



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO
FACOLTÀ DI SCIENZE AGRARIE E ALIMENTARI
CORSO DI LAUREA IN
VALORIZZAZIONE E TUTELA DELL'AMBIENTE E
DEL TERRITORIO MONTANO

STRATEGIE ALIMENTARI PER MITIGARE LA PRODUZIONE
DI METANO ENTERICO NELLE BOVINE DA LATTE

Relatore: Prof. Alberto Tamburini

Elaborato Finale di:

Martino Piva

Matricola: 906688

Anno Accademico 2019-2020

INDICE

RIASSUNTO.....	4
1. INTRODUZIONE.....	6
1.1 Consistenza del patrimonio zootecnico e produzioni di latte	6
1.2 Gas serra (GHG).....	6
1.3 Crescita demografica e Alimentazione.....	9
1.4 Rumine	10
1.4.1 Descrizione ruminanti.....	10
1.4.2 Anatomia e fisiologia del rumine.....	11
1.5 Microbiologia Ruminale	12
1.5.1 Batteri	14
1.5.2 Batteri metanogeni	15
1.5.3 Protozoi	18
1.5.4 Funghi.....	19
1.5.5 Fattori che influenzano il microbiota.....	19
1.5.6 Metanogenesi.....	22
1.6 Strategie per ridurre l'emissione di metano enterico	23
2. METODI DI RIDUZIONE DELLA SINTESI DI METANO ENTERICO	25
2.1 Gestione della razione.....	25
2.1.1 Foraggi.....	25
2.1.2 Concentrati.....	27
2.2 Additivi alimentari	28
2.2.1 Antibiotici	29
2.2.2 Composti alogenati	31
2.2.3 Alghe.....	32
2.2.4 Nitrocomposti.....	37
2.2.5 Metaboliti secondari vegetali.....	40
2.2.6 Integrazione lipidica	51
2.2.7 Biochar	52
2.2.8 Alimentazione microbica diretta.....	53
3. CONCLUSIONI.....	57
<i>Bibliografia</i>	62

RIASSUNTO

Il presente elaborato ha affrontato il tema delle strategie alimentari atte a ridurre l'emissione di metano enterico da parte delle bovine da latte. L'emissione di metano imputata all'allevamento dei ruminanti costituisce una delle attuali principali critiche al settore zootecnico, poiché si stima che costituisca a livello globale circa il 40% delle emissioni del settore agricolo. Bovini da carne e da latte sono in grado di convertire grandi quantità di sostanza organica vegetale in prodotti ad alto valore nutritivo. Tuttavia questo successo evolutivo è legato ad una perdita energetica del 2-12% del contenuto energetico dell'alimento ingerito sotto forma di metano attraverso l'eruttazione. Pertanto di fronte all'aumento previsto nei prossimi decenni della domanda di alimenti di origine animale (latte e carne in particolare) guidato dalla crescita demografica prevista, si rende necessario sviluppare strategie efficienti nella mitigazione delle emissioni dei ruminanti.

Attualmente gli studi hanno seguito due approcci differenti, quali la gestione della razione e l'utilizzo di additivi con effetto inibitorio. Le strategie più interessanti per i produttori sfruttano metodi di modificazione della razione alimentare. Ad esempio la variazione delle quantità e qualità dei foraggi utilizzati e la proporzione tra foraggi e concentrati costituiscono metodi facilmente applicabili negli allevamenti e che svolgono un effetto negativo sulla produzione di metano nonostante l'impatto risulti essere da basso a moderato (fino al 20%).

L'approccio più promettente sembra essere tuttavia l'utilizzo di additivi con effetto inibitorio della produzione di metano. Notevole interesse è stato riposto nell'individuazione di metaboliti secondari vegetali, tuttavia solo pochi additivi hanno dimostrato di ridurre la sintesi di metano *in vitro* ed ancora meno *in vivo*. Altri studi hanno proposto di utilizzare direttamente l'integrazione di batteri, batteriocine o metaboliti fungini, infatti sono stati ottenuti risultati interessanti anche se molto variabili. Considerando l'estrema diversità di batteri, batteriocine, metaboliti secondari vegetali e fungini esistenti in natura ed il

numero esiguo di composti analizzati finora per questo scopo, rimane auspicabile un continuo interesse da parte della comunità scientifica in questo campo.

Recentemente è stato proposto di utilizzare sottoprodotti industriali e forestali come additivi anche per diminuire la produzione di metano enterico. In quest'ambito è stato studiato l'effetto di Biochar, osservando tuttavia risultati contrastanti e perciò il suo utilizzo rimane in discussione. Gli inibitori più promettenti rimangono il 3-NOP e le macro alghe rosse. Il 3-NOP risulta essere altamente specifico dimostrando riduzioni fino al 50% con dosaggi ridotti, senza variazioni significative dei parametri fisiologici delle bovine. Infatti attualmente questo additivo è in attesa di approvazione per la commercializzazione. Le macro alghe rosse hanno mostrato da subito riduzioni consistenti fino al 65%. Queste sembrano causare degli effetti negativi sul livello d'ingestione e sulla produzione, sebbene aumentino l'efficienza alimentare. La dose di inclusione adatta dev'essere ancora dimostrata a cause del numero limitato di studi effettuati.

Attualmente la ricerca di inibitori di diversa origine è significativamente attiva, nonostante siano stati individuati un numero esiguo di additivi efficaci ed utilizzabili su scala globale e nelle diverse situazioni. Perciò è auspicabile che la ricerca futura amplifichi le conoscenze disponibili per identificare strategie alimentari alternative. Inoltre perseguendo lo scopo di mitigare la produzione di metano enterico in modo sostenibile risulta necessario effettuare valutazioni riguardo l'intero ciclo produttivo dei possibili inibitori individuati.

1. INTRODUZIONE

1.1 Consistenza del patrimonio zootecnico e produzioni di latte

In Italia il patrimonio zootecnico, a dicembre 2019, contava 1.498.847 bovine da latte, distribuite in 26.530 allevamenti (BDN, 2019).

Il trend negativo, relativo al numero di allevamenti, osservato in tutto il mondo si conferma anche in Italia, mantenendo tuttavia stabile il numero di capi ed aumentando la produzione di latte. In Europa si può notare come il numero di capi sia pari a 22.627.300, distribuiti in circa 600.000 allevamenti (EUROSTAT, 2019). La produzione europea di latte si attesta oggi a 168.057.490 t, che rappresenta il 31,5% a livello globale (FAOSTAT, 2019).

1.2 Gas serra (GHG)

I gas serra sono gas presenti nell'atmosfera e responsabili dell'innalzamento della temperatura della Terra. Necessari per creare le condizioni ideali per la vita, sono presenti in natura a basse concentrazioni, tuttavia raggiungono ogni anno quantità sempre più elevate, a causa dell'attività antropica, aumentando il riscaldamento globale e con esso i cambiamenti climatici. I principali gas a effetto serra (GHG) e le loro quantità relative sono vapore acqueo, H₂O (36-70%), anidride carbonica, CO₂ (9-26%), metano, CH₄ (4-9%) e protossido di azoto N₂O (3-7%) più altri gas in concentrazioni minori (Yusuf *et al.*, 2012).

L'importanza di ogni gas ad effetto serra viene stabilita in funzione del suo contributo al riscaldamento globale, utilizzando l'indice noto come *Global Warming Potential* (GWP, potenziale di riscaldamento globale). L'indice si basa su una scala relativa che confronta ogni gas con il biossido di carbonio, il cui GWP ha per definizione il valore 1. Viene utilizzato come fattore di conversione per calcolare le emissioni di tutti i gas serra in emissioni di CO₂ equivalente (IPCC, 2007). In particolare il GPW a 100 anni calcolato per il metano è circa 25 (IPCC, 2007) rendendo così il contributo relativo al cambiamento climatico importante. Il metano viene emesso sia naturalmente sia per via antropica. Le fonti antropiche

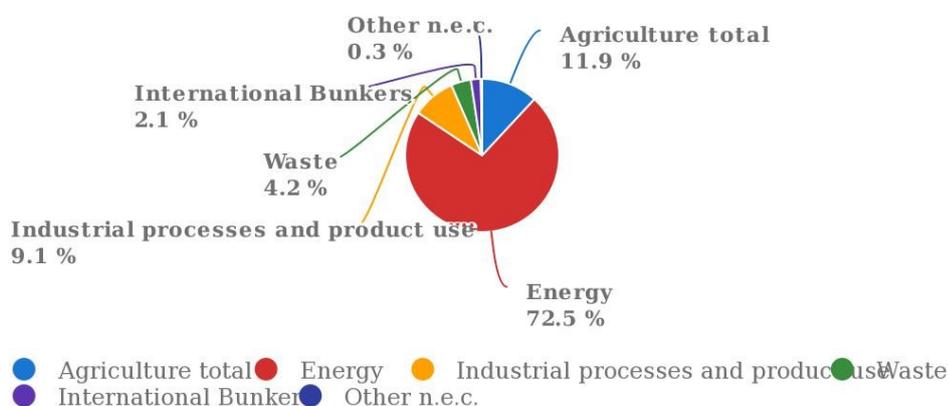
sono generalmente raggruppate in tre settori: l'energia, i rifiuti e l'agricoltura; nell'ultimo si osserva la maggior quantità di metano emesso seguito rispettivamente dal settore energetico e da quello dei rifiuti.

Osservando l'emissione totale dei gas serra globalmente dei vari settori, l'agricoltura è risultata responsabile dell'11,9% (FAOSTAT, 2017; figura 1.1) e di 9,9% nella UE a 28 stati (EUROSTAT, 2018).

Figura 1.1 - Percentuale di emissione di gas serra per settore.

Share of each sector in total emissions with land use

World + (Total), 2017

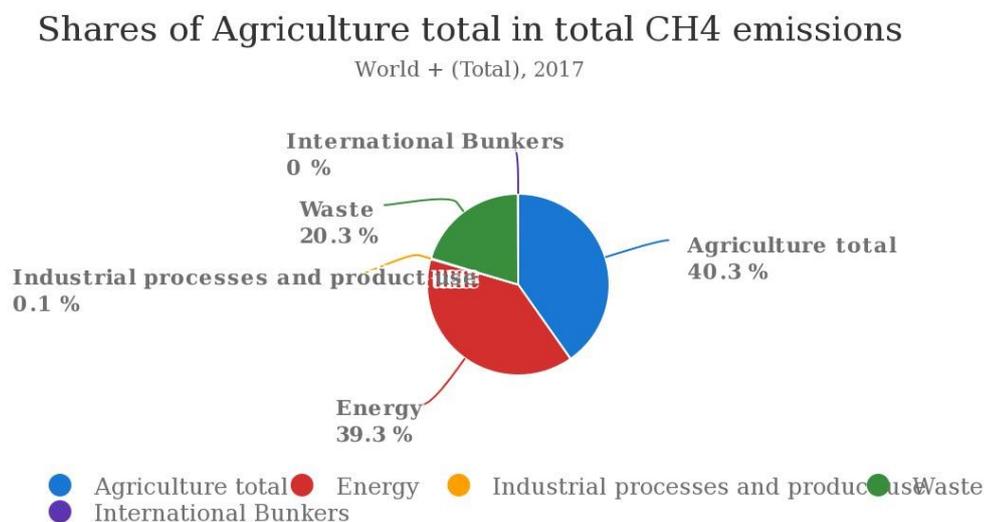


Source: FAOSTAT (Feb 06, 2021)

Lo sviluppo di particolari processi digestivi, da parte dei ruminanti in simbiosi con i microrganismi ruminali, ha permesso loro di utilizzare il carbonio organico contenuto nei polisaccaridi delle specie vegetali. Da questo punto di vista i ruminanti svolgono un ruolo cruciale nel convertire prodotti indigeribili per l'uomo in prodotti digeribili. Questo successo evolutivo è affiancato ad un'importante perdita di energia sotto forma di metano (Johnson *et al.*, 1995).

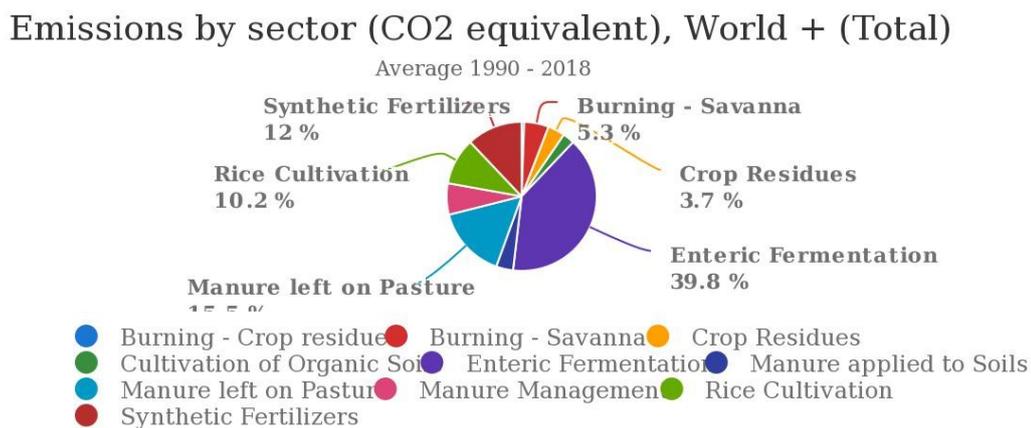
Infatti, andando ad analizzare solamente la percentuale di metano emesso dai diversi settori si può notare come l'agricoltura raggiunga il 40,3% a livello globale (FAOSTAT, 2017; figura 1.2) raggiungendo il 53,7% in Europa 28 (EUROSTAT, 2018).

Figura 1.2 - Percentuale di emissione di CH₄ per settori.



Inoltre, analizzando le diverse voci all'interno del settore agricolo, si nota come sia composta per quasi il 40% da emissioni derivanti dalle fermentazioni enteriche (FAOSTAT, 2018; figura 1.3). In Europa si parla di poco oltre le 200.000 tonnellate di CO₂ equivalenti (FAOSTAT, 2018).

Figura 1.3 - Percentuali di CO₂ equivalenti all'interno del settore agricolo.



In Italia, nel 2018, l'agricoltura ha rappresentato il terzo settore per emissione di gas serra con il 7,1%, tuttavia è stato il primo osservando l'emissione di solo

metano con il 44,7% del totale, di cui, quelle imputabili alle fermentazioni ruminanti, sono state pari al 73,8%. I bovini da latte sono risultati responsabili del 45,2% (256,56 Gg) di tali emissioni, mentre quelli non da latte per il 35,8% (203,61 Gg) (Romano *et al.*, 2020).

Tabella 1.1 - Trend dell'emissione dei gas serra in Italia.

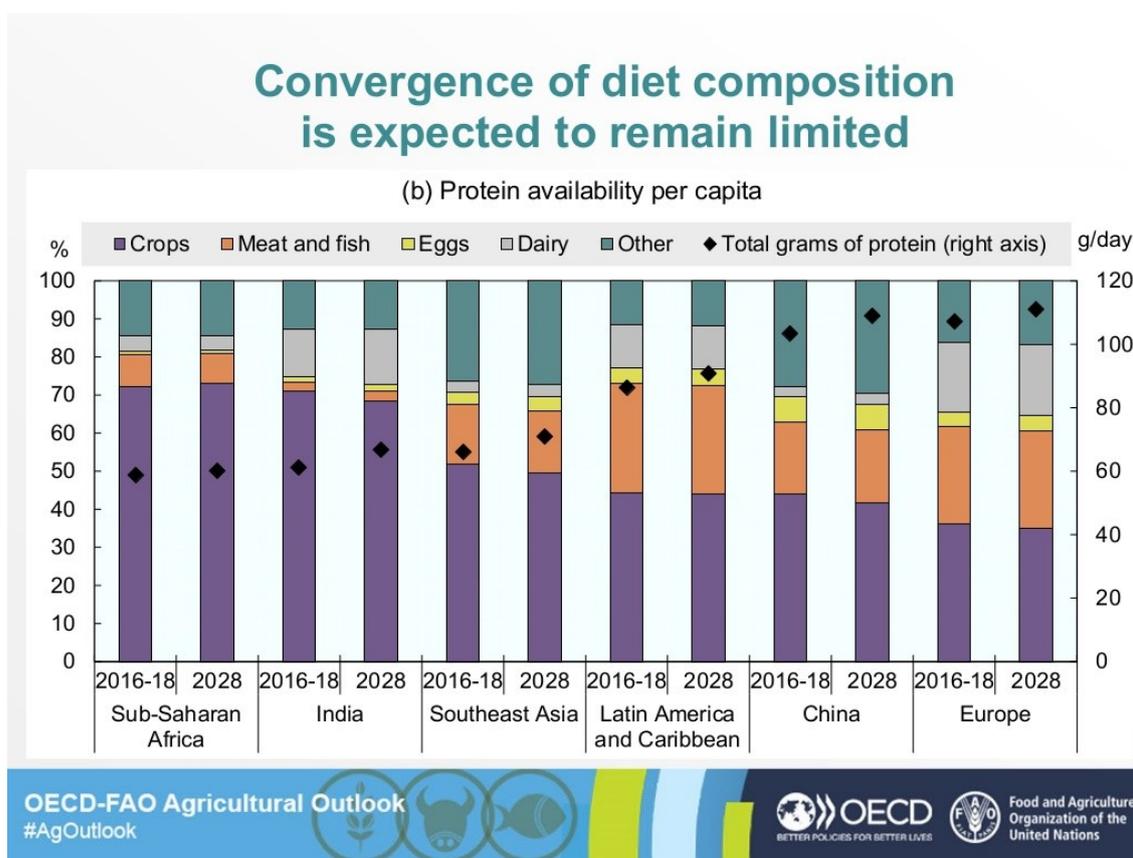
	1990	1995	2000	2005	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
CH ₄	21,336	21,108	20,483	19,189	19,142	19,195	19,100	19,189	19,021	19,185	19,311	19,412	19,250
N ₂ O	12,907	13,225	13,096	12,330	10,652	11,109	11,532	10,858	10,710	10,676	10,980	10,778	10,516
CO ₂	466	513	527	521	353	376	567	465	423	438	539	436	421
Total	34,709	34,846	34,107	32,040	30,147	30,681	31,199	30,512	30,154	30,299	30,831	30,625	30,187

La tabella 1.1 mostra il trend dell'emissione di gas serra dal 1990 al 2018, riportata in Gg CO₂ equivalenti, del settore agricolo: in particolare si può notare come il totale sia diminuito del 13,0%. ISPRA (2020) attribuisce le ragioni di questa diminuzione alla riduzione del numero di capi allevati, della superficie coltivata/produzione di colture e della quantità di fertilizzanti azotati sintetici applicati oltre che dai cambiamenti nei sistemi di gestione dei reflui zootecnici.

1.3 Crescita demografica e Alimentazione

La crescita demografica, che secondo l'ONU (stima del 2019, aggiornata) toccherà 8,5 miliardi nel 2030, 9,7 miliardi nel 2050 e 10,9 miliardi nel 2100, causerà un aumento della domanda di alimenti, generando un aumento della produzione di prodotti di derivazione animale: in particolare per il latte, si stima pari a 1,6% (OECD/FAO, 2020). Secondo il rapporto della OECD, Agricultural Outlook 2016-2028 la composizione delle diete alimentari è destinata a rimanere inalterata (figura 1.4), concorrendo insieme alla crescita demografica ed all'aumento dei redditi ad un incremento della domanda di prodotti di origine animale.

Figura 1.4 - revisione della composizione proteica della dieta.



Questo, si prevede, porterà ad un aumento di emissioni di GHG del 51%, da $7,6 \pm 0,1$ Gt per anno (misurate in equivalenti di CO_2) nel 2005/2007 a $11,4 \pm 0,2$ Gt nel 2050 (Springmann *et al.*, 2016).

1.4 Rumine

1.4.1 Descrizione ruminanti

Da un punto di vista fisiologico i mammiferi, e più precisamente gli erbivori, hanno sviluppato compartimenti specializzati per ospitare un ecosistema complesso costituito da diversi microrganismi che gli permettono di degradare con maggiore efficienza la sostanza organica vegetale. Gli erbivori dipendono dal microbiota per mantenere la loro salute e le loro prestazioni. Sulla base della posizione e sulla quantità di questi compartimenti possiamo differenziare: ruminanti (per esempio

Bovini, capre e pecore), pseudo ruminanti (per esempio Camelidi e ippopotami) ed erbivori dell'intestino posteriore (elefanti, asini, cavalli e zebre). Nei ruminanti e nei pseudo ruminanti, i microrganismi presenti nei pre-stomaci svolgono anche una funzione nutritiva in quanto fonte di proteine ad alto valore biologico e vitamine, a differenza degli erbivori dell'intestino posteriore.

1.4.2 Anatomia e fisiologia del rumine

Per affrontare il tema oggetto di studio è necessario analizzare brevemente le principali caratteristiche anatomiche e fisiologiche del rumine. I bovini sono caratterizzati dall'aver 3 pre-stomaci posti tra l'esofago e lo stomaco vero e proprio. I pre-stomaci sono rumine, reticolo e omaso, seguiti appunto dallo stomaco vero, detto abomaso. In questo sistema complesso di compartimenti avviene una prima digestione a carico della comunità microbica presente mentre successivamente, nello stomaco e nell'intestino, avviene una digestione enzimatica.

Il rumine è il primo dei pre-stomaci, il più voluminoso (120-200 l) ed è l'organo in cui avvengono i processi fermentativi per via dell'ambiente anaerobico e per la presenza di una comunità microbica estremamente ricca e complessa. È posto nel lato sinistro della cavità addominale ed è esso stesso diviso in compartimenti tramite pilastri muscolari che formano i sacchi dorsale, ventrale, caudo-dorsale e caudo-ventrale. La superficie interna del rumine è ricoperta di numerose papille di diversa forma e dimensione. Svolgono funzione meccanica rimescolando il contenuto ruminale ed assorbente nei confronti di piccole molecole. L'epitelio che riveste il rumine svolge la funzione di assorbimento della miscela acidi grassi volatili (AGV), prodotti dal microbiota ruminale, che fungono da substrato energetico per l'animale. Sono acetato, butirrato e propionato nelle rispettive concentrazioni 70:20:10, anche se queste possono variare in funzione della dieta (Dieho *et al.*, 2016). L'aumentare delle pressioni parziali di questi acidi causerebbe un forte abbassamento del pH ruminale, che è tuttavia mantenuto abbastanza costante grazie all'azione di assorbimento svolta dall'epitelio e ad una maggiore introduzione di saliva. Oltre a questo fondamentale ruolo, funge anche

da barriera alle potenziali sostanze nocive presenti nel lume prevenendo danni all'intero organismo (Baaske *et al.*, 2020).

Da un punto di vista fisiologico, il bolo alimentare arriva, dopo una prima masticazione grossolana, al rumine con una grande quantità di saliva. Qui inizia la degradazione dell'alimento a carico della comunità batterica, accomunata ad un movimento ritmico muscolare della parete ruminale che consente una distribuzione più uniforme dei microrganismi all'interno del contenuto del rumine. La degradazione microbica non causa di per sé una grande triturazione dei tessuti vegetali, ma ad intervalli, nel periodo successivo l'alimentazione, delle contrazioni muscolari riportano il bolo mericico dal rumine alla bocca, dove avviene la seconda masticazione più fine, detta ruminazione. Questa non solo ha il compito di mescolare più intimamente il bolo con una grande quantità di saliva e con i microrganismi, ma effettua un'efficace scomposizione meccanica dell'alimento aumentando la superficie degradabile del substrato.

Una volta tornato nel rumine, la comunità microbica riprende ad idrolizzare le cellulose vegetali, le emicellulose, pectine, fruttosani, amidi e altri polisaccaridi a zuccheri monomerici o dimerici che vengono fermentati, per dare come prodotti finali acido acetico, propionico e butirrico, metano e anidride carbonica. Gli acidi vengono assorbiti attraverso la parete del rumine nel flusso sanguigno ed infine convertiti in zuccheri e lipidi richiesti dall'animale, mentre i gas vengono eruttati. È un fenomeno riflesso indotto dalla presenza di gas e percepito grazie a dei recettori di tensione presenti sulla parete ruminale. L'eruttazione di metano, come osservato nei paragrafi precedenti, costituisce un'importante fonte di gas ad effetto serra di natura antropica, ma per l'animale rappresenta anche una perdita di energia notevole, pari a circa il 2-12% dell'energia alimentare ingerita (Johnson *et al.*, 1995).

1.5 Microbiologia Ruminale

L'insieme dei microrganismi presenti nel rumine formano una comunità estremamente complessa, densa ed attiva; con un'ampia varietà di capacità metaboliche (Stewart, 1997). Responsabile delle fermentazioni ruminali svolge un

ruolo cruciale nel processo digestivo negli esseri viventi che lo hanno sviluppato, in quanto l'energia presente nei carboidrati vegetali complessi viene resa disponibile per l'animale ospite solo grazie alla sua attività.

Comprendere i meccanismi ed i fattori che regolano la struttura microbica è di notevole interesse scientifico, economico ed ambientale. Infatti è stato osservato come questa comunità microbica possa incidere sulla salute, sulla produzione quantitativa e qualitativa dell'ospite (Jami *et al.* 2014) e sull'emissione di metano (Stewart, 1997). L'ecosistema microbico del rumine è costituito da una popolazione simbiotica diversificata di batteri anaerobici, archaea, protozoi ciliati e funghi, tuttavia solo il 10-50% dei batteri ruminali è stato isolato e identificato (Kobayashi, 2006). Questi microrganismi (tabella 1.2) hanno trovato l'ambiente favorevole per la crescita e lo sviluppo, grazie all'abbondante presenza di nutrienti, lievi sbalzi di pH e temperatura costante.

Tabella 1.2 - Microrganismi all'interno del microbiota (Nagaraja, 2016);

Types	Domain	Number (per ml or g of ruminal contents)	Percentage of total microbial mass
Bacteria	Eubacteria	10^9 – 10^{11}	40–90
Methanogens	Archaea	10^5 – 10^8	2–4
Protozoa	Eukarya		0–60
Flagellates		10^2 – 10^3	
Ciliates		10^4 – 10^6	
Fungi	Eukarya	–	10
Bacteriophages	–	10^{11} – 10^{12}	–

All'interno di questa comunità microbica si sono instaurate tutte le tipologie di interazione microbo-microbo quali competizione, commensalismo, parassitismo, sintropismo, predazione e neutralismo. Queste rendono ancor più complesso lo studio e la comprensione del microbiota nel dettaglio.

Le efficienze di produzione, trasferimento e utilizzo di ATP durante la crescita microbica sono fattori importanti che influenzano la sopravvivenza dei microrganismi nel rumine, dove le fonti energetiche vi arrivano in modo abbondante ma periodico. Dunque altrettanto importanti sono le strategie che gli organismi hanno sviluppato per far fronte ai periodi intermedi all'alimentazione. In questi momenti, la capacità di immagazzinare energia può essere cruciale, non solo per mantenere la vitalità, ma per garantire che l'organismo possa rispondere

rapidamente ed efficacemente al successivo afflusso di energia fermentabile fonti (Stewart, 1997).

1.5.1 Batteri

La popolazione batterica è la più diversificata e numerosa con una concentrazione complessiva tra 10^9 e 10^{12} per ml di liquido ruminale. Il numero di batteri riflette la digeribilità dell'alimento, motivo per cui nelle diete a base di cereali è da 10 a 100 volte superiori a quella a base di foraggio (Nagaraja, 2016). Sono strettamente anaerobi e principalmente gram-negativi ma è stato osservato che la presenza di batteri gram-positivi aumenta negli animali nutriti con cereali, raggiungendo il 20-30% del totale (Nagaraja, 2016). Circa il 30% dei batteri fluttuano liberamente nel liquido ruminale, mentre il restante 70% aderiscono alle particelle alimentari, cellule protozoarie, sporangi fungini o cellule epiteliali (Nagaraja, 2016).

I batteri presenti nel rumine variano notevolmente per la loro specificità di utilizzazione del substrato. La maggior parte utilizza monomeri oppure oligomeri che vengono liberati dal materiale vegetale come amido, pectina, cellulosa, emicellulosa e lipidi. Per questo la loro classificazione avviene sulla base dell'attività metabolica e del substrato utilizzato. Questo aiuta l'assegnazione di un ruolo nell'ambiente ruminale delle diverse specie di batteri. Di seguito vengono elencati e descritti brevemente i più importanti gruppi batterici secondo questa classificazione:

- **Cellulosolitici:** importanti degradatori della cellulosa e emicellulosa, prediligono pH compreso tra 6 e 6,8 e sono in grado di scindere il legame β -glicosidico della cellulosa. Questa capacità gli permette di idrolizzare lentamente la cellulosa dapprima in cellulodestrine, successivamente in cellobioso ed infine due molecole di glucosio. È noto come per riuscire a degradare la cellulosa questi batteri necessitano di aderire all'alimento attraverso delle proteine (Stewart, 1997). I più importanti sono: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *R. flavefaciens* e *Butyrivibrio fibrisolvens*, *B. fibrisolvens* (Stewart, 1997). In numero inferiore sono stati osservati sporadicamente anche *Eubacterium cellulosolvens* e *Clostridium longisporum*;

- **Amilolitici:** fermentano i carboidrati non strutturali (zuccheri, amidi, pectine e β -glucani), crescono rapidamente di numero e prediligono pH compreso tra 5,5 e 6. Attraverso la produzione di α -amilasi extracellulare riescono a scindere l'amido in malto-oligosaccaridi e successivamente in catene carboniose (Stewart, 1997). Le specie più presenti sono: *Streptococcus bovis*, *Bacteroides amylophilus*, *Bacteroides ruminicola*, *Succinivibrio dextrinosolvens*, *Succinomonas amyloolitica*, *Selenomonas ruminantium*, *Eubacterium ruminantium*;
- **Lattici:** sono un gruppo di batteri importanti in quanto concorrono nel causare la forma acuta di acidosi lattica (Stewart, 1997). I batteri più importanti sono membri del genere *Lactobacillus*, *Streptococcus bovis*;
- **Utilizzatori del lattato:** *Veillonella alcalescens*, *Megasphaera elsdenii* e *Selenomonas ruminantium* sono utilizzatori dell'acido lattico. In condizioni normali riescono a mantenere bassa la sua concentrazione all'interno del ruminando utilizzandolo come substrato;
- **Lipolitici:** sono in grado di degradare i differenti componenti lipidici presenti nella dieta attraverso la sintesi extracellulare di lipasi, e anche se non sono molto presenti né importanti, il più abbondante è *Anaerovibrio lipolytica*;
- **Proteolitici:** idrolizzano le proteine presenti nell'alimento per ricavare energia, ma anche aminoacidi, peptidi e NH_3 . Questi vengono utilizzati nella sintesi di proteine batteriche oppure essere ulteriormente degradati. I più importanti appartengono ai seguenti generi: *Bacteroides*, *Butyrivibrio*, *Selenomonas* e *Succinivibrio*;

È necessario osservare che tale classificazione non è sempre rispettata in quanto numerose specie batteriche sono in grado di utilizzare più substrati energetici o di svolgere più di una delle funzioni sopra citate in funzione delle condizioni ambientali (Stewart, 1997).

1.5.2 Batteri metanogeni

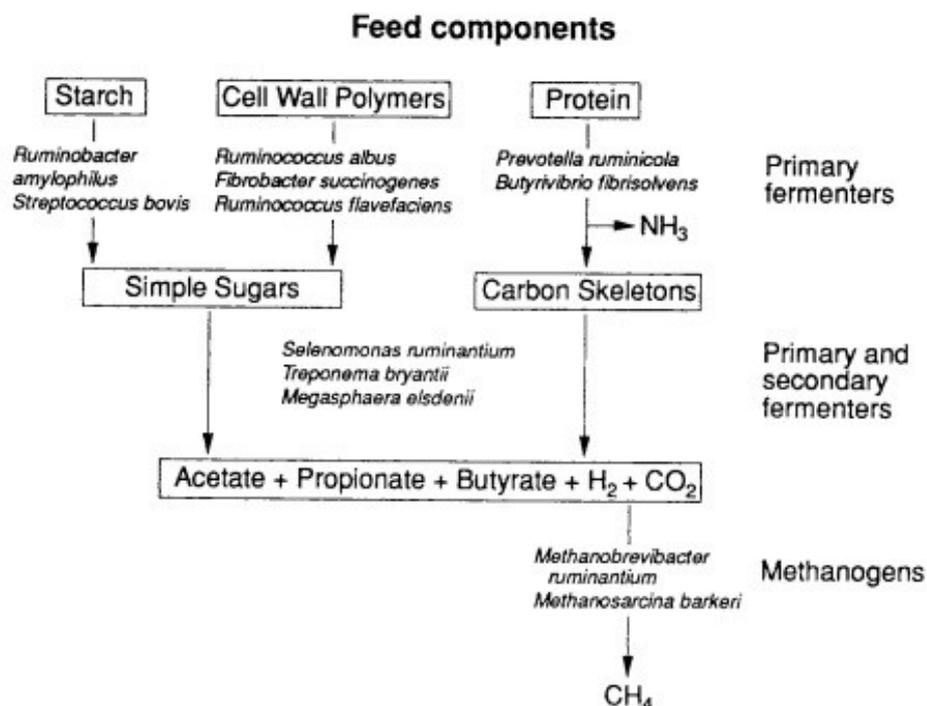
La conoscenza della comunità metanogena ruminale rappresenta il punto di partenza nello sviluppo di strategie mirate al mitigare la produzione di metano dei bovini. Infatti questa popolazione microbica è attualmente oggetto di studio

per la comunità scientifica in quanto diretti responsabili della produzione di metano.

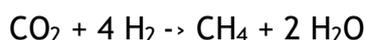
Appartengono al dominio degli *Archaea* e differiscono dai batteri per la composizione dei lipidi intercellulari, per l'assenza di polimeri di peptidoglicani nelle pareti cellulari e per il punto di vista fenotipico (Krause *et al.*, 2014).

I metanogeni sono anaerobi obbligati e preferiscono un pH compreso tra 6 e 8 (Boadi *et al.*, 2004). Va sottolineato che, come i batteri cellulolitici, sono sensibili a sbalzi di pH, ed è anche per questo motivo che l'aggiunta di concentrati alla dieta può causare una riduzione del metano enterico (Knapp *et al.*, 2014). Nel microbiota sono stati osservati almeno quattro ordini diversi: *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales* e *Methanomassiliicoccales*. In particolare la maggior parte (92%) degli *Archaea* ruminali può essere collocata in tre gruppi a livello di genere. Questi sono *Methanobrevibacter* (62%), *Methanomicrobium* (15%) e un grande gruppo di archeobatteri ruminali non coltivati classificati come cluster ruminale C o RCC (16%) (Janssen *et al.*, 2008). Queste proporzioni differiscono notevolmente all'interno della letteratura scientifica e non è ancora chiaro da quali fattori siano dovute tali differenze. Tuttavia *Methanobrevibacter spp.* è risultato essere il genere dominante all'interno di diversi studi (Yang *et al.*, 2019). I metanogeni nel rumine si trovano liberi nel fluido ruminale, aderenti al materiale particolato e ai protozoi ruminali, associati come endosimbionti all'interno dei protozoi ruminali e attaccati all'epitelio ruminale.

Figura 1.5 - Schema riassuntivo delle fermentazioni ruminali (McAllister *et al.*, 1996).



Il metabolismo energetico dei metanogeni è limitato alla formazione di metano da CO_2 e H_2 , formiato, metanolo, metilammine e acetato e si trovano all'ultimo step delle fermentazioni ruminali. Tutti i membri dei *Methanosarcinales* contengono citocromi, e questo gli permette di avere un ampio spettro di substrato e di essere più efficienti. Tuttavia sono una piccola minoranza nella popolazione degli *Archaea*. Negli altri ordini sono assenti i citocromi, dunque riducono solo la CO_2 con H_2 a metano, sebbene alcuni membri possano anche usare il formiato come donatore di elettroni (Thauer *et al.*, 2008). Nel rumine, il percorso predominante è l'idrogenotrofico, utilizzando CO_2 come fonte di carbonio e H_2 come principale donatore di elettroni (Janssen *et al.*, 2008; figura 1.5) secondo la reazione:



L'idrogeno molecolare svolge un ruolo chiave all'interno del rumine (Janssen *et al.*, 2010) anche se raramente raggiunge alte concentrazioni nel rumine. Le basse concentrazioni e la scarsa solubilità in acqua di H_2 ha spinto i metanogeni a sviluppare un contatto fisico ed interazioni simbiotiche con i produttori di

idrogeno. Più in particolare è stata osservata la presenza di importanti associazioni di endo- ed ecto- simbiosi da parte dei metanogeni con i protozoi ciliati (Finlay *et al.*, 1994). Si stima siano circa il 9-25% dei metanogeni ruminali e contribuiscono a quasi il 37% della produzione di metano (Finlay *et al.*, 1994). L'abbondanza complessiva di questa popolazione microbica non è sempre correlata positivamente con le emissioni di metano, ad esempio, la dimensione della comunità metanogena e le produzioni di metano non hanno mostrato alcuna corrispondenza (Morgavi *et al.* 2012). Pertanto, la composizione della comunità metanogena potrebbe contribuire più delle sue dimensioni alle emissioni di metano (Yang *et al.*, 2019). Delle interazioni non sono state ancora osservate tra batteri metanogeni e funghi anaerobici sebbene sia noto che contengono mitocondri modificati, detti idrogenosomi, che producono H₂ (Li *et al.*, 2017). In cambio della produzione di idrogeno molecolare i metanogeni svolgono un effetto benefico sulla crescita e l'attività dei funghi.

1.5.3 Protozoi

Costituiscono la microfauna ruminale in cui trovano l'ambiente ideale per la crescita raggiungendo popolazioni di 10⁵-10⁶ cellule/ml che rappresenta lo 0,01% delle cellule microbiche (Stewart, 1997). Nonostante ciò, grazie alle più grandi dimensioni, possono contribuire alla biomassa ruminale anche per il 50% (Newbold *et al.*, 2015). Sono presenti alcuni generi di protozoi flagellati ma i più importanti e numerosi sono ciliati.

In base ai ruoli e alle caratteristiche morfologiche, i ciliati vengono classificati in due gruppi: holotrichs e entodiniomorphs. I generi più comuni sono *Isotricha* e *Dasytricha*, entrambi afferenti al gruppo holotrichs e sono interamente ricoperti di ciglia, mentre il genere più frequente è *Entodinium* appartenente al gruppo entodiniomorphs, con protozoi ricoperti di ciglia solo in zone ristrette. Una delle differenze principali tra i due gruppi sembra essere la capacità di idrolizzare o meno polisaccaridi strutturali e quindi di utilizzare substrati fermentativi diversi (Nagaraja, 2016).

Il ruolo della comunità protozoaria all'interno del ruminante non è ancora totalmente compresa, tuttavia molti comportamenti sono ora ben noti. Tutti i ciliati effettuano una predazione nei confronti di batteri e zoospore, seguendo criteri

casuali dipendente solo dalla concentrazione batterica e fungina (Nagaraja, 2016). Alcune specie competono con i batteri amilolitici per l'amido alimentare, che fermentano principalmente in acetato (Stewart, 1997). Un'altra importante funzione è la produzione di idrogeno ruminale (H_2) principalmente convertito in metano (CH_4) dai metanogeni situati all'interno o sulla loro superficie esterna (Finlay *et al.*, 1994). Tale interazione in passato ha portato interesse nella ricerca scientifica, suggerendo che l'eliminazione dei protozoi ruminanti, detta *defaunation*, potrebbe essere utilizzata per incrementare la produzione di propionato da parte dei batteri amilolitici e per ridurre la sintesi di metano (Johnson *et al.*, 1995). Tuttavia recenti studi hanno dimostrato come la defaunazione ha spostato le fermentazioni verso la produzione di più propionato e meno metano solo per un breve periodo di tempo, alla fine del quale è stata osservata la produzione di meno propionato e più metano (Morgavi *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2018).

1.5.4 Funghi

I funghi anaerobici nonostante siano stati documentati per la prima volta più di 100 anni fa furono erroneamente identificati come protozoi flagellati. Sono stati riclassificati da Orpin nel 1975 come funghi anaerobici appartenenti al phylum fungino *Chytridiomycetes*. Nel 2007, sono stati riconosciuti come un phylum distinto, il *Neocallimastigomycota* (Hibbett *et al.*, 2007). Le specie osservate più comuni sono *Neocalimastix patriciarum*, *Anaeromyces mucronatus* e *Orpinomyces bovis* (Hess *et al.*, 2020). All'interno del ruminante è stato dimostrato che rivestono dei ruoli importanti quali degradatori altamente efficienti di materiali lignocellulosici e creatori di interazioni simbiotiche con archeobatteri metanogeni descritte in precedenza (Li *et al.*, 2017).

1.5.5 Fattori che influenzano il microbiota

È noto che le popolazioni microbiche vengono selezionate da una serie di fattori tra cui regime alimentare e soprattutto i suoi cambiamenti, razza bovina (Guan *et al.*, 2008; Jami *et al.*, 2014; Henderson *et al.*, 2015; Wallace *et al.*, 2019), età dell'animale (Guzman *et al.*, 2015; Chun *et al.*, 2020). Anche la posizione

geografica e la stagione sono stati identificati come fattori che possono influenzare l'ecosistema ruminale (Stewart, 1997).

Il cambiamento della dieta e quindi dei substrati per la degradazione primaria ha un importante effetto a cascata sul metabolismo microbico del rumine, con conseguenti cambiamenti sia nei profili degli acidi organici che nei livelli di metano prodotti (Stewart, 1997) che incidono sulla qualità e quantità della produzione animale.

Gli studi (Henderson *et al.*, 2015) dimostrano le variazioni dell'abbondanza relativa di alcuni gruppi tassonomici rispetto ad altri in funzione della dieta. Più in particolare, per esempio, i membri dell'ordine *Clostridiales* sono più abbondanti nei bovini alimentati con diete ricche di foraggi e meno abbondanti nei bovini nutriti con diete ad alto contenuto di concentrati. Anche il genere *Fibrobacter* mostra un comportamento simile, in quanto più abbondante in bovini alimentati con foraggi mentre quando è stato aggiunto del concentrato alla dieta l'abbondanza relativa è diminuita (Henderson *et al.*, 2015). Il comportamento del genere *Fibrobacter* può essere spiegato dal fatto che concorre alla degradazione della cellulosa contenuta nelle fibre vegetali.

De Menezes *et al.* (2010) hanno studiato la struttura della comunità microbica ruminale in relazione alle emissioni di metano, alimentando due gruppi di bovine con le diete più utilizzate ovvero pascolo e razione mista totale (TMR). In particolare, con le bovine alimentate al pascolo l'abbondanza sia delle *Prevotellaceae* che delle *Veillonellaceae* ha causato una produzione di propionato maggiore, in quanto specie note per la produzione di propionato. L'abbondanza di questi batteri produttori di propionato potrebbe aver deviato H₂ dalla metanogenesi alla produzione di acido propionico, riducendo i livelli di emissione di metano. Questa riduzione è stata quantificata come il 60% in meno di metano per vacca e, se corretto per l'assunzione di sostanza secca, una riduzione dell'11% (O'Neill *et al.*, 2011). Le distinte comunità batteriche, che si sono sviluppate in questo caso, probabilmente variano nel loro potenziale metabolico, con il risultato che diversi metaboliti diventano disponibili, per l'attività metanogena a valle (Stewart, 1997; Ellis *et al.*, 2008).

Un'altra osservazione interessante, presente nei precedenti studi, è l'indipendenza della popolazione di protozoi in funzione della dieta. Il fattore

principale che ha modellato la struttura della comunità dei protozoi era il singolo animale stesso, con differenze pronunciate tra gli animali.

Nel complesso, la dieta costituisce un fattore importante della struttura della comunità microbica. Ciò può derivare dal fatto che le caratteristiche fisiche e chimiche dell'alimento selezionino le diverse nicchie microbiche disponibili.

Dal punto di vista genetico, è noto come la funzione del ruminale e la produttività dei ruminanti possano essere previste dall'abbondanza di un piccolo numero di microrganismi del microbiota, a loro volta legati al genoma dell'ospite in quanto mostrano stime significative di ereditabilità (Jami *et al.*, 2014; Wallace *et al.*, 2019).

In sintesi è stato osservato come l'abbondanza di alcuni generi tassonomici rispetto ad altri all'interno del nucleo di microrganismi è spiegata in misura significativa dalla genetica dell'ospite. In alcuni studi è stato osservato che questa piccola comunità è costituita da meno dello 0,25% del pool complessivo di specie microbiche, e più precisamente 512 su 250.000 OTU (unità tassonomiche operative), tuttavia è molto abbondante, rappresentando dal 30 al 60% del microbioma complessivo (Wallace *et al.*, 2019). Questi microbi del nucleo mostrano una struttura di rango di abbondanza indipendente dalla geografia, razza e dieta, dove l'ordine di abbondanza delle specie è mantenuto quasi identico tra i diversi individui. È interessante notare come la genetica dell'ospite influenzi anche la quantità di emissioni di metano (Henderson *et al.*, 2015), infatti è stato dimostrato che la variazione delle emissioni di metano attribuibile alla genetica dell'ospite possa essere del 19-24% e che la comunità batterica, da sola, potrebbe essere responsabile del 6-7% della variazione (Difford *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2020), mostrando tuttavia stime significative di ereditabilità pari al 16-44%.

La genetica dell'ospite sembrerebbe influenzare anche l'assunzione di mangime residua (RFI), che viene utilizzata come indice attraverso la struttura del microbiota ruminale. È stato osservato che sia moderatamente ereditabile ed indipendente dalla crescita e dalla corporatura dell'ospite (Guan *et al.*, 2008). L'indice RFI misura il grado di efficienza dei capi ed è definito come la differenza tra l'effettiva assunzione di mangime da parte dell'animale e il suo fabbisogno alimentare previsto per il mantenimento e la crescita. Gli animali più efficienti quindi, che sono bovini con bassa RFI (L-RFI), dovrebbero avere una ridotta

assunzione di mangime ma prestazioni simili ai bovini con alta RFI (H-RFI), che risultano animali meno efficienti. L'analisi della struttura microbica ha indicato che specifici gruppi batterici possono essere presenti solo nei bovini L-RFI (Guan *et al.*, 2008).

1.5.6 Metanogenesi

La sintesi di metano deriva dalla fermentazione anaerobica di carboidrati complessi contenuti nei tessuti vegetali, effettuata dalla comunità microbica ruminale. In particolare viene prodotto per l'87% nel rumine mentre la restante parte nel cieco costituendo una perdita del 2-12% dell'energia lorda alimentare (Boadi *et al.*, 2004). Ciò influisce negativamente sulla potenziale conversione dell'energia alimentare in Energia Metabolizzabile, rappresentando una delle più importanti inefficienze nei sistemi di produzione dei ruminanti (Johnson *et al.*, 1995).

I principali substrati utilizzati dai metanogeni sono H₂ e CO₂, ciò costituisce anche la via più importante di eliminazione dell'idrogeno molecolare presente nel rumine. Così facendo la pressione parziale di H₂ viene generalmente mantenuta ad un livello basso, evitando l'azione inibente che svolge sulle vie fermentative attraverso meccanismi di feedback negativo (Yang *et al.*, 2019). In condizioni normali, la pressione parziale di H₂ viene mantenuta in un determinato range (da 1 a 10 Pa) in modo da rendere svantaggioso, dal punto di vista energetico, l'utilizzo di idrogeno molecolare come substrato, riducendo le competizioni tra i vari microrganismi ed i metanogeni (Yang *et al.*, 2019). Oltre alla concentrazione di H₂, mantenuta in un determinato range favorevole per i metanogeni, questi sono avvantaggiati grazie alla creazione di interazioni con le popolazioni microbiche di produttori di H₂, discusse in precedenza.

Nel rumine, dunque, i carboidrati semplici e complessi vengono idrolizzati a zuccheri a 5 e 6 atomi di carbonio dall'attività enzimatica microbica. Gli zuccheri vengono fermentati in AGV attraverso vie metaboliche a più fasi, che possono essere riassunte nelle seguenti equazioni (Knapp *et al.*, 2014):

- Glucosio → 2 piruvato + 4H (metabolismo dei carboidrati)

- Piruvato + H₂O → acetato + CO₂ + 2H
- Piruvato + 4H → propionato + H₂O
- Acetato + 4H → butirrato + 2H₂O
- CO₂ + 8H → CH₄ + 2H₂O (metanogenesi)

1.6 Strategie per ridurre l'emissione di metano enterico

La letteratura scientifica stima che le riduzioni delle emissioni originate dal solo cambiamento alimentare, passando quindi a diete a base di prodotti vegetali, non siano sufficienti per ottenere una stabilizzazione del clima tale da limitare l'aumento della temperatura globale entro i 2 ° C (Springmann *et al.*, 2016). Ne consegue la necessità di trovare un equilibrio tra l'adozione di diete a base vegetale ed i progressi nelle strategie e nelle tecnologie di mitigazione delle emissioni di GHG nel settore alimentare.

Come riportato nei paragrafi precedenti, l'allevamento di bovini, incide particolarmente sulle emissioni globali di gas serra. La letteratura scientifica (Knapp *et al.*, 2014; Kumari *et al.*, 2020) ha evidenziato come la riduzione della produzione di metano durante i processi fermentativi all'interno del ruminante può essere ricercata utilizzando tre grandi strategie:

- **Manipolazione della dieta:** approccio a breve termine in quanto genera subito delle riduzioni nell'emissione di metano. Si tratta di manipolare la razione alimentare delle bovine con lo scopo di ridurre o di inibire la sintesi di metano all'interno del ruminante;
- **Gestione dell'allevamento:** approccio a lungo termine, si effettua con due metodi: allevamento selettivo degli animali, quindi selezione genetica in funzione di parametri fisiologici ereditabili, strettamente legati alla produzione di metano (De Haas *et al.*, 2011). L'altro metodo sfrutta il miglioramento selettivo del foraggio per sviluppare specie con qualità più elevate soprattutto per la degradazione ruminale (Abberton *et al.*, 2007);
- **Gestione del bestiame:** approccio a lungo termine, si concentra su migliorare l'efficienza produttiva e riproduttiva dei capi, in modo da

ridurre le dimensioni della mandria mantenendo la stessa produzione. Così facendo si possono raggiungere più bassi livelli di emissioni per kg di prodotto (Kumari *et al.*, 2020);

Kumari *et al.*, (2020) hanno osservato come la manipolazione della dieta è da considerarsi la più promettente per ridurre le emissioni di metano enterico in quanto, tra l'altro, anche più ampiamente accettata, condizione necessaria nell'individuazione di una strategia comune, facilmente utilizzabile su scala globale ma soprattutto efficace.

2. METODI DI RIDUZIONE DELLA SINTESI DI METANO ENTERICO

Le strategie dietetiche che mirano alla riduzione della sintesi di metano possono essere suddivise in due categorie principali (Haque *et al.*, 2018):

- **Gestione della razione:** miglioramento della qualità del foraggio e modifica della proporzione degli alimenti che compongono la razione;
- **Integrazione di additivi:** mira ad inibire direttamente la comunità metanogena o indirettamente riducendo il substrato disponibile per la metanogenesi;

2.1 Gestione della razione

2.1.1 Foraggi

Le strategie che utilizzano il miglioramento del foraggio e la modifica della proporzione degli alimenti che compongono la razione si basano sul fatto che l'emissione di metano sia influenzata da diversi fattori, quali ad esempio il livello di ingestione, il tempo di ritenzione ruminale dovuta alla digeribilità, la composizione chimica dei foraggi e dei concentrati, in quanto può variare il tipo di carboidrato ingerito, e la loro proporzione nella razione (Kumar *et al.*, 2009). Migliorando le qualità della porzione di foraggi contenuti nella razione alimentare è possibile ottenere una riduzione dell'emissione di metano più o meno intensa. Aumentare la qualità del foraggio è realizzabile attraverso la gestione del pascolo, i tempi di raccolta, l'uso di specie foraggere con una digeribilità superiore, l'uso di piante contenenti tannino condensato e stoccaggio dei foraggi per preservare il contenuto di nutrienti digeribili (Beauchemin *et al.*, 2020).

Il foraggio di alta qualità contiene quantità maggiori di carboidrati facilmente fermentescibili e meno NDF. Sostituendolo ai foraggi di scarsa qualità, promuove un aumento della DMI ed una maggiore digeribilità e di conseguenza una riduzione del tempo di ritenzione ruminale. L'aumento della quantità di alimento fermentabile nel rumine causa direttamente una produzione totale di metano maggiore. Tuttavia se la si considera in proporzione alla DMI risulta essere minore. Questo è dovuto dalla relazione tra livello di ingestione e digeribilità dell'alimento

in quanto un aumento della ingestione causa direttamente la riduzione della digeribilità ed un aumento del tasso di passaggio. Di fatto, il passaggio più rapido dell'alimento implica una minore opportunità di degradazione microbica. Pertanto causa una fermentazione ruminale di minore entità, lo spostamento della digestione dei nutrienti dal rumine all'intestino e di conseguenza una riduzione della sintesi di metano per unità di alimento ingerito (Knapp *et al.* 2014).

Dal punto di vista energetico, quando la digestione dell'amido viene spostata nell'intestino, dovrebbe essere più efficiente per l'animale rispetto alla fermentazione ruminale. Nonostante ciò si presume che abbia una digeribilità limitata fino al 60% nell'intestino, sebbene non sia stato ancora dimostrato (Harmon *et al.*, 2004).

Oltre al tempo di ritenzione ruminale, variando la qualità o la specie di foraggio, cambiano anche le proporzioni di AGV che si formano nel rumine. La produzione di propionato consuma idrogeno, mentre la sintesi di acetato e butirrato genera H_2 disponibile per la metanogenesi. Pertanto, uno spostamento a favore della produzione di propionato sarà accompagnato da una riduzione della produzione di CH_4 per unità di alimento fermentato, mentre si verifica il contrario per acetato e butirrato (Knapp *et al.*, 2014).

L'uso di foraggi altamente digeribili nella dieta, dunque riduce la fermentazione enterica e di conseguenza riduce le emissioni di CH_4 (Gerber *et al.*, 2013). Ad esempio, l'utilizzo di foraggio di specie leguminose, costituito da un contenuto di fibre ed un rapporto C/N inferiori rispetto ad altri foraggi, può causare un'emissione inferiore di CH_4 (Gerber *et al.*, 2013).

Anche la lavorazione e la conservazione del foraggio rappresentano dei fattori che influiscono sulle emissioni di CH_4 . I foraggi tritati o macinati sono costituiti da particelle di dimensioni inferiori, richiedendo una minore degradazione ruminale. Inoltre le particelle troppo piccole riescono a passare senza essere digerite nel rumine, causando una riduzione della digeribilità dell'NDF e di conseguenza un aumento del tasso di passaggio con la diminuzione dell'emissione di CH_4 .

La pellettatura sembra invece ridurre la produzione di metano in misura maggiore rispetto alla triturazione, tuttavia l'effetto è marcato utilizzando foraggi di bassa qualità. È stato dimostrato che tali lavorazioni sono associate a riduzioni dell'emissione di metano dal 20 al 40% per unità di DM (Johnson *et al.*, 1995), le

quali potrebbero però non essere sufficienti a giustificare il dispendio energetico ed economico aggiuntivo dovuto a queste lavorazioni. Inoltre la triturazione fine dei foraggi ha comportato in primo luogo un'incidenza di acidosi maggiore, dovuta dall'assenza di NDF effettivo (che abbia effettivamente stimolazione alla ruminazione) ed in secondo luogo una riduzione della concentrazione di grassi nel latte (Boadi *et al.*, 2004).

L'insilamento porta ad alimentare bovini con foraggi già parzialmente fermentati, riducendo anche in questo caso il tempo di ritenzione ruminale (Boadi *et al.*, 2004; Haque *et al.*, 2018). In particolare alcuni studi hanno dimostrato come l'insilato di mais, rispetto ad esempio all'insilato d'erba, sia preferibile nella riduzione della produzione di metano (Haque *et al.*, 2018; Vaidya *et al.*, 2020). L'utilizzo di questo insilato fornisce generalmente livelli più alti di carboidrati facilmente digeribili a livello ruminale, come l'amido. Vaidya *et al.* (2020) hanno osservato come la maggiore disponibilità di carboidrati facilmente digeribili venga associata ad incrementi di alcune famiglie batteriche come *Ruminococcaceae* e *Succinivibrionaceae*. Questo spiegherebbe una produzione più elevata di propionato, riducendo l'idrogeno molecolare disponibile per la metanogenesi in quanto le *Succinivibrionaceae* competono con gli *Archea* metanogeni idrogenotrofici per l'idrogeno molecolare, producendo succinato e successivamente propionato. Inoltre, l'utilizzo di insilati di mais ha causato un aumento del livello di ingestione totale e di conseguenza l'aumento del tasso di passaggio, riducendo le fermentazioni ruminali e favorendo la digestione dei nutrienti nell'intestino, ha contribuito alla riduzione della metanogenesi (Haque *et al.*, 2018; Vaidya *et al.*, 2020).

2.1.2 Concentrati

Le bovine da latte ad alta produzione sono caratterizzate dall'aver un fabbisogno energetico elevato. L'assorbimento di nutrienti dal solo foraggio non soddisfa in genere le necessità nutritive delle bovine, anche al limite fisico di ingestione. Pertanto è necessario integrare la razione alimentare di concentrati in modo da apportare maggiori quantità di nutrienti con minore fibra. L'integrazione di alimenti costituiti da minore parete vegetale e da maggiori quantità di zuccheri

facilmente fermentescibili causa un cambiamento nell'ambiente ruminale e nella composizione microbica, promuovendo la sintesi di acido propionico. Di conseguenza si riduce la disponibilità di idrogeno per i metanogeni (Johnson *et al.*, 1995; Haque, 2018).

Un altro effetto osservabile, dovuto all'integrazione di concentrati, è l'abbassamento di pH ruminale che causa l'inibizione della crescita dei batteri metanogeni. Tuttavia comporta una riduzione della digeribilità delle fibre e può aumentare il rischio di acidosi (Beauchemin *et al.*, 2020). Inoltre emissioni di metano interessanti (2-3% dell'energia lorda assunta GEI) sono state ottenute con l'integrazione di concentrati all'80 e al 90% della razione, mentre a livelli più bassi non sono stati riscontrati effetti (Haque, 2018). Questi tassi di integrazione non sono fisiologicamente ed economicamente sostenibili per i bovini (Beauchemin *et al.*, 2020). Inoltre, utilizzando diete a base di amido, non viene preso in considerazione il ruolo chiave svolto dai ruminanti nel convertire grandi quantità di sostanza organica vegetale inutilizzabile per l'uomo in prodotti ad alto valore biologico digeribili.

Come per i foraggi, anche le lavorazioni dei cereali possono sviluppare delle modificazioni dei processi fermentativi nel rumine. Ad esempio la macinatura e lo sfaldamento possono aumentare l'entità fermentativa ruminale dell'amido riducendo la quantità che riesce a passare nell'intestino. Anche il trattamento termico può modificare il tempo di ritenzione ruminale e diminuire il rapporto acetato/propionato. Tuttavia non sono state osservate relazioni dirette tra queste lavorazioni e le emissioni di metano (Knapp *et al.*, 2014).

Dunque, l'integrazione di concentrati nell'alimentazione bovina può migliorare le prestazioni produttive degli animali e può diminuire la produzione di metano. Nonostante ciò non viene considerata come una strategia vera e propria, nella mitigazione dell'emissione di metano, per le ragioni precedentemente descritte.

2.2 Additivi alimentari

Esiste un'ampia varietà di sostanze che possono essere somministrate per ridurre la produzione di metano nel rumine ed ognuno differisce per la modalità d'azione e per i risultati. L'uso di questi additivi mira a colpire le popolazioni microbiche

responsabili della metanogenesi direttamente oppure indirettamente, riducendo o eliminando i substrati utilizzabili dai metanogeni. Risulta necessario ricordare come la comunità microbica sia altamente resiliente, dunque la rimozione o la soppressione di un gruppo microbico comporterà l'adattamento di un altro gruppo per riempire la sua nicchia. Ad esempio è stato osservato come l'eliminazione dei protozoi ciliati dal rumine ha comportato un aumento di 10 volte della popolazione metanogena (Knapp *et al.*, 2014).

L'approccio attuale più comune è quello di utilizzare composti, sia di origine naturale che sintetizzati chimicamente, che permettono di inibire direttamente o indirettamente la metanogenesi senza causare effetti tossici per gli animali, gli esseri umani e l'ambiente. L'uso di inibitori sembra essere una delle strategie più promettenti per ridurre le emissioni di CH₄ dai ruminanti (Beauchemin *et al.*, 2020).

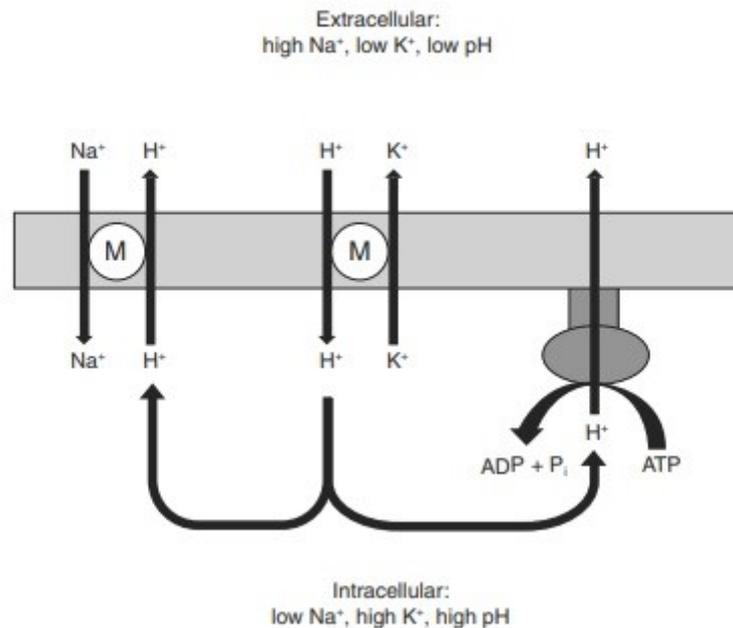
2.2.1 Antibiotici

Gli antibiotici sono un gruppo di composti ad azione antimicrobica spesso utilizzati in zootecnia. In particolare è stato osservato che alcuni di questi possono essere utilizzati nella mitigazione della produzione di metano (Patra *et al.*, 2017). Sono stati individuati gli ionofori, ed in particolare il Monensin. Attualmente non è noto come gli ionofori inibiscano direttamente i batteri metanogeni, ma è stato osservato che riescono a modificare le dinamiche delle popolazioni ruminanti (Haque *et al.*, 2018). L'attività inibente degli ionofori è più efficace nei confronti dei batteri Gram-positivi, in quanto la loro membrana cellulare è caratterizzata da uno strato poroso di peptidoglicano. Quest'ultimo gli permette di essere attraversato più facilmente, sebbene riescano comunque a legarsi anche ai batteri Gram-negativi (Bell *et al.*, 2015). L'inibizione prevalente dei batteri Gram-positivi fornisce un vantaggio competitivo ai batteri Gram-negativi. Questa variazione di popolazioni microbiche causa la riduzione delle specie che producono acetato, formiato, ammoniaca e H₂, diminuendo di conseguenza i substrati disponibili per la metanogenesi (Bell *et al.*, 2015).

Gli ionofori sono composti chimici antibiotici che formano complessi liposolubili capaci di legare e trasportare in modo reversibile cationi polari attraverso le

membrane. Ognuno possiede un'affinità specifica per i diversi cationi metallici e possono agire secondo uniporto o antiporto. Tra i diversi ionofori, il più studiato è il Monensin. Osservabile in figura 2.1, agisce per antiporto scambiando protoni con Na^+ o K^+ (Bell *et al.*, 2015).

Figura 2.1 - Meccanismo di funzionamento del Monensin (M) (Bell *et al.*, 2015).



Essendo il Monensin un antiporto, K^+ viene espulso dalla cellula mentre H^+ viene accumulato all'interno della cellula. Questi ultimi verranno espulsi dalla cellula per diffusione o attivamente, utilizzando ATP in modo da garantire il mantenimento dell'equilibrio ionico e la neutralità del pH cellulare. Il trasporto attivo consuma ATP, causando crescita ridotta e successivamente morte cellulare (Bell *et al.*, 2015).

L'utilizzo di Monensin avviene tipicamente attraverso l'aggiunta alla dieta come premiscela oppure tramite una capsula a lento rilascio (Haquet *et al.*, 2018). Dosi di 24-35 mg/kg sembrano aver ridotto la produzione di metano fino al 10% nei bovini da latte e da carne (Patra *et al.*, 2017; Haquet *et al.*, 2018). Dosaggi di 250 mg/d per vacca hanno causato riduzioni della sintesi di metano di circa il 30%,

associati ad una riduzione della DMI, il che potrebbe spiegare in parte le riduzioni elevate osservate (Patra *et al.*, 2017).

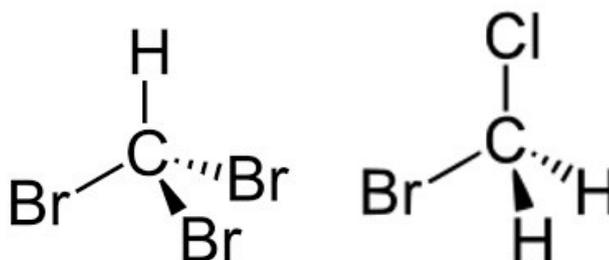
In sintesi, l'utilizzo di questi composti causa l'inibizione di numerose popolazioni microbiche e di conseguenza la riduzione della metanogenesi dovuta alla mancanza di substrati. La variazione microbica inoltre causa un aumento della produzione di propionato e pertanto della capacità produttiva dell'animale, diminuzione della degradazione delle proteine e la diminuzione della produzione di acido lattico (Bell *et al.*, 2015).

L'utilizzo di antibiotici nelle razioni dietetiche per animali è stato vietato nell'Unione Europea dal gennaio 2006 a causa della comparsa di residui e ceppi resistenti di batteri (Direttiva 1831/2003 / CEE, Commissione Europea, 2003). Per questo motivo, l'interesse della comunità scientifica si è spostato per valutare alternative differenti per modulare la fermentazione del rumine.

2.2.2 Composti alogenati

Gli alogeni sono gli elementi del gruppo 17 della tavola periodica sono: fluoro (F), cloro (Cl), bromo (Br), iodio (I) e astato (At) e reagiscono con quasi tutti gli elementi della tavola periodica. In particolare quelli studiati nella riduzione della produzione di metano sono i composti idrocarburi alifatici alogenati quali cloroformio, bromoformio (figura 2.2), bromoclorometano (BCM; figura 2.2), bromodiclorometano, dibromoclorometano, tetracloruro di carbonio, tricloroacetamide e tricloroetiladipato (Patra *et al.*, 2017).

Figura 2.2 - Struttura molecolare del bromoformio (sx) e del bromoclorometano (dx).



Questi composti inibiscono la produzione di metano reagendo con gli enzimi corrinoidi e di conseguenza il trasferimento del gruppo metile cobamide-dipendente nella metanogenesi. Essendo molto reattivi inibiscono anche la produzione di CH₄ fungendo da accettori terminali di elettroni (Patra *et al.*, 2017). Diversi studi, sia *in vitro* che *in vivo*, hanno testato l'effetto di questi composti individuando riduzioni anche importanti della sintesi di metano senza particolari variazioni delle fermentazioni ruminanti (Knight *et al.*, 2011; Abecia *et al.*, 2012; Mitsumori *et al.*, 2012; Denman *et al.*, 2015; Patra *et al.*, 2017).

Tuttavia è necessario osservare come questi composti siano particolarmente problematici, per lo sviluppo di effetti cancerogeni e tossici per l'uomo e per gli animali. Inoltre anche l'effetto negativo sullo strato dell'ozono atmosferico ha portato il commercio di questi composti ad essere fortemente regolamentato, se non vietato in molti Paesi. Pertanto è improbabile che strategie per la mitigazione del metano utilizzabili nelle aziende agricole a livello globale si basino sull'uso degli idrocarburi alifatici alogenati.

2.2.3 Alghe

Le alghe sono organismi autotrofi, unicellulari o pluricellulari, che producono energia chimica grazie alla fotosintesi, generando ossigeno e che non differenziano tessuti veri e propri. Sono caratterizzate dall'aver una maggiore efficienza fotosintetica rispetto alle piante terrestri, dovuta al diverso pigmento utilizzato durante la reazione. Ad esempio le alghe rosse utilizzano un pigmento rosso chiamato B-Ficoeritrina caratterizzato dal 98% di efficienza fotosintetica. Attualmente sono utilizzate come integratori sia nelle diete umane che in quelle animali, ad esempio nell'acquacoltura. Il loro utilizzo deriva dalla capacità di produrre ed accumulare metaboliti secondari bioattivi (Roque *et al.*, 2019b). Diversi studi hanno osservato gli effetti dell'integrazione di alcune specie di alghe nella razione dei bovini, dimostrando che vi sia una riduzione della produzione di metano (Moate *et al.*, 2013; Maia *et al.*, 2016; Roque *et al.*, 2019; Roque *et al.*, 2019b; McCauley *et al.*, 2020; Stefenoni *et al.*, 2021).

Si stima esistano oltre 200.000 specie differenziate in alghe brune, verdi e rosse. Numerose sono state studiate per le loro proprietà antibatteriche, antivirali, antiossidanti, antinfiammatorie e anti-cancerogene (McCauley *et al.*, 2020). Tuttavia, come possibili additivi alle diete dei bovini, solo 50 generi sono stati studiati; 10 generi di micro alghe e 40 generi di macro alghe (McCauley *et al.*, 2020).

Macro alghe

Le macro alghe sono organismi multicellulari con dimensioni che variano da pochi millimetri fino a 50 m e riescono a vivere in una vasta gamma di habitat (McCauley *et al.*, 2020). Il genere di alghe rosse più studiato è *Asparagopsis* in quanto contiene le specie identificate come le più promettenti nella riduzione della sintesi di metano nei bovini ovvero *Asparagopsis taxiformis* e *A. armata*.

È risaputo che le alghe afferenti a questo genere riescono ad accumulare composti bioattivi, ad esempio i composti alogenati a basso peso molecolare. In particolare è stato dimostrato che *A. taxiformis* contiene grandi quantità di bromoformio, dibromocolorometano, acido bromocloroacetico, acido dibromoacetico e diclorometano (Machado *et al.*, 2016; Roque *et al.*, 2019). Queste sostanze vengono accumulate, per effettuare un meccanismo di difesa chimica naturale contro fattori di stress chimici e fisici oltre all'azione antimicrobica (Abbott *et al.*, 2020). Il bromoformio (CHBr₃) è il più abbondante ed è un alometano che, ad alte concentrazioni, causa effetti di tossicità a lungo termine ad animali ed a esseri umani (McCauley *et al.*, 2020). Si stima che globalmente sia prodotto per il 70% dalle alghe (Abbott *et al.*, 2020). È una molecola altamente volatile studiata per aver ridotto le produzioni di metano nei bovini. Tuttavia, la sua tossicità, volatilità e pericolosità nei confronti dell'ozono, rende questo composto problematico da utilizzare, se non vietato. La particolarità del genere *Asparagopsis* spp. di accumulare questi composti a concentrazioni sostenibili per gli animali permette di utilizzare la loro modalità d'azione, riducendo dunque le problematiche derivanti dall'utilizzo diretto (McCauley *et al.*, 2020).

Il bromoformio e gli altri composti alogenati sono in grado di reagire con gli enzimi corrinoidi e di conseguenza inibiscono il trasferimento del gruppo metile

cobamide-dipendente bloccando la metanogenesi nelle fasi finali (Abbett *et al.*, 2020). Oltre alla riduzione di CH₄, che ne deriva dall'azione del bromoformio, la famiglia delle *Bonnemaisoniaceae* (*Rhodophyta*) è caratterizzata dall'aver un'ampia diversità di composti alogenati volatili. Ciò sembrerebbe che possano agire più composti sinergicamente amplificando l'effetto della riduzione della sintesi di metano (Machado *et al.*, 2016).

Le sostanze bioattive presenti nelle alghe possono essere di diversa natura. È stato osservato che possano contenere, oltre ai composti alogenati, batteriocine, florotannini, lipidi, carboidrati, alcaloidi e saponine (Abbett *et al.*, 2020). Inoltre l'analisi nutrizionale di *A. taxiformis* ha rivelato che vi sono alte concentrazioni di minerali quali calcio, sodio, iodio, ferro e manganese suggerendo la possibilità che venga utilizzato anche come integratore oltre al suo potenziale di riduzione del metano (Roque *et al.*, 2019; 2019b; McCauley *et al.*, 2020).

L'utilizzo delle diverse specie di alghe come integratori delle razioni bovine dev'essere ancora studiato a fondo, questo permette di credere che vi siano ampie probabilità di scoprire nuove strategie utili al servizio dell'alimentazione bovina. Tutt'ora, come possibili additivi, sono state identificate *A. taxiformis* e *A. armata* che hanno dimostrato riduzioni dell'emissione di metano importanti. In particolare Machado *et al.* (2016) hanno osservato che l'inclusione del 2% della sostanza organica di *A. taxiformis* ha ridotto l'emissione di metano del 95% *in vitro*, senza alterare la produzione di AGV totale. Roque *et al.* (2019) hanno osservato che l'effetto dell'inclusione del 5% della sostanza organica con *A. taxiformis* *in vitro* ha mostrato una riduzione dell'emissione di gas totali pari al 51,8% ed in particolare, la produzione di CO₂ non è variata mentre la sintesi di CH₄ è stata ridotta del 95%. Il tutto senza variare significativamente la composizione del microbiota. Come si può notare in tabella 2.1 le concentrazioni di AGV totali sono state leggermente ridotte con l'integrazione dell'alga, con una conseguente riduzione del rapporto Acetato/Propionato.

Tabella 2.1 - Produzione di gas totale e di AGV (Roque *et al.*, 2019).

	Control	<i>A. taxiformis</i>	Standard error	<i>p</i> value
Gas Production [ml/(g OM)]				
CH ₄	12.08	0.59	0.59	< 0.0001
CO ₂	15.67	14.24	3.82	0.73
Total Volume	28.54	14.81	3.85	0.02
Volatile Fatty Acid Production [ppm]				
Total VFA	2332.52	2105.11	269.2	0.45
Acetate	1056.99	856.77	135.08	0.21
Propionate	481.12	490.54	58.36	0.88
Propionate:Acetate ^{a)}	0.48	0.6	0.01	< 0.001
Butyrate	394.35	423.01	53.55	0.62
Isobutyrate	84.81	79.83	4.32	0.31
Valerate	212.79	168.72	16.99	0.06
Isovalerate	102.44	86.21	14.49	0.33

^{a)}reported as a ratio of respective VFAs

Questo potrebbe variare la produzione di latte e di grassi nel latte negli esperimenti *in vivo*. Infatti Stefenoni *et al.* (2021) integrando quest'alga, alle dosi di 0,25%, 0,50%, e 0,75% della sostanza secca a bovine in lattazione, hanno misurato alla dose più alta riduzioni della DMI, della produzione di latte (pari al 6,5%) ma non vi è stata una variazione della composizione del latte. Nonostante ciò sono state osservate riduzioni metano che variano tra il 30% e il 65%, accompagnate da un lieve incremento dell'efficienza nel convertire l'alimento in latte.

Roque *et al.* (2019b) hanno utilizzato come additivo *A. armata in vivo* a tassi di inclusione dello 0,5 e dell'1,0%. Sono state osservate riduzioni dell'emissione di metano rispettivamente del 26,4% e del 67,2% (tabella 2.2). A questi livelli d'inclusione l'ingestione delle bovine è diminuita rispettivamente del 10,8% e del 38,0% senza osservare alcun cambiamento significativo del peso corporeo tra i capi che ricevevano *A. armata* a bassa inclusione. È stata osservata inoltre una riduzione della produzione di latte significativa al tasso di inclusione dell'1% con leggere variazioni nella concentrazione di grassi e proteine.

Tabella 2.2 - Effetto dell'inclusione di *A. armata* allo 0,5 e 1% della OM sui parametri fisiologici e sulla produzione di latte delle bovine (Roque *et al.*, 2019b).

Item	Treatment groups			
	Control	Low	High	SEM
Animal (kg)				
Dry matter intake	27.9 ^a	24.9 ^b	17.3 ^c	1.29
Initial body weight	720	732	737	24.9
Body weight change	31.0 ^a	32.7 ^a	21.3 ^b	3.23
adj.FCE ^a	1.29 ^a	1.55 ^a	2.24 ^b	0.10
Milk production				
Milk yield (kg)	36.2 ^a	37.2 ^a	32.0 ^b	2.20
Fat (%)	3.98	3.84	3.71	0.13
Protein (%)	3.12 ^a	3.01 ^{ab}	2.93 ^b	0.06
Lactose (%)	4.74	4.75	4.69	0.04
Solids non-fat (%)	8.65	8.55	8.40	0.08
MUN (mg/dl)	16.7	15.1	15.2	1.79
SCC (x 103/ml)	126	100	129	30.9
Bromoform µg/L	0.11	0.15	0.15	0.03

Tuttavia il livello produttivo osservato era significativamente maggiore rispetto a quello atteso dal livello d'ingestione dopo la riduzione comportando una maggiore efficienza nel convertire il mangime (Roque *et al.*, 2019b).

Nonostante il numero studi limitato, il calo della DMI si presume sia dovuto all'alto contenuto di minerali di queste alghe e dalla riduzione dell'appetibilità della razione (Roque *et al.*, 2019b; Stefenoni *et al.*, 2021). Infatti le concentrazioni di iodio nel latte erano circa 5 volte maggiori che nel latte di controllo ed allo stesso modo anche le concentrazioni di bromuro erano fino a 8 volte superiori (Stefenoni *et al.*, 2021). Nonostante ciò i valori del contenuto di bromoformio nel latte di controllo e nel latte dei trattamenti non differiva particolarmente ed era significativamente inferiori alla soglia di pericolo (Roque *et al.*, 2019b; Stefenoni *et al.*, 2021).

I pochi studi che analizzano gli effetti di queste alghe su bovini da latte in lattazione non permettono ancora di determinare il dosaggio adatto per mantenere il livello di ingestione riducendo la produzione di metano. Tuttavia un fattore più importante del dosaggio sembra essere la concentrazione di bromoformio all'interno dell'additivo, che dev'essere maggiore di 1 mg/g di sostanza organica affinché vi sia un effetto sulla produzione di metano (Magnusson *et al.*, 2020).

Micro alghe

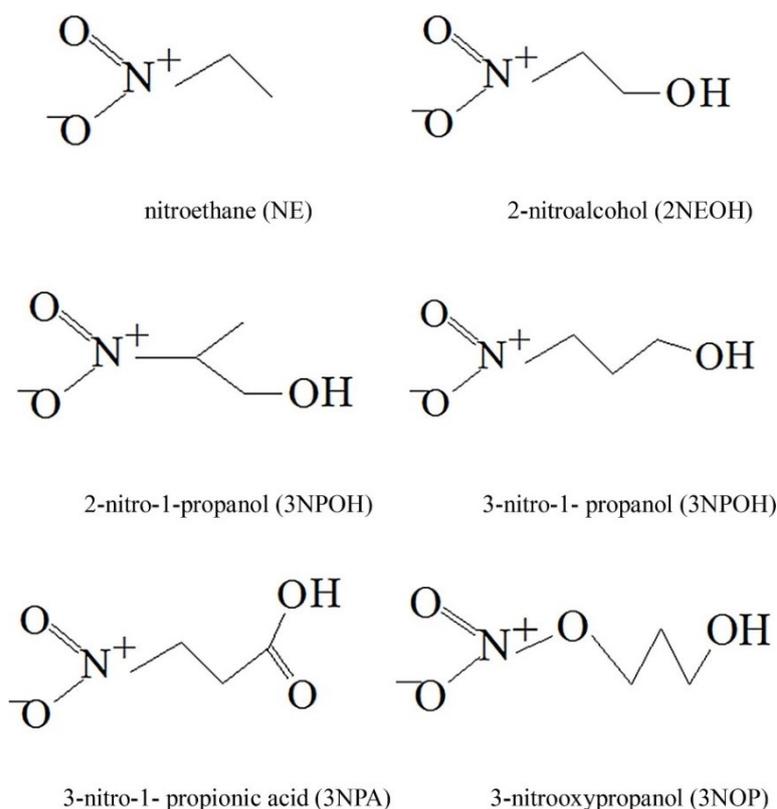
Le micro alghe sono microrganismi unicellulari caratterizzate dal comprendere organismi anche estremamente diversi. Questo permette alle micro alghe di riuscire a crescere e sopravvivere in tutti gli ecosistemi terrestri. La ricerca riguardante gli effetti dell'inclusione di micro alghe nella dieta dei bovini da latte dev'essere ancora implementata in quanto diverse specie hanno mostrato effetti contrastanti nei confronti della produzione di metano. Inoltre, tutt'ora, nessuna specie di micro alghe studiata ha dimostrato effetti comparabili alle macro alghe rosse *Asparagopsis* spp. (McCauley *et al.*, 2020). Sebbene nei confronti della sintesi di metano non possano competere con *Asparagopsis* spp. la composizione di alcune specie di micro alghe le rende particolarmente interessanti come integratori proteici. Ad esempio, Lamminen *et al.* (2019) hanno sostituito l'integrazione di farina di soia con diverse specie di micro alghe, rilevando rese simili o più elevate della produzione di latte, dei grassi del latte e della loro composizione.

2.2.4 Nitrocomposti

Recentemente, i nitrocomposti o nitro derivati, hanno attirato molto interesse da parte della comunità scientifica in quanto si è scoperto come siano efficaci inibitori della sintesi di metano ruminale (Zhang *et al.*, 2018).

Questo gruppo di molecole, descritto con la formula strutturale R-NO₂, è stato suddiviso in nitrocomposti alifatici e aromatici in base alla presenza di gruppi alchili. Un'altra suddivisione può essere effettuata sulla base del numero di gruppi nitro -NO₂ dunque possono essere unitari, binari e multipli. In particolare, gli studi hanno concentrato la ricerca sui nitrocomposti alifatici unitari a catena corta (figura 2.3). I più interessanti dal punto di vista di riduzione delle emissioni sono stati il nitroetano ed il 3-nitroossipropanolo.

Figura 2.3 - Schema dei Nitrocomposti studiati (Zhang *et al.*, 2018).



Nitroetano

La sua formula è CH₃CH₂NO₂, e a temperatura ambiente appare come un liquido incolore, viscoso e quasi insolubile in acqua.

Sebbene la sua modalità di azione non sia ancora del tutto compresa è stato osservato come l'aggiunta di questo nitroderivato alla razione alimentare possa ridurre l'emissione di metano fino al 69% nelle pecore, mentre nei bovini sono state osservate riduzioni fino al 44% (Zhang *et al* 2018).

3-nitroossipropanolo (3-NOP)

Il 3-NOP è una piccola molecola che si è rivelato essere un promettente inibitore sperimentale della metanogenesi, attualmente oggetto di numerosi studi su bovini da latte e da carne in quanto attende approvazione per poter essere commercializzata (Beauchemin *et al.*, 2020). La modalità d'azione è conosciuta ma tutt'ora sotto esame dalla comunità scientifica, in quanto l'effetto sulla

degradazione delle fibre ha generato alcune controversie che verranno descritte successivamente.

Il 3-NOP è stato dimostrato sia simile alle forme metilate dei coenzimi M e B che costituiscono i substrati dell'enzima nichel metil-coenzima M reduttasi (MCR) durante l'ultima fase della metanogenesi. Il suo compito è quello di ridurre il metil-CoM a CH₄ in quanto il CoM costituisce il vettore del gruppo metilico (CoM = acido 2-mercaptoetansolfonico). Il MCR è un grande complesso enzimatico costituito da due siti attivi che si trovano in fondo a due profondi tunnel. Il sito attivo è costituito da un cofattore specifico chiamato F₄₃₀ contenente al suo interno un atomo di nichel tenuto in tensione in modo da renderlo più reattivo. Il 3-NOP, essendo una molecola simile al substrato di MCR ed essendo più reattivo, riesce a legarsi al sito attivo della reduttasi inattivandola (Duin *et al.*, 2016).

L'inibizione della sintesi di metano provoca direttamente una riduzione del consumo di idrogeno molecolare, dunque un suo accumulo all'interno del rumine e un incremento dell'emissione di H₂ dell'animale (Zhang *et al.*, 2020).

Durante la degradazione dei carboidrati complessi, ed in particolare durante la glicolisi, avviene la reazione di ossidazione del NADH. Alte pressioni parziali di H₂ svolgono un effetto negativo su questa reazione andando ad inibire il ciclo della glicolisi. Per questo motivo numerosi studi hanno concentrato l'attenzione anche sulla degradazione dell'NDF nel tratto totale tuttavia non sono state osservate variazioni particolari di digeribilità dell'NDF (Zhang *et al.*, 2020). Questa controversia non è stata ancora del tutto spiegata, tuttavia sembra che vi siano altri meccanismi che blocchino l'azione inibitoria creata dall'alta pressione parziale di idrogeno. Ad esempio, è possibile che altri utilizzatori di H₂ possano aver facilitato la l'ossidazione di NADH (Zhang *et al.*, 2020). Infatti Melgar *et al.* (2020) hanno osservato che l'inibizione della metanogenesi mediante 3-NOP ha causato una riduzione del rapporto acetato/propionato ed un aumento di butirato e valerato. La sintesi di valerato utilizza H₂ ed è il risultato della condensazione dell'acetato e del propionato. Inoltre Zhang *et al.* (2020) hanno osservato le variazioni della composizione microbica dopo l'integrazione di 3-NOP ed i principali taxa coinvolti nella degradazione delle fibre non hanno subito particolari variazioni, confermando la digeribilità dei foraggi e dunque l'azione specifica dell'integrazione di 3-NOP.

I batteri del rumine, ad esempio le specie del genere *Enterobacter*, riescono a ridurre il 3-NOP a nitrito e 1,3-propandiolo grazie ad una nitro estere reductasi alifatica (Duin *et al.*, 2016). L'1,3-propandiolo e il nitrito sono comunemente presenti nel rumine ed insieme al 3-NOP non mostrano tossicità per l'animale, ai dosaggi testati (Duin *et al.*, 2016). Inoltre, il 3-NOP riesce a diffondere attraverso le membrane facilmente permettendogli di arrivare rapidamente al fegato, dove viene denitrato (Duin *et al.*, 2016).

Grazie alla modalità d'azione altamente specifica sono sufficienti piccole dosi per ottenere riduzioni della sintesi di metano consistenti che variano in base alla composizione della dieta, al dosaggio e al metodo di integrazione (Beauchemin *et al.*, 2020; Melgar *et al.*, 2020). Applicando 40-80 mg/kg di sostanza secca alla razione di vacche da latte ad alta produzione, sono state osservate riduzioni delle emissioni di metano del 30% senza effetti negativi o sulle prestazioni produttive (Zhang *et al.*, 2018). Melgar *et al.* (2020) hanno misurato riduzioni del 26% con dosaggio pari a 60 mg/kg di sostanza secca mentre, con dosaggi di 150 mg/kg di sostanza secca sono state osservate riduzioni del 53% (Zhang *et al.*, 2020). L'effetto inibitorio di 3NOP è persistito per 12 settimane di trattamento (Zhang *et al.*, 2018) ed a questi dosaggi non ha mostrato tossicità per l'animale (Duin *et al.*, 2016). Questo ha permesso l'individuazione di un'efficace pratica di mitigazione del metano per le industrie zootecniche.

2.2.5 Metaboliti secondari vegetali

I metaboliti secondari vegetali, come saponine, tannini, flavonoidi e oli essenziali, vengono prodotti per diversi motivi dalle piante. Diversi composti vengono prodotti come difesa chimica, in quanto caratterizzati dall'aver attività antimicrobiche contro diversi tipi di microrganismi. Numerosi di questi composti sono stati individuati come potenziali inibitori dei metanogeni nel rumine e dunque nella produzione di CH₄. L'efficacia nel sopprimere la produzione di metano varia notevolmente a seconda del tipo, delle fonti, del peso molecolare, delle dosi e dei tipi di dieta (Patra *et al.*, 2017).

Oli essenziali

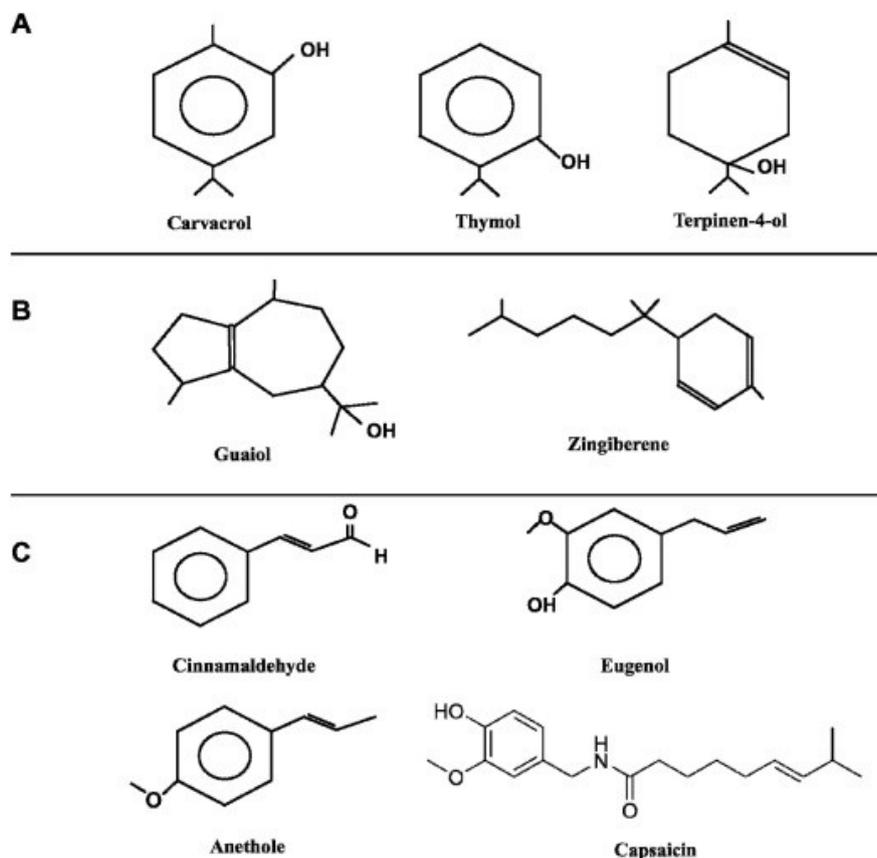
Gli oli essenziali sono composti aromatici volatili prodotti principalmente da piante erbacee ed arbustive, ma presenti anche in numerose specie arboree. Questi composti sono presenti in diversi organi e tessuti della pianta come fiori, foglie, corteccia, frutta, radici, semi e steli. Le concentrazioni osservabili sono influenzate da diversi fattori ambientali, dallo stadio di crescita e dalla salute della pianta. Svolgono principalmente ruolo difensivo contro l'attacco di batteri, funghi o insetti e per questo, nella storia, l'uomo li utilizzò per diversi scopi. Gli oli essenziali sono caratterizzati da una composizione, natura e attività molto diverse.

Dal punto di vista chimico sono miscele complesse composte principalmente da due gruppi chimici: terpenoidi e fenilpropanoidi.

I terpenoidi sono i più abbondanti e vengono prodotti dalle piante attraverso la via metabolica del mevalonato. Questa via produce sostanze a partire da unità di isoprene, costituito da cinque atomi di carbonio. Legandole insieme crea catene di unità isopreniche, che vengono classificate in base al loro numero. Dei terpenoidi, i più osservati in natura appartengono ai monoterpenoidi e ai sesquiterpenoidi (Patra, 2011; figura 2.4A; figura 2.4B).

I fenilpropanoidi (figura 2.4C) vengono prodotti dalle piante attraverso la via dello shikimato, a partire dagli amminoacidi tirosina o della fenilalanina. Questi composti sono costituiti da un'unità fenilica legata ad un'unità propanoica. Nel mondo vegetale trovano particolare importanza i polimeri strutturali di questi composti, ad esempio la lignina. Gli oli essenziali sono stati studiati originalmente come additivi alimentari per aumentare l'efficienza produttiva dei ruminanti, tuttavia alcuni composti sono risultati essere efficaci nel ridurre la sintesi di metano. La modalità d'azione nei confronti della sintesi di metano nel rumine può essere differente in funzione delle diverse molecole attive presenti negli oli essenziali e dalle loro concentrazioni.

Figura 2.4 - Struttura molecolare di alcuni monoterpenoidi (A), sesquiterpenoidi (B) e di alcuni fenilpropanoidi (C).



I terpenoidi e fenilpropanoidi svolgono azione antibatterica principalmente attraverso due meccanismi differenti. La prima è costituita dall'interazione delle molecole attive con la membrana cellulare batterica riuscendo, grazie alla natura idrofobica degli idrocarburi ciclici, ad accumularsi all'interno del doppio strato fosfolipidico. Quest'integrazione causa una perdita di stabilità e di conseguenza provoca la fuoriuscita di ioni e la diminuzione del gradiente ionico transmembrana che dovrà essere riportato attivamente, a scapito della cellula batterica, a valori favorevoli. Nella maggior parte dei casi non porta a morte cellulare, ma si verifica una riduzione di crescita batterica variando la struttura complessiva del microbiota. Tuttavia è stato osservato che alcune molecole si comportino in modo leggermente differente, ma che comunque portino allo stesso risultato. Ad esempio i gruppi ossidrilici dei composti aromatici sembrano possedere la capacità

di trasportare cationi e protoni attraverso le membrane causando variazioni del gradiente ionico. Questo meccanismo d'azione è il principale metodo d'azione ed è più efficace su batteri Gram-positivi favorendo i Gram-negativi. Tuttavia le molecole più piccole ed aromatiche presenti negli oli essenziali, ad esempio il timolo o il carvacrolo, sono in grado di venire assorbite anche dai batteri Gram-negativo riducendone l'azione specifica nei confronti di alcuni gruppi batterici. L'altro meccanismo d'azione sembra essere legato alla capacità di alcune molecole bioattive, presenti negli oli essenziali, di reagire e di coagulare alcuni costituenti cellulari. I composti fenolici sembrano interagire con le proteine attraverso ponti idrogeno e interazioni ioniche o idrofobiche denaturandole mentre i composti non fenolici riescono a legarsi grazie alla presenza di gruppi funzionali (Calsamiglia *et al.*, 2007).

L'applicazione di oli essenziali nelle razioni dei bovini può causare diversi effetti tra cui la riduzione della deaminazione delle proteine alimentari e della metanogenesi. Pertanto sono stati testati *in vitro* diversi componenti, sebbene pochi studi li hanno osservati anche *in vivo* su bovini da latte. I risultati più coerenti *in vitro* sono stati osservati utilizzando l'olio essenziale di timo, origano, cannella e aglio oppure utilizzando i loro componenti principali (rispettivamente timolo, carvacrolo, cinnamaldeide e allicina). Ad esempio, utilizzando la cinnamaldeide (fenilpropanoide), principale composto attivo dell'olio di cannella estratto da *Cinnamomum verum*, è stata osservata una riduzione della produzione di metano pari a 94% (Macheboeuf *et al.*, 2008). Anche l'olio estratto da timo e origano ha dimostrato interesse ed il componente principale è risultato il timolo (monoterpenoide). Ha influenzato il metabolismo dell'azoto e ridotto la sintesi di metano del 99% (Macheboeuf *et al.*, 2008) sebbene anche le concentrazioni di acetato e propionato siano state ridotte (Patra, 2011). Un altro olio essenziale interessante è l'olio di aglio, contenete allicina caratterizzata dall'averne un gruppo funzionale tiosolfinato (Eom *et al.*, 2020). L'aggiunta di questo estratto non ha alterato le caratteristiche della fermentazione riducendo l'emissione di metano linearmente fino al 30% in funzione del dosaggio (Eom *et al.*, 2020). Sebbene vi siano numerosi studi *in vitro* con interessanti risultati, diverse revisioni hanno analizzato tutti gli studi effettuati in cui si testavano i diversi oli essenziali

identificandone pochi come possibili mitigatori della produzione di metano anche *in vivo* (Calsamiglia *et al.*, 2007; Cobellis *et al.*, 2016).

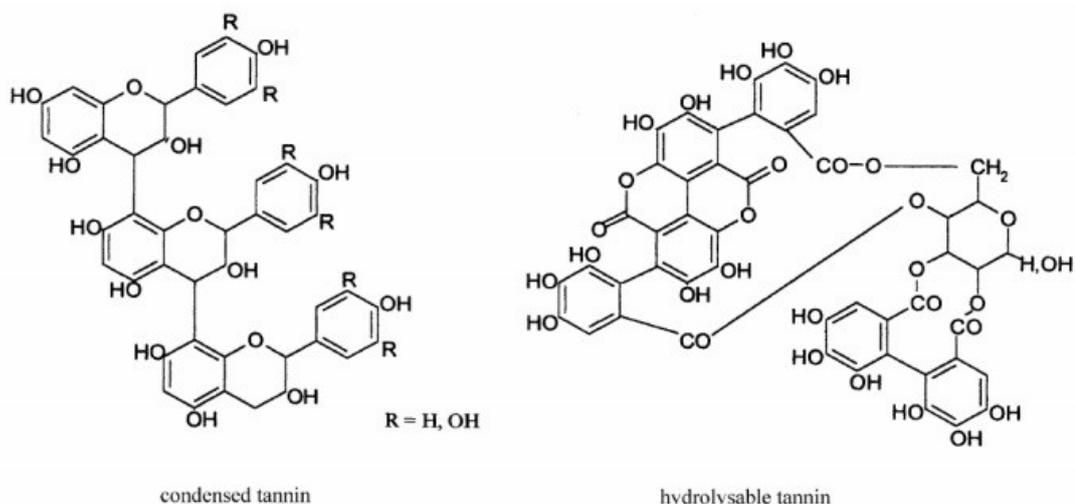
Nonostante ciò, i risultati *in vivo* differivano significativamente a causa delle diverse diete di base utilizzate, delle diverse dosi ed in particolare delle diverse composizioni degli oli essenziali, in quanto queste possono variare in funzione della cultivar utilizzata per l'estrazione. Inoltre, la maggior parte di questi studi, ha mostrato effetti a breve termine, supponendo lo sviluppo di comportamenti di adattamento microbico agli oli essenziali (Cobellis *et al.*, 2016). Questo rende necessario lo sviluppo di ulteriori studi *in vivo* per identificare quali oli essenziali, con quale composizione chimica ed a quali dosaggi possono essere realmente utilizzati come strategia nella mitigazione dell'emissione di CH₄ da parte dei bovini da latte.

Tannini

I Tannini sono composti polifenolici prodotti da numerose specie vegetali. Sono costituiti da una struttura chimica complessa, diversificata e ad alto peso molecolare (da 500 Da ad oltre 28.000 Da). I numerosi gruppi fenolici liberi permettono di reagire legandosi con le proteine e diversi composti (Hassanpour *et al.*, 2011; Aboagye *et al.*, 2019). In natura si differenziano 3 tipi diversi di tannini:

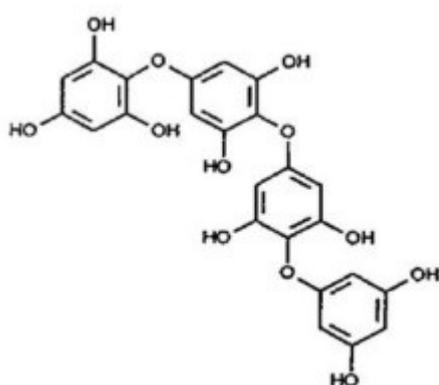
- **Tannini idrolizzabili:** polimeri dell'acido gallico, facilmente idrolizzabili da acidi deboli. Il loro peso molecolare è significativamente inferiore rispetto ai tannini condensati, arrivando fino a 3000 Da. In natura si trovano in concentrazioni minori rispetto ai tannini condensati (Hassanpour *et al.* 2011; Aboagye *et al.*, 2019; figura 2.4);
- **Tannini condensati o proantocianidine:** sono i più comuni nel mondo vegetale. Non sono facilmente idrolizzabili, sono forti antiossidanti ed antibatterici, a causa della struttura chimica in quanto sono composti polifenolici di unità flavan-3-olo. I numerosi gruppi fenolici presenti possono legarsi a diversi substrati. (Hassanpour *et al.*, 2011; figura 2.5);

Figura 2.5 - Struttura molecolare di tannini condensati e idrolizzabili (Hassanpour *et al.*, 2011).



- **Florotannini:** identificati recentemente in numerose specie di alghe brune, sono polimeri del floroglucinolo con peso molecolare che arriva fino a 650.000 Da. Sono presenti fino al 20% della sostanza secca in alcune alghe (Aboagye *et al.*, 2019; Abbott *et al.*, 2020; figura 2.6);

Figura 2.6 - Struttura molecolare dei florotannini (Aboagye *et al.*, 2019).



I tannini possono essere introdotti nelle razioni dei bovini facilmente, in quanto sono contenuti in diverse specie foraggere naturalmente presenti in numerose

aree di pascolo nelle regioni temperate. Ad esempio si trovano solitamente nei legumi da foraggio come la veccia comune (*Vicia sativa*) e la sulla (*Hedysarum coronarium*). Nelle regioni tropicali si osservano concentrazioni più elevate e si trovano comunemente in molte foglie di leguminose e non, sia in alberi che arbusti (ad esempio, *Acacia angustissima*, *Argania spinosa* e *Ceratonia siliqua*).

Entrambi i tipi di tannini si possono trovare in diversi tessuti della stessa pianta. Le concentrazioni possono variare in funzione del tessuto analizzato, dell'età della pianta, del clima e dalle condizioni di crescita. Dal punto di vista nutrizionale, concentrazioni elevate di tannini diluiscono la composizione nutritiva diminuendo il contenuto energetico. La struttura generale dei tannini gli permette di legare le glicoproteine salivari, riducendo l'appetibilità dell'alimento e dunque il livello d'ingestione. Inoltre, sempre grazie a queste proprietà molecolari, riesce a legare con gli enzimi responsabili della degradazione delle fibre e dei carboidrati inibendoli e di conseguenza ridurre le prestazioni degli animali. Un altro effetto importante dei tannini è quello di provocare irritazione e desquamazione della mucosa intestinale se ingeriti ad alte concentrazioni. Tutti questi effetti indesiderati sono prevalentemente legati ai tannini idrolizzabili, anche se sono stati osservati anche con tannini condensati. Nonostante ciò l'integrazione di tannini a basse concentrazioni porta al miglioramento dell'utilizzo dell'azoto, ad un aumento della produzione ed una diminuzione della produzione di metano (Min *et al.*, 2020). Sebbene gli effetti dei tannini siano stati spesso confusi con gli effetti derivanti da caratteristiche intrinseche dei foraggi utilizzati. Oltre all'inserimento nella dieta di foraggi contenenti tannini, possono essere introdotti anche utilizzando gli estratti come additivo. Questi sono caratterizzati dal contenere tannini in forma pura con una composizione chimica uniforme (Aboagye *et al.*, 2019).

Gli effetti nei confronti della produzione di metano è altamente variabile in funzione dell'origine vegetale, del tipo e del peso molecolare dei tannini, della comunità metanogena presente nel rumine, della dieta e dell'animale (Aboagye *et al.*, 2019; Beauchemin *et al.*, 2020). La modalità d'azione è stata analizzata in diversi studi sia *in vivo* che *in vitro*, tuttavia non è ancora stato compreso totalmente. L'azione sviluppata dai tannini sembrerebbe essere legata dalla formazione di complessi con la membrana della parete cellulare dei batteri che

causano cambiamenti morfologici e secrezione di enzimi extracellulari (Bodas *et al.*, 2012). Tuttavia questa modalità d'azione può causare riduzioni di metano derivanti da diversi meccanismi (Aboagye *et al.*, 2019):

- Agendo direttamente sulla comunità metanogena;
- Influenzando i protozoi ciliati associati ai metanogeni;
- Agendo sui batteri fibrolitici riducendo la degradazione della fibra e la digeribilità dell'alimento;
- Utilizzando H₂ e di conseguenza riducendone la disponibilità per la metanogenesi;

La maggior parte degli studi si è concentrata nel ricercare gli effetti dell'utilizzo di tannini condensati in quanto quelli idrolizzabili sembravano essere tossici per gli animali. Tuttavia alcuni studi hanno dimostrato come i tannini idrolizzabili siano specifici nel ridurre la popolazione dei metanogeni. Il dosaggio adatto sembra essere moderato anche se tuttora sconosciuto (Aboagye *et al.*, 2019; Min *et al.*, 2020).

Bovine da latte alimentate con diete a base di trifoglio, contenente il 2,6% della sostanza secca di tannini condensati, hanno mostrato riduzioni nella produzione di metano fino al 16%, mentre se alimentate con una quota fissa di tannini pari a 244 g al giorno, fino al 29% (Min *et al.*, 2020).

Una meta-analisi di 15 esperimenti *in vivo* ha dimostrato come l'integrazione di tannini nella razione alimentare dei bovini ha causato una riduzione lineare di 0,011 l di CH₄/100 g di DMI per ogni g di tannino/100 g di DMI (Jayanegara *et al.*, 2012).

Tuttavia, è necessario analizzare come una delle principali limitazioni dei tannini è che a basse concentrazioni le risposte CH₄ sono significativamente variabili (Beauchemin *et al.*, 2020). Sebbene ci siano numerosi studi *in vitro* e *in vivo* che dimostrino l'efficacia dei tannini, non vi è tuttora la conoscenza necessaria per formulare diete ricche di tannini, ottimali per mitigare la produzione di metano senza causare impatti negativi sulla produttività degli animali.

Sono presenti ancora troppe variabili da chiarire per convincere i produttori a ricorrere all'uso di foraggi ad alto contenuto di tannini o all'uso di estratti (Min *et al.*, 2020).

Saponine

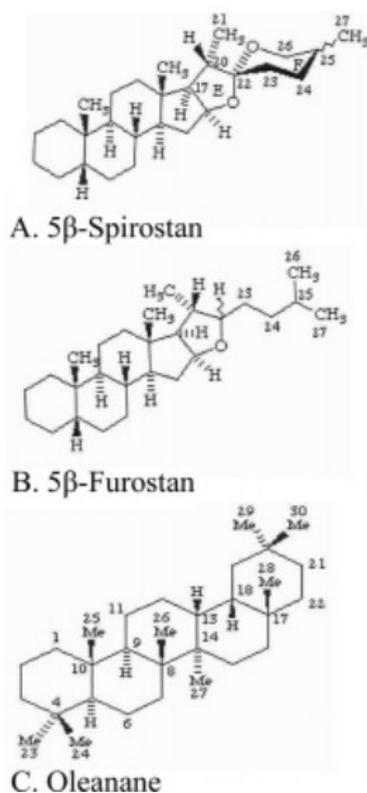
Rappresentano una delle difese chimiche che il regno vegetale ha sviluppato e per questo sono ampiamente diffuse e, generalmente, si trovano nei tessuti più vulnerabili ad attacchi di funghi o batteri o alla predazione di insetti. Il loro utilizzo, da parte dell'uomo, spazia dalla formulazione di prodotti fitosanitari alla farmacologia (Cheek *et al.*, 2014).

Chimicamente formano un gruppo molto ampio e diversificato di molecole includendo steroidi e triterpenoidi. La molecola è composta da una parte glicosidica legata alla sapogenina. La parte glicosidica può essere costituita da una o più porzioni di carboidrati diversi. La sapogenina, o aglicone, può essere un derivato di spirostan e di furostan, per gli steroidi (figura 2.7 A, B rispettivamente), mentre per i triterpenoidi, è un derivato dell'oleanano (figura 2.7). La biosintesi dei triterpenoidi, più presenti e diversificati nel mondo vegetale, parte dall'isopentil difosfato ed avviene grazie all'azione di 3 enzimi chiave (Sawai *et al.*, 2011), quali:

- **Ossidosqualene ciclasi:** costruisce gli scheletri triterpenici base;
- **Monoossigenasi del citocromo P₄₅₀:** media le ossidazioni;
- **Glicosiltransferasi:** sono dipendenti dall'uridina difosfato e catalizza le glicosilazioni;

Le attività biologiche delle saponine variano in funzione della composizione della parte glicosidica, dalla posizione in cui è legata alla sapogenina e dalla sapogenina stessa (Wina *et al.*, 2005). Le saponine steroidee si possono trovare principalmente nelle monocotiledoni mentre le triterpeniche nelle dicotiledoni. Nonostante ciò sono note alcune piante in cui si possono trovare entrambe. Ad esempio l'avena contiene avenacoside nelle foglie (steroidi) mentre l'avenacina nelle radici (Triterpenoide) ed in particolare si presume sia stata sviluppata come mezzo di controllo per il fungo zoosporico *Gaeumannomyces graminis* (Wina *et al.*, 2005). Le saponine sono dunque naturalmente presenti in diverse piante foraggere osservabili in tabella 2.3. Qui vengono menzionate solo le strutture principali, presenti nelle piante studiate, tuttavia ne sono state osservate diverse in funzione della variabilità della parte glicosidica. Ad esempio, nell'erba medica sono state identificate 29 saponine differenti (Wina *et al.*, 2005).

Figura 2.7 - Struttura di spirostan, furostan e dell'oleanano (Wina *et al.*, 2005).



L'utilizzo di saponine nell'alimentazione bovina ha iniziato ad avere particolare interesse, insieme agli altri metaboliti secondari delle piante, col divieto europeo dell'uso di antibiotici nelle diete animali. In questo caso, diversi studi hanno osservato come fonti ricche di saponine possano causare risultati differenti e contrastanti (Jayanegara *et al.*, 2014). Tuttavia in letteratura vi sono numerosi studi non tutti in accordo riguardo l'efficacia di questi composti nel mitigare la produzione di metano enterico (Patra *et al.*, 2017). In alcuni studi mostrano risultati *in vitro* interessanti quando venivano integrate alla dieta le saponine di quillaja, tè o yucca (Jayanegara *et al.*, 2014; Guyader *et al.*, 2017).

Le saponine della yucca sono di tipo steroideo, mentre le saponine della quillaja e del tè sono triterpenoidi (Holtshausen *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2012). In particolare, l'aggiunta di queste tre saponine ha ridotto l'emissione di metano rispettivamente del 9,5%, 13,2% o 23,3% (Jayanegara, *et al.*, 2014). Spesso, tali risultati, non sono stati osservati *in vivo* (Holtshausen *et al.*, 2009; Guyader *et al.*, 2017). Ad esempio, Holtshausen *et al.* (2009) somministrando 10 g/kg di sostanza

secca di *Yucca schidigera* o *Quillaja saponaria* a vacche in lattazione non hanno osservato influenza sulla produzione di metano, fermentazioni ruminali, digeribilità dell'alimento o produzione di latte.

Tabella 2.3 - Saponine contenute in comuni specie foraggere (Wina *et al.*, 2005).

family and species	plant part	saponin or saponin name
Fabaceae		
<i>Acacia auriculoformis</i>	fruit	acaciaside
<i>Albizia lebbek</i>	Pods, bark	albiziasaponin
<i>E. cyclocarpum</i>	leaf, fruit	saponin content 3.9 mg/g
<i>Gilicidia sepium</i>	root, fruit	hederagenin
<i>Glycine maxima</i> (soybean)	seed	soyasapogenol
<i>Lupinus</i> spp. (lupin)	seed	soyasapogenol
<i>Medicago sativa</i> (alfalfa, lucerne)	leaf, root, seed	medicagenic (aglycone), soyasapogenol
<i>Melilotus alba</i> (white sweet clover)	leaf, flower, root	melitonin
<i>Medicago hispida</i> (burr clover)	leaf	hispidacin (soyasapogenol)
<i>P. saman</i>	fruit	saponin content 3.4 mg/g
<i>Pueraria montana</i> var. <i>lobata</i> (Kudzu)	root	kudzusaponins (soyasapogenol)
<i>S. sesban</i>	leaf, seed	glucuronide-oleanolic acid, stigmasta galactopyranoside
<i>S. pachycarpa</i>	leaf	saponin
<i>Trifolium repens</i> (ladino clover)	leaf	cloversaponins (soyasapogenol)
<i>Trifolium pratense</i> (red clover)	leaf	soyasapogenin
<i>T. foenum-graecum</i> (fenugreek)	leaf, seed	steroid saponin
Moringaceae		
<i>M. oleifera</i>	leaf	80 g/kg diosgenin equivalent
Poaceae		
<i>Avena sativa</i> (oat)	leaf, root, seed	avenacin
<i>B. decumbens</i> (signal grass)	leaf	dioscin, diosgenin, yamogenin

Il non accordo presente in letteratura sembra essere dovuto alla natura della saponina utilizzata, ai dosaggi e alla dieta di base (Wang *et al.*, 2012). Si presume che quando si misurano riduzioni, siano dovute dall'azione anti protozoaria che le saponine effettuano. In particolare sembrerebbe che siano in grado di reagire con gli steroli presenti nelle membrane dei protozoi destabilizzandole e successivamente causare la morte cellulare (Wang *et al.*, 2012, Patra *et al.*, 2017). Questo permette di rimuovere una parte dei batteri metanogeni che hanno sviluppato interazioni endo- ed ecto- simbiotiche con i protozoi, che si stima siano circa il 9-25% dei metanogeni ruminali, i quali contribuiscono a quasi il 37% della produzione di metano (Finlay *et al.*, 1994). Tuttavia non sempre sono state osservate riduzioni del numero dei protozoi ed inoltre, dove riscontrate, sembrano essere di tipo temporaneo (Holtshausen *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2012). Wang *et al.* (2019) hanno osservato come le saponine ingerite siano state idrolizzate a

sapogenine rapidamente ed in parte epimerizzate. Questo porta a presumere che l'effetto delle saponine sia dovuto alle sapogenine libere, tuttavia sono necessari altri studi per avere una conferma.

2.2.6 Integrazione lipidica

L'integrazione lipidica ha dimostrato di poter ridurre significativamente l'emissione di metano *in vitro* (Patra, 2013; Patra *et al.*, 2017; Beauchemin *et al.*, 2020). *In vivo* sono state osservate riduzioni fino al 20% tuttavia meta-analisi riportano diminuzioni dell'ordine dell'1-5% di CH₄ integrando 10 g di grassi alimentari per kg di sostanza secca (Beauchemin *et al.*, 2020).

Gli acidi grassi polinsaturi hanno dimostrato essere i più efficaci (Patra, 2013).

La modalità d'azione di questi composti viene svolta attraverso diversi meccanismi. In particolare la bioidrogenazione degli acidi grassi insaturi può fornire un'alternativa via di smaltimento di H₂, sebbene sia dimostrato essere quantitativamente piccola (1-2% dell'H₂ disponibile) (Beauchemin *et al.*, 2020).

Un altro meccanismo d'azione è dovuto agli effetti tossici degli acidi grassi liberi svolta sia sui metanogeni che sui protozoi (Fievez *et al.*, 2003; Patra *et al.*, 2017).

La quantità della riduzione della produzione di metano varia in funzione della fonte e del dosaggio del grasso utilizzato (Fievez *et al.*, 2003). Inoltre l'effetto sembra essere temporaneo a causa della formazione di fenomeni di resistenza selettiva ed in particolare, questa sembra essere sviluppata specificatamente da diversi microrganismi. In sintesi, l'integrazione di grassi alimentari, causa una prima lieve riduzione del metano enterico dovuta dell'efficacia di questi composti e successivamente si osserveranno progressivamente valori normali (Patra *et al.*, 2017). Inoltre l'utilizzo di grassi alimentari nelle diete causa generalmente una riduzione della digeribilità della parete vegetale e della ingestione di sostanza secca, inibizione della fermentazione ruminale e depressione ed alterazione della sintesi di grassi nel latte (Patra, 2013; Beauchemin *et al.*, 2020). L'insieme degli effetti indesiderati, la scarsa mitigazione del metano e la sua temporaneità rende l'integrazione lipidica inefficace nella riduzione del metano enterico nei bovini da latte.

2.2.7 Biochar

L'utilizzo di sottoprodotti industriali e forestali nell'alimentazione bovina contribuisce alla formazione di un settore zootecnico sempre più sostenibile. In questo ambito è stato studiato l'utilizzo di Biochar come integratore nella razione dei bovini.

Il Biochar è un prodotto ricco di carbonio ottenuto dalla pirolisi di biomassa ad alte temperature con un apporto limitato di ossigeno. Originalmente è stato utilizzato con successo nella modificazione dei terreni ed aumentare la disponibilità di nutrienti (Schmidt *et al.*, 2019; Rodrigues *et al.*, 2020). Di conseguenza diversi risultati hanno permesso di ipotizzare un suo possibile utilizzo nella ricerca di strategie alimentari per ridurre la produzione di metano enterico dei ruminanti. Questo composto è caratterizzato dall'essere altamente poroso e dunque ha un'ampia superficie interna capace di adsorbire gas e carbonio e di fornire biofilm di habitat per una proliferazione maggiore delle popolazioni microbiche (Teoh *et al.*, 2019; Rodrigues *et al.*, 2020 Tamayao *et al.*, 2021). Durante il processo di pirolisi la temperatura costituisce un fattore importante nella formazione della porosità in quanto alte temperature causano la fuoriuscita di quantità maggiori di sostanze volatili, al contrario delle basse (Tamayao *et al.*, 2021).

Sebbene vi sia stata riposta grande aspettativa da parte della comunità scientifica, questo composto ha mostrato risultati fortemente contrastanti e spesso ambigui. Infatti sono numerosi gli studi, sia *in vitro* che *in vivo*, nei quali si osserva come l'integrazione di Biochar possa ridurre (fino al 20%), non alterare o perfino aumentare la produzione di metano (Calvelo Pereira *et al.*, 2014; Saleem *et al.*, 2018; Teoh *et al.*, 2019; Rodrigues *et al.*, 2020; Tamayao *et al.*, 2021). Questi risultati non in accordo sembrano essere dovuti a diversi fattori quali temperatura del processo di pirolisi, fonte e dimensione del composto (Teoh *et al.*, 2019; Rodrigues *et al.*, 2020). Un altro fattore che potrebbe spiegare determinati risultati sembra essere la qualità della razione a cui viene integrato il Biochar. Infatti sono stati osservati miglioramenti nella cinetica delle fermentazioni con foraggi di qualità intermedia, mentre non sono state misurate con razioni di qualità superiore (Teoh *et al.*, 2020). Tuttavia per verificare questa teoria sono

necessari numerosi studi per esaminare l'effetto di un singolo trattamento Biochar su varie composizioni di foraggio. Anche il pH di questo composto sembra rivestire particolare influenza sulla capacità di ridurre la produzione di metano. In particolare sono state osservate riduzioni solo con pH acidi (Saleem *et al.*, 2018) mentre non si sono verificate con pH basici (Teoh *et al.*, 2019).

In gran parte degli studi l'aggiunta di Biochar alla razione, non ha modificato la produzione totale di AGV, non ha comportato effetti significativi sulle fermentazioni ruminali, sulla digeribilità dell'alimento e sulle popolazioni microbiche (Rodrigues *et al.*, 2019; Teoh *et al.*, 2019; Tamayao *et al.*, 2021). Saleem *et al.* (2018) hanno osservato un aumento della digeribilità dell'alimento. I numerosi studi contrastanti sull'utilizzo di questo composto, con lo scopo di mitigare la produzione di metano enterico, dunque, non sono sufficienti per chiarire gli effetti sulle fermentazioni ruminali e sui meccanismi d'azione. Rimane quindi ancora in discussione la sua capacità nella riduzione della produzione di metano.

2.2.8 Alimentazione microbica diretta

L'integrazione di microrganismi nella razione dei bovini detta *Direct-Fed Microbials* (DFM), viene comunemente utilizzata per stabilizzare la fermentazione ruminale nei bovini ad alta produzione. Ad esempio, è stato osservato come l'utilizzo del lievito *Saccharomyces cerevisiae* favorisca il corretto svolgimento delle fermentazioni, quando nell'ambiente ruminale vi sono condizioni particolarmente difficili per il microbiota (Philippeau *et al.*, 2017). Sono stati effettuati alcuni studi in cui si analizzava la capacità diretta di determinati microrganismi o dei loro metaboliti nel ridurre l'emissione di metano. Ad esempio, alcune pubblicazioni hanno studiato l'efficacia di *Propiobacterium* e *Lactobacillus* spp. nella mitigazione della produzione di metano. Queste specie, promuovendo la sintesi di propionato e di conseguenza l'utilizzo di H₂, avrebbero potuto ridurre l'emissione di metano. Nonostante ciò, spesso non sono state osservate riduzioni di metano e neppure variazioni nelle fermentazioni ruminali, talvolta l'hanno ridotta leggermente ed altre volte l'hanno aumentata (Jeyanathan *et al.*, 2019). Gli studi presenti mostrano tuttavia una grande disaccordo tra i risultati che

sembrano variare in funzione della dose, della specie e del ceppo batterico. Inoltre sono state osservate variazioni anche in funzione delle condizioni sperimentali quali dieta, stato fisiologico e specie di ruminanti (Philippeau *et al.*, 2017; Jeyanathan *et al.*, 2019). Sembra rivestire un ruolo fondamentale la quantità di amido presente nella razione di base. Infatti riduzioni dell'emissione di metano pari al 26% sono avvenute solo con diete contenenti basse quantità di amido (Philippeau *et al.*, 2017; Jeyanathan *et al.*, 2019). Una recente revisione a cura di Doyle *et al.* (2019) ha evidenziato come l'utilizzo di batteri lattici possa riportare effetti benefici quali un aumento della produzione di latte, una variazione nella composizione del grasso del latte, una migliore efficienza alimentare e un incremento di peso giornaliero. Tuttavia alcuni benefici non sono stati osservati in tutti gli studi (Doyle *et al.*, 2019).

Altre specie microbiche sono state studiate grazie alla loro capacità di produrre metaboliti secondari con una possibile efficacia nella riduzione della produzione di metano (Kumar *et al.*, 2009; Morgavi *et al.*, 2013). In particolare sono stati studiati alcuni ceppi di batteri lattici capaci di produrre batteriocine possibilmente sfruttabili contro i metanogeni. Gli studi sulle batteriocine non sono numerosi dunque ne sono state identificate ancora poche. Una di queste è la nisina prodotta da *Lactococcus lactis* (Kumar *et al.*, 2009; Doyle *et al.*, 2019). *In vitro* ha dimostrato di poter ridurre le emissioni di metano del 36%, tuttavia in quanto sensibile alle proteasi ruminali ed a causa del repentino sviluppo di resistenza da parte dei metanogeni, *in vivo* non ha dimostrato alcuna riduzione (Doyle *et al.*, 2019).

Un'altra batteriocina individuata è bovicina HC5, prodotta da *Streptococcus equinus* HC5, che ha inibito la produzione di CH₄ del 53% *in vitro* (Doyle *et al.*, 2019; Garsa *et al.*, 2019). Tuttavia l'effetto della bovicina sul modello di fermentazione del rumine non è stato finora esplorato. A questo composto i metanogeni non sono stati in grado di sviluppare alcun adattamento, di conseguenza si presume che l'utilizzo di batteriocine derivanti da batteri ruminali non porti a fenomeni di resistenza (Doyle *et al.*, 2019; Garsa *et al.*, 2019). È stato osservato come l'attività di un gran numero di batteriocine sia variabile in funzione del pH ed alcune mostrano scarsa attività a pH neutro (Garsa *et al.*, 2019).

In conclusione, anche se l'uso di batteriocine sia supportato da pochi studi sembra rappresentare un approccio efficace per la riduzione del CH₄ enterico.

I metaboliti secondari prodotti dai funghi sono stati studiati recentemente da pochissimi autori, dimostrando la necessità di dover ampliare la ricerca di nuovi inibitori della metanogenesi anche all'interno di questo regno. Un genere fungineo testato è *Monascus* spp. responsabile della produzione di molecole bioattive tra cui inibitori della 3-idrossi-3-metil-glutaril-coenzima A reduttasi (HMGCR), enzima chiave della biosintesi del colesterolo. Tra le varie molecole inibitorie prodotte dal fungo le più attive sono la monacolina K e la lovastatina. In particolare la lovastatina inibisce la sintesi di isoprenoidi necessari per la produzione del colesterolo all'interno degli *Archea* (Satyanagalakshmi *et al.*, 2015). Inoltre alcuni ceppi di *Monascus* spp. hanno la capacità di produrre la citrinina, una micotossina (Morgavi *et al.*, 2013) con livelli massimi accettabili per mangimi e alimenti fissati dall'UE pari a 100 ng/g. Pertanto i ceppi che producono questa micotossina non devono essere utilizzati per ragioni di sicurezza dei mangimi e per ridurre gli incidenti di tossicità nei ruminanti.

La produzione di diversi composti con azione sinergica ed inibitoria della HMGCR suggeriscono un effetto specifico contro i metanogeni (Morgavi *et al.*, 2013; Satyanagalakshmi *et al.*, 2015), tuttavia sono necessarie ulteriori prove per confermare questa tesi.

Morgavi *et al.* (2013) hanno identificato riduzioni della produzione di metano *in vitro* fino all'86% con una lieve variazione positiva di gas prodotta ed uno spostamento delle proporzioni di AGV riducendo il rapporto acetato/propionato. Questo permette di suggerire come l'utilizzo di questo fungo come additivo non sviluppi effetti negativi sulla digeribilità dell'alimento. Il risultato sembra tuttavia essere legato al substrato di crescita utilizzato. Infatti Morgavi *et al.* (2013) hanno identificato variazioni maggiori se *Monascus* spp. veniva coltivato utilizzando il riso come substrato. Questo è stato osservato anche *in vivo*, nello stesso studio, quando nella razione alimentare degli ovini è stato incluso riso fermentato da *Monascus* spp., raggiungendo riduzioni fino al 30%. *In vivo* la concentrazione batterica ruminale è stata stimolata dal trattamento, la conta dei batteri metanogeni è stata ridotta, mentre i protozoi non hanno subito variazioni.

Sebbene siano state dimostrate riduzioni della produzione di metano negli ovini, nelle bovine da latte non è stato tuttora sperimentato.

Lo studio sull'utilizzo dei metaboliti secondari dei funghi come additivi delle razioni alimentari con lo scopo di ridurre le emissioni di metano nei ruminanti è stato solo iniziato. L'estrema diversità che questo regno contiene al suo interno permette di presumere che vi siano ampie possibilità nell'individuare sostanze bioattive efficaci da poter utilizzare e pertanto rimane auspicabile il proseguimento della ricerca da parte della comunità scientifica.

3. CONCLUSIONI

Il presente elaborato mira ad individuare ed analizzare i possibili approcci alimentari per ridurre l'emissione di metano enterico nelle bovine da latte.

La manipolazione della dieta alimentare sembra essere la strategia che ha dimostrato fin da subito le riduzioni più promettenti, oltre ad essere la più accettata dai produttori. Fondamentalmente si può suddividere in due approcci differenti: la gestione dell'alimentazione modificando le quantità, le qualità e le proporzioni degli alimenti che compongono la razione alimentare, oppure aggiungendo additivi atti ad inibire direttamente o indirettamente le comunità responsabili della metanogenesi.

La riduzione della produzione di metano grazie alla modificazione della dieta si basa sul fatto che razioni più digeribili e ricche di amidi portino ad una serie di effetti come aumenti del livello di ingestione, del tasso di passaggio nel rumine e spostamenti delle fermentazioni ruminali riducendone talvolta l'entità. L'insieme di questi effetti si traduce in riduzioni di metano enterico più o meno intense. Anche le lavorazioni che possono essere effettuate sugli alimenti prima di essere ingeriti dagli animali, quali triturazione e pellettatura, possono influenzare l'emissione di metano riducendola. Nonostante ciò, potrebbe non essere sufficiente da giustificare il maggiore dispendio energetico ed economico necessario per queste lavorazioni ed i possibili squilibri fermentativi provocati alle bovine. L'utilizzo di questo approccio in generale è spesso realizzato dai produttori grazie agli aumenti produttivi e miglioramenti vari (come la salute) che ne conseguono, tuttavia non permettono riduzioni significative.

Pertanto una delle sfide attuali della comunità scientifica è rappresentata dall'individuare additivi efficaci nell'abbattere l'emissione di metano, ma soprattutto facilmente utilizzabili su scala globale senza causare effetti tossici per gli animali, gli esseri umani e l'ambiente.

In passato sono stati identificati diversi additivi ed integratori utili al perseguimento di questo scopo, sebbene siano stati successivamente vietati. Ad esempio è stato analizzato l'utilizzo degli ionofori come il Monensin che

nonostante le possibili opportunità rilevate, si scontra con il cambiamento normativo che vieta l'utilizzo degli antibiotici nell'alimentazione animale, introdotto nell'Unione Europea dal gennaio 2006 a causa della comparsa di residui nei prodotti e di fenomeni di resistenza (Direttiva 1831/2003 / CEE, Commissione Europea, 2003).

Un altro esempio interessante è rappresentato dalla somministrazione alle bovine da latte di composti alogenati, come il bromoformio e il bromoclorometano. Queste molecole hanno dimostrato di causare importanti riduzioni di metano senza significative variazioni delle fermentazioni ruminali. Tuttavia lo sviluppo di effetti tossici per gli animali, per l'uomo e l'effetto negativo sullo strato dell'ozono hanno portato il commercio di questi composti ad essere fortemente regolamentato, se non vietato in alcuni Paesi.

Pertanto, l'interesse della comunità scientifica si è spostato nell'identificare e valutare alternative differenti per modulare le fermentazioni ruminali. Particolare interesse è stato risposto nella ricerca di metaboliti secondari vegetali utili a questo scopo. Sono stati individuati diversi oli essenziali, tannini e saponine capaci di ridurre fortemente la produzione di metano *in vitro*. Nonostante i numerosi studi sui diversi metaboliti vi sono ancora forti variazioni nei risultati *in vivo*, che sembrano causare un impatto di carattere temporaneo che va da basso a moderato (fino al 20%) sulla riduzione dell'emissione di CH₄. Anche l'integrazione lipidica non ha dimostrato risultati interessanti nelle bovine da latte, causando squilibri temporanei nelle fermentazioni ruminali che portano a riduzioni nella sintesi di grassi del latte.

La comunità scientifica ha riposto attenzione anche nell'individuazione di sottoprodotti industriali e forestali utilizzabili come possibili integratori. Questo avrebbe contribuito a rendere il settore zootecnico più sostenibile, riducendo l'emissione di metano ed incrementando l'economia circolare. Tale interesse ha portato ad analizzare l'effetto di Biochar sulle fermentazioni ruminali nelle bovine. Il numero di risultati limitato ed in disaccordo, che vanno dall'assenza di effetto alla riduzione del 20% della sintesi di metano, fanno ritenere questi composti tuttora in discussione, anche se hanno dimostrato di non avere un futuro promettente nell'alimentazione bovina.

Si è pensato dunque di integrare la razione alimentare direttamente con batteri capaci di spostare le fermentazioni ruminali verso altri prodotti, riducendo i substrati disponibili per la metanogenesi. Sono stati analizzati batteri del genere *Propiobacterium* e batteri lattici già utilizzati nell'inoculo per insilati. Gli studi eseguiti non sono ancora sufficienti per chiarire le diverse variazioni di risultati. In generale è stato dimostrato che l'utilizzo di quest'integrazione possa migliorare l'efficienza alimentare, la produzione di latte ed altre influenze positive sulla composizione del latte e sull'incremento di peso giornaliero sebbene il suo ruolo nei confronti della metanogenesi non sia ancora del tutto chiara. Spesso non vi è stata alcuna riduzione, talvolta l'emissione è diminuita ma in alcuni studi è stata perfino aumentata.

Insieme all'integrazione diretta di batteri sono state individuate e studiate anche alcune batteriocine, come la nisina e la bovicina HC5. I risultati *in vitro* sono stati promettenti con riduzioni fino al 50% per la bovicina HC5: tuttavia *in vivo* non è stata studiata e la nisina è risultata essere sensibile alle proteasi ed i batteri metanogeni hanno sviluppato repentinamente fenomeni di resistenza nei sui confronti.

Anche i metaboliti secondari fungini sembrano poter avere un effetto inibitorio sulla produzione di metano sebbene il numero di studi a riguardo sia strettamente limitato. In particolare l'integrazione di riso fermentato da *Monascus* spp. ha causato riduzioni *in vitro* fino all'86% senza variazioni negative delle fermentazioni ruminali. *In vivo* non sono ancora stati eseguiti studi sull'effetto di questo genere fungino sulle bovine da latte. Nell'unico studio *in vivo* sugli ovini sono state raggiunte riduzioni fino al 30%.

La ricerca sull'utilizzo diretto nell'alimentazione di batteri, batteriocine o dei metaboliti secondari fungini è solo all'inizio, dimostrando di avere una capacità nel ridurre l'emissione di metano importante. Pertanto ampliare il più possibile le conoscenze anche in questo ambito risulta necessario per sviluppare strategie diverse ed utilizzabili nella mitigazione del metano.

Recentemente la comunità scientifica ha identificato alcuni possibili inibitori molto promettenti. Il primo fa parte dei nitro derivati ed è il 3-nitroossipropanolo (3-NOP). Sebbene vi siano tuttora delle controversie riguardo la digeribilità delle fibre, che comunque non sembra essere ridotta, questa piccola molecola ha

dimostrato forti riduzioni di metano sia *in vitro* che *in vivo*, dove con dosaggi di 150 mg/kg di sostanza secca sono state riscontrate riduzioni persistenti pari al 53%. A questi dosaggi il 3-NOP non ha dimostrato effetti di tossicità ed è stato metabolizzato dai batteri in nitrito e 1,3-propandiolo, comunemente presenti nel rumine. Il motivo di queste piccole dosi deriva dall'alta specificità del meccanismo d'azione di questa molecola. I diversi studi che hanno approfondito l'utilizzo di questo composto dimostrandone l'efficacia gli hanno permesso di poter essere valutato ed attualmente ancora in attesa di approvazione dagli enti governativi per poter essere commercializzato.

Gli altri inibitori individuati sono due specie algali del genere *Asparagopsis*, e precisamente *A. taxiformis* e *A. armata*. Genere di alghe rosse caratterizzate dalla capacità di accumulare grandi quantità di composti alogenati tra cui maggiormente il Bromoformio. Questi composti fungono da difesa chimica contro stress chimici, fisici e microbici per le alghe. Il vantaggio di utilizzare queste alghe nell'alimentazione bovina risiede nell'opportunità di assicurarsi la riduzione dell'emissione di metano, sfruttando il meccanismo d'azione dei composti alogenati, senza che questi raggiungano concentrazioni tossiche per l'animale. Infatti hanno dimostrato di riuscire a ridurre la produzione di metano *in vitro* fino al 98% mentre *in vivo* fino al 65%. Tuttavia la dose di integrazione adatta non è stata ancora individuata in quanto sulle bovine da latte trattate sono state osservate riduzioni del livello d'ingestione e della produzione di latte, sebbene questo sia stato comunque maggiore di quello atteso grazie all'aumento dell'efficienza alimentare. Gli studi eseguiti sulle bovine da latte sono tuttora un numero troppo esiguo per confermare l'utilizzo delle alghe come una strategia efficace nella riduzione dell'emissione di metano. Nonostante ciò è stata dimostrata fin da subito la sua promettente capacità e possibilità di utilizzo futuro.

In conclusione, il 3-NOP e le attuali alghe identificate rappresentano gli inibitori tuttora più promettenti utilizzabili come possibili additivi per mitigare la produzione di metano enterico nelle bovine da latte.

Nonostante ciò, in futuro la ricerca ha ancora grande possibilità per espandere le conoscenze degli effetti sulle bovine da latte dell'alimentazione diretta

microbica, dei metaboliti secondari vegetali, batterici e fungini, che offrono numerose possibilità promettenti di riduzione del metano enterico.

Bibliografia

- Abberton, M.T., MacDuff, J.H., Marshall, A.H., Humphreys, M.W., 2007. The Genetic Improvement of Forage Grasses and Legumes to Reduce Greenhouse Gas Emissions. Communication Division, FAO. <https://www.uncclean.org/wp-content/uploads/library/fao143.pdf> visitato gennaio 2021.
- Abbott D.W., Aasen I.M., Beauchemin K.A., Grondahl F., Gruninger R., Hayes M., Huws S., Kenny D.A., Krizsan S.J., Kirwan S.F., Lind V., Meyer U., Ramin M., Theodoridou K., von Soosten D., Walsh P.J., Waters S., Xing X., 2020. Seaweed and Seaweed Bioactives for Mitigation of Enteric Methane: Challenges and Opportunities. *Animals*, 10(12), 2432.
- Abecia L., P.G. Toral, A.I. Martín-García, G. Martínez, N.W. Tomkins, E. Molina-Alcaide, C.J. Newbold, D.R. Yáñez-Ruiz, 2012. Effect of bromochloromethane on methane emission, rumen fermentation pattern, milk yield, and fatty acid profile in lactating dairy goats. *Journal of Dairy Science*, 95, 2027-2036,
- Aboagye I. A., Beauchemin K. A., 2019. Potential of molecular weight and structure of tannins to reduce methane emissions from ruminants: a review. *Animals*, 9(11), 856.
- Baaske L, Gäbel G, Dengler F, 2020. Ruminant epithelium: a checkpoint for cattle health. *Journal of Dairy Research* 87, 322-329.
- BDN, Dati forniti dalla BDN dell'anagrafe Zootecnica istituita dal Ministero della Salute presso il CSN dell'Istituto "G. Caporale" di Teramo. 2019.
- Beauchemin K.A., E.M. Ungerfeld, R.J. Eckard, M. Wang, 2020. Review: Fifty years of research on rumen methanogenesis: lessons learned and future challenges for mitigation. *Animal*, 14, s2-s16.

- Bell N., Wickersham T., Sharma V., Callaway T., 2015. Ionophores: a tool for improving ruminant production and reducing environmental impact. *Livestock production and climate change*. CABI, London, UK, 263-272.
- Boadi D., Benchaar C., Chiquette J., Massé D., 2004. Mitigation strategies to reduce enteric methane emissions from dairy cows: Update review. *Canadian Journal of Animal Science*, 84, 319-335.
- Bodas R., Prieto N., García-González R., Andrés S., Giráldez F. J., López S. 2012. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Animal Feed Science and Technology*, 176(1-4), 78-93.
- Calsamiglia S., Busquet M., Cardozo P.W., Castillejos L., Ferret, A., 2007. Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of dairy science*, 90(6), 2580-2595.
- Calvelo Pereira R., S. Muetzel, M. Camps Arbestain, P. Bishop, K. Hina, M. Hedley, 2014. Assessment of the influence of biochar on rumen and silage fermentation: A laboratory-scale experiment. *Animal Feed Science and Technology*, 196, 22-31.
- Cheok C.Y., H. A. K. Salman, R. Sulaiman, 2014. Extraction and quantification of saponins: A review. *Food Research International*, 59, 16-40.
- Chun Y.G., S.K. Ji, H. Yan, Y. J. Wang, J. J. Liu, Z. J. Cao, H. J. Yang, W. J. Zhang, S. L. Li, 2020. Dynamic change of the gastrointestinal bacterial ecology in cows from birth to adulthood. *MicrobiologyOpen*, 9:e1119.
- Cobellis G., Trabalza-Marinucci M., Yu, Z., 2016. Critical evaluation of essential oils as rumen modifiers in ruminant nutrition: A review. *Science of the Total Environment*, 545, 556-568.

- De Haas Y., Windig J.J., Calus M.P.L., Dijkstra J., De Haan M., Bannink A., Veerkamp R.F., 2011. Genetic parameters for predicted methane production and potential for reducing enteric emissions through genomic selection. *J. Dairy Sci.* 94, 6122-6134.
- De Menezes A. B., Lewis E., O'Donovan M., O'Neill B. F., Clipson N., Doyle, E. M., 2011. Microbiome analysis of dairy cows fed pasture or total mixed ration diets. *FEMS microbiology ecology*, 78(2), 256-265.
- Denman S. E., Martinez F. G., Shinkai T., Mitsumori M., McSweeney C. S., 2015. Metagenomic analysis of the rumen microbial community following inhibition of methane formation by a halogenated methane analog. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1087.
- Dieho K., Dijkstra J., Schonewille J. T., & Bannink A., 2016. Changes in ruminal volatile fatty acid production and absorption rate during the dry period and early lactation as affected by rate of increase of concentrate allowance. *Journal of dairy science*, 99(7), 5370-5384.
- Difford G.F., D. R. Plichta, P. Løvendahl, J. Lassen, S. J. Noel, O. Højberg, A. G. Wright, Z. Zhu, L. Kristensen, H. B. Nielsen, B. Guldbandsen, G. Sahana, 2018. Host genetics and the rumen microbiome jointly associate with methane emissions in dairy. *PLoS Genet* 14 (10):e1007580.
- Doyle N., Mbandlwa P., Kelly W. J., Attwood G., Li Y., Ross R. P., Stanton C., Leahy S., 2019. Use of Lactic Acid Bacteria to Reduce Methane Production in Ruminants, a Critical Review. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2207.
- Duin E. C., T. Wagner, S. Shima, D. Prakash, B. Cronin, D. R. Yáñez-Ruiz, S. Duval, R. Rumbeli, R. T. Stemmler, R. K. Thauer, and M. Kindermann, 2016. Mode of action uncovered for the specific reduction of methane emissions

- from ruminants by the small molecule 3-nitrooxypropanol. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 113:6172-6177.
- Ellis J. L., Dijkstra J., Kebreab E., Bannink A., Odongo N. E., McBride B. W., France J., 2008. Aspects of rumen microbiology central to mechanistic modelling of methane production in cattle. The Journal of Agricultural Science, 146(2), 213.
 - Eom J.S., Lee S.J., Lee Y., Kim H.S., Choi Y.Y., Kim H.S., Kim D.H., Lee S.S., 2020. Effects of supplementation levels of *Allium fistulosum* L. extract on *in vitro* ruminal fermentation characteristics and methane emission. PeerJ 8:e9651.
 - Fievez V., Dohme F., Danneels M., Raes K., Demeyer D., 2003. Fish oils as potent rumen methane inhibitors and associated effects on rumen fermentation *in vitro* and *in vivo*. Animal Feed Science and Technology, 104(1-4), 41-58.
 - Finlay B.J., Genoveva E., Clarke K.J., Williams A.G., Embley T.M., Robert P. Hirt, 1994. Some rumen ciliates have endosymbiotic methanogens, FEMS Microbiology Letters 117, 157-161.
 - Garsa A. K., Choudhury P. K., Puniya A. K., Dhewa T., Malik R. K., Tomar, S. K., 2019. Bovicins: the bacteriocins of streptococci and their potential in methane mitigation. Probiotics and antimicrobial proteins. 11(4), 1403-1413.
 - Gerber P. J., Henderson B., Makkar H. P., 2013. Mitigation of greenhouse gas emissions in livestock production: a review of technical options for non-CO₂ emissions (No. 177). Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).

- Guan L. L., Nkrumah J. D., Basarab J. A., Moore, S. S., 2008. Linkage of microbial ecology to phenotype: correlation of rumen microbial ecology to cattle's feed efficiency. *FEMS microbiology letters*, 288(1), 85-91.
- Guyader J., Eugène M., Doreau M., Morgavi D. P., Gérard C., Martin C., 2017. Tea saponin reduced methanogenesis *in vitro* but increased methane yield in lactating dairy cows. *Journal of dairy science*, 100(3), 1845-1855.
- Guzman C. E., Bereza-Malcolm, L. T., De Groef, B., & Franks, A. E., 2015. Presence of selected methanogens, fibrolytic bacteria, and proteobacteria in the gastrointestinal tract of neonatal dairy calves from birth to 72 hours. *PLoS One*, 10(7):e0133048.
- Harmon D.L., R. M. Yamka, and N. A. Elam, 2004. Factors affecting intestinal starch digestion in ruminants: A review. *Canadian Journal of Animal Science*. 84(3): 309-318.
- Haque M., 2018. Dietary manipulation: a sustainable way to mitigate methane emissions from ruminants. *J Anim Sci Technol* 60, 15.
- Hassanpour S., Maherisis N., Eshratkhah B., Mehmandar F.B., 2011. Plants and secondary metabolites (Tannins): A review. *IJFSE*, 1, 47-53.
- Henderson G., Cox F., Ganesh S., Jonker A., Young W., Janssen P. H., 2015. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. *Sci Rep* 5, 1-15.
- Hess M., Paul S.S., Puniya A.K., van der Giezen M., Shaw C., Edwards J.E., Fliegerová K., 2020. Anaerobic Fungi: Past, Present, and Future. *Front. Microbiol.* 11:584893.
- Hibbett D.S., M. Binder, J. F. Bischoff, M. Blackwell, P. F. Cannon, O. E. Eriksson, S. Huhndorf, T. James, P. M. Kirk, R. Lücking, H. T. Lumbsch, F.

- Lutzoni, P. B. Matheny, D. J. McLaughlin, M. J. Powell, S. Redhead, C. L. Schoch, J. W. Spatafora, J. A. Stalpers, R. Vilgalys, M. C. Aime, A. Aptroot, R. Bauer, D. Begerow, G. L. Benny, L. A. Castlebury, P. W. Crous, Y. Dai, W. Gams, D. M. Geiser, G. W. Griffith, C. Gueidan, D. L. Hawksworth, G. Hestmark, K. Hosaka, R. A. Humber, K. D. Hyde, J. E. Ironside, U. Kõljalg, C. P. Kurtzman, K. H. Larsson, R. Lichtwardt, J. Longcore, J. Miądlikowska, A. Miller, J.M. Moncalvo, S. Mozley-Standridge, F. Oberwinkler, E. Parmasto, V. Reeb, J. D. Rogers, C. Roux, L. Ryvarden, J. P. Sampaio, A. Schüßler, J. Sugiyama, R. G. Thorn, L. Tibell, W. A. Untereiner, C. Walker, Z. Wang, A. Weir, M. Weiss, M. M. White, K. Winka, Y. Yao, N. Zhang, 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, 111, 509-547.
- Holtshausen L., A.V. Chaves, K.A. Beauchemin, S.M. McGinn, T.A. McAllister, N.E. Odongo, P.R. Cheeke, C. Benchaar, 2009. Feeding saponin-containing *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* to decrease enteric methane production in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 92, 2809-2821.
 - Jami E., White B.A., Mizrahi I., 2014. Potential Role of the Bovine Rumen Microbiome in Modulating Milk Composition and Feed Efficiency. *PLoS ONE* 9(1):e85423.
 - Jayanegara A., Leiber F., Kreuzer M., 2012. Meta-analysis of the relationship between dietary tannin level and methane formation in ruminants from *in vivo* and *in vitro* experiments. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 96(3), 365-375.
 - Jayanegara A., Wina E., Takahashi J., 2014. Meta-analysis on methane mitigating properties of saponin-rich sources in the rumen: influence of addition levels and plant sources. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 27(10), 1426.
 - Janssen P. H., Kirs M., 2008. Structure of the archaeal community of the rumen. *Applied and environmental microbiology*, 74(12), 3619-3625.

- Janssen P.H., 2010. Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics, *Animal Feed Science and Technology*, 160, 1-22.
- Jeyanathan J., Martin C., Eugène M., Ferlay A., Popova M., Morgavi D. P., 2019. Bacterial direct-fed microbials fail to reduce methane emissions in primiparous lactating dairy cows. *Journal of animal science and biotechnology*, 10(1), 1-9.
- Johnson K.A., D. E. Johnson. 1995. Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science*, 73, 2483-2492.
- Kobayashi Y., 2006. Inclusion of novel bacteria in rumen microbiology: Need for basic and applied science. *Animal Science Journal*, 77: 375-385.
- Knapp J. R., Laur G. L., Vadas P. A., Weiss W. P., Tricarico J. M., 2014. Invited review: Enteric methane in dairy cattle production: Quantifying the opportunities and impact of reducing emissions. *Journal of Dairy Science*, 97, 3231-3261.
- Knight T., Ronimus R.S., Dey D., Tootill C., Naylor G., Evans P., Molano G., Smith A., Tavendale M., Pinares-Patino C.S., Clark, H., 2011. Chloroform decreases rumen methanogenesis and methanogen populations without altering rumen function in cattle. *Animal Feed Science and Technology*, 166, 101-112.
- Krause D. O., Nagaraja T. G., Wright A. D. G., Callaway T. R., 2014. Board-invited review: Rumen microbiology: Leading the way in microbial ecology. *Journal of Animal Science*, 91, 331-341.
- Kumar S., Puniya A. K., Puniya M., Dagar S. S., Sirohi S. K., Singh K., Griffith G. W., 2009. Factors affecting rumen methanogens and methane mitigation

- strategies. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(9), 1557-1566.
- Kumari S., R.K. Fagodiya, M. Hiloidhari, R.P. Dahiya, A. Kumar, 2020. Methane production and estimation from livestock husbandry: A mechanistic understanding and emerging mitigation options. *Science of The Total Environment*, 709, 136135.
 - Lamminen M., Halmemies-Beauchet-Filleau A., Kokkonen T., Jaakkola S., Vanhatalo A., 2019. Different microalgae species as a substitutive protein feed for soya bean meal in grass silage based dairy cow diets. *Animal Feed Science and Technology*, 247, 112-126.
 - Li Y., Jin W., Mu C., Cheng Y., Zhu W., 2017. Indigenously associated methanogens intensified the metabolism in hydrogenosomes of anaerobic fungi with xylose as substrate. *J. Basic Microbiol.* 57, 933-940.
 - Li Z., Deng Q., Liu Y., Yan T., Li F., Cao Y., Yao J. 2018. Dynamics of methanogenesis, ruminal fermentation and fiber digestibility in ruminants following elimination of protozoa: a meta-analysis. *Journal of animal science and biotechnology*, 9(1), 1-9.
 - Machado L., Magnusson M., Paul N. A., Kinley R., de Nys R., Tomkins N., 2016. Identification of bioactives from the red seaweed *Asparagopsis taxiformis* that promote antimethanogenic activity *in vitro*. *Journal of Applied Phycology*, 28(5), 3117-3126.
 - Macheboeuf D., Morgavi D.P., Papon Y., Mousset J.L., Arturo-Schaan M., 2008. Dose-response effects of essential oils on *in vitro* fermentation activity of the rumen microbial population. *Animal Feed Science and Technology*, 145(1-4), pp.335-350.

- Magnusson M., Vucko M. J., Neoh T. L., de Nys, R., 2020. Using oil immersion to deliver a naturally-derived, stable bromoform product from the red seaweed *Asparagopsis taxiformis*. *Algal Research*, 51, 102065.
- Maia M. R., Fonseca A. J., Oliveira H. M., Mendonça C., Cabrita A. R. 2016. The potential role of seaweeds in the natural manipulation of rumen fermentation and methane production. *Scientific reports*, 6(1), 1-10.
- McAllister T. A., Okine E. K., Mathison G. W., Cheng K.-J., 1996. Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. *Canadian Journal of Animal Science*, 76, 231-243.
- McCauley J. I., Labeeuw L., Jaramillo-Madrid A. C., Nguyen L. N., Nghiem L. D., Chaves A. V., Ralph P. J., 2020. Management of enteric methanogenesis in ruminants by algal-derived feed additives. *Current Pollution Reports*, 1-18.
- Melgar A., M.T. Harper, J. Oh, F. Giallongo, M.E. Young, T.L. Ott, S. Duval, A.N. Hristov, 2020. Effects of 3-nitrooxypropanol on rumen fermentation, lactational performance, and resumption of ovarian cyclicity in dairy cows, *Journal of Dairy Science*, 103, 410-432.
- Mitsumori M., Shinkai T., Takenaka A., Enishi O., Higuchi K., Kobayashi Y., Nonaka I., Asanuma N., Denman S. E., McSweeney C. S., 2012. Responses in digestion, rumen fermentation and microbial populations to inhibition of methane formation by a halogenated methane analogue. *British Journal of Nutrition*, 108(3), 482-491.
- Moate P.J, S.R.O. Williams, M.C. Hannah, R.J. Eckard, M.J. Auldist, B.E. Ribaux, J.L. Jacobs, W.J. Wales, 2013. Effects of feeding algal meal high in docosahexaenoic acid on feed intake, milk production, and methane emissions in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 96, 3177-3188.

- Morgavi, D., Martin, C., Jouany, J., & Ranilla, M., 2012. Rumen protozoa and methanogenesis: Not a simple cause-effect relationship. *British Journal of Nutrition*, 107(3), 388-397.
- Morgavi D. P., Martin C., Boudra H., 2013. Fungal secondary metabolites from *Monascus* spp. reduce rumen methane production *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Animal Science*, 91(2), 848-860.
- Min B. R., Solaiman S., Waldrip H. M., Parker D., Todd R. W., Brauer D., 2020. Dietary mitigation of enteric methane emissions from ruminants: A review of plant tannins mitigation options. *Animal Nutrition*, 6, 231-246.
- Nagaraja T.G., 2016. Microbiology of the Rumen. In: Millen D. D., Arrigoni M. D. B., Pacheco R. D. L., 2016. *Rumenology*. Cham, Switzerland: Springer International Publishing, 39-63.
- Newbold C.J., de la Fuente G., Belanche A., Ramos-Morales E., McEwan N.R., 2015. The Role of Ciliate Protozoa in the Rumen. *Front. Microbiol.* 6:1313.
- O'Neill B. F., Deighton M. H., O'loughlin B. M., Mulligan F. J., Boland T. M., O'donovan M., Lewis E., 2011. Effects of a perennial ryegrass diet or total mixed ration diet offered to spring-calving Holstein-Friesian dairy cows on methane emissions, dry matter intake, and milk production. *Journal of dairy science*, 94(4), 1941-1951.
- Orpin C. G., 1975. Studies on the rumen flagellate *Neocallimastix frontalis*. *J. Gen. Microbiol.* 91 249-262.
- OECD/Food and Agriculture Organization of the United Nations (2020), "Dairy and dairy products", in *OECDFAO Agricultural Outlook 2020-2029*, OECD Publishing, Paris/Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

- Patra, A.K., 2011. Effects of essential oils on rumen fermentation, microbial ecology and ruminant production. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 6(5), pp.416-428.
- Patra A.K., 2013. The effect of dietary fats on methane emissions, and its other effects on digestibility, rumen fermentation and lactation performance in cattle: a meta-analysis. *Livestock Science* 155, 244-254.
- Patra A.K., Park T., Kim M., Yu Z., 2017. Rumen methanogens and mitigation of methane emission by anti-methanogenic compounds and substances. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 8(1), 1-18.
- Philippeau C., A. Lettat, C. Martin, M. Silberberg, D.P. Morgavi, A. Ferlay, C. Berger, P. Nozière, 2017. Effects of bacterial direct-fed microbials on ruminal characteristics, methane emission, and milk fatty acid composition in cows fed high- or low-starch diets. *Journal of Dairy Science*, Volume 100, 2637-2650.
- Rodrigues A.R.F., Maia M.R.G., Cabrita A.R.J., Oliveira H.M., Bernardo M., Lapa N., Fonseca I., Trindade H., Pereira J.L., Fonseca A.J.M., 2020. Assessment of potato peel and agro-forestry biochars supplementation on *in vitro* ruminal fermentation. *PeerJ* 8:e9488.
- Romano D., C. Arcarese, A. Bernetti, A. Caputo, M. Contaldi, M. Cordella, R. De Lauretis, E. Di Cristofaro, A. Gagna, B. Gonella, F. Moricci, E. Taurino, M. Vitullo, 2020. Italian Greenhouse Gas Inventory 1990-2018. National Inventory Report, ISPRA.
<https://www.isprambiente.gov.it/it/pubblicazioni/rapporti/italian-greenhouse-gas-inventory-1990-2018.-national-inventory-report-2020-visitato-gennaio-2021>.
- Roque B.M., C. G. Brooke, J. Ladau, T. Polley, L. J. Marsh, N. Najafi, P. Pandey, L. Singh, R. Kinley, J. K. Salwen, E. Eloë-Fadrosch, E. Kebreab, M. Hess, 2019. Effect of the macroalgae *Asparagopsis taxiformis* on methane

- production and rumen microbiome assemblage. *Animal Microbiome*, 1(1), 1-14.
- (B) Roque B. M., Salwen J. K., Kinley R., Kebreab E., 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.
 - Saleem A.M., Ribeiro J. G.O., Yang W.Z., Ran T., Beauchemin K.A., McGeough E.J., Ominski K.H., Okine E.K., McAllister T.A., 2018. Effect of engineered biocarbon on rumen fermentation, microbial protein synthesis, and methane production in an artificial rumen (RUSITEC) fed a high forage diet. *Journal of Animal Science* 96:3121-3130.
 - Satyanagalakshmi K., Sridhar G. T., Sirohi S. K., 2015. An overview of the role of rumen methanogens in methane emission and its reduction strategies. *African Journal of Biotechnology*, 14(16), 1427-1438.
 - Sawai S., Saito K., 2011. Triterpenoid biosynthesis and engineering in plants. *Frontiers in plant science*, 2, 25.
 - Schmidt H., Hagemann N., Draper K., Kammann C., 2019. The use of biochar in animal feeding. *PeerJ* 7:e7373.
 - Seshadri R., Leahy S.C., Attwood G.T., Teh K.H., Lambie S.C., Cookson A.L., Eloë-Fadrosh E.A., Pavlopoulos G.A., Hadjithomas M., Varghese N.J., Paez-Espino D., Perry R., Henderson G., Creevey C.J., Terrapon N., Lapebie P., Drula E., Lombard V., Rubin E., Kyripides N.C., Henrissat B., Woyke T., Ivanova N.N., Kelly W.J. 2018. Cultivation and sequencing of rumen microbiome members from the Hungate1000 Collection. *Nature Biotechnology*, 36, 359-367.
 - Springmann M., H. C. J. Godfray, M. Rayner, P. Scarborough, 2016. Analysis and valuation of the health and climate change cobenefits of dietary change. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, 4146-4151.

- Stefenoni H. A., Räisänen S. E., Cueva S. F., Wasson D. E., Lage C. F. A., Melgar A., M.E. Fetter, P. Smith, M. Hennessy, B. Vecchiarelli, J. Bender, D. Pitta, C.L. Cantrell, C. Yarish, Hristov A. N., 2021. Effects of the macroalga *Asparagopsis taxiformis* and oregano leaves on methane emission, rumen fermentation, and lactational performance of dairy cows. *Journal of dairy science*.
- Stewart C.S., 1997. *The Rumen Microbial Ecosystem*, London, Chapman & Hall, 10-235.
- Tamayao P.J., G.O. Ribeiro, T.A. McAllister, H.E. Yang, A.M. Saleem, K.H. Ominski, E.K. Okine, E.J. McGeough, 2021. Effects of post-pyrolysis treated biochars on methane production, ruminal fermentation, and rumen microbiota of a silage-based diet in an artificial rumen system (RUSITEC). *Animal Feed Science and Technology*, 273, 114802.
- Teoh R., Caro E., Holman D.B., Joseph S., Meale S.J., Chaves A.V., 2019. Effects of Hardwood Biochar on Methane Production, Fermentation Characteristics, and the Rumen Microbiota Using Rumen Simulation. *Front. Microbiol.* 10:1534.
- Thauer R. K., Kaster A. K., Seedorf H., Buckel W., Hedderich R., 2008. Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. *Nature Reviews Microbiology*, 6(8), 579-591.
- Wallace R.J., G. Sasson, P.C. Garnsworthy, I. Tapio, E. Gregson, P. Bani, P. Huhtanen, A. R. Bayat, F. Strozzi, F. Biscarini, T. J. Snelling, N. Saunders, S. L. Potterton, J. Craigon, A. Minuti, E. Trevisi, M. L. Callegari, F. P. Cappelli, E. H. Cabezas-Garcia, J. Vilkki, C. Pinares-Patino, K. O. Fliegerová, J. Mrázek, H. Sechovcová, J. Kopečný, A. Bonin, F. Boyer, P. Taberlet, F. Kokou, E. Halperin, J. L. Williams, K. J. Shingfield, I. Mizrahi, 2019. A heritable subset of the core rumen microbiome dictates dairy cow productivity and emissions. *Science advances*, 5(7), eaav8391.

- Wang J.K., Ye J.A., Liu J.X., 2012. Effects of tea saponins on rumen microbiota, rumen fermentation, methane production and growth performance—a review. *Trop Anim Health Prod* 44, 697-706.
- Wang B., Ma M.P., Diao Q.Y., Tu Y., 2019. Saponin-Induced Shifts in the Rumen Microbiome and Metabolome of Young Cattle. *Front. Microbiol.* 10:356.
- Wina E., Muetzel S., Becker K., 2005. The impact of saponins or saponin-containing plant materials on ruminant production A Review. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(21), 8093-8105.
- Yang C., Lang W., 2019. Ruminal methane production: Associated microorganisms and the potential of applying hydrogen-utilizing bacteria for mitigation, *Science of The Total Environment*, 654, 1270-1283.
- Yusuf R.O., Z. Z. Noor, A. H. Abba, M. A. A. Hassan, M. F. M. Din, 2012. Methane emission by sectors: A comprehensive review of emission sources and mitigation methods. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16, 5059-5070.
- Vaidya J.D., van Gastelen S., Smidt H., Plugge C.M., Edwards J.E., 2020. Characterization of dairy cow rumen bacterial and archaeal communities associated with grass silage and maize silage based diets. *PLoS ONE* 15(3): e0229887.
- Zhang Q., Difford G., Sahana G., Løvendahl P., Lassen J, Lund M.S., Guldbbrandtsen B., Janss L., 2020. Bayesian modeling reveals host genetics associated with rumen microbiota jointly influence methane emission in dairy cows. *ISME J* 14, 2019-2033.
- Zhang X.M., R. J. Gruninger, A. W. Alemu, M. Wang, Z. L. Tan, M. Kindermann, K. A. Beauchemin, 2020. 3-Nitrooxypropanol supplementation

had little effect on fiber degradation and microbial colonization of forage particles when evaluated using the in situ ruminal incubation technique. Journal of Dairy Science, 103, 8986-8997,

- Zhang Z.W., Cao Z., Wang Y., Wang Y., Yang Y., Li S., 2018. Nitrocompounds as potential methanogenic inhibitors in ruminant animals: A review. Animal Feed Science and Technology, 236, 107-114.

Sitografia

- EUROSTAT: <https://ec.europa.eu/eurostat/home>
- FAOSTAT: <http://www.fao.org/faostat/en/#data>