

Estrategias nutricionales para la reducción de la producción de metano y mejora de la eficiencia de la fermentación ruminal

**Nutritional strategies for reducing
methane production and improving
the efficiency of rumen fermentation**



TESIS DOCTORAL / DOCTORAL THESIS 2023

Pedro Jesús Romero Márquez

Dirigida por Dr. David R. Yáñez Ruiz y Dr. Alejandro Belanche Gracia



UNIVERSIDAD
DE GRANADA



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

TESIS DOCTORAL

**ESTRATEGIAS NUTRICIONALES PARA LA
REDUCCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE
METANO Y MEJORA DE LA EFICIENCIA DE
LA FERMENTACIÓN RUMINAL**

*NUTRITIONAL STRATEGIES FOR REDUCING
METHANE PRODUCTION AND IMPROVING THE
EFFICIENCY OF RUMEN FERMENTATION*

PEDRO JESÚS ROMERO MÁRQUEZ

Realizada bajo la dirección de los doctores:

DAVID RAFAEL YÁÑEZ RUIZ

ALEJANDRO BELANCHE GRACIA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA
FUNDAMENTAL Y DE SISTEMA

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Pedro Jesús Romero Márquez
ISBN: 978-84-1195-146-3
URI: <https://hdl.handle.net/10481/89472>

El trabajo que se presenta en esta memoria de Tesis Doctoral ha sido realizado en el Departamento de Nutrición y Producción Animal Sostenible de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC) de Granada, dentro del grupo de investigación de Producción Sostenible de Rumiantes, respaldado por un contrato predoctoral financiado por el Programa Marco de Investigación e Innovación de la Unión Europea Horizonte 2020 (H2020), bajo el acuerdo de subvención N° 818368 (MASTER).

Parte de los resultados de esta Tesis Doctoral se recogen en las siguientes **publicaciones**:

Romero, P., Huang, R., Jiménez, E., Palma-Hidalgo, J. M., Ungerfeld, E. M., Popova, M., Morgavi, D. P., Belanche, A., & Yáñez-Ruiz, D. R. (2023). Evaluating the effect of phenolic compounds as hydrogen acceptors when ruminal methanogenesis is inhibited *in vitro* – Part 2. Dairy goats. *Animal*, 17(5), 100789. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2023.100789>

Índice de impacto (Journal Citation Reports): 3.6 (Q1 Veterinary Sciences).

Romero, P., Belanche, A., Jiménez, E., Hueso, R., Ramos-Morales, E., Salwen, J. K., Kebreab, E., & Yáñez-Ruiz, D. R. (2023). Rumen microbial degradation of bromoform from red seaweed (*Asparagopsis taxiformis*) and the impact on rumen fermentation and methanogenic archaea. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 14, 133. <https://doi.org/10.1186/s40104-023-00935-z>

Índice de impacto (Journal Citation Reports): 7 (Q1 Agriculture, Dairy & Animal Science).

Asimismo, parte de los resultados han sido presentados en los siguientes **congresos científicos**:

Romero, P., Belanche, A., Jiménez, E., Palma-Hidalgo, J.M., Martín-García, A.I., Yáñez-Ruiz D.R. 2021. Estudio *in vitro* del tratamiento combinado con alga *Asparagopsis taxiformis* y compuestos fenólicos para mitigar la producción de metano y mejorar la eficiencia de la fermentación ruminal. En: XIX Jornadas sobre Producción Animal (AIDA). Virtual.

Romero, P., Huang, R., Jiménez, E., Palma-Hidalgo, J.M., Martín-García, A.I., Ungerfeld, E.M., Popova, M., Morgavi, D.P., Belanche, A., Yáñez-Ruiz, D.R. 2021. *In vitro* study of combined treatment with *Asparagopsis taxiformis* and phenolic compounds

to mitigate methane production and improve rumen fermentation efficiency. En: 12th International Symposium on Gut Microbiology. Virtual.

Romero, P., Huang, R., Jiménez, E., Palma-Hidalgo, J.M., Martín-García, A.I., Ungerfeld, E.M., Popova, M., Morgavi, D.P., Belanche, A., Yáñez-Ruiz, D.R. 2022. *In vivo* study of combining *Asparagopsis taxiformis* and phloroglucinol to reduce methane production and improve rumen fermentation efficiency in goats. En: 8th Annual Global Greenhouse Gas & Animal Agriculture Conference. Orlando, Florida, EEUU.

Romero, P., Belanche, A., Hueso, R., Ramos-Morales, E., Salwen, J.K., Kebreab, E., Yáñez-Ruiz, D.R. 2022. *In vitro* rumen microbial degradation of bromoform and the impact on rumen fermentation. En: 8th Annual Global Greenhouse Gas & Animal Agriculture Conference. Orlando, Florida, EE.UU.

Romero, P., Huang, R., Jiménez, E., Palma-Hidalgo, J. M., Martín-García, A. I., Ungerfeld, E. M., Popova, M., Morgavi, D. P., Belanche, A., Yáñez-Ruiz, D. R. 2022. Validation of nutritional strategy to mitigate methane production and improve efficiency of rumen fermentation. En: 7th EAAP International Symposium on Energy and Protein Metabolism and Nutrition. Granada, España.

Romero, P., Huang, R., Jiménez, E., Martín-García, A. I., Smith, P. E., Ungerfeld, E. M., Popova, M., Morgavi, D. P., Belanche, A., Yáñez-Ruiz, D. R. 2023. Phenolic compounds modulate the rumen microbiota when methane production was inhibited *in vitro*. En: 13th International Gut Microbiology Symposium. Aberdeen, Escocia, Reino Unido.

*A mi abuela Kika
y a mis padres*

Índice de contenidos

Índice de figuras	9
Índice de tablas	11
Abreviaturas / <i>Abbreviations</i>	13
Resumen / <i>Abstract</i>	15
Introducción	21
1. <i>Ganadería y cambio climático</i>	22
2. <i>Fermentación ruminal</i>	24
3. <i>Metabolismo del hidrógeno</i>	29
3.1. <i>Metanogénesis</i>	30
3.2. <i>Otras rutas metabólicas que incorporan hidrógeno</i>	34
4. <i>Factores que influyen en la producción de metano</i>	35
5. <i>Estrategias nutricionales de mitigación del metano</i>	37
5.1. <i>Composición en materias primas de la dieta</i>	37
5.2. <i>Uso de compuestos aditivos o suplementos</i>	38
5.2.1. <i>Compuestos que modifican el patrón de fermentación ruminal</i>	39
5.2.1.1. <i>Aceites esenciales</i>	39
5.2.1.2. <i>Taninos</i>	42
5.2.1.3. <i>Saponinas</i>	44
5.2.1.4. <i>Ionóforos</i>	45
5.2.2. <i>Aceptores alternativos de hidrógeno</i>	47
5.2.2.1. <i>Nitrato</i>	47
5.2.2.2. <i>Ácidos orgánicos</i>	48
5.2.3. <i>Inhibidores de los metanógenos</i>	50
5.2.3.1. <i>Compuestos halogenados</i>	50
5.2.3.2. <i>3-nitrooxipropanol</i>	51
5.2.3.3. <i>Macroalgas rojas del género <i>Asparagopsis</i></i>	54
5.4. <i>Estrategias de mitigación basadas en la combinación de aditivos</i>	58
5.4.1. <i>Compuestos fenólicos</i>	60
Objetivos / <i>Objectives</i>	63
Materiales y Métodos	69
Estudio 1. <i>Evaluación del efecto de los compuestos fenólicos como aceptores de hidrógeno cuando se inhibe la metanogénesis ruminal <i>in vitro</i></i>	72

Experimentos 1.1 y 1.2. Selección de niveles de inclusión de <i>Asparagopsis taxiformis</i> y compuestos fenólicos que no comprometan la fermentación ruminal	72
Experimento 1.3. Efecto del tratamiento combinado de <i>Asparagopsis taxiformis</i> y compuestos fenólicos <i>in vitro</i> tras una adaptación de la microbiota.....	75
Experimento 1.4. Efecto dosis-respuesta del floroglucinol en combinación con <i>Asparagopsis taxiformis in vitro</i> tras una adaptación de la microbiota	76
Estudio 2. Evaluación de los efectos de combinar <i>Asparagopsis taxiformis</i> y floroglucinol sobre la producción de metano y la fermentación ruminal en caprino .	78
Estudio 3. Determinación del patrón de degradación microbiana del bromoformo contenido en <i>Asparagopsis taxiformis</i> y su impacto en la fermentación ruminal en función del tipo de dieta.....	82
Estudio 4. Evaluación del efecto del bromoformo en el crecimiento de cultivos puros de metanógenos del rumen.....	85
Análisis de muestras y cálculos	88
Análisis estadísticos.....	92
Resultados / Results	95
Study 1. Evaluating the effect of phenolic compounds as hydrogen acceptors when rumen methanogenesis is inhibited <i>in vitro</i>	96
Study 2. Combining <i>Asparagopsis taxiformis</i> and phloroglucinol to decrease methane production and improve rumen fermentation efficiency in goats	102
Study 3. Rumen microbial degradation of bromoform from red seaweed (<i>Asparagopsis taxiformis</i>) and its impact on rumen fermentation according to the type of diet.....	106
Study 4. Dose-response effect of bromoform on methanogens growth.....	110
Discusión / Discussion.....	113
Conclusiones / Conclusions	137
Referencias / References	143
Material Suplementario / Supplementary Material	171

Índice de figuras

Figura 1. Esquema de la fermentación microbiana de carbohidratos en el rumen. Adaptado de Pereira et al. (2022).	28
Figura 2. Cambios en la energía libre de Gibbs (ΔG_T) para la fermentación de la glucosa a diferentes concentraciones de H_2 según Janssen (2010). Las vías fermentativas consideradas fueron glucosa \rightarrow 2 acetato + 4 H_2 (\blacktriangle), glucosa \rightarrow butirato + 2 H_2 (\blacksquare), glucosa \rightarrow acetato + propionato + H_2 (\bullet), glucosa \rightarrow 0.66 acetato + 0.66 butirato + 2.66 H_2 (\square), y glucosa \rightarrow 0.66 acetato + 1.33 propionato (\circ).	30
Figura 3. Ciclo de Wolf constituido por ocho etapas por el que CO_2 es reducido a CH_4 con 4 H_2 en metanógenos hidrogenotrofos. Adaptado de Glasson et al. (2022).	33
Figura 4. Modelo de producción de CH_4 en el rumen e intestino de un rumiante y su liberación a la atmósfera. Adaptado de Murray et al. (1975).	34
Figura 5. Representación de la producción de CH_4 en el rumen y las 3 etapas (1, 2 y 3) en las que pueden actuar los distintos aditivos.	39
Figura 6. Relación entre la reducción de las emisiones de CH_4 y la cantidad de bromoformo ingerida (mg $CHBr_3$ /kg IMS) según distintos estudios en los que se suplementó la dieta de rumiantes con <i>Asparagopsis</i> (Eason & Fennessy, 2023).	56
Figura 7. Rutas metabólicas de degradación de compuestos fenólicos en el rumen. Adaptado de Martínez-Fernández et al. (2017).	61
Figura 8. Diseño experimental correspondiente a los Experimentos 1.1 y 1.2 del Estudio 1. BES: 2-bromoetanosulfonato a diferentes concentraciones: 0 (BES0), 4 (BES4), 8 (BES8), 12 (BES12), 16 (BES16), 20 μ M (BES20). AT: <i>Asparagopsis taxiformis</i> a diferentes concentraciones: 0 (AT0), 1 (AT1), 2 (AT2), 3 (AT3) 4 (AT4) y 5% MS (AT5); AGV: ácidos grasos volátiles.	74
Figura 9. Diseño experimental correspondiente a los Experimentos 1.3 y 1.4 del Estudio 1. AT0: <i>Asparagopsis taxiformis</i> a 0% MS (solo sustrato); AT2: <i>A. taxiformis</i> a 2% MS; AGV: ácidos grasos volátiles.	77
Figura 10. Diseño experimental correspondiente al Estudio 2. AT-: <i>Asparagopsis taxiformis</i> a 0% MS; AT+: <i>A. taxiformis</i> a 5% MS; PG-: Floroglucinol a 0% MS; PG+: Floroglucinol a 2% MS; AGV: ácidos grasos volátiles.	81
Figura 11. Diseño experimental correspondiente al Estudio 3. AT0: <i>Asparagopsis taxiformis</i> a 0% MS (solo sustrato); AT2: <i>A. taxiformis</i> a 2% MS; HC: sustrato alto en concentrado (alfalfa y cebada 30:70 en MS); HF: sustrato alto en forraje (heno y cebada 70:30 en MS); $CHBr_3$: bromoformo; CH_2Br_2 : dibromometano; AGV: ácidos grasos volátiles.	84
Figura 12. Diseño experimental correspondiente al Estudio 4. NOINHB: No inhibidor; BES: 2-bromoetanosulfonato; $CHBr_3$: bromoformo; AGV: ácidos grasos volátiles.	87

Figura 13. A) Cámaras respirométricas utilizadas en el desarrollo de esta Tesis en la Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Granada, España. B) Diagrama esquemático del funcionamiento de una cámara respirométrica de circuito abierto. Adaptado de Malik et al. (2017).....	90
Figure 14. Averaged pattern of CH ₄ (Figure 14a) and H ₂ emissions (Figure 14b) observed in goats (n=8) during 24 h according to the treatments: basal diet (AT-PG-); <i>Asparagopsis taxiformis</i> at 0.5% DM (AT+PG-); phloroglucinol at 2% DM (AT-PG+); and the combination of <i>A. taxiformis</i> and phloroglucinol (AT+PG+). The arrows show feeding/dosing times.....	105
Figure 15. Effect of supplementing with <i>Asparagopsis taxiformis</i> at 2% DM to high-concentrate (HC) and high-forage (HF) substrates on the <i>in vitro</i> concentration (mM) of bromoform (CHBr ₃) and dibromomethane (CH ₂ Br ₂) at different incubation times (h) (Study 3).....	110
Figure 16. Effect of bromoform (CH ₃ Br) at different concentrations (0, 0.4, 2, 10 and 50 μM) on the growth (mL CH ₄ /mL gas) of <i>Methanobrevibacter smithii</i> (A), <i>Methanobrevibacter ruminantium</i> (B), <i>Methanosphaera stadtmanae</i> (C), <i>Methanosarcina barkeri</i> (D), <i>Methanobrevibacter millerae</i> (E), <i>Methanothermobacter wolfei</i> (F) and <i>Methanobacterium mobile</i> (G) (Study 4).....	112
Figure 17. Proposed and targeted pathways for hydrolysable tannins metabolism by rumen microbiota. Adapted from Lotfi (2020).....	122
Figure 18. Effect of phloroglucinol at different initial concentration (0, 6, 16, 26, 36 mM) when combined with <i>Asparagopsis taxiformis</i> at 2% DM on dihydrogen production per total volatile fatty acids production (mL/mmol) and acetate concentration (mM) after 5 days of incubation using rumen fluid from goats. VFA = volatile fatty acids. ^{a-e} Within a row means with different superscripts differ (n=4).....	123

Índice de tablas

Tabla 1. Relación entre los objetivos de esta Tesis Doctoral y los estudios y experimentos que se llevaron a cabo para abordarlos.....	71
Tabla 2. Composición química de los ingredientes del sustrato (alfalfa y cebada) y de <i>Asparagopsis taxiformis</i> usados en el Estudio 1.	73
Tabla 3. Composición química de los ingredientes de la dieta (alfalfa y cebada) y de <i>Asparagopsis taxiformis</i> usados en el Estudio 2.	79
Tabla 4. Composición química de los ingredientes de la dieta (alfalfa y cebada) y de <i>Asparagopsis taxiformis</i> usados en el Estudio 3.	83
Table 5. Dose-response effect of <i>A. taxiformis</i> (0, 1, 2, 3, 4, 5% DM) on 24 h <i>in vitro</i> fermentation in rumen fluid from goats (Experiment 1.1).	97
Table 6. Effect of phenol, catechol, resorcinol, hydroquinone, phloroglucinol, pyrogallol, gallic acid and formic acid at 6 mM on 24 h <i>in vitro</i> fermentation in rumen fluid from goats (Experiment 1.2).	98
Table 7. Effect of phenol, catechol, resorcinol, hydroquinone, phloroglucinol, pyrogallol, gallic acid and formic acid at 6 mM when combined with <i>A. taxiformis</i> at 2% DM on <i>in vitro</i> fermentation after 5 days of incubation in rumen fluid from goats (Experiment 1.3).	100
Table 8. Effect of phloroglucinol at different doses (6, 16, 26, 36 mM) when combined with <i>A. taxiformis</i> at 2% DM on <i>in vitro</i> fermentation after 5 days of incubation in rumen fluid from goats (Experiment 1.4).	101
Table 9. Effect of the inclusion rate of <i>A. taxiformis</i> (AT) and phloroglucinol (PG) on rumen fermentation parameters and the abundance of the main rumen microbial groups in goats after 14 days of treatment (Study 2).....	102
Table 10. Effect of the inclusion rate of <i>A. taxiformis</i> (AT) and phloroglucinol (PG) on BW, DMI, CH ₄ production and H ₂ emissions in goats after 14 days of treatment (Study 2).....	103
Table 11. Effect of the inclusion of <i>A. taxiformis</i> (AT) and phloroglucinol (PG) on averaged CH ₄ production and H ₂ emissions (L/h) at different intervals during 24 h...	105
Table 12. Effect of the inclusion rate (R) of <i>Asparagopsis taxiformis</i> and the type of substrate (S) on the <i>in vitro</i> cumulative gas production and production rate at different incubation intervals (Study 3).	107
Table 13. Effect of the inclusion rate (R) of <i>Asparagopsis taxiformis</i> and the type of substrate (S) on rumen fermentation parameters at 72 h of incubation (Study 3).....	107
Table 14. Effect of the inclusion rate (R) of <i>Asparagopsis taxiformis</i> and the type of substrate (S) on the <i>in vitro</i> CH ₄ cumulative production and production rate at different incubation intervals (Study 3).	108

Table 15. Effect of the inclusion rate (R) of <i>Asparagopsis taxiformis</i> and the type of substrate (S) on the <i>in vitro</i> H ₂ cumulative production and production rate at different incubation intervals (Study 3).	109
Table 16. Effect of bromoform concentrations (C) and incubation times (T) on CH ₄ inhibition rate (%) in different archaeal species (Study 4).....	111
Supplementary Table S1. The dose-response effect of 2-bromoethanesulfonate (0, 4, 8, 12, 16, 20 µM) on 24 h <i>in vitro</i> fermentation in rumen fluid from goats (Experiment 1.1).....	172
Supplementary Table S2. The dose-response effect of phenol (0, 2, 4, 6 mM) on 24 h <i>in vitro</i> fermentation in rumen fluid from goats (Experiment 1.2).....	172
Supplementary Table S3. The dose-response effect of catechol (0, 2, 4, 6 mM) on 24 h <i>in vitro</i> fermentation in rumen fluid from goats (Experiment 1.2).....	173
Supplementary Table S4. The dose-response effect of resorcinol (0, 2, 4, 6 mM) on 24 h <i>in vitro</i> fermentation in rumen fluid from goats (Experiment 1.2).....	173
Supplementary Table S5. The dose-response effect of hydroquinone (0, 2, 4, 6 mM) on 24 h <i>in vitro</i> fermentation in rumen fluid from goats (Experiment 1.2).....	174
Supplementary Table S6. The dose-response effect of phloroglucinol (0, 2, 4, 6 mM) on 24 h <i>in vitro</i> fermentation in rumen fluid from goats (Experiment 1.2).....	174
Supplementary Table S7. The dose-response effect of pyrogallol (0, 2, 4, 6 mM) on 24 h <i>in vitro</i> fermentation in rumen fluid from goats (Experiment 1.2).....	175
Supplementary Table S8. The dose-response effect of gallic acid (0, 2, 4, 6 mM) on 24 h <i>in vitro</i> fermentation in rumen fluid from goats (Experiment 1.2).....	175
Supplementary Table S9. The dose-response effect of formic acid (0, 2, 4, 6 mM) on 24 h <i>in vitro</i> fermentation in rumen fluid from goats (Experiment 1.2).....	176

Abreviaturas / Abbreviations

[H]	Hidrógeno metabólico
3NOP	3-nitrooxipropanol / <i>3-nitrooxypropanol</i>
A:P	Relación acetato:propionato / <i>acetate:propionate ratio</i>
AGV	Ácidos grasos volátiles
BCM	Bromoclorometano / <i>Bromochloromethane</i>
BES	2-bromoetanosulfonato / <i>2-bromoethanesulfonate</i>
BW	<i>Body weight</i>
CH₄	Metano / <i>Methane</i>
CO₂	Dióxido de carbono / <i>Carbon dioxide</i>
CoM	Coenzima M / <i>Coenzyme M</i>
DM	<i>Dry matter</i>
DMI	<i>Dry matter intake</i>
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria / <i>European Food Safety Authority</i>
GEI	Gases de efecto invernadero
H₂	Dihidrógeno / <i>Dihydrogen</i>
H₄MPT	Tetrahidrometanopterina
H₄SPT	Tetrahidrosarcinopterina
IMS	Ingesta de la materia seca
MCR	Metil-coenzima M reductasa / <i>Methyl-coenzyme M reductase</i>
MO	Materia orgánica
MS	Materia seca
MTR	Metil-tetrahidrometanopterina:coenzima M metiltransferasa / <i>Methyl-tetrahydromethanopterin:coenzyme M methyltransferase</i>
OM	<i>Organic matter</i>
PV	Peso vivo
qPCR	PCR cuantitativa
SEM	Standard error of the mean
VFA	Volatile fatty acids

Resumen

La producción ganadera, como cualquier otro sector económico, contribuye a las emisiones de gases de efecto invernadero, especialmente en los rumiantes en forma de metano entérico (CH_4), que se produce como resultado de la fermentación microbiana de carbohidratos en el rumen. Una de las estrategias que ha mostrado mayor potencial para reducir la emisión de CH_4 en rumiantes es el uso de aditivos nutricionales. Entre los aditivos de la dieta con mayor potencial, la macroalga roja *Asparagopsis taxiformis* se ha mostrado efectiva gracias a su elevado contenido en análogos halogenados del CH_4 , principalmente bromoformo (CHBr_3). Sin embargo, la mayoría de las estrategias basadas en el uso de inhibidores de la metanogénesis, incluyendo *A. taxiformis*, generan un exceso de dihidrógeno (H_2) en el rumen que se emite y, por consiguiente, no se redirige ni se retiene en metabolitos que puedan ser utilizados por el rumiante. Por tanto, la reducción de la producción de CH_4 mediante el uso de aditivos no conlleva una mejora en la eficiencia de la fermentación ruminal que pueda beneficiar la productividad animal. Para superar dicha ineficiencia en la inhibición del CH_4 , se han considerado los compuestos fenólicos como potenciales aceptores de H_2 , con la posibilidad de que recuperen parte del exceso de H_2 en su proceso de degradación por microorganismos ruminales específicos. El principal objetivo de esta Tesis Doctoral fue desarrollar estrategias nutricionales que reduzcan la producción de CH_4 en rumiantes y que al mismo tiempo mejoren la eficiencia de la fermentación ruminal. Para ello, se llevó a cabo una serie de experimentos *in vitro* (**Estudio 1**) para evaluar el efecto dosis-respuesta de *A. taxiformis* (**Experimento 1.1**) y un amplio rango de compuestos fenólicos (fenol, catecol, resorcinol, hidroquinona, floroglucinol, pirogalol, ácido gálico) y ácido fórmico (**Experimento 1.2**) sobre la producción de CH_4 y la fermentación ruminal. *Asparagopsis taxiformis* al 2% de la materia seca (MS) del sustrato fue óptimo para inhibir la producción de CH_4 (-99%) y aumentar la acumulación de H_2 (+37,5 veces) sin comprometer la fermentación ruminal. Los compuestos fenólicos a concentraciones inferiores o iguales a 6 mM no afectaron negativamente la fermentación ruminal. Posteriormente, se evaluó cada compuesto fenólico en presencia de *A. taxiformis* sobre una población microbiana ya adaptada a la presencia de los compuestos fenólicos (**Experimento 1.3**), siendo el floroglucinol el más eficaz en captar el exceso de H_2 resultante de la inhibición de la metanogénesis. A continuación, se evaluaron dosis crecientes de floroglucinol en combinación con *A. taxiformis* para optimizar su potencial como aceptor de H_2 (**Experimento 1.4**).

Floroglucinol a una concentración máxima de 36 mM redujo la producción de H₂ por mol de CH₄ reducido (-45.5%), aumentó la concentración de AGV (+49,8%) y promovió un incremento de la síntesis de acetato en comparación con *A. taxiformis* sola, sin efectos negativos en la abundancia del total de bacterias en el rumen. Tras el estudio *in vitro*, se evaluó *in vivo* la suplementación con *A. taxiformis* al 0,5% MS y floroglucinol al 2% MS (equivalente a una concentración ruminal de 40 mM) en la dieta en cabras adultas (**Estudio 2**). La suplementación de *A. taxiformis* redujo la producción de CH₄ (-31%) y aumentó las emisiones de H₂ (+38 veces) y la síntesis de propionato, mientras que la combinación con floroglucinol redujo las emisiones de H₂ (-68%) y aumentó la concentración de acetato (+18,9%). El nivel de reducción de las emisiones de H₂ y que fuera un efecto mayoritariamente postprandial sugiere que una mayor eficiencia de redirección del H₂ hacia la síntesis de acetato es posible. El diseño del estudio no permitió determinar si el cambio en el perfil de fermentación supuso una mejora en productividad animal, lo que requeriría futuros estudios. Además de optimizar la combinación del alga y compuestos fenólicos, se realizó un experimento *in vitro* para examinar el patrón de degradación del CHBr₃ de *A. taxiformis* en el rumen y su impacto en la fermentación ruminal según el tipo de dieta (**Estudio 3**), puesto que es un compuesto con potencial efecto tóxico en el animal o en el consumidor si se transfiere a la leche o carne. Se observó una rápida degradación del CHBr₃ (70% degradado en 30 minutos, 90% en 3 horas y 100% en 12 horas), seguida de la formación de dibromometano hasta las 6 horas, que luego disminuyó de forma gradual pero más lentamente que el CHBr₃. La relación de forraje y concentrado en la dieta no influyó en la degradación del bromoformo. Finalmente, se emplearon cultivos puros de siete cepas de metanógenos con el fin de determinar la diferente sensibilidad de estos microorganismos a dosis crecientes de CHBr₃ (**Estudio 4**). Los resultados mostraron que la concentración más baja de CHBr₃ (0,4 μM) fue suficiente para inhibir el crecimiento de los metanógenos, con diferentes niveles de reducción según la especie. Los hallazgos de esta Tesis Doctoral han contribuido al estudio de la suplementación combinada de *A. taxiformis* y floroglucinol en condiciones *in vitro* e *in vivo*, representando una potencial estrategia nutricional para mitigar la producción de CH₄ y redirigir la acumulación de H₂ hacia la producción de acetato, por tanto, mejorando la eficiencia de la fermentación ruminal. Los resultados obtenidos también permiten una mejor comprensión del modo de acción y degradación del CHBr₃, aspectos fundamentales para la aprobación del uso de *A. taxiformis* en la cadena de producción de alimentos por las autoridades sanitarias competentes.

Abstract

Livestock production contributes to greenhouse gas emissions, particularly in ruminants, in the form of enteric methane (CH₄), produced through microbial fermentation of carbohydrates in the rumen. One of the strategies that showed most potential to reduce enteric CH₄ production involves the use of feed additives. Among feed additives with potential to reduce CH₄ emissions in ruminants, the red macroalgae *Asparagopsis taxiformis* has proven effective due to its high content in halogenated CH₄ analogues, primarily bromoform (CHBr₃). However, most strategies based on methanogenesis inhibitors, including *A. taxiformis*, generate an excess of dihydrogen (H₂) in the rumen, which is expelled and, consequently, not redirected or retained in metabolites that can be used by the ruminant. Therefore, these mitigation strategies do not result in an improvement in rumen fermentation efficiency that could benefit animal productivity. To overcome this inefficiency in CH₄ inhibition, phenolic compounds have been suggested as potential H₂ acceptors, which could incorporate some of the excess H₂ in their degradation process by specific rumen microorganisms. The main objective of this Doctoral Thesis was to develop nutritional strategies to reduce CH₄ production in ruminants while improving rumen fermentation efficiency. A series of *in vitro* experiments (**Study 1**) were conducted to assess the dose-response effect of *A. taxiformis* (**Experiment 1.1**) and a wide range of phenolic compounds (phenol, catechol, resorcinol, hydroquinone, phloroglucinol, pyrogallol, gallic acid) and formic acid (**Experiment 1.2**) on CH₄ production and rumen fermentation. *Asparagopsis taxiformis* at 2% of the dry matter (DM) of the substrate was optimal for inhibiting CH₄ production (-99%) and increasing H₂ accumulation (+37.5 times) without compromising overall rumen fermentation. Phenolic compounds at concentrations below or equal to 6 mM did not negatively affect ruminal fermentation. Subsequently, each phenolic compound was evaluated in the presence of *A. taxiformis* within an adapted microbial population (**Experiment 1.3**), with phloroglucinol proving most effective in capturing the excess H₂ resulting from methanogenesis inhibition. Then, increasing doses of phloroglucinol in combination with *A. taxiformis* were evaluated to optimise its potential as H₂ acceptor (**Experiment 1.4**). Phloroglucinol at a maximum concentration of 36 mM reduced H₂ production per mol of reduced CH₄ (-45.5%), increased volatile fatty acid (VFA) concentration (+49.8%), and promoted greater acetate synthesis compared to *A. taxiformis* alone, without affecting the abundance of total bacteria in the rumen.

Following the *in vitro* study, individual and combined supplementation with *A. taxiformis* at 0.5% DM and floroglucinol at 2% DM (equivalent to a ruminal concentration of 40 mM) was evaluated in adult goats (**Study 2**). The supplementation of *A. taxiformis* alone reduced CH₄ production (-31%) and increased H₂ emissions (+38 times) and propionate synthesis, while the combination with floroglucinol reduced H₂ emissions (-68%) and increased acetate concentration (+18.9%). The level of reduction in H₂ emission, mostly occurred in postprandial situations, suggests that a higher efficiency of H₂ redirection towards acetate synthesis is possible. The study design did not allow determining if the shift in the fermentation profile led to improved animal productivity. Concurrently, an *in vitro* experiment was conducted to examine the degradation pattern of CHBr₃ from *A. taxiformis* in the rumen and its impact on rumen fermentation according to the type of diet (**Study 3**), as this compound can potentially be toxic to the animal or the consumer if it is transferred to milk or meat. Rapid degradation of CHBr₃ was observed (70% degraded in 30 minutes, 90% in 3 hours, and 100% in 12 hours), followed by dibromomethane formation until 6 hours, and then gradually decreased. The forage:concentrate ratio in the diet did not have an effect on bromoform degradation. Finally, pure cultures of seven methanogen strains were used to determine their sensitivity to increasing doses of CHBr₃ (**Study 4**). The results showed that the lowest CHBr₃ concentration (0.4 µM) was sufficient to inhibit methanogens' growth, with different reduction levels between species. The findings of this Doctoral Thesis have contributed to the study of combined supplementation of *A. taxiformis* and floroglucinol under *in vitro* and *in vivo* conditions, representing a potential nutritional strategy to mitigate CH₄ production and redirect H₂ accumulation towards acetate production, thereby improving rumen fermentation efficiency. The results also provide a better understanding of the mode of action and degradation of CHBr₃, essential aspects for the approval of using *A. taxiformis* in the food production chain by the competent health authorities.

INTRODUCCIÓN

1. Ganadería y cambio climático

La población mundial ha superado los 8,1 mil millones de personas y se espera que alcance los 9,7 mil millones en 2050 (ONU, 2022). Como resultado, se estima un incremento del 35-56% en la demanda de alimento entre 2010 y 2050 (van Dijk et al., 2021). Para satisfacer dicha demanda, todos los sistemas agrícolas deberán incrementar significativamente su producción. En particular, el crecimiento poblacional y económico, la urbanización y cambios en los patrones de consumo en países en vías de desarrollo han triplicado la demanda de productos de origen animal en los últimos 50 años (Makkar, 2018). Para el año 2050, se estima que la producción global de leche y carne tendrá que incrementarse en 1077 y 455 millones de toneladas, respectivamente (Alexandratos & Bruinsma, 2012). Sin embargo, no se prevé un incremento de la superficie cultivable a nivel global, lo que implica un incremento de las tensiones entre la producción de alimentos destinados a la ganadería y al ser humano. La ganadería desempeña un papel fundamental en la seguridad alimentaria al proporcionar el 33% de las proteínas consumidas y el 17% de las calorías totales a nivel mundial, pero el aumento de su producción plantea un desafío importante en términos de sostenibilidad (FAO, 2018). El sector ganadero consume aproximadamente la mitad de la producción mundial de grano (Smith et al., 2013), emplea el 41% del total de agua utilizada en agricultura para la producción del alimento del ganado (Heinke et al., 2020) y es responsable del 14,5% del total de emisiones antropogénicas de gases de efecto invernadero (GEI), correspondiente a 7.1 Gt de equivalentes de dióxido de carbono (CO₂) al año (Gerber et al., 2013). El aumento de la producción de ganado, como cualquier otra actividad humana, conlleva una importante emisión de GEI, contribuyendo así al calentamiento global (Salter, 2017). Por tanto, garantizar la disponibilidad de alimento al mismo tiempo que se reducen las emisiones de GEI constituye un desafío urgente para la ganadería y el sector primario en general.

Los rumiantes desempeñan un papel fundamental en la cadena de suministro de alimento para el ser humano. Gracias a su sistema digestivo único, los rumiantes son capaces de transformar alimentos fibrosos no aprovechables por animales monogástricos, como pasto y forraje, en productos para el consumo humano, como la carne y la leche (Morgavi et al., 2010). Aunque la producción de rumiantes puede parecer ineficiente en términos absolutos, ya que sus productos solo recuperan entre el 6% y el 26% de la energía de la

dieta, su eficiencia es mucho mayor cuando se considera la calidad de los nutrientes de la carne y la leche en relación al contenido de nutrientes esenciales en la dieta (Gill et al., 2010). Bajo estos términos, los rumiantes pueden considerarse un sistema de producción más sostenible que los monogástricos ya que permiten reducir la inclusión de alimentos destinados al consumo humano en su dieta y, por consiguiente, disminuir en cierta medida la competencia por los terrenos de cultivo. Esto es especialmente ventajoso en regiones donde la tierra cultivable es limitada debido a condiciones climáticas adversas o a la baja calidad del suelo (Cornale et al., 2022). Sin embargo, hay que tener en cuenta el alto coste medioambiental que representa la producción de carne y leche de rumiantes. A nivel local, conlleva la contaminación del aire, la tierra y el agua de determinadas regiones con compuestos nitrogenados y fósforos derivados principalmente de acumulación de excretas procedentes sistemas de producción intensiva (Steinfeld et al., 2006).

A nivel global, los rumiantes generan una gran cantidad de emisiones de GEI, siendo el metano (CH₄) la principal fuente de dichas emisiones. Se estima que los rumiantes son responsables del 40% del total de GEI emitidos por el sector ganadero y del 16% de las emisiones antropogénicas de CH₄ a nivel mundial (Gill et al., 2010; Tseten et al., 2022). Las emisiones de CH₄ en rumiantes proceden fundamentalmente de la fermentación microbiana entérica de los alimentos. En concreto, el 89% del CH₄ emitido por los rumiantes se produce en el rumen y se exhala por la boca y la nariz a la atmósfera (Hook et al., 2010). La cuantía de dichas emisiones depende de diversos factores como la especie y raza del animal, la genética del hospedador, el nivel de alimentación, el tipo de dieta o el uso de aditivos anti-metanogénicos (Sejian et al., 2011).

El CH₄ es un GEI de vida corta, con un tiempo de permanencia en la atmósfera de 12,5 años. Presenta un potencial de calentamiento global 84 o 28 veces mayor que el CO₂ para un periodo de 20 o 100 años, respectivamente (IPCC, 2013). Además, el CH₄ tiene la capacidad de aumentar el ozono troposférico y el vapor de agua estratosférico, lo que puede aumentar la fuerza de radiación del gas en aproximadamente un 70% (Lashof & Ahuja, 1990). Dado su impacto significativo en el calentamiento global a corto plazo, gran parte de las estrategias para mitigar las emisiones de GEI en la ganadería se centran en la reducción de las emisiones de CH₄ de origen entérico. En este sentido, para alcanzar el objetivo del Acuerdo de París de limitar el calentamiento global a 1,5 °C, se estima que las emisiones de CH₄ en los sistemas agrícolas deben reducirse en un rango que oscila entre el 11% y el 30% para el año 2030, y entre el 24% y el 47% para el año 2050 (Arndt

et al., 2022). Además, las emisiones de CH₄ procedentes de la fermentación ruminal no solo contribuyen al calentamiento global del planeta, sino que también suponen una pérdida entre el 2 y 12% de la energía bruta ingerida por el animal que podría utilizarse para la producción de carne y leche (Johnson & Johnson, 1995). Por tanto, mitigar la producción de CH₄ en rumiantes no solo persigue reducir el impacto medioambiental del sector ganadero, sino también optimizar la eficiencia de utilización de la energía del alimento por parte de los rumiantes. Por todo ello, es preciso conocer el proceso metabólico de fermentación microbiana ruminal y sus efectos sobre la metanogénesis ruminal, tal y como se describe a continuación.

2. Fermentación ruminal

Los rumiantes se alimentan de material vegetal consistente principalmente en carbohidratos, que pueden clasificarse en estructurales (celulosa, hemicelulosa y pectina) y no-estructurales (almidón, ácidos orgánicos y otros carbohidratos solubles como los fructanos) (Erickson & Kalscheur, 2020). Para la digestión del alimento, los rumiantes presentan un sistema digestivo muy diferente al de los animales monogástricos a nivel anatómico, fisiológico y metabólico. El tracto digestivo anterior de los rumiantes está formado por cuatro compartimentos: tres pre-estómagos (rumen, retículo y omaso) y un estómago glandular (abomaso) (Clauss & Hofmann, 2014). En el rumen se dan las condiciones ideales para albergar una microbiota compleja, diversa, dinámica y altamente específica en relación con sus funciones metabólicas (Morgavi et al., 2010). Los microorganismos ruminales son anaerobios y se clasifican en bacterias (10^{10} - 10^{11} células/mL), arqueas (10^7 - 10^9 células/mL), protozoos (10^4 - 10^6 células/mL), hongos (10^3 - 10^6 células/mL) y bacteriófagos (10^9 - 10^{10} células/mL) (Newbold & Ramos-Morales, 2020; Wright & Klieve, 2011). Estos microorganismos establecen una relación simbiótica con el hospedador, facilitándole la obtención de energía y nutrientes. Los diferentes grupos microbianos actúan estrechamente entre sí para degradar los carbohidratos de los alimentos fibrosos en el proceso conocido como fermentación ruminal (Wang & McAllister, 2002). Como productos principales de la fermentación, se obtienen ácidos grasos volátiles (AGV) y proteína microbiana que representan la principal fuente de energía y proteína para el rumiante, respectivamente. Sin embargo, la oxidación de los carbohidratos es incompleta debido al ambiente anaerobio del rumen, resultando como subproductos: CH₄, CO₂, dihidrógeno (H₂) y equivalentes reductores (Moss et al., 2000).

Las principales rutas metabólicas de los carbohidratos en el rumen se muestran en la **Figura 1**. En primer lugar, los microorganismos rompen los enlaces glucosídicos de los polisacáridos que forman la pared celular de las plantas, liberando los monómeros que los componen (McAllister et al., 1994). La celulosa está formada por β -glucosa y otros hexosas, la hemicelulosa por pentosas con cadenas lineales de xilosa y enlaces variables de arabinosa, ácidos urónicos y galactosa, las pectinas por unidades de ácido galacturónico con enlaces α , y el almidón por α -glucosa. La degradación de los polisacáridos es llevada a cabo por bacterias, arqueas y protozoos. Entre las bacterias, destacan las especies de los géneros *Fibrobacter* y *Ruminococcus* como degradadoras de celulosa (Shi et al., 1997), *Butyrivibrio*, *Prevotella* y *Ruminococcus* como degradadoras de hemicelulosa (Zhou et al., 2015), *Butyrivibrio* y *Prevotella* como bacterias degradadoras de pectina (Marounek & Duskova, 1999), y *Prevotella*, *Clostridium*, *Butyrivibrio* y *Ruminobacter* como degradadoras de almidón (Zhou et al., 2015). Los hongos ruminales pueden pertenecer a los géneros *Neocallimastix*, *Caecomyces*, *Orpynomices*, *Sphaeromas* y *Piromonas*, con una importante actividad fibrolítica en sinergia con las bacterias fibrolíticas (Hobson & Stewart, 1997; Orpin & Joblin, 1997). Entre los protozoos del rumen, los grandes entodiniomorfos son los que presentan mayor actividad fibrolítica, mientras que los holotricos y pequeños entodiniomorfos poseen una mayor actividad amilolítica (Newbold et al., 2015).

Las hexosas y pentosas obtenidas de la degradación de carbohidratos son utilizadas por diferentes vías (McAllister et al., 1996). Las hexosas son metabolizadas a través de la glucólisis (vía Embden-Meyerhof-Parnas), obteniéndose dos piruvatos, ATP y NADH. Las pentosas como la xilosa y la arabinosa son metabolizadas principalmente a través de la vía de las pentosas fosfato, produciéndose gliceraldehído-3-fosfato y fructosa-6-fosfato que pueden entrar posteriormente en la glucólisis, y ribosa-5-fosfato que puede ser utilizada en la síntesis de nucleótidos e histidina (Russell & Wallace, 1997; Voet & Voet, 1995). Tras la glucólisis, el piruvato se convierte en el punto central de la fermentación, a partir del cual divergen las diversas vías de producción de AGV, principalmente acetato, butirato y propionato (Hackmann et al., 2017; Russell & Wallace, 1997). La síntesis de acetato y butirato están interrelacionadas y proceden de la descarboxilación oxidativa del piruvato en acetyl-CoA, liberándose CO₂ (Bergman, 1990). La mayoría de los microorganismos celulolíticos son productores de acetato, destacando *Fibrobacter succinogenes* (Wang et al., 2016). En la producción de butirato, destaca la especie

hemicelulolítica *Butyrivibrio fibrisolvens* (Diez-Gonzalez et al., 1999). En cambio, la síntesis de propionato es llevada a cabo principalmente por microorganismos amilolíticos y se puede producir por dos vías: la vía del succinato (o vía aleatorizada, ya que el carbono en la posición del 2 del piruvato aparece aleatoriamente en las posiciones 2 o 3 del succinato) y la vía del acrilato (o vía no-aleatorizada, ya que el carbono en la posición 2 del piruvato aparece en la posición 2 del propionato). La vía del succinato parte del oxalacetato que es reducido a malato, que es deshidratado para formar fumarato, que es reducido a succinato, que a su vez es descarboxilado para generar propionato. Intervienen bacterias del filo *Firmicutes* de la clase *Negativicutes*, como la especie *Selenomonas ruminantium* o bacterias del género *Succinoclasticum* (K. Wang et al., 2023; M. Wang et al., 2016). La vía del acrilato parte de la reducción de piruvato a lactato, que es activado intracelularmente a lactil-CoA, que luego se deshidrata a acrilil-CoA, que se reduce a propionil-CoA, que finalmente da propionato (Newbold et al., 2005). Algunas especies de la clase *Negativicutes* como *Megasphaera elsdenii* y de la clase *Clostridia* como *Coprococcus catus* utilizan la vía del acrilato para producir propionato (Wang et al., 2023). También se forman AGV adicionales en cantidades menores por la desaminación de aminoácidos, como el isobutirato a partir de valina, el isovalerato a partir de leucina y el 2-metil butirato a partir de isoleucina, que son factores de crecimiento para muchos organismos celulolíticos (Bergman, 1990). La mayoría de AGV se absorben a lo largo del epitelio ruminal y permiten satisfacer entre el 70 y el 80% de las necesidades energéticas totales del hospedador.

En el rumen también se metabolizan gran parte de las proteínas y compuestos nitrogenados no proteicos presentes en la dieta, que son degradados por los microorganismos a péptidos, aminoácidos y amonio (Bach et al., 2005; Hristov & Jouany, 2005). Entre el 30-50% de las bacterias ruminales tienen actividad proteolítica (Wallace et al., 1997), pero muy pocas cepas son estrictamente proteolíticas (Hungate, 1966). Las especies proteolíticas más importantes, ante diferentes condiciones de alimentación, son *Ruminobacter amilophilus*, *Prevotella ruminicola*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, y *Streptococcus bovis* (Yokohama & Johnson, 1988). Los péptidos, aminoácidos y amonio liberados son absorbidos rápidamente por las bacterias del rumen para ser incorporados directamente a la síntesis proteica o para ser descarboxilados y desaminados produciendo AGV, CO₂ y amoníaco (Bach et al., 2005). El amoníaco representa la principal fuente de N para las bacterias ruminales, pero cuando excede la capacidad de utilización por parte

de los microorganismos es absorbido por las células epiteliales del rumen y posteriormente transportado al hígado a través del torrente sanguíneo, donde se convierte en urea (Reynolds & Kristensen, 2008). La urea puede reciclarse de nuevo en el rumen a través de la saliva y la pared del epitelio ruminal para la síntesis de proteína, pero en exceso se excreta a través de la orina. Esto no solo supone una ineficiencia energética para el animal (pérdida del 60% del nitrógeno ingerido) sino que es la principal fuente de amoníaco volatilizado del estiércol del ganado rumiante (Bussink & Oenema, 1998). Desde un punto de vista ambiental, es importante que las fuentes de proteínas en la dieta se ajusten lo más cerca posible a las necesidades de los microorganismos y los animales para evitar la conversión del exceso de nitrógeno en urea y la excreción de esta en la orina.

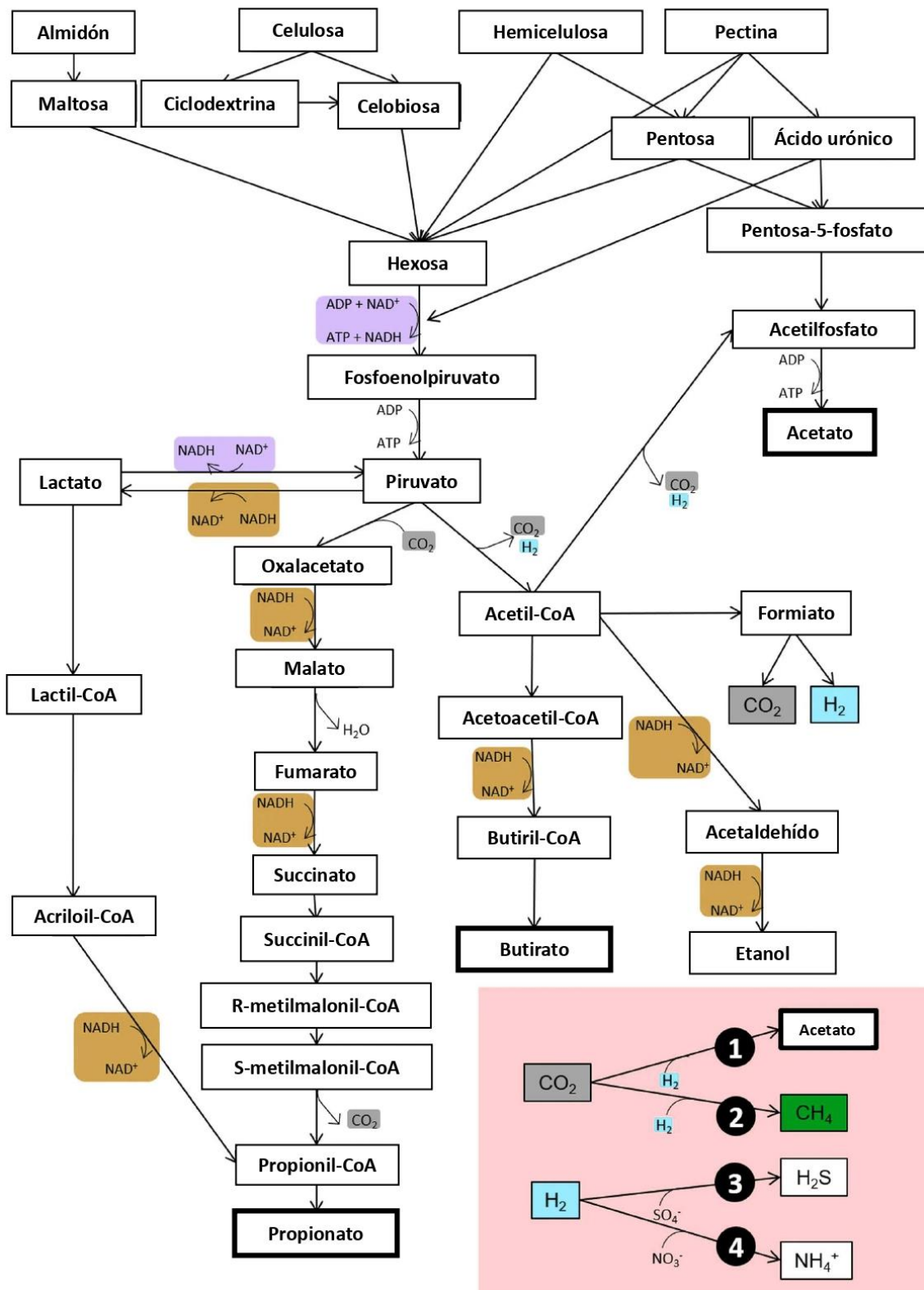


Figura 1. Esquema de la fermentación microbiana de carbohidratos en el rumen. Adaptado de Pereira et al. (2022).

3. Metabolismo del hidrógeno

Durante la fermentación ruminal, se producen flujos de hidrógeno metabólico ([H]) en forma de poder reductor (Ungerfeld, 2020). En la glicolisis, la oxidación de gliceraldehído-3-fosfato en 1,3-bifosfoglicerato conlleva la reducción de NAD^+ en NADH (Voet & Voet, 1995). La producción de acetato y butirato resultan en una producción neta de [H], liberado en la descarboxilación oxidativa del piruvato a acetil-CoA. Dicho [H] puede utilizarse para reducir ferredoxina (Fd_{ox} pasa a $\text{Fd}_{\text{red}}^{2-}$) o para reducir CO_2 en formiato (Russell, 2002; Russell & Wallace, 1997). Sin embargo, la contribución de butirato a la producción de [H] será menor que la del acetato ya que también implica dos reacciones que consumen poder reductor en forma de NADH, la reducción de acetoacetil-CoA a β -hidroxibutiril-CoA y de crotonil-CoA a butiril-CoA (Miller & Jenesel, 1979). La síntesis de propionato, por su parte, implica un consumo neto de equivalentes reductores independientemente de la vía utilizada. En la vía aleatorizada, las reducciones del oxalacetato a malato consumen poder reductor en forma de H_2 , formiato, NADH o lactato (Asanuma et al., 1999; Russell & Wallace, 1997). En la vía no-aleatorizada, NADH y flavoproteína reducida son utilizados como donador de electrones en la reducción de piruvato y de acriloil-CoA (Hackmann et al., 2017; Prabhu et al., 2012). Por tanto, el balance de [H] de la fermentación ruminal dependerá del perfil de AGV formados en la fermentación microbiana.

Es esencial mantener un equilibrio entre la producción y el consumo de [H] en el rumen. Para que la fermentación continúe de manera satisfactoria, los cofactores que han sido reducidos en el proceso deben ser re-oxidados (Wolin et al., 1997). Esto ocurre principalmente mediante la transferencia de electrones de los cofactores reducidos a H^+ para formar H_2 por enzimas hidrogenasas (Frey, 2002). En el rumen, el H_2 puede encontrarse como H_2 disuelto o H_2 gaseoso (Janssen, 2010). Generalmente, se considera que solo el H_2 disuelto está disponible para los microorganismos. El formiato, intermediario en la fermentación, se puede considerar como una tercera forma de H_2 debido a su rápida conversión reversible en H_2 y CO_2 por formiato deshidrogenasas. El H_2 no puede acumularse en el rumen ya que inhibiría la fermentación ruminal a través de mecanismos de retroalimentación negativa (McAllister & Newbold, 2008). Cuando la presión parcial de H_2 es alta dentro del rumen, se inhibe la actividad hidrogenasa relacionada con la oxidación de los cofactores reducidos, impidiendo la fermentación ruminal (**Figura 2**) y reduciendo la tasa de crecimiento de los microorganismos ruminales

y la síntesis de proteína microbiana (Janssen, 2010). Para evitar esto, la mayor parte del H₂ es transferido desde bacterias, protozoos y hongos a metanógenos hidrogenotrofos que lo utilizan principalmente para reducir CO₂ en CH₄, permitiendo la eliminación de H₂ del rumen (Janssen, 2010).

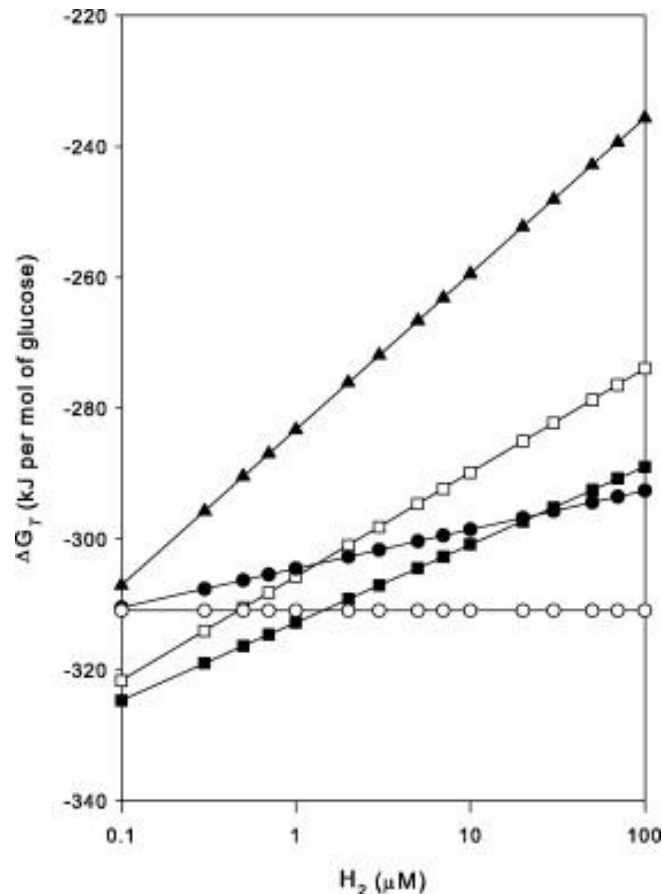
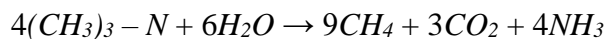
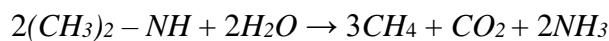
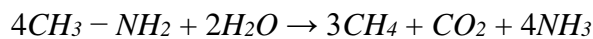
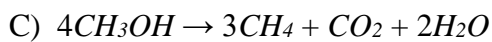
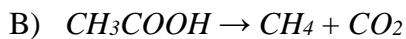
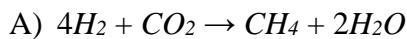


Figura 2. Cambios en la energía libre de Gibbs (ΔG_T) para la fermentación de la glucosa a diferentes concentraciones de H₂ según Janssen (2010). Las vías fermentativas consideradas fueron glucosa \rightarrow 2 acetato + 4 H₂ (▲), glucosa \rightarrow butirato + 2 H₂ (■), glucosa \rightarrow acetato + propionato + H₂ (●), glucosa \rightarrow 0.66 acetato + 0.66 butirato + 2.66 H₂ (□), y glucosa \rightarrow 0.66 acetato + 1.33 propionato (○).

3.1. Metanogénesis

La metanogénesis es el sumidero principal del H₂ producido en la fermentación ruminal (Morgavi et al., 2010). Es un proceso fundamental ya que mantiene la concentración de H₂ disuelto (o presión parcial de H₂) en el rumen a niveles adecuados para que la fermentación microbiana tenga lugar (entre 0,1 y 50 μM; Janssen, 2010). Los microorganismos responsables de la síntesis de CH₄ se denominan metanógenos y

pertenecen al dominio Archaea. Son las únicas arqueas conocidas del ecosistema ruminal, aunque es posible que existan otras no cultivadas y con una función diferente a la metanogénesis (Tajima et al., 2001). Los metanógenos del rumen pertenecen mayoritariamente al filo Euryarchaeota y se encuentran asociados tanto con la fase líquida como con la fase sólida del contenido del rumen, con el epitelio del rumen y con los protozoos por su elevada producción de H₂ (Morgavi et al., 2010). Según el sustrato utilizado como fuente de carbono, se distinguen tres vías metanogénicas diferentes (Liu & Whitman, 2008): hidrogenotrófica (A), acetoclástica (B) y metilotrófica (C).



La vía hidrogenotrófica es la más favorable energéticamente y, por tanto, la predominante. En ella, el CH₄ se produce a partir de la reducción de CO₂ con electrones donados fundamentalmente por H₂ (82%) aunque también por formiato (18%) (Janssen, 2010; Liu & Whitman, 2008; Ungerfeld, 2015). La mayoría de metanógenos hidrogenotrofos pertenecen al género *Methanobrevibacter*, el más abundante dentro del rumen ya que puede suponer hasta el 90% de las secuencias de metanógenos (Hristov et al., 2012). En él, destacan las especies *M. gottshalkii*, *M. ruminantium* y *M. smithii* (Carberry et al., 2014; Janssen & Kirs, 2008). En menor concentración, existen otros metanógenos hidrogenotrofos pertenecientes a *Methanosphaera*, *Methanobacterium* y *Methanimicrococcus*. Las vías acetoclástica y metilotrófica son menos relevantes ya que requieren más energía y están limitadas a determinados microorganismos. En la vía metilotrófica, arqueas del orden *Methanosarcinales* y *Methanomassillicoccaceae* pueden utilizar metilaminas y metanol para formar CH₄. En la vía acetoclástica, arqueas principalmente del orden *Methanosarcinales* producen CH₄ a partir de acetato (Janssen & Kirs, 2008; Tapio et al., 2017).

La reducción de CO₂ a CH₄ por los metanógenos hidrogenotrofos tiene lugar a través del ciclo de Wolfe (Rouvière & Wolfe, 1988; Thauer, 2012). Este proceso cíclico consta de ocho etapas (**Figura 3**) por las que el grupo de carbono avanza al unirse con varios

coenzimas y, finalmente, se reduce a CH₄ (Ferry, 2011; Liu & Whitman, 2008; McAllister et al., 1996; Rouvière & Wolfe, 1988; Thauer, 2012). El proceso comienza con la reacción del CO₂ con metanofurano, reduciéndose el CO₂ a formilo y formándose el complejo formilmetanofurano mediante la enzima formilmetanofurano deshidrogenasa, con ferredoxina como donador de electrones. En el segundo paso, el grupo formilo del formilmetanofurano es transferido a un acarreador de grupos carbono C1 conocido como tetrahidrometanopterina (H₄MPT) o a su homólogo tetrahidrosarcinopterina (H₄SPT). En la tercera etapa, el grupo formilo del formil-H₄M(S)PT se convierte en metenil-H₄M(S)PT mediante la acción de la enzima ciclohidrolasa 5,10-metilenil-H₄M(S)PT. En las etapas cuatro y cinco, la coenzima F₄₂₀ (F₄₂₀ H₂) actúa como donador de electrones en dos ocasiones, primero convirtiendo el grupo metenilo en metileno (etapa cuatro) y luego reduciéndolo a un grupo metilo (etapa cinco), lo que da como resultado la formación de metil-H₄M(S)PT. La oxidación de F₄₂₀ es catalizada por la hidrogenasa reductora de F₄₂₀. En la sexta etapa (común para las vías hidrogenotrófica y acetoclástica), el grupo metilo se transfiere a la coenzima M (HS-CoM), generándose metil-CoM mediante la acción de la metil-H₄M(S)PT:CoM metiltransferasa (MTR). Esta reacción es dependiente de cobalamina (vitamina B₁₂), caracterizada por un anillo corrina tetrapirrólico con un ion de cobalto central (Mathur & Hazra, 2022). La séptima etapa del ciclo de Wolfe (común para las tres vías metanogénicas), última de la metanogénesis como tal, consiste en la reducción del grupo metilo de metil-CoM a CH₄, catalizada por la metil-CoM reductasa (MCR) (Jaun & Thauer, 2007). Esta enzima posee dos sitios activos independientes los cuales contienen cada uno como grupo prostético una molécula de coenzima F₄₃₀, compuesta por un anillo tetrapirrólico con un centro de níquel. Para que la enzima esté activada, el cofactor F₄₃₀ debe estar en estado de oxidación Ni(I), permitiendo su actividad hidrogenasa y formiato deshidrogenasa (Yang et al., 2007). La coenzima B (HS-CoB) suministra los electrones necesarios para esta etapa y se combina con la HS-CoM escindida para formar heterodisulfuro CoM-S-S-CoB como producto final, junto con el CH₄. El heterodisulfuro CoM-S-S-CoB se recicla para convertirse nuevamente en las moléculas reducidas CoB-SH y CoM-SH mediante el complejo hidrogenasa-heterodisulfuro reductasa que se encuentra en el citosol (MvhADG-HdrABC), representando la octava etapa del ciclo de Wolfe. La bifurcación de electrones del H₂ da como resultado la reducción de la ferredoxina para participar de nuevo en la metanogénesis. Además, se genera un suministro adicional de ferredoxina reducida a

partir de la energía producida durante la translocación de iones de sodio (Na^+) hacia el interior de la célula a través de hidrogenasas asociadas a la membrana como Eha y Ehb (Evans et al., 2019; Thauer et al., 2008).

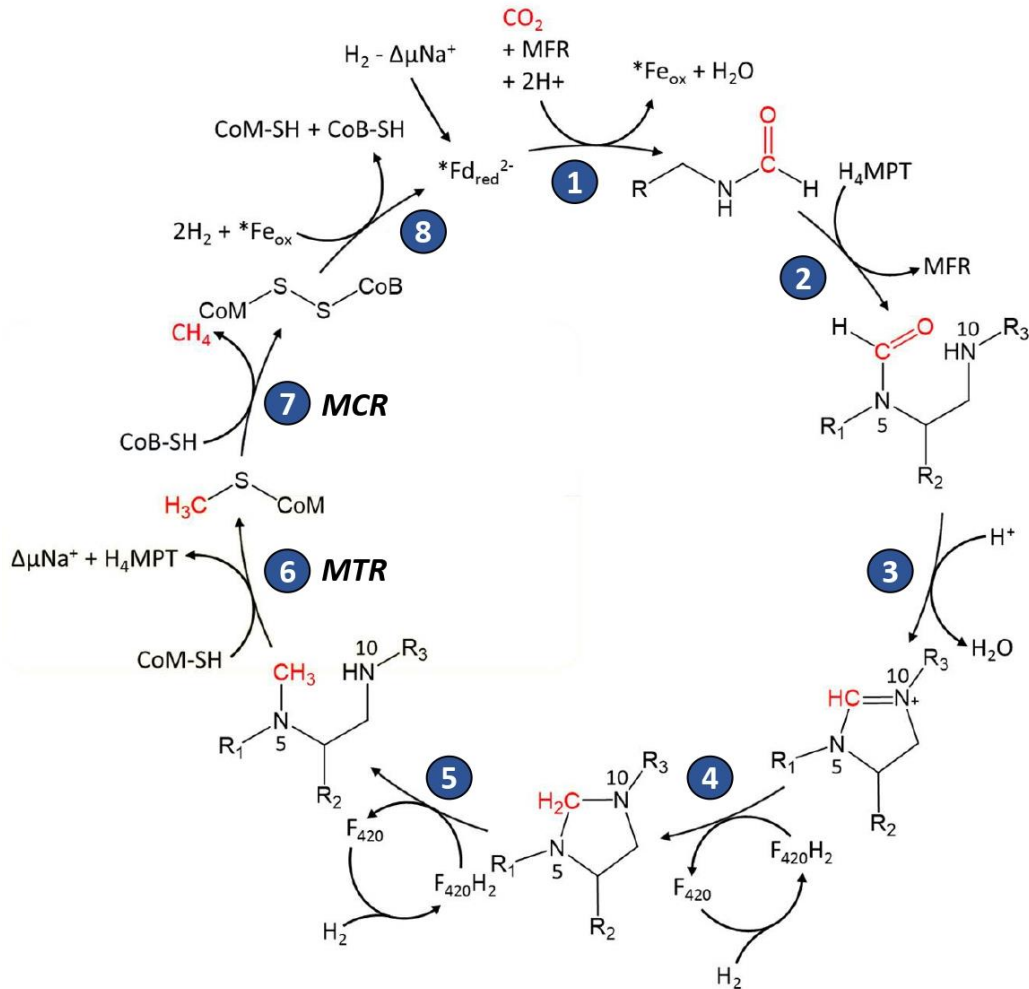


Figura 3. Ciclo de Wolf constituido por ocho etapas por el que CO_2 es reducido a CH_4 con 4 H_2 en metanógenos hidrogenotrofos. Adaptado de Glasson et al. (2022).

El CH_4 producido en el rumen carece de valor nutritivo para el animal y se libera a la atmósfera (**Figura 4**; Murray et al., 1976). Sin embargo, a combustión de un mol de CH_4 a 25°C y 1 atm libera 165,2 kcal. El 87% del CH_4 producido proviene del rumen, mientras que un 13% se forma en el intestino posterior. El 95% del CH_4 es liberado a la atmósfera mediante el eructo, mientras que el 5% es absorbido y eliminado mediante la respiración. En cambio, el 88% del metano producido en el intestino es absorbido y eliminado por la respiración, mientras que el 12% es expulsado a través del recto. En total, un 2% del CH_4 producido se libera a través del recto y un 98% a través de la nariz y boca, del cual el 85%

se libera por el eructo y el 15% por la respiración (Murray et al., 1976). La liberación del CH₄ no solo contribuye a las emisiones de GEI, sino que supone una pérdida de parte de la energía ingerida en la dieta (Johnson & Johnson, 1995).

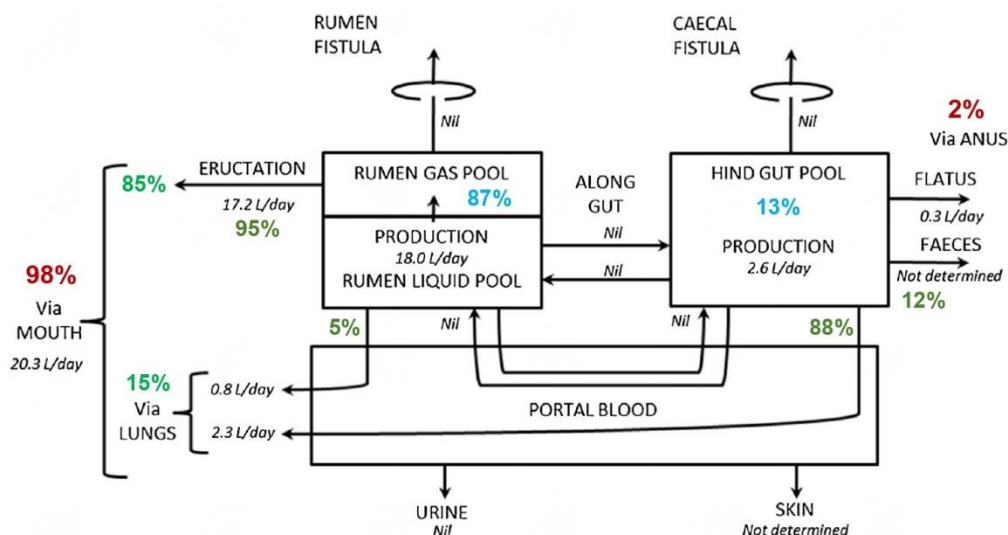


Figura 4. Modelo de producción de CH₄ en el rumen e intestino de un rumiante y su liberación a la atmósfera. Adaptado de Murray et al. (1975).

3.2. Otras rutas metabólicas que incorporan hidrógeno

Existen otros microbios ruminales no metanogénicos que compiten con los metanógenos por el H₂. Sin embargo, desempeñan un papel menos dominante dentro del ecosistema ruminal (Choudhury et al., 2022; Greening et al., 2019; Morgavi et al., 2010). Como ya se ha descrito, la síntesis de propionato es una vía que consume poder reductor en forma de cofactores reducidos y también de H₂ (Newbold et al., 2005). Según el balance clásico, la propionogénesis supone el sumidero del 19% del [H] durante la fermentación ruminal (Wolin, 1960). La síntesis de propionato se verá favorecida cuando la concentración de H₂ en el rumen aumente (Wang et al., 2023). Los homoacetógenos son microorganismos ruminales que consumen H₂ para reducir CO₂ en acetato a través de la vía de Wood-Ljungdahl (Drake, 1994), por lo que son competidores de los metanógenos. Sin embargo, esta vía es termodinámicamente menos favorable que la metanogénesis y la abundancia de los homoacetógenos es menor que la de metanógenos, ya que posee un umbral de requerimiento de H₂ más alto (Karekar et al., 2022). La reducción de nitrato y sulfato también suponen vías de incorporación de H₂ y son termodinámicamente más favorables

que la metanogénesis (van Zijderveld et al., 2010). Sin embargo, la concentración de estos aceptores de electrones en el rumen generalmente limita la velocidad de incorporación de H₂, a menos que se agreguen a la dieta en forma de sales. Otro proceso consumidor de H₂ en el rumen es la biohidrogenación (Ungerfeld, 2015). La dieta de los rumiantes puede contener grasas, principalmente en forma de triacilglicérols, que son hidrolizados a ácidos grasos (lipólisis). Durante la hidrogenación, se eliminan los dobles enlaces presentes en los ácidos grasos insaturados para convertirlos en saturados. No obstante, la proporción de H₂ utilizada en esta reacción es tan solo del 1-2 % del total disponible (Jenkins, 1992). Por último, la producción de biomasa microbiana se podría considerar un sumidero alternativo de H₂, ya que procesos anabólicos como la fijación de amoníaco a cadenas de carbono para la síntesis de aminoácidos requiere equivalentes reductores (Ungerfeld, 2015).

4. Factores que influyen en la producción de metano

La producción de CH₄ en el rumen viene determinada en gran medida por la microbiota ruminal. Se tiende intuitivamente a considerar que la abundancia general de metanógenos está correlacionada con la producción de CH₄ entérico (Veneman et al., 2015). Sin embargo, numerosos estudios sugieren que la abundancia general de metanógenos no es el factor esencial que determina la producción de CH₄ entérico, sino la estructura de la comunidad de metanógenos y la abundancia relativa y grado de actividad metabólica de aquellos más relevantes. Por ejemplo, se ha observado un aumento en la abundancia de miembros del género *Methanosphaera* en vacuno (Danielsson et al., 2017; Ramayo-Caldas et al., 2020; Smith et al., 2022) y ovino (Kittelman et al., 2014; Shi et al., 2014) que emiten bajas cantidades de CH₄. Además, dentro del género *Methanobrevibacter*, Danielsson et al. (2017) informaron de un aumento en la abundancia relativa de *M. gottschalkii* y *M. ruminantium* en vacas lecheras que emiten altas y bajas cantidades de CH₄, respectivamente. Martínez-Álvaro et al. (2020) describieron que vacas con bajas emisiones de CH₄ tenían una comunidad más diversa de metanógenos involucrados en las tres vías metanogénicas, en comparación con aquellos con altas emisiones de CH₄, que tenían un bajo número de géneros metanogénicos hidrogenotróficos. Esto resalta la importancia de la interacción entre las comunidades y la competencia entre los metanógenos por el H₂. Para respaldar esta hipótesis, se ha observado un aumento en la abundancia de metanógenos metilotróficos como *Methanosphaera* en animales que

emiten bajas cantidades de CH₄ (Feldewert et al., 2020; Kelly et al., 2019). Las emisiones de CH₄ no vienen determinadas únicamente por los metanógenos, sino que también dependerá indirectamente de aquellos microorganismos involucrados en la producción y utilización de H₂. Se informó que ovejas con baja emisión de CH₄ presentaban genes codificantes de hidrogenasas y reductasas involucradas en sumideros alternativos de H₂ (Greening et al., 2019). Esto destaca la importancia de la competencia por el H₂ entre los metanógenos y otros grupos microbianos para controlar las emisiones de CH₄. Kittelmann et al. (2014) reportaron una mayor abundancia de comunidades bacterianas asociadas a la producción de propionato en ovejas de baja emisión de CH₄, mientras que las ovejas con altas emisiones de CH₄ presentaban una mayor abundancia de bacterias pertenecientes al filo *Firmicutes*, incluyendo las familias *Ruminococcaceae*, *Clostridiales* y *Lachnospiraceae*, que son conocidas por producir acetato, CO₂ e H₂ (Marounek & Duskova, 1999; Rooke et al., 2014). Wallace et al. (2015) informaron de un aumento de cuatro veces en la abundancia de miembros de la familia bacteriana productora de succinato *Succinivibrionaceae* en novillos de carne con baja emisión de CH₄ en comparación con aquellos con alta emisión. Además, se ha demostrado que el ganado de alta emisión de CH₄ posee una microbiota ruminal caracterizada por una mayor abundancia de bacterias productoras de butirato y formiato, como *Pseudobutyrvibrio* y *Butyrvibrio* (Martínez-Álvaro et al., 2020; Smith et al., 2022). Guyader et al. (2014) mostraron que existía una relación lineal positiva entre el número de protozoos y la producción de CH₄ entérico por unidad de ingesta de materia seca (IMS), ya que los protozoos participan en la producción y posterior transferencia del H₂ a los metanógenos. La relación entre las comunidades fúngica y la producción de CH₄ no están definidas aún, principalmente debido a que la mayoría de los hongos del rumen están sin clasificar (Cunha et al., 2019).

La composición de las comunidades microbianas del rumen cambia según las condiciones del ambiente ruminal, que vienen determinadas principalmente por la alimentación. Por tanto, la dieta es otro factor determinante en la composición de la microbiota del rumen y el perfil de fermentación ruminal, que a su vez determina la concentración de H₂ en el rumen y, por tanto, la producción de CH₄. Un mayor contenido en carbohidratos no estructurales en la dieta (mayor digestibilidad) provoca una tasa de fermentación relativamente elevada, que a su vez conlleva una alta producción de AGV y energía para el crecimiento microbiano (Hook et al., 2010). La acumulación de AGV disminuye el pH

en el rumen, provocando la inhibición de metanógenos. Si la producción de AGV y lactato es mayor que su absorción, se puede producir una bajada excesiva del pH provocando acidosis ruminal (Golder et al., 2023). Además, la fermentación rápida provoca un aumento de la producción de H₂ que excede la capacidad de los metanógenos, disminuyendo la producción de CH₄ por unidad de materia orgánica digerida (Rooke et al., 2014). Por el contrario, las dietas con alto contenido en carbohidratos estructurales (menor digestibilidad) requieren más tiempo para ser degradados por los microorganismos del rumen debido a sus enlaces β, resultando en tasas de fermentación más lentas que permiten una mejor utilización del H₂ ruminal por parte de los metanógenos. Además, las dietas ricas en fibra favorecen termodinámicamente la síntesis de acetato y butirato, dando lugar a una producción relativamente elevada de H₂ y, por tanto, de CH₄ por unidad de material fermentado en el rumen (Belanche et al., 2019; Chen et al., 2021). Por otro lado, la fermentación de carbohidratos no estructurales promueve la síntesis de propionato, reduciéndose la relación acetato:propionato (A:P). La síntesis de propionato disminuye la concentración de H₂ en el rumen, resultando en una menor producción de CH₄ (Janssen, 2010; Johnson & Johnson, 1995; Ungerfeld, 2013). Asimismo, la frecuencia de alimentación influye sobre la producción de CH₄ entérico. La metanogénesis se incrementa al poco tiempo de la ingestión del alimento, para luego disminuir hasta el siguiente tiempo de ingesta. Por tanto, a mayor frecuencia de alimentación, se espera una mayor producción de CH₄ (Blaise et al., 2018).

5. Estrategias nutricionales de mitigación del metano

5.1. Composición en materias primas de la dieta

Basándose en la relación entre la digestibilidad de la materia orgánica de los alimentos, el patrón de fermentación, la microbiota ruminal y la producción de CH₄, la primera estrategia de mitigación de la metanogénesis a considerar es la que consiste en la modulación de la actividad ruminal a través de la composición en ingredientes y forma física de presentación de la dieta (Beauchemin et al., 2020; Grossi et al., 2019; Hristov et al., 2013). Entre estas estrategias nutricionales más comunes para la reducción de las emisiones de CH₄ entérico, se encuentra el aumento de la calidad de los forrajes y digestibilidad de sus nutrientes (aumento de su contenido en carbohidratos no fibrosos y menos lignina), la disminución de la relación forraje:concentrado en la dieta o la reducción del tiempo de ingesta (Hristov et al., 2013). Sin embargo, aunque las

reducciones de la producción de CH₄ conseguidas con estas intervenciones son interesantes, en muchos casos el mercado de materias primas o la zona donde se encuadra la explotación ganadera limita enormemente la aplicación de estas medidas y, por tanto, no forman parte del estudio de esta Tesis Doctoral.

5.2. Uso de compuestos aditivos o suplementos

Otra estrategia nutricional para la reducción de las emisiones de CH₄ consiste en mantener la dieta basal en cuanto a ingredientes principales e incluir el uso de suplementos o aditivos con actividad moduladora de la metanogénesis ruminal. Estas estrategias son las que han demostrado mayor potencial de mitigación (Arndt et al., 2022) y forman parte del estudio de esta Tesis Doctoral. Según el Reglamento CE 1831/2003, los aditivos se definen como “sustancias, microorganismos o preparados distintos de las materias primas y premezclas, que se añaden intencionadamente al alimento o al agua para influir favorablemente en: (i) las características de los piensos o de los productos de origen animal, (ii) el impacto ambiental de la producción animal, (iii) los rendimientos productivos, el bienestar, la salud, mediante su influencia en el perfil de la microbiota intestinal o la digestibilidad de los alimentos, o (iv) por su efecto coccidiostático o histomonostático”. En consecuencia, los aditivos se pueden clasificar como **tecnológicos** (ej., antioxidantes, emulsificantes), **sensoriales** (ej., aromas, pigmentos), **nutricionales** (ej., vitaminas, minerales traza, aminoácidos), **zootécnicos** (ej., potenciadores de la digestión, estabilizadores de la microbiota intestinal) y coccidiostáticos o histomonóstatos. Para ser catalogados como aditivos por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), los productos deben cumplir una normativa específica según la categoría en la que se incluyan (Rychen et al., 2018). Los aditivos que afectan a parámetros zootécnicos, entre los que se incluirían aquellos destinados a reducir la producción de CH₄, son los que requieren una evaluación más exhaustiva que certifique su eficacia y seguridad para los animales, las personas que manipulan sus productos, los consumidores y el medio ambiente. En la actualidad, el número de productos cuya eficacia en reducir la producción de CH₄ está certificada por organismos gubernamentales es muy limitado. La mayoría están catalogados para otras funciones o se encuentran en fase experimental. El desarrollo de aditivos eficaces para inhibir la producción de CH₄ debe tener en cuenta una serie de elementos para su valoración y empleo adecuados, entre los que se incluye conocer con detalle el modo de acción (pueden afectar la formación de

CH₄ desde diferentes perspectivas; McAllister & Newbold, 2008), la dosificación (tasas de inclusión elevadas pueden afectar a la ingesta del animal y por tanto a su productividad o salud; Gerber et al., 2013); la duración de su eficacia (muchos solo funcionan a corto plazo debido a su dilución en el rumen o la degradación del aditivo por parte de los microorganismos; Muetzel et al., 2019); y la disponibilidad del compuesto (su uso debe ser práctico y seguro; Petri et al., 2020). Los compuestos que reducen la producción de CH₄ en el rumen pueden agruparse en 3 grandes grupos, atendiendo a la fase de la metanogénesis en la que ejercen su acción (**Figura 5**). De esta manera, podemos distinguir aquellos que 1) modifican el patrón de fermentación microbiana, generalmente produciendo menos H₂ que es la principal fuente donadora de electrones en la metanogénesis; 2) los que actúan como aceptores alternativos de H₂, redireccionándolo hacia vías metabólicas diferentes a la metanogénesis; 3) los que inhiben directamente la actividad de los metanógenos en el rumen (McAllister & Newbold, 2008).

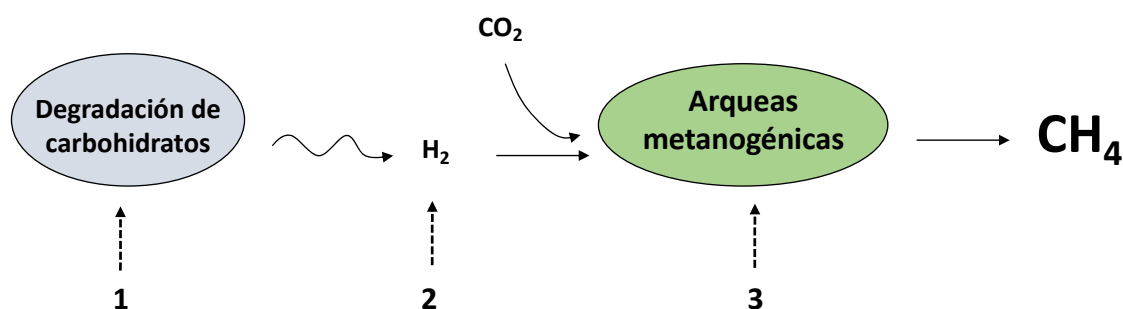


Figura 5. Representación de la producción de CH₄ en el rumen y las 3 etapas (1, 2 y 3) en las que pueden actuar los distintos aditivos.

5.2.1. Compuestos que modifican el patrón de fermentación ruminal

5.2.1.1. Aceites esenciales

Los aceites esenciales son mezclas complejas de metabolitos secundarios volátiles y lipofílicos producidos por las plantas, responsables de proporcionar los sabores y aromas característicos de estas (Benchaar & Greathead, 2011). Están compuestos por terpenoides, principalmente monoterpenos y sesquiterpenos, junto con una variedad de hidrocarburos alifáticos de bajo peso molecular, ácidos, alcoholes, aldehídos, ésteres o lactonas acíclicas y, excepcionalmente, compuestos que contienen nitrógeno y azufre, cumarinas y homólogos de fenilpropanoides (Dorman & Deans, 2000). Cuando se extraen

y concentran, o se sintetizan químicamente, los aceites esenciales pueden ejercer actividades antimicrobianas basadas en su interacción con la membrana celular de las bacterias (Chao et al., 2000; Deans & Ritchie, 1987; Sivropoulou et al., 1996). Los componentes hidrofóbicos de los aceites esenciales pueden acumularse en la bicapa lipídica de las membranas bacterianas, alterando el transporte de electrones, los gradientes de iones, la translocación de proteínas, la fosforilación y otras reacciones dependientes de enzimas, resultando en una disminución de la tasa de crecimiento de las bacterias o incluso la muerte celular (Dorman & Deans, 2000; Ultee et al., 1999). Esta acción antimicrobiana de los aceites esenciales afecta principalmente a las bacterias grampositivas, ya que las gramnegativas cuentan con una capa externa que actúa como barrera de permeabilidad. Sin embargo, moléculas de bajo peso molecular, como el timol y el carvacrol presentes en ciertos aceites esenciales, son capaces de atravesar esta barrera y alterar la membrana bacteriana (Helander et al., 1998). En el rumen, las bacterias grampositivas están implicadas en los procesos de fermentación que producen acetato y butirato, generando H_2 (Owens & Goetsch, 1988), mientras que las bacterias ruminales gramnegativas están involucradas en la síntesis de propionato, que consume H_2 (Russell & Strobel, 1989). El uso de aceites esenciales provoca generalmente que las bacterias gramnegativas sean el grupo predominante en el rumen, resultando en un cambio en el patrón de fermentación hacia una mayor producción de propionato y menos acetato, reduciendo así la producción de H_2 y, por consiguiente, la metanogénesis ruminal (Bergen & Bates, 1984).

Al ser un grupo de aditivos tan heterogéneo, es difícil generalizar sobre su eficacia. Varios aceites esenciales como el tomillo, orégano, canela y ajo o sus componentes principales (timol, carvacrol, cinamaldehído y alicina respectivamente) han demostrado su capacidad de reducir la producción de CH_4 en condiciones *in vitro* (Cobellis et al., 2016). Sin embargo, los resultados de los estudios *in vivo* han sido menos concluyentes (Benchaar & Greathead, 2011; Hristov et al., 2022). Algunos productos comerciales que contienen varios aceites esenciales han demostrado reducir la producción de CH_4 en un número muy limitado de estudios *in vivo*. Por ejemplo, un producto comercial de aceite de orégano (Orego Stim, Anpario plc, Nottinghamshire, Reino Unido) administrado a vacas lecheras en periodo de lactancia no afectó a la producción total de CH_4 ni expresada respecto a la producción de leche, pero sí redujo la producción de CH_4 respecto a la IMS entre un 16 y un 22% (Kolling et al., 2018). La suplementación de 15 g/d de un producto

comercial con extracto de cítricos y alicina de ajo (Mootral GmbH) en la dieta de novillos de engorde redujo la producción de CH₄ entérico en un 23% después de 12 semanas de suplementación, pero no se determinó la persistencia de la disminución después de ese periodo (Roque et al., 2019c). Un metaanálisis de estudios que ofrecieron 1 g/d de una mezcla de cilantro, eugenol, acetato de geranilo y geraniol (Agolin Ruminant; Agolin S.A., Bière, Suiza) a vacas lecheras señaló una disminución del 9% en la producción de CH₄ cuando los animales eran adaptados al aditivo durante más de 4 semanas (Belanche et al., 2020a). Además, los efectos de algunos aceites esenciales (ej., capsaicina) son dependientes del pH y de la dieta, por lo que el uso de estos compuestos podría resultar en efectos distintos sobre la producción de CH₄ y la fermentación ruminal según las condiciones y el sistema de producción en el que se estudien (Calsamiglia et al., 2007; Hart et al., 2008).

De forma general, los aceites esenciales estudiados no afectaron negativamente a la productividad animal o la calidad de los productos (leche, carne) (Benchaar et al., 2009) e incluso en algunos casos se han encontrado mejoras (Belanche et al., 2020a). Sin embargo, algunos estudios encontraron efectos adversos sobre la digestión de los alimentos (Benchaar et al., 2009; Cobellis et al., 2016). A las dosis normalmente recomendadas (entre 1 y 15 g por animal y día, según el producto; Belanche et al., 2020a), la probabilidad de que los aceites esenciales sean tóxicos para los animales es baja, aunque conviene comprobar su posible transferencia a los productos animales debido a su carácter volátil. Algunos compuestos de aceites esenciales, como el estragol y el metil eugenol, han mostrado propiedades genotóxicas (Burt, 2004) y pueden ser potencialmente irritantes y causar dermatitis alérgica durante el manejo. Se ha demostrado que los compuestos organosulfurados del ajo son responsables de efectos hemotóxicos en el ganado vacuno y causan daño celular (Amagase, 2006; Rae, 1999).

Aunque hay numerosos productos comerciales en el mercado a base de aceites esenciales disponibles para su uso en alimentación animal, hasta ahora ninguno ha sido registrado por la EFSA como aditivo zootécnico con beneficio declarado al medio ambiente, sino que incluyen compuestos que están contemplados en la categoría de aditivos sensoriales, por lo que no describe el efecto específico sobre la reducción de la producción de CH₄, el mecanismo de acción y la persistencia de los efectos sobre un periodo prolongado de administración. En la actualidad, el principal desafío consiste en identificar aceites esenciales con una composición bastante consistente que inhiban selectivamente la

metanogénesis en el rumen, con efectos duraderos y sin deprimir la digestión de alimentos y la productividad animal.

5.2.1.2. Taninos

Los taninos son compuestos secundarios de las plantas ricos en fenoles y con capacidad de formar complejos con las proteínas, lo que a menudo hace que no estén disponibles para la digestión y la absorción. Se clasifican en taninos condensados o hidrolizables (McMahon et al., 2000). Los taninos hidrolizables se distinguen por tener un núcleo compuesto de un glúcido con grupos hidroxilos esterificados por ácidos fenólicos. En cambio, los taninos condensados (o proantocianidinas) son polímeros no ramificados de hidroxiflavonoles como la catequina, unidos mediante enlaces entre carbonos y sin el núcleo glucídico. Su modo de acción para disminuir la producción de CH₄ dependerá del tipo de tanino. Los taninos hidrolizables tienden a inhibir directamente los metanógenos del rumen, mientras que los taninos condensados disminuyen el número de protozoos asociados a metanógenos (Aboagye & Beauchemin, 2019). Además, se ha determinado que los taninos pueden afectar al crecimiento de determinados microorganismos, tales como las bacterias celulolíticas o los hongos (Patra & Saxena, 2009a), afectando negativamente a la degradación de la fibra. Esto favorecería un aumento de la producción de propionato frente a acetato, dejando menos H₂ disponible para la síntesis de CH₄ (Verma et al., 2021).

La eficacia de los taninos para reducir la producción de CH₄ se ha mostrado altamente variable según la fuente, tipo y peso molecular de los taninos, así como la dosis utilizada, el tipo de dieta o la comunidad microbiana presente en el rumen del animal (Aboagye & Beauchemin, 2019; Jayanegara et al., 2012; Mueller-Harvey, 2006). Los taninos pueden administrarse al animal como taninos naturales presentes en el forraje (ingredientes) o como taninos purificados añadidos a la dieta (aditivos). Las leguminosas y arbustos tropicales (por ejemplo, *Acacia mearnsii*, castaño (*Castanea* spp.) y quebracho (*Schinopsis balansae*) son forrajes ricos en taninos (Aboagye & Beauchemin, 2019). Estudios realizados en ganado vacuno, ovino y caprino han encontrado una reducción de las emisiones de CH₄ entre un 6 y un 45% al utilizar diferentes especies vegetales ricas en taninos como ingredientes (Aboagye et al., 2018; Denninger et al., 2020; Liu et al., 2019). Sin embargo, otros estudios han informado que la suplementación de extractos de taninos no tuvo efectos en las emisiones de CH₄ (Beauchemin et al., 2007; Ebert et al.,

2017; Wischer et al., 2014). Un metaanálisis realizado por Orzuna-Orzuna et al. (2021), con hasta 26 estudios en vacuno que emplearon taninos purificados, observó una reducción del 5,9% en las emisiones de CH₄ por kg de IMS, sin afectar negativamente al rendimiento animal, aunque sí a la digestibilidad del alimento [con dosis superiores a 12 g/kg de la dieta en base a materia seca (MS)]. Además, se observó una reducción de la concentración de nitrógeno amoniacal en el rumen (-5,9%), excreción urinaria de N (-3,0%). Esto sugiere que los taninos también son capaces de reducir la proteólisis y mejorar la utilización de N en los rumiantes gracias a su tendencia a unirse a proteínas en el tracto gastrointestinal, cambiando la excreción de N en la orina por excreción de N en heces (de liberación más lenta) lo que implica una menor liberación de amoníaco y un menor impacto ambiental. Otro metaanálisis de estudios *in vivo* utilizando tanto plantas ricas en taninos como taninos extraídos indicó una disminución lineal del 3,5% en la producción de CH₄ respecto a la IMS y del 2,6% en la digestibilidad de la materia orgánica (MO) por cada adición de 10 g de taninos por kg de MS (Jayanegara et al., 2012). Aunque parte del efecto de la disminución del CH₄ podría atribuirse a una menor digestión de MO, la producción de CH₄ sobre la base de MO digerible también disminuyó. Se recomienda una tasa de inclusión por debajo de 40 g/kg MS de la dieta, ya que por encima de esta se observó un impacto negativo sobre la IMS, la digestibilidad de fibra y proteína y el rendimiento animal. El suministro de taninos purificados en lugar de taninos no extraídos puede limitar posibles efectos negativos sobre la digestibilidad del alimento y el rendimiento animal al limitar la interacción entre la microbiota ruminal y otros compuestos de la planta (Aboagye & Beauchemin, 2019). El efecto de los taninos sobre el perfil de AGV es muy variable, aunque existe evidencia de mezclas de taninos que han promovido un cambio en la fermentación hacia la síntesis de propionato (Marshall et al., 2022).

A pesar de los estudios que han demostrado el potencial de los taninos para reducir la producción de CH₄ entérico, se requiere más investigación para determinar las concentraciones óptimas de diferentes fuentes de taninos condensados e hidrolizables como aditivos en la dieta y sus efectos en la IMS, la digestibilidad, el rendimiento o la salud animal. Aunque existen productos basados en taninos disponibles comercialmente para su uso como aditivos alimentarios, ninguno está registrado bajo la categoría de aditivo zootécnico orientado a la disminución de las emisiones de CH₄.

5.2.1.3. Saponinas

Las saponinas son una clase de metabolitos secundarios de plantas con una gran diversidad en estructura y actividad biológica. Son glicósidos de esteroides o de triterpenoides, consistentes en una base de azúcar (ej., glucosa, galactosa, ácido glucurónico) unida a una aglicona hidrofóbica llamada sapogenina. Las saponinas actúan como "detergentes naturales" gracias a sus grupos degradantes de membrana que forman complejos con esteroides en las membranas celulares de los protozoos, provocando la lisis celular. Modifican la fermentación en gran medida al suprimir los protozoos ruminales, lo que promueve la síntesis de propionato y reduce la disponibilidad de H₂ en el rumen para la metanogénesis (Adegbeye et al., 2019; Jayanegara et al., 2014; Patra & Saxena, 2009b).

El efecto inhibitorio de la producción de CH₄ de las saponinas es muy variable y depende de la fuente, la estructura química, la dosis, la composición de la dieta y la adaptación de los microorganismos ruminales a las saponinas. La mayoría de los estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que las saponinas de té, *Sapindus*, *Quillaja*, *Yucca*, alfalfa y *Sesbania* redujeron la producción de CH₄, aunque algunas investigaciones no reportaron efectos (Goel & Makkar, 2012; Jafari et al., 2019; Patra & Saxena, 2009a). Un metaanálisis de estudios *in vitro* indicó que la adición de niveles crecientes (hasta 500 mg/g de sustrato) de una fuente rica en saponinas (quillay, té o yuca) redujo las emisiones de CH₄ por unidad de sustrato en un 7,9%, 13,0% o 22,3%, respectivamente (Jayanegara et al., 2014). También se observó una disminución en la proporción de acetato y un aumento en la proporción de propionato. Otro metaanálisis analizando 17 estudios *in vivo* observó una reducción del 8,6% en la producción de CH₄ respecto a la IMS para niveles de inclusión de saponinas igual o superiores a 0,5% de MS, pero también una reducción de la digestibilidad del alimento (Ridla et al., 2021). En cambio, la digestibilidad aumentó a niveles de inclusión por debajo de 0,5% de MS, pero sin efectos sobre la producción de CH₄. La mejora potencial en el perfil de ácidos grasos observada *in vitro* solo se manifestó *in vivo* en mejoras limitadas en la calidad de la leche, como un aumento de los ácidos grasos insaturados (Szczechowiak et al., 2016; Wang et al., 2017). Sin embargo, algunos estudios encontraron una disminución de la IMS y la producción de leche en vacas con saponinas de té (Guyader et al., 2017; Wang et al., 2017). Por otro lado, las saponinas pueden mejorar la eficiencia de utilización de N y de síntesis de proteína microbiana al inhibir la actividad proteolítica de los protozoos, aumentando la absorción de

aminoácidos en el intestino del animal (Patra & Saxena, 2009b). Además, las saponinas son capaces de unirse a amoníaco cuando su concentración en el rumen es alta, y luego liberarlo gradualmente para la síntesis de proteína microbiana cuando la concentración es baja (Wallace, 1991). Esto se ha relacionado con una mejora en la ganancia de peso en ganado vacuno y ovino alimentado con fuentes de saponinas, pero solo con dietas altas en forraje y sin efecto a largo plazo por adaptación de la microbiota ruminal a las saponinas (Kholif, 2023).

Existe al menos una patente que involucra el uso de saponinas en la alimentación de rumiantes (Aoun et al., 2003), pero hasta la fecha no existe ningún producto comercial basado en saponinas con un beneficio medioambiental. La suplementación de dietas de rumiantes con plantas ricas en saponinas o extractos que contienen saponinas purificadas suponen una potencial estrategia de mitigación, pero la alta variabilidad en los resultados entre los estudios realizados hace que se requiera una mayor investigación. Uno de los principales problemas que presenta el uso de saponinas es que su acción antiprotozoaria parece ser transitoria, ya que microorganismos del rumen son capaces de romper la unión entre el azúcar y la sapogenina, inactivando la saponina. Para evitar esto, se han propuesto estrategias como combinar extractos de saponinas con iminoazúcares que inhiben enzimas glicosidasas, o la sustitución de su base de azúcar por otros pequeños residuos polares que no puedan ser descompuestos por las glicosidasas (Ramos-Morales et al., 2017a, 2017b). Otra limitación que implica el uso de saponinas es que, debido a que su efecto inhibitorio de la metanogénesis se relaciona únicamente con la pérdida de protozoos del rumen, el aumento de la actividad de metanógenos no asociados con los protozoos puede restaurar los niveles de emisiones de CH₄ previos al tratamiento (Kim et al., 2023). Además, se necesita una evaluación más amplia de sus efectos sobre la degradabilidad de los alimentos, la productividad del animal o su seguridad. En principio, no deberían esperarse residuos de saponinas en los productos animales debido a su degradación en el rumen a sapogeninas, siendo excretadas en las heces o absorbidas en el duodeno y transportadas al hígado, donde pueden conjugarse con un glucurónido y excretarse en la bilis (Kholif, 2023). No obstante, la degradación de saponinas en el rumen a las concentraciones empleadas en los estudios debe ser estudiada.

5.2.1.4. Ionóforos

Los ionóforos son compuestos de poliéter generalmente sintetizados por microorganismos que aumentan la permeabilidad de las membranas celulares de bacterias

grampositivas y protozoos a iones, aumentando la concentración de H^+ y Na^+ en el citoplasma. En consecuencia, las células microbianas utilizan energía para expulsar H^+ , lo que resulta en un crecimiento retardado y la muerte de estos microorganismos (Azzaz et al., 2015; Duffield et al., 2008a; Duffield & Bagg, 2000). Por tanto, el suplemento de ionóforos cambia la población bacteriana del rumen, predominando las bacterias gramnegativas que son resistentes a los ionóforos gracias a su capa externa que actúa como barrera de permeabilidad. Como resultado de este cambio en la estructura de la comunidad bacteriana, disminuye la producción de acetato y aumenta la producción de propionato, liberándose menos H_2 . Esto conduce a una reducción de la metanogénesis. Sin embargo, existen informes variables sobre la adaptación de los microorganismos a los efectos de los ionóforos. Algunos estudios indican efectos limitados en el tiempo (Appuhamy et al., 2013).

El ionóforo más efectivo para modificar la fermentación ruminal es la monensina, producida por *Streptomyces cinnamonensis*, aunque existen otros como nigericina, gramicidina y lasalocid. En muchos países donde se practica el cebo intensivo de rumiantes, la monensina es un compuesto que se utiliza de manera rutinaria. No obstante, sus efectos sobre la producción de CH_4 suelen ser modestos. Según un metaanálisis realizado por Appuhamy et al. (2013), se observó una reducción promedio del 5% en la producción diaria de CH_4 con el uso de monensina, perdiendo su eficacia con el tiempo. Además de sus efectos en la producción de CH_4 , la monensina mejora la eficiencia de conversión del alimento, lo que conduce a un aumento de la producción animal con la misma cantidad de alimento consumido, disminuyendo las emisiones de CH_4 por IMS y por ganancia de peso vivo (PV) (Duffield et al., 2008b; Hristov et al., 2013). No obstante, la suplementación con monensina durante un periodo prolongado tiene el potencial de afectar negativamente el rendimiento de los animales (Odongo et al., 2007). Además, se observó que el uso de ionóforos puede aumentar la producción de leche, pero disminuye su contenido graso (Duffield et al., 2008b). También reduce la concentración de amoníaco en el rumen, aunque existen resultados contradictorios sobre sus efectos en el metabolismo del nitrógeno y la liberación de nitrógeno al medio ambiente (Duffield et al., 2008a).

Aunque los ionóforos pueden mejorar la salud del rumiante (Appuhamy et al., 2013; Duffield et al., 2008a, 2008b), pueden resultar tóxicos en altas concentraciones. Por tanto, su suplementación en la dieta de los animales requiere una baja dosificación, por debajo

de 50 mg/kg MS. Se ha cuestionado si el uso generalizado de ionóforos contribuye a la resistencia cruzada a otros antibióticos (Wong, 2019). Por ello, el uso de la monensina y demás ionóforos como aditivos promotores del crecimiento está prohibido en algunos países, incluido la Unión Europea desde 2006 (https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/en/IP_05_1687). Por tanto, aunque algunos países fuera de la Unión Europea lo comercialicen, no se consideran una solución práctica para reducir las emisiones de CH₄ de los rumiantes.

5.2.2. Aceptores alternativos de hidrógeno

5.2.2.1. Nitrato

El nitrato se suministra en la dieta en forma de sales altamente solubles (nitrato de calcio principalmente) y se reduce fácilmente en el ambiente anaerobio del rumen. Su reducción a nitrito y posteriormente a amoníaco proporciona un sumidero de H₂ en el rumen termodinámicamente favorable en comparación con la reducción de CO₂ a CH₄. Se espera entonces que el nitrato reduzca competitivamente la metanogénesis ruminal. Según las relaciones estequiométricas, la suplementación de 1% de nitrato en la dieta en base a MS debería reducir la producción de CH₄ en un 12,5% (por ejemplo, de 20,7 a 18,1 g CH₄/kg de IMS) para las condiciones de producción en pastoreo, esperándose una reducción mayor en sistemas intensivos con dietas con más concentrado (Maigaard et al., 2023). Al tener en cuenta la reducción incompleta del nitrato, la relación estequiométrica varía, prediciéndose una menor reducción de la producción de CH₄. Por otra parte, el nitrito formado como intermediario en la reducción del nitrato es tóxico para los metanógenos, por lo que tiene un efecto adicional sobre la inhibición de la metanogénesis. La suplementación con nitrato disminuye consistentemente la producción de CH₄ en experimentos *in vivo* a largo plazo (Lee & Beauchemin, 2014), incluyendo experimentos que duran hasta 407 días consecutivos (Granja-Salcedo et al., 2019). En su metaanálisis, Lee & Beauchemin (2014) describieron una disminución lineal de 8,3 g de CH₄ por kg de IMS, por g de nitrato ingerido, por kg de masa corporal y por día. En un metaanálisis posterior, Feng et al. (2020) observaron una reducción general de CH₄ del 11,4% con nitrato al 1% de MS, o del 13,2% si se excluyen los estudios de en los que se utilizó una formulación de nitrato de liberación lenta. El metaanálisis realizado por Arndt et al. (2022) encontró que la inclusión de nitrato disminuyó la producción total de CH₄ en un 17%. Se ha observado que la suplementación de nitrato puede causar una disminución en la IMS del 3% y no se han encontrado beneficios sobre la productividad animal (Nguyen

et al., 2016; Yang et al., 2016). Solo se ha observado una mejora de la productividad cuando se agregan a dietas deficientes de N, ya que el nitrato también proporciona una fuente de nitrógeno (en forma de amoníaco) para la síntesis de proteína microbiana en el rumen. No obstante, cuando está en exceso se convierte en urea en el hígado y los riñones (Yang et al., 2016). Además, existe cierto riesgo de toxicidad para el animal que depende de la dosis debido a la acumulación del nitrito. Este metabolito intermediario en el proceso de reducción del nitrato puede ser absorbido a través de la pared del rumen y reaccionar con la hemoglobina para formar metahemoglobina, que no puede transportar oxígeno y por lo tanto representa un riesgo para la salud del rumiante (Villar et al., 2021). Además, se puede producir óxido nitroso y ser expulsado como GEI muy potente (Petersen et al., 2015). Por todas estas limitaciones, las dosis de nitrato en la dieta suelen limitarse por debajo del 1% de MS (Hegarty et al., 2021), aunque podría aumentarse con una adaptación previa de los microorganismos ruminales a concentraciones crecientes de este sustrato. El nitrato con formulación de liberación lenta en el rumen aumenta la seguridad del aditivo para el animal, pero también se ha observado que provoca la aparición de nitrato en las heces, sugiriendo que el nitrato no se libera adecuadamente en el rumen (Lee et al., 2017). Por ello, el uso de este tipo de formulaciones no está recomendado hoy en día. Aunque se pueden encontrar trazas de nitrato en la leche (Guyader et al., 2016) y en los tejidos (Doreau et al., 2018) del animal, se considera seguro para los consumidores.

El nitrato de calcio está disponible para su uso en el mercado comercializado como ingrediente alimenticio (Silvair®, Cargill) pero no como aditivo, ya que proporciona N extra a la dieta que puede convertirse en proteína microbiana en el rumen, de forma similar a lo que ocurre con la urea alimentaria. Su uso aún no se ha extendido de manera notable en el sector, fundamentalmente por el coste que tiene. Aunque permite reducir parte de las fuentes de N de la dieta (soja o urea), la eficacia mostrada en cuanto al nivel de reducción de la producción de CH₄ (menor del 20%) puede resultar insuficiente para representar una estrategia de mitigación del CH₄ de forma individual, además de representar un riesgo para la salud del rumiante si se exceden las dosis recomendadas.

5.2.2.2. Ácidos orgánicos

Los ácidos dicarboxílicos intermediarios de la fermentación ruminal son potenciales aceptores de electrones orgánicos que bien incorporan [H] por sí mismos (fumarato, que se reduce a succinato en la vía aleatorizada de propionato) o pueden ser metabolizados en

compuestos que incorporan [H] (malato, que se deshidrata a fumarato; acrilato, que puede esterificarse a acriloil-CoA e incorporarse en la vía no-aleatorizada de propionato; crotonato, que puede esterificarse a crotonil-CoA e incorporarse en la formación de butirato) (Carro & Ungerfeld, 2015; Ungerfeld & Hackmann, 2020). Estos compuestos orgánicos favorecen la síntesis de propionato y en menor medida de butirato, que son absorbidos a través de la pared del rumen y tienen un valor nutricional para los rumiantes, a la vez que reducen la disponibilidad del H₂ para los metanógenos. Los compuestos orgánicos más estudiados en el rumen han sido el fumarato y el malato. Según la estequiometría del metabolismo del fumarato, la reducción de 1 mol de fumarato a 1 mol de succinato incorpora 1 mol de equivalentes reductores, lo que teóricamente suprimiría la formación de 0,25 moles de CH₄ a través de la metanogénesis hidrogenotrófica. Por ejemplo, una disminución del 10% en la producción de CH₄ de una vaca que produce 328 g/día de CH₄ requeriría que el animal ingiriera 1,4 kg/día de fumarato de sodio, es decir, una parte considerable de su dieta (Newbold et al., 2005). Sin embargo, los metaanálisis de experimentos *in vitro* observaron que las disminuciones en la producción de CH₄ estuvieron por debajo de la expectativa teórica para fumarato y malato, porque ambos compuestos se convirtieron parcialmente en acetato en lugar de en propionato, liberando H₂ en lugar de incorporarlo (Ungerfeld et al., 2007; Ungerfeld & Forster, 2011). Debido a la propiedad termodinámica de que tanto el acetato como el propionato pueden ser generados a partir de los precursores de propionato, la adición de precursores de propionato en la dieta puede tanto generar como consumir H₂. Esto limita su potencial como estrategia efectiva para la reducción del CH₄. Los estudios *in vivo* de la suplementación de fumarato y malato han mostrado resultados variables, desde no tener efecto en algunos estudios hasta efectos leves o moderados (reducción entre el 10 y el 23%) en otros (Carro & Ungerfeld, 2015). El metaanálisis realizado por Arndt et al. (2022) encontró que la inclusión de fumarato disminuyó la producción total de CH₄ en un 16%. Es posible que la inclusión de un nivel elevado (10%) de ácido fumárico altamente fermentable en la dieta disminuyera aún más la producción de CH₄ y desplazara la fermentación hacia el propionato (Janssen, 2010).

En la mayoría de los estudios, no se han observado efectos significativos de la inclusión moderada de malato en la IMS, mientras que los efectos del fumarato han sido más inconsistentes, con una disminución de la IMS en algunos estudios y la falta de efectos en otros (Carro & Ungerfeld, 2015). Por otro lado, el malato estimula a *Selenomonas*

ruminantium y puede ayudar a prevenir la acidosis láctica al promover el metabolismo del lactato (Carro & Ungerfeld, 2015). Por su parte, el fumarato y el malato son intermediarios naturales de la fermentación en el rumen y se consideran seguros, estando registrados como ingredientes alimentarios en la Unión Europea y en Estados Unidos (Carro & Ungerfeld, 2015). No existen efectos secundarios tóxicos ni residuos biológicos asociados al uso de estos ácidos orgánicos con el propósito de promover la formación de propionato para inhibir la producción de CH₄ en el rumen. Sin embargo, la alimentación con fumarato y malato en rumiantes se ve limitada en gran medida por el elevado coste, incrementado por los niveles relativamente altos de inclusión necesarios y los efectos relativamente pequeños en la reducción de CH₄.

5.2.3. Inhibidores de los metanógenos

5.2.3.1. Compuestos halogenados

Desde la década de 1960, diversos compuestos químicos han sido investigados con el fin de inhibir directamente la actividad de los metanógenos. Existen compuestos halogenados que son análogos del CH₄, como el bromoclorometano (BCM), el cloroformo o el tetracloruro de carbono (Bauchop, 1967; Lanigan, 1972; Trei et al., 1971). Estos inhiben principalmente el penúltimo paso de la metanogénesis al reaccionar con la vitamina B₁₂ para bloquear la actividad de la MTR, responsable de la síntesis de metil-CoM (Wood et al., 1968). También hay compuestos halogenados estructuralmente análogos de la CoM-SH, como el 2-bromoetanosulfonato (BES), de manera que pueden inhibir el último paso de la metanogénesis al bloquear la MCR (Gunsalus et al., 1978). Entre otros, el cloroformo, BCM y BES han demostrado su efecto inhibitor específico sobre los metanógenos (Patra et al., 2017). Diversos estudios *in vitro* han observado una reducción de más del 95% en la producción de CH₄ cuando BES fue añadido al medio de cultivo a concentraciones a partir de 50 µM, debido a una reducción en la abundancia de metanógenos totales (Lee et al., 2003; Ungerfeld et al., 2019; Yang et al., 2019). En condiciones *in vivo*, BES redujo la producción de CH₄ hasta un 40% (Immig et al., 1996). Sin embargo, estos efectos solo duraron 3 días, sugiriendo una rápida adaptación de la microbiota ruminal a la presencia de BES. Reducciones similares en la producción de CH₄ (30-50%) se observaron cuando se alimentó ganado vacuno con 1,6-2,6 g cloroformo/100 kg de PV, así como se redujo la abundancia de los metanógenos totales (Martinez-Fernandez et al., 2016, 2018). Utilizando concentraciones más altas, Knight et

al. (2011) observaron que la suplementación con cloroformo en vacas redujo la producción de CH₄ hasta un 90%. La inhibición, aunque en menor nivel, se mantuvo durante 32 días, sugiriendo que la adaptación de la microbiota ruminal al cloroformo es más limitada. Por su parte, 0,3 g BCM/100 kg de PV redujo la producción de CH₄ un 33%, 2 g un 70% y 5 g un 90% en caprino (Abecia et al., 2012; Mitsumori et al., 2012). El efecto de los compuestos halogenados sobre la producción de CH₄ es dependiente de la dosis y de la dieta, siendo más pronunciada la reducción de la metanogénesis en sustratos mixtos (concentrado y pasto) que solo pasto (Lee et al., 2003; O'Brien et al., 2014).

La reducción de la producción de CH₄ por el uso de compuestos halogenados fue siempre acompañada por un aumento de la producción de H₂ y una disminución de la relación A:P, sin que la concentración total de AGV sea afectada (Abecia et al., 2012; Knight et al., 2011; Martinez-Fernandez et al., 2016; Mitsumori et al., 2012). Los efectos observados sobre la concentración de amoníaco en el rumen han sido pequeños o nulos. El aumento de la síntesis de propionato puede resultar en un aumento de la producción de leche, aunque disminuyendo la calidad del perfil de ácidos grasos (Abecia et al., 2012). La digestibilidad del alimento no suele verse afectada, pero generalmente la IMS disminuye cuando se administran agentes anti-metanogénicos halogenados (Ungerfeld, 2018). En cualquier caso, estos compuestos halogenados no son aceptados para su uso práctico debido a sus propiedades hepatotóxicas, carcinogénicas o contaminantes (p. ej.; su efecto negativo sobre la capa de ozono estratosférica) (Harnisch et al., 2002; Kimbrough, 1979). Aunque no puedan ser usados en potenciales estrategias de mitigación de la metanogénesis, los inhibidores halogenados son muy útiles como modelo experimental en estudios de corta a media duración.

5.2.3.2. 3-nitrooxipropanol

El 3-nitrooxipropanol (3NOP) es un inhibidor de la metanogénesis desarrollado y comercializado por DSM Nutritional Products (Basilea, Suiza). Este mononitrato de 1,3-propanodiol (fórmula: HOCH₂CH₂CH₂ONO₂; Duval & Kindermann, 2012) es un análogo estructural de la metil-CoM, sustrato de la MCR en el paso final de la metanogénesis. El 3NOP presenta mayor afinidad que la metil-CoM por el cofactor F₄₃₀, que es el sitio activo de la MCR, de manera que el 3NOP se une selectivamente y oxida el Ni(I) del cofactor F₄₃₀. De esta manera, el 3NOP inactiva la MCR e inhibe la metanogénesis (Duin et al., 2016). Además, la transferencia del electrón del Ni(I) del

cofactor F430 al grupo nitrato de 3NOP provoca su división en 1,3-propanodiol y nitrito, el cual también inactiva la MCR (Duin et al., 2016). No obstante, la MCR puede ser reactivada mediante un sistema de reparación propio de los metanógenos que depende de H₂, ATP y chaperonas (Prakash et al., 2014). Por tanto, una vez el 3NOP ha sido completamente metabolizado y ya no está presente en el rumen, las emisiones de CH₄ pueden ser restauradas a sus niveles originales (Zhou et al., 2013).

Existen un creciente número de publicaciones científicas (más de 50) que describen la eficacia de 3NOP en vacuno lechero y de carne, en una variedad de dietas y sistemas de manejo, junto con distintas revisiones y metaanálisis (Dijkstra et al., 2018; Jayanegara et al., 2018; Kebreab et al., 2023; Kim et al., 2020; Yu et al., 2021). Los metaanálisis de Dijkstra et al. (2018) y Kim et al. (2020) establecieron disminuciones lineales en la producción de CH₄ en función de la dosis de 3NOP. En el metaanálisis de Dijkstra et al. (2018), la reducción promedio de la producción de CH₄ fue mayor en vacuno lechero (-38,2%) que en vacuno de carne (-26,1%). Lo mismo ocurría al expresar la producción de CH₄ respecto a la IMS (-34,9% en vacuno lechero, -21,1% en vacuno de carne). Estos metaanálisis se actualizaron recientemente para vacas lecheras con los estudios más recientes, incluyendo el efecto de la composición de la dieta (Kebreab et al., 2023). Los modelos que solo incluyeron la dosis de 3NOP (a una concentración promedio de 70,5 mg/kg de MS) indicaron una disminución del 32,7%, 30,9% y 32,6% para la producción diaria de CH₄, la producción de CH₄ respecto a la IMS y respecto a la leche corregida por energía, respectivamente. Respecto al efecto de la dieta, el nivel de reducción de la metanogénesis alcanzado por 3NOP disminuyó con el aumento del contenido fibroso y el contenido en grasa en la dieta. La mayoría de los estudios a largo plazo (hasta 34 semanas; Vyas et al., 2016a) han mostrado que la efectividad de 3NOP se mantuvo constante. Sin embargo, algunos estudios informaron que la efectividad de 3NOP disminuyó ligeramente con el tiempo, lo que podría estar relacionado con la utilización de dosis bajas o con una posible adaptación de la microbiota ruminal (Yu et al., 2021). Los estudios no han descrito los potenciales efectos negativos de la acumulación del H₂ por la actividad anti-metanogénica de 3NOP en la digestibilidad del alimento y en algunos casos se han observado aumentos leves (Hristov et al., 2015; van Gastelen et al., 2022). Según la mayoría de los estudios en vacuno lechero, la suplementación de dietas con 3NOP (40 a 80 mg/kg de MS) no mejoró el crecimiento de los animales (Jayanegara et al., 2018), ni afectó la IMS, la producción de leche o la eficiencia alimentaria. Sin embargo, algunos

estudios observaron un ligero aumento de la ganancia de peso corporal (Haisan et al., 2014; van Gastelen et al., 2022) y pequeños cambios en los componentes de la leche (Jayanegara et al., 2018; Schilde et al., 2021). Dependiendo de la dieta y de la dosis de 3NOP (100 a 200 mg/kg de MS), la mayoría de los estudios en vacuno de carne han descrito una disminución de la IMS de 2 a 6,5% (Alemu et al., 2019, 2021), sin efectos negativos en el rendimiento de los animales (Alemu et al., 2019, 2021; Vyas et al., 2016a, 2018), excepto cuando se alimenta con una dieta alta en grano con una alta dosis de 3NOP (200 mg/kg de MS). Así, se ha descrito un aumento de la relación entre ganancia de peso y consumo de alimento (entre 2,5 y 5%) en algunos estudios en vacuno de carne (Alemu et al., 2021; Vyas et al., 2016a, 2018), pero no en todos (Beauchemin, 2021).

Como resultado de la inhibición de la metanogénesis, el H₂ que ya no es consumido por los metanógenos se acumula en el rumen y esto hace que el flujo de [H] de la fermentación ruminal se desplace desde la síntesis de acetato hacia la de propionato, butirato y valerato (Ungerfeld, 2018). Se ha observado una mayor concentración de propionato y butirato y una reducción en la relación A:P con la suplementación de 3NOP tanto en vacuno lechero como de carne (Romero-Perez et al., 2014; Schilde et al., 2021). Se ha planteado la hipótesis de que este cambio podría llevar a una mayor disponibilidad de energía y glucosa para el animal (Ungerfeld, 2018). También se ha demostrado que el pH ruminal es incrementado con la suplementación de 3NOP, lo que indica un menor riesgo de acidosis ruminal (Jayanegara et al., 2018). Respecto a la seguridad del aditivo, los compuestos derivados de la degradación de 3NOP (1,3-propanodiol y nitrito) son degradados a su vez en el rumen (Duin et al., 2016), con menos del 5% del compuesto original excretado en la orina, por lo que teóricamente no hay riesgo de residuos en carne y leche (Thiel et al., 2019). No obstante, se recomiendan dosis por debajo de los 60 mg/kg de MS ingerida.

Este extenso conjunto de datos publicados de estudios *in vitro* e *in vivo* de corto y largo plazo, junto con estudios realizados bajo las directrices y requisitos específicos necesarios para registrar 3NOP en Europa, permitieron al panel de EFSA evaluar y concluir que 3NOP tiene el potencial de ser eficaz en el caso de todas las especies de rumiantes (Bampidis et al., 2021). Esto ha permitido la disponibilidad comercial de 3NOP en la Unión Europea (Bovaer[®] DSM) y su registro oficial como aditivo zootécnico para reducir la producción de CH₄ entérico en ganado lechero. Por ahora, su uso está orientado a sistemas de estabulación permanente donde existe un mayor control de la dieta y por tanto

la capacidad de dosificar el producto de manera adecuada, mientras que su utilización en pastoreo resulta más compleja.

5.2.3.3. Macroalgas rojas del género *Asparagopsis*

Las macroalgas rojas del género *Asparagopsis* son especies subtropicales pertenecientes a la familia Bonnemaisoniaceae, originarias del Pacífico y distribuidas actualmente en ecosistemas marinos cálidos y templados (Andreakis et al., 2004) que destacan por producir naturalmente altas concentraciones de compuestos halogenados estructuralmente análogos del CH₄ (2-6% del peso seco de la biomasa; Mata et al., 2012), siendo el CHBr₃ el más abundante de todos (Machado et al., 2016b). Estos compuestos son almacenados en células glandulares especializadas y liberados al medio como mecanismo de defensa ante situaciones de depredación o contra microorganismos antagonistas (Paul et al., 2006). Al igual que otros análogos del CH₄, el CHBr₃ es capaz de reaccionar con la vitamina B₁₂ para bloquear la actividad de la MTR, responsable de la síntesis de metil-CoM en la penúltima etapa de la metanogénesis (Wood et al., 1968). Sin embargo, también se ha identificado otro mecanismo de acción basado en la unión del bromoformo al tetrapirrol de níquel del cofactor F₄₃₀, sitio activo de la MCR, inhibiendo por tanto la reducción de metil-CoM en CH₄ (Glasson et al., 2022; Yang et al., 2007). Las investigaciones se han centrado principalmente en *Asparagopsis taxiformis* debido a su elevada concentración de CHBr₃ (hasta 7,8 mg/g; Roque et al., 2021). En menor medida, también se ha estudiado la especie *Asparagopsis armata* pero con un contenido en CHBr₃ (1,32 mg/g; Roque et al., 2019b) menor que *A. taxiformis*, por lo que hoy en día se considera menos prometedora.

Machado et al. (2014) demostraron por primera vez en condiciones *in vitro* que la inclusión de *A. taxiformis* al 20% de materia orgánica (MO) redujo la producción de CH₄ en un 99%. Estudios *in vitro* posteriores confirmaron este efecto anti-metanogénico a dosis de 2% de MO del sustrato (Kinley et al., 2016; Machado et al., 2014, 2016a, 2018; Roque et al., 2019a). Chagas et al. (2019) observaron que *A. taxiformis* era efectiva en reducir la producción de CH₄ *in vitro* incluso a tasas de inclusión por debajo del 0,1% de MO. Estos estudios observaron que *A. taxiformis*, al igual que otros inhibidores de la metanogénesis, aumentaban la producción de H₂ y provocaban un cambio en el perfil de fermentación hacia la síntesis de propionato, disminuyendo la relación A:P pero generalmente sin efectos sobre la producción de AGV totales. Además, Machado et al.,

(2018) encontraron que *A. taxiformis* a 2% de MS alteraba la estructura de la comunidad de metanógenos ruminales, disminuyendo la abundancia de *Methanobacteriales*, *Methanomassiliicoccales* y *Methanomicrobiales*. Utilizando la misma dosis, O'Hara et al. (2023) observaron una desaparición casi total de los metanógenos, así como la inhibición de bacterias degradadoras de fibra, incluyendo *Fibrobacter* y *Ruminococcus*, y la prevalencia de otros géneros involucrados en la producción de propionato como *Prevotella*, *Bifidobacterium*, *Succinivibrio*, *Ruminobacter* y *Lachnospiraceae* no clasificada.

El potencial anti-metanogénico de *A. taxiformis* también ha sido demostrado *in vivo*, con una alta variabilidad entre los resultados de los distintos estudios debido a diferencias en la tasa de inclusión del alga, su contenido en CHBr_3 , el contenido de fibra en la dieta del animal o la composición de la comunidad microbiana del rumen (Hegarty et al., 2021). Li et al. (2016) observaron en ovino que dosis inferiores al 1% de la MO de la dieta no afectaban la producción de CH_4 , mientras que niveles de inclusión del 2-3% de MO reducían la producción de CH_4 hasta un 80% durante un periodo de 72 días. En vacuno de carne, Kinley et al. (2020) y Roque et al. (2021) encontraron mayores niveles de reducción de la producción de CH_4 (80-90%) con dosis más bajas de *A. taxiformis* (0,2-0,5% de MO), siendo el efecto dependiente de la dosis. Además de la especie animal, la principal diferencia entre Li et al. (2016), Kinley et al. (2020) y Roque et al. (2021) fue la concentración de CHBr_3 en el alga (1,75; 6.55 y 7.8 mg/g, respectivamente), relacionándose un mayor contenido en CHBr_3 con un mayor efecto inhibitorio de la metanogénesis. En vacuno lechero, Krizsan et al., (2023) y Stefenoni et al. (2021) observaron que *A. taxiformis* al 0,5% de MS redujo las emisiones diarias de CH_4 un 60-65%, las emisiones de CH_4 respecto a IMS un 54-55%, y las emisiones de CH_4 respecto a la leche corregida por energía un 58%. Otro estudio que empleó *A. armata* con un menor contenido en CHBr_3 (1,3 mg/g) que *A. taxiformis*, encontró que una dosis de 0,5% de MO resultó en una reducción de la producción de CH_4 inferior al 30% (Roque et al., 2019b). Por tanto, la concentración de CHBr_3 es un factor fundamental en la respuesta de la producción de CH_4 a *Asparagopsis* (**Figura 6**; Eason & Fennessy, 2023). Aunque Roque et al. (2021) observaron un efecto persistente de *A. taxiformis* hasta 147 días, Stefenoni et al. (2021) señalaron que la eficacia de *A. taxiformis* disminuye gradualmente con el tiempo, probablemente debido a la inestabilidad y pérdida de CHBr_3 del producto, en

lugar de una adaptación de los microbios del rumen, siendo este un aspecto que todavía debe investigarse más a fondo.

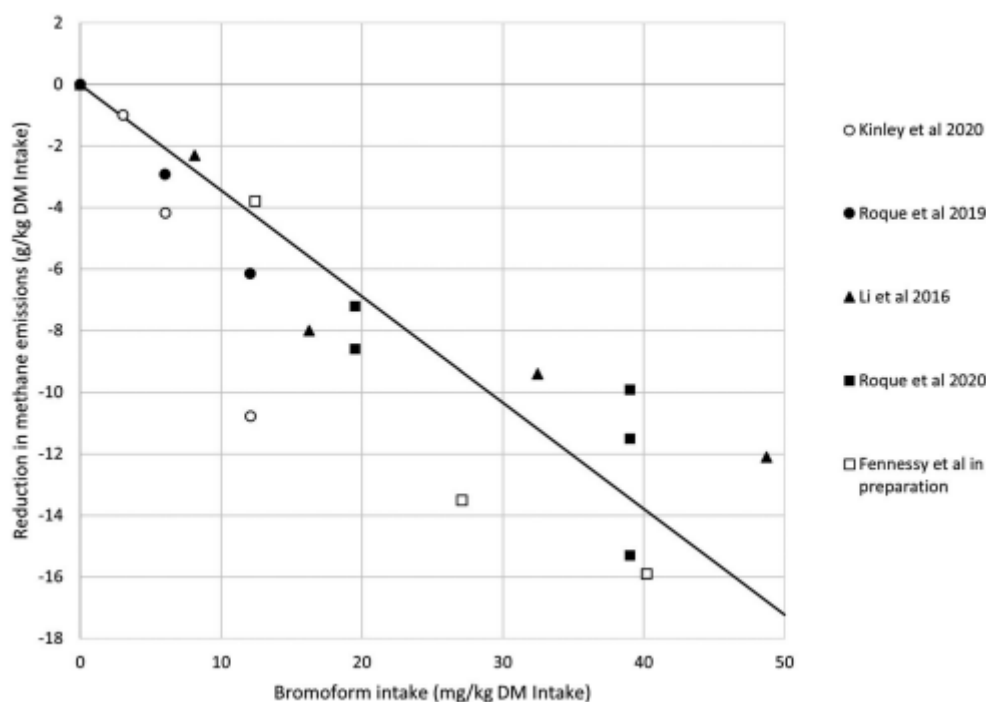


Figura 6. Relación entre la reducción de las emisiones de CH₄ y la cantidad de bromoformo ingerida (mg CHBr₃/kg IMS) según distintos estudios en los que se suplementó la dieta de rumiantes con *Asparagopsis* (Eason & Fennessy, 2023).

En los estudios *in vivo* que midieron las emisiones de H₂, la suplementación de *A. taxiformis* aumentó la producción de H₂ desde 234% hasta 1700%, según el nivel de inclusión (Kinley et al., 2020; Roque et al., 2021; Stefenoni et al., 2021). Además, la producción total de AGV no fue afectada negativamente con dosis de *A. taxiformis* por debajo del 2% de MO y el perfil de fermentación cambió hacia una mayor síntesis de propionato, de modo que la relación A:P fue reducida entre un 12% y un 45% (Kinley et al., 2020; Li et al., 2016; Stefenoni et al., 2021). Un elemento importante en varios estudios es que la suplementación dietética con *A. taxiformis* redujo la ingesta de alimento de manera dependiente de la dosis (Muizelaar et al., 2021; Roque et al., 2021; Stefenoni et al., 2021), pero no en todos (Kinley et al., 2020). *Asparagopsis taxiformis* aumentó (Kinley et al., 2020) o no afectó (Roque et al., 2021) la ganancia de masa corporal de novillos, aunque en ambos estudios la eficiencia alimentaria mejoró debido a la reducción de la IMS. La inclusión de *A. taxiformis* en la dieta no tuvo efectos sobre la calidad de la canal o de la carne (Kinley et al., 2020; Roque et al., 2021). Stefenoni et al. (2021)

observaron que la reducción de la IMS repercutió en la producción de leche, que disminuyó un 6,5% con la suplementación de *A. taxiformis* a 0,5% de MO.

Asparagopsis taxiformis puede obtenerse tanto de la cosecha en el mar como de la cría comercial en cultivo, con un número creciente de producciones aún en fase de desarrollo tanto en el hemisferio norte como en el sur. Su naturaleza hace que sea un inhibidor de la metanogénesis con un prometedor potencial de aplicación práctica en el futuro. Actualmente, el uso de *Asparagopsis* para la mitigación del CH₄ entérico está protegido por una patente controlada exclusivamente por la empresa FutureFeed (<https://www.future-feed.com/>) y los proveedores comerciales deben tener una licencia de FutureFeed para su explotación comercial. Además, su uso no entra en la categoría de aditivo zootécnico sino como ingrediente de la dieta, lo que quizás suponga una barrera para su implementación en la UE. Para que en el futuro el uso de *A. taxiformis* pueda ser implementado como estrategia de mitigación en todos los diferentes sistemas de producción de rumiantes, es esencial una mayor investigación para comprender cómo la dosificación, el contenido en CHBr₃ del alga o la dieta afectan la eficacia de *A. taxiformis*. En base a los resultados de los distintos estudios, se ha planteado que las tasas de inclusión de *A. taxiformis* no deben exceder el 1 % de MS, siendo ideales los niveles de 0,2-0,5% de MS (Hegarty et al., 2021). Sin embargo, ya se ha mencionado que la cuestión principal no es tanto el nivel de inclusión del alga, sino su contenido en CHBr₃. Concentraciones de CHBr₃ altas permitirán niveles de inclusión del alga en la dieta más bajos que no afecten negativamente la IMS, la eficiencia de conversión de alimento o la función ruminal (Min et al., 2021). Por ello, también es necesario estudiar las condiciones de preparación y almacenamiento del alga que minimicen la volatilización del CHBr₃, siendo hasta ahora el producto liofilizado el que ofrece más garantías. Por otro lado, Roque et al. (2021) sugirieron que el tipo de dieta influye en el potencial anti-metanogénico de *A. taxiformis* al observar una mayor reducción de la producción de CH₄ cuando el contenido de fibra en la dieta era menor.

Un aspecto fundamental para la aprobación de *Asparagopsis* como aditivo zootécnico es descartar la existencia de residuos de CHBr₃ en los tejidos y productos del animal que pueda representar un riesgo para la salud del consumidor. El CHBr₃ está clasificado por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) como posible carcinógeno humano, debido a que la exposición oral prolongada de animales a concentraciones elevadas de CHBr₃ puede causar tumores en el hígado (Glasson et al., 2022). Estudios

previos no observaron acumulación de CHBr_3 en tejidos animales o en la leche en vacuno (Kinley et al., 2020; Roque et al., 2019b; Stefenoni et al., 2021) con tasas de inclusión de *Asparagopsis* inferiores a 0.5% MS. Esto sugiere que el CHBr_3 puede ser metabolizado en el rumen. Por otro lado, un estudio reciente con altas tasas de inclusión de *A. taxiformis* y sin emplear animales de control sugirió que el CHBr_3 podría ser excretado en la orina y la leche en vacas lecheras (Muizelaar et al., 2021). Sin embargo, su concentración en la leche fue inferior a la mitad del nivel estándar de CHBr_3 en el agua potable según la EPA. Además, no se detectó CHBr_3 en la leche después de 10 días ofreciendo continuamente *A. taxiformis*, lo que plantea la posibilidad de que la adaptación microbiana pueda desempeñar un papel en la reducción del flujo de CHBr_3 a la leche. Al igual que para otros compuestos halogenados, la transferencia de CHBr_3 a productos alimenticios derivados de rumiantes está determinada en gran medida por su potencial de degradación o modificación en el entorno del rumen. Los metanógenos tienen la capacidad de metabolizar compuestos halogenados estructuralmente análogos del CH_4 en la naturaleza (Guo & Chen, 2018; Holliger et al., 1992; Jaun & Thauer, 2007) gracias a la MTR y especialmente a la MCR, que pueden des-halogenar de manera reductiva estos compuestos a CH_4 y otros intermediarios menos halogenados (Krone et al., 1989). Sin embargo, actualmente no existe literatura sobre el destino metabólico de compuestos bromados como el CHBr_3 en el sistema digestivo de los rumiantes. Se puede hipotetizar que su metabolismo en el rumen será similar al observado con la degradación anaerobia de hidrocarburos clorados *in vitro* en lodos (Van Eekert et al., 1998) y la des-halogenación reductiva del tetracloruro de carbono por suspensiones celulares de la arquea *Methanosarcina barkeri*, lo que genera cloroformo, cloruro de metileno, cloruro de metilo y CH_4 como intermediarios (Krone et al., 1989). Sin embargo, esta hipótesis de des-halogenación no ha sido aún demostrada experimentalmente en el caso del CHBr_3 de *Asparagopsis*.

5.4. Estrategias de mitigación basadas en la combinación de aditivos

Los aditivos que han demostrado una mayor eficacia reduciendo la producción de CH_4 (niveles de reducción superiores al 25%) son aquellos que se basan en la inhibición directa de la actividad o el crecimiento de las metanógenos del rumen (Leng, 2014). Sin embargo, la inhibición de la metanogénesis conduce a la acumulación de H_2 en el rumen que de otra manera sería utilizado por los metanógenos. El H_2 queda entonces disponible para

ser potencialmente redirigido hacia vías metabólicas alternativas que utilicen el H₂ para generar productos de fermentación como AGV (Ungerfeld, 2015). Esto explicaría el cambio en el perfil de fermentación hacia la producción de propionato (vía consumidora de H₂) que se ha observado de forma consistente con la suplementación de inhibidores de la metanogénesis en la dieta de los rumiantes (Martínez-Fernández et al., 2016; Melgar et al., 2020; Min et al., 2021; Yu et al., 2021). Sin embargo, la inhibición de la metanogénesis aumentó sustancialmente las emisiones de H₂ en los estudios en los que se midió. Esto indica que la comunidad microbiana del rumen no es capaz de redirigir el 100% del H₂ disponible hacia la síntesis de productos de fermentación aprovechables por el rumiante (Ungerfeld, 2020). Esta falta de beneficios productivos representa un claro hándicap que puede limitar la implementación de estrategias de mitigación basadas en aditivos anti-metanogénicos por parte de los ganaderos. Estas estrategias podrían ser optimizadas mediante la combinación de inhibidores de la metanogénesis con sustratos capaces de actuar como aceptores de H₂. Esto permitiría reducir las emisiones de CH₄ y, a su vez, redirigir el exceso de H₂ resultante hacia productos beneficiosos para el animal.

Tal y como se mencionó previamente, existen aditivos que promueven rutas metabólicas en el rumen que pueden competir con los metanógenos por el H₂ (McAllister & Newbold, 2008). La acetogénesis reductiva (Gagen et al., 2015), la propionogénesis (Janssen, 2010), la reducción de nitrato y sulfato, la biohidrogenación de ácidos grasos, la degradación de metabolitos orgánicos o la producción de biomasa microbiana han sido identificados como vías consumidoras de H₂ alternativas a la metanogénesis (Choudhury et al., 2022; Leng, 2014; Malik et al., 2015). Estas vías podrían ser favorecidas por la adición de ciertos aditivos en condiciones de inhibición de la metanogénesis ruminal (Ungerfeld et al., 2022). Sin embargo, no todas ellas promueven la síntesis de productos de fermentación aprovechables por el rumiante para obtener energía. Hasta la fecha, apenas existen estudios que hayan investigado la combinación de inhibidores de metanogénesis con compuestos que promuevan la redirección del H₂ hacia productos que potencialmente mejoren la eficiencia de la fermentación ruminal. Liu et al. (2022) y Thorsteinsson et al. (2023) estudiaron el efecto de combinar 3NOP y fumarato sobre la fermentación ruminal en condiciones *in vitro*, pero en ningún caso observaron una reducción de la concentración de H₂ ni un aumento de la síntesis de propionato o AGV totales por el efecto combinado de ambos aditivos. En cambio, Martínez-Fernández et al. (2017) demostraron que la suplementación con floroglucinol, un compuesto fenólico,

podía actuar como aceptor de electrones en condiciones de inhibición de la metanogénesis ruminal (utilizando cloroformo como inhibidor), favoreciendo grupos microbianos específicos y la síntesis adicional de AGV en el ganado vacuno. Estos resultados sugieren que el uso de inhibidores de la metanogénesis combinado con la adición de compuestos fenólicos podría reducir la producción de CH₄ en el rumen al tiempo que mejora la eficiencia de la fermentación ruminal.

5.4.1. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios de las plantas cuya estructura química se caracteriza por al menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo (Minatel et al., 2017). Este grupo incluye los taninos y los flavonoides, que pueden ser degradados en el rumen (**Figura 7**) por bacterias específicas liberándose sus constituyentes fenólicos (McSweeney et al., 2001; Smith et al., 2005). El principal compuesto resultante de la degradación de taninos hidrolizables es el ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico). Este puede ser descarboxilado a pirogalol (1,2,3-trihidroxibenceno), que a su vez puede ser transformado en resorcinol (1,3-dihidroxibenceno) o floroglucinol (1,3,5-trihidroxibenceno), que pueden ser transformables entre sí (Armstrong & Patel, 1994) o no (Lotfi, 2020). Los flavonoides también pueden ser convertidos en floroglucinol. Además, el floroglucinol puede ser reducido por bacterias ruminales con consumo de H₂ o formiato a dihidrofloroglucinol, que a continuación sufre una escisión hidrolítica dando lugar principalmente a acetato y en menor medida butirato (Krumholz & Bryant, 1986; Patel et al., 1981; Tsai et al., 1976).

Tsai & Jones (1975) aislaron 8 cepas de bacterias ruminales grampositivas capaces de degradar el floroglucinol, cinco pertenecientes a *Streptococcus bovis* y tres al género *Coprococcus*. Los cultivos anaerobios de *Streptococcus bovis* en un medio con líquido ruminal al 40% que contenía inicialmente 0.03 M de floroglucinol degradaron entre el 50% y el 80% del sustrato en 2 días, mientras que los cultivos de *Coprococcus* spp. degradaron más del 80% del sustrato en las mismas condiciones. En Sarwono et al. (2019), la suplementación de floroglucinol aumentó la abundancia relativa de *Coprococcus* spp. *in vitro*. Martínez-Fernández et al. (2017) obtuvieron el mismo resultado en vacuno. *Coprococcus* spp. no es capaz de convertir pirogalol a floroglucinol, pero puede reducir inicialmente 1 molécula de floroglucinol a dihidrofloroglucinol utilizando NADPH como donador de electrones, para luego producir 2 moléculas de

acetato y 2 moléculas de CO₂ (Patel et al., 1981; Tsai et al., 1976). Conradt et al. (2016) identificaron tres reductasas de floroglucinol pertenecientes a la familia de deshidrogenasas/reductasas NADPH involucradas en la degradación anaerobia de floroglucinol que implica una escisión hidrolítica de su anillo hacia el ácido 3-hidroxi-5-oxohexanoico y luego la formación de acetato. *Eubacterium oxidoreducens* es capaz de descarboxilar el ácido gálico a pirogalol y transformarlo en floroglucinol. Luego, utiliza 1 molécula de H₂ o formiato para catabolizar 1 molécula de floroglucinol y producir 2 moléculas de acetato y 0.5 molécula de butirato (Krumholz et al., 1987; Krumholz & Bryant, 1986) Se ha calculado una energía libre de Gibbs de -158 kJ/mol para la conversión de floroglucinol a acetato, lo que indica que es una reacción muy favorable desde el punto de vista termodinámico y se plantea que podría ocurrir incluso en las mismas condiciones que la metanogénesis hidrogenotrófica (Martinez-Fernandez et al., 2017).

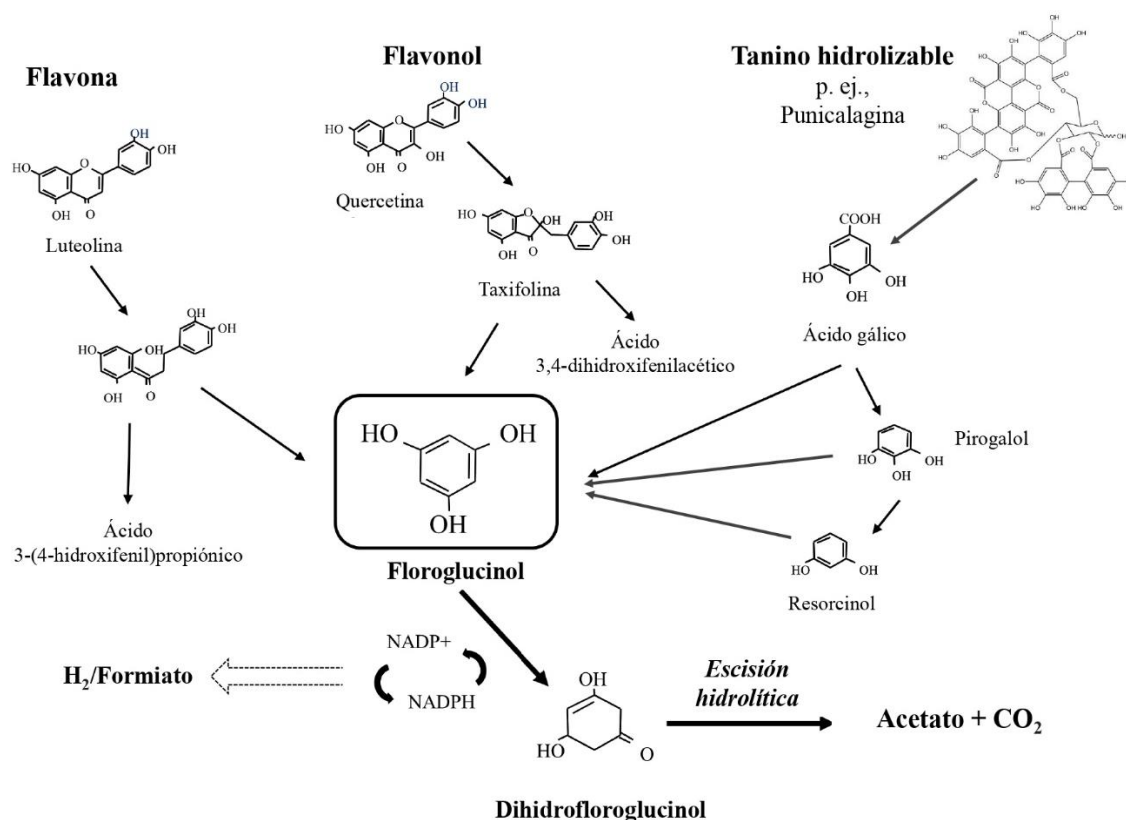


Figura 7. Rutas metabólicas de degradación de compuestos fenólicos en el rumen. Adaptado de Martinez-Fernandez et al. (2017).

OBJETIVOS

Objectives

A pesar del ingente interés que existe en desarrollar estrategias nutricionales a base de aditivos o suplementos para reducir la producción de CH₄ en rumiantes, el número de soluciones que puedan aplicarse a nivel práctico en la actualidad son muy limitadas. Una de las opciones que ha mostrado mayor potencial es la suplementación de la dieta con la macroalga roja *A. taxiformis*, que supone un tratamiento con una capacidad de reducir la metanogénesis de manera muy efectiva. Además, se trata de un material que se produce de manera natural en numerosos océanos del planeta, a diferencia de otros inhibidores de la metanogénesis de síntesis química. Sin embargo, la inhibición de la metanogénesis mediante el uso de este alga y de otros inhibidores potentes de la metanogénesis genera una acumulación de H₂ en el rumen que los microorganismos no son capaces de distribuir eficientemente hacia otras rutas metabólicas, de modo que no se producen cambios en el patrón de fermentación que potencialmente mejoren la productividad del rumiante. El efecto de reducción de la producción de CH₄ sin mejoras en la productividad del animal es un elemento que está limitando notablemente la implementación de medidas para la reducción de las emisiones de CH₄ en el sector ganadero. La investigación sobre aditivos que favorezcan la redirección del H₂ disponible tras la inhibición de la metanogénesis hacia la síntesis de metabolitos aprovechables por el rumiante es muy escasa y necesita mayor recorrido. Así, existen compuestos fenólicos que pueden ser reducidos por bacterias ruminales específicas a acetato, consumiendo H₂ en el proceso, por lo que se hipotetiza que podrían actuar como aceptores de H₂ y favorecer la síntesis de AGV. Sin embargo, en la actualidad no existen estrategias nutricionales desarrolladas en base a la suplementación combinada de un inhibidor de la metanogénesis con potencial uso práctico y un compuesto fenólico que mejoren la fermentación ruminal y la producción animal. Por otro lado, y a pesar de la evidencia que existe sobre la efectividad en reducir la metanogénesis, el uso de *A. taxiformis* como estrategia de mitigación requiere una mayor investigación de aspectos que aún se desconocen, como entender el patrón de degradación de su compuesto bioactivo CHBr₃ en el rumen y su interacción con la microbiota ruminal. Estos aspectos son fundamentales para que las autoridades sanitarias competentes finalmente aprueben su uso en la cadena de producción de alimentos.

En base a lo expuesto anteriormente, el **objetivo principal** de esta Tesis Doctoral consiste en desarrollar estrategias nutricionales que reduzcan la producción de CH₄ en rumiantes y que al mismo tiempo mejoren la eficiencia de la fermentación ruminal. Para abordarlo, se plantean los siguientes **objetivos específicos**:

- 1) Identificar las dosis adecuadas de *A. taxiformis* como inhibidor de la metanogénesis y de un rango de compuestos fenólicos como potenciales aceptores de H₂ que no comprometan la fermentación ruminal *in vitro*.
- 2) Evaluar el efecto del tratamiento combinado de *A. taxiformis* y compuestos fenólicos sobre la metanogénesis y la fermentación ruminal *in vitro* tras una adaptación de la microbiota.
- 3) Determinar en condiciones *in vitro* el efecto dosis-respuesta del compuesto fenólico más prometedor como aceptor de H₂ en combinación con *A. taxiformis* para optimizar su potencial.
- 4) Evaluar *in vivo* el efecto de la combinación más prometedora de *A. taxiformis* y compuesto fenólico sobre la producción de CH₄ y la fermentación ruminal en caprino.
- 5) Describir el patrón de degradación microbiana del CHBr₃ contenido en *A. taxiformis* y su impacto en la fermentación ruminal *in vitro* en función del tipo de dieta.
- 6) Evaluar el efecto dosis-respuesta de CHBr₃ en el crecimiento de cultivos puros de metanógenos del rumen.

Despite the significant interest in developing nutritional strategies based on additives or supplements to reduce CH₄ production in ruminants, the number of practical solutions currently available is very limited. One option that has shown great potential is supplementing the diet with the red macroalgae *A. taxiformis*, representing an effective treatment for reducing methanogenesis. Moreover, it is a plant-based material that naturally occurs in several oceans worldwide, unlike other chemically synthesised methanogenesis inhibitors. However, inhibiting methanogenesis using this seaweed and other potent methanogenesis inhibitors leads to an accumulation of H₂ in the rumen that microorganisms cannot efficiently redirect into other metabolic pathways. As a result, there are no changes in the fermentation pattern that could potentially improve ruminant productivity. The reduction in CH₄ production without improvements in animal productivity significantly hinders the implementation of such strategies to mitigate CH₄ emissions in the livestock sector. Research on additives that facilitate the redirection of excess H₂, generated after methanogenesis inhibition, toward the synthesis of metabolites beneficial for the ruminant is limited and needs further exploration. Phenolic compounds can be reduced by specific ruminal bacteria to acetate with H₂ consumption. Hence, it is hypothesized that they could act as H₂ acceptors, favouring the synthesis of volatile fatty acids. Currently, there are no nutritional strategies developed based on the combined supplementation of a practical methanogenesis inhibitor and a phenolic compound that improves ruminal fermentation and animal production. Additionally, despite evidence of its effectiveness in reducing methanogenesis, the use of *A. taxiformis* as a mitigation strategy requires further investigation into unknown aspects, such as understanding the degradation pattern of its bioactive compound CHBr₃ in the rumen and its interaction with rumen microbiota. These factors are essential for competent health authorities to finally approve its use in the food production chain.

In consideration of the preceding, the **main objective** of this Doctoral Thesis is to develop nutritional strategies that can reduce CH₄ production in ruminants while improving ruminal fermentation efficiency. To address this, the following **specific objectives** are proposed:

- 1) To identify the optimal doses of *A. taxiformis* as a methanogenesis inhibitor and a wide range of phenolic compounds as potential H₂ acceptors that do not compromise *in vitro* rumen fermentation.

- 2) To evaluate the combined treatment of *A. taxiformis* and phenolic compounds on methanogenesis and *in vitro* rumen fermentation after microbial adaptation.
- 3) To determine the dose-response effect of the most promising phenolic compound as H₂ acceptor in combination with *A. taxiformis* to optimise its potential under *in vitro* conditions.
- 4) To evaluate *in vivo* the effect of the most promising combination of *A. taxiformis* and phenolic compound on CH₄ production and rumen fermentation in goats.
- 5) To describe the microbial degradation pattern of CHBr₃ from *A. taxiformis* and its impact on *in vitro* rumen fermentation according to the type of diet.
- 6) To evaluate the dose-response effect of CHBr₃ on methanogens' growth in pure cultures.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para abordar los objetivos de esta Tesis Doctoral, se llevaron a cabo cuatro estudios tal y como se ilustra en la **Tabla 1**. El **Estudio 1** (Objetivos 1, 2 y 3) consistió en cuatro experimentos *in vitro* consecutivos con líquido ruminal de cabra en los que se evaluó el efecto de emplear distintos niveles del alga *A. taxiformis* con potencial anti-metanogénico (**Experimento 1.1**) y diferentes compuestos fenólicos que actúan como potenciales aceptores de H₂ (**Experimento 1.2**) sobre la producción de CH₄ y la fermentación ruminal. Posteriormente se evaluó los efectos de la combinación de ambas estrategias sobre una población microbiana adaptada (**Experimento 1.3**). El compuesto fenólico más prometedor como potencial aceptor de H₂ fue evaluado a distintas concentraciones en combinación con *A. taxiformis* para maximizar su potencial (**Experimento 1.4**).

En el **Estudio 2** (Objetivo 4) se investigó en cabras adultas los efectos derivados de combinar el inhibidor con el compuesto aceptor de H₂ más prometedor para reducir la metanogénesis y mejorar la eficiencia de la fermentación ruminal. El **Estudio 3** (Objetivo 5) consistió en una incubación *in vitro* para describir el patrón de degradación del CHBr₃ contenido en *A. taxiformis* en dos tipos de dieta y su impacto en la fermentación ruminal. Por último, en el **Estudio 4** (Objetivo 6) se emplearon cultivos puros de siete especies de metanógenos para determinar la sensibilidad de estos microorganismos en el rumen al CHBr₃.

Los animales utilizados en estos ensayos fueron manejados de acuerdo con las directrices españolas de Experimentación Animal (RD 53/2013) y los protocolos fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal de la EEZ-CSIC (A/18/03/2019/042).

Tabla 1. Relación entre los objetivos de esta Tesis Doctoral y los estudios y experimentos que se llevaron a cabo para abordarlos.

Objetivos	Estudio	Exp.
(1) Identificar las dosis adecuadas de <i>A. taxiformis</i> como inhibidor de la metanogénesis y de un rango de compuestos fenólicos como potenciales aceptores de H ₂ que no comprometan la fermentación ruminal <i>in vitro</i>	1	1.1 1.2
(2) Evaluar el efecto del tratamiento combinado de <i>A. taxiformis</i> y compuestos fenólicos sobre la metanogénesis y la fermentación ruminal <i>in vitro</i> tras una adaptación de la microbiota.	1	1.3
(3) Determinar en condiciones <i>in vitro</i> el efecto dosis-respuesta compuesto fenólico más prometedor como aceptor de H ₂ en combinación con <i>A. taxiformis</i> para optimizar su potencial.	1	1.4
(4) Evaluar <i>in vivo</i> el efecto de la combinación más prometedora de <i>A. taxiformis</i> y compuesto fenólico sobre la producción de CH ₄ y la fermentación ruminal en caprino.	2	
(5) Determinar el patrón de degradación microbiana del CHBr ₃ contenido en <i>A. taxiformis</i> y su impacto en la fermentación ruminal <i>in vitro</i> en función del tipo de dieta.	3	
(6) Evaluar el efecto dosis-respuesta de CHBr ₃ en el crecimiento de cultivos puros de metanógenos del rumen.	4	

Estudio 1. Evaluación del efecto de los compuestos fenólicos como aceptores de hidrógeno cuando se inhibe la metanogénesis ruminal *in vitro*.

Experimentos 1.1 y 1.2. Selección de niveles de inclusión de *Asparagopsis taxiformis* y compuestos fenólicos que no comprometan la fermentación ruminal

En primer lugar, se llevaron a cabo dos experimentos *in vitro* utilizando un sistema de cultivos no renovados de contenido ruminal con una duración de 24 h cada uno (**Figura 8**). En el **Experimento 1.1** se evaluó el efecto dosis-respuesta de *A. taxiformis* (0, 1, 2, 3, 4 y 5% del sustrato en MS) y BES como inhibidor modelo (0, 4, 8, 12, 16 y 20 μM) sobre la fermentación ruminal. Para la incubación, se utilizaron un total de 48 botellas Wheaton (viales de vidrio) según el siguiente diseño: 2 inhibidores (*A. taxiformis* y BES) \times 6 dosis \times 4 réplicas experimentales consistente en diferentes inóculos ($n=4$). El tratamiento control se consideró la ausencia de inhibidor (dosis 0). Se utilizó heno de alfalfa y grano de cebada como sustrato de las incubaciones. Los ingredientes fueron previamente molidos con un molino (220 v, type WRB 90 Lb/4P, Dietz-motoren KG, Electromotorenfabrik, Dettingen unter Teck, Alemania), pasando a través de un tamiz de 1 mm² de poro. El alga *A. taxiformis* se obtuvo de SeaExpert (Faial, Portugal) y su concentración de CHBr₃ fue de 6 mg/g de la MS de la biomasa. Fue liofilizada y molida 2 \times 30 s con un molino de laboratorio (IKA All analytical mill, Staufen, Alemania), pasando a través de un tamiz de 1 mm² de poro, con un intervalo de 30 s entre ciclos para enfriar el molino. Además, el equipo del molino se enfrió previamente en nitrógeno líquido para evitar el sobrecalentamiento y el daño potencial de la integridad química del alga. El alga molida se almacenó a 4 °C en un desecador hasta su posterior uso. El compuesto BES se obtuvo de Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Se preparó una solución madre de BES 10 M que fue almacenada a 4 °C. La MS, MO, proteína bruta (PB), extracto etéreo (EE), fibra en detergente neutro (FDN), fibra en detergente ácido (FDA) y lignina detergente en ácido (LDA) de los ingredientes del sustrato (alfalfa y cebada) y *A. taxiformis* utilizados en el Estudio 1 se detalla en la **Tabla 2**.

En el **Experimento 1.2** se investigó el efecto dosis-respuesta de siete compuestos fenólicos (fenol, catecol, resorcinol, hidroquinona, floroglucinol, pirogalol y ácido gálico) y ácido fórmico a diferentes concentraciones (0, 2, 4 y 6 mM) sobre la fermentación ruminal. Para ello se utilizaron un total de 128 botellas Wheaton en función del siguiente

diseño: 8 compuestos fenólicos \times 4 dosis \times réplicas experimentales (n=4). En este caso, el tratamiento control se consideró la ausencia de compuesto fenólico (dosis 0).

Las incubaciones realizadas en los Experimentos 1.1 y 1.2 siguieron el protocolo descrito por Yáñez-Ruiz et al. (2016). Se obtuvo líquido ruminal de cuatro cabras Murciano-Granadinas adultas (n=4) canuladas en el rumen, que previamente se habían adaptado durante más de 3 semanas a una dieta compuesta por un 70% de heno de alfalfa y un 30% de grano de cebada en términos de MS. El contenido ruminal fue extraído en ayunas, filtrado través de una gasa de doble capa y mezclado con una solución tampón precalentada (0,35 g/L de NaHCO₃ y 0,04 g/L de NH₄HCO₃; Mould et al., 2005) en una proporción 1:2. Posteriormente volúmenes de 50 mL del medio de cultivo tamponado fueron dispensados anaerómicamente en botellas Wheaton de 120 mL. Cada botella contenía 0,5 g de MS del sustrato (70:30 alfalfa y cebada sobre MS). Tras dispensar el medio en las botellas, estas fueron selladas, agitadas suavemente y colocadas en una incubadora a 39 °C durante 24 h. La presión del gas en el espacio de cabeza de las botellas fue medida a las 6 y 24 h, utilizando un medidor de presión de amplio rango (Sper Scientific LTD, Scottsdale, Arizona, EE. UU.) y el gas acumulado en el espacio de cabeza fue liberado tras cada medición. Además, se tomaron muestras de gas en bolsas herméticas de PVDF estándar (Cole-Parmer Kynar, Vernon Hills, Illinois, EE. UU.) para el análisis de CH₄ y H₂. El contenido de cultivo también fue muestreado a las 24 h y dividido en dos submuestras: la primera muestra (0,8 mL) fue diluida con 0,8 mL de una solución ácida (HCl 0,5 N, 20 g/L de ácido metafosfórico con 0,8 g/L de ácido crotónico como patrón interno) y almacenada a -20 °C para la determinación de AGV. La segunda muestra (1,6 mL) fue diluida con 0,4 mL de solución de tricloroacetato (250 g/L) y almacenada a -20 °C para el análisis de lactato y amoníaco. El pH de los cultivos fue determinado al principio y al final del proceso.

Tabla 2. Composición química de los ingredientes del sustrato (alfalfa y cebada) y de *Asparagopsis taxiformis* usados en el Estudio 1.

Nutrientes, g/kg MS	Alfalfa	Cebada	<i>A. taxiformis</i>
MS	884	905	877
MO	901	975	460
PC	174	134	146
EE	13,7	20,1	2,1
FDN	428	285	194
FDA	303	67,8	66,5
LDA	62,9	8,7	15,3

MS: Materia seca; MO: Materia orgánica; PC: proteína cruda; EE: Extracto etéreo; FDN: Fibra en detergente neutro; FDA: Fibra en detergente ácido; LDA: Lignina en detergente ácido.

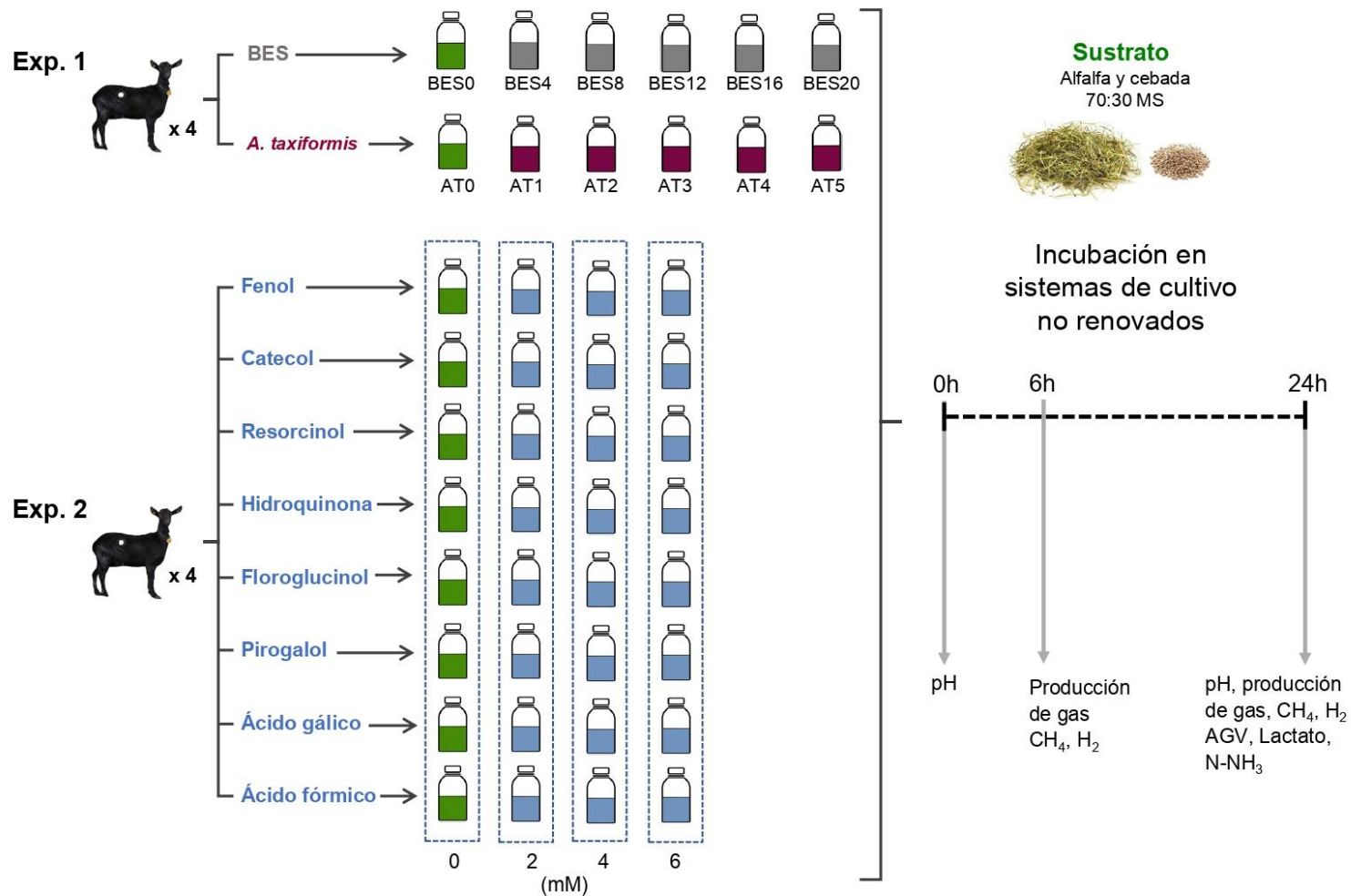


Figura 8. Diseño experimental correspondiente a los Experimentos 1.1 y 1.2 del Estudio 1. BES: 2-bromoetanosulfonato a diferentes concentraciones: 0 (BES0), 4 (BES4), 8 (BES8), 12 (BES12), 16 (BES16), 20 μ M (BES20). AT: *Asparagopsis taxiformis* a diferentes concentraciones: 0 (AT0), 1 (AT1), 2 (AT2), 3 (AT3) 4 (AT4) y 5% MS (AT5); AGV: ácidos grasos volátiles.

Experimento 1.3. Efecto del tratamiento combinado de *Asparagopsis taxiformis* y compuestos fenólicos *in vitro* tras una adaptación de la microbiota

En base a las observaciones realizadas en los Experimentos 1.1 y 1.2, en el **Experimento 1.3** se procedió a evaluar el efecto sobre la fermentación ruminal de combinar *A. taxiformis* al 2% de la MS del sustrato con cada uno de los ocho compuestos fenólicos a una dosis de 6 mM (**Figura 9**). Para ello, se incubaron 68 botellas Wheaton según el siguiente diseño: 8 compuestos fenólicos combinados con *A. taxiformis* al 2% de la MS del sustrato \times 2 dosis del compuesto fenólico (0 y 6 mM), además de una botella únicamente con sustrato solo para cada inóculo animal (n=4). El tratamiento solo con *A. taxiformis* (equivalente al tratamiento con compuesto fenólico a dosis 0 mM) fue considerado como control.

La microbiota ruminal requiere un periodo de adaptación a la presencia de compuestos fenólicos para facilitar su degradación (Theodorou et al., 1987). Sin embargo, los cultivos *in vitro* no renovados están recomendados para un tiempo máximo de incubación de 72 h, ya que tiempos más prolongados resultan en una acidificación del medio por acumulación de AGV y el sustrato se vuelve limitante (Yáñez-Ruiz et al., 2016). Para permitir la adaptación de la microbiota a los compuestos fenólicos se utilizó el método de cultivos no renovados descrito previamente, pero prolongado en el tiempo de forma secuencial (Castro-Montoya et al., 2015; Gascoyne & Theodorou, 1988; Theodorou et al., 1984), lo que permitió extender el experimento hasta 5 días de duración. Este modelo secuencial consistió en transferir diariamente con una jeringa un tercio del volumen de incubación (16,7 mL) a una nueva botella con 33,3 mL de tampón fresco y 0,5 g de sustrato MS (70:30 alfalfa y cebada sobre MS). Asimismo, con cada transferencia se añadió una nueva dosis de compuesto fenólico a la botella correspondiente. La dosis de *A. taxiformis* no se añadió al sustrato de las botellas hasta la última transferencia (día 4). El gas en el espacio de cabeza de las botellas se midió y se liberó a las 6 h y 24 h después de cada transferencia. Al quinto día de incubación, se tomaron muestras del gas del espacio de cabeza para el análisis de CH₄ e H₂, y del contenido del cultivo para la determinación de AGV, lactato y amoníaco, tal y como se describió para los experimentos anteriores.

Experimento 1.4. Efecto dosis-respuesta del floroglucinol en combinación con *Asparagopsis taxiformis* *in vitro* tras una adaptación de la microbiota

A partir de los resultados obtenidos en el Experimento 1.3, floroglucinol fue seleccionado como el compuesto fenólico con mayor potencial como aceptor de H₂ en condiciones de inhibición de la metanogénesis y de adaptación de la microbiota al compuesto. En el **Experimento 1.4** se realizó una incubación secuencial *in vitro* de 5 días (**Figura 9**) con el fin de determinar la dosis máxima a la que el floroglucinol puede incorporarse al medio para maximizar su capacidad de capturar H₂ sin comprometer la actividad microbiana ruminal. Para ello, el floroglucinol se evaluó en dosis crecientes (0, 6, 16, 26 y 36 mM) y se utilizó un total de 24 botellas Wheaton según el siguiente diseño: floroglucinol combinado con *A. taxiformis* al 2% MS × 5 dosis de floroglucinol, además de una botella solo con sustrato para cada inóculo animal (n=4). El tratamiento solo con *A. taxiformis* (equivalente al tratamiento con floroglucinol a dosis 0 mM) fue considerado como control. Esta incubación de cultivos secuenciales siguió el mismo método detallado en el Experimento 3. Adicionalmente se recogió 1 mL del contenido de cada cultivo 24 h después de la última transferencia. Estas muestras se centrifugaron a 16.000 g durante 15 min a 4 °C. Posteriormente, se eliminó el líquido sobrenadante y se conservó el pellet a -20 °C con el propósito de llevar a cabo la extracción del ADN genómico.

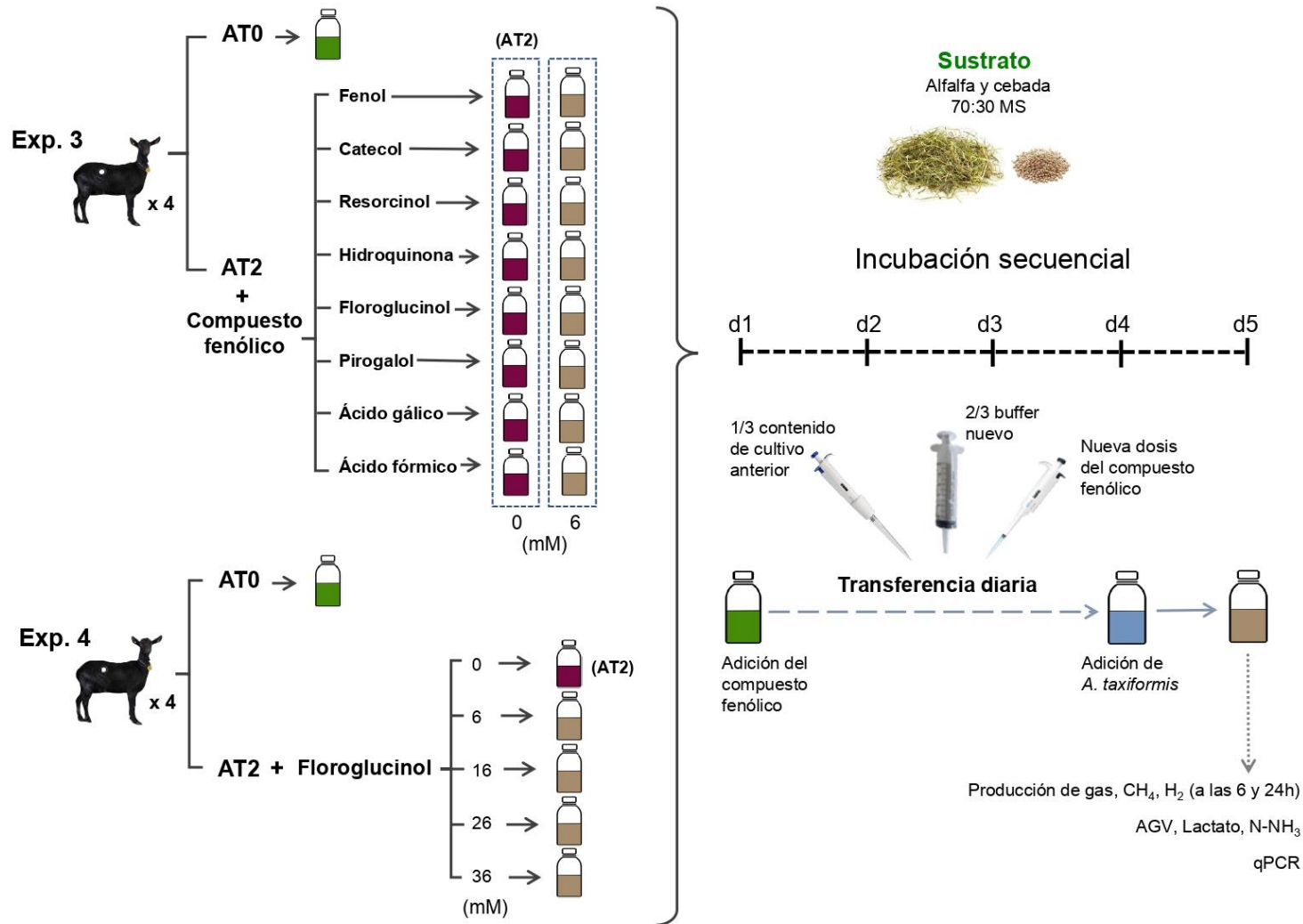


Figura 9. Diseño experimental correspondiente a los Experimentos 1.3 y 1.4 del Estudio 1. AT0: *Asparagopsis taxiformis* a 0% MS (solo sustrato); AT2: *A. taxiformis* a 2% MS; AGV: ácidos grasos volátiles.

Estudio 2. Evaluación de los efectos de combinar *Asparagopsis taxiformis* y floroglucinol sobre la producción de metano y la fermentación ruminal en caprino

Tras el estudio *in vitro* del floroglucinol como aceptor de H⁺ en condiciones de inhibición de la metanogénesis (Estudio 1), se procedió a evaluar la combinación de *A. taxiformis* y floroglucinol como estrategia nutricional para mitigar la producción de CH₄ y a la vez mejorar la eficiencia de la fermentación ruminal en condiciones *in vivo* (**Estudio 2**). En este estudio (**Figura 10**) se utilizaron ocho cabras Murciano-Granadinas adultas no gestantes con un PV medio de 40,8±1,8 kg como animales experimentales. Las cabras permanecieron estabuladas en las instalaciones de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC) de Granada (España) durante todo el ensayo. Las cabras fueron asignadas aleatoriamente a uno de los cuatro tratamientos experimentales definidos según un diseño de un doble cuadrado latino 4 × 4, con una disposición factorial 2 × 2 de los tratamientos: dos niveles de *A. taxiformis* (0 vs 0,5% MS; AT- y AT+, respectivamente) y dos niveles de floroglucinol (0 vs 2% MS; PG- y PG+, respectivamente). Así pues, se consideraron cuatro tratamientos: a) dieta basal (AT-PG-); b) *A. taxiformis* al 0,5% de la MS de la dieta (AT+PG-); c) floroglucinol al 2% MS (AT-PG+); y d) la combinación de *A. taxiformis* y floroglucinol (AT+PG+). La dosis de floroglucinol elegida se basó en los resultados del Experimento 1.4. Se estimó que la administración de floroglucinol al 2% de la MS de la dieta equivale a una concentración ruminal de 40 mM (considerándose una IMS de 1 kg/d y un volumen medio del rumen de 4 L para pequeños rumiantes no lactantes; Moyo & Nsahlai, 2018), similar a la concentración óptima de 36 mM determinada *in vitro*. En cambio, se utilizó una dosis de *A. taxiformis* menor que la usada *in vitro* (2% MS *in vitro* vs 0,5% MS *in vivo*), de acuerdo con estudios anteriores (Hegarty et al., 2021). La razón de esta reducción responde a que dosis por encima de 0,5% podrían resultar en una disminución de la ingesta de materia seca del animal. Además, se utilizó un lote diferente de *A. taxiformis* al empleado *in vitro*. En esta ocasión, el alga se obtuvo de Blue Ocean Barns (Kailua-Kona, Hawái, EE. UU.), su concentración de CHBr₃ era de 5 mg/g de la MS de la biomasa y recibió el mismo proceso de preparación descrito anteriormente. El floroglucinol anhidro (99% de pureza) fue obtenido de MBL LAB CÓRDOBA SL (Córdoba, España; 99% de pureza) y la formulación se preparó como polvo blanco seco en lotes de 6 kg. A lo largo del experimento, todas las cabras tuvieron libre acceso a agua potable y se alimentaron con la misma dieta basal (**Tabla 3**) consistente en 700 g/d de

heno de alfalfa y 300 g/d de grano de cebada en términos de MS para mantener un mismo plano de alimentación. El heno de alfalfa fue picado a 15-20 cm. La dieta se ofreció en dos tomas diarias, una a las 0900 h y otra a las 1400 h. Las dosis de *A. taxiformis*, floroglucinol y la combinación de ambos compuestos se mezclaron con grano de cebada molido (20 g) de la dieta basal y se administraron oralmente en dos tomas, coincidiendo con los momentos de ofrecimiento de la dieta. Para ello se utilizó una jeringa abierta. Los animales del grupo AT-PG- recibieron 20 g de cebada con el mismo procedimiento.

Tabla 3. Composición química de los ingredientes de la dieta (alfalfa y cebada) y de *Asparagopsis taxiformis* usados en el Estudio 2.

Nutrientes, g/kg MS	Alfalfa	Cebada	<i>A. taxiformis</i>
MS	904	909	924
MO	895	907	788
PC	148	106	393
EE	9,01	19,5	3,59
FDN	566	296	424
FDA	423	60,8	112
LDA	314	8,26	79,4

MS: Materia seca; MO: Materia orgánica; PC: proteína cruda; EE: Extracto etéreo; FDN: Fibra en detergente neutro; FDA: Fibra en detergente ácido; LDA: Lignina en detergente ácido.

Cada periodo experimental duró un total de 14 días y consistió en 10 días de adaptación a los tratamientos, seguido de 3 días de mediciones de CH₄ y H₂, y un día de recogida de líquido ruminal. Durante el periodo de adaptación, los animales se alojaron en corrales individuales para controlar su IMS. Al igual que en el ensayo *in vitro*, se favoreció la adaptación de la microbiota ruminal a la presencia del floroglucinol para facilitar su degradación (Theodorou et al., 1987). En este caso, el floroglucinol se administró en dosis crecientes durante los tres primeros días (0,5, 1 y 1,5% MS en los días 1, 2 y 3 de cada periodo, respectivamente) y, a partir del día 4, se administraron las dosis completas de floroglucinol (2% MS) y *A. taxiformis* (0,5% MS) a las cabras asignadas a los tratamientos correspondientes. Durante los días 11, 12 y 13, los animales fueron confinados en cámaras de respiración de circuito abierto para cuantificar las emisiones entéricas de CH₄ y H₂. Cada animal fue asignado a la misma cámara en todos los periodos para minimizar la variabilidad intra-animal. Se registró diariamente la IMS de cada animal, así como la temperatura, la humedad, la concentración de CO₂ y la tasa de renovación del aire dentro de cada cámara de respiración. El día 14, los animales fueron reubicados en corrales individuales y alimentados a las 0900 h, junto con la administración de los tratamientos. A las 3 h tras la alimentación, se extrajo el contenido del rumen mediante intubación orogástrica como se describe en Belanche et al. (2020b).

Las muestras de rumen (aproximadamente 60 ml por animal) se filtraron a través de una gasa estéril (1 mm de tamaño de poro) y las submuestras se almacenaron a -20 °C para el análisis de lactato y AGV, y a -80 °C para la extracción de ADN y cuantificación de los principales grupos microbianos. Las cabras se pesaron en una balanza digital (Bosche GmbH y Co. KG, Damme, Alemania) al principio y al final de cada periodo experimental.

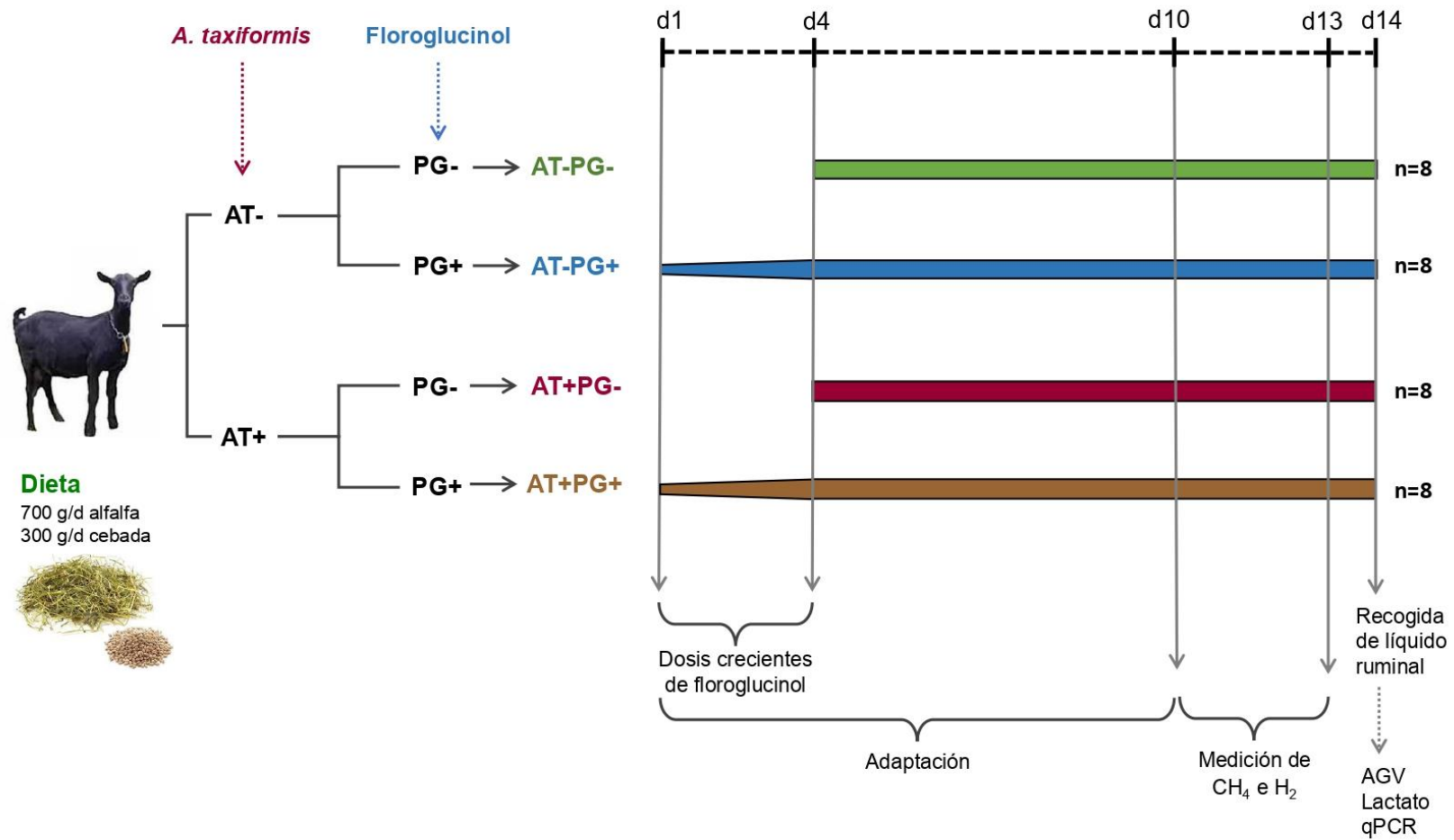


Figura 10. Diseño experimental correspondiente al Estudio 2. AT-: *Asparagopsis taxiformis* a 0% MS; AT+: *A. taxiformis* a 5% MS; PG-: Floroglucinol a 0% MS; PG+: Floroglucinol a 2% MS; AGV: ácidos grasos volátiles.

Estudio 3. Determinación del patrón de degradación microbiana del bromoformo contenido en *Asparagopsis taxiformis* y su impacto en la fermentación ruminal en función del tipo de dieta

Para estudiar la cinética de degradación del CHBr_3 presente de forma natural en *A. taxiformis* en el ecosistema microbiano del rumen (**Estudio 3**), se llevó a cabo una incubación *in vitro* de cultivos no renovados (Yáñez-Ruiz et al., 2016) a diferentes tiempos (entre 0,5 y 72 h) (**Figura 11**). El líquido ruminal se obtuvo de cinco terneros de raza Limousine, de 12 a 14 meses de edad, procedentes del matadero comercial El Durqueño en Santa Fe, Granada (España). Una vez obtenido, el contenido ruminal fue filtrado, mezclado con solución tamponada y dispensado en botellas Wheaton de 120 mL tal y como se describió para los Experimentos 1.1 y 1.2. Se utilizó dos tipos de sustrato de fermentación que diferían en la proporción forraje:concentrado: 1) un sustrato con alta proporción de concentrado (HC; heno de alfalfa y grano de cebada en una proporción de 30:70 en MS) para promover una tasa de fermentación rápida; y 2) un sustrato con alta proporción de forraje (HF; heno de alfalfa y grano de cebada en una proporción de 70:30 en MS) para promover una tasa de fermentación microbiana más lenta y sostenida. Además, para cada sustrato se consideró la inclusión o no de *A. taxiformis*: 1) *A. taxiformis* suplementada al 0% del sustrato en base a MS (NO); y 2) *A. taxiformis* suplementada al 2% del sustrato en base a MS (AT2). El objetivo de utilizar dos sustratos diferentes fue evaluar si las distintas dietas y tasas de fermentación podían afectar al patrón de degradación del CHBr_3 . Se empleó la misma tasa de inclusión (2% MS) y el mismo lote de *A. taxiformis* que en el Experimento 1.1. La composición química de los ingredientes del sustrato (alfalfa y cebada) y de *A. taxiformis* se presenta en la **Tabla 4**.

Para cada combinación de dos factores (NO-HC, NO-HF, AT2-HC, AT2-HF) y por cada inóculo animal (n=5), se incubó un set de 11 botellas Wheaton, cada una correspondiente a un tiempo de muestreo (0, 0,5, 1, 3, 6, 8, 12, 16, 24, 48 y 72 h) dado que la apertura y muestreo de la botella implicaba su inhabilitación para continuar la incubación a tiempos más largos. Esto resultó en un total de 220 botellas Wheaton incubadas. En cada tiempo de muestreo, se midió la presión del gas en el espacio de cabeza, se recogió todo el gas y se muestreó el contenido de cultivo de las botellas Wheaton correspondientes a dicho tiempo de muestreo. La presión del gas en el espacio de cabeza se midió con un medidor de presión de amplio rango (Sper Scientific LTD, Scottsdale, Arizona, EE. UU.) y todo

el volumen de gas del espacio de cabeza se recogió en bolsas herméticas de PVDF de 250 mL (Cole-Parmer Kynar, Vernon Hills, Illinois, EE. UU.) para los análisis de CH₄ y H₂. Para garantizar la recogida completa del gas del espacio de cabeza, se utilizó una jeringa conectada al transductor de presión para extraer el gas hasta que la presión dentro del espacio de cabeza de la botella se igualaba con la presión atmosférica. El gas del espacio de cabeza de las botellas restantes se liberó a cada tiempo hasta que llegó el momento de ser muestreadas. Un volumen de 10 mL de cada contenido de incubación fue recogido en viales para cromatografía de gases-espectrometría de masas (Thermo Fisher Scientific, Rockwood, Tennessee, EE. UU.) para cuantificar la concentración de compuestos halogenados (CHBr₃ y CH₂Br₂). Además, se recogieron 0,8 mL del contenido líquido de las botellas incubadas durante 72h, y se diluyeron en 0,8 mL de una solución ácida (HCl 0,5N, 20 g/L de ácido metafosfórico que contenía 0,8 g/L de ácido crotónico como patrón interno) para determinar la concentración de AGV. Todas las muestras se almacenaron a -20 °C inmediatamente después de ser tomadas.

Tabla 4. Composición química de los ingredientes de la dieta (alfalfa y cebada) y de *Asparagopsis taxiformis* usados en el Estudio 3.

Nutrientes, g/kg MS	Alfalfa	Cebada	<i>A. taxiformis</i>
MS	904	909	924
MO	895	907	788
PC	148	106	393
EE	9,01	19,5	3,59
FDN	566	296	424
FDA	423	60,8	112
LDA	314	8,26	79,4

MS: Materia seca; MO: Materia orgánica; PC: proteína cruda; EE: Extracto etéreo; FDN: Fibra en detergente neutro; FDA: Fibra en detergente ácido; LDA: Lignina en detergente ácido.

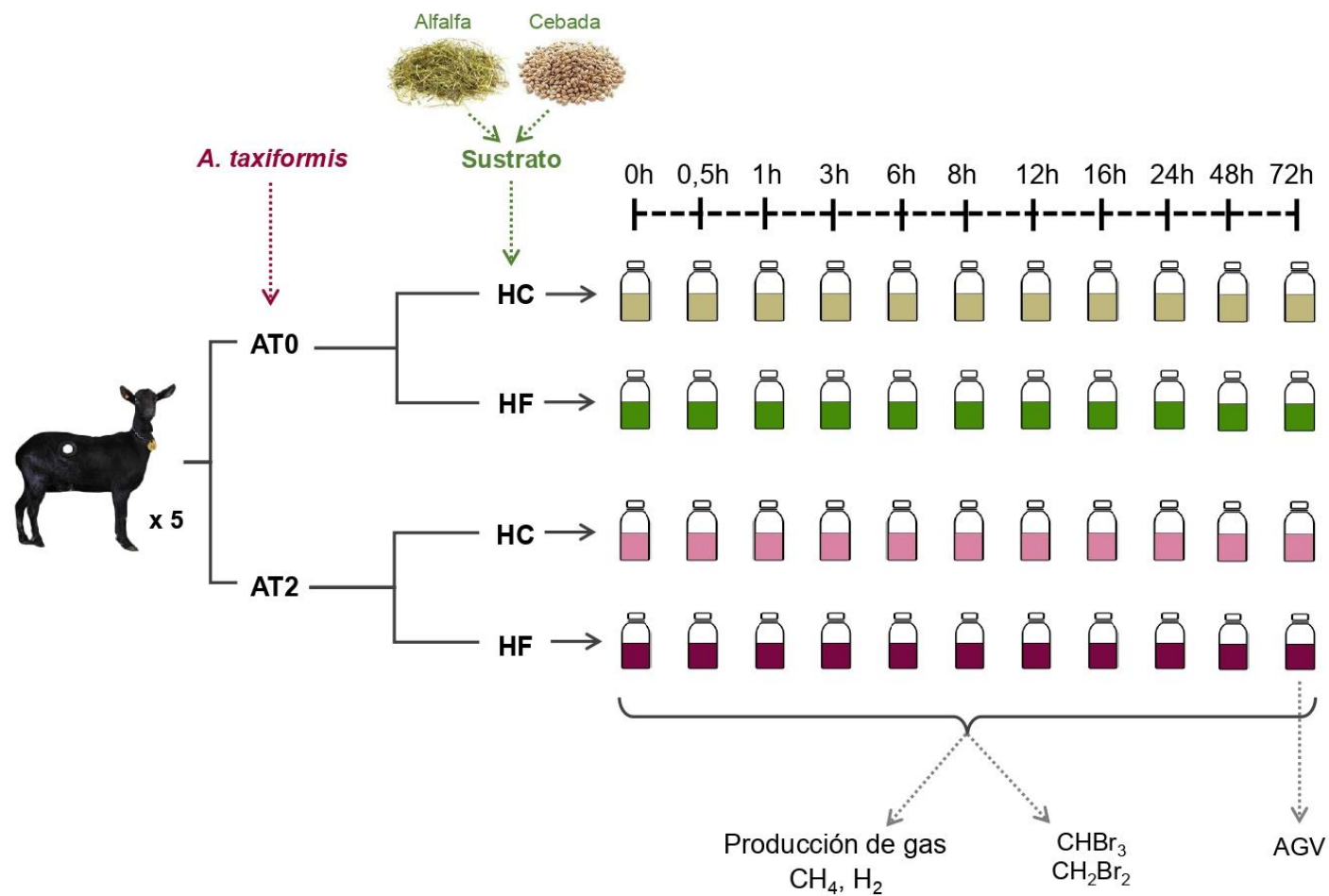


Figura 11. Diseño experimental correspondiente al Estudio 3. AT0: *Asparagopsis taxiformis* a 0% MS (solo sustrato); AT2: *A. taxiformis* a 2% MS; HC: sustrato alto en concentrado (alfalfa y cebada 30:70 en MS); HF: sustrato alto en forraje (heno y cebada 70:30 en MS); CHBr₃: bromoformo; CH₂Br₂: dibromometano; AGV: ácidos grasos volátiles.

Estudio 4. Evaluación del efecto del bromoformo en el crecimiento de cultivos puros de metanógenos del rumen

Con el fin de determinar la sensibilidad de los principales metanógenos del rumen al bromoformo (**Estudio 4**), se incubaron cultivos puros de seis cepas de metanógenos ruminales (*Methanobrevibacter smithii* DSM 861, *Methanobrevibacter ruminantium* DSM 1093, *Methanosphaera stadtmanae* DSM 3091, *Methanosarcina barkeri* DSM 800, *Methanobrevibacter millerae* DSM 16643 y *Methanobacterium mobile* DSM 1539) y *Methanothermobacter wolfei* DSM 2970 (metanógeno no ruminal utilizado como especie modelo en numerosos trabajos), en presencia de CHBr_3 (**Figura 12**). Las cepas fueron adquiridas de la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares de DSMZ (<https://www.dsmz.de>). Estas especies se seleccionaron para representar algunos de los metanógenos más abundantes en el rumen, abarcando los principales clados filogenéticos (Snelling et al., 2014). Los cultivos de metanógenos se llevaron a cabo en tubos Hungate de 12 mL, utilizando medios y condiciones de crecimiento conforme a las indicaciones proporcionadas por DSMZ para microorganismos anaeróbicos. Los medios de cultivo (119, 120, 161, 322), con descripciones detalladas disponibles en la página web de DSMZ (www.dsmz.de), se prepararon de manera aséptica en una cámara de anaerobiosis, bajo una atmósfera compuesta por 80% de H_2 y 20% de CO_2 (Whitley DG250 Anaerobic Workstation, Don Whitley Scientific Limited, West Yorkshire, Reino Unido). Para la inoculación, las ampollas con los diferentes cultivos puros se manipularon dentro de la misma cámara anaeróbica y bajo la misma atmósfera de 80% H_2 y 20% CO_2 , según las especificaciones de DSMZ. Para cada cepa, se evaluaron los siguientes tratamientos: no inhibidor (NOINHB; ningún compuesto aplicado), 100 μM de BES como inhibidor de referencia, y concentraciones crecientes de CHBr_3 (0,4; 2, 10 y 50 μM). El rango de dosis se determinó de manera que incluyera la tasa de inclusión de *A. taxiformis* utilizada en los Estudios 1 y 3 (2% de la MS del sustrato, lo que equivale a una concentración de 40 μM en el medio de cultivo). Los compuestos BES y CHBr_3 fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y se prepararon como soluciones de 100 y 50 μM , respectivamente. Dichas soluciones se almacenaron a 4 °C.

Los cultivos se incubaron durante 17 días y se aplicaron los tratamientos correspondientes en el día 2 para garantizar que los cultivos estaban en fase activa de crecimiento. Se realizaron tres incubaciones consecutivas (n=3) con duplicados analíticos para cada

tratamiento que se promediaron. Para garantizar condiciones anaeróbicas y óptimo crecimiento de los cultivos, se llevó a cabo una presurización de los tubos con una mezcla de gas H_2/CO_2 en la cámara anaeróbica hasta alcanzar una presión de 1 bar en su espacio de cabeza. Los tubos fueron dispuestos en posición horizontal dentro de una cámara de incubación que operaba a 37 °C, con una agitación constante a 120 rpm, y se mantuvieron en la oscuridad. En los días 2, 5, 7, 9, 12, 15 y 17 de incubación, se extrajeron muestras de 0,5 mL del gas producido para analizar la concentración de CH_4 . La producción de CH_4 fue utilizada para monitorizar el crecimiento de los metanógenos (Balch & Wolfe, 1976).

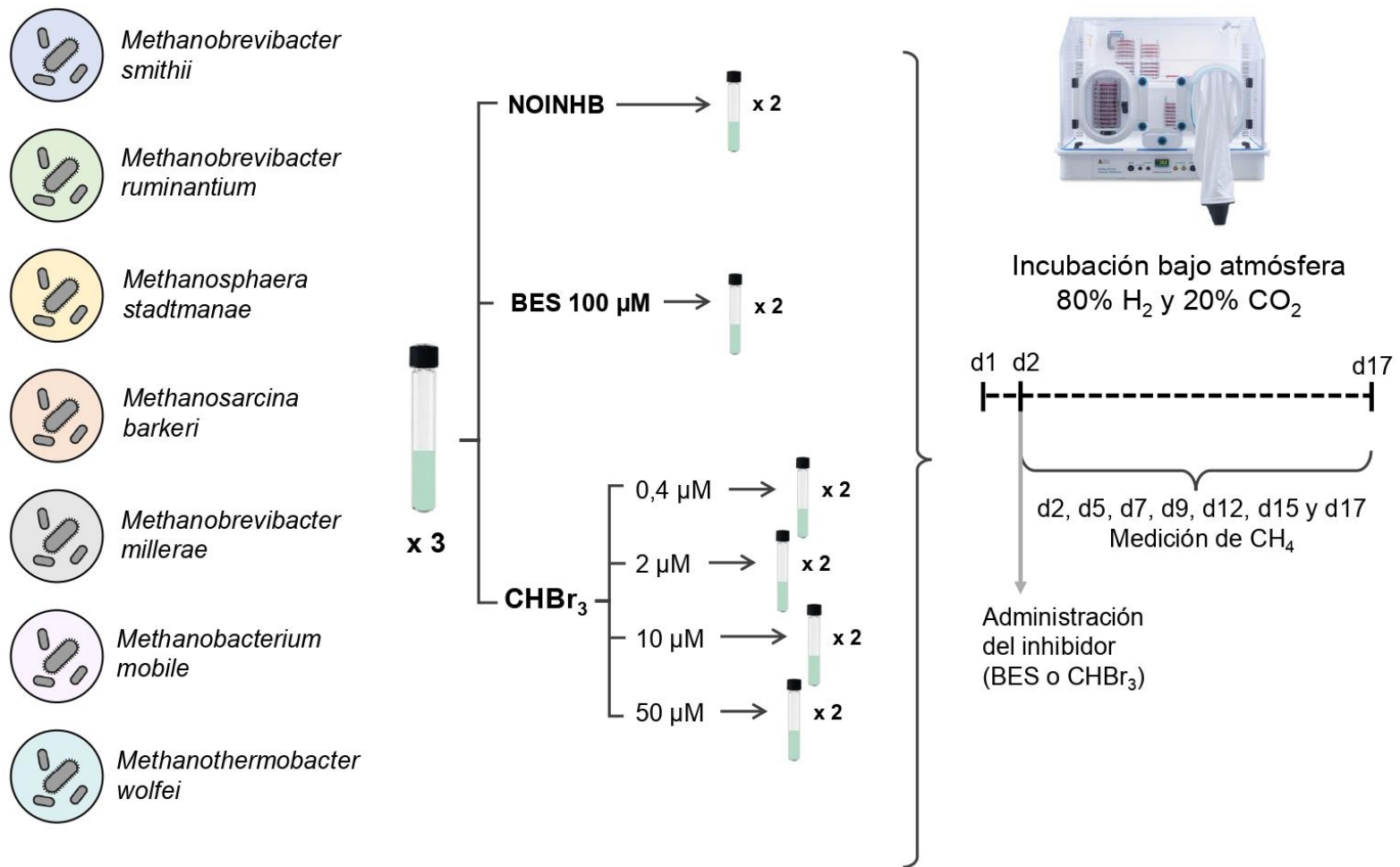


Figura 12. Diseño experimental correspondiente al Estudio 4. NOINHB: No inhibidor; BES: 2-bromoetanosulfonato; CHBr₃: bromoformo; AGV: ácidos grasos volátiles.

Análisis de muestras y cálculos

Determinación de la composición química

Se analizó la MS, MO, PB, EE, FDN, FDA y LDA de *A. taxiformis* y de los ingredientes utilizados como sustrato en los Estudios 1 y 3 y como dieta en el Estudio 2, tal y como se describe en Arco-Pérez et al. (2017). La materia seca (método 934.01) y las cenizas (OM) (método 942.05) se determinaron según AOAC (2005). El contenido en nitrógeno (método AOAC 990.03) se determinó mediante el método Dumas (Leco TruSpec CN, St. Joseph, MI, EE.UU.) y se convirtieron a PB multiplicando por 6,25. El extracto etéreo se midió mediante extracción con éter de petróleo (método AOAC 920.39). Los análisis de FDN y FDA se realizaron según Van Soest et al. (1991) utilizando una unidad de análisis de fibras Ankom 220 (Ankom Technology Corp., Macedon, NY, EE.UU.), con α -amilasa para el análisis de FDN en muestras de concentrado, mientras que la FDA se determinó por solubilización de la celulosa con ácido sulfúrico al 72%.

Medición de metano e hidrógeno *in vitro*: cromatografía de gases

Las concentraciones de CH₄ e H₂ de las muestras de gas tomadas en las incubaciones *in vitro* fueron determinadas mediante un sistema de micro-cromatografía de gases (Agilent 490, Santa Clara, California, EE. UU.) equipado con dos columnas cromatográficas: una columna CP-Molsieve 5A de 10 m con argón como gas portador, y una columna CP-PoraPLOT U de 10 m con helio como gas portador. Se realizó el análisis siguiendo una adaptación de la metodología de Cluett et al. (2020). El sistema fue calibrado con una mezcla de gases estándar certificada (Messer Gases for Life, Tarragona, España) con la siguiente composición: 1% H₂, 3% O₂, 20% CH₄, 26% N₂, 50% CO₂. Se introdujo un volumen de 10 mL de cada muestra al micro-cromatógrafo, utilizando una bomba de muestreo interna. Cada muestra fue analizada por triplicado. El análisis fue realizado en los Servicios Técnicos Instrumentales de la Estación Experimental del Zaidín (SIC-EEZ; CSIC) en Granada (España). Por otro lado, se calculó la producción de gas de las incubaciones transformando las medidas de presión en unidades de volumen utilizando la ley de los gases ideales bajo presión atmosférica estándar y 39 °C.

Para los cultivos puros de metanógenos, la concentración de CH₄ fue analizada inyectando las muestras de gas de 0,5 mL en un cromatógrafo de gases de detección por

ionización de llama (HP Hewlett 5890, Packard Series II, Waldbronn, Alemania) usando una jeringa Sample-Lock de 0,5 mL (Hamilton, Nevada, EE. UU.). La concentración de CH₄ fue determinada utilizando una curva estándar generada inyectando diferentes volúmenes de CH₄ puro al 99,9% antes y después de la inyección de las muestras.

Medición de metano e hidrógeno *in vivo*: cámaras respirométricas

Se midió la producción entérica de CH₄ e H₂ de cada cabra utilizando 4 cámaras respirométricas de circuito abierto (**Figura 13A**). Estas cámaras, construidas con estructura de metal y paneles de policarbonato, miden 1,8 m de ancho × 1,8 m de profundidad × 1,5 m de altura (Abecia et al., 2012). Cada cámara cuenta con un flujo de entrada y un flujo de salida de aire (**Figura 13B**). El conducto de salida está equipado con un sistema que captura una muestra del aire y la dirige hacia un analizador de gases. El CH₄ es detectado por un sensor por infrarrojos (ULTRAMAT 23, Siemens AG, Múnich, Alemania) y el H₂ por un sensor semiconductor de dióxido de estaño (Q-S121, Qubit Systems Inc., Kingston, Ontario, Canadá). El equipo fue calibrado diariamente con una mezcla de gases certificada (Linde Gas España S.A.U., Valencia, España) con la siguiente composición: 50 ppm H₂, 50 ppm CH₄, 1000 ppm CO₂ y resto N₂. La temperatura del aire dentro de las cámaras se mantuvo en un rango de 15 a 20 °C. El caudal de aire (expresado en L/min) se midió dos veces al día en el conducto de salida de cada cámara utilizando un anemómetro (PCE Ibérica SL, Albacete, España). El aire del conducto de salida de cada cámara fue muestreado durante 2,5 min cada 12,5 min, realizando una media de 115 mediciones diarias por cámara. El aire de la sala se midió a la misma frecuencia para determinar las concentraciones basales de CH₄ e H₂. Se realizaron dos interrupciones diarias en las mediciones para limpiar el suelo de la cámara y ofrecer a las cabras la toma de alimento de la mañana (0900 h) y de la tarde (1400 h), que coincidían con los momentos en los que el aire de la cámara no se estaba analizando. Las emisiones diarias de CH₄ e H₂ de cada cámara fueron calculadas como el flujo de aire multiplicado por la concentración de gas en el conducto de salida de la cámara, tras restarle la concentración basal.

A)



B)

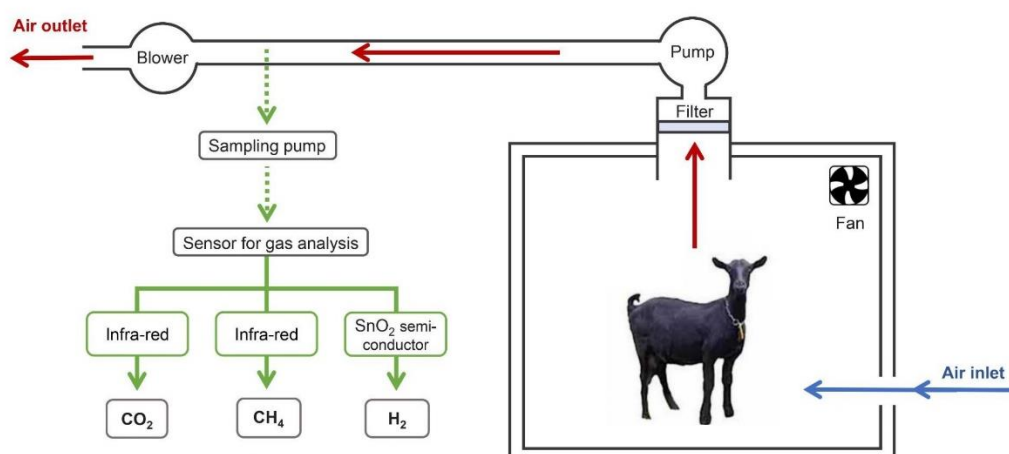


Figura 13. A) Cámaras respirométricas utilizadas en el desarrollo de esta Tesis en la Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Granada, España. B) Diagrama esquemático del funcionamiento de una cámara respirométrica de circuito abierto. Adaptado de Malik et al. (2017).

Determinación del perfil de fermentación ruminal

Las concentraciones de AGV individuales (acetato, propionato, isobutirato, butirato, isovalerato y valerato) fueron determinadas con un sistema de cromatografía de gases acoplado a un detector de ionización de llama (Auto-System PerkinElmer, Norwalk, Connecticut, EE. UU.), utilizando una columna de polietilenglicol reticulada al 100% (TRB-FFAP, 30 m × 0,53 mm i.d. × 1 μm de espesor de película, Teknokroma, España) siguiendo el procedimiento descrito en Arco-Pérez et al. (2017). Se inyectó 1 μL de cada muestra en modo “split” (20 mL/min). El gas portador empleado fue N₂ (1 mL/min), y se

ajustaron las temperaturas del inyector y del detector a 260 °C y 275 °C, respectivamente. Se mantuvo la columna a una temperatura de 100 °C durante 1 min, seguido de un incremento de temperatura a 15 °C/min hasta alcanzar 160 °C, permaneciendo en esta temperatura durante 1 min. Se utilizaron estándares externos para la identificación de los picos de AGV según su tiempo de retención, y ácido crotonico como estándar interno para la cuantificación. En cuanto a las concentraciones de lactato y amoniac, fueron determinadas mediante métodos colorimétricos descritos por Barker & Summerson (1941) y Weatherburn (1967), respectivamente. En el método de Barker & Summerson, el ácido láctico es oxidado a acetaldehído en presencia de ácido sulfúrico concentrado caliente. A continuación, se combina el acetaldehído con p-hidroxidifenilo en ácido sulfúrico concentrado (en frío), dando lugar a una reacción de color que es utilizada para la medición colorimétrica. En el método Weatherburn, el fenol, el nitroprusiato y el hipoclorito alcalino reaccionan con el amoniac, generando azul de indofenol cuya concentración es proporcional a la cantidad de amoniac presente.

Determinación de la concentración de bromoformo y dibromometano

Las concentraciones de CHBr_3 y CH_2Br_2 fueron cuantificadas siguiendo el procedimiento detallado en el estudio de Colomb et al. (2008). Las muestras fueron analizadas mediante un sistema de micro-extracción de espacio de cabeza en fase sólida (CTC Analytics PAL Combi-xt Autosampler, Zwingen, Suiza) acoplado a un cromatógrafo de gases bidimensional y espectrómetro de masas de tiempo de vuelo (Waters Micromass Quattro micro GC, Milford, Massachusetts, EE. UU.). La detección de los analitos consistió en hacer barridos completos en espectrometría de masas con 500 barridos/s. Estos análisis se llevaron a cabo en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada (CIC-UGR), España.

Determinación de la abundancia de los grupos microbianos ruminales por PCR cuantitativa

El ADN fue extraído directamente de las muestras congeladas en el caso de los experimentos *in vitro* y de muestras previamente liofilizadas en el caso del experimento *in vivo*, utilizándose un kit comercial (DNeasy PowerSoil Pro Kit, Qiagen Ltd., Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante adaptadas a muestras ruminales (Smith et al., 2022). Se utilizó una alícuota del ADN eluido (2 μl) para cuantificar la

abundancia de los principales grupos microbianos mediante PCR cuantitativa (qPCR) utilizando un sistema de detección de PCR en tiempo real multicolor iQ5 (BioRad Laboratories Inc., Hercules, California, EE. UU.), tal y como se describió en Belanche et al. (2020b). Los conjuntos de cebadores utilizados fueron los siguientes: para las bacterias totales, se emplearon los cebadores del ARNr 16S *forward* GTGSTGCAYGGYTGTCGTCA y *reverse* ACGTCRTCCMCACCTTCCTC; para las arqueas, los cebadores del gen *mcrA* *forward* TTCGGTGGATCDCARAGRGC y *reverse* GBARGTCGWAWCCGTAGAATCC; para los hongos anaeróbicos, los cebadores del ARNr 18S *forward* GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTC y *reverse* CAAATTCACAAAGGGTAGGATGAT; y para los protozoos, los cebadores del 18S ARNr *forward* GCTTTCGWTGGTAGTGTATT y *reverse* CTTGCCCTCYAATCGTWCT. Las condiciones de amplificación consistieron en una etapa inicial a 95 °C durante 5 min, seguida de 40 ciclos de 95 °C durante 15 s, 60 °C durante 30 s y 72 °C durante 55 s; y finalmente, una etapa a 72 °C durante 1 min. La cantidad absoluta de cada grupo microbiano, expresada en copias de ADN por mL de materia fresca, se determinó utilizando diluciones seriadas de cantidades conocidas de estándares de qPCR. Estos estándares de qPCR se crearon a partir del plásmido pCR 4-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA), que contenía fragmentos de los genes 16S, *mcrA* o 18S de bacterias, arqueas y protozoos, respectivamente (Belanche et al., 2020b).

Análisis estadísticos

En primer lugar, se comprobaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de la varianza para los resultados de todos los experimentos mediante las pruebas de Shapiro-Wilk y Bartlett, respectivamente. A continuación, cada ensayo fue analizado según el diseño experimental correspondiente. Cuando se detectaron efectos significativos, se utilizaron contrastes polinómicos para determinar las respuestas lineales y/o cuadráticas (en el Experimento 1.1, 1.2 y 1.4 y en el Estudio 4), y las medias se compararon mediante el test LSD de Fisher utilizando el software StatGraphics Centurion 19 (StatPoint Technologies, Inc. USA, 2020). Se declararon efectos significativos a $P < 0,05$ y tendencias a $0,05 \leq P < 0,10$.

A continuación, se detalla el diseño estadístico de cada experimento:

Estudio 1

Los datos de los Experimentos 1.1, 1.2, 1.3 y 1.4 fueron analizados estadísticamente mediante ANOVA unidireccional de la siguiente manera:

Experimento 1.1

$$Y_{ij} = \mu + I_i + G_j + e_{ij} \quad (\text{dosis respuesta para cada inhibidor})$$

Experimento 1.2

$$Y_{ij} = \mu + D_i + G_j + e_{ij} \quad (\text{dosis-respuesta para cada compuesto fenólico})$$

$$Y_{ij} = \mu + C_i + G_j + e_{ij} \quad (\text{comparación entre compuestos fenólicos})$$

Experimento 1.3

$$Y_{ij} = \mu + W_i + G_j + e_{ij} \quad (\text{comparación entre compuestos fenólicos en inhibición de la metanogénesis})$$

Experimento 1.4

$$Y_{ij} = \mu + X_i + G_j + e_{ij} \quad (\text{dosis-respuesta del floroglucinol en inhibición de la metanogénesis})$$

Donde Y_{ij} representa una variable dependiente continua, μ es la media global de la población, I_i es el efecto fijo de la dosis del inhibidor de la metanogénesis (*A. taxiformis* o BES), D_i es el efecto fijo de la dosis del compuesto fenólico (fenol, catecol, resorcinol, hidroquinona, floroglucinol, pirogalol, ácido gálico o ácido fórmico), C_i es el efecto fijo del tipo de compuesto fenólico a 6 mM, W_i es el efecto fijo del tipo de compuesto fenólico a 6 mM cuando se combina con *A. taxiformis* al 2% de MS, X_i es el efecto fijo de la dosis de floroglucinol cuando se combina con *A. taxiformis* al 2% de MS, G_j representa el efecto aleatorio de la cabra utilizada como donante, y e_{ij} es el error residual.

Estudio 2

Los resultados del Estudio 2 fueron analizados estadísticamente mediante un ANOVA factorial 2×2 como sigue:

$$Y_{ijk} = \mu + AT_i + PG_j + (AT \times PG)_{ij} + G_k + PR_l + e_{ijkl}$$

Donde Y_{ijk} representa la variable dependiente continua, μ es la media global de la población, AT_i es el efecto fijo de la tasa de inclusión de *A. taxiformis* (0 frente a 5 g/kg

MS), PG_j es el efecto fijo de la suplementación con floroglucinol (0 frente a 20 g/kg MS), $(AT \times PG)_{ij}$ representa el término de interacción, G_k representa el efecto aleatorio de la cabra (n=8), PR_l representa el efecto aleatorio del periodo, y e_{ijkl} es el error residual.

Estudio 3

Los resultados del Estudio 3 se analizaron estadísticamente mediante un ANOVA factorial 2×2 :

$$Y_{ijk} = \mu + R_i + S_j + (R \times S)_{ij} + A_k + e_{ijk} \quad (\text{por tiempo de muestreo})$$

Donde Y_{ijk} representa la variable dependiente continua, μ es la media global de la población, R_i es el efecto fijo de la tasa de inclusión de *A. taxiformis* (AT0 vs. AT2), S_j es el efecto fijo del sustrato (HC vs. HF), $(R \times S)_{ij}$ representa el término de interacción, A_k representa el efecto aleatorio del inóculo animal (n=5), y e_{ijk} es el error residual.

Estudio 4

Los resultados del Estudio 4 se analizaron estadísticamente por medidas repetidas de la siguiente manera:

$$Y_{ijk} = \mu + C_i + T_j + (C \times T)_{ij} + A_k + e_{ijk} \quad (\text{por especie metanogénica})$$

Donde Y_{ijk} representa la variable continua dependiente, μ es la media global de la población, C_i es el efecto fijo de la concentración de CHBr_3 (0, 0,4, 2, 10, 50 μM), T_j es el efecto fijo del tiempo (2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14 d), $(C \times T)_{ij}$ representa el término de interacción, A_k representa la repetición de la serie (n=3), y e_{ijk} es el error residual.

RESULTADOS

Results

Study 1. Evaluating the effect of phenolic compounds as hydrogen acceptors when rumen methanogenesis is inhibited *in vitro*

Experiment 1.1: *A. taxiformis* showed a dose-response effect on *in vitro* rumen fermentation (**Table 5**). Increasing the concentration of *A. taxiformis* (0, 1, 2, 3,4 and 5% of the substrate on a dry matter (DM) basis) promoted a significant reduction ($P < 0.001$) in rumen methane (CH_4) production, reaching a plateau from inclusion rates equal or above of 1% DM and up to 99% of inhibition at the highest doses. This CH_4 inhibition was accompanied by an increase ($P = 0.004$) in rumen dihydrogen (H_2) accumulation, reaching a plateau from an inclusion rate of 3% DM. Moreover, the volatile fatty acid (VFA) profile changed by the inclusion of *A. taxiformis*. Acetate molar proportion decreased ($P < 0.001$) and propionate increased ($P < 0.001$) in a dose-dependent way, reaching a plateau from an inclusion rate of 1% DM. As a result, the acetate:propionate (A:P) ratio decreased ($P < 0.001$) with inclusion rates equal or above 1% DM. No significant effects were observed on other fermentation variables, such as total gas production, pH, lactate, and ammonia concentration. Experiment 1.1 also revealed the dose-response effect of 2-bromoethanesulfonate (BES), a reference methanogenesis inhibitor, at 0, 4, 8, 12, 16, and 20 μM on *in vitro* rumen fermentation (**Supplementary Table S1**). Methane production decreased ($P = 0.006$) as the dose increased, reaching a 74% reduction at the highest concentration tested (BES at 20 μM). Methane inhibition resulted in a tendency to increase ($P = 0.092$) H_2 accumulation and a shift in the fermentation pattern towards less acetate ($P = 0.002$) and more propionate formation ($P < 0.001$), decreasing the A:P ratio ($P < 0.001$). Based on these results, *A. taxiformis* at 2% DM was considered optimal to consistently inhibit rumen methanogenesis and increase H_2 production under *in vitro* conditions without impairing rumen fermentation. This dosage was selected for the subsequent experiments to promote an increase in H_2 concentration in the *in vitro* system, to test whether it could be redirected by some rumen microbes towards the degradation pathway of phenolic compounds.

Table 5. Dose-response effect of *Asparagopsis taxiformis* (0, 1, 2, 3, 4, 5% DM) on 24 h *in vitro* fermentation in rumen fluid from goats (Experiment 1.1).

	AT0	AT1	AT2	AT3	AT4	AT5	SEM	P-value	Contrasts
pH	6.45	6.35	6.36	6.38	6.37	6.40	0.02	0.612	NS
TGP, mL	125	117	121	122	124	122	3.11	0.992	NS
CH ₄ , mL	38.0 ^a	2.13 ^b	0.34 ^b	0.10 ^b	0.12 ^b	0.10 ^b	3.43	<0.001	L ^{**} , Q ^{***}
H ₂ , mL	0.28 ^c	2.46 ^c	10.5 ^b	16.5 ^{ab}	29.0 ^a	19.9 ^{ab}	2.62	0.004	L ^{***}
NH ₃ -N, mg/100 mL	53.0	42.9	50.0	47.8	43.4	42.2	3.08	0.912	NS
Lactate, µg/mL	11.7	11.2	10.9	12.5	12.2	12.5	0.62	0.974	NS
Total VFA, mM	113	106	109	105	105	103	3.79	0.987	NS
VFA, mol/100 mol									
Acetate	61.7 ^a	53.9 ^b	53.1 ^b	52.3 ^b	52.5 ^b	52.4 ^b	0.76	<0.001	L ^{***} , Q ^{***}
Propionate	19.3 ^b	25.6 ^a	25.7 ^a	26.3 ^a	26.1 ^a	26.0 ^a	0.54	<0.001	L ^{***} , Q ^{***}
Isobutyrate	1.38	1.10	1.15	1.03	0.93	0.98	0.06	0.352	NS
Butyrate	14.0	15.9	16.4	16.9	17.0	17.2	0.38	0.142	NS
Isovalerate	1.98	1.53	1.55	1.48	1.38	1.45	0.09	0.446	NS
Valerate	1.69	2.05	2.10	2.05	2.08	2.13	0.06	0.283	NS
A:P	3.20 ^a	2.11 ^b	2.06 ^b	1.99 ^b	2.01 ^b	2.01 ^b	0.09	<0.001	L ^{***} , Q ^{***}

AT: *A. taxiformis* at 0 (AT0), 1 (AT1), 2 (AT2), 3 (AT3) 4 (AT4) and 5% DM (AT5); VFA: volatile fatty acids; TGP: total gas production; A:P: acetate:propionate ratio. ^{a-c} Values within a row with different superscripts differ significantly at $P < 0.05$ (n=4). Contrast: NS, not significant; L, linear response; Q, quadratic response; ^{***} $P < 0.001$; ^{**} $P < 0.01$.

Experiment 1.2: The inclusion of the different phenolic compounds at concentrations of 2, 4 and 6 mM did not show a dose-response effect on CH₄ and H₂ production or rumen fermentation *in vitro*, except for phloroglucinol (**Supplementary Tables S2-S9**). Increasing concentrations of phloroglucinol linearly increased VFA concentration ($P = 0.020$) and acetate molar proportion ($P < 0.001$) and decreased the A:P ratio ($P = 0.004$). **Table 6** summarises the effects of the eight phenolic compounds at their highest dose (6 mM) on rumen fermentation variables compared to the control treatment (substrate alone). Phloroglucinol and pyrogallol numerically lowered CH₄ production by 47% and 42%, respectively, despite these decreases did not reach statistical significance. No significant differences were observed in H₂ and total gas production for any of the compounds considered. Phloroglucinol supplementation decreased rumen pH ($P = 0.009$), possibly as a result of a numerically increased total VFA production. Moreover, phloroglucinol increased ($P = 0.002$) acetate molar proportion and A:P ratio ($P < 0.001$). In view of the absence of negative effects of the phenolic compounds on the rumen fermentation, the maximum dose considered (6 mM) was selected as the optimal inclusion rate for testing these compounds in combination with *A. taxiformis* in the following experiment (1.3).

Table 6. Effect of phenol, catechol, resorcinol, hydroquinone, phloroglucinol, pyrogallol, gallic acid and formic acid at 6 mM on 24 h *in vitro* fermentation in rumen fluid from goats (Experiment 1.2).

	PC0	Phe6	Cat6	Res6	Hyd6	Phl6	Pyr6	GA6	FA6	SEM	P-value
pH	6.46 ^a	6.46 ^a	6.48 ^a	6.47 ^a	6.47 ^a	6.35 ^b	6.46 ^a	6.47 ^a	6.44 ^a	0.01	0.009
TGP, mL	132	132	131	131	130	133	132	132	136	1.32	0.994
CH ₄ , mL	18.3	20.2	23.5	19.1	19.3	9.78	10.7	21.6	13.0	1.65	0.562
H ₂ , mL	0.27	0	0	0	0	0.01	0.01	0	0	0.05	0.884
NH ₃ -N, mg/100 mL	157	141	141	161	133	151	157	139	157	6.72	0.987
Lactate, µg/mL	10.4	11.1	11.3	7.72	11.6	8.02	12.0	13.0	11.2	0.87	0.936
Total VFA, mM	110	108	111	112	114	126	108	111	113	1.50	0.206
VFA, mol/100 mol											
Acetate	61.2 ^b	61.2 ^b	60.6 ^b	61.2 ^b	60.7 ^b	64.3 ^a	61.0 ^b	60.8 ^b	60.4 ^b	0.23	0.002
Propionate	18.5	18.9	19.0	18.7	19.0	17.0	18.7	18.7	18.7	0.17	0.214
Isobutyrate	1.21	1.10	1.20	1.20	1.20	1.13	1.10	1.08	1.13	0.03	0.899
Butyrate	15.3	14.8	15.3	15.0	15.2	14.2	15.3	15.5	15.6	0.21	0.942
Isovalerate	2.30	2.25	2.38	2.45	2.48	2.15	2.60	2.53	2.75	0.06	0.444
Valerate	1.46 ^{bc}	1.80 ^a	1.48 ^{bc}	1.43 ^{bc}	1.43 ^{bc}	1.28 ^c	1.35 ^{bc}	1.40 ^{bc}	1.60 ^{ab}	0.04	0.049
A:P	3.31 ^b	3.24 ^b	3.19 ^b	3.28 ^b	3.21 ^b	3.81 ^a	3.27 ^b	3.25 ^b	3.25 ^b	0.04	<0.001

PC0: phenolic compound at 0 mM (substrate alone); Phe6: phenol at 6 mM; Cat6: catechol at 6 mM; Res6: resorcinol at 6 mM; Hyd6: hydroquinone at 6 mM; Phl6: phloroglucinol at 6 mM; Pyr6: pyrogallol at 6 mM; GA6: gallic acid at 6 mM; FA6: formic acid at 6 mM; TGP: total gas production; VFA: volatile fatty acids; A:P: acetate:propionate ratio. ^{a-c} Values within a row with different superscripts differ significantly at $P < 0.05$ (n=4).

Experiment 1.3: The effects of supplementing *A. taxiformis* alone (at 2% of DM) or in combination with individual phenolic compounds (at 6 mM) are presented in **Table 7**. Methane production was significantly decreased ($P = 0.007$) when *A. taxiformis* was supplemented in combination with every phenolic compound in comparison with *A. taxiformis* alone. The concentrations of ammonia were unaffected by the experimental treatments, but the combined supplementation of *A. taxiformis* with resorcinol or pyrogallol promoted the lowest lactate concentrations ($P = 0.025$). Total gas production was increased with phloroglucinol and formic acid supplementation ($P < 0.001$). Pyrogallol and phloroglucinol were the compounds that promoted the greatest nominal decrease in H₂ accumulation, particularly when this H₂ production was corrected by the VFA concentration ($P = 0.081$). Phloroglucinol also increased ($P < 0.001$) total VFA production, reaching a higher value than *A. taxiformis* alone and promoting a lower rumen pH ($P < 0.001$). Phloroglucinol supplementation also changed the VFA profile by increasing acetate ($P < 0.001$) and decreasing propionate ($P = 0.028$) and isovalerate

molar proportions ($P = 0.025$). Based on these findings, mostly on the ability to reduce H_2 accumulation, phloroglucinol was chosen to be further evaluated at increasing concentrations in a CH_4 inhibition scenario in the following experiment (1.4).

Experiment 1.4: Table 8 shows the effect of supplementing *A. taxiformis* alone (at 2% DM) or in combination with increasing doses of phloroglucinol (6, 16, 26 and 36 mM). Methane production was further inhibited ($P < 0.001$) by the addition of phloroglucinol at the lowest concentration used (6 mM) compared with the addition of *A. taxiformis* alone, whereas H_2 accumulation decreased ($P < 0.001$) as dosage increased. Phloroglucinol at a dose of 16 mM and above promoted a decrease in H_2 released per mol of CH_4 decreased ($P = 0.009$), as well as an increase in total gas production ($P < 0.001$). An increase in total VFA production was also observed in a dose-dependent way, reaching the maximum level with the 36 mM dose. Phloroglucinol at 26 mM (or above) increased acetate ($P < 0.001$) and butyrate ($P = 0.031$) molar proportions, whereas propionate, isobutyrate, isovalerate and valerate molar proportions were decreased ($P < 0.001$). Consequently, the maximum A:P ratio was detected at the highest dose ($P < 0.001$). In addition, phloroglucinol at 36 mM caused a reduction ($P < 0.001$) of the pH and the ammonia concentration, and an increment ($P < 0.001$) of the lactate concentration. Given this diversity of results, the minimum and maximum doses of phloroglucinol (6 and 36 mM) were considered to evaluate the effect of phloroglucinol on the abundance of the microbial communities. The concentration of the main microbial groups (total bacteria, archaea, protozoa and anaerobic fungi) was similar when supplementing with *A. taxiformis* alone or in combination with phloroglucinol at low dosage (6 mM). However, supplementing phloroglucinol at high dose (36 mM) promoted a significantly decreased in the concentrations of protozoa ($P < 0.001$), archaea ($P < 0.001$) and anaerobic fungi ($P = 0.013$) compared to the supplementation of *A. taxiformis* alone.

Table 7. Effect of phenol, catechol, resorcinol, hydroquinone, phloroglucinol, pyrogallol, gallic acid and formic acid at 6 mM when combined with *Asparagopsis taxiformis* at 2% DM on *in vitro* fermentation after 5 days of incubation in rumen fluid from goats (Experiment 1.3).

	Treatments										SEM	P-value
	AT0	AT2	AT2 + Phe6	AT2 + Cat6	AT2 + Res6	AT2 + Hyd6	AT2 + Phl6	AT2 + Pyr6	AT2 + GA6	AT2 + FA6		
pH	6.53±0.01	6.50 ^{ab}	6.51 ^a	6.51 ^a	6.50 ^{ab}	6.50 ^{ab}	6.35 ^c	6.52 ^a	6.51 ^a	6.47 ^b	0.01	<0.001
TGP, mL	95.9±2.46	77.6 ^{cd}	77.8 ^{cd}	77.1 ^{cd}	79.2 ^{bcd}	75.0 ^d	87.0 ^a	76.9 ^{cd}	80.1 ^{bc}	82.6 ^{ab}	0.68	<0.001
CH ₄ , mL	8.91±0.93	0.11 ^a	0.00 ^b	0.01 ^b	0.01 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.01	0.007
mL CH ₄ /mmol VFA	1.81±0.20	0.03 ^a	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0.002	0.007
H ₂ , mL	0.14±0.02	2.17	1.93	2.52	2.12	1.52	1.36	1.02	1.70	2.30	0.13	0.155
mL H ₂ /mmol VFA	0.03±0.00	0.54 ^a	0.51 ^{abc}	0.66 ^a	0.55 ^a	0.39 ^{abc}	0.28 ^{bc}	0.25 ^c	0.41 ^{abc}	0.58 ^a	0.04	0.081
mol H ₂ /mol CH ₂ decreased	-	0.25	0.23	0.29	0.25	0.20	0.16	0.12	0.19	0.27	0.02	0.211
NH ₃ -N, mg/100 mL	15.5±2.86	13.0	13.6	13.4	14.8	14.3	14.7	12.0	11.6	15.2	0.68	0.954
Lactate, µg/mL	5.09±0.31	4.23 ^a	2.22 ^{bc}	3.77 ^{ab}	1.64 ^c	3.55 ^{abc}	3.06 ^{abc}	1.62 ^c	2.25 ^{bc}	2.68 ^{abc}	0.24	0.025
Total VFA, mM	98.9±2.99	81.3 ^{bc}	74.4 ^c	77.3 ^{bc}	79.1 ^{bc}	77.9 ^{bc}	95.7 ^a	81.5 ^{bc}	80.5 ^{bc}	79.2 ^{bc}	1.16	<0.001
VFA, mol/100 mol												
Acetate	60.2±0.36	53.1 ^b	50.5 ^{cd}	47.1 ^e	49.2 ^d	50.8 ^{cd}	57.3 ^a	51.2 ^c	50.8 ^{cd}	52.0 ^{bc}	0.46	<0.001
Propionate	24.4±0.36	28.0 ^{ab}	24.9 ^{bc}	25.0 ^{bc}	27.8 ^{ab}	29.8 ^a	23.1 ^c	26.6 ^{abc}	27.4 ^{ab}	28.4 ^{ab}	0.48	0.028
Isobutyrate	1.40±0.16	1.19	1.25	1.13	1.18	1.03	1.08	1.10	1.28	1.18	0.04	0.895
Butyrate	10.1±0.53	13.5 ^c	18.3 ^a	16.6 ^{ab}	15.2 ^{bc}	13.9 ^{bc}	14.9 ^{bc}	16.0 ^{abc}	15.5 ^{abc}	14.0 ^{bc}	0.38	0.042
Isovalerate	1.38±0.14	1.04 ^{ab}	1.13 ^a	1.05 ^{ab}	1.00 ^{abc}	0.90 ^d	0.88 ^d	0.98 ^{cd}	1.05 ^{ab}	0.98 ^{cd}	0.02	0.025
Valerate	2.63±0.18	3.30 ^c	4.00 ^{bc}	9.23 ^a	5.75 ^b	3.50 ^{bc}	2.75 ^c	4.20 ^{bc}	4.03 ^{bc}	3.48 ^{bc}	0.38	<0.001
A:P	2.47±0.02	1.90 ^{bc}	2.05 ^b	1.91 ^{bc}	1.79 ^c	1.71 ^c	2.49 ^a	1.96 ^{bc}	1.87 ^{bc}	1.83 ^{bc}	0.04	<0.001

AT0: *A. taxiformis* at 0% DM (substrate alone); AT2: *A. taxiformis* at 2% DM tested alone or in combination with a phenolic compound; Phe6: phenol at 6 mM; Cat6: catechol at 6 mM; Res6: resorcinol at 6 mM; Hyd6: hydroquinone at 6 mM; Phl6: phloroglucinol at 6 mM; Pyr6: pyrogallol at 6 mM; GA6: gallic acid at 6 mM; FA6: formic acid at 6 mM; TGP: total gas production; VFA: volatile fatty acids; A:P: acetate:propionate ratio. In the first column, mean±SE. For the treatments, SEM. The treatments were included in the statistical analysis (AT0 was not). ^{a-c} Values within a row with different superscripts differ significantly at $P < 0.05$ (n=4).

Table 8. Effect of phloroglucinol at different doses (6, 16, 26, 36 mM) when combined with *Asparagopsis taxiformis* at 2% DM on *in vitro* fermentation after 5 days of incubation in rumen fluid from goats (Experiment 1.4).

	AT0	Treatments					SEM	P-value	Contrasts
		AT2	AT2 + Phl6	AT2 + Phl16	AT2 + Phl26	AT2 + Phl36			
pH	6.73±0.02	6.68 ^a	6.50 ^b	6.18 ^c	5.86 ^d	5.78 ^d	0.07	<0.001	L ^{***} , Q ^{**}
TGP, mL	94.7±1.95	78.6 ^c	88.3 ^b	97.3 ^a	99.2 ^a	99.2 ^a	1.93	<0.001	L ^{***} , Q ^{***}
CH ₄ , mL	10.4±1.42	0.13 ^a	0.03 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.02	0.014	L ^{**} , Q [*]
mL CH ₄ /mmol VFA	2.98±0.42	0.05 ^a	0.01 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.01	0.015	L ^{**} , Q [*]
H ₂ , mL	0.13±0.03	3.15 ^a	2.30 ^{ab}	1.61 ^{bc}	1.15 ^c	1.71 ^{bc}	0.20	0.002	L ^{***} , Q ^{**}
mL H ₂ /mmol VFA	0.04±0.01	1.05 ^a	0.60 ^b	0.31 ^{bc}	0.21 ^c	0.28 ^c	0.08	<0.001	L ^{***} , Q ^{***}
mol H ₂ /mol CH ₂ decreased	-	0.33 ^a	0.23 ^{ab}	0.16 ^b	0.13 ^b	0.18 ^b	0.02	0.009	L ^{**} , Q [*]
NH ₃ -N, mg/100 mL	15.3±1.98	18.0 ^a	13.9 ^{ab}	10.6 ^b	5.13 ^c	4.31 ^c	1.33	<0.001	L ^{***}
Lactate, µg/mL	3.18±0.47	2.20 ^b	1.97 ^b	3.46 ^b	7.89 ^a	8.42 ^a	0.60	<0.001	L ^{***}
Total VFA, mM	70.0±0.89	60.2 ^c	76.2 ^d	103 ^c	113 ^b	120 ^a	5.11	<0.001	L ^{**} , Q ^{***}
VFA, mol/100 mol									
Acetate	61.6±0.60	53.4 ^d	58.8 ^c	65.4 ^b	70.5 ^a	71.8 ^a	1.58	<0.001	L ^{***} , Q ^{***}
Propionate	19.2±0.97	21.8 ^a	18.0 ^b	12.1 ^c	7.40 ^d	6.45 ^d	1.34	<0.001	L ^{***} , Q ^{***}
Isobutyrate	1.05±0.06	1.04 ^a	0.90 ^{ab}	0.78 ^b	0.50 ^c	0.45 ^c	0.05	<0.001	L ^{***}
Butyrate	12.9±0.92	17.3 ^c	17.7 ^{bc}	18.4 ^{abc}	19.7 ^{ab}	19.8 ^a	0.35	0.031	L ^{***}
Isovalerate	1.35±0.06	1.16 ^a	0.95 ^b	0.65 ^c	0.48 ^d	0.38 ^d	0.07	<0.001	L ^{***} , Q ^{**}
Valerate	4.03±0.46	5.31 ^a	3.72 ^b	2.58 ^c	1.35 ^d	1.10 ^d	0.37	<0.001	L ^{***} , Q ^{**}
A:P	3.24±0.15	2.47 ^d	3.28 ^d	5.45 ^c	9.68 ^b	11.3 ^a	0.75	<0.001	L ^{***}
Microbe (log copies/mL)									
Bacteria	11.6±0.07	11.6	11.6			11.5	0.03	0.593	NS
Protozoa	8.32±0.33	8.22 ^a	8.31 ^a			5.82 ^b	0.38	<0.001	L ^{***}
Archaea	8.14±0.01	6.65 ^a	6.81 ^a			5.23 ^b	0.22	<0.001	L ^{***} , Q [*]
Fungi	6.44±1.10	6.44 ^a	5.54 ^a			2.75 ^b	0.60	0.013	L ^{**}

AT0: *A. taxiformis* at 0% DM (substrate alone); AT2: *A. taxiformis* at 2% DM tested alone or in combination with phloroglucinol at 6 (AT2+Phl6), 16 (AT2+Phl16), 26 (AT2+Phl26) and 36 mM (AT2+Phl36). TGP: total gas production; VFA: volatile fatty acids; A:P: acetate:propionate ratio. In the first column, mean±SE. For the treatments, SEM. The treatments were included in the statistical analysis (substrate alone was not). ^{a-c} Values within a row with different superscripts differ significantly at $P < 0.05$ (n=4). Contrast: NS, not significant; L, linear response; Q, quadratic response; *** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$.

Study 2. Combining *Asparagopsis taxiformis* and phloroglucinol to decrease methane production and improve rumen fermentation efficiency in goats

There were no significant differences in lactate and total VFA concentrations across experimental groups (**Table 9**). However, a shift in the VFA profile was observed when *A. taxiformis* and phloroglucinol were administered. *Asparagopsis taxiformis* supplementation significantly decreased the acetate ($P < 0.001$) and increased propionate ($P < 0.001$), butyrate ($P = 0.022$) and valerate molar proportions ($P < 0.001$), resulting in decreased A:P ratio ($P < 0.001$). Conversely, phloroglucinol promoted a shift in the fermentation pattern towards a higher acetate ($P < 0.001$) and A:P ratio ($P < 0.001$), and lower propionate ($P < 0.001$), isobutyrate ($P = 0.001$), butyrate ($P = 0.013$), isovalerate ($P = 0.030$) and valerate molar proportions ($P = 0.001$). The rumen fermentation pattern was not affected by the interaction between *A. taxiformis* and phloroglucinol supplementation. Quantitative PCR analysis showed a tendency (interaction, $P = 0.096$) to decrease the concentration of total bacteria when *A. taxiformis* and phloroglucinol were combined, compared to separate supplementations (**Table 9**). The rumen concentrations of archaea, protozoa and anaerobic fungi were not affected by any of the experimental treatments.

Table 9. Effect of the inclusion rate of *Asparagopsis taxiformis* (AT) and phloroglucinol (PG) on rumen fermentation parameters and the abundance of the main rumen microbial groups in goats after 14 days of treatment (Study 2).

	AT-		AT+		SEM	P-value		
	PG-	PG+	PG-	PG+		AT	PG	AT × PG
Lactate, µg/mL	47.4	53.6	52.9	51.5	3.16	0.824	0.745	0.597
Total VFA, mM	81.5	78.5	77.8	82.7	1.87	0.942	0.786	0.289
Individual VFA, mol/100 mol								
Acetate	69.1	75.0	61.7	69.0	1.03	<0.001	<0.001	0.568
Propionate	15.7	13.2	20.9	16.2	0.64	<0.001	<0.001	0.193
Isobutyrate	1.12	0.88	1.16	0.95	0.04	0.390	0.001	0.783
Butyrate	11.3	8.8	13.0	11.1	0.48	0.022	0.013	0.697
Isovalerate	1.18	0.88	1.15	1.05	0.05	0.461	0.030	0.247
Valerate	1.65	1.27	2.13	1.69	0.08	<0.001	0.001	0.792
A:P	4.44	5.79	3.09	4.28	0.21	<0.001	<0.001	0.745
Microbe (log gene copies/mg DM)								
Bacteria	10.5	10.8	10.8	10.7	0.13	0.403	0.637	0.096
Protozoa	7.74	7.71	7.89	7.79	0.08	0.166	0.404	0.686
Archaea	4.87	4.92	5.34	4.90	0.46	0.666	0.707	0.640
Fungi	11.1	11.2	11.6	11.3	0.29	0.243	0.914	0.522

AT-: *A. taxiformis* at 0% DM; AT+: *A. taxiformis* at 0,5% DM; PG-: phloroglucinol at 0% DM; PG+: phloroglucinol at 2% DM; SEM: standard error of the mean; VFA: volatile fatty acid; A:P: acetate:propionate ratio.

No significant differences were observed for dry matter intake (DMI) and body weight (BW) across treatments (**Table 10**). The addition of *A. taxiformis* decreased daily CH₄ emissions (CH₄ production), per unit of DMI (CH₄ yield) and per kg of BW by 33.9, 31.4 and 34.7%, respectively, compared to treatments without *A. taxiformis* ($P < 0.001$). The addition of phloroglucinol did not affect CH₄ emissions.

Supplementation with *A. taxiformis* also promoted a substantial increase in H₂ emission per day, per DMI and per BW being 35.7, 37.9 and 31.3 times higher than treatments without *A. taxiformis* supplementation, respectively ($P < 0.001$). Supplementation with phloroglucinol promoted a significant decrease in H₂ emissions (-67.3%, $P = 0.011$), per kg of DMI (-70.5%, $P = 0.008$) and per kg of BW (-72.4%, $P = 0.007$). However, these main effects were modulated by the interaction between *A. taxiformis* and phloroglucinol supplementation (AT × PG) for H₂ emissions ($P = 0.012$), per kg of DMI ($P = 0.008$) and per kg BW ($P = 0.008$). As a result, the combined supplementation of *A. taxiformis* and phloroglucinol decreased total expelled H₂, H₂ per kg of DMI, and H₂ per kg of BW compared to *A. taxiformis* alone. Likewise, the H₂ expelled per mol of CH₄ decreased was greater with *A. taxiformis* supplementation ($P < 0.001$), although the significant interaction (AT × PG) revealed that this increase was 2.3 times lower when animals were supplemented with phloroglucinol, than in those that did not receive such substrate ($P = 0.016$).

Table 10. Effect of the inclusion rate of *Asparagopsis taxiformis* (AT) and phloroglucinol (PG) on BW, DMI, CH₄ production and H₂ emissions in goats after 14 days of treatment (Study 2).

	AT-		AT+		SEM	P-value		
	PG-	PG+	PG-	PG+		AT	PG	AT × PG
BW, kg	40.4	39.3	39.8	39.7	0.89	0.973	0.759	0.782
DMI, kg/d	0.90	0.89	0.85	0.86	0.02	0.294	0.961	0.807
Methane emissions								
CH ₄ , L/d	45.4	42.2	27.1	30.8	1.78	<0.001	0.906	0.132
CH ₄ , L/kg of DMI	50.8	47.5	31.6	35.9	1.86	<0.001	0.823	0.101
CH ₄ , L/kg of BW	1.18	1.13	0.68	0.83	0.06	<0.001	0.545	0.231
Hydrogen emissions								
H ₂ , L/d	0.29 ^b	0.19 ^b	13.0 ^a	4.15 ^b	1.25	<0.001	0.011	0.012
H ₂ , L/kg of DMI	0.31 ^b	0.22 ^b	15.6 ^a	4.47 ^b	1.52	<0.001	0.008	0.008
H ₂ , L/kg of BW	0.01 ^b	0.005 ^b	0.37 ^a	0.10 ^b	0.04	<0.001	0.007	0.008
mol H ₂ /mol CH ₄ decreased	0 ^c	0 ^c	0.71 ^a	0.31 ^b	0.07	<0.001	0.082	0.016

AT-: *A. taxiformis* at 0% DM; AT+: *A. taxiformis* at 0,5% DM; PG-: phloroglucinol at 0% DM; PG+: phloroglucinol at 2% DM; SEM: Standard error of the mean; BW: body weight; DMI: dry matter intake. ^{a-c} Values within a row with different superscripts differ significantly at $P < 0.05$ (n=8) due to AT × PG interaction.

The rate of CH₄ production and H₂ emissions (L/h) followed a diurnal variation which was determined by the feeding pattern as shown in **Figure 14**. Methane production in treatments without *A. taxiformis* supplementation peaked at 1 h and 6 h, corresponding to post-prandial situations, and declined with the addition of *A. taxiformis* at the same times. In addition, two large peaks were observed for H₂ emissions at 1 h and 6 h in animals that received *A. taxiformis* alone, which correspond with CH₄ inhibition. However, these peaks were much less pronounced in animals that received *A. taxiformis* combined with phloroglucinol and absent in those administered phloroglucinol alone or fed the basal diet. Considering the diurnal fluctuations of CH₄ production and H₂ emissions within each treatment, three-time intervals were identified which correspond with i) the post-prandial effects after the first feeding/dosing (0 - 5 h interval), ii) the second feeding/dosing (5 - 10 h interval) and iii) the absence of feeding/dosing (10 - 24 h interval or overnight) (**Table 11**). Supplementation with *A. taxiformis* promoted a decrease in the CH₄ production for the three-time intervals, this decrease being much larger during the post-prandial periods (-60%, $P < 0.001$) than overnight (-23%, $P = 0.024$). During the period 5 to 10 h, the decrease in CH₄ production induced by *A. taxiformis* supplementation tended to be higher when the macroalgae was not combined with phloroglucinol (interaction, $P = 0.068$). As described before, H₂ emissions were increased with *A. taxiformis* supplementation ($P < 0.001$) and decreased with phloroglucinol supplementation ($P = 0.003$ and $P = 0.053$), but these effects only occurred during post-prandial periods (i and ii) and not overnight (iii). Moreover, the increase in H₂ emissions induced by *A. taxiformis* supplementation during the post-prandial periods was negligible when animals were supplemented with phloroglucinol but evident when animals were not supplemented with phloroglucinol (interaction, $P \leq 0.055$). This interaction was not detected during the 10 to 24h period which corresponded with a non-feeding period.

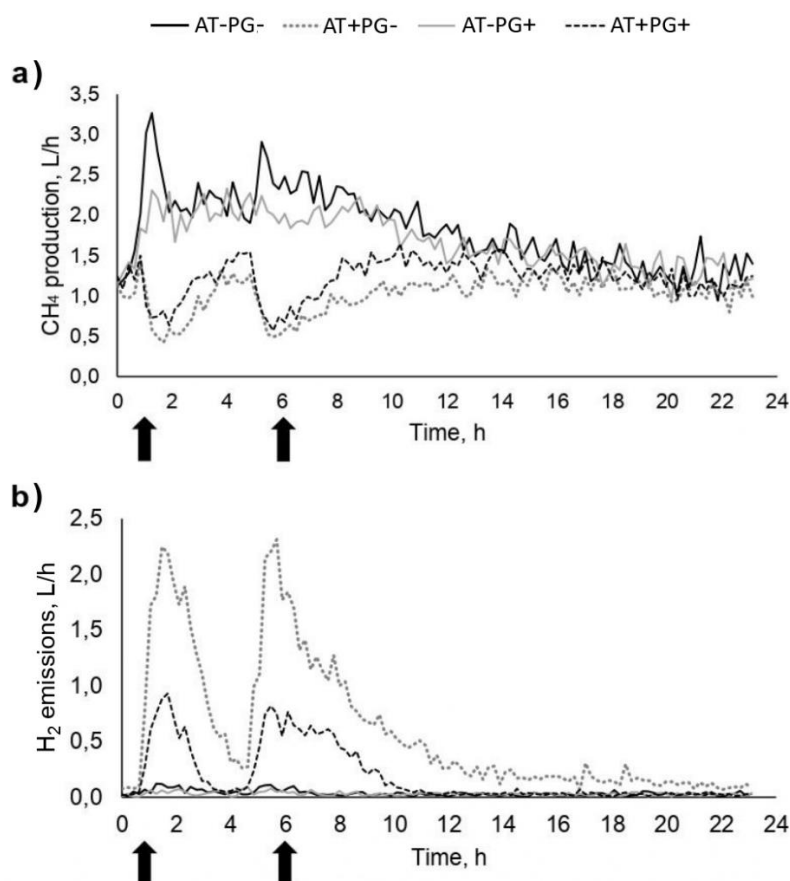


Figure 14. Averaged pattern of CH₄ (**Figure 14a**) and H₂ emissions (**Figure 14b**) observed in goats (n=8) during 24 h according to the treatments: basal diet (AT-PG-); *Asparagopsis taxiformis* at 0.5% DM (AT+PG-); phloroglucinol at 2% DM (AT-PG+); and the combination of *A. taxiformis* and phloroglucinol (AT+PG+). The arrows show feeding/dosing times.

Table 11. Effect of the inclusion of *Asparagopsis taxiformis* (AT) and phloroglucinol (PG) on averaged CH₄ production and H₂ emissions (L/h) at different intervals during 24 h.

	AT-		AT+		SEM	AT	P-value	
	PG-	PG+	PG-	PG+			PG	AT × PG
CH ₄ production, L/h								
0 h - 5 h	2.32	2.04	0.86	1.08	0.14	<0.001	0.836	0.146
5 h - 10 h	2.19	1.95	0.92	1.25	0.12	<0.001	0.754	0.068
10 h - 24 h	1.46	1.42	1.12	1.28	0.06	0.024	0.548	0.337
H ₂ emissions, L/h								
0 h - 5 h	0.07 ^b	0.05 ^b	1.30 ^a	0.41 ^b	0.11	<0.001	0.003	0.004
5 h - 10 h	0.03	0.03	0.92	0.36	0.10	<0.001	0.053	0.055
10 h - 24 h	0.03	0.03	0.17	0.03	0.03	0.170	0.199	0.184

AT-: *A. taxiformis* at 0% DM; AT+: *A. taxiformis* at 0,5% DM; PG-: phloroglucinol at 0% DM; PG+: phloroglucinol at 2% DM; SEM: Standard error of the mean. ^{a-b} Values within a row with different superscripts differ significantly at $P < 0.05$ (n=8) due to AT × PG interaction.

Study 3. Rumen microbial degradation of bromoform from red seaweed (*Asparagopsis taxiformis*) and its impact on rumen fermentation according to the type of diet

The results from the *in vitro* gas production test confirmed that different fermentation pattern was obtained by using either HC or HF substrates (**Table 12**). This was reflected not only in significantly greater volume of gas produced by HC substrate ($P = 0.046$) but also a significantly greater gas production rate ($P = 0.046$) at most time intervals. No significant differences were noted in total VFA production ($P = 0.243$), but the HC substrate promoted a higher molar proportion of propionate ($P = 0.001$), butyrate ($P = 0.008$) and valerate ($P = 0.021$), whereas the HF substrate promoted a higher acetate molar proportion ($P < 0.001$) (**Table 13**).

The addition of *A. taxiformis* at 2% DM significantly decreased the cumulative gas production (**Table 12**) at every time interval ($P < 0.001$), but not the VFA production (**Table 13**) after 72 h incubation ($P = 0.446$). Additionally, *A. taxiformis* treatment had a strong effect on fermentation pattern, promoting an increase in the molar proportions of propionate, butyrate and valerate ($P < 0.001$), and a decrease in the molar proportion of acetate ($P < 0.001$). **Table 13** also showed a significant interaction ($P = 0.003$) between *A. taxiformis* inclusion rate and the type of substrate (R \times S) for the A:P ratio indicating a larger decrease for the HF than for the HC substrate.

Table 12. Effect of the inclusion rate (R) of *Asparagopsis taxiformis* and the type of substrate (S) on the *in vitro* cumulative gas production and production rate at different incubation intervals (Study 3).

Substrate	HC		HF		SEM	P-value		
	0	2	0	2		R	S	R x S
<i>A. taxiformis</i> inclusion rate (% DM)								
Cumulative gas production, mL								
0 - 0.5 h	6.10	4.60	5.60	4.30	0.18	<0.001	0.046	0.560
0.5 - 1.5 h	15.2	10.9	14.5	10.0	0.40	<0.001	0.092	0.812
1.5 - 3 h	25.7	19.0	24.3	18.0	0.60	<0.001	0.079	0.731
3 - 6 h	41.5	31.6	37.3	29.0	1.21	<0.001	0.02	0.505
6 - 8 h	52.3	40.8	44.6	36.0	1.65	<0.001	0.004	0.395
8 - 12 h	66.4	52.5	55.2	44.3	1.37	<0.001	<0.001	0.309
12 - 16 h	83.6	66.9	69.1	55.8	2.19	<0.001	<0.001	0.461
16 - 24 h	93.3	75.6	77.5	63.2	2.36	<0.001	<0.001	0.488
24 - 48 h	115	94.0	105	85.9	2.74	<0.001	0.007	0.654
48 - 72 h	130	106	123	102	3.16	<0.001	0.108	0.772
Gas production rate, mL/h								
0 - 0.5 h	12.23	9.27	11.18	8.65	0.362	<0.001	0.046	0.560
0.5 - 1.5 h	9.09	6.23	8.96	5.69	0.300	<0.001	0.297	0.508
1.5 - 3 h	6.98	5.39	6.48	5.30	0.312	0.002	0.367	0.523
3 - 6 h	5.29	4.20	4.34	3.67	0.227	0.004	0.010	0.380
6 - 8 h	5.37	4.62	3.64	3.51	0.281	0.153	<0.001	0.293
8 - 12 h	3.52	2.93	2.66	2.07	0.139	0.002	<0.001	0.982
12 - 16 h	4.31	3.59	3.49	2.87	0.260	0.030	0.016	0.851
16 - 24 h	1.21	1.08	1.05	0.93	0.066	0.088	0.044	0.969
24 - 48 h	0.91	0.77	1.13	0.94	0.032	<0.001	<0.001	0.579
48 - 72 h	0.62	0.51	0.79	0.66	0.042	0.023	0.005	0.753

HC: High-concentrate substrate (alfalfa and barley 70:30 in DM); HF: High-forage substrate (alfalfa and barley 30:70 in DM); SEM: Standard error of the mean.

Table 13. Effect of the inclusion rate (R) of *Asparagopsis taxiformis* and the type of substrate (S) on rumen fermentation parameters at 72 h of incubation (Study 3).

Substrate	HC		HF		SEM	P-value		
	0	2	0	2		R	S	R x S
<i>A. taxiformis</i> inclusion rate (% DM)								
Total VFA, mM	82.2	80.1	78.0	72.8	4.580	0.446	0.243	0.745
VFA, mol/100 mol								
Acetate	62.9	52.4	66.7	56.0	0.347	<0.001	<0.001	0.886
Propionate	21.3	28.6	19.2	27.5	0.366	<0.001	0.001	0.218
Butyrate	9.07	12.13	8.35	10.7	0.310	<0.001	0.008	0.314
Isobutyrate	1.75	1.83	1.57	1.40	0.100	0.631	0.015	0.241
Isovalerate	2.85	2.38	2.45	2.05	0.208	0.065	0.115	0.866
Valerate	2.05	2.63	1.78	2.32	0.103	<0.001	0.021	0.898
A:P	2.96 ^b	1.84 ^c	3.49 ^a	2.05 ^c	0.038	<0.001	<0.001	0.003

HC: High-concentrate substrate (alfalfa and barley 70:30 in DM); HF: High-forage substrate (alfalfa and barley 30:70 in DM); SEM: Standard error of the mean; VFA: Volatile fatty acids; A:P: Acetate:propionate ratio. ^{a-c} Values within a row with different superscripts differ significantly at $P < 0.05$ due to R x D interaction.

The main effect of *A. taxiformis* inclusion on rumen fermentation was reflected in a substantial inhibition of CH₄ cumulative production ($P = 0.002$) and production rate ($P = 0.018$) for both diets across all time intervals considered (**Table 14**). During the initial incubation period (0 - 1.5 h), a significant interaction ($P = 0.029$) showed that the inhibition of CH₄ cumulative production and production rate were only detected with the HF substrate. This strong inhibition of methanogenesis resulted in increased H₂ production rate, which was significantly higher ($P = 0.006$) with *A. taxiformis* than without the macroalgae from 1.5 to 12 h of incubation (**Table 15**). Hydrogen cumulative production was significantly increased ($P = 0.020$) by HC compared to HF substrate at 12 h of incubation. From 24 h until the end of the incubation period, the effect of *A. taxiformis* on H₂ cumulative production significantly differed (significant interaction, $P < 0.032$) based on the type of diet, with a greater increase observed when *A. taxiformis* was included with HC substrate.

Table 14. Effect of the inclusion rate (R) of *Asparagopsis taxiformis* and the type of substrate (S) on the in vitro CH₄ cumulative production and production rate at different incubation intervals (Study 3).

Substrate <i>A. taxiformis</i> inclusion rate (% DM)	HC		HF		SEM	P-value		
	0	2	0	2		R	S	R x S
Cumulative CH ₄ , mL								
0 - 1.5 h	0.08 ^{ab}	0.05 ^{bc}	0.13 ^a	0.00 ^c	0.017	0.001	0.93	0.029
1.5 - 6 h	1.32	0.08	0.77	0.02	0.185	<0.001	0.137	0.218
6 - 12 h	1.95	0.12	1.85	0.03	0.329	<0.001	0.771	0.984
12 - 24 h	3.18	0.20	4.14	0.04	0.833	0.002	0.644	0.517
24 - 72 h	8.36	0.52	13.2	0.15	1.833	<0.001	0.252	0.187
CH ₄ production rate, μL/h								
0 - 1.5 h	56.3 ^{ab}	33.3 ^{bc}	85.2 ^a	2.30 ^c	11.50	0.001	0.93	0.029
1.5 - 6 h	274	5.91	143	3.62	38.70	<0.001	0.119	0.130
6 - 12 h	106	7.71	180	1.88	36.60	0.004	0.379	0.307
12 - 24 h	102	6.38	191	0.41	49.70	0.018	0.427	0.366
24 - 72 h	108	6.78	189	2.40	30.80	0.001	0.244	0.199

HC: High-concentrate substrate (alfalfa and barley 70:30 in DM); HF: High-forage substrate (alfalfa and barley 30:70 in DM); SEM: Standard error of the mean. ^{a-c} Values within a row with different superscripts differ significantly at $P < 0.05$ due to R x S interaction.

Table 15. Effect of the inclusion rate (R) of *Asparagopsis taxiformis* and the type of substrate (S) on the in vitro H₂ cumulative production and production rate at different incubation intervals (Study 3).

Substrate <i>A. taxiformis</i> inclusion rate (% DM)	HC		HF		SEM	P-value		
	0	2	0	2		R	S	R x S
Cumulative H ₂ , μL								
0 - 1.5 h	3.91	0.23	0.10	0.06	1.937	0.361	0.331	0.371
1.5 - 6 h	4.69	5.08	0.30	2.88	2.190	0.514	0.166	0.629
6 - 12 h	5.20	23.3	0.52	8.66	3.410	0.004	0.020	0.178
12 - 24 h	8.38 ^c	107 ^a	1.64 ^d	26.7 ^b	14.56	0.002	0.015	0.032
24 - 72 h	8.83 ^c	108 ^a	2.11 ^d	27.9 ^b	14.34	0.002	0.014	0.031
H ₂ production rate, μL/h								
0 - 1.5 h	2.61	0.15	0.07	0.04	1.291	0.361	0.331	0.371
1.5 - 6 h	0.17	1.08	0.04	0.63	0.205	0.006	0.191	0.450
6 - 12 h	0.08	3.03	0.04	0.96	0.540	0.006	0.082	0.094
12 - 24 h	0.27 ^c	6.99 ^a	0.09 ^d	1.51 ^b	1.011	0.003	0.021	0.028
24 - 72 h	0.01	0.02	0.01	0.02	0.010	0.274	0.698	0.726

HC: High-concentrate substrate (alfalfa and barley 70:30 in DM); HF: High-forage substrate (alfalfa and barley 30:70 in DM); SEM: Standard error of the mean. ^{a-c} Values within a row with different superscripts differ significantly at $P < 0.05$ due to R x D interaction.

The monitorization of CHBr₃ and CH₂Br₂ concentrations throughout the incubation process is showed in **Figure 15**. A rapid degradation of CHBr₃ was observed, with 70% degraded within the first 30 min and nearly 90% after 3 h of incubation. Most (> 99%) of the CHBr₃ was degraded within 12 h of incubation. In line with the observations on CHBr₃ degradation, CH₂Br₂ was not detected at 0 h but its presence was quickly detected in the samples after the incubation began and increasing rapidly until it peaked at 6 - 8 h of incubation. Then, a gradual decline in concentration was observed towards the end of the incubation period (18 to 72 h) at which around 50% of the maximum CH₂Br₂ detected at 6 h was no longer present in the samples. Neither CHBr₃ degradation nor CH₂Br₂ synthesis were significantly affected by the type of substrate used (HC or HF).

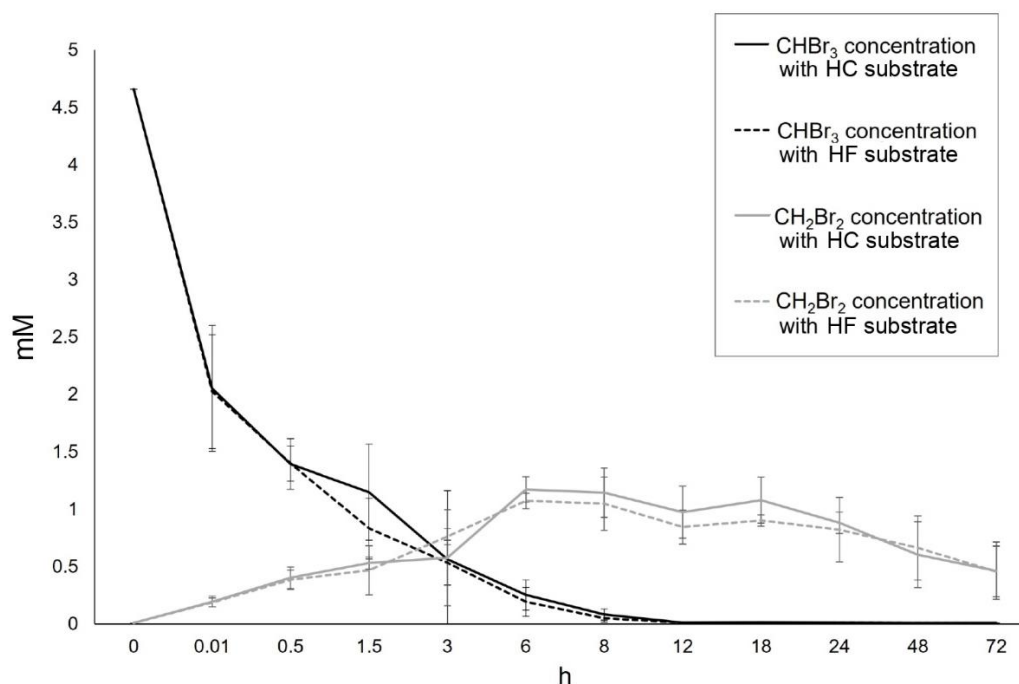


Figure 15. Effect of supplementing with *Asparagopsis taxiformis* at 2% DM to high-concentrate (HC) and high-forage (HF) substrates on the *in vitro* concentration (mM) of bromoform (CHBr₃) and dibromomethane (CH₂Br₂) at different incubation times (h) (Study 3).

Study 4. Dose-response effect of bromoform on methanogens growth

The increasing addition of CHBr₃ promoted a quadratic response in the inhibition of the growth of *Methanobrevibacter smithii*, *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanosphaera stadtmanae*, *Methanobrevibacter millerae*, *Methanothermobacter wolfei*, and *Methanobacterium mobile*, with the highest drop observed for concentrations between 2 and 10 μ M, depending on the methanogen species (Table 16). Moreover, *M. barkeri* (Figure 16), *Methanosphaera stadtmanae* (Figure 16C), *M. ruminantium* (Figure 16C) and *M. millerae* (Figure 16E) were the most affected strains since all of them experienced a high inhibition even when incubated with low concentrations of CHBr₃. On the contrary, *M. smithii* (Figure 16A) and *M. mobile* (Figure 16G) could be considered the most resistant species to the anti-methanogenic activity of CHBr₃, as their growing rates were only decreased by around 30% even when incubated with the highest CHBr₃ dose. The incubation time also modulated the CH₄ inhibition promoting a linear decrease for *M. smithii* and linear increases for *M. ruminantium* and *M. barkeri*, while quadratic responses were noted for *M. stadtmanae* and *M. millerae*.

Table 16. Effect of bromoform concentrations (C) and incubation times (T) on CH₄ inhibition rate (%) in different archaeal species (Study 4).

	BES 100 µM	CHBr ₃ concentration, µM				SEM	Contrasts C	Time							SEM	Contrasts T
		0.4	2	10	50			d 2	d 5	d 7	d 9	d 12	d 15	d 17		
<i>Methanobrevibacter smithii</i>	17.8±3.46	14.3 ^b	19.0 ^b	34.4 ^a	32.9 ^a	2.96	L**, Q***	27.5 ^{abc}	35.4 ^a	32.3 ^{ab}	28.5 ^{abc}	20.0 ^{bcd}	17.7 ^{cd}	14.5 ^d	3.92	L**
<i>Methanobrevibacter ruminantium</i>	60.3±4.05	58.4	62.9	71.1	68.7	3.98	Q [†]	54.2 ^b	72.2 ^{ab}	54.5 ^b	60.3 ^{bc}	60.3 ^{bc}	76.1 ^a	79.1 ^a	5.26	L**
<i>Methanosphaera stadtmanae</i>	31.2±3.35	54.8 ^b	73.7 ^a	75.4 ^a	76.6 ^a	1.71	L*, Q**	89.9 ^a	72.7 ^b	73.8 ^b	74.0 ^b	56.7 ^c	58.2 ^c	65.7 ^{bc}	2.26	L***, Q*
<i>Methanosarcina barkeri</i>	40.3±3.81	37.6 ^{ab}	24.7 ^b	31.8 ^{ab}	46.5 ^a	3.28	L*	29.9	28.7	28.5	35.0	38.9	40.8	44.2	4.34	L [†]
<i>Methanobrevibacter millerae</i>	28.7±5.14	42.0 ^b	63.3 ^a	69.2 ^a	75.6 ^a	5.56	L**, Q*	47.5 ^c	54.6 ^{bc}	53.4 ^{bc}	71.6 ^{ab}	77.1 ^a	69.9 ^{ab}	63.8 ^{abc}	7.35	L*, Q [†]
<i>Methanothermobacter wolfei</i>	19.6±5.75	30.5 ^b	39.9 ^{ab}	48.6 ^a	48.4 ^a	3.42	L*, Q**	43.3 ^a	20.5 ^b	47.9 ^a	50.6 ^a	40.0 ^a	42.7 ^a	47.8 ^a	4.52	NS
<i>Methanobacterium mobile</i>	10.2±4.05	22.3 ^b	33.3 ^a	19.9 ^b	30.1 ^a	2.67	Q [†]	30.7 ^b	20.1 ^d	16.0 ^d	23.5 ^{bcd}	43.7 ^a	20.6 ^{cd}	30.3 ^{bc}	3.53	NS

BES: 2-bromoethanesulphonate; CHBr₃: bromoform. In the first column, mean±SE (standard error). For the treatments, SEM (standard error of the mean). BES treatment was not included in the statistical analysis. ^{a-d} Values within a row with different superscripts differ significantly at $P < 0.05$ (n=3). Contrast: NS, not significant; L, linear response; Q, quadratic response; *** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$; [†] $P < 0$

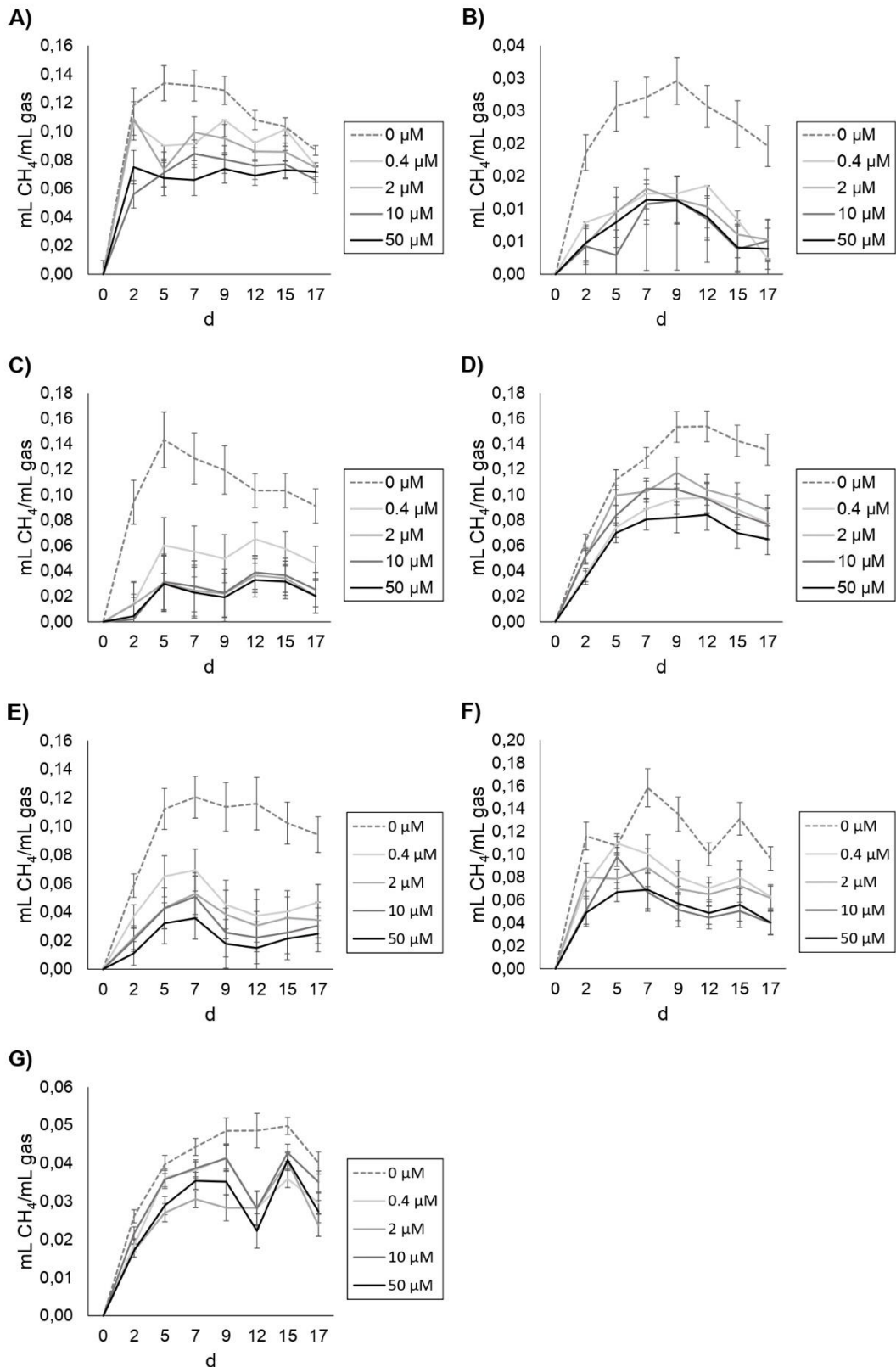


Figure 16. Effect of bromoform (CH₃Br) at different concentrations (0, 0.4, 2, 10 and 50 μM) on the growth (mL CH₄/mL gas) of *Methanobrevibacter smithii* (A), *Methanobrevibacter ruminantium* (B), *Methanosphaera stadtmanae* (C), *Methanosarcina barkeri* (D), *Methanobrevibacter millerae* (E), *Methanothermobacter wolfei* (F) and *Methanobacterium mobile* (G) (Study 4).

DISCUSIÓN

Discussion

Background

The contribution of enteric CH₄ to greenhouse gas emissions (Gill et al., 2010) and its associated loss of gross energy intake to the animal (2-12%; Johnson & Johnson, 1995) have evidenced the need for strategies to reduce CH₄ production by ruminants (Ungerfeld, 2018). In recent years, different nutritional strategies based on the use of feed additives have been developed to mitigate enteric CH₄ emissions (Beauchemin et al., 2022; Hegarty et al., 2021; Honan et al., 2021). Among them, both synthetic and natural compounds have been identified for their ability to reduce enteric CH₄ production by targeting one of three distinct stages in the metabolic process of CH₄ synthesis in the rumen: i) directly inhibiting the methanogenesis, ii) decreasing the production of H₂ in the rumen, or iii) providing alternative sinks for H₂ disposal in the rumen. The additives that have demonstrated the highest efficacy in reducing enteric CH₄ production (reductions > 25%) are those based on the direct inhibition of the methanogenic activity of rumen archaea (Leng, 2014). Among these compounds, the halogenated compounds BES, chloroform and bromochloromethane (BCM) have demonstrated their specific inhibitory effect on rumen methanogens (Patra et al., 2017). However, these compounds are not accepted for practical use due to the short-lived persistence of their effects on the rumen microbiota and their potential carcinogenic or contaminating properties. As a result, other alternatives have arisen in recent years. Novel synthesised nitrocompounds, such as 3-nitrooxypropanol (3NOP) (Kebreab et al., 2023), and plant-based supplements rich in halogenated compounds, such as red macroalgae from the genus *Asparagopsis* (Glasson et al., 2022), have been found to decrease CH₄ production under *in vitro* and *in vivo* conditions. In particular, *A. taxiformis* and *A. armata* are two species known for accumulating antimethanogenic compounds, primarily CHBr₃, which effectively inhibit enzymes critical to CH₄ production (Machado et al., 2016b). However, the inhibition of rumen methanogenesis leads to H₂ accumulation in the rumen that otherwise would be utilised by methanogens. This excess of H₂ in the rumen makes this molecule available for being redirected towards alternative metabolic pathways that consume H₂ and yield fermentation products such as VFA (Ungerfeld, 2015). This has been evidenced by the shift in the fermentation profile towards propionate production (a H₂-incorporating pathway) that has been consistently reported when CH₄ inhibitors were included in the diet of ruminants (Hristov et al., 2015; Martinez-Fernandez et al., 2016; Stefenoni et al., 2021). Nevertheless, methanogenesis inhibition is yet accompanied by a substantial

increase in H₂ expelled across all these studies, indicating that this process can still be optimised to minimise the energy lost by the host (Ungerfeld et al., 2022). Novel nutritional strategies based on feeding substrates that can modify the rumen microbiota and act as H₂ acceptors could facilitate the redirection of energy towards useful fermentation products for the ruminant resulting in potential increases in productivity.

A potential nutritional strategy to use part of the excess H₂ consists of dietary supplementation with phenolic compounds, which constitute a diverse group of secondary plant metabolites characterised by the presence of benzene rings with one or more hydroxyl groups (Minatel et al., 2017). Phenolic compounds can be degraded by rumen bacteria into energy yielding products (mainly acetate) with H₂ or formate consumption (Krumholz & Bryant, 1986; McSweeney et al., 2001), thus representing an alternative pathway for allocating the excess H₂ when methanogenesis is inhibited towards the synthesis of beneficial products for the ruminant. Martinez-Fernandez et al. (2017) showed that, under the methanogenesis inhibition scenario induced by chloroform, the supplementation of a phenolic compound decreased H₂ expelled by redirecting H₂ towards acetate production in beef cattle. However, this observation had not been proven under practical CH₄ mitigation strategies such as supplementation with *A. taxiformis* or under other ruminant species. In the first study of this thesis (**Study 1**), three consecutive *in vitro* experiments were conducted to evaluate the impact of CH₄ inhibitors (**Experiment 1.1**), phenolic compounds (**Experiment 1.2**), and the combination of both (**Experiment 1.3**) on rumen fermentation. Then, the most promising combination that reduced CH₄ production while improving rumen fermentation (*A. taxiformis* + phloroglucinol) was tested with increasing concentrations of the phenolic compound to maximise its potential (**Experiment 1.4**). After that, the optimised combination of the methanogenesis inhibitor and the phenolic compound was evaluated as a nutritional strategy *in vivo* with adult goats (**Study 2**). However, to classify an additive-based strategy as effective in mitigating enteric CH₄ emissions, a more comprehensive evaluation than just assessing the *in vitro* and *in vivo* performance is required. Other critical aspects include a better understanding of the mode of action, its interaction with the diet and ensuring its practicality and safety for utilization (e.g., if there are residues in animal products) (Petri et al., 2020). These are requirements to fulfil for any additive to be legally registered under the European Food Safety Authority (EFSA) regulation in the EU (Rychen et al., 2018). In this line, two *in vitro* experiments were conducted to study

the degradation pattern of the main antimethanogenic compound of *A. taxiformis* (CHBr₃) in the rumen and its impact on rumen fermentation according to the type of diet (**Study 3**), and its dose-response effect on the growth of a range of methanogen species (**Study 4**).

The sections below follow the same order of studies as described above to develop a sequential discussion to connect outcomes before conclusions can be reached.

Dose-response effect of *Asparagopsis taxiformis* and phenolic compounds on *in vitro* rumen fermentation

Increasing concentrations of *A. taxiformis* (0, 1, 2, 3, 4, and 5% DM) with a CHBr₃ concentration of 6 mg/g DM was used in the first experiment of this thesis (**Experiment 1.1**) to evaluate the dose-response effect on rumen fermentation. In agreement with Chagas et al. (2019), increasing levels of *A. taxiformis* resulted in a quadratic response in CH₄ production. The lowest dose of *A. taxiformis* used (1% DM) was sufficient to decrease CH₄ production by 95%, while higher doses (2-5% DM) inhibited CH₄ production to undetectable levels. These results evidenced that *A. taxiformis* at low inclusion rates represents a potent inhibitor of rumen methanogenesis under laboratory conditions. In accordance with our results, Machado et al. (2016a) reported a 85% reduction of CH₄ production with an inclusion rate of 1% of the organic matter (OM) of the substrate, and a nearly total reduction at doses above 2% OM. Kinley et al. (2016) also reported that CH₄ production was fully inhibited at an inclusion rate of 2% OM. Roque et al. (2019a) reported a 95% reduction in CH₄ production by supplementing *A. taxiformis* at 5% OM. Chagas et al. (2019) further demonstrated that *A. taxiformis* with a similar CHBr₃ content (6.8 mg/g DM) at a lower rate of inclusion (0.5% DM) almost completely inhibited CH₄ production *in vitro*. Conversely, Booke et al. (2020) observed that *A. taxiformis* with lower bromoform concentration (2.3 mg/g DM) reduced CH₄ production by up to 74% in *in vitro* rumen fermentation. Therefore, CHBr₃ concentration is an important factor to consider when evaluating *A. taxiformis* effectiveness. Indeed, other red and brown seaweeds have shown minimal impact or no influence on CH₄ production because of their low or undetectable levels of CHBr₃ (Brooke et al., 2020; Eason & Fennessy, 2023; Terry et al., 2023). The *in vitro* experiment and all the above-mentioned studies with *A. taxiformis* used diets with a high proportion of forage. Therefore, the impact of the diet composition on *A. taxiformis* antimethanogenic potential

cannot be inferred by comparing only the results described above. Later on, a follow-up study specifically addressed this aspect considering two different types of diets (**Study 3**). The halogenated compound BES was also tested in increasing concentrations (0, 4, 8, 12, 16, and 20 μM), based on Konisky (1990). The unfavourable toxicological profile of BES prevents its practical application as a mitigation strategy, but the magnitude of its antimethanogenic effect makes it a valuable reference inhibitor for testing other feed additives. The highest dose of BES reduced CH_4 production by 74%. Therefore, *A. taxiformis* at 1% DM could be considered more effective in inhibiting CH_4 production (-95%) than BES at 20 μM (-74%) when tested under identical *in vitro* conditions. Other studies reported that 50 μM BES nearly suppressed methanogenesis (Ungerfeld et al., 2019), which would be in line with the CH_4 reductions observed for *A. taxiformis* at higher doses (2-5% DM).

The decrease in CH_4 production from *A. taxiformis* was consistent with an increase in H_2 accumulation. Similarly, BES showed a tendency to increase H_2 production. This is in line with observations in previous *in vivo* studies with *A. taxiformis* (Kinley et al., 2020; Roque et al., 2021; Stefenoni et al., 2021), halogenated CH_4 analogues (Martinez-Fernandez et al., 2016; Mitsumori et al., 2012) and 3NOP (Hristov et al., 2015; Lopes et al., 2016; Vyas et al., 2016b). Elevation of H_2 was expected as methanogenesis is the main pathway of H_2 disposal in the rumen. Dihydrogen is a key product of rumen fermentation and thermodynamically controls the VFA production (Ungerfeld, 2020). The increase of H_2 partial pressure resulted from methanogenesis inhibition could theoretically lead to a displacement from acetate to propionate production, as acetate production generates H_2 while propionate production consumes H_2 (Janssen, 2010). This could explain the dose-dependent decrease in the A:P ratio resulting from *A. taxiformis* supplementation at increasing concentrations. Likewise, previous studies reported that the molar proportion of acetate decreased whereas propionate increased, as *A. taxiformis* inclusion levels increased (Chagas et al., 2019; Kinley et al., 2016; Machado et al., 2016a). In fact, most feed additives that reduce CH_4 production have demonstrated a concomitant reduction in the A:P ratio (Abecia et al., 2012; Hristov et al., 2015), including BES in this study. This suggests that rumen fermentation favours propionate production when methanogenesis is inhibited since propionate production serves as an alternative H_2 sink (Ungerfeld, 2015). As a result of this increase in propionate, an indirect decrease in the H_2 -producing acetate production is often observed under a methanogenesis inhibition

scenario. A decreased A:P ratio is associated with increased milk yield, as propionate synthesis results in an increase in glucose and subsequently lactose, which ultimately determines to a great extent milk production. Some previous studies reported that *A. taxiformis* at 2-5% OM decreased VFA production, suggesting that the accumulated H₂ in the rumen could compromise rumen fermentation (Kinley et al., 2016; Machado et al., 2016a). However, we did not observe a decrease in total VFA concentration with *A. taxiformis* at 1-5% DM, according to Roque et al. (2019a). The rest of the fermentation variables studied were not affected by the inclusion of *A. taxiformis*. Then, *A. taxiformis* at a dose of 2% DM was suggested to be optimal to provide a strong inhibition of methanogenesis without impairing microbial fermentation.

As mentioned above, there are other nutritional strategies to mitigate CH₄ production by promoting metabolic pathways that can compete with archaea for H₂, such as acetogenesis (Gagen et al., 2015), propionogenesis (Newbold et al., 2005), nitrate and sulphate reduction (van Zijderveld et al., 2010), formate formation (Leng, 2014), increases of microbial biomass production (Ungerfeld, 2015) and organic acids degradation (Newbold et al., 2005; Ungerfeld et al., 2003). Organic acids, such as propionate precursors, can be reduced by some rumen bacterial species using H₂ as electron donor. Aspartate, malate, fumarate, and acrylate have been tested as direct H₂ acceptors, or compounds metabolised to electron acceptors (Newbold et al., 2005; Ungerfeld et al., 2003). However, the use of these organic acids as feed additives presents some drawbacks that limit their practical application, such as concerns over palatability (Bayaru et al., 2001), rumen acidification (Asanuma et al., 1999), inconsistency of the effects produced, or their high cost (Newbold & Rode, 2006). Thus, there is an interest in searching for compounds with commercial potential that can be metabolically reduced by rumen microbes and, at the same time, yield end products that can be used by the host animal as energy sources. There is a group of tannins that can be hydrolysed into carbohydrates and phenolic constituents, mainly gallic acid, which is further converted to pyrogallol, phloroglucinol or resorcinol by the rumen microbiota (McSweeney et al., 2001). Then, these phenolic compounds can be mainly degraded into acetate by some rumen bacteria with H₂ consumption under anaerobic conditions (Armstrong & Patel, 1994; Krumholz & Bryant, 1986; Tsai et al., 1976).

The second *in vitro* experiment in this thesis (**Experiment 1.2**) evaluated the impact of several phenolic compounds (phenol, catechol, resorcinol, hydroquinone, phloroglucinol,

pyrogallol, gallic acid) and formic acid at 0, 2, 4 or 6 mM on rumen fermentation. Results indicated that none of the phenolic compounds but phloroglucinol and pyrogallol had an effect on CH₄ production under the evaluated doses (up to 6mM). These findings are consistent with Wei et al. (2019), who found that up to 4.8 mM gallic acid did not affect CH₄ production. In line with Sarwono et. al (2019), who reported a 18-32% reduction in CH₄ production when phloroglucinol was supplemented at 6 mM under *in vitro* conditions, our work showed a 47% reduction in CH₄ production with the same concentration of phloroglucinol. This suggests that phloroglucinol reducing bacteria may compete with methanogens for available H₂ even in the presence of hydrogenotrophic methanogenesis, as the reduction of phloroglucinol to acetate is likely to be thermodynamically favourable (ΔG° of -158 kJ/mol; Kaiser & Hanselmann, 1982; Krumholz & Bryant, 1986). However, Sarwono et. al (2019) observed a decrease in the relative quantity of methanogens due to phloroglucinol supplementation and suggested that the antimethanogenic effect of phloroglucinol could be attributed to its toxicity. This mode of action based on the inhibition of methanogens' growth has also been reported for pyrogallol (Field & Lettinga, 1987) and plant polyphenol extracts (Jayanegara et al., 2012). Moreover, phloroglucinol was the only phenolic compound that increased total VFA production and changed VFA profile by increasing A:P ratio. Sarwono et al. (2019) reported an increase in total VFA and A:P ratio with phloroglucinol in high forage:concentrate substrate (as noted in our study), but decreased VFA production without increasing acetate in low forage:concentrate substrate, possibly as a result of a lower H₂ availability. A decrease in ammonia-nitrogen would have been expected due to the potential formation of complexes between the free hydroxyl group of the phenolic compounds and the carbonyl groups of peptides on the protein (McSweeney et al., 2001). However, none of the phenolic compounds had an effect on ammonia-nitrogen. In short, the phenolic compounds at 6 mM did not negatively impact rumen fermentation and could be considered for further testing in the subsequent incubation.

Reducing methane production while improving rumen fermentation *in vitro*

Previous *in vivo* studies showed that inhibiting methanogenesis by the addition of *A. taxiformis* (Kinley et al., 2020; Roque et al., 2021; Stefenoni et al., 2021) or other antimethanogenic supplements such as synthetic halogenated compounds (Martinez-Fernandez et al., 2016; Mitsumori et al., 2012) and 3NOP (Hristov et al., 2015; Lopes et

al., 2016; Vyas et al., 2016b) lead to a H₂ redirection into energy-yielding metabolites such as propionate (Janssen, 2010), while an important proportion of the unutilised H₂ accumulates in the rumen and is ultimately expelled out by the animal. These findings were observed under *in vitro* conditions in **Experiment 1.1**. The accumulation of H₂ in the rumen limits the reoxidation of NADH, which would theoretically decrease nutrient catabolism (Wolin et al., 1997). Furthermore, the exhaled H₂ represents a moderate energy loss to the animal (Ungerfeld et al., 2022). Given the theoretical potential of phenolic compounds to be degraded by rumen bacteria into energy-yielding metabolites with H₂ consumption, they could act as alternative H₂ acceptors when methanogenesis is inhibited. Therefore, the combined application of a methanogenesis inhibitor and phenolic compounds could improve the effects of each other on CH₄ production and rumen fermentation. Martinez-Fernandez et al. (2017) demonstrated that the potential of the phenolic compound phloroglucinol as H₂ acceptor was maximised when supplemented in combination with chloroform as a methanogenesis inhibitor in the rumen of beef cattle. This thesis described for the first time the effect of a range of phenolic compounds supplemented in combination with an algae-based methanogenesis inhibitor when tested *in vitro* using rumen fluid from goats and aims to provide some recommendations for their further *in vivo* applications.

In the third *in vitro* experiment of this thesis (**Experiment 1.3**), CH₄ production was further reduced, reaching complete inhibition, by all phenolic compounds at 6 mM when combined with *A. taxiformis* at 2% DM, compared with *A. taxiformis* alone. Phloroglucinol and pyrogallol at 6 mM also reduced H₂ accumulation, but only phloroglucinol increased total VFA production and acetate molar proportion. These results agree with studies by Conradt et al. (2016), Patel et al. (1981) and Tsai et al. (1976), which reported that several rumen bacteria classified as *Eubacterium oxidoreducens*, *Streptococcus bovis*, and *Coprococcus* spp. could reduce phloroglucinol to dihydrophloroglucinol, using NADPH or formate as the electron donors, thereby alleviating the partial pressure of H₂ in the rumen. Specifically, three phloroglucinol reductases belonging to the family of NADPH dehydrogenases/reductases have been identified as responsible for the anaerobic degradation of phloroglucinol (Conradt et al., 2016). Then, the hydrolytic ring cleavage of the dihydrophloroglucinol molecule could produce mainly acetate and carbon dioxide (CO₂). Butyrate can also be an end-product derived from phloroglucinol degradation (Conradt et al., 2016). However, no effect on

butyrate molar proportion was observed by phloroglucinol supplementation. In agreement with Martinez-Fernandez et al. (2017), phloroglucinol addition when methanogenesis had been inhibited resulted in greater acetate formation with less gas H₂ produced per mole of CH₄ decreased. Therefore, the negative impact of H₂ accumulation in the rumen caused by *A. taxiformis* supplementation can be alleviated by the addition of phloroglucinol, stimulating microbial groups which utilize H₂ as reductant in the phloroglucinol degradation pathway (Martinez-Fernandez et al., 2017).

Theoretically, the other phenolic compounds tested in this experiment could potentially be converted into phloroglucinol, thereby producing VFA (Krumholz & Bryant, 1986). However, none of the phenolic compounds led to increased acetate production. Many studies investigating the fate of metabolites derived from hydrolysable tannins in the ruminant reported an incomplete transformation of gallic acid, pyrogallol, resorcinol, phloroglucinol and other phenolic metabolites into VFA (**Figure 17**; Lotfi, 2020). The transformation of phenolic compounds in the rumen are the result of extracellular and intracellular enzymatic activity and cross-feeding relationships between microbes, whereas the fermentation of phloroglucinol into VFA is an intracellular enzymatic activity that needs the transport of phloroglucinol into the microbial cell (Lotfi, 2020). Some of the enzymes involved in the metabolism of phenolic compounds are gallic acid decarboxylase (E.C. 4.1.1.59), pyrogallol 1,2 dioxygenase (E.C.1.13.11.35), phloroglucinol reductase (E.C.1.3.1.57), dihydrophloroglucinol hydrolase (E.C.3.7.1), pyrogallol phloroglucinol isomerase (E.C.5.4.99) and phenol oxidase (Jana et al., 2014). The microorganisms involved in this process are not typical members of normal rumen microbiota (Krause et al., 2005). Therefore, the interconversion of the phenolic compounds largely depends on the adaptation of the rumen microbiota to the presence of phenolic compounds (Theodorou et al., 1987). Moreover, strains such as *Coprococcus* sp. Pe₁₅ have demonstrated the ability to metabolise phloroglucinol into VFA, but not pyrogallol into phloroglucinol. Whereas phloroglucinol to acetate conversion is a favourable reaction thermodynamically ($\Delta G^\circ = -158$ kJ/mol; Krumholz & Bryant, 1986), the conversion of phenolic compounds to phloroglucinol seems difficult to achieve in the rumen. On the basis of these factors, phloroglucinol was considered as the most promising phenolic compound to redirect H₂ from methanogenesis inhibition into the synthesis of energy-yielding metabolites.

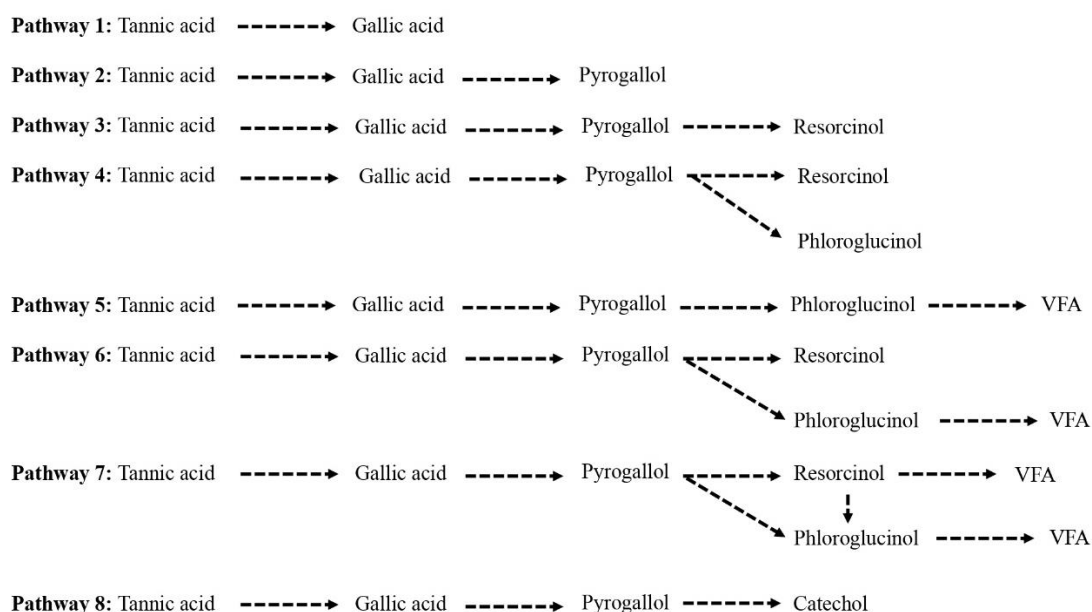


Figure 17. Proposed and targeted pathways for hydrolysable tannins metabolism by rumen microbiota. Adapted from Lotfi (2020).

Optimising the potential of phloroglucinol as hydrogen acceptor under methanogenesis inhibition *in vitro*

In view of the positive outcomes from **Experiment 1.3**, it was considered important to evaluate a wider range of phloroglucinol concentrations (0, 6, 16, 26, 36 mM) when methanogenesis is inhibited in order to maximise the effect on VFA production without affecting overall rumen fermentation (**Experiment 1.4**). The results showed that increasing doses of phloroglucinol when combined with *A. taxiformis* led to a response on the fermentation variables studied. Tsai et al. (1976) reported that 1 mole of H₂ is used to degrade 1 mole of phloroglucinol to 2 moles of acetate and 2 moles of CO₂. In agreement, our study found an inverse relationship between H₂ accumulation and acetate. As H₂ accumulation (expressed in relation to VFA production) decreased with the increasing dosage of phloroglucinol, acetate concentration increased in a dose-dependent manner (**Figure 18**). Moreover, the progressive increase in total gas produced observed in this study could be related to the increase in CO₂ production caused by the degradation of phloroglucinol (Tsai et al., 1976).

The increasing doses of phloroglucinol also resulted in a decrease in pH that could be explained by the increase in total VFA concentration, which in turn could be interpreted

as a further indication of increased fermentative activity (Ungerfeld, 2020). Moreover, the lactate accumulation and the decrease in propionate molar proportion reported in this work could indicate an inhibition of the acrylate pathway for propionate synthesis (Prabhu et al., 2012), which would be competing for reducing equivalents with the phloroglucinol degradation pathway. The decrease in ammonia-nitrogen concentration observed in this experiment could be associated with the ability of phenolic compounds to bind dietary proteins via their hydroxyl groups, increasing the resistance of the proteins to microbial degradation (McSweeney et al., 2001). With some diets, a decrease in the concentration of NH₃-N in the rumen may lead to a decrease in urinary N excretion, which would result in reduced emissions of ammonia and nitrous oxide and therefore of greenhouse gas (Carulla et al., 2005; Dijkstra et al., 2018). Additionally, the decrease in ammonia-nitrogen concentration is consistent with the decrease in the molar proportion of isobutyrate and isovalerate, which originate from deamination of branched-chain amino acids (Apajalahti et al., 2019).

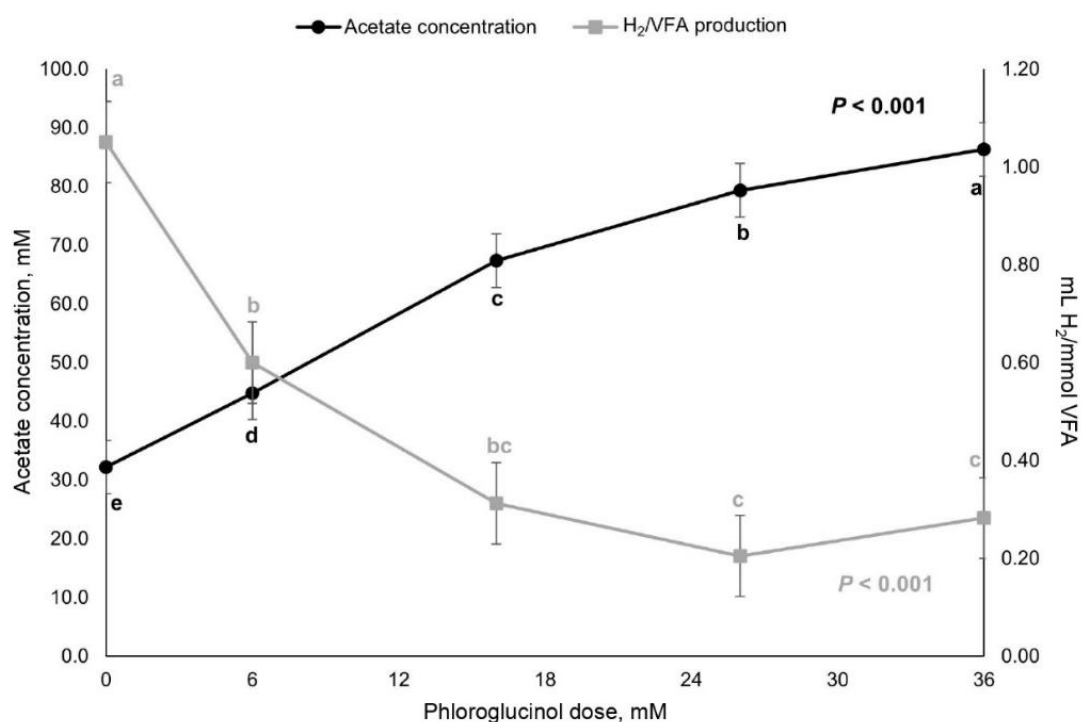


Figure 18. Effect of phloroglucinol at different initial concentration (0, 6, 16, 26, 36 mM) when combined with *Asparagopsis taxiformis* at 2% DM on dihydrogen production per total volatile fatty acids production (mL/mmol) and acetate concentration (mM) after 5 days of incubation using rumen fluid from goats. VFA = volatile fatty acids. ^{a-e} Within a row means with different superscripts differ (n=4).

The addition of phloroglucinol had no effect on the abundance of total bacteria. McSweeney et al. (2001) reported that polyphenolic compounds inhibit the population density of major cellulolytic bacteria in the rumen and lead to decrease of digestibility. Sarwono et al. (2019) showed that phloroglucinol supplementation lowered the relative abundance of *Ruminococcus albus*, but did not affect other cellulolytic species, such as *Ruminococcus flaveciens* or *Fibrobacter succinogenes*. Moreover, phloroglucinol would be expected to shift the composition of the bacterial population by stimulating specific microbial groups capable of using H₂ in the metabolism of phloroglucinol to acetate and butyrate. Martinez-Fernandez et al. (2017) reported that the combination of chloroform and phloroglucinol promoted an increase in the relative abundance of *Coprococcus* spp., which are relevant bacteria in phloroglucinol degradation (Conradt et al., 2016; Tsai et al., 1976). The present study also showed that the abundances of protozoa, archaea and anaerobic fungi were decreased by phloroglucinol supplementation, which suggests that phloroglucinol could have an anti-microbial effect on those communities. In agreement with that, de Paula et al. (2016) observed a reduction of *Entodinium* protozoa when different phenolic compounds were supplemented in the diet. Kayembe et al. (2013) reported the toxicity of phenol, resorcinol, hydroquinone and pyrogallol to methanogens, and demonstrated the inverse correlation of the methanogenic toxicity with the number of hydroxyl groups on the aromatic compound. Sarwono et al. (2019) also observed a decrease in the relative abundance of methanogens with the addition of phloroglucinol. Zuhainis et al. (2007) found that certain phenolic monomers decreased rumen fungal population. These findings suggest that further analyses of the rumen microbiota are needed to clarify the mechanisms of action of phenolic compounds (e.g., phloroglucinol) in the rumen.

In Martinez-Fernandez et al. (2017), phloroglucinol was supplied in the diet of beef cattle by progressively increasing its dose during the first 10 days up to 75 g/100 kg live weight, which was estimated to be equivalent to about 40 mM in the rumen. In agreement, **Study 1** of this thesis demonstrated that phloroglucinol could be added *in vitro* up to similar concentrations to maximise H₂ capture and acetate production without compromising the overall fermentation. The hypothesis previously demonstrated by Martinez-Fernandez et al. (2017) using chloroform as a methanogenesis inhibitor was confirmed in our *in vitro* experiment, but the practical potential of combining *A. taxiformis* and phloroglucinol as a CH₄ mitigation strategy still needed to be confirmed *in vivo*.

Evaluating the nutritional strategy of combining phloroglucinol and *Asparagopsis taxiformis* in goats

The efficacy of combining *A. taxiformis* and phloroglucinol on inhibiting CH₄ production, preventing H₂ accumulation and promoting an increased acetate production was demonstrated *in vitro* (**Study 1**). Then, an *in vivo* study was conducted to analyse the effect of combining *A. taxiformis* and phloroglucinol to decrease CH₄ emissions and improved rumen fermentation efficiency through a more efficient H₂ utilization in adult goats (**Study 2**).

A. taxiformis was shown to nearly inhibit enteric CH₄ emission *in vitro*, whereas *in vivo* research in sheep (Li et al., 2016), beef cattle (Kinley et al., 2020; Roque et al., 2021), and dairy cows (Krizsan et al., 2023; Stefenoni et al., 2021) have reported a large variation due to differences in the inclusion rate, CHBr₃ concentration, animal species and diet formulation (Hegarty et al., 2021). Li et al. (2016) reported a 15% decrease in CH₄ production in Merino sheep fed *A. taxiformis* at 0.5% OM, whereas Stefenoni et al. (2021) indicated CH₄ reductions up to 80% using a similar concentration (0.5% DM) in dairy cows (Stefenoni et al., 2021). A meta-analysis of the effects of feeding predominantly *A. taxiformis* to cattle found a 37% mean reduction in CH₄ yield (Lean et al., 2021). Similarly, a 31% reduction in CH₄ yield was observed in the *in vivo* experiment of this thesis (**Study 2**) when supplementing *A. taxiformis* at 0.5% DM. As observed *in vitro*, the *in vivo* study showed that *A. taxiformis* inhibited the H₂ consumption by methanogens leading to an excess of rumen H₂ which was redirected towards propionate production, resulting in a decrease in the A:P ratio. This agrees with previous *in vivo* studies with *A. taxiformis* (Kinley et al., 2020; Krizsan et al., 2023; Roque et al., 2021; Stefenoni et al., 2021) and other methanogenesis inhibitors such as synthetic halogenated compounds (Martinez-Fernandez et al., 2016; Mitsumori et al., 2012) and 3NOP (Hristov et al., 2015; Lopes et al., 2016; Vyas et al., 2016b). This change in VFA profile did not result in negative effects on meat quality in beef cattle (Kinley et al., 2020), although it is hypothesised that *A. taxiformis* could have a negative impact on the milk fat content of lactating ruminants given its lower A:P ratio (Roque et al., 2019a). However, despite the synthesis of propionate as an alternative H₂ sink, our study revealed that an important proportion of the H₂ accumulated in the rumen and was exhaled, representing an energy loss to the animal (Ungerfeld et al., 2022). This observation suggests that the optimization of the H₂ fluxes is still far to be optimal under certain CH₄ inhibition scenarios.

Martinez-Fernandez et al. (2017) showed that H₂ could be redirected towards acetate production through phloroglucinol supplementation when methanogenesis was inhibited by chloroform in beef cattle, leading to higher acetate production (+12.8%) and lower H₂ emissions (-51%). When phloroglucinol was administered to the goats in addition to *A. taxiformis* instead of chloroform, a similar increase in acetate production (+18.9%) and lower H₂ emission (-71%) were observed. These findings are in line with **Experiment 1.4**, which showed a progressive decline in H₂ production (up to -63%) and a linear increase in the acetate production (from 32 to 86 mM) with increasing phloroglucinol doses (from 0 to 36 mM) under a CH₄ inhibition scenario (*A. taxiformis* at 2% DM). In concordance with Martinez-Fernandez et al. (2017), the *in vitro* study (Experiment 1.4) reported a small but additional decrease in CH₄ production when *A. taxiformis* and phloroglucinol were combined (-14%), which was not noted in our *in vivo* study (Study 2). Animals that received the combination of *A. taxiformis* and phloroglucinol still expelled more H₂ than those that received phloroglucinol alone or fed the basal diet, suggesting that an optimisation of this nutritional strategy could still be possible. In this sense, alternative combinations of CH₄ inhibitors and H₂ acceptors have been recently explored. Maigaard et al. (2023) evaluated the combination of 3NOP and nitrate in dairy cows. However, this did not result in further H₂ use and redirection towards the synthesis of beneficial products. Therefore, phloroglucinol remains as the most promising H₂ acceptor to date that can capture excess H₂ from methanogenesis inhibition and incorporate it into acetate production via the anaerobic degradation pathway in the rumen.

The pattern of CH₄ and H₂ emissions throughout the day revealed larger post-prandially differences across treatments that gradually came closer towards the end of the day. Methane production dramatically decreased whereas H₂ emissions substantially increased after feeding/dosing time in animals that received *A. taxiformis* alone, but a slight recovery was observed overnight. This distinct pattern agrees with that observed in goats treated with BCM (Martínez-Fernández et al., 2013). The lower inhibitory activity towards the end of the day could indicate a rapid degradation of CHBr₃ in the rumen, which was further demonstrated in **Study 3**. In that case, the efficacy of this mitigation strategy could be improved by using novel delivery formats that allow sustained slow release of CHBr₃ into the rumen. This would ensure the anti-methanogenic effect of CHBr₃ in the rumen and hence the increase in H₂ available to be utilised in phloroglucinol degradation over longer duration. The present study also demonstrated that the highest

decreased of H₂ by the combined supplementation of *A. taxiformis* and phloroglucinol appeared during the post-prandial period, when phloroglucinol was available to be fermented by the rumen microbes.

No differences in DMI were observed across treatments. This is consistent with Li et al. (2016), who reported that DMI was not affected in sheep fed *A. taxiformis* at 3% OM. In Stefanoni et al. (2021), no effect on DMI was observed when dairy cows were treated with *A. taxiformis* at 0.5% DM for 10 days, but feed intake decreased when the duration of the treatment was extended up to 28 days. Dry matter intake typically decreases in experiments with CH₄ reductions above 50%, and this decrease could be linked to the accumulation of excess H₂ in the rumen (Ungerfeld, 2018). It could be expected that phloroglucinol addition would mitigate this effect as it decreased H₂ emissions. In contrast to Martinez-Fernandez et al. (2017), that showed an increase in daily weight gain in Brahman steers when phloroglucinol was supplemented with chloroform, no effects on BW were observed in the present study when combining phloroglucinol and *A. taxiformis*, possibly due to two reasons: i) animals were adults and hence not in a physiological growing stage and ii) the duration of each experimental period (14 days) was insufficient to promote significant differences in the energy uptake and ultimately in the BW gain. The potential effects of such nutritional intervention on production parameters would need further investigation, including experiments with growing or lactating ruminants over longer experimental periods.

The increased acetate with less H₂ expelled per mole of CH₄ decreased resulted from phloroglucinol supplementation can be explained by the degradation pathway of phloroglucinol in the rumen. As mentioned before, phloroglucinol can be degraded by specific rumen bacteria to predominately produce CO₂ and acetate (and butyrate in less extent) as end products with metabolic hydrogen consumption (Krumholz et al., 1987; Patel et al., 1981; Tsai et al., 1976; Tsai & Jones, 1975). An increase in acetate and A:P ratio was observed when phloroglucinol was supplemented alone, whereas the VFA profile was not affected when phloroglucinol was combined with *A. taxiformis*. This suggests that the acetate-producing phloroglucinol degradation pathway and the propionate formation promoted by *A. taxiformis* may contribute equally to the metabolic balance. In agreement with Martinez-Fernandez et al. (2017), no differences were observed in total VFA concentration when phloroglucinol was supplemented in a CH₄ inhibition scenario. Conversely, the previous *in vitro* experiments (**Experiment 1.3 and**

1.4) reported an increase in total VFA concentration when *A. taxiformis* and phloroglucinol were combined. A more substantial reduction of CH₄ production (> 99%) was observed *in vitro*, resulting in greater availability of H₂ to be utilised by phloroglucinol-reducing bacteria. Thus, the degradation rate of phloroglucinol to acetate *in vivo* could be expected to be lower than observed under *in vitro* conditions. This is possibly due to the higher complexity of the microbial ecosystem and dynamics in the *in vivo* study, which may include rumen microbial adaptation to the diet and homeostasis mechanism exhibited by the host (e.g., rumination, saliva production, urea recycling, etc.) that can minimise the effects when studied *in vivo*.

Rumen concentrations of total bacteria, methanogens, protozoa, and anaerobic fungi were not affected by the dietary supplementation with *A. taxiformis*, phloroglucinol or the combination of both. A reduction in the number of methanogens by *A. taxiformis* addition could be expected, as observed *in vitro* (**Experiment 1.4**). However, *A. taxiformis* supplementation had no effect on the abundance of archaeal communities under *in vivo* conditions. Krizsan et al. (2023) did not find any significant differences in the abundance of archaeal communities between cows fed with or without *A. taxiformis* but showed a shift in the archaeal community composition upon *A. taxiformis* supplementation. This observation supports previous findings suggesting that rumen methanogenesis depends, to a large extent, on the distribution of different archaea species and their activity rather than their absolute numbers (Zhou et al., 2010). Phloroglucinol did not affect the abundance of total bacteria, but a shift in bacterial community structure with increased levels of bacterial taxa able to catabolise phloroglucinol to acetate and butyrate would be expected. Several rumen bacteria have been identified as phloroglucinol utilizers and were classified as *Eubacterium oxidoreducens*, *Streptococcus bovis* and *Copropoccus* spp. (Martinez-Fernandez et al. 2017). In addition, de Paula et al. (2016) observed a decrease of *Entodinium* protozoa by the addition of different phenolic compounds, whereas Zuhainis et al. (2007) found that certain phenolic monomers decreased rumen fungal population.

Impact of *Asparagopsis taxiformis* on *in vitro* rumen fermentation according to the type of diet

The type of diet consumed by the ruminant, and particularly the forage:concentrate ratio, determines to a great extent the fermentation pattern in the rumen (Chen et al., 2021).

There is a faster fermentation rate of carbohydrates when the proportion of concentrate and ultimately the proportional amount of highly fermentable substrates in the diet is increased. On the contrary, diets mainly based on forage have a high content in structural carbohydrates such as cellulose and hemicellulose, which require longer times to be degraded by rumen microorganisms. The mitigation strategies analysed in this thesis (*A. taxiformis* alone or in combination with phenolic compounds) were tested using a high forage diet *in vitro* (**Study 1**) and *in vivo* (**Study 2**). However, we have not determined the inhibitory potential of *A. taxiformis* with a high concentrate diet, which is typical of modern intensive livestock production systems. In another *in vitro* experiment (**Study 3**), *A. taxiformis* at 2% DM was evaluated in two different types of diets (HF: forage:concentrate at 70:30 DM; HC: forage:concentrate at 30:70 DM). Results showed that HC diet led to a greater volume of gas produced compared with HF diet, suggesting a greater yield of fermentation products when concentrate proportion is increased (Belanche et al., 2019). A greater supply of fermentable carbohydrates leads to a faster fermentation rate, increasing VFA production and microbial growth and thus enhancing the degradation potential of different substrates (Hook et al., 2010). Hagemeister et al. (1981) showed an increase of 22.1 g of microbial protein biomass per 100 g increase in fermentable organic matter supplied to the rumen. However, the faster fermentation rate induced by the HC diet did not result in a greater VFA concentration. In accordance with previous studies (Chen et al., 2021; Wang et al., 2020), the lower forage:concentrate ratio in the diet changed the fermentation profile from acetate towards propionate production.

According to **Experiment 1.1** and other previous *in vitro* experiments (Kinley et al., 2016; Roque et al., 2019a), the inclusion of *A. taxiformis* had an effect on *in vitro* cumulative gas production. In both types of diets, the impact of *A. taxiformis* to decrease the volume of gas produced was detected at the beginning of the fermentation and remained consistent during the 72-h incubation period. Additionally, CH₄ production was almost completely inhibited in both types of diets at the initiation of the fermentation and maintained this scenario through the 72-h incubation period. This aligns with the level of CH₄ reduction previously observed in **Experiment 1.1** (-99%) with the same batch of *A. taxiformis* and inclusion rate. The substantial reduction of CH₄ production by the addition of *A. taxiformis* was accompanied by an increase in rumen H₂ accumulation and a shift in the VFA profile from H₂-producing acetate to H₂-incorporating propionate production, as previously observed in this thesis (**Study 1 and 2**) and in agreement with other studies

that used *A. taxiformis* (Kinley et al., 2020; Roque et al., 2021) and other effective anti-methanogenic compounds (Hristov et al., 2015; Martinez-Fernandez et al., 2016). As previously described in **Study 1 and 2**, the propionate production pathway was not efficient enough to capture all the available H₂ that otherwise would be utilised for CH₄ production and most of the excess H₂ was then released into the gas phase. The rumen microbial ecosystem has not ecologically evolved to efficiently capture the excess of H₂ above certain levels (Janssen, 2010) and it is therefore wasted.

Understanding how the type of diet affects *A. taxiformis* impact on methanogenesis and rumen fermentation is essential for the optimisation of nutritional strategies based on the use of the macroalgae. In **Study 3**, the lower forage:concentrate ratio in the diet shifted the fermentation profile from acetate towards propionate production. This shift in the A:P ratio means a displacement from metabolic pathways that produce H₂ to those that incorporate H₂ (Janssen, 2010). Thus, higher dietary content of fibre could increase H₂ formation, promoting the methanogenic activity of rumen archaea, whereas diets with higher content of starch deprive methanogens of H₂ and thus decrease CH₄ production (Valadares et al., 1999). Therefore, high concentrate diets could enhance the potential of methanogenesis inhibitors. In line with this, Roque et al. (2021) found an interaction between the type of diet and the magnitude of CH₄ reduction in beef cattle, as the same inclusion level of *A. taxiformis* (0.5% OM) reduced CH₄ production by 59 and 82% in high forage and high concentrate diet, respectively. Vyas et al. (2016b) showed lower CH₄ emissions by methanogenesis-inhibited animals fed high concentrate diet compared to high forage diet. However, in **Study 3**, the level of CH₄ production achieved by *A. taxiformis* was not influenced by the type of diet, except at the beginning of the incubation. Interestingly, lower amounts of H₂ were induced by HF diet compared to HC diet during methanogenesis inhibition. This agrees with Martinez-Fernandez et al. (2016), who showed that the amount of expelled H₂ per mole of decreased methane was lower when the proportion of forage in the diet was increased. This is possibly due to the slower fermentation rate of the forage diets which might allow a more efficient utilisation of the H₂ released, compared with the diets with highly fermentable carbohydrates, which might produce H₂ faster than the propionate producing bacteria are able to consume. Based on this, *A. taxiformis* resulted in a larger decrease in A:P ratio when supplemented in HF substrate (-41%) than in HC substrate (-34%).

In vitro* rumen microbial degradation of bromoform from *Asparagopsis taxiformis

Bromoform is the most abundant halogenated metabolite in *A. taxiformis* that provides anti-methanogenic activity to the macroalgae (Machado et al., 2016b). For *A. taxiformis* to be considered a practical tool for CH₄ production mitigation, it is essential to guarantee that food products from livestock fed the macroalgae are safe for consumption and that elevated CHBr₃ levels are not detected in animal tissues or products. No CHBr₃ residues have been found in samples of kidney, liver, faeces, fat, muscle tissue or milk taken from sheep (Li et al., 2016) and beef cattle (Kinley et al., 2020; Roque et al., 2021) fed diets with *A. taxiformis* at inclusion levels from 0.2 to 1% DM. This suggests that CHBr₃ is either degraded in the digestive tract or, if absorbed into the animal tissues, is converted to other metabolites that are potentially excreted in urine.

As reviewed by Glasson et al. (2022), studies conducted with methanogens have demonstrated that the enzymes methyl-tetrahydromethanopterin:coenzyme M methyltransferase (MTR) and methyl-coenzyme M reductase (MCR) reductively dehalogenate a range of halogenated CH₄ analogues to CH₄ and other less halogenated intermediates, with cofactor F₄₃₀ of MCR being 50 times more active than MTR (Krone et al., 1989). The efficiency of dehalogenation also increases according to expected carbon-halogen bond dissociation energies which decrease in the order F > Cl > Br > I. Therefore, CHBr₃ would be more efficiently dehalogenated than chloroform. Based on Van Eekert et al. (1998) that described chlorinated degradation *in vitro* in anaerobic sludge, we hypothesised that CHBr₃ was degraded to CH₂Br₂, then CH₃Br, and finally CH₄ and Br. Our work (**Study 3**) demonstrated the dehalogenation process of CHBr₃ to CH₂Br₂ by rumen microbes according to the type of diet. We observed that 70% of the CHBr₃ in *A. taxiformis*, equivalent to 3 mM, was degraded within 30 min, whereas CH₂Br₂ only reached a concentration of 0.4 mM by 30 min and never reached a concentration higher than 1.2 mM in both diets. This suggests that either CHBr₃ is being degraded through a non-CH₂Br₂ pathway or that CH₂Br₂ generated over the first 30 min had an extremely short half-life and the experimental approach used was not able to detect its production. The latter conclusion would be consistent with a degradation mechanism that significantly depleted cofactor F₄₃₀ within the first 30 min of fermentation, resulting in a long-term inhibition of CH₄ production. Cofactor F₄₃₀ is an essential prosthetic group of MCR, which catalyses the last step of methanogenesis (Jaun & Thauer, 2007). In the actual rumen environment, some amount of F₄₃₀ regeneration would be expected, as

would complete degradation of the halogenated CH₄ analogues. The lack of detection of CH₃Br and Br as intermediate and end-product of the degradation process, respectively, might be explained by the high volatility of CH₃Br, the high reactivity of Br with different compounds under the rumen fermentation conditions, and the difficulty to use a sample collection procedure to retain highly volatile compounds from the fermentation vessels to ensure their detection and quantification. This deserves further analytical evaluation in future studies.

Our results showed that neither CHBr₃ degradation nor CH₂Br₂ synthesis were significantly affected by the type of diet used as substrate, suggesting that the overall rumen fermentation rate is not a driving factor involved in CHBr₃ degradation, therefore, similar conclusions can be achieved regardless the diet used by the animal. This is important in order to establish a safety pattern from the use of bromoform-containing algae across a range of livestock production systems. Further *in vivo* investigations are needed to describe in detail the suggested pathway for CHBr₃ degradation in the rumen, adjusting the inclusion rate of *A. taxiformis* to *in vivo* conditions (e.g., the inclusion rate of 0.5% DM used in Study 2). Considering the rapid degradation of CHBr₃ observed *in vitro* and the longer residence time of the digesta in the rumen (Mambrini & Peyraud, 1997), it is likely that the same results would be observed *in vivo*. If this is confirmed, it would provide evidence that CHBr₃ undergoes rapid degradation upon administration in the rumen, and therefore would not be transferred to animal tissues, milk or urine. However, the fate of the resulting metabolites is still unknown.

Impact of bromoform on rumen methanogens growth

Rumen methanogens are microbes capable of producing energy through the reduction of different carbon sources (mainly CO₂) to CH₄ with consumption of H₂ or formate from anaerobic fermentation (Moss et al., 2000). The biochemistry of microbial CH₄ generation has been primarily focused on *Methanothermobacter thermoautotrophicus* and *Methanosarcina barkeri*, which are the primary subjects of *Methanobacteriales* research. However, it's important to note that neither of these prototype *Methanobacteriales* species significantly contribute to the microbiota of the ruminants. In this context, the main contributors to methanogenesis belong to the *Methanobrevibacter* genus, which is the most abundant in the rumen (90% of methanogen sequences; Hristov et al., 2012). *Methanobrevibacter ruminantium*, *M. gottschalkii*, *M.*

smithii and *M. millerae* are considered major CH₄ producers in the rumen (Carberry et al., 2014; Janssen & Kirs, 2008; Kong et al., 2013). There are other species belonging to different genera that importantly contribute to enteric CH₄ production such as *Methanosphaera stadtmanae* (Whitford, 2001), and others less abundant such as *Methanobacterium mobile* (Patra et al., 2017). The complete genome of *Methanobrevibacter ruminantium*, a major CH₄ producer in bovine rumen, has been reported recently and constitutes an important corner stone for further studies on rumen methanogens (Leahy, 2010). The diversity and species richness of ruminal methanogens are quite low, reflecting the highly selective ruminal environment for methanogens.

Mitigation strategies based on the use of halogenated CH₄ analogues, such as CHBr₃, whose mechanism of action consists of directly blocking one or more steps of the methanogenic process, are depriving methanogens of their main source of energy (Janssen, 2010). Therefore, inhibition of methanogenesis potentially leads to a reduction in the growth of methanogens population (Denman et al., 2015). Previous studies reported significant decreases of the abundance of methanogens with the inclusion of *A. taxiformis* (Machado et al., 2018; Roque et al., 2019a) or synthetic halogenated compounds (Martinez-Fernandez et al., 2016, 2017). However, some studies have reported that methanogenesis inhibition results in a shift in the community structure of methanogens rather than a decrease in the overall abundance of methanogens (Krizsan et al., 2023). In the last experiment of this study (**Study 4**), six pure cultures of different strains of methanogens as a wide representation of rumen methanogen population, and *Methanobacterium wolfei* as a well-studied methanogen which is commonly found in sludges, were cultivated in presence of CHBr₃ at different concentrations (0, 0.4, 2, 10 and 50 µM) to evaluate the dose-response effect on their individual growth. These concentrations were chosen to cover the range of dosage that can be achieved in the rumen with an inclusion rate of *A. taxiformis* of 2% DM.

The minimum concentration tested (0.4 µM CHBr₃) was sufficient to decrease, to a great extent, the growth of all species. This is explained by the mode of action of CHBr₃, which impact on MCR, the connecting point for all methanogenesis pathways (hydrogenotrophic, acetoclastic, and methylotrophic). However, the reduction levels were not the same in all the species. For instance, the growth of *M. ruminantium* and *M. stadtmanae* were reduced by more than 50% at that dosage. Previous studies (Nollet et al., 1997; Ungerfeld et al., 2004) reported the high sensitivity of *M. ruminantium* to BES,

another specific inhibitor of the last step of the methanogenesis pathway. However, no significant decrease in *M. ruminantium* growth was observed when CHBr_3 concentration was further increased. Conversely, *M. smithii*, *M. stadtmanae*, *M. barkeri*, *M. millerae*, *M. wolfei* and *M. mobile* growing rates were affected in a dose-dependent manner, reaching different rates of CH_4 inhibition as level of inclusion of CHBr_3 increased. Both *M. mobile* and *M. smithii* could be considered the most resistant strains to CHBr_3 as their growing rate was less affected than the others. This agrees with Ungerfeld et al. (2014), that reported that both species were less sensitive to BES than *M. ruminantium*. Differences in the sensitiveness of methanogens to methanogenesis inhibitors have been attributed to some extent to the varying ability to uptake these inhibitors into the cells (Patra et al., 2017). The genus *Methanobrevibacter*, which is the most dominant member of the rumen archaeal community, can be divided into two subgroups according to their expression of MCR that catalyses the rate limiting step of methanogenesis (Thauer, 2019). *Methanobrevibacter smithii* belongs to the clade capable of synthesising both forms of MCR (MCRI and MCRII) while *M. ruminantium* only possesses MCRI (Abbott et al., 2020). Therefore, *M. ruminantium* methanogenesis pathway is more limited and can be more rapidly blocked by a halogenated CH_4 analogue, while *M. smithii* has greater MCR activity and requires a higher concentration of inhibitors such as CHBr_3 to be strongly affected. In addition, *M. smithii* and *M. mobile* have shown more resistance to coenzyme M (CoM) analogues as they are capable of synthesising CoM, having lower rates of transport of external CoM and its analogues into the cell (Ungerfeld et al., 2004). However, this should not limit CHBr_3 transport as it is a CH_4 analogue. For the rest of methanogens studied here, it could be suggested that their sensitivity may depend on the saturation capacity of their MCR enzymatic system. Further research on MCR specific characteristics of other species could help to fully understand the impact that CHBr_3 has on the rumen archaeal population.

In contrast to this thesis, other studies reported that *Methanosphaera* species were more resistant than *Methanobrevibacter* in response to 3NOP supplementation, that also inhibits MCR activity (Duin et al., 2016; Pitta et al., 2022). Although both *Methanosphaera* and *Methanobrevibacter* belong to the same order (*Methanobacteriales*), *Methanosphaera* lineages have some relevant characteristics that make them more advantageous in an inhibition scenario. Whereas *Methanobrevibacter* reduce CO_2 or formate, *Methanosphaera* has acquired the ability to extract the methyl group from methanol and

therefore adopts a methanogenic pathway that is a hybrid between the hydrogenotrophic and methylotrophic pathways (Fricke et al., 2006). Moreover, the affinity and thresholds for H₂ are lower for *Methanosphaera* compared with those of *Methanobrevibacter* (Feldewert et al., 2020; Thauer et al., 2008). As previously observed, methanogenesis inhibition leads to a redirection of H₂ into propionate production. This can decrease the H₂ partial pressure in the rumen and further inhibit hydrogenotrophic methanogens, while methylotrophic methanogens can still produce CH₄. However, as pure cultures of methanogens were used in this experiment, no H₂ redirection into alternative fermentation products (e.g., VFA) was possible. Therefore, under high H₂ partial pressure conditions, *Methanosphaera stadtmanae* did not show any competitive advantage over *Methanobrevibacter* species.

Furthermore, the composition of the rumen methanogens community is largely influenced by the basal diet, ruminant species, management, and geographical area (Henderson et al., 2015). Therefore, it could be expected that the variable relative abundance of the different species of methanogens in the rumen ecosystem, as a consequence of the above listed factors, determined the inhibitory potential of CHBr₃ containing additives. Consequently, variations in all of these factors could indirectly affect the CH₄ inhibition rate reached by mitigation strategies based on *A. taxiformis* supplementation. A complete understanding of the rumen microbiome in response to *A. taxiformis* supplementation in animals under different dietary conditions may allow accurate predictions of treatment efficacy.

CONCLUSIONES

Conclusions

1. La inclusión de *Asparagopsis taxiformis* en la dieta al 2% inhibió eficazmente la metanogénesis, resultando en una acumulación del exceso de dihidrógeno sin que la fermentación ruminal fuese comprometida *in vitro*. La evaluación de un amplio rango de compuestos fenólicos a concentraciones crecientes hasta 6 mM tampoco afectó negativamente la fermentación ruminal *in vitro*.
2. La evaluación de la combinación de *Asparagopsis taxiformis* con diferentes compuestos fenólicos mostró que el floroglucinol fue el más eficaz en captar el H₂ ruminal acumulado por la inhibición de la metanogénesis *in vitro* y redirigirlo hacia la síntesis de acetato a través de la vía de degradación del floroglucinol.
3. El aumento de la concentración de floroglucinol hasta 36 mM en combinación con *A. taxiformis* optimizó su potencial como aceptor de H₂, resultando en una reducción de la acumulación de H₂ y un aumento de la síntesis de acetato y de ácidos grasos volátiles totales, suponiendo una mejora en la fermentación ruminal *in vitro* en comparación con la suplementación solo con *A. taxiformis*.
4. La estrategia nutricional basada en combinar *A. taxiformis* y floroglucinol demostró ser efectiva para mitigar la producción de CH₄ en caprino y, al mismo tiempo, reducir las emisiones de H₂ y aumentar la concentración de acetato. Esta estrategia representa una mejora de la eficiencia de la fermentación ruminal en comparación con la suplementación individual de *A. taxiformis*. No obstante, no se redujo las emisiones de H₂ por completo y la mayor parte de la reducción ocurrió durante la etapa postprandial, lo que sugiere que todavía existe margen de mejora para incrementar la eficiencia de redirección del H₂.
5. El bromoformo contenido en *A. taxiformis* fue rápidamente degradado en el rumen a dibromometano, descomponiéndose el 90% en las primeras 3 horas. Este hallazgo podría justificar la ausencia de residuos de bromoformo en productos animales en estudios anteriores con *A. taxiformis*, aunque es necesario evaluar la presencia de otros metabolitos halogenados resultantes de su degradación. El tipo de dieta no afectó ni la degradación del bromoformo ni la síntesis de dibromometano, lo que sugiere que la tasa de fermentación no es un factor determinante en la degradación microbiana del bromoformo en el rumen, por lo que los resultados podrían aplicarse a sistemas de producción que utilizan diferentes dietas.
6. El bromoformo inhibió el crecimiento de metanógenos a concentraciones muy bajas, con diferencias entre especies en la sensibilidad al compuesto. Estos

hallazgos contribuyen a una mejor comprensión de la efectividad potencial de *A. taxiformis* como aditivo de la dieta para mitigar las emisiones de CH₄ en rumiantes.

7. Los resultados de esta Tesis Doctoral ponen de manifiesto la necesidad de investigación que evalúe los efectos a largo plazo de suplementar *A. taxiformis* y floroglucinol, u otro compuesto con propiedades similares, sobre la microbiota ruminal, la productividad animal y la seguridad de sus productos.

1. The inclusion of *Asparagopsis taxiformis* at 2% of the dry matter of the substrate effectively inhibited methanogenesis, leading to the accumulation of excess dihydrogen without compromising *in vitro* rumen fermentation. The screening of a wide range of phenolic compounds at increasing concentrations up to 6 mM did not show a negative impact on *in vitro* rumen fermentation.
2. The evaluation of the combination of *A. taxiformis* with each phenolic compound showed that phloroglucinol was the most effective in capturing part of the excess rumen dihydrogen resulting from methanogenesis inhibition, which was redirected towards acetate production through the phloroglucinol degradation pathway.
3. Increasing doses of phloroglucinol up to 36 mM in combination with *A. taxiformis* enhanced its potential as H₂ acceptor, resulting in a reduction in H₂ accumulation while promoting an increase in acetate and total volatile fatty acids production, thereby improving *in vitro* rumen fermentation, compared to the supplementation of *A. taxiformis* alone.
4. The nutritional strategy based on combining *A. taxiformis* and phloroglucinol was proved successful to mitigate CH₄ production in goats while reducing H₂ emissions and increasing acetate concentration. This strategy represents an improvement in rumen fermentation efficiency compared to the supplementation of *A. taxiformis* alone. However, H₂ emissions were not completely reduced and most of the reduction occurred during the post-prandial stage, suggesting that the efficiency of H₂ redirection could be further improved.
5. Bromoform from *A. taxiformis* was rapidly degraded to dibromomethane in the rumen, with 90% broken down within the first 3 h. This finding may justify the absence of bromoform residues in animal products in previous studies with *A. taxiformis*. However, the presence of subsequent halogenated compounds still needs to be evaluated. The type of diet used as substrate did not affect neither bromoform degradation nor dibromomethane synthesis, suggesting that the fermentation rate is not a driving factor involved in rumen microbial degradation of bromoform and therefore these findings could be applied to different ruminant feeding systems.
6. Bromoform inhibited the growth of methanogens at very low concentrations, with some differences between species in their sensitivity to the compound. These findings can contribute to a better understanding of the potential effectiveness of

- A. taxiformis* as a practical feed additive for mitigating CH₄ emissions in ruminants.
7. The results of this Doctoral Thesis highlight the need for further research to assess the long-term effects of supplementing *A. taxiformis* and phloroglucinol, or any compound with similar attributes, on rumen microbiota, animal productivity and the safety of their products.

REFERENCIAS

References

- 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., Soosten, D. von, Walsh, P. J., Waters, S., & Xing, X. (2020). Seaweed and seaweed bioactives for mitigation of enteric methane: Challenges and opportunities. *Animals*, 10(12), 2432. <https://doi.org/10.3390/ani10122432>
- Abecia, L., Toral, P. G., Martín-García, A. I., Martínez, G., Tomkins, N. W., Molina-Alcaide, E., Newbold, C. J., & Yáñez-Ruiz, D. R. (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(4), 2027–2036. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4831>
- 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. <https://doi.org/10.3390/ani9110856>
- Aboagye, I. A., Oba, M., Castillo, A. R., Koenig, K. M., Iwaasa, A. D., & Beauchemin, K. A. (2018). Effects of hydrolyzable tannin with or without condensed tannin on methane emissions, nitrogen use, and performance of beef cattle fed a high-forage diet. *Journal of Animal Science*, 96(12), 5276–5286. <https://doi.org/10.1093/jas/sky352>
- Adegbeye, M. J., Elghandour, M. M. M. Y., Monroy, J. C., Abegunde, T. O., Salem, A. Z. M., Barbabosa-Pliego, A., & Faniyi, T. O. (2019). Potential influence of Yucca extract as feed additive on greenhouse gases emission for a cleaner livestock and aquaculture farming - A review. *Journal of Cleaner Production*, 239, 118074. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.118074>
- Alemu, A. W., Pekrul, L. K. D., Shreck, A. L., Booker, C. W., McGinn, S. M., Kindermann, M., & Beauchemin, K. A. (2021). 3-nitrooxypropanol decreased enteric methane production from growing beef cattle in a commercial feedlot: Implications for sustainable beef cattle production. *Frontiers in Animal Science*, 2. <https://doi.org/10.3389/fanim.2021.641590>
- Alemu, A. W., Romero-Pérez, A., Araujo, R., & Beauchemin, K. (2019). Effect of encapsulated nitrate and microencapsulated blend of essential oils on growth performance and methane emissions from beef steers fed backgrounding diets. *Animals*, 9(1), 21. <https://doi.org/10.3390/ani9010021>
- Alexandratos, N., & Bruinsma, J. (2012). World agriculture towards 2030/2050: The 2012 revision (ESA Working paper No. 12-03). FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. <https://www.fao.org/3/ap106e/ap106e.pdf>
- Amagase, H. (2006). Clarifying the real bioactive constituents of garlic. *The Journal of Nutrition*, 136(3), 716S–725S. <https://doi.org/10.1093/jn/136.3.716S>
- Andreakis, N., Procaccini, G., & Kooistra, W. H. (2004). *Asparagopsis taxiformis* and *Asparagopsis armata* (Bonnemaisoniales, Rhodophyta): genetic and morphological identification of Mediterranean populations. *European Journal of Phycology*, 39(3), 273–283. <https://doi.org/10.1080/0967026042000236436>
- Aoun, M., Amiand, G., Garres, P., & Boide, P. (2003). Food supplement used in feed formulations in ruminants (WO Patent 03/056935 A1).
- Apajalahti, J., Vienola, K., Raatikainen, K., Holder, V., & Moran, C. A. (2019). Conversion of branched-chain amino acids to corresponding isoacids - An in vitro tool

- for estimating ruminal protein degradability. *Frontiers in Veterinary Science*, 6, 311. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00311>
- Appuhamy, J. A. D. R. N., Strathe, A. B., Jayasundara, S., Wagner-Riddle, C., Dijkstra, J., France, J., & Kebreab, E. (2013). Anti-methanogenic effects of monensin in dairy and beef cattle: A meta-analysis. *Journal of Dairy Science*, 96(8), 5161–5173. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5923>
- Arco-Pérez, A., Ramos-Morales, E., Yáñez-Ruiz, D. R., Abecia, L., & Martín-García, A. I. (2017). Nutritive evaluation and milk quality of including of tomato or olive by-products silages with sunflower oil in the diet of dairy goats. *Animal Feed Science and Technology*, 232, 57–70. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.08.008>
- Armstrong, S. M., & Patel, T. R. (1994). Microbial degradation of phloroglucinol and other polyphenolic compounds. *Journal of Basic Microbiology*, 34(2), 123–135. <https://doi.org/10.1002/jobm.3620340208>
- Arndt, C., Hristov, A. N., Price, W. J., McClelland, S. C., Pelaez, A. M., Cueva, S. F., Oh, J., Dijkstra, J., Bannink, A., Bayat, A. R., Crompton, L. A., Eugène, M. A., Enahoro, D., Kebreab, E., Kreuzer, M., McGee, M., Martin, C., Newbold, C. J., Reynolds, C. K., ... Yu, Z. (2022). Full adoption of the most effective strategies to mitigate methane emissions by ruminants can help meet the 1.5 °C target by 2030 but not 2050. *PNAS*, 119(20), e2111294119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2111294119>
- Asanuma, N., Iwamoto, M., & Hino, T. (1999). Effect of the addition of fumarate on methane production by ruminal microorganisms in vitro. *Journal of Dairy Science*, 82(4), 780–787. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75296-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75296-3)
- Azzaz, H. H., Murad, H. A., & Morsy, T. A. (2015). Utility of ionophores for ruminant animals: A review. *Asian Journal of Animal Sciences*, 9(6), 254–265. <https://doi.org/10.3923/ajas.2015.254.265>
- Bach, A., Calsamiglia, S., & Stern, M. D. (2005). Nitrogen metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science*, 88, E9–E21. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)73133-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)73133-7)
- Balch, W. E., & Wolfe, R. S. (1976). New approach to the cultivation of methanogenic bacteria: 2-mercaptoethanesulfonic acid (HS-CoM)-dependent growth of *Methanobacterium ruminantium* in a pressurized atmosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 32(6), 781–791. <https://doi.org/10.1128/aem.32.6.781-791.1976>
- Bampidis, V., Azimonti, G., Bastos, M. L., Christensen, H., Dusemund, B., Durjava, M. F., Kouba, M., López-Alonso, M., López Puente, S., Marcon, F., Mayo, B., Pechová, A., Petkova, M., Ramos, F., Sanz, Y., Villa, R. E., Woutersen, R., Aquilina, G., Bories, G., ... Pizzo, F. (2021). Safety and efficacy of a feed additive consisting of 3-nitrooxypropanol (Bovaer® 10) for ruminants for milk production and reproduction (DSM Nutritional Products Ltd). *EFSA Journal*, 19(11), e06905. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6905>
- Barker, S. B., & Summerson, W. H. (1941). The colorimetric determination of lactic acid in biological material. *Journal of Biological Chemistry*, 138(2), 535–554. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)51379-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)51379-x)

- Bauchop, T. (1967). Inhibition of rumen methanogenesis by methane analogues. *Journal of Bacteriology*, 94(1), 171–175. <https://doi.org/10.1128/jb.94.1.171-175.1967>
- Bayaru, E., Kanda, S., Kamada, T., Itabashi, H., Andoh, S., Nishida, T., Ishida, M., Itoh, T., Kunihiko, N., & Isobe, Y. (2001). Effect of fumaric acid on methane production, rumen fermentation and digestibility of cattle fed roughage alone. *Animal Science Journal*, 72(2), 139–146. <https://doi.org/10.2508/chikusan.72.139>
- Beauchemin, K. A. (2021). 68 Utility of 3-NOP in beef production systems. *Journal of Animal Science*, 99, 132–133. <https://doi.org/10.1093/jas/skab054.223>
- Beauchemin, K. A., McGinn, S. M., Martinez, T. F., & McAllister, T. A. (2007). Use of condensed tannin extract from quebracho trees to reduce methane emissions from cattle 1. *Journal of Animal Science*, 85(8), 1990–1996. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-686>
- Beauchemin, K. A., Ungerfeld, E. M., Abdalla, A. L., Alvarez, C., Arndt, C., Becquet, P., Benchaar, C., Berndt, A., Mauricio, R. M., McAllister, T. A., Oyhantçabal, W., Salami, S. A., Shalloo, L., Sun, Y., Tricarico, J., Uwizeye, A., De Camillis, C., Bernoux, M., Robinson, T., & Kebreab, E. (2022). Invited review: Current enteric methane mitigation options. *Journal of Dairy Science*, 105(12), 9297–9326. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22091>
- Beauchemin, K. A., Ungerfeld, E. M., Eckard, R. J., & Wang, M. (2020). Review: Fifty years of research on rumen methanogenesis: Lessons learned and future challenges for mitigation. *Animal*, 14, S2–S16. <https://doi.org/10.1017/S1751731119003100>
- Belanche, A., Newbold, C., Morgavi, D., Bach, A., Zweifel, B., & Yáñez-Ruiz, D. (2020a). A meta-analysis describing the effects of the essential oils blend Agolin Ruminant on performance, rumen fermentation and methane emissions in dairy cows. *Animals*, 10(4), 620. <https://doi.org/10.3390/ani10040620>
- Belanche, A., Palma-Hidalgo, J. M., Nejjam, I., Jiménez, E., Martín-García, A. I., & Yáñez-Ruiz, D. R. (2020b). Inoculation with rumen fluid in early life as a strategy to optimize the weaning process in intensive dairy goat systems. *Journal of Dairy Science*, 103(6), 5047–5060. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-18002>
- Belanche, A., Palma-Hidalgo, J. M., Nejjam, I., Serrano, R., Jiménez, E., Martín-García, I., & Yáñez-Ruiz, D. R. (2019). In vitro assessment of the factors that determine the activity of the rumen microbiota for further applications as inoculum. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(1), 163–172. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9157>
- Benchaar, C., & Greathead, H. (2011). Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 166–167, 338–355. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.04.024>
- Benchaar, C., Hristov, A. N., & Greathead, H. (2009). Essential oils as feed additives in animal nutrition. In T. Steiner (Ed.), *Phytogenics in animal nutrition* (pp. 111–146). University Press, Nottingham, UK.
- Bergen, W. G., & Bates, D. B. (1984). Ionophores: Their effect on production efficiency and mode of action. *Journal of Animal Science*, 58(6), 1465–1483. <https://doi.org/10.2527/jas1984.5861465x>

- Bergman, E. N. (1990). Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiological Reviews*, 70(2), 567–590. <https://doi.org/10.1152/physrev.1990.70.2.567>
- Blaise, Y., Andriamandroso, A. L. H., Beckers, Y., Heinesch, B., Muñoz, E. C., Soyeurt, H., Froidmont, E., Lebeau, F., & Bindelle, J. (2018). The time after feeding alters methane emission kinetics in Holstein dry cows fed with various restricted diets. *Livestock Science*, 217, 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2018.07.004>
- Brooke, C. G., Roque, B. M., Shaw, C., Najafi, N., Gonzalez, M., Pfefferlen, A., De Anda, V., Ginsburg, D. W., Harden, M. C., Nuzhdin, S. V., Salwen, J. K., Kebreab, E., & Hess, M. (2020). Methane reduction potential of two pacific coast macroalgae during in vitro ruminant fermentation. *Frontiers in Marine Science*, 7, 561. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00561>
- Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods—A review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
- Bussink, D. W., & Oenema, O. (1998). Ammonia volatilization from dairy farming systems in temperate areas: A review. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 51, 19–33. <https://doi.org/10.1023/A:1009747109538>
- 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. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-644>
- Carberry, Ci. A., Waters, S. M., Kenny, D. A., & Creevey, C. J. (2014). Rumen methanogenic genotypes differ in abundance according to host residual feed intake phenotype and diet type. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(2), 586–594. <https://doi.org/10.1128/AEM.03131-13>
- Carro, M. D., & Ungerfeld, E. M. (2015). Utilization of organic acids to manipulate ruminal fermentation and improve ruminant productivity. In A. Puniya, R. Singh, & D. Kamra (Eds.), *Rumen microbiology: From evolution to revolution* (pp. 177–197). Springer, New Delhi, India. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2401-3_13
- Carulla, J. E., Kreuzer, M., Machmüller, A., & Hess, H. D. (2005). Supplementation of *Acacia mearnsii* tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. *Australian Journal of Agricultural Research*, 56(9), 961–970. <https://doi.org/10.1071/AR05022>
- Castro-Montoya, J., Peiren, N., Cone, J. W., Zweifel, B., Fievez, V., & De Campeneere, S. (2015). In vivo and in vitro effects of a blend of essential oils on rumen methane mitigation. *Livestock Science*, 180, 134–142. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2015.08.010>
- Chagas, J. C., Ramin, M., & Krizsan, S. J. (2019). In vitro evaluation of different dietary methane mitigation strategies. *Animals*, 9(12), 1120. <https://doi.org/10.3390/ani9121120>
- Chao, S. C., Young, D. G., & Oberg, C. J. (2000). Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. *Journal of Essential Oil Research*, 12(5), 639–649. <https://doi.org/10.1080/10412905.2000.9712177>

- Chen, H., Wang, C., Huasai, S., & Chen, A. (2021). Effects of dietary forage to concentrate ratio on nutrient digestibility, ruminal fermentation and rumen bacterial composition in Angus cows. *Scientific Reports*, 11(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96580-5>
- Choudhury, P. K., Jena, R., Tomar, S. K., & Puniya, A. K. (2022). Reducing enteric methanogenesis through alternate hydrogen sinks in the rumen. *Methane*, 1(4), 320–341. <https://doi.org/10.3390/methane1040024>
- Clauss, M., & Hofmann, R. R. (2014). The digestive system of ruminants, and peculiarities of (wild) cattle. In M. Melletti & J. Burton (Eds.), *Ecology, evolution and behaviour of wild cattle* (pp. 57–62). Cambridge University Press, Cambridge, UK. <https://doi.org/10.1017/CBO9781139568098.008>
- Cluett, J., VanderZaag, A. C., Baldé, H., McGinn, S., Jenson, E., Hayes, A. C., & Ekwe, S. (2020). Effects of two manure additives on methane emissions from dairy manure. *Animals*, 10(5), 807. <https://doi.org/10.3390/ani10050807>
- 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*, 545–546, 556–568. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.12.103>
- Colomb, A., Yassaa, N., Williams, J., Peeken, I., & Lochte, K. (2008). Screening volatile organic compounds (VOCs) emissions from five marine phytoplankton species by head space gas chromatography/mass spectrometry (HS-GC/MS). *Journal of Environmental Monitoring*, 10(3), 325–330. <https://doi.org/10.1039/b715312k>
- Conradt, D., Hermann, B., Gerhardt, S., Einsle, O., & Michael, M. (2016). Biocatalytic properties and structural analysis of phloroglucinol reductases. *Angewandte Chemie International Edition*, 55(50), 15531–15534. <https://doi.org/10.1002/anie.201607494>
- Cornale, P., Mimosi, A., & Battaglini, L. M. (2022). 43. Reducing feed-food competition: impact of by-products and grazing in ruminant feeding. In D. Bruce & A. Bruce (Eds.), *Transforming food systems: Ethics, innovation and responsibility* (pp. 282–287). Wageningen Academic Publishers, Wageningen, Netherlands. https://doi.org/10.3920/978-90-8686-939-8_43
- Cunha, C. S., Marcondes, M. I., Veloso, C. M., Mantovani, H. C., Pereira, L. G. R., Tomich, T. R., Dill-McFarland, K. A., & Suen, G. (2019). Compositional and structural dynamics of the ruminal microbiota in dairy heifers and its relationship to methane production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(1), 210–218. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9162>
- Danielsson, R., Dicksved, J., Sun, L., Gonda, H., Müller, B., Schnürer, A., & Bertilsson, J. (2017). Methane production in dairy cows correlates with rumen methanogenic and bacterial community structure. *Frontiers in Microbiology*, 8, 226. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00226>
- de Paula, E. M., Samensari, R. B., Machado, E., Pereira, L. M., Maia, F. J., Yoshimura, E. H., Franzolin, R., Faciola, A. P., & Zeoula, L. M. (2016). Effects of phenolic compounds on ruminal protozoa population, ruminal fermentation, and digestion in water buffaloes. *Livestock Science*, 185, 136–141. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2016.01.021>

- Deans, S. G., & Ritchie, G. (1987). Antibacterial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 5(2), 165–180. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(87\)90034-1](https://doi.org/10.1016/0168-1605(87)90034-1)
- Denman, S. E., Fernandez, G. M., 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. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01087>
- Denninger, T. M., Schwarm, A., Birkinshaw, A., Terranova, M., Dohme-Meier, F., Münger, A., Eggerschwiler, L., Bapst, B., Wegmann, S., Clauss, M., & Kreuzer, M. (2020). Immediate effect of *Acacia mearnsii* tannins on methane emissions and milk fatty acid profiles of dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, 261, 114388. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.114388>
- Diez-Gonzalez, F., Bond, D. R., Jennings, E., & Russell, J. B. (1999). Alternative schemes of butyrate production in *Butyrivibrio fibrisolvens* and their relationship to acetate utilization, lactate production, and phylogeny. *Archives of Microbiology*, 171(5), 324–330. <https://doi.org/10.1007/s002030050717>
- Dijkstra, J., Bannink, A., France, J., Kebreab, E., & Gastelen, S. Van. (2018). Short communication: Antimethanogenic effects of 3-nitrooxypropanol depend on supplementation dose, dietary fiber content, and cattle type. *Journal of Dairy Science*, 101(10), 9041–9047. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14456>
- Doreau, M., Arbore, M., Popova, M., Rochette, Y., & Martin, C. (2018). Linseed plus nitrate in the diet for fattening bulls: effects on methane emission, animal health and residues in offal. *Animal*, 12(3), 501–507. <https://doi.org/10.1017/S1751731117002014>
- Dorman, H. J. D., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2), 308–316. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00969.x>
- Drake, H. L. (1994). Acetogenesis, acetogenic bacteria, and the acetyl-CoA “Wood/Ljungdahl” pathway: Past and current perspectives. In H. L. Drake (Ed.), *Acetogenesis* (pp. 3–60). Springer, Boston, MA, USA. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1777-1_1
- Duffield, T. F., & Bagg, R. N. (2000). Use of ionophores in lactating dairy cattle: A review. *Canadian Veterinary Journal*, 41(5), 388–394.
- Duffield, T. F., Rabiee, A. R., & Lean, I. J. (2008a). A meta-analysis of the impact of monensin in lactating dairy cattle. Part 1. Metabolic effects. *Journal of Dairy Science*, 91(4), 1334–1346. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0607>
- Duffield, T. F., Rabiee, A. R., & Lean, I. J. (2008b). A meta-analysis of the impact of monensin in lactating dairy cattle. Part 2. Production effects. *Journal of Dairy Science*, 91(4), 1347–1360. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0608>
- Duin, E. C., Wagner, T., Shima, S., Prakash, D., Cronin, B., Yáñez-Ruiz, D. R., & Duval, S. (2016). Mode of action uncovered for the specific reduction of methane emissions from ruminants by the small molecule 3-nitrooxypropanol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(22), 6172–6177. <https://doi.org/10.1073/pnas.1600298113>

- Duval, S., & Kindermann, M. (2012). Use of nitrooxy organic molecules in feed for reducing enteric methane emissions in ruminants, and/or to improve ruminant performance (International Patent Application WO 2012/084629 A1). World Intellectual Property Organization.
- Eason, C. T., & Fennessy, P. (2023). Methane reduction, health and regulatory considerations regarding Asparagopsis and bromoform for ruminants. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. <https://doi.org/10.1080/00288233.2023.2248948>
- Ebert, P. J., Bailey, E. A., Shreck, A. L., Jennings, J. S., & Cole, N. A. (2017). Effect of condensed tannin extract supplementation on growth performance, nitrogen balance, gas emissions, and energetic losses of beef steers. *Journal of Animal Science*, 95(3), 1345–1355. <https://doi.org/10.2527/jas.2016.0341>
- Erickson, P. S., & Kalscheur, K. F. (2020). Nutrition and feeding of dairy cattle. In W. Bazer, G. C. Lamb, & G. Wu (Eds.), *Animal agriculture: Sustainability, challenges and innovations* (pp. 157–180). Elsevier, Netherlands. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817052-6.00009-4>
- Evans, P. N., Boyd, J. A., Leu, A. O., Woodcroft, B. J., Parks, D. H., Hugenholtz, P., & Tyson, G. W. (2019). An evolving view of methane metabolism in the Archaea. *Nature Reviews Microbiology*, 17(4), 219–232. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0136-7>
- FAO (2018). *World livestock: transforming the livestock sector through the sustainable development goals*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <https://doi.org/10.4060/ca1201en>
- Feldewert, C., Lang, K., & Brune, A. (2020). The hydrogen threshold of obligately methyl-reducing methanogens. *FEMS Microbiology Letters*, 367(17), fnaa137. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa137>
- Feng, X. Y., Dijkstra, J., Bannink, A., van Gastelen, S., France, J., & Kebreab, E. (2020). Antimethanogenic effects of nitrate supplementation in cattle: A meta-analysis. *Journal of Dairy Science*, 103(12), 11375–11385. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18541>
- Ferry, J. G. (2011). Fundamentals of methanogenic pathways that are key to the biomethanation of complex biomass. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(3), 351–357. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.04.011>
- Field, J. A., & Lettinga, G. (1987). The methanogenic toxicity and anaerobic degradability of a hydrolyzable tannin. *Water Research*, 21(3), 367–374. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(87\)90217-X](https://doi.org/10.1016/0043-1354(87)90217-X)
- Frey, M. (2002). Hydrogenases: Hydrogen-activating enzymes. *Chembiochem*, 3(2–3), 153–160. [https://doi.org/10.1002/1439-7633\(20020301\)3:2/3<153::AID-CBIC153>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/1439-7633(20020301)3:2/3<153::AID-CBIC153>3.0.CO;2-B)
- Fricke, W. F., Seedorf, H., Henne, A., Krüer, M., Liesegang, H., Hedderich, R., Gottschalk, G., & Thauer, R. K. (2006). The genome sequence of *Methanosphaera stadtmanae* reveals why this human intestinal archaeon is restricted to methanol and H₂ for methane formation and ATP synthesis. *Journal of Bacteriology*, 188(2), 642–658. <https://doi.org/10.1128/JB.188.2.642-658.2006>
- Gagen, E. J., Denman, S. E., & McSweeney, C. S. (2015). Acetogenesis as an alternative to methanogenesis in the rumen. In P. K. Malik, R. Bhatta, J. Takahashi, R. A. Kohn, &

- C. S. Prasad (Eds.), *Livestock production and climate change* (pp. 292–303). CABI, Wallingford, Oxfordshire, UK. <https://doi.org/10.1079/9781780644325.0292>
- Gascoyne, D. J., & Theodorou, M. K. (1988). Consecutive batch culture — A novel technique for the in vitro study of mixed microbial populations from the rumen. *Animal Feed Science and Technology*, 21(2–4), 183–189. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(88\)90099-5](https://doi.org/10.1016/0377-8401(88)90099-5)
- Gerber, P. J., Steinfeld, H., Henderson, B., Mottet, A., Opio, C., Dijkman, J., Falcucci, A., & Tempio, G. (2013). *Tackling climate change through livestock—A global assessment of emissions and mitigation opportunities*. FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. <https://www.fao.org/3/i3437e/i3437e.pdf>
- Gill, M., Smith, P., & Wilkinson, J. M. (2010). Mitigating climate change: The role of domestic livestock. *Animal*, 4(3), 323–333. <https://doi.org/10.1017/S1751731109004662>
- Glasson, C. R. K., Kinley, R. D., Nys, R. De, King, N., Adams, S. L., Packer, M. A., Svenson, J., Eason, C. T., & Magnusson, M. (2022). Benefits and risks of including the bromoform containing seaweed *Asparagopsis* in feed for the reduction of methane production from ruminants. *Algal Research*, 64, 102673. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102673>
- Goel, G., & Makkar, H. P. S. (2012). Methane mitigation from ruminants using tannins and saponins. *Tropical Animal Health and Production*, 44(4), 729–739. <https://doi.org/10.1007/s11250-011-9966-2>
- Golder, H. M., LeBlanc, S. J., Duffield, T., Rossow, H. A., Bogdanich, R., Hernandez, L., Block, E., Rehberger, J., Smith, A. H., Thomson, J., & Lean, I. J. (2023). Characterizing ruminal acidosis risk: A multierd, multicountry study. *Journal of Dairy Science*, 106(5), 3155–3175. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22571>
- Granja-Salcedo, Y. T., Fernandes, R. M., Araujo, R. C. de, Kishi, L. T., Berchielli, T. T., Resende, F. D. de, Berndt, A., & Siqueira, G. R. (2019). Long-term encapsulated nitrate supplementation modulates rumen microbial diversity and rumen fermentation to reduce methane emission in grazing steers. *Frontiers in Microbiology*, 10, 614. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00614>
- Greening, C., Geier, R., Wang, C., Woods, L. C., Morales, S. E., McDonald, M. J., Rushton-Green, R., Morgan, X. C., Koike, S., Leahy, S. C., Kelly, W. J., Cann, I., Attwood, G. T., Cook, G. M., & Mackie, R. I. (2019). Diverse hydrogen production and consumption pathways influence methane production in ruminants. *The ISME Journal*, 13(10), 2617–2632. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0464-2>
- Grossi, G., Goglio, P., Vitali, A., & Williams, A. G. (2019). Livestock and climate change: Impact of livestock on climate and mitigation strategies. *Animal Frontiers*, 9(1), 69–76. <https://doi.org/10.1093/af/vfy034>
- Gunsalus, R. P., Romesser, J. A., & Wolfe, R. S. (1978). Preparation of coenzyme M analogs and their activity in the methyl coenzyme M reductase system of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Biochemistry*, 17(12), 2374–2377. <https://doi.org/10.1021/bi00605a019>
- Guo, M., & Chen, Y. (2018). Coenzyme cobalamin: Biosynthesis, overproduction and its application in dehalogenation—A review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 17, 259–284. <https://doi.org/10.1007/s11157-018-9461-6>

- Guyader, J., Doreau, M., Morgavi, D. P., Gérard, C., Loncke, C., & Martin, C. (2016). Long-term effect of linseed plus nitrate fed to dairy cows on enteric methane emission and nitrate and nitrite residuals in milk. *Animal*, 10(7), 1173–1181. <https://doi.org/10.1017/S1751731115002852>
- 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. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11644>
- Guyader, J., Eugène, M., Nozière, P., Morgavi, D. P., Doreau, M., & Martin, C. (2014). Influence of rumen protozoa on methane emission in ruminants: a meta-analysis approach. *Animal*, 8(11), 1816–1825. <https://doi.org/10.1017/S1751731114001852>
- Hackmann, T. J., Ngugi, D. K., Firkins, J. L., & Tao, J. (2017). Genomes of rumen bacteria encode atypical pathways for fermenting hexoses to short-chain fatty acids. *Environmental Microbiology*, 19(11), 4670–4683. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13929>
- Hagemeister, H., Liipping, W., & Kaufmann, W. (1981). Microbial protein synthesis and digestion in the high-yielding dairy cow. In W. Haresign & D. J. A. Cole (Eds.), *Recent developments in ruminant nutrition* (pp. 31–48). Butterworths, London, UK.
- Haisan, J., Sun, Y., Guan, L. L., Beauchemin, K. A., Iwaasa, A., Duval, S., Barreda, D. R., & Oba, M. (2014). The effects of feeding 3-nitrooxypropanol on methane emissions and productivity of Holstein cows in mid lactation. *Journal of Dairy Science*, 97(5), 3110–3119. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7834>
- Harnisch, J., de Jager, D., Gale, J., & Stobbe, O. (2002). Halogenated compounds and climate change. *Environmental Science and Pollution Research*, 9(6), 369–374. <https://doi.org/10.1007/BF02987583>
- Hart, K. J., Yáñez-Ruiz, D. R., Duval, S. M., McEwan, N. R., & Newbold, C. J. (2008). Plant extracts to manipulate rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*, 147(1–3), 8–35. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.09.007>
- Hegarty, R. S., Passetti, R. A. C., Dittmer, K. M., Wang, Y., Shelton, S., Emmet-Booth, J., Wollenberg, E., McAllister, T., Leahy, S., Beauchemin, K., & Gurwick, N. (2021). An evaluation of evidence for efficacy and applicability of methane inhibiting feed additives for livestock. Edition 1. Global Research Alliance. <https://hdl.handle.net/10568/116489>
- Heinke, J., Lannerstad, M., Gerten, D., Havlík, P., Herrero, M., Notenbaert, A. M. O., Hoff, H., & Müller, C. (2020). Water use in global livestock production—Opportunities and constraints for increasing water productivity. *Water Resources Research*, 56(12), e2019WR026995. <https://doi.org/10.1029/2019WR026995>
- Helander, I. M., Alakomi, H.-L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., Gorris, L. G. M., & von Wright, A. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(9), 3590–3595. <https://doi.org/10.1021/jf980154m>
- Henderson, G., Cox, F., Ganesh, S., Jonker, A., Young, W., Janssen, P. H., Abecia, L., Angarita, E., Aravena, P., Arenas, G. N., Ariza, C., Attwood, G. T., Avila, J. M., Avila-Stagno, J., Bannink, A., Barahona, R., Batistotti, M., Bertelsen, M. F., Brown-Kav, A., ... Zunino, P. (2015). Rumen microbial community composition varies with diet and host,

- but a core microbiome is found across a wide geographical range. *Scientific Reports*, 5, 14567. <https://doi.org/10.1038/srep14567>
- Hobson, P. N., & Stewart, C. S. (1997). *The rumen microbial ecosystem*. Springer, Dordrecht, Netherlands.
- Holliger, C., Schraa, G., Stupperich, E., Stams, A. J., & Zehnder, A. J. (1992). Evidence for the involvement of corrinoids and factor F430 in the reductive dechlorination of 1,2-dichloroethane by *Methanosarcina barkeri*. *Journal of Bacteriology*, 174(13), 4427–4434. <https://doi.org/10.1128/jb.174.13.4427-4434.1992>
- Honan, M., Feng, X., Tricarico, J. M., & Kebreab, E. (2021). Feed additives as a strategic approach to reduce enteric methane production in cattle: Modes of action, effectiveness and safety. *Animal Production Science*, 62, 1303–1317. <https://doi.org/10.1071/AN20295>
- Hook, S. E., Wright, G., & McBride, B. W. (2010). Methanogens: Methane producers of the rumen and mitigation strategies. *Archaea*, 2010, 945785. <https://doi.org/10.1155/2010/945785>
- Hristov, A. N., Callaway, T. R., Lee, C., & Dowd, S. E. (2012). Rumen bacterial, archaeal, and fungal diversity of dairy cows in response to ingestion of lauric or myristic acid1. *Journal of Animal Science*, 90(12), 4449–4457. <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4624>
- Hristov, A. N., & Jouany, J. P. (2005). Factors affecting the efficiency of nitrogen utilization in the rumen. In *Nitrogen and phosphorus nutrition of cattle: reducing the environmental impact of cattle operations* (pp. 117–166). CABI Publishing. <https://doi.org/10.1079/9780851990132.0117>
- Hristov, A. N., Melgar, A., Wasson, D., & Arndt, C. (2022). Symposium review: Effective nutritional strategies to mitigate enteric methane in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 105(10), 8543–8557. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21398>
- Hristov, A. N., Oh, J., Firkins, J. L., Dijkstra, J., Kebreab, E., Waghorn, G., & Makkar, H. P. S. (2013). Special topics — Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. *Journal of Animal Science*, 91(11), 5045–5069. <https://doi.org/10.2527/jas.2013-6583>
- Hristov, A. N., Oh, J., Frederick, T. W., Harper, M. T., Weeks, H. L., Branco, A. F., Moate, P. J., Deighton, M. H., Williams, S. R. O., Kindermann, M., Duval, S., Hristov, A. N., Oh, J., Giallongo, F., Frederick, T. W., Harper, M. T., & Weeks, H. L. (2015). An inhibitor persistently decreased enteric methane emission from dairy cows with no negative effect on milk production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(34), 10663–10668. <https://doi.org/10.1073/pnas.1504124112>
- Hungate, R. E. (1966). *The rumen and its microbes*. Academic Press, New York, USA. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/C2013-0-12555-X>
- Immig, I., Demeyer, D., Fiedler, D., Van Nevel, C., & Mbanzamihigo, L. (1996). Attempts to induce reductive acetogenesis into a sheep rumen. *Archiv Für Tierernaehrung*, 49(4), 363–370. <https://doi.org/10.1080/17450399609381898>

- IPCC (2013). Anthropogenic and natural radiative forcing. In T. F. Stocker et al. (Eds.), *Climate change 2013: The physical science basis. Contribution of working group I to the fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (pp. 658–740). Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Jafari, S., Ebrahimi, M., Goh, Y. M., Rajion, M. A., Jahromi, M. F., & Al-Jumaili, W. S. (2019). Manipulation of rumen fermentation and methane gas production by plant secondary metabolites (saponin, tannin and essential oil) – A review of ten-year studies. *Annals of Animal Science*, 19(1), 3–29. <https://doi.org/10.2478/aoas-2018-0037>
- Jana, A., Halder, S. K., Banerjee, A., Paul, T., Pati, B. R., Mondal, K. C., & Das Mohapatra, P. K. (2014). Biosynthesis, structural architecture and biotechnological potential of bacterial tannase: A molecular advancement. *Bioresource Technology*, 157, 327–340. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.017>
- 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(1–2), 1–22. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.07.002>
- Janssen, P. H., & Kirs, M. (2008). Structure of the archaeal community of the rumen. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(12), 3619–3625. <https://doi.org/10.1128/AEM.02812-07>
- Jaun, B., & Thauer, R. K. (2007). Methyl-coenzyme M reductase and its nickel corphin coenzyme F430 in methanogenic archaea. In A. Sigel, H. Sigel, & R. K. O. Sigel (Eds.), *Nickel and Its Surprising Impact in Nature* (pp. 323–356). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470028131.ch8>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2011.01172.x>
- Jayanegara, A., Sarwono, K. A., Kondo, M., Matsui, H., Ridla, M., & Laconi, E. B. (2018). Use of 3-nitrooxypropanol as feed additive for mitigating enteric methane emissions from ruminants: a meta-analysis. *Italian Journal of Animal Science*, 17(3), 650–656. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2017.1404945>
- 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), 1426–1435. <https://doi.org/10.5713/ajas.2014.14086>
- Jenkins, T. C. (1992). Lipid metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science*, 76(12), 3851–3863. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77727-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77727-9)
- Johnson, K. A., & Johnson, D. E. (1995). Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science*, 73(8), 2483–2492. <https://doi.org/10.2527/1995.7382483x>
- Kaiser, J.-P., & Hanselmann, K. W. (1982). Fermentative metabolism of substituted monoaromatic compounds by a bacterial community from anaerobic sediments. *Archives of Microbiology*, 133, 185–194. <https://doi.org/10.1007/BF00414999>

- Karekar, S., Stefanini, R., & Ahring, B. (2022). Homo-acetogens: Their metabolism and competitive relationship with hydrogenotrophic methanogens. *Microorganisms*, 10(2), 397. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020397>
- Kayembe, K., Basosila, L., Mpiana, P. T., Sikulisimwa, P. C., & Mbuyu, K. (2013). Inhibitory effects of phenolic monomers on methanogenesis in anaerobic digestion. *British Microbiology Research Journal*, 3(1), 32–41. <https://doi.org/10.9734/BMRJ/2013/2291>
- Kebreab, E., Bannink, A., Pressman, E. M., Walker, N., Karagiannis, A., van Gastelen, S., & Dijkstra, J. (2023). A meta-analysis of effects of 3-nitrooxypropanol on methane production, yield, and intensity in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 106(2), 927–936. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22211>
- Kelly, W. J., Leahy, S. C., Kamke, J., Soni, P., Koike, S., Mackie, R., Seshadri, R., Cook, G. M., Morales, S. E., Greening, C., & Attwood, G. T. (2019). Occurrence and expression of genes encoding methyl-compound production in rumen bacteria. *Animal Microbiome*, 1, 15. <https://doi.org/10.1186/s42523-019-0016-0>
- Kholif, A. E. (2023). A review of effect of saponins on ruminal fermentation, health and performance of ruminants. *Veterinary Sciences*, 10(7), 450. <https://doi.org/10.3390/vetsci10070450>
- Kim, H., Kim, B.-W., Yoo, D., Moon, J., Kwon, I., Lee, Y., & Seo, J. (2023). In vitro evaluation of Aloe saponaria as a potential feed additive to modulate ruminal fermentation and microbial diversity. *Journal of Applied Animal Research*, 51(1), 115–122. <https://doi.org/10.1080/09712119.2023.2165086>
- Kim, H., Lee, H. G., Baek, Y.-C., Lee, S., & Seo, J. (2020). The effects of dietary supplementation with 3-nitrooxypropanol on enteric methane emissions, rumen fermentation, and production performance in ruminants: A meta-analysis. *Journal of Animal Science and Technology*, 62(1), 31–42. <https://doi.org/10.5187/jast.2020.62.1.31>
- Kimbrough, R. D. (1979). The carcinogenic and other chronic effects of persistent halogenated organic compounds. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 320(1), 415–418. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1979.tb56622.x>
- Kinley, R. D., De Nys, R., Vucko, M. J., Machado, L., & Tomkins, N. W. (2016). The red macroalgae *Asparagopsis taxiformis* is a potent natural antimethanogenic that reduces methane production during in vitro fermentation with rumen fluid. *Animal Production Science*, 56(3), 282–289. <https://doi.org/https://doi.org/10.1071/AN15576>
- Kinley, R. D., Martinez-Fernandez, G., Matthews, M. K., de Nys, R., Magnusson, M., & Tomkins, N. W. (2020). Mitigating the carbon footprint and improving productivity of ruminant livestock agriculture using a red seaweed. *Journal of Cleaner Production*, 259, 120836. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.120836>
- Kittelman, S., Pinares-Patiño, C. S., Sedorf, H., Kirk, M. R., Ganesh, S., McEwan, J. C., & Janssen, P. H. (2014). Two different bacterial community types are linked with the low-methane emission trait in sheep. *PLoS ONE*, 9(7), e103171. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103171>
- Knight, T., Ronimus, R. S., Dey, D., Tootill, C., Naylor, G., Evans, P., Molano, G., Smith, A., Tavendale, M., Pinares-Patiño, C. S., & Clark, H. (2011). Chloroform decreases rumen methanogenesis and methanogen populations without altering rumen function in

cattle. *Animal Feed Science and Technology*, 166–167, 101–112. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.04.059>

Kolling, G. J., Stivanin, S. C. B., Gabbi, A. M., Machado, F. S., Ferreira, A. L., Campos, M. M., Tomich, T. R., Cunha, C. S., Dill, S. W., Pereira, L. G. R., & Fischer, V. (2018). Performance and methane emissions in dairy cows fed oregano and green tea extracts as feed additives. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 4221–4234. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13841>

Kong, Y., Xia, Y., Seviour, R., Forster, R., & McAllister, T. A. (2013). Biodiversity and composition of methanogenic populations in the rumen of cows fed alfalfa hay or triticale straw. *FEMS Microbiology Ecology*, 84(2), 302–315. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12062>

Konisky, J. (1990). Inhibitory effects of 2-bromoethanesulfonate and protection by addition of coenzyme M in hydrogen-oxidizing marine enrichment cultures. *FEMS Microbiology Ecology*, 6(3), 239–242. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(90\)90736-A](https://doi.org/10.1016/0378-1097(90)90736-A)

Krause, D. O., Smith, W. J. M., Brooker, J. D., & McSweeney, C. S. (2005). Tolerance mechanisms of streptococci to hydrolysable and condensed tannins. *Animal Feed Science and Technology*, 121(1–2), 59–75. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.02.008>

Krizsan, S. J., Ramin, M., Chagas, J. C. C., Halmemies-Beauchet-Filleau, A., Singh, A., Schnürer, A., & Danielsson, R. (2023). Effects on rumen microbiome and milk quality of dairy cows fed a grass silage-based diet supplemented with the macroalga *Asparagopsis taxiformis*. *Frontiers in Animal Science*, 4, 1112969. <https://doi.org/10.3389/fanim.2023.1112969>

Krone, U. E., Laufer, K., Thauer, R. K., & Hogenkamp, H. P. C. (1989). Coenzyme F430 as a possible catalyst for the reductive dehalogenation of chlorinated C1 hydrocarbons in methanogenic bacteria. *Biochemistry*, 28(26), 10061–10065. <https://doi.org/10.1021/bi00452a027>

Krumholz, L. R., & Bryant, M. (1986). *Eubacterium oxidoreducens* sp. nov. requiring H₂ or formate to degrade gallate, pyrogallol, phloroglucinol and quercetin. *Archives of Microbiology*, 144, 8–14. <https://doi.org/10.1007/BF00454948>

Krumholz, L. R., Crawford, R. L., Hemling, M. E., & Bryant, M. P. (1987). Metabolism of gallate and phloroglucinol in *Eubacterium oxidoreducens* via 3-hydroxy-5-oxohexanoate. *Journal of Bacteriology*, 169(5), 1886–1890. <https://doi.org/10.1128/jb.169.5.1886-1890.1987>

Lanigan, G. (1972). Metabolism of pyrrolizidine alkaloids in the ovine rumen. IV. Effects of chloral hydrate and halogenated methanes on rumen methanogenesis and alkaloid metabolism in fistulated sheep. *Australian Journal of Agricultural Research*, 23(6), 1085–1091. <https://doi.org/10.1071/AR9721085>

Lashof, D. A., & Ahuja, D. R. (1990). Relative contributions of greenhouse gas emissions to global warming. *Nature*, 344, 529–531. <http://dx.doi.org/10.1038/344529a0>

Lean, I. J., Golder, H. M., Grant, T. M. D., & Moate, P. J. (2021). A meta-analysis of effects of dietary seaweed on beef and dairy cattle performance and methane yield. *PLoS ONE*, 16(7), e0249053. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0249053>

- Lee, C., Araujo, R. C., Koenig, K. M., & Beauchemin, K. A. (2017). Effects of encapsulated nitrate on growth performance, nitrate toxicity, and enteric methane emissions in beef steers: Backgrounding phase. *Journal of Animal Science*, 95(8), 3700–3711. <https://doi.org/10.2527/jas.2017.1460>
- Lee, C., & Beauchemin, K. A. (2014). A review of feeding supplementary nitrate to ruminant animals: Nitrate toxicity, methane emissions, and production performance. *Canadian Journal of Animal Science*, 94(4), 557–570. <https://doi.org/10.4141/cjas-2014-069>
- Lee, H. J., Lee, S. C., Kim, J. D., Oh, Y. G., Kim, B. K., Kim, C. W., & Kim, K. J. (2003). Methane production potential of feed ingredients as measured by in vitro gas test. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 16(8), 1143–1150. <https://doi.org/10.5713/ajas.2003.1143>
- Leng, R. A. (2014). Interactions between microbial consortia in biofilms: A paradigm shift in rumen microbial ecology and enteric methane mitigation. *Animal Production Science*, 54(5), 519–543. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1071/AN13381>
- Li, X., Norman, H. C., Kinley, R. D., Laurence, M., Wilmot, M., Bender, H., de Nys, R., & Tomkins, N. (2016). *Asparagopsis taxiformis* decreases enteric methane production from sheep. *Animal Production Science*, 58(4), 681–688. <https://doi.org/10.1071/AN15883>
- Liu, H., Puchala, R., LeShure, S., Gipson, T. A., Flythe, M. D., & Goetsch, A. L. (2019). Effects of lespedeza condensed tannins alone or with monensin, soybean oil, and coconut oil on feed intake, growth, digestion, ruminal methane emission, and heat energy by yearling Alpine doelings1. *Journal of Animal Science*, 97(2), 885–899. <https://doi.org/10.1093/jas/sky452>
- Liu, Y., & Whitman, W. B. (2008). Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1125(1), 171–189. <https://doi.org/10.1196/annals.1419.019>
- Liu, Z., Wang, K., Nan, X., Cai, M., Yang, L., Xiong, B., & Zhao, Y. (2022). Synergistic effects of 3-nitrooxypropanol with fumarate in the regulation of propionate formation and methanogenesis in dairy cows in vitro. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(6), e01908-21. <https://doi.org/10.1128/aem.01908-21>
- Lopes, J. C., de Matos, L. F., Harper, M. T., Giallongo, F., Oh, J., Gruen, D., Ono, S., Kindermann, M., Duval, S., & Hristov, A. N. (2016). Effect of 3-nitrooxypropanol on methane and hydrogen emissions, methane isotopic signature, and ruminal fermentation in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 99(7), 5335–5344. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10832>
- Lotfi, R. (2020). A commentary on methodological aspects of hydrolysable tannins metabolism in ruminant: A perspective view. *Letters in Applied Microbiology*, 71(5), 466–478. <https://doi.org/10.1111/lam.13346>
- Machado, L., Magnusson, M., Paul, N. A., De Nys, R., & Tomkins, N. (2014). Effects of marine and freshwater macroalgae on in vitro total gas and methane production. *PLoS ONE*, 9(1), e85289. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085289>
- Machado, L., Magnusson, M., Paul, N. A., Kinley, R., de Nys, R., & Tomkins, N. (2016a). Dose-response effects of *Asparagopsis taxiformis* and *Oedogonium* sp. on in vitro

- fermentation and methane production. *Journal of Applied Phycology*, 28, 1443–1452. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0639-9>
- Machado, L., Magnusson, M., Paul, N. A., Kinley, R., de Nys, R., & Tomkins, N. (2016b). Identification of bioactives from the red seaweed *Asparagopsis taxiformis* that promote antimethanogenic activity in vitro. *Journal of Applied Phycology*, 28, 3117–3126. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0830-7>
- Machado, L., Tomkins, N., Magnusson, M., Midgley, D. J., de Nys, R., & Rosewarne, C. P. (2018). In vitro response of rumen microbiota to the antimethanogenic red macroalga *Asparagopsis taxiformis*. *Microbial Ecology*, 75, 811–818. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-1086-8>
- Maigaard, M., Weisbjerg, M. R., Johansen, M., Walker, N., Ohlsson, C., & Lund, P. (2023). Effects of dietary fat, nitrate, and 3-NOP and their combinations on methane emission, feed intake and milk production in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. Advance online publication. <https://doi.org/10.3168/jds.2023-23420>
- Makkar, H. P. S. (2018). Review: Feed demand landscape and implications of food-not feed strategy for food security and climate change. *Animal*, 12(8), 1744–1754. <https://doi.org/10.1017/S175173111700324X>
- Malik, P. K., Bakshi, B. S., Sejian, V., Zimmerman, P. R., Kurihara, M., & Bhatta, R. (2017). Methane estimation methodologies in sheep. In V. Sejian, R. Bhatta, J. Gaughan, P. Malik, S. Naqvi, & R. Lal (Eds.), *Sheep production adapting to climate change*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-4714-5_12
- Malik, P. K., Bhatta, R., Gagen, E. J., Sejian, V., Soren, N. M., & Prasad, C. S. (2015). Alternate H₂ sinks for reducing rumen methanogenesis. In V. Sejian, J. Gaughan, L. Baumgard, & C. Prasad (Eds.), *Climate change impact on livestock: Adaptation and mitigation* (pp. 303–320). Springer, New Delhi, India. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2265-1_19
- Mambrini, M., & Peyraud, J. (1997). Retention time of feed particles and liquids in the stomachs and intestines of dairy cows. Direct measurement and calculations based on faecal collection. *Reproduction Nutrition Development*, 37(4), 427–442. <https://doi.org/10.1051/rnd:19970404>
- Marounek, M., & Duskova, D. (1999). Metabolism of pectin in rumen bacteria *Butyrivibrio fibrisolvens* and *Prevotella ruminicola*. *Letters in Applied Microbiology*, 29(6), 429–433. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.1999.00671.x>
- Marshall, C. J., Beck, M. R., Garrett, K., Castillo, A. R., Barrell, G. K., Al-Marashdeh, O., & Gregorini, P. (2022). The effect of feeding a mix of condensed and hydrolyzable tannins to heifers on rumen fermentation patterns, blood urea nitrogen, and amino acid profile. *Livestock Science*, 263, 105034. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2022.105034>
- Martínez-Álvarez, M., Auffret, M. D., Stewart, R. D., Dewhurst, R. J., Duthie, C.-A., Rooke, J. A., Wallace, R. J., Shih, B., Freeman, T. C., Watson, M., & Roehe, R. (2020). Identification of complex rumen microbiome interaction within diverse functional niches as mechanisms affecting the variation of methane emissions in bovine. *Frontiers in Microbiology*, 11, 659. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00659>
- Martínez-Fernández, G., Abecia, L., Martín-García, A. I., Ramos-Morales, E., Hervás, G., Molina-Alcaide, E., & Yáñez-Ruiz, D. R. (2013). In vitro-in vivo study on the effects

of plant compounds on rumen fermentation, microbial abundances and methane emissions in goats. *Animal*, 7(12), 1925–1934. <https://doi.org/10.1017/S1751731113001699>

Martinez-Fernandez, G., Denman, S. E., Cheung, J., McSweeney, C. S., & Min, W. (2017). Phloroglucinol degradation in the rumen promotes the capture of excess hydrogen generated from methanogenesis inhibition. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1871. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01871>

Martinez-Fernandez, G., Denman, S. E., Yang, C., Cheung, J., Mitsumori, M., & McSweeney, C. S. (2016). Methane inhibition alters the microbial community, hydrogen flow, and fermentation response in the rumen of cattle. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1122. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01122>

Martinez-Fernandez, G., Duval, S., Kindermann, M., Schirra, H. J., Denman, S. E., & McSweeney, C. S. (2018). 3-NOP vs. halogenated compound: Methane production, ruminal fermentation and microbial community response in forage fed cattle. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1582. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01582>

Mata, L., Gaspar, H., & Santos, R. (2012). Carbon/nutrient balance in relation to biomass production and halogenated compound content in the red alga *Asparagopsis taxiformis* (Bonnemaisoniaceae). *Journal of Phycology*, 48(1), 248–253. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2011.01083.x>

Mathur, Y., & Hazra, A. B. (2022). Methylations in vitamin B12 biosynthesis and catalysis. *Current Opinion in Structural Biology*, 77, 102490. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2022.102490>

McAllister, T. A., Bae, H. D., Jones, G. A., & Cheng, K.-J. (1994). Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *Journal of Animal Science*, 72(11), 3004–3018. <https://doi.org/10.2527/1994.72113004x>

McAllister, T. A., Cheng, K.-J., Okine, E. K., & Mathison, G. W. (1996). Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. *Canadian Journal of Animal Science*, 76(2), 231–243. <https://doi.org/10.4141/cjas96-035>

McAllister, T. A., & Newbold, C. J. (2008). Redirecting rumen fermentation to reduce methanogenesis. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 48(2), 7–13. <https://doi.org/https://doi.org/10.1071/EA07218>

McMahon, L. R., McAllister, T. A., Berg, B. P., Majak, W., Acharya, S. N., Popp, J. D., Coulman, B. E., Wang, Y., & Cheng, K.-J. (2000). A review of the effects of forage condensed tannins on ruminal fermentation and bloat in grazing cattle. *Canadian Journal of Plant Science*, 80(3), 469–485. <https://doi.org/10.4141/P99-050>

McSweeney, C. S., Palmer, B., McNeill, D. M., & Krause, D. O. (2001). Microbial interactions with tannins: Nutritional consequences for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 91(1–2), 83–93. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(01\)00232-2](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(01)00232-2)

Melgar, A., Harper, M. T., Oh, J., Giallongo, F., Young, M. E., Ott, T. L., Duval, S., & Hristov, A. N. (2020). Effects of 3-nitrooxypropanol on rumen fermentation, lactational performance, and resumption of ovarian cyclicity in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 103(1), 410–432. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17085>

- Miller, T. L., & Jenesel, S. E. (1979). Enzymology of butyrate formation by *Butyrivibrio fibrisolvens*. *Journal of Bacteriology*, 138(1), 99–104. <https://doi.org/10.1128/jb.138.1.99-104.1979>
- Min, B. R., Parker, D., Brauer, D., Waldrip, H., Lockard, C., Hales, K., Akbay, A., & Augyte, S. (2021). The role of seaweed as a potential dietary supplementation for enteric methane mitigation in ruminants: Challenges and opportunities. *Animal Nutrition*, 7(4), 1371–1387. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2021.10.003>
- Minatel, I. O., Borges, C. V., Borges, C. V., Alonzo, H., Hector, G., Gomez, G., Chen, C. O., Chen, C. O., Pace, G., & Lima, P. (2017). Phenolic compounds: Functional properties, impact of processing and bioavailability. In M. Soto-Hernandez, M. Palma-Tenango, & M. R. García-Mateos (Eds.), *Phenolic compounds - Biological activity* (pp. 1–24). IntechOpen, London, UK. <https://doi.org/10.5772/66368>
- 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. <https://doi.org/10.1017/S0007114511005794>
- Morgavi, D. P., Forano, E., Martin, C., & Newbold, C. J. (2010). Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal*, 6(5), 1024–1036. <https://doi.org/10.1017/S1751731110000546>
- Moss, A. R., Jouany, J.-P., & Newbold, J. (2000). Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Annales de Zootechnie*, 49(3), 231–253. <https://doi.org/10.1051/animres:2000119>
- Mould, F. L., Morgan, R., Kliem, K. E., & Krystallidou, E. (2005). A review and simplification of the in vitro incubation medium. *Animal Feed Science and Technology*, 123-124, 155–172. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.05.002>
- Moyo, M., & Nsahlai, I. V. (2018). Rate of passage of digesta in ruminants; are goats different? In S. Kukovics (Ed.), *Goat science*. IntechOpen, London, UK. <https://doi.org/10.5772/intechopen.69745>
- Mueller-Harvey, I. (2006). Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(13), 2010–2037. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2577>
- Muetzel, S., Katherine, L., Janssen, P. H., Pacheco, D., Bird, N., Walker, N., Vidoni, N., Schweikert, L., Clasadonte, L., & Kindermann, M. (2019). Towards the application of 3-nitrooxypropanol in pastoral farming systems. 7th GGAA – Greenhouse Gas and Animal Agriculture Conference, Iguassu Falls, Brazil.
- Muizelaar, W., Groot, M., van Duinkerken, G., Peters, R., & Dijkstra, J. (2021). Safety and transfer study: Transfer of bromoform present in *Asparagopsis taxiformis* to milk and urine of lactating dairy cows. *Foods*, 10(3), 584. <https://doi.org/10.3390/foods10030584>
- Murray, R. M., Bryant, A. M., & Leng, R. A. (1976). Rates of production of methane in the rumen and large intestine of sheep. *British Journal of Nutrition*, 36(1), 1–14. <https://doi.org/10.1079/BJN19760053>

- Newbold, C. J., de la Fuente, G., Belanche, A., Ramos-Morales, E., & McEwan, N. R. (2015). The role of ciliate protozoa in the rumen. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1313. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01313>
- Newbold, C. J., López, S., Nelson, N., Ouda, J. O., Wallace, R. J., & Moss, A. R. (2005). Propionate precursors and other metabolic intermediates as possible alternative electron acceptors to methanogenesis in ruminal fermentation. *British Journal of Nutrition*, 94(1), 27–35. <https://doi.org/10.1079/BJN20051445>
- Newbold, C. J., & Ramos-Morales, E. (2020). Review: Ruminal microbiome and microbial metabolome: Effects of diet and ruminant host. *Animal*, 14, s78–s86. <https://doi.org/10.1017/S1751731119003252>
- Newbold, C. J., & Rode, L. M. (2006). Dietary additives to control methanogenesis in the rumen. *International Congress Series*, 1293, 138–147. <https://doi.org/10.1016/j.ics.2006.03.047>
- Nguyen, S. H., Barnett, M. C., & Hegarty, R. S. (2016). Use of dietary nitrate to increase productivity and reduce methane production of defaunated and faunated lambs consuming protein-deficient chaff. *Animal Production Science*, 56(3), 290. <https://doi.org/10.1071/AN15525>
- Nollet, L., Demeyer, D., & Verstraete, W. (1997). Effect of 2-bromoethanesulfonic acid and *Peptostreptococcus productus* ATCC 35244 addition on stimulation of reductive acetogenesis in the ruminal ecosystem by selective inhibition of methanogenesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(1), 194–200.
- O'Brien, M., Navarro-Villa, A., Purcell, P. J., Boland, T. M., & O'Kiely, P. (2014). Reducing in vitro rumen methanogenesis for two contrasting diets using a series of inclusion rates of different additives. *Animal Production Science*, 54(2), 141. <https://doi.org/10.1071/AN12204>
- Odongo, N. E., Or-Rashid, M. M., Kebreab, E., France, J., & McBride, B. W. (2007). Effect of supplementing myristic acid in dairy cow rations on ruminal methanogenesis and fatty acid profile in milk. *Journal of Dairy Science*, 90(4), 1851–1858. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-541>
- O'Hara, E., Terry, S. A., Moote, P., Beauchemin, K. A., McAllister, T. A., Abbott, D. W., & Gruninger, R. J. (2023). Comparative analysis of macroalgae supplementation on the rumen microbial community: *Asparagopsis taxiformis* inhibits major ruminal methanogenic, fibrolytic, and volatile fatty acid-producing microbes in vitro. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1104667. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1104667>
- Orpin, C. G., & Joblin, K. N. (1997). The rumen anaerobic fungi. In P. N. Hobson & C. S. Stewart (Eds.), *The rumen microbial ecosystem* (pp. 140–195). Springer, Dordrecht, Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-009-1453-7_4
- Orzuna-Orzuna, J., Dorantes-Iturbide, G., Lara-Bueno, A., Mendoza-Martínez, G., Miranda-Romero, L., & Hernández-García, P. (2021). Effects of dietary tannins' supplementation on growth performance, rumen fermentation, and enteric methane emissions in beef cattle: A meta-analysis. *Sustainability*, 13(13), 7410. <https://doi.org/10.3390/su13137410>

- Owens, F. N., & Goetsch, A. L. (1988). Ruminant fermentation. In D. C. Church (Ed.), *The ruminant animal: Digestive physiology and nutrition* (pp. 145–171). Waveland Press, Prospect Heights, NY, USA.
- Patel, T. R., Jure, K. G., & Jones, G. A. (1981). Catabolism of phloroglucinol by the rumen anaerobe. *Applied and Environmental Microbiology*, 42(6), 1010–1017. <https://doi.org/10.1128/aem.42.6.1010-1017.1981>
- Patra, A. K., & Saxena, J. (2009a). Dietary phytochemicals as rumen modifiers: A review of the effects on microbial populations. *Antonie van Leeuwenhoek*, 96(4), 363–375. <https://doi.org/10.1007/s10482-009-9364-1>
- Patra, A. K., & Saxena, J. (2009b). The effect and mode of action of saponins on the microbial populations and fermentation in the rumen and ruminant production. *Nutrition Research Reviews*, 22(2), 204–219. <https://doi.org/10.1017/S0954422409990163>
- Patra, A., 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(13), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0145-9>
- Pereira, A. M., de Lurdes Nunes Enes Dapkevicius, M., & Borba, A. E. S. (2022). Alternative pathways for hydrogen sink originated from the ruminal fermentation of carbohydrates: Which microorganisms are involved in lowering methane emission?. *Animal Microbiome*, 4(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s42523-021-00153-w>
- Petersen, S. O., Hellwing, A. L. F., Brask, M., Højberg, O., Poulsen, M., Zhu, Z., Baral, K. R., & Lund, P. (2015). Dietary nitrate for methane mitigation leads to nitrous oxide emissions from dairy cows. *Journal of Environmental Quality*, 44(4), 1063–1070. <https://doi.org/10.2134/jeq2015.02.0107>
- Petri, R. M., Neubauer, V., Humer, E., Kröger, I., Reisinger, N., & Zebeli, Q. (2020). Feed additives differentially impact the epimural microbiota and host epithelial gene expression of the bovine rumen fed diets rich in concentrates. *Frontiers in Microbiology*, 11, 119. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00119>
- Pitta, D. W., Indugu, N., Melgar, A., Hristov, A., Challa, K., Vecchiarelli, B., Hennessy, M., Narayan, K., Duval, S., Kindermann, M., & Walker, N. (2022). The effect of 3-nitrooxypropanol, a potent methane inhibitor, on ruminal microbial gene expression profiles in dairy cows. *Microbiome*, 10(1), 146. <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01341-9>
- Prabhu, R., Altman, E., & Eitemana, M. A. (2012). Lactate and acrylate metabolism by *Megasphaera elsdenii* under batch and steady-state conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(24), 8564–8570. <https://doi.org/10.1128/AEM.02443-12>
- Prakash, D., Wu, Y., Suh, S.-J., & Duin, E. C. (2014). Elucidating the process of activation of methyl-coenzyme M reductase. *Journal of Bacteriology*, 196(13), 2491–2498. <https://doi.org/10.1128/JB.01658-14>
- Rae, H. A. (1999). Onion toxicosis in a herd of beef cows. *The Canadian Veterinary Journal*, 40(1), 55–57.
- Ramayo-Caldas, Y., Zingaretti, L., Popova, M., Estellé, J., Bernard, A., Pons, N., Bellot, P., Mach, N., Rau, A., Roume, H., Perez-Enciso, M., Faverdin, P., Edouard, N., Ehrlich,

- D., Morgavi, D. P., & Renand, G. (2020). Identification of rumen microbial biomarkers linked to methane emission in Holstein dairy cows. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 137(1), 49–59. <https://doi.org/10.1111/jbg.12427>
- Ramos-Morales, E., de la Fuente, G., Duval, S., Wehrli, C., Bouillon, M., Lahmann, M., Preskett, D., Braganca, R., & Newbold, C. J. (2017a). Antiprotozoal effect of saponins in the rumen can be enhanced by chemical modifications in their structure. *Frontiers in Microbiology*, 08, 399. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00399>
- Ramos-Morales, E., de la Fuente, G., Nash, R. J., Braganca, R., Duval, S., Bouillon, M. E., Lahmann, M., & Newbold, C. J. (2017b). Improving the antiprotozoal effect of saponins in the rumen by combination with glycosidase inhibiting iminosugars or by modification of their chemical structure. *PLOS ONE*, 12(9), e0184517. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184517>
- Reynolds, C. K., & Kristensen, N. B. (2008). Nitrogen recycling through the gut and the nitrogen economy of ruminants: An asynchronous symbiosis. *Journal of Animal Science*, 86, E293–E305. <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0475>
- Ridla, M., Laconi, E. B., Nahrowi, & Jayanegara, A. (2021). Effects of saponin on enteric methane emission and nutrient digestibility of ruminants: An in vivo meta-analysis. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 788(1), 012028. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/788/1/012028>
- Romero-Perez, A., Okine, E. K., McGinn, S. M., Guan, L. L., Oba, M., Duval, S. M., Kindermann, M., & Beauchemin, K. A. (2014). The potential of 3-nitrooxypropanol to lower enteric methane emissions from beef cattle. *Journal of Animal Science*, 92(10), 4682–4693. <https://doi.org/10.2527/jas.2014-7573>
- Rooke, J. A., Wallace, R. J., Duthie, C.-A., McKain, N., de Souza, S. M., Hyslop, J. J., Ross, D. W., Waterhouse, T., & Roehe, R. (2014). Hydrogen and methane emissions from beef cattle and their rumen microbial community vary with diet, time after feeding and genotype. *British Journal of Nutrition*, 112(3), 398–407. <https://doi.org/10.1017/S0007114514000932>
- Roque, B. M., Brooke, C. G., Ladau, J., Polley, T., Marsh, L. J., Najafi, N., Pandey, P., Singh, L., Kinley, R., Salwen, J. K., Eloie-Fadrosch, E., Kebreab, E., & Hess, M. (2019a). Effect of the macroalgae *Asparagopsis taxiformis* on methane production and rumen microbiome assemblage. *Animal Microbiome*, 1(3), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s42523-019-0004-4>
- Roque, B. M., Salwen, J. K., Kinley, R., & Kebreab, E. (2019b). Inclusion of *Asparagopsis armata* in lactating dairy cows' diet reduces enteric methane emission by over 50 percent. *Journal of Cleaner Production*, 234, 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.06.193>
- Roque, B. M., Van Lingen, H. J., Vrancken, H., & Kebreab, E. (2019c). Effect of Mootral—a garlic- and citrus-extract-based feed additive—on enteric methane emissions in feedlot cattle. *Translational Animal Science*, 3(4), 1383–1388. <https://doi.org/10.1093/tas/txz133>
- Roque, B. M., Venegas, M., Kinley, R. D., De Nys, R., Duarte, T. L., Yang, X., & Kebreab, E. (2021). Red seaweed (*Asparagopsis taxiformis*) supplementation reduces

enteric methane by over 80 percent in beef steers. *PLoS ONE*, 16(3), e0247820. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247820>

Rouvière, P. E., & Wolfe, R. S. (1988). Novel biochemistry of methanogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 263(17), 7913–7916. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)68417-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)68417-0)

Russell, J. B. (2002). *Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition*. Ithaca, NY, USA.

Russell, J. B., & Strobel, H. J. (1989). Effect of ionophores on ruminal fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(1), 1–6. <https://doi.org/10.1128/aem.55.1.1-6.1989>

Russell, J. B., & Wallace, R. J. (1997). Energy-yielding and energy-consuming reactions. In P. N. Hobson & C. S. Stewart (Eds.), *The rumen microbial ecosystem* (pp. 246–282). Springer, Dordrecht, Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-009-1453-7_6

Rychen, G., Aquilina, G., Azimonti, G., Bampidis, V., Bastos, M. de L., Bories, G., Chesson, A., Cocconcelli, P. S., Flachowsky, G., Gropp, J., Kolar, B., Kouba, M., López-Alonso, M., López Puente, S., Mantovani, A., Mayo, B., Ramos, F., Saarela, M., Villa, R. E., ... Martino, L. (2018). Guidance on the assessment of the efficacy of feed additives. *EFSA Journal*, 16(5), e05274. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5274>

Salter, A. M. (2017). Improving the sustainability of global meat and milk production. *Proceedings of the Nutrition Society*, 76(1), 22–27. <https://doi.org/10.1017/S0029665116000276>

Sarwono, K. A., Kondo, M., Ban-Tokuda, T., Jayanegara, A., & Matsui, H. (2019). Effects of phloroglucinol and the forage: Concentrate ratio on methanogenesis, in vitro rumen fermentation, and microbial population density. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 7(3), 164–171. <https://doi.org/10.17582/journal.aavs/2019/7.3.164.171>

Schilde, M., von Soosten, D., Hüther, L., Meyer, U., Zeyner, A., & Dänicke, S. (2021). Effects of 3-nitrooxypropanol and varying concentrate feed proportions in the ration on methane emission, rumen fermentation and performance of periparturient dairy cows. *Archives of Animal Nutrition*, 75(2), 79–104. <https://doi.org/10.1080/1745039X.2021.1877986>

Sejian, V., Lal, R., Lakritz, J., & Ezeji, T. (2011). Measurement and prediction of enteric methane emission. *International Journal of Biometeorology*, 55(1), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s00484-010-0356-7>

Shi, W., Moon, C. D., Leahy, S. C., Kang, D., Froula, J., Kittelmann, S., Fan, C., Deutsch, S., Gagic, D., Seedorf, H., Kelly, W. J., Atua, R., Sang, C., Soni, P., Li, D., Pinares-Patiño, C. S., McEwan, J. C., Janssen, P. H., Chen, F., ... Rubin, E. M. (2014). Methane yield phenotypes linked to differential gene expression in the sheep rumen microbiome. *Genome Research*, 24(9), 1517–1525. <https://doi.org/10.1101/gr.168245.113>

Shi, Y., Odt, C. L., & Weimer, P. J. (1997). Competition for cellulose among three predominant ruminal cellulolytic bacteria under substrate-excess and substrate-limited conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(2), 734–742. <https://doi.org/10.1128/aem.63.2.734-742.1997>

- Sivropoulou, A., Papanikolaou, E., Nikolaou, C., Kokkini, S., Lanaras, T., & Arsenakis, M. (1996). Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(5), 1202–1205. <https://doi.org/10.1021/jf950540t>
- Smith, A. H., Zoetendal, E., & Mackie, R. I. (2005). Bacterial mechanisms to overcome inhibitory effects of dietary tannins. *Microbial Ecology*, 50(2), 197–205. <https://doi.org/10.1007/s00248-004-0180-x>
- Smith, J., Sones, K., Grace, D., MacMillan, S., Tarawali, S., & Herrero, M. (2013). Beyond milk, meat, and eggs: Role of livestock in food and nutrition security. *Animal Frontiers*, 3(1), 6–13. <https://doi.org/10.2527/af.2013-0002>
- Smith, P. E., Kelly, A. K., Kenny, D. A., & Waters, S. M. (2022a). Differences in the composition of the rumen microbiota of finishing beef cattle divergently ranked for residual methane emissions. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.855565>
- Snelling, T. J., Genç, B., McKain, N., Watson, M., Waters, S. M., Creevey, C. J., & Wallace, R. J. (2014). Diversity and community composition of methanogenic archaea in the rumen of scottish upland sheep assessed by different methods. *PLoS ONE*, 9(9), e106491. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106491>
- Stefenoni, H. A., Räisänen, S. E., Cueva, S. F., Wasson, D. E., Lage, C. F. A., Melgar, A., Fetter, M. E., Smith, P., Hennessy, M., Vecchiarelli, B., Bender, J., Pitta, D., Cantrell, C. L., Yarish, C., & 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*, 104(4), 4157–4173. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19686>
- Steinfeld, H., Gerber, P., Wassenaar, T., Castel, V., Rosales, M., & de Haan, C. (2006). *Livestock's long shadow: Environmental issues and options*. FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Szczechowiak, J., Szumacher-Strabel, M., El-Sherbiny, M., Bryszak, M., Stochmal, A., & Cieslak, A. (2016). Effect of dietary supplementation with *Saponaria officinalis* root on rumen and milk fatty acid proportion in dairy cattle. *Animal Science Papers and Reports*, 34(3), 221–232.
- Tajima, K., Nagamine, T., Matsui, H., Nakamura, M., & Aminov, R. I. (2001). Phylogenetic analysis of archaeal 16S rRNA libraries from the rumen suggests the existence of a novel group of archaea not associated with known methanogens. *FEMS Microbiology Letters*, 200(1), 67–72. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10694.x>
- Tapio, I., Snelling, T. J., Strozzi, F., & Wallace, R. J. (2017). The ruminal microbiome associated with methane emissions from ruminant livestock. In *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 8, 7. <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0141-0>
- Terry, S. A., Krüger, A. M., Lima, P. M. T., Gruninger, R. J., Abbott, D. W., & Beauchemin, K. A. (2023). Evaluation of rumen fermentation and microbial adaptation to three red seaweeds using the Rumen Simulation Technique. *Animals*, 13(10), 1643. <https://doi.org/10.3390/ani13101643>
- Thauer, R. K. (2012). The Wolfe cycle comes full circle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(38), 15084–15085. <https://doi.org/10.1073/pnas.1213193109>

- Thauer, R. K. (2019). Methyl (alkyl)-coenzyme M reductases: Nickel F-430-containing enzymes involved in anaerobic methane formation and in anaerobic oxidation of methane or of short chain alkanes. *Biochemistry*, 58(52), 5198–5220. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00164>
- 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. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1931>
- Theodorou, M. K., Gascoyne, D. J., Akin, D. E., & Hartley, R. D. (1987). Effect of phenolic acids and phenolics from plant cell walls on rumenlike fermentation in consecutive batch culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(5), 1046–1050. <https://doi.org/10.1128/aem.53.5.1046-1050.1987>
- Theodorou, M. K., Gascoyne, D. J., & Beever, D. E. (1984). The role of consecutive batch culture in rumen microbiology. *Canadian Journal of Animal Science*, 64(5), 47–48. <https://doi.org/10.4141/cjas84-150>
- Thorsteinsson, M., Maigaard, M., Lund, P., Weisbjerg, M. R., & Nielsen, M. O. (2023). Effect of fumaric acid in combination with *Asparagopsis taxiformis* or nitrate on in vitro gas production, pH, and redox potential. *JDS Communications*, 4(5), 335–339. <https://doi.org/10.3168/jdsc.2022-0259>
- Trei, J. E., Parish, R. C., Singh, Y. K., & Scott, G. C. (1971). Effect of methane inhibitors on rumen metabolism and feedlot performance of sheep. *Journal of Dairy Science*, 54(4), 536–540. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(71\)85882-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(71)85882-4)
- Tsai, C.-G., Gates, D. M., Ingledew, W. M., & Jones, G. A. (1976). Products of anaerobic phloroglucinol degradation by *Coprococcus* sp. Pe151,2. *Canadian Journal of Microbiology*, 22(2), 159–164. <https://doi.org/10.1139/m76-022>
- Tsai, C.-G., & Jones, G. (1975). Isolation and identification of rumen bacteria capable of anaerobic phloroglucinol degradation. *Canadian Journal of Microbiology*, 21(6), 794–801. <https://doi.org/10.1139/m75-117>
- Tseten, T., Sanjorjo, R. A., Kwon, M., & Kim, S. W. (2022). Strategies to mitigate enteric methane emissions from ruminant animals. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(3), 269–277. <https://doi.org/10.4014/jmb.2202.02019>
- Ultee, A., Kets, E. P. W., & Smid, E. J. (1999). Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(10), 4606–4610. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.10.4606-4610.1999>
- Ungerfeld, E. M. (2013). A theoretical comparison between two ruminal electron sinks. *Frontiers in Microbiology*, 4, 319. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00319>
- Ungerfeld, E. M. (2015). Shifts in metabolic hydrogen sinks in the methanogenesis-inhibited ruminal fermentation: A meta-analysis. *Frontiers in Microbiology*, 6, 37. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00037>
- Ungerfeld, E. M. (2018). Inhibition of rumen methanogenesis and ruminant productivity: A meta-analysis. *Frontiers in Veterinary Science*, 5, 113. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00113>

- Ungerfeld, E. M. (2020). Metabolic hydrogen flows in rumen fermentation: Principles and possibilities of interventions. *Frontiers in Microbiology*, 11, 589. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00589>
- Ungerfeld, E. M., Aedo, M. F., Martínez, E. D., & Saldivia, M. (2019). Inhibiting methanogenesis in rumen batch cultures did not increase the recovery of metabolic hydrogen in microbial amino acids. *Microorganisms*, 7(5), 115. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7050115>
- Ungerfeld, E. M., Beauchemin, K. A., & Muñoz, C. (2022). Current perspectives on achieving pronounced enteric methane mitigation from ruminant production. *Frontiers in Animal Science*, 2, 795200. <https://doi.org/10.3389/fanim.2021.795200>
- Ungerfeld, E. M., & Forster, R. J. (2011). A meta-analysis of malate effects on methanogenesis in ruminal batch cultures. *Animal Feed Science and Technology*, 166–167, 282–290. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.04.018>
- Ungerfeld, E. M., & Hackmann, T. J. (2020). Factors influencing the efficiency of rumen energy metabolism. In C. S. McSweeney & R. I. Mackie (Eds.), *Improving rumen function* (pp. 421–466). Burleigh Dodds Science Publishing <https://doi.org/10.19103/AS.2020.0067.14>
- Ungerfeld, E. M., Kohn, R. A., Wallace, R. J., & Newbold, C. J. (2007). A meta-analysis of fumarate effects on methane production in ruminal batch cultures. *Journal of Animal Science*, 85(10), 2556–2563. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-674>
- Ungerfeld, E. M., Rust, S. R., Boone, D. R., & Liu, Y. (2004). Effects of several inhibitors on pure cultures of ruminal methanogens. *Journal of Applied Microbiology*, 97(3), 520–526. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02330.x>
- Ungerfeld, E. M., Rust, S. R., & Burnett, R. (2003). Use of some novel alternative electron sinks to inhibit ruminal methanogenesis. *Reproduction Nutrition Development*, 43(2), 189–202. <https://doi.org/10.1051/rnd:2003016>
- United Nations (2022). *World population prospects 2022: Summary of results*. https://www.un.org/development/desa/pd/sites/www.un.org.development.desa.pd/files/wpp2022_summary_of_results.pdf
- Valadares, R. F. D., Broderick, G. A., Filho, S. C. V., & Clayton, M. K. (1999). Effect of replacing alfalfa silage with high moisture corn on ruminal protein synthesis estimated from excretion of total purine derivatives. *Journal of Dairy Science*, 82(12), 2686–2696. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75525-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75525-6)
- van Dijk, M., Morley, T., Rau, M. L., & Saghai, Y. (2021). A meta-analysis of projected global food demand and population at risk of hunger for the period 2010–2050. *Nature Food*, 2(7), 494–501. <https://doi.org/10.1038/s43016-021-00322-9>
- Van Eekert, M. H. A., Schröder, T. J., Stams, A. J. M., Schraa, G., & Field, J. A. (1998). Degradation and fate of carbon tetrachloride in unadapted methanogenic granular sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(7), 2350–2356. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.7.2350-2356.1998>
- van Gastelen, S., Dijkstra, J., Heck, J. M. L., Kindermann, M., Klop, A., de Mol, R., Rijnders, D., Walker, N., & Bannink, A. (2022). Methane mitigation potential of 3-

- nitrooxypropanol in lactating cows is influenced by basal diet composition. *Journal of Dairy Science*, 105(5), 4064–4082. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20782>
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B., & Lewis, B. A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74(10), 3583–3597. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)
- van Zijderveld, S. M., Gerrits, W. J. J., Apajalahti, J. A., Newbold, J. R., Dijkstra, J., & Leng, R. A. (2010). Nitrate and sulfate: Effective alternative hydrogen sinks for mitigation of ruminal methane production in sheep. *Journal of Dairy Science*, 93(12), 5856–5866. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3281>
- Veneman, J. B., Muetzel, S., Hart, K. J., Faulkner, C. L., Moorby, J. M., Perdok, H. B., & Newbold, C. J. (2015). Does dietary mitigation of enteric methane production affect rumen function and animal productivity in dairy cows?. *PLOS ONE*, 10(10), e0140282. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140282>
- Verma, S., Taube, F., & Malisch, C. S. (2021). Examining the variables leading to apparent incongruity between antimethanogenic potential of tannins and their observed effects in ruminants—A review. *Sustainability*, 13(5), 2743. <https://doi.org/10.3390/su13052743>
- Villar, M. L., Godwin, I. R., Hegarty, R. S., Erler, D. V., Farid, H. T., & Nolan, J. V. (2021). Nitrate and nitrite absorption, recycling and retention in tissues of sheep. *Small Ruminant Research*, 200, 106392. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2021.106392>
- Voet, D., & Voet, J. G. (1995). *Biochemistry*. John Wiley & Sons, NY, USA.
- Vyas, D., Alemu, A. W., McGinn, S. M., Duval, S. M., Kindermann, M., & Beauchemin, K. A. (2018). The combined effects of supplementing monensin and 3-nitrooxypropanol on methane emissions, growth rate, and feed conversion efficiency in beef cattle fed high-forage and high-grain diets. *Journal of Animal Science*, 96(7), 2923–2938. <https://doi.org/10.1093/jas/sky174>
- Vyas, D., McGinn, S. M., Duval, S. M., Kindermann, M., & Beauchemin, K. A. (2016a). Effects of sustained reduction of enteric methane emissions with dietary supplementation of 3-nitrooxypropanol on growth performance of growing and finishing beef cattle. *Journal of Animal Science*, 94(5), 2024–2034. <https://doi.org/10.2527/jas.2015-0268>
- Vyas, D., McGinn, S. M., Duval, S. M., Kindermann, M. K., & Beauchemin, K. A. (2016b). Optimal dose of 3-nitrooxypropanol for decreasing enteric methane emissions from beef cattle fed high-forage and high-grain diets. *Animal Production Science*, 58(6), 1049–1055. <https://doi.org/10.1071/AN15705>
- Wallace, R. J. (1991). Rumen proteolysis and its control. In J. P. Jouany (Ed.), *Rumen microbial metabolism and ruminant digestion* (pp. 131–150). Quae, Paris, France.
- Wallace, R. J., Onodera, R., & Cotta, M. A. (1997). Metabolism of nitrogen-containing compounds. In P. N. Hobson & C. S. Stewart (Eds.), *The rumen microbial ecosystem* (pp. 283–328). Springer, Dordrecht, Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-009-1453-7_7
- Wallace, R. J., Rooke, J. A., McKain, N., Duthie, C.-A., Hyslop, J. J., Ross, D. W., Waterhouse, A., Watson, M., & Roehe, R. (2015). The rumen microbial metagenome

- associated with high methane production in cattle. *BMC Genomics*, 16(1), 839. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2032-0>
- Wang, B., Tu, Y., Zhao, S. P., Hao, Y. H., Liu, J. X., Liu, F. H., Xiong, B. H., & Jiang, L. S. (2017). Effect of tea saponins on milk performance, milk fatty acids, and immune function in dairy cow. *Journal of Dairy Science*, 100(10), 8043–8052. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12425>
- Wang, K., Xiong, B., & Zhao, X. (2023). Could propionate formation be used to reduce enteric methane emission in ruminants?. *Science of The Total Environment*, 855, 158867. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158867>
- Wang, L., Zhang, G., Li, Y., & Zhang, Y. (2020). Effects of high forage/concentrate diet on volatile fatty acid production and the microorganisms involved in VFA production in cow rumen. *Animals*, 10(2), 223. <https://doi.org/10.3390/ani10020223>
- Wang, M., Wang, R., Xie, T. Y., Janssen, P. H., Sun, X. Z., Beauchemin, K. A., Tan, Z. L., & Gao, M. (2016). Shifts in rumen fermentation and microbiota are associated with dissolved ruminal hydrogen concentrations in lactating dairy cows fed different types of carbohydrates. *The Journal of Nutrition*, 146(9), 1714–1721. <https://doi.org/10.3945/jn.116.232462>
- Wang, Y., & McAllister, T. A. (2002). Rumen microbes, enzymes and feed digestion-A review. *Animal Sciences*, 15(11), 1659–1676. <https://doi.org/10.5713/ajas.2002.1659>
- Weatherburn, M. W. (1967). Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry*, 39(8), 971–974. <https://doi.org/10.1021/ac60252a045>
- Wei, C., Guyader, J., Collazos, L., Beauchemin, K. A., & Zhao, G. Y. (2019). Effects of gallic acid on in vitro rumen fermentation and methane production using rumen simulation (Rusitec) and batch-culture techniques. *Animal Production Science*, 59(2), 277. <https://doi.org/10.1071/AN17365>
- Wischer, G., Greiling, A. M., Boguhn, J., Steingass, H., Schollenberger, M., Hartung, K., & Rodehutschord, M. (2014). Effects of long-term supplementation of chestnut and valonea extracts on methane release, digestibility and nitrogen excretion in sheep. *Animal*, 8(6), 938–948. <https://doi.org/10.1017/S1751731114000639>
- Wolin, M. J. (1960). A theoretical rumen fermentation balance. *Journal of Dairy Science*, 43(10), 1452–1459. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(60\)90348-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(60)90348-9)
- Wolin, M. J., Miller, T. L., & Stewart, C. S. (1997). Microbe-microbe interactions. In P. N. Hobson & S. C. Stewart (Eds.), *The rumen microbial ecosystem* (pp. 467–491). Springer, Dordrecht, Netherlands.
- Wong, A. (2019). Unknown risk on the farm: Does agricultural use of ionophores contribute to the burden of antimicrobial resistance?. *MSphere*, 4(5). <https://doi.org/10.1128/mSphere.00433-19>
- Wood, J. M., Kennedy, F. S., & Wolfe, R. S. (1968). The reaction of multihalogenated hydrocarbons with free and bound reduced vitamin B12. *Biochemistry*, 7(5), 1707–1713. <https://doi.org/10.1021/bi00845a013>
- Wright, A.-D. G., & Klieve, A. V. (2011). Does the complexity of the rumen microbial ecology preclude methane mitigation?. *Animal Feed Science and Technology*, 166–167, 248–253. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.04.015>

- Yáñez-Ruiz, D. R., Bannink, A., Dijkstra, J., Kebreab, E., Morgavi, D. P., Kiely, O. P., Reynolds, C. K., Schwarm, A., Shingfield, K. J., Yu, Z., & Hristov, A. N. (2016). Design, implementation and interpretation of *in vitro* batch culture experiments to assess enteric methane mitigation in ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 216, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.03.016>
- Yang, C., McKain, N., McCartney, C. A., & Wallace, R. J. (2019). Consequences of inhibiting methanogenesis on the biohydrogenation of fatty acids in bovine ruminal digesta. *Animal Feed Science and Technology*, 254, 114189. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.05.012>
- Yang, C., Rooke, J. A., Cabeza, I., & Wallace, R. J. (2016). Nitrate and inhibition of ruminal methanogenesis: Microbial ecology, obstacles, and opportunities for lowering methane emissions from ruminant livestock. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00132>
- Yang, N., Reiher, M., Wang, M., Harmer, J., & Duin, E. C. (2007). Formation of a nickel–methyl species in methyl-coenzyme M reductase, an enzyme catalyzing methane formation. *Journal of the American Chemical Society*, 129(36), 11028–11029. <https://doi.org/10.1021/ja0734501>
- Yokohama, M. T., & Johnson, K. A. (1988). Microbiología del rumen e intestino. In C. D. Church (Ed.), *El rumiante, fisiología digestiva y nutrición* (pp. 137–158). Acribial, Zaragoza, España.
- Yu, G., Beauchemin, K. A., & Dong, R. (2021). A review of 3-nitrooxypropanol for enteric methane mitigation from ruminant livestock. *Animals*, 11(12), 3540. <https://doi.org/10.3390/ani11123540>
- Zhou, M., Chen, Y., & Guan, L. L. (2015). Rumen bacteria. In A. K. Puniya, R. Singh, & D. N. Kamra (Eds.), *Rumen microbiology: From evolution to revolution* (pp. 79–95). Springer, New Delhi, India.
- Zhou, M., Hernandez-Sanabria, E., & Guan, L. L. (2010). Characterization of variation in rumen methanogenic communities under different dietary and host feed efficiency conditions, as determined by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(12), 3776–3786. <https://doi.org/10.1128/AEM.00010-10>
- Zhou, Y., Dorchak, A. E., & Ragsdale, S. W. (2013). In vivo activation of methyl-coenzyme M reductase by carbon monoxide. *Frontiers in Microbiology*, 4, 69. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00069>
- Zuhainis, S. W., Abdullah, N., Alimon, A. R., & Ho, Y. W. (2007). Effects of phenolic monomers on the degradation of ¹⁴C-cellulose by rumen fungi. *Research Journal of Microbiology*, 2, 918–925. <https://scialert.net/abstract/?doi=jm.2007.918.925>

MATERIAL SUPPLEMENTARIO

*Supplementary
material*

Supplementary Table S1. The dose-response effect of 2-bromoethanesulfonate (0, 4, 8, 12, 16, 20 μ M) on 24 h *in vitro* fermentation in rumen fluid from goats (Experiment 1.1).

	BES0	BES4	BES8	BES12	BES16	BES20	SEM	P-value	Contrasts
pH	6.45	6.40	6.38	6.37	6.37	6.36	0.02	0.725	NS
TGP, mL	125	121	120	117	118	117	3.02	0.984	NS
CH ₄ , mL	38.0 ^a	22.1 ^b	19.1 ^b	11.9 ^b	12.4 ^b	9.94 ^b	2.83	0.006	L ^{***} , Q [†]
H ₂ , mL	0.28	1.96	2.36	8.74	8.59	11.4	1.38	0.092	NS
NH ₃ -N, mg/100 mL	53.0	48.1	48.3	47.2	44.0	43.9	3.13	0.975	NS
Lactate, μ g/mL	11.7	12.8	10.7	10.4	11.2	10.3	0.65	0.902	NS
Total VFA, mM	117	112	111	108	106	107	4.27	0.986	NS
VFA, mol/100 mol									
Acetate	61.7 ^a	56.9 ^b	55.7 ^b	55.8 ^b	55.5 ^b	55.3 ^b	0.59	0.002	L ^{***} , Q ^{**}
Propionate	19.3 ^c	22.8 ^b	23.6 ^{ab}	23.8 ^a	24.0 ^a	24.2 ^a	0.37	<0.001	L ^{***} , Q ^{***}
Isobutyrate	1.38	1.18	1.18	1.20	1.28	1.20	0.07	0.967	NS
Butyrate	14.0	15.5	15.8	15.6	15.7	15.8	0.32	0.575	NS
Isovalerate	1.98	1.75	1.70	1.60	1.60	1.58	0.09	0.848	NS
Valerate	1.69	1.93	2.00	1.98	1.98	2.00	0.06	0.686	NS
A:P	3.20 ^a	2.50 ^b	2.36 ^b	2.34 ^b	2.32 ^b	2.29 ^b	0.07	<0.001	L ^{***} , Q ^{***}

BES: 2-bromoethanesulfonate at different concentrations: 0 (BES0), 4 (BES4), 8 (BES8), 12 (BES12), 16 (BES16) and 20 μ M (BES20); VFA: volatile fatty acids; TGP: total gas production; A:P = acetate:propionate ratio. ^{a-c} Values within a row with different superscripts differ significantly at $P < 0.05$ (n=4). Contrast: NS, not significant; L, linear response; Q, quadratic response; *** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; [†] $P < 0.1$.

Supplementary Table S2. The dose-response effect of phenol (0, 2, 4, 6 mM) on 24 h *in vitro* fermentation in rumen fluid from goats (Experiment 1.2).

	Phe0	Phe2	Phe4	Phe6	SEM	P-value	Contrasts
pH	6.46	6.46	6.46	6.46	0.01	0.994	NS
TGP (mL)	132	132	135	132	2.09	0.975	NS
CH ₄ (mL)	18.3	20.8	13.6	20.2	2.28	0.772	NS
H ₂ (mL)	0.27	0	0	0	0.11	0.713	NS
NH ₃ -N (mg/100 mL)	157	132	130	141	13.2	0.868	NS
Lactate (μ g/mL)	10.4	11.0	11.8	11.1	1.29	0.988	NS
Total VFA (mM)	110	112	101	108	3.50	0.758	NS
VFA (mol/100 mol)							
Acetate	61.2	61.0	61.4	61.2	0.23	0.959	NS
Propionate	18.5	18.8	18.5	18.9	0.22	0.919	NS
Isobutyrate	1.21	1.10	1.05	1.10	0.04	0.396	NS
Butyrate	15.3	15.2	15.2	14.8	0.32	0.970	NS
Isovalerate	2.30	2.48	2.25	2.25	0.08	0.801	NS
Valerate	1.46	1.45	1.65	1.80	0.05	0.060	NS
A:P	3.31	3.25	3.34	3.25	0.04	0.830	NS

Phe: phenol at different concentrations: 0 (Phe0), 2 (Phe2), 4 (Phe4) and 6 mM (Phe6); VFA: volatile fatty acids; TGP: total gas production; A:P: acetate:propionate ratio. Contrast: NS, not significant.

Supplementary Table S3. The dose-response effect of catechol (0, 2, 4, 6 mM) on 24 h *in vitro* fermentation in rumen fluid from goats (Experiment 1.2).

	Cat0	Cat2	Cat4	Cat6	SEM	<i>P</i> -value	Contrasts
pH	6.46	6.46	6.47	6.48	0.01	0.951	NS
TGP (mL)	132	133	129	131	2.06	0.964	NS
CH ₄ (mL)	18.3	26.9	21.0	23.5	2.02	0.489	NS
H ₂ (mL)	0.27	0	0	0	0.11	0.712	NS
NH ₃ -N (mg/100 mL)	157	143	148	141	8.90	0.910	NS
Lactate (μg/mL)	10.4	11.6	12.3	11.3	1.49	0.978	NS
Total VFA (mM)	110	108	110	111	1.76	0.961	NS
VFA (mol/100 mol)							
Acetate	61.2	60.8	60.9	60.6	0.21	0.744	NS
Propionate	18.5	18.7	19.0	19.0	0.21	0.800	NS
Isobutyrate	1.21	1.13	1.10	1.20	0.04	0.728	NS
Butyrate	15.3	15.1	15.2	15.3	0.29	0.996	NS
Isovalerate	2.30	2.33	2.35	2.38	0.07	0.983	NS
Valerate	1.46 ^b	2.08 ^a	1.48 ^b	1.48 ^b	0.07	<0.001	Q*
A:P	3.31	3.26	3.21	3.19	0.03	0.594	NS

Cat: catechol at different concentrations: 0 (Cat0), 2 (Cat2), 4 (Cat4) and 6 mM (Cat6); VFA: volatile fatty acids; TGP: total gas production; A:P: acetate:propionate ratio. ^{a-b} Values within a row with different superscripts differ significantly at $P < 0.05$ (n=4). Contrast: NS, not significant; Q, quadratic response; * $P < 0.05$.

Supplementary Table S4. The dose-response effect of resorcinol (0, 2, 4, 6 mM) on 24 h *in vitro* fermentation in rumen fluid from goats (Experiment 1.2).

	Res0	Res2	Res4	Res6	SEM	<i>P</i> -value	Contrasts
pH	6.46	6.46	6.48	6.47	0.01	0.854	NS
TGP (mL)	132	131	131	131	1.82	0.991	NS
CH ₄ (mL)	18.3	19.1	19.9	19.1	1.95	0.994	NS
H ₂ (mL)	0.27	0	0	0	0.11	0.712	NS
NH ₃ -N (mg/100 mL)	157	147	175	161	6.50	0.644	NS
Lactate (μg/mL)	10.4	7.74	8.24	7.72	1.08	0.751	NS
Total VFA (mM)	110	112	113	112	1.50	0.921	NS
VFA (mol/100 mol)							
Acetate	61.2	61.3	61.4	61.2	0.22	0.996	NS
Propionate	18.5	18.5	18.6	18.7	0.18	0.994	NS
Isobutyrate	1.21	1.20	1.23	1.20	0.05	0.998	NS
Butyrate	15.3	15.1	15.1	15.0	0.29	0.992	NS
Isovalerate	2.30	2.45	2.38	2.45	0.08	0.879	NS
Valerate	1.46	1.43	1.43	1.43	0.03	0.969	NS
A:P	3.31	3.31	3.31	3.28	0.03	0.987	NS

Res: resorcinol at different concentrations: 0 (Res0), 2 (Res2), 4 (Res4) and 6 mM (Res6); VFA: volatile fatty acids; TGP: total gas production; A:P: acetate:propionate ratio. Contrast: NS, not significant.

Supplementary Table S5. The dose-response effect of hydroquinone (0, 2, 4, 6 mM) on 24 h *in vitro* fermentation in rumen fluid from goats (Experiment 1.2).

	Hyd0	Hyd2	Hyd4	Hyd6	SEM	P-value	Contrasts
pH	6.46	6.45	6.50	6.47	0.01	0.653	NS
TGP (mL)	132	132	132	130	1.79	0.965	NS
CH ₄ (mL)	18.3	25.7	22.9	19.3	2.25	0.680	NS
H ₂ (mL)	0.27	0	0	0	0.11	0.712	NS
NH ₃ -N (mg/100 mL)	157	160	154	133	6.27	0.514	NS
Lactate (μg/mL)	10.4	8.87	10.8	11.6	1.32	0.940	NS
Total VFA (mM)	110	115	112	114	1.82	0.746	NS
VFA (mol/100 mol)							
Acetate	61.2	61.4	61.1	60.7	0.27	0.898	NS
Propionate	18.5	18.5	18.5	19.0	0.20	0.873	NS
Isobutyrate	1.21	1.28	1.23	1.20	0.04	0.944	NS
Butyrate	15.3	15.0	15.1	15.2	0.29	0.991	NS
Isovalerate	2.30	2.50	2.58	2.48	0.08	0.646	NS
Valerate	1.46	1.43	1.48	1.43	0.04	0.976	NS
A:P	3.31	3.32	3.30	3.21	0.04	0.749	NS

Hyd: Hydroquinone at different concentrations: 0 (Hyd0), 2 (Hyd2), 4 (Hyd4) and 6 mM (Hyd6); VFA: volatile fatty acids; TGP: total gas production; A:P: acetate:propionate ratio. Contrast: NS, not significant.

Supplementary Table S6. The dose-response effect of phloroglucinol (0, 2, 4, 6 mM) on 24 h *in vitro* fermentation in rumen fluid from goats (Experiment 1.2).

	Phl0	Phl2	Phl4	Phl6	SEM	P-value	Contrasts
pH	6.46 ^a	6.41 ^b	6.38 ^b	6.35 ^b	0.01	0.002	L ^{***}
TGP (mL)	132	133	132	133	1.78	0.998	NS
CH ₄ (mL)	18.3	19.6	16.1	9.78	1.92	0.361	NS
H ₂ (mL)	0.27	0	0	0.01	0.11	0.714	NS
NH ₃ -N (mg/100 mL)	157	157	164	151	8.17	0.977	NS
Lactate (μg/mL)	10.4	12.7	13.5	8.02	1.33	0.578	NS
Total VFA (mM)	110 ^b	114 ^{ab}	121 ^a	126 ^a	2.19	0.020	L ^{***}
VFA (mol/100 mol)							
Acetate	61.2 ^c	62.3 ^{bc}	63.3 ^{ab}	64.3 ^a	0.33	<0.001	L ^{***}
Propionate	18.5	17.8	17.3	17.0	0.26	0.084	NS
Isobutyrate	1.21	1.18	1.15	1.13	0.04	0.881	NS
Butyrate	15.3	15.0	14.7	14.2	0.28	0.608	NS
Isovalerate	2.30	2.45	2.25	2.15	0.07	0.671	NS
Valerate	1.46	1.33	1.30	1.28	0.04	0.208	NS
A:P	3.31 ^c	3.51 ^{bc}	3.67 ^{ab}	3.81 ^a	0.06	0.004	L ^{***} , Q [†]

Phl: Phloroglucinol at different concentrations: 0 (Phl0), 2 (Phl2), 4 (Phl4) and 6 mM (Phl6); VFA: volatile fatty acids; TGP: total gas production; A:P: acetate:propionate ratio. ^{a-c} Values within a row with different superscripts differ significantly at $P < 0.05$ (n=4). Contrast: NS, not significant; L, linear response; Q, quadratic response; ^{***} $P < 0.001$; [†] $P < 0.1$.

Supplementary Table S7. The dose-response effect of pyrogallol (0, 2, 4, 6 mM) on 24 h *in vitro* fermentation in rumen fluid from goats (Experiment 1.2).

	Pyr0	Pyr2	Pyr4	Pyr6	SEM	P-value	Contrasts
pH	6.46	6.45	6.49	6.46	0.01	0.695	NS
TGP (mL)	132	132	132	132	1.78	0.999	NS
CH ₄ (mL)	18.3	16.5	18.5	10.7	1.95	0.537	NS
H ₂ (mL)	0.27	0	0	0.01	0.11	0.716	NS
NH ₃ -N (mg/100 mL)	157	154	149	157	9.12	0.991	NS
Lactate (μg/mL)	10.4	12.9	15.4	12.0	1.66	0.773	NS
Total VFA (mM)	110	114	111	108	2.07	0.849	NS
VFA (mol/100 mol)							
Acetate	61.2	61.8	60.8	61.0	0.27	0.712	NS
Propionate	18.5	18.1	18.6	18.7	0.19	0.799	NS
Isobutyrate	1.21	1.13	1.20	1.10	0.04	0.693	NS
Butyrate	15.3	15.1	15.4	15.3	0.30	0.994	NS
Isovalerate	2.30	2.48	2.63	2.60	0.08	0.438	NS
Valerate	1.46	1.38	1.38	1.35	0.04	0.710	NS
A:P	3.31	3.42	3.27	3.27	0.03	0.511	NS

Pyr: Pyrogallol at different concentrations: 0 (Pyr0), 2 (Pyr2), 4 (Pyr4) and 6 mM (Pyr6); VFA: volatile fatty acids; TGP: total gas production; A:P: acetate:propionate ratio. Contrast: NS, not significant.

Supplementary Table S8. The dose-response effect of gallic acid (0, 2, 4, 6 mM) on 24 h *in vitro* fermentation in rumen fluid from goats (Experiment 1.2).

	GA0	GA2	GA4	GA6	SEM	P-value	Contrasts
pH	6.46	6.40	6.46	6.47	0.01	0.191	NS
TGP (mL)	132	136	132	132	1.68	0.812	NS
CH ₄ (mL)	18.3	19.8	16.4	21.6	1.76	0.843	NS
H ₂ (mL)	0.27	0.01	0	0	0.11	0.714	NS
NH ₃ -N (mg/100 mL)	157	133	145	139	6.40	0.545	NS
Lactate (μg/mL)	10.4	12.5	11.7	13.0	1.23	0.881	NS
Total VFA (mM)	110	115	111	111	1.60	0.727	NS
VFA (mol/100 mol)							
Acetate	61.2	60.6	60.9	60.8	0.26	0.825	NS
Propionate	18.5	18.9	18.7	18.7	0.21	0.946	NS
Isobutyrate	1.21	1.03	1.05	1.08	0.03	0.123	NS
Butyrate	15.3	15.7	15.5	15.5	0.32	0.965	NS
Isovalerate	2.30	2.50	2.53	2.53	0.09	0.702	NS
Valerate	1.46	1.30	1.38	1.40	0.05	0.670	NS
A:P	3.31	3.21	3.26	3.25	0.04	0.798	NS

GA: Gallic acid at different concentrations: 0 (GA0), 2 (GA2), 4 (GA4) and 6 mM (GA6); VFA: volatile fatty acids; TGP: total gas production; A:P: acetate:propionate ratio. Contrast: NS, not significant.

Supplementary Table S9. The dose-response effect of formic acid (0, 2, 4, 6 mM) on 24 h *in vitro* fermentation in rumen fluid from goats (Experiment 1.2).

	FA0	FA2	FA4	FA6	SEM	<i>P</i> -value	Contrasts
pH	6.46	6.46	6.45	6.44	0.01	0.873	NS
TGP (mL)	132	133	135	136	1.94	0.872	NS
CH ₄ (mL)	18.3	20.0	21.9	13.0	2.63	0.766	NS
H ₂ (mL)	0.27	0	0	0	0.11	0.713	NS
NH ₃ -N (mg/100 mL)	157	134	142	157	10.1	0.842	NS
Lactate (μg/mL)	10.4	12.0	12.2	11.2	1.28	0.960	NS
Total VFA (mM)	110	111	114	113	1.84	0.856	NS
VFA (mol/100 mol)							
Acetate	61.2	61.0	60.7	60.4	0.25	0.647	NS
Propionate	18.5	18.8	18.7	18.7	0.22	0.986	NS
Isobutyrate	1.21	1.10	1.10	1.13	0.03	0.509	NS
Butyrate	15.3	15.3	15.4	15.6	0.32	0.987	NS
Isovalerate	2.30	2.50	2.60	2.75	0.09	0.337	NS
Valerate	1.46	1.43	1.50	1.60	0.05	0.704	NS
A:P	3.31	3.26	3.25	3.25	0.04	0.902	NS

FA: Formic acid at different concentrations: 0 (FA0), 2 (FA2), 4 (FA4) and 6 mM (FA6); VFA: volatile fatty acids; TGP: total gas production; A:P: acetate:propionate ratio. Contrast: NS, not significant.



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**