



# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e Ambiente

Corso di laurea magistrale in Scienze e Tecnologie Animali

## **FONTI DI VARIAZIONE DELLE EMISSIONI DI METANO NELLE VACCHE DA LATTE ALLEVATE IN VENETO**

*Phenotypic variation of methane emissions in dairy cows in the Veneto  
region*

Relatore

Ch.mo Prof. Massimo De Marchi

Correlatori

Ch.mo Prof. Mauro Penasa

Dott.ssa Silvia Magro

Laureando

**Mattia Angelo Berno**

Matricola n. 2124976

ANNO ACCADEMICO 2024-2025



# Sommario

RIASSUNTO .....	1
ABSTRACT .....	3
1. INTRODUZIONE .....	5
1.1 Una panoramica del settore latte .....	5
1.2 Metano e ambiente .....	6
1.3 Un sottoprodotto per eccellenza: il metano .....	8
1.4 Produzione del metano enterico nei ruminanti .....	9
1.5 Fattori che influenzano la produzione di metano .....	13
1.5.1 Ingestione e caratteristiche dell'alimento .....	14
1.5.2 Giorni di lattazione, ordine di parto e produzione .....	16
1.5.3 Effetto razza .....	18
1.6 Misurazione del metano con metodi diretti .....	18
1.6.1 Camera di respirazione .....	19
1.6.2 Esafluoruro di zolfo tracciante (SF6) .....	21
1.6.3 Green Feed .....	22
1.6.4 Anidride carbonica tracciante .....	23
1.6.5 Rilevatore laser .....	24
1.7 Predizione del metano .....	25
2. OBIETTIVO .....	29
3. MATERIALI E METODI .....	31
3.1 Attività di campionamento .....	31
3.2 Analisi latte .....	31
3.3 Analisi acidi grassi .....	32
3.4 Analisi razione .....	33
3.5 Predizione metano .....	35
3.5 Analisi statistica .....	37
4. RISULTATI e DISCUSSIONE .....	39
4.1 Statistiche descrittive .....	39
4.2 Correlazioni .....	43
4.3 Analisi della varianza .....	45
4.4 Effetto razza .....	45
4.5 Effetto dello stadio di lattazione .....	48
4.6 Effetto ordine di parto .....	58
5. CONCLUSIONI .....	63
BIBLIOGRAFIA .....	65
RINGRAZIAMENTI .....	75



## RIASSUNTO

Il metano ( $\text{CH}_4$ ) è un gas naturale che viene prodotto dalla decomposizione della sostanza organica. È un gas serra fondamentale per mantenere un ambiente vivibile sulla superficie terrestre. Tuttavia, a causa dell'attività umana, viene prodotto in eccesso, contribuendo così al riscaldamento globale e al conseguente cambiamento climatico. Negli allevamenti, il  $\text{CH}_4$  viene prodotto a seguito delle fermentazioni ruminali ad opera dei microrganismi metanogeni, i quali degradano la sostanza organica ingerita dagli animali trasformandola in composti assorbibili dall'organismo. Questi microrganismi sono essenziali per la fisiologia dei ruminanti, ma diventano un problema dal punto di vista ambientale perché come composto finale del processo di digestione viene prodotto anche  $\text{CH}_4$ .

In questo lavoro di tesi si è perseguito l'obiettivo di analizzare i diversi fattori alla base delle variazioni nella produzione di  $\text{CH}_4$  nelle vacche da latte. Per ottenere una visione più ampia, sono state messe a confronto tre razze allevate in Veneto: Frisone Italiana, Pezzata Rossa Italiana e Rendena. Sono stati campionati rispettivamente 499, 204 e 206 animali, per un totale di 909 soggetti, allevati in 16 aziende della Regione Veneto. Le aziende in questione adottavano sistemi di gestione e di alimentazione della mandria diversi. Per tutti gli allevamenti visitati sono stati raccolti e analizzati campioni delle razioni. Le attività si sono svolte in concomitanza con i controlli funzionali dell'Associazione Regionale Allevatori del Veneto, che ha fornito un campione di latte per ciascun animale. Il campione è stato successivamente analizzato per determinarne la composizione e il profilo in acidi grassi. A partire da questi ultimi, tramite formule recuperate dalla letteratura, sono state stimate le produzioni di  $\text{CH}_4$  degli animali. Successivamente, sono state analizzate le principali fonti di variazione della produzione del  $\text{CH}_4$ , ovvero la razza, l'ordine di parto, lo stadio di lattazione e le interazioni razza x ordine di parto e razza x stadio di lattazione.

Lo stadio di lattazione rappresenta la principale fonte di variazione della produzione di  $\text{CH}_4$ , seguito dall'interazione razza x stadio di lattazione, dalla razza e dall'ordine di parto. L'interazione razza x ordine di parto non ha impattato significativamente la variabilità della produzione di  $\text{CH}_4$ . La curva di produzione del  $\text{CH}_4$ , durante la lattazione, ha evidenziato un andamento simile a quella della produzione di latte, ma con un picco posticipato. Dalle analisi è emerso che l'emissione di  $\text{CH}_4$  aumenta con l'ordine di parto e la differenza più marcata si osserva tra il primo e il secondo parto. I risultati hanno inoltre evidenziato che le vacche della razza più produttiva, ovvero la Frisone Italiana, hanno una produzione individuale giornaliera di  $\text{CH}_4$  maggiore rispetto a quella delle vacche delle altre razze, ma un'incidenza minore quando tale produzione viene rapportata al kg di latte prodotto e al kg di sostanza secca ingerita.



# ABSTRACT

Methane (CH<sub>4</sub>) is a natural gas produced by the decomposition of organic matter. It is a greenhouse gas essential for maintaining a livable environment on the Earth's surface. However, due to human activities, it is produced in excess, thereby contributing to global warming and climate change. In livestock farming, CH<sub>4</sub> is produced as a result of ruminal fermentation carried out by methanogenic microorganisms, which break down the organic matter ingested by animals and convert it into compounds that can be absorbed by the organism. These microorganisms are essential for the physiology of ruminants, but they become an environmental concern because CH<sub>4</sub> is also produced as an end product of the digestion process.

This thesis aimed to analyse the factors underlying the variations in CH<sub>4</sub> production in dairy cows. To gain a broader perspective, three breeds reared in the Veneto region were compared: Italian Holstein, Simmental and Rendena. A total of 909 animals (499, 204, and 206 individuals from each breed, respectively) were sampled across 16 farms. These farms employed different herd management and feeding systems. For all the visited farms, feed ration samples were collected and analysed. The sampling was carried out in conjunction with the routine performance testing conducted by the Regional Breeders Association of Veneto (ARAV), which provided a milk sample for each animal. The samples were subsequently analysed to determine their composition and fatty acid profile. Based on this information, the CH<sub>4</sub> production was estimated using formulas sourced from scientific literature. Finally, the main sources of variation of CH<sub>4</sub> production were analysed: breed, parity, stage of lactation, and the interactions breed x parity and breed x stage of lactation.

The stage of lactation emerged as the main source of variation of CH<sub>4</sub> production, followed by the breed x stage of lactation interaction, breed, and parity. The breed x parity interaction did not significantly affect the variability of CH<sub>4</sub> production. The CH<sub>4</sub> production curve during lactation showed a trend similar to that of milk production, but with a delayed peak. The analyses revealed that CH<sub>4</sub> emissions increase with parity, with the most marked difference observed between the first and second calving. The results also highlighted that cows of the highest-producing breed, the Italian Holstein, have a higher individual daily CH<sub>4</sub> production compared to cows of the other breeds. However, their CH<sub>4</sub> emissions are lower when expressed per kg of milk produced and kg of dry matter intake.



# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 Una panoramica del settore latte

Il settore lattiero-caseario ricopre un ruolo di fondamentale importanza a livello mondiale, sia dal punto di vista economico che da quello della produzione agroalimentare. Nel mondo sono allevati circa 265 milioni di vacche da latte di varie razze, con una produzione che nel 2024 si è attestata attorno alle 981 milioni di tonnellate di latte, l'1.5% in più rispetto all'anno precedente. In questo quadro, l'Asia è il continente con la maggiore produzione, arrivando a produrre il 47% del latte mondiale (FAO, 2024). Anche in Europa la produzione è in aumento, con un incremento dello 0,6% nel 2024 rispetto al 2023, attestandosi a circa 235 milioni di tonnellate. Nel Vecchio Continente la crescita è dovuta principalmente a Russia, Bielorussia e Unione Europea. Questo è un settore in continua e costante crescita, volta a migliorare ed efficientare l'intero processo produttivo. Infatti, solo 70 anni fa, negli Stati Uniti era richiesto il 23% in più di alimento e il 21% in più di animali per produrre 1 milione di tonnellate di latte in confronto alle attuali capacità produttive (Medeiros et al., 2022). Questo risultato si è ottenuto negli anni grazie ad un'attenta e progressiva crescita dell'efficienza dei metodi di produzione. Si sono ottenuti animali più efficienti con una maggiore produzione individuale; quindi, un sistema stalla più robusto e competitivo di fronte ai continui cambiamenti di mercato. Inoltre, la tendenza è quella di abbandonare le aziende con pochi capi a favore di stalle più grandi, le quali aiutano a ridurre i costi fissi, la difformità di produzione e quindi portano a maggiori introiti (Maltz, 2020).

A livello nazionale, il settore lattiero-caseario è una voce che ricopre un ruolo strategico nell'economia del Paese. Infatti, la produzione di latte bovino genera 6,5 miliardi di euro che rappresentano il 10% della PLV dell'agricoltura nel suo complesso. Nel 2023 il settore in termini economici è cresciuto del 4% rispetto al 2022, grazie anche agli aumenti dei prezzi (ISMEA, 2024). L'industria del latte, inoltre, rappresenta circa un terzo del valore economico del settore zootecnico italiano (ISMEA, 2022). La trasformazione si concentra su prodotti caseari, in particolare formaggi e derivati, di alta qualità e prezzo, spesso valorizzati da certificazioni di origine (DOP) (Bittante et al., 2022; European Union, 2012). La valorizzazione di questi prodotti è un importante motore per il settore agroalimentare italiano, il quale produce ben 56 Indicazioni geografiche (DOP) (derivante da latte vaccino, ovi-caprino, bufalino e misti) che riescono a generare 5,6 miliardi di euro alla produzione (ISMEA, 2024). I prodotti derivanti da questa industria non sono destinati solo all'autoconsumo, ma anche ad un'intensa esportazione che porta l'Italia ad essere il terzo esportatore mondiale di formaggi e latticini. Dopo alcuni anni di leggero aumento, nel 2023 il grado di

autoapprovvigionamento si è attestato all'80%. Ciò significa che circa il 20% del latte che circola nel nostro Paese è importato, principalmente sotto forma di latte sfuso in cisterna. Questo influisce sulle dinamiche del prezzo alla stalla, rendendo il mercato più sensibile alle variazioni estere e meno alla competitività del settore interno (ISMEA, 2024).

Come nel resto del mondo, anche in Italia si osserva una tendenza alla diminuzione delle aziende e alla concentrazione dei capi in allevamenti di maggiori dimensioni. Negli ultimi 30 anni, le aziende sono diminuite da più di 200.000 unità a circa 25.000, con una conseguente diminuzione anche del numero di capi (40%) arrivando ad allevare all'incirca 1.6 milioni di vacche, le quali sono concentrate per tre quarti del totale nel Nord Italia (ISTAT, 2022). Allo stesso tempo, negli anni sono migliorate le tecniche di allevamento, la genetica degli animali è cambiata, portando ad un aumento della produzione individuale, e la razza Frisona è stata introdotta in misura maggiore a discapito delle razze locali meno produttive. Tutto ciò ha contribuito a mantenere pressoché costante la produzione di latte bovino (Berton et al., 2024).

Negli ultimi 30 anni questo settore ha subito notevoli ed importanti cambiamenti, dovuti al concatenarsi di diversi fattori, come il cambiamento della politica agricola europea, l'abolizione delle quote latte, lo spostamento verso sistemi più sostenibili in linea con le strategie del *Farm to Fork*, la crescente richiesta dei consumatori di prodotti di qualità più elevata e rispettosi degli standard di benessere animale e, una serie di miglioramenti genetici e non nell'allevamento (Berton et al., 2024). Il benessere animale è un tema caldo al centro del dibattito sociale che porta a importanti riflessioni e modifiche del settore. Il reparto vacca da latte, all'interno del più ampio ramo dell'allevamento, probabilmente è quello meno soggetto alle critiche dei consumatori per motivi di natura stessa del tipo di allevamento e per i cambiamenti ad esso apportati negli anni. Ad ogni modo, resta all'ordine del giorno la continua ricerca e creazione di un sistema volto a mettere in primo piano la salute e il benessere dell'animale, sia per motivi etici sia per migliorare l'efficienza del settore. Oltre a tutto questo, c'è da tenere in considerazione l'impatto ambientale che tutto il processo produttivo crea. Tutti questi ostacoli sono una sfida che mette sempre più a dura prova gli allevatori e gli addetti ai lavori, ma sono anche un forte motore per lo sviluppo di nuove tecnologie e processi all'avanguardia.

## **1.2 Metano e ambiente**

L'effetto serra è un fenomeno termodinamico che consente di creare un ambiente vivibile per moltissime forme di vita sulla Terra. Il tutto si basa sulla presenza in atmosfera di vari gas, tra cui vapore acqueo, anidride carbonica (CO<sub>2</sub>), metano (CH<sub>4</sub>) e ossidi di azoto, che fungono da veri e propri isolanti trattenendo il calore (Kweku et al., 2018). Questi gas formano una barriera semipermeabile

in atmosfera perché lasciano passare i raggi ultravioletti molto energetici, i quali riscaldano la vegetazione e il terreno e ritornano indietro sotto forma di radiazioni infrarosse. Queste hanno una lunghezza d'onda maggiore e perciò sono più deboli, motivo per cui vengono bloccate e respinte proprio come in una serra. L'effetto serra è il principale fattore che mantiene il pianeta ad una temperatura costante e adeguata alle forme di vita, evitando che il calore si disperda verso lo spazio. La differenza tra la temperatura media attuale di 14°C e quella che si avrebbe solo con le radiazioni solari, (-19°C), è pari a 33°C, ossia l'aumento di temperatura che si ha con l'effetto serra (Le Treut et al., 2007). Verso la fine del 1800 però, con la rivoluzione industriale, i gas serra emessi in atmosfera hanno cominciato ad aumentare a causa dell'attività umana. Questo ha portato ad una temperatura media che, attualmente, è di circa 1,1°C più elevata rispetto alla temperatura media preindustriale (IPCC, 2018). Anche con piccoli scostamenti della temperatura media i risultati possono essere catastrofici. Il surriscaldamento globale porta a una redistribuzione dei deserti e delle zone umide, lo scioglimento dei ghiacciai con successivo innalzamento di mari e oceani con perdita di zone costiere o intere città. Inoltre, cambiano anche gli andamenti climatici che mostrano un trend meno costante con eventi estremi sempre più frequenti e uno sviluppo delle malattie dei vegetali, e non solo, sempre meno controllabile.

Il CH<sub>4</sub> in atmosfera rimane per poco più di un decennio, tempo molto inferiore rispetto ai 100-200 anni della CO<sub>2</sub>. Allo stesso tempo però, assorbe molta più energia della CO<sub>2</sub>. Il risultato netto considerando il breve tempo di permanenza e il maggiore assorbimento di energia fornisce il GWP (EPA, n.d.). Il settore primario a livello globale è responsabile del 22% delle emissioni totali di gas serra in termini di potere riscaldante a 100 anni (Global Warming Potential, GWP); il 23% di queste emissioni è formato dal CH<sub>4</sub> (IPCC, 2022). Perciò, solo il 5,1% delle emissioni globali sono dovute alle emissioni di CH<sub>4</sub> del settore primario. Il metano è stimato avere un GWP tra 27 e 30 anni.

In Italia la situazione è migliore con il settore che produce circa il 7% medio nel periodo 1990-2022 (ISPRA, 2022) delle emissioni. La tendenza dell'andamento delle emissioni è in leggero ma costante declino dagli anni '90 in poi. Questo è dovuto alla progressiva riduzione del numero di capi, un miglioramento nell'efficienza di produzione di questi e ad un utilizzo minore e più efficace di fertilizzanti sintetici nei suoli (ISPRA, 2022).

Oltre al problema ambientale che l'emissione di CH<sub>4</sub> causa, esiste anche un'altra conseguenza che ha effetti diretti sul ruminante. Infatti, con la produzione di CH<sub>4</sub> si accumula energia che poi non viene riutilizzata per le funzioni vitali ma viene persa con l'eruttazione. Questa perdita è stata calcolata essere intorno al 2-12% rispetto al totale energia ingerito (Johnson & Johnson, 1995). Tutto questo implica una serie di effetti che possono creare problemi in più ambiti dell'allevamento.

Si può notare che la produzione di questo gas non è la prima causa di inquinamento e che comunque la sua permanenza in atmosfera è breve. Questo non significa però che non si debbano ricercare i fattori primari coinvolti nella produzione di questo gas e cercare di limitarli. Creare dei sistemi più efficienti con meno emissioni è un obiettivo all'ordine del giorno, sia per un tornaconto dell'allevatore, sia per mitigare il cambiamento climatico e salvaguardare il futuro delle prossime generazioni.

### **1.3 Un sottoprodotto per eccellenza: il metano**

Il CH<sub>4</sub> è un composto chimico appartenente al gruppo degli idrocarburi alifatici saturi. A temperatura ambiente si presenta sotto forma di gas, è incolore, inodore e non provoca tossicità negli organismi viventi ed è quasi insolubile in acqua (Enciclopedia treccani, n.d.).

Il CH<sub>4</sub> si genera come prodotto finale del processo di decomposizione della sostanza organica in un ambiente anossico, cioè privo di ossigeno. Facendo cento il totale delle emissioni di CH<sub>4</sub>, 40 di queste sono dovute a cause naturali, la restante parte è rilasciata da processi riconducibili all'attività umana (Karakurt et al., 2012). È molto difficile definire precisamente le varie fonti e come queste incidono sul totale delle emissioni: come si evince dalla Figura 1, il CH<sub>4</sub> può essere prodotto da una molteplicità di fonti diverse.

Le zone umide, comprese le paludi, zone lacustri e risaie, sono la maggior fonte di emissione naturale, arrivando a produrre tra il 15% e il 45% di tutto il CH<sub>4</sub> generato nel mondo (Segers, 1998). Altre importanti fonti sono i rilasci da parte degli oceani, con le eruzioni vulcaniche e i depositi di metano sotto forma di idrato che si libera con lo scioglimento dei ghiacciai e permafrost (Saunio et al., 2024). La produzione e combustione di gas naturale e carbone, inclusa l'industria energetica, rappresenta una quota antropogenica decisamente ampia. Il settore agricolo è responsabile della produzione di circa il 29% di CH<sub>4</sub> di origine antropica (Knapp et al., 2014).

La produzione di tale gas derivante dal settore primario ha origine principalmente da fermentazioni enteriche degli animali, generalmente ruminanti, e dallo stoccaggio degli stessi effluenti per lungo periodo (IPCC, 2023). L'allevamento del bestiame e tutte le attività ad esso annesse incidono per il 14,5% sul totale delle emissioni mondiali (Gerber et al., 2013), e di questa quota il 90% deriva da ruminanti (Scholtz et al., 2020). Più nello specifico, il settore lattiero caseario rappresenta il 20% della produzione di gas serra del comparto allevamento, di cui il 46,5% proviene dalla fermentazione enterica degli animali (Gerber et al., 2013). Tutto ciò è molto importante per capire come l'allevamento sia al centro del dibattito mondiale e come rappresenti una sfida per il suo proseguo nel prossimo futuro.

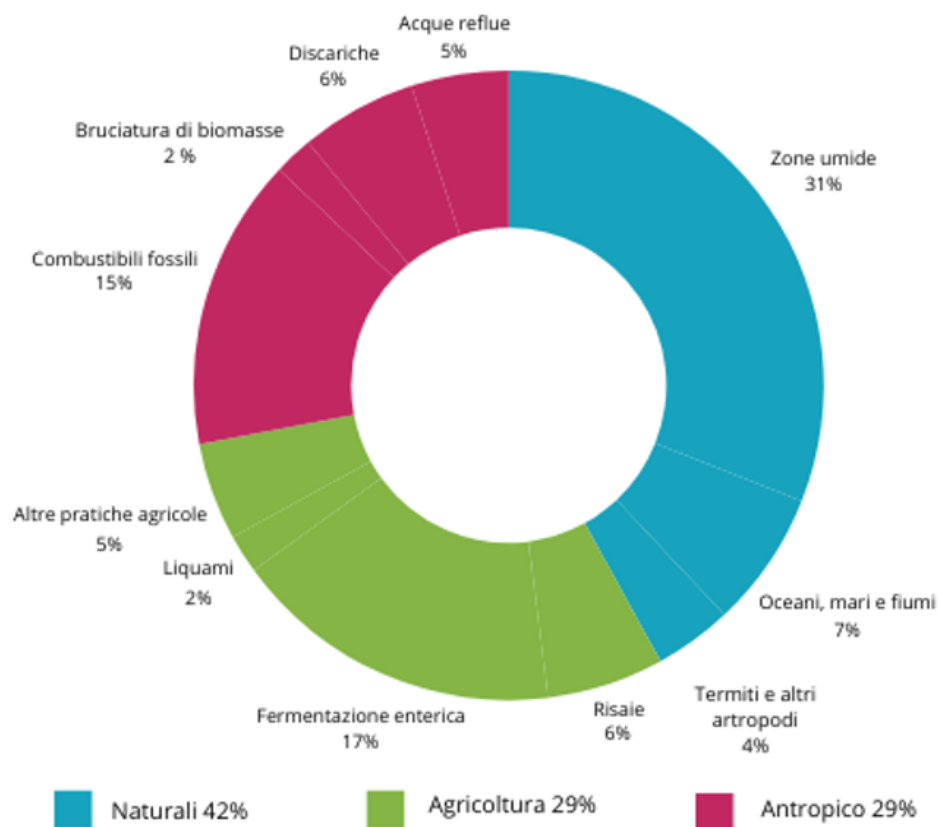
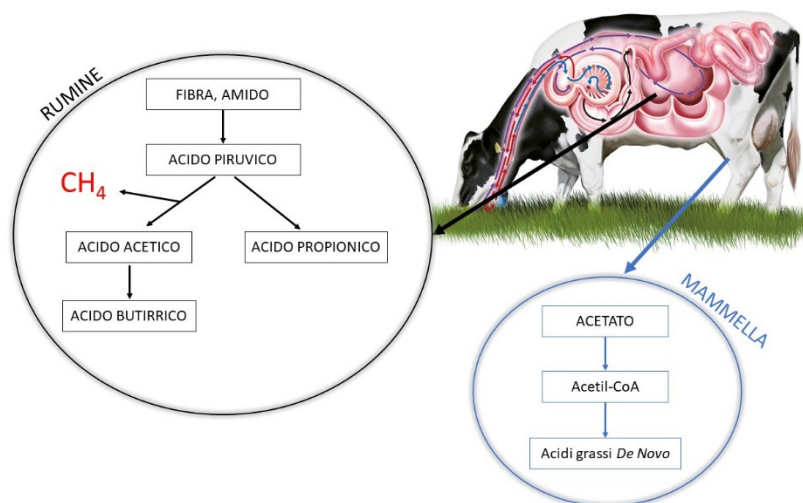


Figura 1. Emissioni di metano da fonti naturali o antropiche (Knapp et al., 2014).

## 1.4 Produzione del metano enterico nei ruminanti

Come già descritto in precedenza, le fermentazioni enteriche dei ruminanti giocano un ruolo chiave nel sistema di produzione del CH<sub>4</sub>. Questo gas enterico prodotto dai ruminanti deriva dal processo di digestione della materia organica ingerita. Nello specifico, il 90% deriva dalle fermentazioni che avvengono all'interno del rumine, mentre la restante parte viene prodotta dalla flora microbica presente nell'intestino crasso (Ellis et al., 2008; Negussie et al., 2017).

Il rumine è uno pre-stomaco che ha un ruolo di vitale importanza per la nutrizione dell'animale. All'interno di questa sacca è presente un ambiente anaerobico a temperatura costante che favorisce l'attività dei microrganismi essenziali per la corretta digestione delle sostanze (Baldwin & Connor, 2017; Nagaraja, 2016).

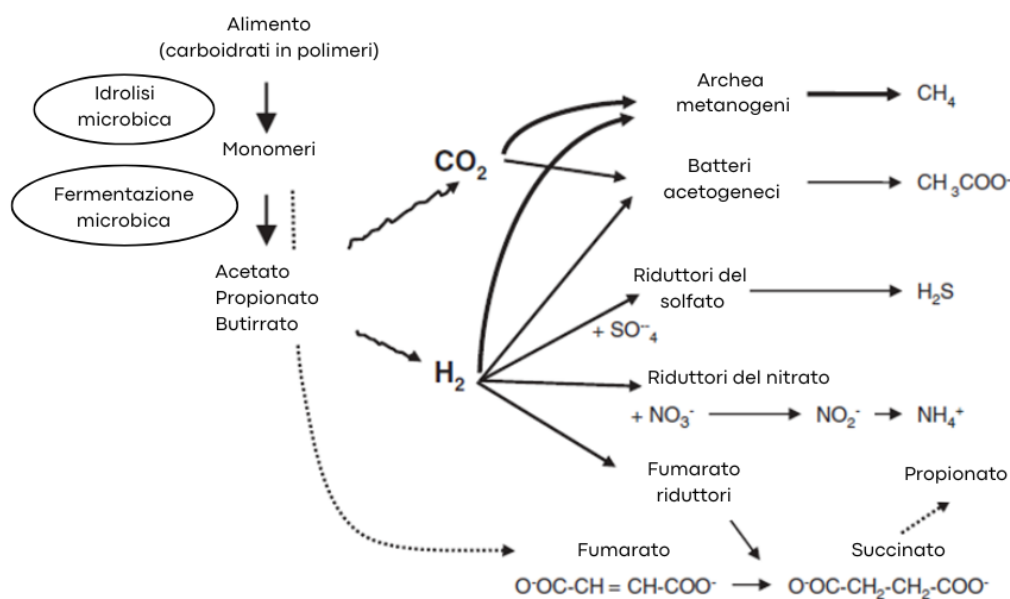


**Figura 2.** Metanogenesi nei ruminanti.

Come illustrato in Figura 2, nel rumine avviene la degradazione dei carboidrati strutturali e non, polimeri complessi come la cellulosa, l'emicellulosa o l'amido che vengono convertiti in monomeri. Successivamente, queste molecole vengono ulteriormente degradate in acidi grassi volatili (acido propionico, acetico e butirrico),  $\text{CO}_2$ , diidrogeno ( $\text{H}_2$ ) e  $\text{CH}_4$  (Beauchemin et al., 2020; FAO, 2023; Moss et al., 2000). L'alimento parzialmente digerito attraversa gli stomaci e trova l'intestino, dove primariamente subisce un ulteriore attacco enzimatico nella prima parte dell'apparato per poi subire l'attacco definitivo ad opera dei microbi intestinali, prima di essere espulso con le feci (Moss et al., 2000). Le varie molecole prodotte vengono assorbite lungo tutto il sistema digerente e utilizzate in modo differente in base alla natura della sostanza o all'organo di destinazione. Gli acidi grassi assorbiti attraverso l'epitelio ruminale (Baldwin & Connor, 2017) in particolare l'acetato, fungono da precursori per la formazione di acidi grassi di *de novo* sintesi, sia a corta che media catena (Figura 2). Questo è il motivo per cui la fermentazione ruminale, la produzione di  $\text{CH}_4$  e la composizione degli acidi grassi nel latte sono in relazione tra di loro (Knapp et al., 2014).

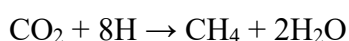
Il rumine contiene una vasta serie di microrganismi, tra cui protozoi ciliati, funghi e batteri anaerobici e archeobatteri (Newbold et al., 2015a). L'interazione che si crea tra queste diverse forme di vita è la chiave per un corretto metabolismo ruminale. Il perno centrale attorno a cui tutte le fermentazioni che avvengono nell'animale girano è il trasferimento di  $\text{H}_2$  tra i vari cofattori ma soprattutto tra le diverse specie di microrganismi. Nelle reazioni di ossidazione dei polimeri intervengono diversi cofattori, il più importante tra tutti è la nicotinammide adenina dinucleotide ( $\text{NAD}^+$ ). La sua presenza in forma ossidata è fondamentale perché funge da accettore di elettroni mantenendo costante la carica del mezzo. I cofattori ridotti risultanti dalle diverse reazioni di catalisi delle molecole devono essere re-ossidati per poter far proseguire il metabolismo, al contrario, a cascata si bloccherebbe tutto il sistema (Wolin et al., 1997). Gli elettroni vengono trasferiti ad accettori diversi dall'ossigeno tra cui la  $\text{CO}_2$ ,

il solfato, il nitrato e il fumarato. Il trasporto di elettroni attraverso i corpi microbici genera ATP, quindi energia, grazie all'attività dell'enzima ATP-sintasi (Bertram et al., 2006).



**Figura 3.** Fermentazione microbica dei polisaccaridi e metabolismo dell' $H_2$  nel rumine (Morgavi et al., 2010).

L'idrogeno metabolico viene convertito in  $H_2$  da particolari specie batteriche che esprimono l'idrogenasi (Knapp et al., 2014). L' $H_2$  è uno dei maggiori prodotti finali della reazione di fermentazioni a carico di protozoi, funghi e alcuni batteri (Bunglavan, 2014; Ungerfeld, 2018). Questo non viene accumulato nel rumine ma viene immediatamente utilizzato da altre forme di microrganismi (Moss et al., 2000) per sintetizzare diversi composti (Figura 3). Gli organismi metanogeni utilizzano l' $H_2$  per ridurre la  $CO_2$  in  $CH_4$  secondo la seguente reazione di metanogenesi:



Il  $CH_4$  è la maggior fonte di accumulo di elettroni provenienti dalle varie reazioni. Questo risulta essere molto importante perché un accumulo di  $H_2$  porterebbe ad un aumento della sua pressione parziale che potrebbe inibire le normali funzionalità degli enzimi microbici che partecipano alla catena di trasporto degli elettroni, bloccando così tutto il metabolismo (Morgavi et al., 2010). La ricezione e successivo utilizzo dell' $H_2$  di una specie microbica da un'altra è conosciuto come trasferimento interspecie di  $H_2$  (Wolin et al., 1997), funzionalità che può esistere grazie alla relazione molto stretta tra le due comunità (Tapio et al., 2017). Infatti, nel rumine l' $H_2$  non viene prodotto solo dalle reazioni chimiche che avvengono ma anche dal lavoro della flora presente. Un'importante frazione di biomassa microbica è ricoperta dai protozoi, organismi unicellulari complessi. Anche se la loro presenza è tangibile, il loro ruolo nelle fermentazioni ruminali e/o nella nutrizione dell'animale non è del tutto chiaro e ancora compreso (Williams & Coleman, 1992). D'altro canto, questi

organismi sono strettamente legati alla metanogenesi data la loro abbondante produzione di H<sub>2</sub> (Newbold et al., 1995), fin tanto da spiegare il 47% della variabilità di produzione del CH<sub>4</sub> su esperimenti svolti in vitro (Morgavi et al., 2010). I protozoi non sono però l'unico produttore di H<sub>2</sub> perché anche alcune specie batteriche e i funghi anaerobici possono formare quantità considerevoli di prodotto, sempre in misura minore rispetto a quanto viene fatto dalla prima specie.

Gli archeobatteri, gli organismi metanogeni veri e propri, recuperano gran parte dell'H<sub>2</sub> prodotto e lo trasformano in CH<sub>4</sub>. Questi microrganismi sono in stretto contatto con i protozoi, tanto da scambiare una relazione di commensalità intra-citoplasmica, oppure aderiscono alla membrana esterna ricavandone un importante beneficio (McAllister et al., 2015; Newbold et al., 2015b). Il rapporto esistente tra le due specie porta vantaggio ad entrambe le parti; gli archeobatteri traggono vantaggio dalla produzione di H<sub>2</sub>, lo sottraggono alla soluzione e quindi creano un ambiente più fruibile per la vita dei protozoi.

Ci sono diversi substrati che possono essere usati dagli organismi metanogeni per la produzione del gas: anidride carbonica, molecole contenenti gruppi metilici o acetato (Liu & Whitman, 2008). Anche il metanoato, la base coniugata dell'acido formico, può essere usato come donatore di elettroni (Beauchemin et al., 2020) arrivando ad essere il punto di partenza di quasi il 18% del CH<sub>4</sub> prodotto (Hungate et al., 1970). I composti contenenti gruppi metilici, metilammine o l'acetato derivano dalla catalisi di alimenti contenenti particolari nutrienti, come le pectine. Questi sono spesso donatori di elettroni, ma sono poche le famiglie di microrganismi che sono in grado di sfruttarli in modo adeguato e per questo la produzione è relativamente modesta. La via metabolica per eccellenza resta quella che utilizza la CO<sub>2</sub> come molecola riducente. Una volta prodotto, il CH<sub>4</sub> non viene accumulato nell'animale, dal momento che potrebbe inibire le fermentazioni, ma viene espulso all'esterno. Considerando che la maggior parte del gas viene prodotta all'interno del ruminante (90%), questa viene espulsa tramite eruttazione, processo fisiologico nell'ordine dei ruminanti, e non come flatulenza.

La produzione di CH<sub>4</sub> enterico è un processo del tutto fisiologico che nasce dal concatenarsi di più aspetti come il tipo di alimento che l'animale ingerisce, il suo metabolismo e la presenza di una microflora molto attiva adatta a degradare polimeri complessi che altri animali non riuscirebbero a utilizzare. Il CH<sub>4</sub> come prodotto finale di tutta la serie di reazioni e fermentazioni che avvengono è fondamentale per l'attività ruminale, ma ha effetti molto rilevanti sull'ambiente e sul bilancio energetico dell'animale. Per questo motivo, negli anni sono stati condotti molti studi e prove per comprendere l'opportunità di avere dei risultati positivi sulla riduzione di produzione di questo gas (Beauchemin et al., 2020; Bunglavan, 2014; Knapp et al., 2014; Morgavi et al., 2023; Ungerfeld, 2018; Ungerfeld & Pitta, 2024). Diverse soluzioni sono state studiate e testate per raggiungere questo

scopo: aumentare la digeribilità della razione, variare la quota di fibra o amido nell'alimento, defaunazione a carico specialmente dei protozoi, aggiunta di aditivi che fungono da accettori di elettroni o riduzione della metanogenesi. I risultati ottenuti variano a seconda della metodologia. Infatti, esiste una grande variabilità tra le diverse tecnologie ma nel complesso si possono ottenere riduzioni abbastanza importanti (tra il 10% e 40%) (Beauchemin et al., 2020).

Quantificare esattamente i benefici o meno della riduzione del CH<sub>4</sub> non è semplice perché comprendere appieno il funzionamento del complesso metabolismo che avviene nell'animale è cosa assai ardua. Specialmente dal punto di vista energetico, sono state fatte molte supposizioni senza solide basi. In uno studio recente è stato studiato l'incremento di produzione dato dalla maggiore energia che si può ottenere a seguito di una riduzione della produzione di gas (Morgavi et al. 2023). Quanto trovato rispetta quanto detto finora. Anche a seguito di un abbassamento consistente nella produzione del gas, l'incremento di energia non si converte in un diretto aumento di produzione perché nel metabolismo intervengono altri fattori che riequilibrano il tutto. Anche l'eccesso di H<sub>2</sub> liberi che si genera nel rumine e le conseguenze sulla flora microbica non è ancora del tutto nota. In conclusione, non è possibile affermare che una riduzione del CH<sub>4</sub> possa aumentare l'efficienza con cui l'alimento ingerito è utilizzato. Certo però è l'effetto benefico che questo può portare sull'ambiente.

## 1.5 Fattori che influenzano la produzione di metano

La produzione di CH<sub>4</sub> da parte dell'animale è un processo particolare. Attraverso diverse reazioni, il gas viene sintetizzato e successivamente rilasciato all'esterno dell'animale. Comprendere questa produzione risulta complesso, motivo per cui sono stati sviluppati diversi fenotipi con cui è possibile esprimere la quantità di CH<sub>4</sub> prodotta in base all'unità più adeguata (de Haas et al., 2017; Herd et al., 2013). Il primo fenotipo utilizzabile è *CH<sub>4</sub> production* calcolato come litri o grammi per giorno per vacca. Un altro fenotipo è il *CH<sub>4</sub> intensity*, ossia g per kg di output, in questo caso di latte prodotto. L'ultimo fenotipo che possiamo utilizzare per la quantificazione del CH<sub>4</sub> prodotto è il *CH<sub>4</sub> yield* espresso come g su kg di sostanza secca ingerita.

Secondo recenti e importanti studi in materia (Bittante et al., 2018; Bougouin et al., 2019; Martínez-Marín et al., 2023; van Gastelen et al., 2015), la produzione di CH<sub>4</sub> nella vacca da latte varia con un range medio di 14-17, 20-25 e 350-400 g rispettivamente per *CH<sub>4</sub> yield*, *CH<sub>4</sub> intensity* e *CH<sub>4</sub> production*. Tuttavia, questi valori possono variare sotto l'influenza di diversi fattori ambientali o genetici. Questi sono da molto tempo sotto la lente d'ingrandimento dei ricercatori, sia per capire in

che modo la produzione del gas varia, sia per trovare dei sistemi più efficienti con un minore livello di emissioni.

### 1.5.1 Ingestione e caratteristiche dell'alimento

La dieta dell'animale è uno dei più importanti fattori che influisce sulla metanogenesi. Essa, infatti, con le diverse sostanze apportate, agisce direttamente a livello del metabolismo e sul lavoro dei microbi ruminali. L'ingestione di materia organica e la sua conseguente fermentazione comporta un incremento nella produzione di CH<sub>4</sub> entro 15 minuti dall'ingestione di alimento, per poi continuare per diverse ore (de Haas et al., 2017). Il picco di produzione di CH<sub>4</sub> si verifica poco dopo l'assunzione del pasto, poiché durante la ruminazione e il riposo la produzione è modesta. Maggiore è la quantità di alimento scaricato nel rumine, maggiore è la generazione di CH<sub>4</sub>, dovuta all'aumento della quantità di alimento da fermentare. Allo stesso tempo, però, si riduce l'incidenza del CH<sub>4</sub> prodotto per kg di sostanza secca (Jentsch et al., 2007). Di conseguenza, *CH<sub>4</sub> yield* e ingestione di sostanza secca mostrano un andamento di tipo inversamente proporzionale.

La composizione e la qualità dell'alimento che arriva al rumine è il primo fattore coinvolto nella produzione di CH<sub>4</sub>. La digestione e la relativa quantità e qualità delle fermentazioni che avvengono sono vincolati all'attività della grande mole di microrganismi che è presente nel rumine e non solo, e questi necessitano di energia, azoto e minerali nelle giuste proporzioni per lavorare correttamente (Moss, 1994).

Il rapporto tra gli acidi grassi volatili prodotti e la quantità di prodotti finali generati con le fermentazioni è influenzato dalla composizione della sostanza secca, più in particolare dal rapporto tra i carboidrati strutturali o NDF e quelli non strutturali o carboidrati (Bannink et al., 2006; Sutton et al., 2003). La formazione di acido acetico e butirrico deriva principalmente dalla degradazione dei carboidrati strutturali. La fermentazione dei carboidrati strutturali, oltre alla sintesi dell'acido grasso, porta con sé anche la formazione di CO<sub>2</sub> e una grande quantità di H<sup>+</sup>. La degradazione dei carboidrati non strutturali, invece, porta alla formazione di acido propionico e acqua (Moss et al., 2000). Questa via metabolica si distingue dall'altra per la formazione di H<sub>2</sub>: nella produzione di acido propionico, oltre a non generare H<sub>2</sub> liberi, si osserva anche il suo utilizzo, riducendone la quantità presente nel sistema (Jentsch et al., 2007; Knapp et al., 2014). Inoltre, la produzione dell'acido propionico abbassa il pH ruminale, inibendo parzialmente la crescita e lo sviluppo dei microrganismi metanogeni e dei protozoi. Di conseguenza, si osserva una minore produzione di metano, ma anche una ridotta digeribilità della fibra, a causa della creazione di un ambiente sfavorevole ai microbi. L'utilizzo di razioni a base di foraggi con alto contenuto di lignina, cellulosa ed emicellulosa porta ad una maggiore

produzione di acido acetico e butirrico con conseguente emissione di CH<sub>4</sub>. Investire su un utilizzo di foraggi di maggiore qualità è fondamentale per aumentare l'efficienza di tutti i processi (Waghorn & Clark, 2006). La qualità della fibra può essere aumentata migliorando la tecnica di coltivazione delle colture. Per esempio, anticipare l'epoca di raccolta aiuta ad avere un minore contenuto di NDF nel prodotto. Anche una corretta conservazione del prodotto raccolto è essenziale per mantenere il più possibile inalterate le sostanze nutritive. Infine, la scelta di varietà o specie selezionate per racchiudere una fibra molto più tenera e digeribile è la chiave per creare una razione equilibrata e funzionale alle esigenze dell'animale. Razioni con alto contenuto di amido a discapito della fibra comportano perciò una minore produzione di CH<sub>4</sub> (Mc Geough et al., 2010). Tuttavia, i foraggi restano la base dell'alimentazione delle vacche da latte. Variare troppo il rapporto esistente tra i carboidrati strutturali e non può comportare alterazioni indesiderate nella composizione e qualità del latte (van Gastelen et al., 2015).

Oltre alla fibra e all'amido, altri componenti possono influenzare la metanogenesi. Le proteine all'interno del rumine fermentano alimentando i microrganismi presenti e quindi innalzano il CH<sub>4</sub> enterico prodotto (Jentsch et al., 2007; Vanegas et al., 2017). Al contrario, la presenza di grassi nella razione è in contrasto con la produzione di CH<sub>4</sub>. Da analisi svolte in vitro, un'aggiunta di grassi inibisce parzialmente il metabolismo dei protozoi e dei batteri metanogeni comportando così una minore produzione (Knapp et al., 2014). Inoltre, gli acidi grassi polinsaturi (PUFA) nel rumine fungono da accettori alternativi di H<sub>2</sub> sottraendolo così al metabolismo del CH<sub>4</sub>, anche se la loro azione è di modesta entità (Hegarty, 1999; K. A. Johnson & Johnson, 1995).

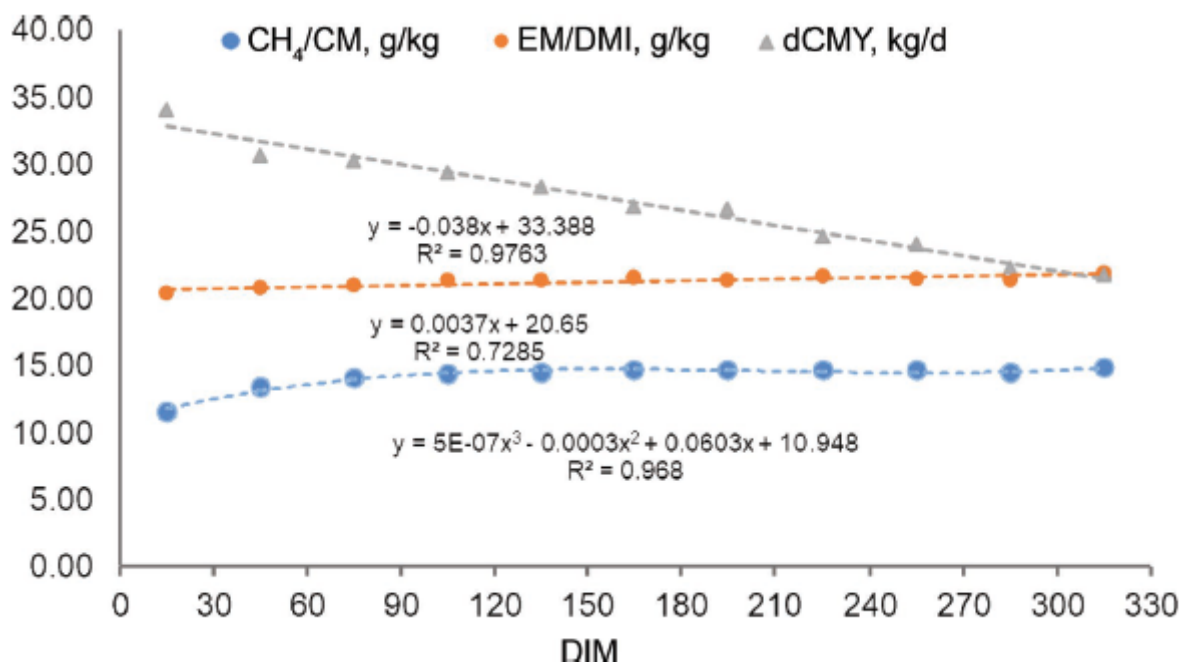
Anche la tecnica di lavorazione e la distribuzione dell'alimento possono influenzare la quota di CH<sub>4</sub> prodotto (Knapp et al., 2014). Somministrare alimenti macinati, sfilacciati, pelettati o estrusi può diminuire la quota di NDF digeribile nel rumine e diminuire il CH<sub>4</sub> prodotto a causa dell'aumento della velocità di transito (Moss et al., 2000). Se questi prodotti lavorati sono incrementati nella dieta in grandi quantità possono diminuire l'emissione in un range compreso tra il 20% e il 40% per unità di sostanza secca (Johnson & Johnson, 1995). In questo caso si avranno degli importanti benefici dal punto di vista di emissione di CH<sub>4</sub>, ma si perderà una quota di sostanze nutritive che, se non assorbite nell'intestino, andranno eliminate con le feci e sprecate. Non solo gli alimenti quindi, ma anche il tempo che questi trascorrono nel rumine, sono fattori che influenzano la metanogenesi. Maggiore è la quantità di alimento ingerita e maggiore è la sua permanenza nel rumine, più alta è la sintesi di CH<sub>4</sub> da parte dei microrganismi. Infatti, avere vacche con minore ingestione comporterebbe una minore produzione di CH<sub>4</sub> per vacca ma anche una minore produzione di latte (Negussie et al., 2017). Allevare animali con elevata ingestione e alimentarli con razioni energetiche che fanno lavorare bene

il rumine aumenta l'efficienza di produzione del latte con conseguente abbassamento del *CH<sub>4</sub> intensity*. Questo è fondamentale per cercare di ridurre quello che è l'impatto ambientale che l'allevamento di questi animali comporta.

### **1.5.2 Giorni di lattazione, ordine di parto e produzione**

La vacca da latte è come un sistema molto complesso che si modifica e si adatta per mantenere un equilibrio anche a fronte di cambiamenti importanti nell'ambiente. Non per questo però non sono evidenziabili variazioni nel corso della vita dell'animale. Le modifiche che avvengono possono essere studiate in maniera approfondita analizzando ciò che avviene durante la lattazione, tra i diversi parti con l'invecchiare dell'animale e a diversi livelli produttivi. Nel corso degli anni molti ricercatori si sono concentrati sull'analisi di come il metabolismo (Flis & Wattiaux, 2005; Morales Piñeyrúa et al., 2018; Neuenschwander et al., 2005), la composizione e la produzione di latte (Gonçalves et al., 2018; Lacková et al., 2024; Østerås et al., 2006) variano secondo i fattori citati in precedenza. È molto importante conoscere questo per comprendere come una bovina risponde ai cambiamenti e quindi, creare dei sistemi più efficienti che rispondano alle esigenze dell'animale, dell'ambiente e del mercato.

Anche per quanto riguarda la metanogenesi, esiste un'ampia variabilità legata ai diversi stadi fisiologici che attraversano la vacca da latte. La variazione nella di produzione di  $CH_4$  rispetto all'ordine di parto sembra essere solo di carattere quantitativo, con un aumento della produzione con l'avanzare dell'età dell'animale e una maggiore differenza tra il primo e il secondo parto (Bittante et al., 2018). Questa variazione è da imputare principalmente alla crescita dell'animale che porta ad una maggiore ingestione di alimento ed una maggiore quantità di latte prodotto. Questo fa capire come un aumento della produzione sia direttamente proporzionale ad un aumento dell'emissione di  $CH_4$  se questa è dovuta ad un aumento dell'ingestione. Tuttavia, la possibilità di allevare animali più produttivi a parità di sostanza secca ingerita aiuterebbe a mantenere costante la produzione allevando meno animali e quindi diminuendo i costi. Inoltre, diminuirebbe il *CH<sub>4</sub> intensity*, perciò diminuirebbe l'incidenza della produzione di  $CH_4$  su un'unità di prodotto (Shibata & Terada, 2010).



**Figura 4.** Effetto dei giorni di lattazione (DIM) sulla produzione di latte (dCMY, kg/d) e sulla predizione del CH<sub>4</sub> yield, per kg di SS ingerita (EM/DMI, g/kg) e sul CH<sub>4</sub> intensity, per unità di prodotto (CH<sub>4</sub>/CM, g/kg) (Bittante et al., 2018).

In relazione ai giorni di lattazione, Bittante et al. 2018 hanno notato un cambiamento più marcato nella produzione di CH<sub>4</sub>. Il *CH<sub>4</sub> production* tende ad aumentare, ma senza grandi variazioni e in maniera lineare, con il proseguire della lattazione a causa probabilmente del progressivo aumento di carboidrati strutturali meno digeribili che rallentano il transito ruminale e diminuiscono la quota di alimento che bypassa il rumine (Bittante et al., 2018). Di conseguenza, questi hanno più tempo per essere degradati e fermentati, portando a una maggiore produzione di gas. La curva di produzione di CH<sub>4</sub> attraverso la lattazione può essere sovrapposta con poco margine di errore alla curva di lattazione per la produzione del latte. Il *CH<sub>4</sub> yield* ad inizio lattazione è pari a circa 19 g/d per poi aumentare a più di 20 g/d durante il terzo mese fino ad un crollo abbastanza deciso toccando valori inferiori a 15 g/d a fine lattazione, rispecchiando così la classica curva di lattazione con il picco che ricade all'interno del secondo/terzo mese dopo il parto. Il *CH<sub>4</sub> intensity* mostra dei valori bassi ad inizio lattazione (10-11 g/kg) per poi aumentare gradualmente lungo la lattazione (Figura 4). Questo riflette il fatto che una parte del grasso del latte dall'inizio lattazione viene prodotta grazie alla mobilitazione degli acidi grassi delle riserve corporee dell'animale e non con gli acidi grassi volatili prodotti dalle fermentazioni ruminali. Quindi, ad inizio lattazione non tutto il grasso presente nel latte è lo specchio di fermentazioni ruminali e conseguente produzione di CH<sub>4</sub>. L'aumento che si ha durante la lattazione invece, una volta superato il periodo di bilancio energetico negativo, evidenzia la necessità da parte dell'animale di ricostituire le riserve corporee (Bittante et al., 2018).

### **1.5.3 Effetto razza**

Non esistono in letteratura molti studi in merito all'effetto che ha la razza, e quindi la genetica ad essa correlata, sulla produzione di CH<sub>4</sub>. Come già riportato precedentemente, la metanogenesi è strettamente correlata con la composizione acidica del latte.

La variazione degli acidi grassi, confrontando varie razze, è da imputare principalmente alla diversa composizione del latte e alla diversa tipologia di dieta a cui questi animali sono sottoposti (Bittante et al., 2018). Anche in Martínez-Marín et al., (2023) sono state riscontrate differenze tra diverse razze (Frisona Italiana, Pezzata Rossa Italiana e Grigio Alpina), ma anche in questo caso è di difficile comprensione l'effetto che ha la genetica rispetto a quanto imputabile all'ambiente. Gli animali erano allevati in montagna con sistemi di allevamento molto diversi (differente tipo di alimentazione, quantità di latte prodotto e gestione degli stessi). Questo ha portato ad avere una grande fonte di variazione soprattutto per quanto riguarda la composizione del latte che influisce direttamente sull'accuratezza della stima degli altri fattori ad essa collegata come la produzione di CH<sub>4</sub>.

## **1.6 Misurazione del metano con metodi diretti**

Per procedere con qualsiasi tipo di indagine fenotipica o genetica sugli animali per quanto riguarda la produzione di CH<sub>4</sub>, e quindi tecniche per mitigarla o controllarla, è necessario quantificare il CH<sub>4</sub> prodotto. Questo non risulta per nulla scontato data la grande varianza in termine di tecniche di allevamento e caratteristiche dell'animale. Non per ultimo, la misurazione di un gas risulta di base un'operazione complessa, se poi questa è associata ad un animale, l'analisi si complica maggiormente. Come evidenziato in Tabella 1, esistono numerose tecniche di misurazione capaci di campionare direttamente in vivo le emissioni prodotte. Questi metodi comprendono le camere di respirazione, l'esafluoruro di zolfo tracciante (SF<sub>6</sub>), campioni di respiro durante la mungitura o l'alimentazione, il Green Feed, il rilevatore laser del metano (LMD), le camere di misurazione portatili, le maschere o cappucci facciali (FAO, 2023; Garnsworthy et al., 2019; Hammond et al., 2016; Zhao et al., 2020). La camera di respirazione è il Gold Standard dei metodi, essendo quello più preciso ed affidabile in quanto misura le emissioni nel loro complesso, provenienti da narici, bocca e ano. Gli altri metodi si concentrano solo sulle emissioni date con il respiro, tralasciando quelle anali. Sono metodi, comunque, abbastanza precisi in quanto le emissioni di CH<sub>4</sub> derivano per il 99% per via orale (Garnsworthy et al., 2019). Questi sono tutti metodi con un costo elevato che non sono riproducibili per un grande numero di animali. Esistono poi tecniche di misurazione in vitro che rispettano il benessere dell'animale ma l'accuratezza della misura con questi metodi non è la stessa. Di seguito sono descritti i principali metodi utilizzabili.

**Tabella 1.** Metodi diretti di misurazione del metano.

<b>Metodo</b>	<b>Vantaggi</b>	<b>Svantaggi</b>
<b>Camera di respirazione</b>	Molto accurata e precisa (soprattutto per valutare gli effetti dei singoli alimenti), rileva emissioni totali quindi sia orali che intestinali, ambiente controllato e confinato, informazioni derivanti dallo specifico animale	È richiesto un periodo di ambientamento degli animali, i risultati possono differire da quello che avviene in natura o in ambienti aperti, molto costoso e complesso, ha bisogno di calibrazioni, ogni 2-3 ore c'è la necessità di rilasciare l'anidride carbonica prodotta per garantire all'animale un ambiente vivibile
<b>Esafluoruro di zolfo tracciante (SF6)</b>	Accurata, gli animali possono non essere confinati, relativamente poco costosa e poco invasiva	Possibile inquinamento della misura derivante da inquinanti ambientali o da animali troppo ravvicinati, misurazione di solo un animale alla volta, leggermente più imprecisa della camera di respirazione
<b>Green feed</b>	Poco costosa, necessita di poco lavoro e consente di campionare molti animali con lo stesso strumento sia al pascolo che in stalla	La misura è soggetta a variazioni tra i vari giorni e tra gli animali campionati a causa di interferenze ambientali, posizione non corretta della testa dell'animale o dal tipo di alimento assunto. L'animale richiede adattamento al sistema
<b>Anidride carbonica tracciante</b>	Rilevatore applicabile a mangiatoie già esistenti per non interferire con il comportamento dell'animale, poco costosa e laboriosa	Se viene utilizzata su pochi animali la misura non risulta molto accurata perché può essere soggetta a variazioni dovute all'ambiente e all'animale
<b>Rilevatore laser</b>	Tecnica semplice, economica, non invasiva che rispetta il naturale comportamento dell'animale	Possibile interferenza dell'ambiente sulla misurazione, specialmente se usata al pascolo dove il vento può disperdere il gas emesso. Questa metodologia diventa soggettiva se l'operatore non lavora correttamente in quanto può influenzare molto la misura

### 1.6.1 Camera di respirazione

La camera di respirazione è il Gold Standard delle metodologie per rilevare l'energia spesa e consumata da un animale (FAO, 2023). Questa tecnica di misurazione si basa sul principio della calorimetria indiretta. Questa metodologia si basa sullo scambio di gas, in particolare O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub>, usando camere a circuiti aperti dove vengono analizzati i flussi in entrata e in uscita o camere a circuiti chiusi dove si analizza la composizione dei gas che si accumulano in un determinato periodo (Johnson & Johnson, 1995). Nei circuiti aperti, la differenza tra la concentrazione dell'aria in entrata e in uscita viene moltiplicata per il flusso d'aria fornendo così il dato di produzione di CH<sub>4</sub> (Jiao et al., 2013;

Johnson & Johnson, 1995). Spesso, l'analizzatore dei gas può essere anche un solo apparecchio capace di lavorare su più camere (Hammond et al., 2016) e capace di misurare tutta una serie di gas per valutare l'emissione di gas serra nel suo complesso o la produzione di calore, tutto nello stesso momento (Zhao et al., 2016).

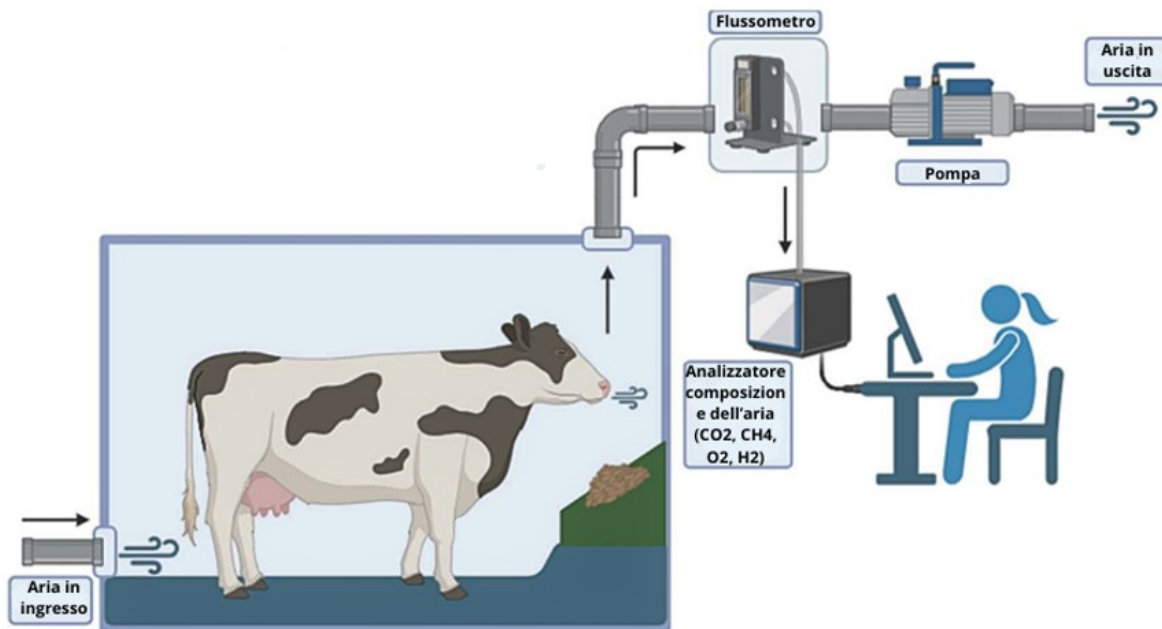


Figura 5. Camera di respirazione (Foto: Alison Pfau, University of Wisconsin-Madison).

La camera di respirazione altro non è che una camera a tenuta stagna in cui un animale, raramente più di uno, è confinato all'interno e tutto lo scambio di gas viene misurato (Figura 5). A seconda del tipo di misurazione cercata, l'animale è trattenuto nella camera da 1 a 7 giorni: questo implica che una singola camera in media non riesca ad analizzare più di 30-50 animali all'anno (Garnsworthy et al., 2019). Per il funzionamento della camera nel suo complesso è essenziale avvalersi della migliore tecnologia per una misurazione precisa, di un'adeguata manutenzione, di strumenti di recupero dei gas e per il controllo delle condizioni interne alla camera come la temperatura, l'umidità, la concentrazione di CO<sub>2</sub> e la ventilazione (Waghorn, 2014). Come riportato in Gardiner et al., (2015), se non viene eseguita periodicamente la taratura dell'analizzatore e verificato che tutto il gas venga trattenuto, questo metodo perde il 100% di accuratezza che lo contraddistingue. Perciò, questa tecnica risulta costosa e si rende necessario personale specializzato per utilizzarla al meglio. Inoltre, dato l'esiguo numero di animali che può ospitare, risulta poco pratica in un esperimento su un grande numero di capi (Garnsworthy et al., 2019; Zhao et al., 2020). Infine, prima di confinare l'animale nella camera, questo ha bisogno di un periodo di addestramento e adattamento, facendo lievitare i costi.

Un grosso vantaggio di questa tecnica rispetto alle altre è che facilita l'investigazione delle relazioni esistenti tra la produzione di  $\text{CH}_4$  e i fattori coinvolti come l'ingestione, specifici tipi di alimenti, caratteristiche dell'animale. È vero però che un ambiente così chiuso tende a modificare quelli che sono le abitudini comportamentali dell'animale e la sua routine, specialmente in termini di ingestione e appetito, oltre a limitarne i movimenti (Garnsworthy et al., 2019; Johnson & Johnson, 1995). Questo risulta particolarmente problematico quando l'obiettivo è valutare le emissioni di animali al pascolo, le cui abitudini sono molto diverse rispetto a quelle degli animali allevati in ambiente confinato (camera di respirazione). Esistono però delle soluzioni che aiutano a mitigare questo problema, ad esempio dei poli-tunnel in materiale plastico con spazi molto più ampi dove è possibile confinare un gruppo più numeroso di animali e andare quindi incontro al benessere dell'animale (FAO, 2023).

### 1.6.2 Esafluoruro di zolfo tracciante ( $\text{SF}_6$ )

La tecnica dell' $\text{SF}_6$  è stata sviluppata per la prima volta da Zimmerman (1993), e studiata per la misura del  $\text{CH}_4$  nei ruminanti da Johnson et al., (1994). È una tecnica che è stata sviluppata per misurare le emissioni degli animali anche se non sono confinati in una camera: si adatta sia per animali in stalla che al pascolo (Lassey, 2013; Pinares-Patiño et al., 2011). L' $\text{SF}_6$  è un gas inerte che non viene prodotto naturalmente dai bovini ruminanti e non interferisce sul normale processo fermentativo e digestivo del rumine.

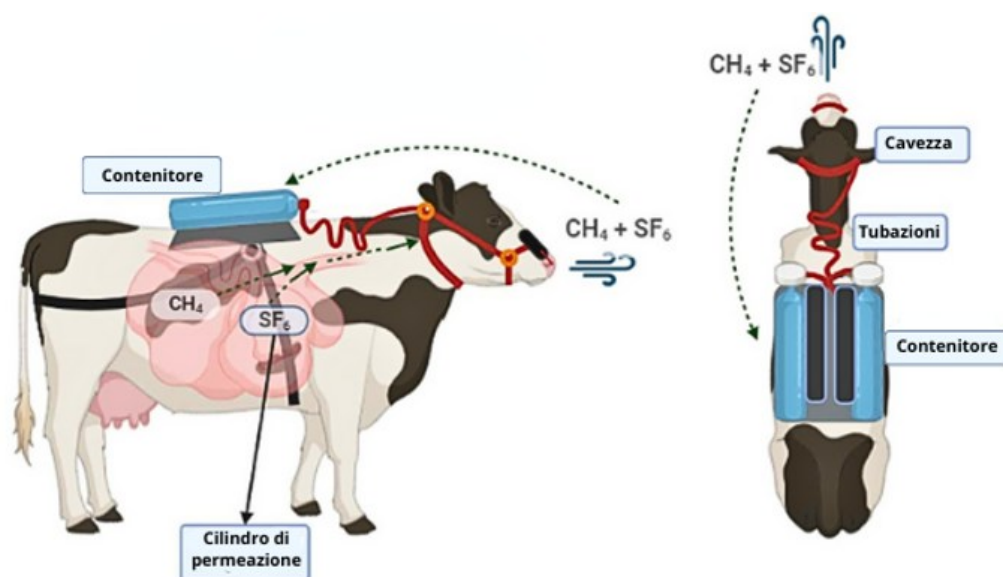


Figura 6. Tecnica dell' $\text{SF}_6$  tracciante (Alison Pfau, University of Wisconsin-Madison).

Nel rumine di ogni animale da analizzare viene inserito un piccolo cilindro contenente l' $\text{SF}_6$  che viene rilasciato lentamente con un flusso noto (Figura 6). L'aria viene prelevata vicino alle narici dell'animale mediante un piccolo tubo fissato con apposite cinghie, il quale poi è collegato ad un

contenitore sottovuoto posizionato sul collo o sulla schiena. Per limitare il flusso dell'aria in entrata nel contenitore viene utilizzato un tubo capillare o una piastra con un piccolo orifizio, in modo tale da riempire il contenitore per il 50-70% dopo circa 24 ore (Garnsworthy et al., 2019). Le misurazioni possono essere giornaliere o basarsi su più giorni per rendere la misura più precisa. Conoscendo il tasso di rilascio dell'SF<sub>6</sub> da parte del cilindro nel rumine, lo si moltiplica per il rapporto tra le concentrazioni di CH<sub>4</sub> e SF<sub>6</sub> nel contenitore e si ottiene così il tasso di emissione di CH<sub>4</sub>. Di per sé, l'SF<sub>6</sub> è un potente gas serra con un GWP di 23900 e una vita media di 3200 anni, ma la quantità utilizzata in questa tecnica è talmente piccola che non viene considerata come un problema (Hammond et al., 2016).

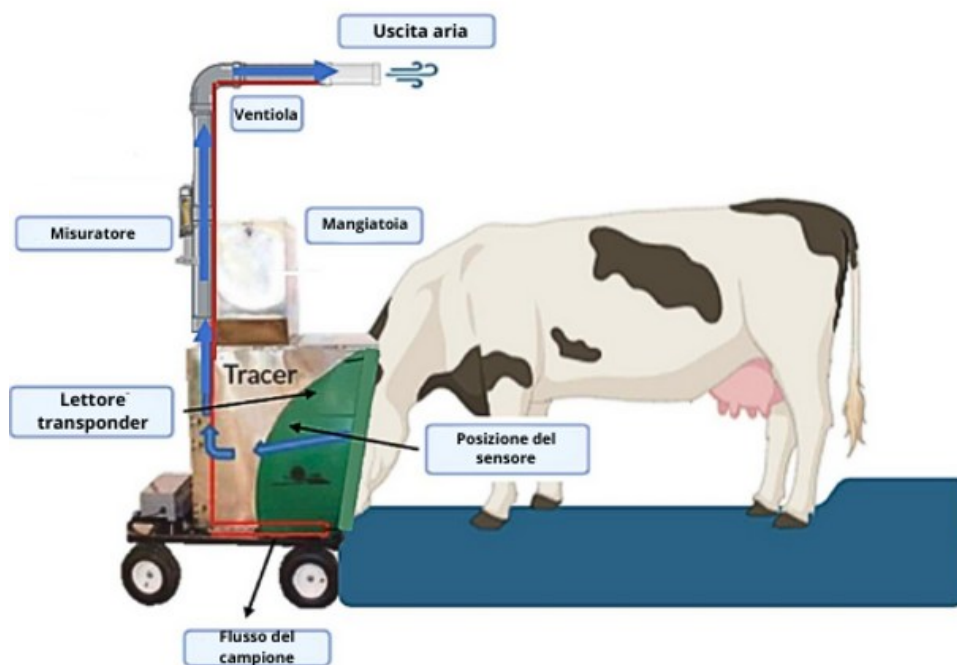
Questa tecnica ha lo svantaggio che la misurazione può risultare imprecisa a causa di inquinamenti esterni. Il respiro di un altro animale accanto al tubo di aspirazione, le emissioni di gas dai reflui (FAO, 2023) o ambienti chiusi e poco ventilati possono alterare i risultati dell'analisi (Hristov et al., 2016).

Il costo di un singolo misuratore è relativamente modesto, ma la raccolta del gas si può fare solo un animale alla volta. Il lavoro nel cambiare ogni giorno il contenitore e i costi di laboratorio rendono questa tecnica, comunque, abbastanza costosa (Garnsworthy et al., 2019). Rispetto alla camera di respirazione, è una tecnica meno invasiva per l'animale, ne rispetta il suo benessere e il suo comportamento tipico senza influenzarne l'alimentazione. Questa tecnica è abbastanza attendibile ma, se non viene eseguita correttamente e se ci sono fattori di disturbo, la misurazione può variare anche più del 10% rispetto a una camera di respirazione (Ramírez-Restrepo et al., 2020; Storm et al., 2012).

### **1.6.3 Green Feed**

Il Green Feed (Figura 7) consiste in una piccola camera per la testa dell'animale, la quale è associata a una stazione di alimentazione, in grado di campionare a intervalli random il metano emesso e lo scambio gassoso emesso dai ruminanti (Cottle et al., 2015; Zimmerman & Zimmerman, 2012). L'alimento funziona da esca per l'animale, questo si avvicina alla camera per alimentarsi del mangime, qui lo strumento rileva l'animale grazie a un orecchino a onde radio e inizia la misurazione (Zhao et al., 2020). L'aria espirata da naso e bocca viene continuamente assorbita da una piccola ventola, trasportata in un canale dove verrà analizzata con un sensore a infrarossi non dispersivo (Huhtanen et al., 2015). Il gas viene misurato solo quando l'animale entra nella stazione e si alimenta, normalmente per 3-7 minuti per diverse volte al giorno per un periodo che può essere da pochi giorni a qualche mese (Hammond et al., 2016).

Dato il gran numero di animali che si possono campionare con un solo analizzatore, questa risulta essere una tecnica relativamente poco costosa e che richiede poco lavoro. Questo strumento, dal momento che preleva l'aria emessa dall'animale, è molto influenzabile dalla posizione della testa del ruminante nella camera, dalla quantità di alimento che ingerisce (Hammond et al., 2015) e dalle condizioni ambientali (Hristov et al., 2018). Infatti, per le misurazioni di animali al pascolo, la presenza di vento sostenuto può inficiare sulla qualità della misurazione per il ricambio di gas all'interno della camera. L'animale, come per le altre tecniche, deve essere prima preparato e gli si deve insegnare ad usare la stazione (Garnsworthy et al., 2019). Questo può essere un problema perché poi non tutti gli animali riescono a imparare e la frequenza con al quale questi si alimentano è molto variabile. Per raggiungere un'affidabilità della misurazione buona (80-90%), in rapporto alla camera di respirazione, è necessario un numero consistente di animali, molte rilevazioni per un periodo sufficientemente lungo in modo da ridurre le possibili variazioni date dall'esterno (Zhao et al., 2020).



**Figura 7.** Schematizzazione di un sistema Green Feed mobile (Foto: Alison Pfau, University of Wisconsin-Madison).

#### 1.6.4 Anidride carbonica tracciante

Molti gruppi di ricerca hanno sviluppato metodi per la quantificazione delle emissioni di CH<sub>4</sub> che si basano sull'analisi della concentrazione del gas nel respiro (Garnsworthy et al., 2019). Sono chiamati in inglese *sniffer*, cioè annusatori, perché sono stati per la prima volta utilizzati come rilevatori di perdite di gas. L'aria emessa dall'animale è campionata vicino alle narici dell'animale attraverso un tubo fissato alla mangiatoia e collegato direttamente all'analizzatore (Garnsworthy et al., 2019). La mangiatoia può essere quella già presente nelle autostazioni di alimentazione o nei robot di mungitura

(Figura 8). In questo modo l'animale non è messo in nessuna situazione di paura e non vede lo strumento; ecco così che, durante le sue normali visite alla stazione, viene anche analizzato il respiro ottenendo un dato veritiero. Durante ogni visita viene campionato il respiro per un tempo che va dai 3 ai 7 minuti.

Spesso questa tecnologia sfrutta la CO<sub>2</sub> come gas tracciante, come avviene per l'SF<sub>6</sub>, e calcola la produzione di CH<sub>4</sub> sulla base del rapporto che esiste tra CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> e sulla quantità di CO<sub>2</sub> predetta sulla base della produttività dell'animale (Madsen et al., 2010). La conoscenza del rapporto tra i due gas si basa su una conoscenza costruita in più di 100 anni di ricerche ed esperimenti sui fabbisogni alimentari e sulla composizione degli alimenti (Storm et al., 2012). La quantificazione dell'ingestione alimentare può essere convertita in produzione di calore e c'è un'importante relazione che lega la produzione di calore e CO<sub>2</sub>.



*Figura 8. Un esempio di rilevatore applicato ad una stazione automatica di mungitura (Foto: Storm et al., 2012).*

Così come la produzione di calore quindi, l'emissione di CO<sub>2</sub> è influenzata dalle caratteristiche e dai comportamenti dell'animale come la sua stazza, l'attività motoria, la produzione e la quantità e tipo di alimento che ingerisce (Hammond et al., 2016; Storm et al., 2012). Confrontandola con la camera di respirazione, questa tecnica risulta pertanto meno affidabile. Se la misurazione avviene su un consistente numero di animali e con una frequenza adeguata, questa metodologia può rivelarsi soddisfacente, avendo anche un costo modesto.

### **1.6.5 Rilevatore laser**

Il rilevatore laser è un dispositivo portatile in grado di misurare la concentrazione di CH<sub>4</sub> nell'aria compresa tra il dispositivo e la bocca dell'animale sfruttando la tecnica dell'assorbimento

nell'infrarosso per il CH<sub>4</sub> (Chagunda et al., 2013; Ricci et al., 2014). La misurazione viene effettuata manualmente tenendo l'apparecchio a circa 1-3 metri dall'animale per un periodo nell'ordine di qualche minuto per rilevare diverse respirazioni (Garnsworthy et al., 2019; Hammond et al., 2016). L'operatore deve cercare di tenere la stessa distanza durante tutta la misurazione e una distanza costante con tutti gli animali. Inoltre, il laser deve essere puntato il più possibile verso la bocca dell'animale o la misura sarà sfalsata. L'output sarà uguale a una serie di picchi dati dal ciclo di respirazione: solo questi verranno considerati perché rappresentano il CH<sub>4</sub> eruttato (Ricci et al., 2014). Questa tecnica ha l'enorme vantaggio che rispetta appieno le normali routine nell'animale non interferendo in alcun modo sul suo comportamento. L'effetto ambientale può essere un'importante fattore che varia la misurazione: emissioni di CH<sub>4</sub> dai reflui, animali troppo vicini al capo coinvolto nella misurazione, la temperatura, l'umidità, la pressione atmosferica e la velocità del vento sono tutti agenti di alterazione (Chagunda et al., 2013). Specialmente negli animali al pascolo, la velocità del vento deve essere monitorata costantemente per evitare che disperda tutto il CH<sub>4</sub> emesso. Il lavoro dell'operatore resta il fattore più importante da monitorare. Infatti, è suo il compito di mantenere una distanza costante, variare l'angolo e tenere sempre il laser puntato correttamente seguendo i movimenti che esegue l'animale. Se la misurazione viene eseguita correttamente la tecnica di rilevazione con il laser è una metodologia promettente che aiuta a campionare in condizioni reali a basso costo e con una buona accuratezza (Niero et al., 2020).

## **1.7 Predizione del metano**

Conoscere la quantità di CH<sub>4</sub> prodotta da un animale risulta essere molto importante per sviluppare sistemi più efficienti a basso impatto sull'ambiente. Mettere in piedi un valido protocollo di selezione genetica basata su questo fattore richiede dei dati abbastanza precisi su quanto gas viene prodotto. Il Gold Standard per la misurazione del CH<sub>4</sub> è la camera di respirazione ma sono strumenti costosi e solo pochi centri possono vantarsi di poterla utilizzare (Negussie et al., 2017). Anche gli altri metodi di misurazione diretta sugli animali si contraddistinguono per il fatto che richiedono costi elevati per la loro implementazione e gestione (Negussie et al., 2016; Pickering et al., 2015). Inoltre, sono tecnologie che possono non adattarsi al benessere dell'animale generando una forte contrapposizione dell'opinione pubblica. Essendo particolarmente complessi si adattano bene a studiare un numero limitato di animali e non ad un campionamento di massa necessario per una corretta selezione genetica. Per questo motivo, negli anni sono stati studiati altri metodi molto più veloci ed economici che si basano sulla predizione del CH<sub>4</sub> prodotto basandosi su diversi modelli e "proxies" (Bougouin et al., 2019; Ellis et al., 2010; Negussie et al., 2017).

Il “proxy” ideale dovrebbe essere altamente correlato sia a livello genetico che fenotipico, avere un costo esiguo e poter essere ripetutamente misurato su larga scala. La loro accuratezza a volte può non essere all’altezza dei piani di miglioramento ma il rumore di fondo può essere limitato dall’elevato numero di campionamenti attuabili (Negussie et al, 2017). Tra i metodi di predizione, la relazione che sussiste tra la produzione di CH<sub>4</sub> e l’efficienza alimentare risulta essere molto interessante (Basarab et al., 2013). Il problema che può nascere in questo caso è la misurazione dell’ingestione di sostanza secca a livello individuale perchè in uno studio su larga scala risulta complesso ricavare un dato preciso (Bittante & Cipolat-Gotet, 2018). In Negussie et al. (2017) viene fatta una panoramica su diversi altri “proxies” che si possono utilizzare per determinare il CH<sub>4</sub> prodotto. Sono incentrati particolarmente sull’alimentazione e sul rumine: è stato studiato il tempo di ruminazione, la frequenza di alimentazione, il pH ruminale e le caratteristiche dei microbi presenti al suo interno e i metaboliti prodotti durante le fermentazioni. Tutti questi possono essere degli strumenti di predizione ma non sempre sono facili da analizzare e se usati singolarmente la loro accuratezza molte volte è messa in discussione.

Analizzando la composizione del latte prodotto e più in particolare gli acidi grassi presenti, si ottiene un “proxy” molto interessante per via del rapporto che sussiste tra acidi grassi e le fermentazioni ruminali (Knapp et al., 2014). Nel rumine avviene la sintesi di acetato e β-idrossibutirrato e come prodotto finale si forma H<sub>2</sub> che poi viene convertito in CH<sub>4</sub>, mentre la sintesi di propionato è coinvolta in un consumo di H<sub>2</sub> (Demeyer & van Nevel, 1975). Gli acidi grassi lineari a corta e media catena presenti nel latte derivano per la maggior parte da sintesi *de novo* nella mammella (Bernard et al., 2008). Per la sintesi viene utilizzato maggiormente l’acetato (85% di tutta la sintesi), poi β-idrossibutirrato (10-15%) e una piccola parte di propionato formando così acidi grassi a corta catena (C<sub>4</sub>, C<sub>6</sub> e C<sub>8</sub>), gran parte di quelli a media catena (C<sub>10</sub>, C<sub>12</sub> e C<sub>14</sub>) e il 60% dei C<sub>16</sub> (Negussie et al., 2017). Come già descritto, la produzione di acetato e butirrato è legata positivamente con la metonogenesi. Grazie alle stesse vie chimiche coinvolte, esiste una relazione positiva tra la sintesi di CH<sub>4</sub> e gli acidi grassi a corta e media catena nel latte (van Gastelen & Dijkstra, 2016). Gli acidi grassi a catena dispari o ramificata (OBCFA) possono essere usati anch’essi per la predizione del CH<sub>4</sub> data la loro origine microbica (Massaro et al., 2024; van Lingen et al., 2014). Nella mammella il propionato è il substrato di sintesi di C<sub>15:0</sub> e C<sub>17:0</sub> il quale è correlato negativamente con la produzione di CH<sub>4</sub>. Per questo motivo, può essere assunta una correlazione negativa tra questi acidi grassi e l’emissione del gas (van Gastelen & Dijkstra, 2016). I batteri cellulolitici sono spesso ricchi di acidi grassi *iso* mentre quelli amilolitici mostrano una prevalenza di acidi grassi a catena dispari e *antesio* (Vlaeminck et al., 2006). Dalle conoscenze in ambito nutrizionale, si può affermare che gli acidi grassi *iso* hanno una relazione positiva con il CH<sub>4</sub> emesso, al contrario, gli acidi grassi a catena

dispari e *antesio* sono correlati negativamente. Comunque, la correlazione maggiormente positiva la si ritrova con gli acidi grassi saturi (dal C6:0 al C16:0) e quella più negativa con diverse forme di acidi grassi *trans*-C18 (van Lingen et al., 2014).

Il Gold Standard per la misurazione degli acidi grassi nel latte è la tecnica della gas cromatografia, metodologia molto accurata e precisa. D'altro canto, è una tecnica complessa che richiede molto lavoro e costi, per questo motivo applicarla in uno studio su larga scala o quotidianamente è molto complesso e quasi infattibile (Bittante & Cipolat-Gotet, 2018; Massaro et al., 2024). Una tecnica abbastanza recente è quella di utilizzare l'infrarosso, più in particolare il medio infrarosso (MIR) dato già il suo grande uso nei controlli funzionali o nelle analisi quotidiane per valutare la qualità del latte (Massaro et al., 2024). È una tecnica molto economica, veloce e non distruttiva basata su analisi multiparametriche. Questa metodologia di misurazione è abbastanza sicura ma deve essere usata con la giusta attenzione data la sua scarsa abilità predittiva per gli acidi grassi minori, specialmente gli acidi grassi insaturi della serie C:18 (Maurice-Van Eijndhoven et al., 2013). Grande attenzione è poi da porre nella fase di creazione e sviluppo delle curve di calibrazione per creare un output il più affidabile possibile (De Marchi et al., 2014).

Negli ultimi anni la ricerca si è focalizzata molto sullo studiare il modo migliore per predire in modo veloce ed accurato la produzione di CH<sub>4</sub>. Sfruttando l'infrarosso sono state create diverse equazioni di stima che, come base, hanno tutte la composizione del latte in termini di acidi grassi (Bougouin et al., 2019; Dijkstra et al., 2011; van Gastelen et al., 2018; van Lingen et al., 2014). Questi studi sono basati su metanalisi quindi su una moltitudine di dati provenienti da altrettanti animali campionati, alimentati con diverse diete e allevati in diverse condizioni. Grazie alla grande variabilità di informazioni ottenute si riesce a costruire un'equazione di predizione più solida e che meglio di adatta a interpretare le variazioni che ci possono essere tra i capi. I dati di produzione di CH<sub>4</sub> utilizzati in questi studi sono stati ottenuti attraverso metodi diretti come le camere di respirazione, l'SF<sub>6</sub> e il Green Feed. Con le equazioni il CH<sub>4</sub> viene espresso sulla base di diversi fenotipi già descritti in precedenza (*CH<sub>4</sub> intensity*, *CH<sub>4</sub> yield* e *CH<sub>4</sub> production*). Inoltre, in alcune equazioni sono stati combinati assieme diversi "proxies", oltre agli acidi grassi è stata aggiunta l'ingestione di sostanza secca, la composizione della dieta, le caratteristiche dell'animale (peso vivo), la produzione di latte e la sua composizione (Bougouin et al., 2019; Negussie et al., 2017). Avvalersi di più "proxies" contemporaneamente limita l'errore aumentando l'affidabilità e la robustezza della predizione.



## 2. OBIETTIVO

In letteratura sono presenti pochi studi relativi all'analisi delle differenze di produzione di CH<sub>4</sub> in diverse razze di vacche da latte. La produzione di CH<sub>4</sub> è una tematica di grande attualità per quanto concerne le emissioni nell'ambiente. Sapere come la generazione di gas enterico varia nella nostra zona di allevamento, il Veneto, risulta fondamentale per raggiungere lo scopo di rendere più efficiente e meno impattante l'allevamento bovino. Per questi motivi, la presente tesi ha valutato l'emissione di CH<sub>4</sub> (*production, yield e intensity*) in 3 diverse razze di vacche allevate in Veneto e i principali fattori che le influenzano, in particolare ordine di parto e stadio di lattazione.



## 3. MATERIALI E METODI

### 3.1 Attività di campionamento

Per la rilevazione dei dati necessari a questo studio sono state svolte diverse attività di campionamento da aprile a ottobre 2024. Sono stati visitati 16 allevamenti di vacche da latte nelle province di Vicenza, Padova, Treviso, Venezia e Belluno (Veneto, Italia). Queste aziende erano allevamenti “monorazza”: in particolare, 9 allevavano Frisona Italiana, 4 Pezzata Rossa Italiana e 3 Rendena. La mungitura avveniva tramite sala convenzionale in 9 allevamenti, mentre nei restanti 7 era installato un robot di mungitura. Sono stati raccolti in totale 909 campioni di latte individuale (499 per la razza Frisona Italiana, 204 per la razza Pezzata Rossa Italiana e 206 per la razza Rendena). Le vacche erano caratterizzate da diverso ordine di parto, stadio di lattazione e livello di produzione, al fine di includere la maggiore variabilità possibile nella successiva analisi statistica.

I campionamenti si sono svolti nello stesso giorno del controllo funzionale da parte dell’Associazione Regionale Allevatori del Veneto (ARAV, Vicenza), con l’obiettivo di raccogliere un profilo dettagliato di ciascun animale. Tale profilo includeva la produzione giornaliera di latte e la relativa qualità, lo stadio di lattazione e l’ordine di parto. Per ogni azienda, oltre ai campioni di latte, è stato prelevato un campione rappresentativo della razione.

### 3.2 Analisi latte

Le analisi sono state eseguite presso i laboratori di ARAV. All’interno del laboratorio latte, un’aliquota di questo prodotto è stata analizzata tramite strumentazione a infrarossi CombiFoss<sup>TM</sup> 7 (Foss Electric A/S, Hillerød, Danimarca). Sfruttando la spettroscopia mid-infrared (MIR), sono stati rilevati i valori di grasso, proteina, caseina, lattosio (%) e la concentrazione di urea (mg/dL) per ciascun animale campionato. Per rilevare il conteggio delle cellule somatiche (SCC, cellule/ $\mu$ L) invece, è stata utilizzata la citometria a flusso. In questo modo, si è riusciti a risalire alla composizione chimica del latte, utile per le successive analisi statistiche.

Il valore di SCC è stato trasformato in punteggio (SCS) con lo scopo di ottenere una distribuzione normale dei dati tramite la formula seguente:  $SCS = 3 + \log_2(SCC/100)$ .

### 3.3 Analisi acidi grassi

Dai campioni prelevati in azienda dai tecnici ARAV è stata ricavata un'aliquota di 10 mL di latte per ciascuno campione, che è stata congelata e in seguito liofilizzata tramite Scanvac CoolSafe™, senza alterare la composizione lipidica originaria, per prepararla alla successiva operazione di esterificazione diretta.

In seguito alla liofilizzazione, sono stati pesati 100 mg di campione all'interno di provette in Pyrex di dimensioni 10 cm x 2,5 cm. A ciascuna porzione di campione sono stati aggiunti 2 mL di una soluzione di metossido 0,5 M in metanolo e 1 mL di esano. Le provette sono state quindi incubate a 50°C per 15 minuti, al fine di promuovere la transesterificazione alcalina.

Al termine dell'incubazione, i campioni sono stati lasciati raffreddare a temperatura ambiente per circa 5 minuti. Successivamente, è stato aggiunto 1 mL di una soluzione di acido cloridrico al 5 % in metanolo al campione, che è stato sottoposto a un secondo ciclo di incubazione alle medesime condizioni termiche e temporali, questa volta per favorire la reazione di esterificazione acida. Come in precedenza, i campioni sono stati lasciati raffreddare fino a temperatura ambiente.

Si è quindi proceduto con l'estrazione dei FAME (Fatty Acid Methyl Esters). A tal fine, sono stati aggiunti 2 mL di esano e 3 mL di una soluzione di carbonato di potassio. I campioni sono stati agitati energeticamente per 30 secondi mediante vortex, quindi centrifugati a 400 giri per 10 minuti a 4°C. Al termine della centrifugazione, è stata prelevata la fase organica e sottoposta ad analisi mediante gascromatografia con rivelatore a ionizzazione di fiamma (GC-FID), utilizzando un gascromatografo Agilent 7890B (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). È stato iniettato un volume di 1 µL con un rapporto di split pari a 70:1. Per la separazione dei composti è stata impiegata una colonna CP-Sil 88 (100 m x 0.25 mm di diametro interno, spessore del film 0.20 µm), utilizzando idrogeno come gas di trasporto, con un flusso di regolato a 1,25 mL/min. Il forno è stato inizialmente impostato a 80°C, aumentando fino a 190°C con un gradiente di 3°C/min e mantenendo a tale temperatura per 8 minuti. Successivamente, la temperatura è stata portata a 230°C con lo stesso gradiente, fino a raggiungere i 240°C, mantenuti per 3 minuti. Sia l'iniettore che il rivelatore sono stati mantenuti a una temperatura di 250°C.

È stata inoltre eseguita una seconda iniezione, utilizzando la stessa colonna e una temperatura del forno statica a 165°C, per consentire la separazione specifica degli isomeri C18:1n9 cis-9 e C18:1n3 trans-15.

L'identificazione degli acidi grassi è stata effettuata confrontando i tempi di ritenzione con quelli di differenti miscele standard di esteri metilici di acidi grassi (Supelco 37-component FAME Mix, cod.

47,885–U; NuChek 674, 463, ecc.). I singoli esteri metilici degli acidi grassi sono stati espressi come percentuale dell'area totale degli esteri metilici eluiti.

### **3.4 Analisi razione**

Durante le visite in azienda, oltre al campione di latte, ne è stato raccolto uno anche della razione. Per essere certi che questo fosse rappresentativo dell'esatto contenuto nutrizionale della razione, lo si è prelevato appena dopo lo scarico del carro mattutino, prima che l'azione selezionatrice degli animali potesse creare differenti frazioni. Il campione, circa 2 kg, è stato raccolto prelevando frazioni uniformi lungo tutta la mangiatoia per assicurare una buona riproduzione delle caratteristiche della razione, poi è stato suddiviso in 2 aliquote da circa 1 kg ciascuna. Queste hanno subito il congelamento a -20°C entro le 6 ore dalla raccolta. Un'aliquota era indirizzata al laboratorio di ARAV per le analisi chimiche necessarie, l'altra ha avuto il solo scopo di fungere come riserva in caso di eventuali controlli o analisi seguenti. A seguito della richiesta all'allevatore, è stata ottenuta anche la composizione della razione in termini di singoli alimenti.

Per consentire le analisi chimiche in laboratorio, i campioni sono stati pre-essiccati in forno a 55°C per 48 h a peso costante (circa 400 grammi). Dopo questa fase, la sostanza restante è stata pesata nuovamente calcolando così l'umidità del campione tramite semplice sottrazione delle due pesate. È stata poi eseguita una macinazione dei campioni in un mulino Retsch SK (Bauknecht, Stoccarda, Germania) fino ad ottenere una granulometria di 0,75 mm. La determinazione delle componenti chimiche della razione è avvenuta come descritto nei principali articoli scientifici del settore.

Per quantificare le proteine si è sfruttato il metodo Kjeldahl che consiste in una digestione delle stesse in una soluzione acida, la quale porta alla liberazione dell'azoto organico che viene poi convertito in ammoniaca e distillato. Grazie ad una soluzione standard di acido, si titola la soluzione distillata precedentemente, quantificando così l'azoto organico presente. Le frazioni fibrose (NDF, ADF e ADL) sono state determinate mediante lo strumento ANKOM. L'analisi consiste nel trattamento delle sostanze con detergenti neutri, poi con soluzioni acide e alcaline per eliminare le frazioni proteiche e amidacee. Si esegue poi una pesatura della sostanza fibrosa restante al fine di ottenere la quantità esatta di fibra presente nel campione. La tecnica della polimetria è stata sfruttata per quantificare la quota di amido. Utilizzando una soluzione di idrossido di sodio è stata creata una sospensione dei campioni, con conseguente digestione con alfa-amilasi. A questo punto viene misurato l'angolo di rotazione della luce polarizzata che passa attraverso il campione quantificando così l'amido presente. Le ceneri totali sono state determinate previo incenerimento del campione in muffole, con una successiva pesatura della sostanza restante per ottenere una percentuale da esprimere sul secco. Per

finire, i lipidi grezzi (estratto etereo) sono stati determinati grazie all'estrattore Soxhlet. I campioni sono stati posizionati in appositi contenitori metallici dove sono stati sottoposti a una fase di estrazione con ripetute immersioni in etere di petrolio e un'essiccazione in stufa. A questo punto, pesando il composto, si è ottenuto il contenuto lipidico. Tutte queste analisi e procedure descritte sono state eseguite seguendo le indicazioni del regolamento n. 152/2009 della Commissione europea (Commissione europea 2009). La composizione analitica dei campioni di razione provenienti dalle diverse aziende oggetto di studio è riportata in Tabella 2.

**Tabella 2.** Tipo e composizione analitica della razione delle aziende analizzate.

Azienda	Tipo razione	Umidità (%)	Proteina Grezza (%/SS)	Estratto etereo (%/SS)	Amido (%/SS)	NDF (%/SS)	ADF (%/SS)	ADL (%/SS)	Fibra grezza (%/SS)	Ceneri (%/SS)
1	A secco	43,24	8,30	1,44	NA	59,02	31,98	3,20	29,33	7,50
2	A secco	47,18	10,96	2,48	18,50	41,87	19,95	2,45	18,52	8,19
3	Unifeed	57,11	9,50	2,28	11,84	54,65	28,72	2,31	27,50	9,62
4	Unifeed	50,22	12,53	2,22	21,20	39,34	22,11	1,81	20,74	7,43
5	Unifeed	43,49	14,03	2,69	23,71	35,73	21,20	3,61	19,83	7,96
6	Unifeed	41,70	12,98	3,28	25,35	37,58	18,70	1,70	18,06	7,26
7	Unifeed	50,04	13,35	1,98	19,99	40,74	21,12	3,01	17,37	11,44
8	Unifeed	48,64	14,80	3,65	24,28	31,71	17,88	2,24	15,14	6,64
9	Unifeed	53,00	14,94	3,04	27,92	35,88	19,85	2,41	16,62	7,07
10	Unifeed	49,35	13,73	3,16	25,72	34,99	20,88	2,57	17,39	7,80
11	Unifeed	NA	10,75	2,07	13,58	49,89	27,91	4,48	26,65	8,06
12	Unifeed	41,92	15,63	3,17	18,86	38,42	20,45	2,38	16,57	8,73
13	Unifeed	48,04	11,61	2,88	26,49	36,65	19,64	2,22	17,78	7,21
14	Unifeed	49,25	15,36	3,74	21,78	37,72	20,64	2,67	15,96	7,56
15	Unifeed	43,64	14,10	3,57	22,33	37,00	20,76	3,59	20,48	5,79
16	Unifeed	40,50	13,41	2,31	22,16	37,47	20,64	3,21	18,78	8,18

### 3.5 Predizione metano

Una volta raccolti e organizzati in un database tutti i dati relativi alle caratteristiche della dieta e del latte – inclusa la composizione dei principali costituenti e il contenuto in acidi grassi – è stato possibile predire i diversi fenotipi di CH<sub>4</sub> (*production, yield, intensity*) per ciascun animale campionato grazie all’ausilio di specifiche equazioni. Queste ultime sono state derivate da Bougouin et al. (2019), un importante e recente studio che ha analizzato dati provenienti da un ampio numero di animali allevati in diverse aree e alimentati con diverse diete, con l’obiettivo di sviluppare nuovi modelli empirici basati sulle emissioni individuali di CH<sub>4</sub>, sulla composizione del latte e della razione e su altre caratteristiche dell’animale. Nello studio di Bougouin et al. (2019) le analisi sono state condotte su 825 osservazioni individuali, provenienti da 34 esperimenti esterni svolti in diversi Paesi del mondo. Tutti i dati relativi alla produzione individuale di CH<sub>4</sub> derivavano da metodi di misurazione diretta, quali camere di respirazione, gas tracciante SF<sub>6</sub> o Green Feed, al fine di garantire misurazioni accurate e affidabili della metanogenesi nelle vacche da latte. Ogni osservazione era accompagnata da un’ampia gamma di informazioni specifiche per ciascun animale, elemento che ha permesso di costruire modelli predittivi sempre più complessi. Sono stati costruiti modelli lineari ad effetti misti con diversi livelli di complessità: i più semplici si basavano esclusivamente sulla composizione amminoacidica del latte, mentre quelli più avanzati includevano ulteriori variabili indipendenti riferite alle caratteristiche del latte, della dieta o dell’animale.

Bougouin et al. (2019) hanno sviluppato diverse equazioni in grado di stimare tre principali proxies comunemente utilizzati per la valutazione delle emissioni di metano: *production, yield e intensity*. Per il presente studio, tuttavia, è stata selezionata solo una parte di tali equazioni. I criteri di selezione si sono basati sull’affidabilità e robustezza dei modelli, nonché sulla disponibilità delle variabili richieste, limitandosi a quelle che utilizzano esclusivamente i caratteri a nostra disposizione: profilo degli acidi grassi, caratteristiche del latte e della dieta. In Tabella 3 sono riportate le equazioni scelte: 3 per quanto riguarda il *CH<sub>4</sub> production*, 3 per il *CH<sub>4</sub> intensity* e 2 per il *CH<sub>4</sub> yield*.

**Tabella 3.** Equazioni per la stima di CH<sub>4</sub> production, yield e intensity e relative performance (da: Bougoin et al., 2019).

Carattere	Equazione	R <sup>2</sup>
CH <sub>4</sub> Production A	$467.3 (\pm 49.24) + 26.7 \times C10:0 (\pm 8.66) - 101.1 \times [iso\ C17:0 + trans-9\ C16:1] (\pm 47.34) - 122.8 \times cis-11\ C18:1 (\pm 23.48) - 37.3 \times trans-11, cis-15\ C18:2 (\pm 9.76)$	0,84
CH <sub>4</sub> Production B	$372.5 (\pm 51.68) + 18.6 \times C10:0 (\pm 8.69) - 79.3 \times iso\ C17:0 + trans-9\ C16:1 (\pm 45.37) - 103.4 \times cis-11\ C18:1 (\pm 24.44) - 38.9 \times trans-11, cis-15\ C18:2 (\pm 9.39) + 3.6 \times produzione\ latte (\pm 0.77)$	0.86
CH <sub>4</sub> Production C	$178.6 (\pm 57.13) + 22.7 \times C10:0 (\pm 7.96) - 100.0 \times cis-11\ C18:1 (\pm 22.96) - 41.5 \times trans-11, cis-15\ C18:2 (\pm 8.81) + 4.2 \times produzione\ latte (\pm 0.77) + 31.2 \times grasso (\pm 7.96)$	0.86
CH <sub>4</sub> Yield A	$21.0 (\pm 1.09) + 10.5 \times iso\ C16:0 (\pm 2.32) - 2.7 \times cis-11\ C18:1 (\pm 0.54) - 0.8 \times trans-10\ C18:1 (\pm 0.13) - 1.1 \times cis-9, cis-12\ C18:2 (\pm 0.28)$	0.82
CH <sub>4</sub> Yield B	$9.3 (\pm 3.10) + 0.1 \times C16:0 (\pm 0.05) + 6.0 \times iso\ C16:0 (\pm 2.30) - 2.8 \times cis-11\ C18:1 (\pm 0.53) - 0.6 \times trans-10\ C18:1 (\pm 0.13) - 1.0 \times cis-9, cis-12\ C18:2 (\pm 0.28) + 0.3 \times NDF (\pm 0.05) - 0.4 \times EE (\pm 0.14)$	0.85
CH <sub>4</sub> Intensity A	$13.8 (\pm 1.19) + 9.8 \times iso\ C16:0 (\pm 2.97) - 2.4 \times cis-15\ C18:1 (\pm 0.88) - 0.4 \times [trans-10 + trans-11\ C18:1] (\pm 0.12)$	0.70
CH <sub>4</sub> Intensity B	$17.0 (\pm 1.42) + 5.5 \times iso\ C16:0 (\pm 2.60) - 0.9 \times trans-10\ C18:1 (\pm 0.12) - 0.3 \times EE (\pm 0.11) - 0.1 \times amido (\pm 0.04)$	0.71
CH <sub>4</sub> Intensity C	$15.3 (\pm 5.37) + 3.9 \times iso\ C16:0 (\pm 2.40) - 0.5 \times [trans-10 + trans-11\ C18:1] (\pm 0.09) + 1.9 \times grasso (\pm 0.30) + 2.2 \times proteina (\pm 0.69) - 3.2 \times lattosio (\pm 0.88)$	0.77

### 3.5 Analisi statistica

La gestione, organizzazione ed elaborazione dei dati sono state effettuate utilizzando il software R (versione 4.3.2, R Core Team, 2023, Vienna, Austria). Dopo la stima dei diversi fenotipi di CH<sub>4</sub>, sono state calcolate le statistiche descrittive e le correlazioni di Pearson con i parametri di qualità del latte.

Per quanto riguarda l'analisi della varianza, è stato applicato un modello finalizzato a individuare le principali fonti di variazione della produzione di CH<sub>4</sub>. Il modello adottato è il seguente:

$$y_{ijkl} = \mu + \text{razza}_i + \text{giorni di lattazione}_j + \text{ordine di parto}_k \\ + (\text{razza} \times \text{giorni di lattazione})_{ij} + (\text{razza} \times \text{ordine di parto})_{ik} \\ + \text{azienda}_l(\text{razza})_i + e_{ijkl}$$

Dove:

- $\mu$  è la media generale;
- $y_{ijkl}$  è la variabile dipendente, cioè CH<sub>4</sub> *production*, *yield* o *intensity*;
- $\text{razza}_i$  è l'effetto fisso dell' $i$ -esima razza ( $i$  = Frisona Italiana, Pezzata Rossa Italiana, Rendena);
- $\text{giorni di lattazione}_j$  è l'effetto fisso della  $j$ -esima classe di giorni di lattazione ( $j$  = 6 classi; 5-55, 56-105, 106-155, 156-205, 206-255, >255 giorni);
- $\text{ordine di parto}_k$  è l'effetto fisso della  $k$ -esima classe di ordine di parto ( $k$  = 3; primipare, secondipare, terzipare e oltre);
- $(\text{razza} \times \text{giorni di lattazione})_{ij}$  è l'effetto fisso dell'interazione tra razza e giorni di lattazione;
- $(\text{razza} \times \text{ordine di parto})_{ik}$  è l'effetto fisso dell'interazione tra razza e ordine di parto;
- $\text{azienda}_l(\text{razza})_i$  è l'effetto casuale dell' $l$ -esima azienda ( $l$  = da 1 a 16) entro l' $i$ -esima razza;
- $e_{ijkl}$  è l'effetto residuo casuale.

A seguito dell'analisi della varianza è stato effettuato un test di confronti multipli tra le medie stimate degli effetti tenendo conto di un livello di significatività  $P < 0,05$ .



## 4. RISULTATI e DISCUSSIONE

### 4.1 Statistiche descrittive

In Tabella 4 sono illustrate le medie e le deviazioni standard della produzione e della qualità del latte nelle razze Frisona Italiana, Pezzata Rossa Italiana e Rendena.

**Tabella 4.** Media e deviazione standard (DS) della produzione e della composizione del latte entro razza.

Carattere	Frisona Italiana		Pezzata Rossa Italiana		Rendena	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS
Latte, kg/d	37,13	9,44	29,00	7,61	20,45	5,68
Grasso, %	3,33	0,74	2,95	0,80	3,41	0,60
Proteina, %	3,34	0,35	3,48	0,33	3,24	0,32
Lattosio, %	4,80	0,16	4,79	0,17	4,90	0,17
Caseina, %	2,62	0,31	2,74	0,29	2,57	0,26
SCS, score	2,32	1,93	1,43	1,79	2,34	1,72
Urea, mg/dL	23,08	3,95	21,76	3,60	18,95	5,12

Come si può osservare, per quanto riguarda la razza Frisona Italiana, la produzione media di latte è risultata pari a 37,13 kg/d, un valore superiore rispetto alle medie registrate in animali allevati al di fuori dell'Italia, pur mantenendo un coefficiente di variazione che comunque è nella media. In un recente studio sulla componente genetica della produzione di CH<sub>4</sub> in vacche di razza Frisona allevate in diverse aree del Canada, le produzioni medie sono state pari a 32,65 kg/d e 30,85 kg/d (Kamalanathan et al., 2023). Nel lavoro di Bougouin et al. (2019), che ha incluso animali provenienti da diversi Paesi, la produzione media era 29,30 kg/d. La produzione media osservata nel presente studio risulta invece in linea con quella nazionale della Frisona Italiana. La produzione media giornaliera per l'anno 2024 è stata infatti di circa 36 kg (ANAFIBJ, 2025). Il tenore proteico del latte analizzato, pari al 3,34%, è in linea con il dato nazionale (3,40%) e leggermente superiore a quello riportato da Bougouin et al. (2019), pari al 3,2%. Al contrario, il contenuto di grasso si è rilevato eccezionalmente basso (3,33%), se confrontato con la media nazionale del 2024 che si attesta attorno al 3,93%.

Concentrandoci sulla Pezzata Rossa Italiana, i valori medi di produzione, grasso e proteine sono stati pari a 29,00 kg/d, 2,95% e 3,48%. Le statistiche nazionali per la Pezzata Rossa Italiana, secondo il bollettino riferito all'anno 2024 fornito dall'Associazione Italiana Allevatori (AIA, 2025), riportano un dato di produzione pari a circa 23,90 kg/d con un contenuto in grasso e proteina pari a 3,90% e 3,43%. L'unico valore in linea con quanto trovato è il contenuto di proteine. La media giornaliera di produzione in questo studio è maggiore rispetto a quella nazionale, indicando che le aziende campionate sono indirizzate alla produzione del latte. Il contenuto in grasso al contrario è apparso molto minore, andando in controtendenza a quelle che sono le caratteristiche di questa razza, ossia una minore produzione di latte rispetto a razze più specializzate ma con un maggiore contenuto in nutrienti.

Gli animali di razza Rendena hanno una produzione media di 20,45 kg/d, con un tenore in grasso e proteina rispettivamente di 3,41% e 3,24%. Questi valori sono abbastanza in linea con quello che è l'andamento italiano per questa razza. Infatti, secondo le statistiche fornite da AIA per il 2024, la media giornaliera di latte è stata di 18,29 kg/d, quella di grasso 3,51% e quella di proteina 3,26%.

Nei dati ottenuti per l'SCS è presente molta variabilità. È interessante notare che in una razza di elevata rusticità come la Rendena, il contenuto in cellule somatiche sia in linea con quello di una razza altamente specializzata come la Frisona Italiana. La Pezzata Rossa Italiana, al contrario, ha un minore contenuto di cellule, dimostrabile dal suo carattere modestamente rustico e meno portato ad una elevata produzione. Questa razza però presenta un'alta variabilità, indice che all'interno della popolazione gli individui differiscono molto tra di loro. Per gli altri caratteri riportati in Tabella 4, il coefficiente di variazione è più contenuto e comunque in linea con quanto riportato in letteratura.

Stimolante è inoltre notare come il contenuto di urea vari tra le razze. La Frisona Italiana presenta il contenuto in urea più alto (23,08 mg/dL), poi la Pezzata Rossa Italiana (21,76 mg/dL) e infine la Rendena (18,95 mg/dL). Questo andamento è l'esatto opposto di quanto trovato in un recente studio sulle fonti di variazione dell'urea nel latte (Bittante, 2022). Tanti sono i fattori che partecipano alla variazione del contenuto di questo nutriente, tra i quali anche il livello di produttività della mandria e il livello di intensivizzazione dell'allevamento.

Concentrandoci ora sugli acidi grassi contenuti nel latte (Tabella 5), questi sono risultati solo parzialmente in linea con quanto riportato da Bougouin et al. (2019) per quanto riguarda la razza Frisona. Si può notare come gli animali campionati in questo studio mostrino un contenuto maggiore di C16:0 (32,51 g/100 g vs 29,83 g/100 g), iso C 17:0 + trans-9 C 16:1 (0,39 g/100 g vs 0,20 g/100 g) e cis-9, cis-12 C 18:2 (2,50 g/100 g vs 1,84 g/100 g). Al contrario, il latte ha presentato una composizione molto minore di cis-15 C 18:1 (0,09 g/100 g vs 0,29 g/100 g), trans-10 C 18:1 (0,56

g/100 g vs 0,90 g/100 g), trans-11 C 18:1 (0,85 g/100 g vs 1,65 g/100 g), trans-11, cis-15 C 18:2 (0,03 g/100 g vs 0,46 g/100 g). Al momento della stesura di questo lavoro, la letteratura è carente di studi riguardanti la composizione degli acidi grassi di animali di razza Pezzata Rossa Italiana e soprattutto Rendena. Solitamente sono l'acido oleico e linoleico gli acidi grassi di maggiore importanza ricercati nei vari studi nelle vacche da latte, mentre gli altri acidi grassi utilizzati con le equazioni predittive sono analizzati solo su determinati studi approfonditi. È utile ricordare inoltre che gli acidi grassi minori, contenuti in modesta quantità nel latte, non vengono studiati frequentemente perché il livello di accuratezza nell'analisi non sempre è adeguato. In Massaro et al. (2024), anche se su razza Bruna, la composizione in termini di acidi grassi non si discosta in modo eccessivo da quella della Pezzata Rossa Italiana e Rendena.

**Tabella 5.** Media e deviazione standard degli acidi grassi entro razza utilizzati nelle equazioni (g/100 g di acidi grassi totali) per la stima di CH<sub>4</sub> Production, CH<sub>4</sub> Yield e CH<sub>4</sub> Intensity.

Acidi grassi (g/100 g di acidi grassi totali)	Frisona Italiana		Pezzata Rossa Italiana		Rendena	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS
C 10:0	2,80	0,55	2,98	0,43	2,81	0,40
C 16:0	32,51	3,53	32,56	3,59	28,88	2,68
iso C 16:0	0,23	0,07	0,33	0,10	0,37	0,06
iso C 17:0 + trans-9 C 16:1	0,39	0,06	0,40	0,05	0,47	0,06
cis-11 C 18:1	0,60	0,22	0,50	0,16	0,54	0,18
cis-15 C 18:1	0,09	0,03	0,10	0,03	0,11	0,05
trans-10 C 18:1	0,56	0,62	0,39	0,19	0,29	0,06
trans-11 C 18:1	0,85	0,21	0,89	0,25	1,27	0,44
cis-9, cis-12 C 18:2	2,50	0,37	1,92	0,53	1,76	0,32
trans-11, cis-15 C 18:2	0,03	0,02	0,04	0,02	0,11	0,17

Confrontando i valori in questo studio, quello che è possibile constatare è che la composizione del latte è abbastanza simile eccetto per alcuni acidi grassi. La Rendena presenta il minor contenuto in C 16:0 e trans-10 C 18:1 e il maggiore in trans-11 C 18:1 e trans-11, cis-15 C 18:2. La Pezzata Rossa Italiana mostra un profilo che si avvicina di più a quello della Frisona Italiana che alla Rendena.

La composizione in acidi grassi del latte mostra un'ampia variabilità, con il coefficiente di variabilità che può andare da un 10% fino a più del 150%, specialmente negli acidi grassi contenuti in piccole

quantità. Dato che l'obiettivo di questo lavoro è predire il CH<sub>4</sub>, questo tipo di variabilità è un punto positivo perché in metanalisi presenti in letteratura è riportato che questi costituenti del latte sono altamente variabili (Bougouin et al., 2019; van Lingen et al., 2014).

In Tabella 6 sono riportate le statistiche descrittive dei diversi fenotipi di CH<sub>4</sub> stimati con le equazioni nella totalità delle tre razze. La media di CH<sub>4</sub> *production* è risultata compresa tra 431,63 g/d e 419,58 g/d a seconda dell'equazione utilizzata. Per quanto riguarda il CH<sub>4</sub> *yield*, i valori si sono attestati in un range che va da 19,69 g/kg SS a 21,44 g/kg SS. Infine, l'*intensity* ha mostrato un range di variazione da 15,75 g/kg a 13,83 g/kg di latte. All'interno della stessa categoria di proxy, le equazioni utilizzate hanno fornito delle stime che, anche se con medie leggermente diverse tra di loro, non variano in maniera eccessiva.

Da notare come le equazioni utilizzate risultino più affidabili nel predire il CH<sub>4</sub> prodotto man mano che queste diventano più complesse. In Tabella 3 è evidenziato come un'equazione formata semplicemente dagli acidi grassi può essere migliorata inserendo all'interno altre caratteristiche come la composizione del latte. Questo è indice dello stretto rapporto che sussiste tra i vari componenti prodotti dalla bovina.

**Tabella 6.** Statistiche descrittive del metano predetto con le diverse equazioni.

Carattere <sup>1</sup>	Media	Deviazione Standard	Minimo	Massimo
CH <sub>4</sub> Production A (g/d)	431,63	34,90	329,40	524,90
CH <sub>4</sub> Production B (g/d)	428,96	52,78	269,40	582,80
CH <sub>4</sub> Production C (g/d)	419,58	55,42	252,80	572,10
CH <sub>4</sub> Yield A (g/kg SS)	19,69	1,74	14,13	24,71
CH <sub>4</sub> Yield B (g/kg SS)	21,44	3,30	12,75	29,82
CH <sub>4</sub> Intensity A (g/kg latte)	15,75	1,00	12,85	18,79
CH <sub>4</sub> Intensity B (g/kg latte)	15,16	1,13	11,66	17,82
CH <sub>4</sub> Intensity C (g/kg latte)	13,83	2,19	7,89	20,89

<sup>1</sup> CH<sub>4</sub> Production, CH<sub>4</sub> Yield e CH<sub>4</sub> Intensity calcolati con le equazioni riportate in Tabella 3.

I valori di CH<sub>4</sub> prodotto sono paragonabili con quanto riportato in altri importanti studi o review sull'argomento. Bougouin et al., (2019), con misurazioni effettuate con metodi diretti, riporta per *yield* e *intensity* valori molto simili a quanto trovato in questo studio, rispettivamente di 19,8 g/kg SS e 14,7 g/kg latte. Per quanto riguarda il *production* riporta un valore leggermente minore, 410,6 g/d. In Massaro et al. (2024) sono state utilizzate, oltre a equazioni provenienti da altri studi, le stesse

equazioni scelte in questo. I valori di *production* sono risultati molto più in linea rispetto al precedente studio citato (441- 428 g/d), in linea anche i valori di *yield* e *intensity*, rispettivamente di 20,2 g/kg SS e 16,1 g/kg latte.

## 4.2 Correlazioni

In Tabella 7 sono riportate le correlazioni di Pearson calcolate tra le diverse equazioni predittive e i principali caratteri del latte, inclusa la produzione giornaliera. Buona parte delle correlazioni è risultata significativa ( $P < 0,05$ ). La proteina ha mostrato una relativa indipendenza, mentre le SCS non sono risultate significative per 5 equazioni su 8. Le correlazioni, anche se significative, sono risultate per la quasi totalità dei rapporti abbastanza deboli, con alcune eccezioni importanti. La produzione giornaliera di latte è il carattere che mostra le correlazioni più forti e significative: infatti, è il fattore che per primo viene considerato quando si valuta l'emissione di CH<sub>4</sub> in ambito scientifico. Ad eccezione della prima equazione, la produzione mostra, con CH<sub>4</sub> *production* B e C, un forte legame positivo superando lo 0,70. Anche se leggermente minori, questi valori sono in linea con quanto riportato in Bittante & Cecchinato, 2020), ovvero un valore di 0,84. La maggiore produzione riflette una maggiore emissione di gas principalmente dovuta alla maggiore ingestione e quindi alla maggiore degradazione di biomassa da parte dei microrganismi del rumine (Bittante & Cecchinato, 2020). La correlazione negativa che è stata trovata tra la produzione di latte e il CH<sub>4</sub> *yield* e *intensity* sono in comune accordo con quanto trovato da Bougouin et al. (2019). Quando aumenta la resa in latte dell'animale, la produzione di CH<sub>4</sub> si diluisce abbassando così l'incidenza di emissione per litro di prodotto. Un animale più produttivo è sinonimo di efficienza e questo si traduce in un migliore utilizzo dell'alimento ingerito e quindi una riduzione del CH<sub>4</sub> *yield*. La selezione per una maggiore produzione di latte rende l'animale più efficiente riducendo l'intensità di CH<sub>4</sub> (g/kg latte), ma fa aumentare la quota di gas prodotto giornalmente dall'animale. L'inclusione però del CH<sub>4</sub> *production* nel programma di selezione porterebbe a una riduzione del progresso genetico a causa dell'introduzione di un indice con correlazione genetica positiva tra i due caratteri e quindi sfavorevole allo scopo finale (Bittante & Cecchinato, 2020).

Sia il grasso che la proteina del latte mostrano una relazione positiva, seppur non molto forte, con tutti i caratteri di emissione del CH<sub>4</sub>. Questo è in linea con quanto trovato da Bougouin et al. (2019), ma in contrasto con quanto riportato in Bittante & Cecchinato (2020). Infatti, in questo ultimo studio le uniche relazioni significative sono state con il CH<sub>4</sub> *yield* e di tipo negativo e forte (-0.64 e -0.53 per grasso e proteina). La natura di questa discrepanza è difficile da comprendere, ma probabilmente, avendo utilizzato altre equazioni, il rapporto può cambiare. Si può notare come la relazione che il grasso e la proteina hanno con l'equazione C del CH<sub>4</sub> *intensity* sia molto forte. Questo viene spiegato

dal fatto che il tenore lipidico e proteico del latte è un fattore che è stato inserito all'interno della formula e quindi ha un ruolo fondamentale nella predizione.

**Tabella 7.** Correlazioni di Pearson tra i caratteri latte qualità e i diversi fenotipi di CH<sub>4</sub> (Production, Yield and Intensity)<sup>1</sup>, con le relative significatività<sup>2</sup>.

Carattere	CH <sub>4</sub> Production A (g/d)	CH <sub>4</sub> Production B (g/d)	CH <sub>4</sub> Production C (g/d)	CH <sub>4</sub> Yield A (g/kg SS)	CH <sub>4</sub> Yield B (g/kg SS)	CH <sub>4</sub> Intensity A (g/kg latte)	CH <sub>4</sub> Intensity B (g/kg latte)	CH <sub>4</sub> Intensity C (g/kg latte)
Latte, kg/d	0,02 ( <i>ns</i> )	0,79 ***	0,71 ***	-0,61 ***	-0,66 ***	-0,57 ***	-0,63 ***	-0,28 ***
Grasso, %	0,16 ***	-0,03 ( <i>ns</i> )	0,37 ***	0,26 ***	0,16 ***	0,21 ***	0,14 ***	0,85 ***
Proteina, %	0,16 ***	-0,10 *	-0,02 ( <i>ns</i> )	0,13 ***	-0,03 ( <i>ns</i> )	0,15 ***	0,07 ( <i>ns</i> )	0,64 ***
Lattosio, %	-0,12 **	-0,11 **	-0,14 ***	0,03 ( <i>ns</i> )	0,15 ***	0,08 *	0,17 ***	-0,34 ***
Caseina, %	0,19 ***	-0,10 **	0,00 ( <i>ns</i> )	0,16 ***	0,01 ( <i>ns</i> )	0,17 ***	0,08 *	0,65 ***
SCS, score	-0,08 *	-0,08 *	-0,04 ( <i>ns</i> )	-0,01 ( <i>ns</i> )	0,02 ( <i>ns</i> )	0,04 ( <i>ns</i> )	0,04 ( <i>ns</i> )	0,21 ***
Urea, mg/dL	0,01 ( <i>ns</i> )	0,10 **	0,14 ***	-0,07 *	-0,14 ***	-0,05 ( <i>ns</i> )	-0,19 ***	0,06 **

<sup>1</sup> CH<sub>4</sub> Production, CH<sub>4</sub> Yield e CH<sub>4</sub> Intensity calcolati con le equazioni riportate in Tabella 3.

<sup>2</sup> \*\*\**P*<0,001, \*\**P*<0,01, \**P*<0,05, *ns* non significativo.

Il contenuto di cellule somatiche non è risultato un fattore legato strettamente alla produzione di CH<sub>4</sub>. Interessante è notare che l'unica relazione altamente significativa esiste con il CH<sub>4</sub> *intensity* C, dove al cui interno troviamo oltre agli acidi grassi, grasso e proteina anche il lattosio contenuto nel latte. Quindi, probabilmente, è proprio il rapporto che sussiste tra quest'ultimo nutriente e le cellule somatiche la causa di questa significatività. Infatti, esiste uno stretto legame tra il lattosio e le cellule somatiche (Alessio et al., 2021; Cinar et al., 2015). Se la ghiandola mammaria va incontro ad un'infezione, la produzione del latte ne risente: la produzione cala, si nota un incremento delle cellule somatiche e un decremento del contenuto di lattosio. Si può notare che nel CH<sub>4</sub> *intensity* C, l'SCS

mostra una relazione positiva, ma lattosio e resa in latte sono all'opposto, avvalorando quanto appena descritto.

### 4.3 Analisi della varianza

**Tabella 8.** Valore F calcolato e significatività<sup>1</sup> degli effetti fissi per i diversi caratteri di metano.

Carattere <sup>2</sup>	Stadio di lattazione	Ordine di parto	Razza	Razza*Stadio di lattazione	Razza*Ordine di parto
CH <sub>4</sub> Production A (g/d)	17,01***	4,82 **	1,35	2,85 **	0,15
CH <sub>4</sub> Production B (g/d)	15,92***	15,06***	10,41 **	2,51 **	0,85
CH <sub>4</sub> Production C (g/d)	8,13***	12,66***	7,62 **	2,95 **	0,58
CH <sub>4</sub> Yield A (g/kg SS)	16,81***	0,09	11,52 **	1,16	0,31
CH <sub>4</sub> Yield B (g/kg SS)	15,16***	0,54	12,16 **	1,98 *	0,66
CH <sub>4</sub> Intensity A (g/kg latte)	13,29***	0,58	5,68 *	1,43	0,39
CH <sub>4</sub> Intensity B (g/kg latte)	4,99***	0,44	4,52 *	1,04	0,47
CH <sub>4</sub> Intensity C (g/kg latte)	34,75***	1,04	0,08	2,69 **	0,29

<sup>1</sup> \*\*\* $P < 0,001$ , \*\* $P < 0,01$ , \* $P < 0,05$ .

<sup>2</sup> CH<sub>4</sub> Production, CH<sub>4</sub> Yield e CH<sub>4</sub> Intensity calcolati con le equazioni riportate in Tabella 3.

In Tabella 8 sono riportati i valori F e i livelli di significatività degli effetti fissi considerati nell'analisi della varianza. Si può notare come l'effetto dello stadio di lattazione risulti significativo per tutte le equazioni considerate, con un valore F compreso tra 4,99 e 34,75. Quando si considera anche la razza per valutare eventuali relazioni con lo stadio di lattazione, il numero di interazioni significative si riduce. La significatività è presente in tutte le equazioni che stimano il CH<sub>4</sub> *production* e solo nell'equazione C per il CH<sub>4</sub> *intensity*. Anche per il CH<sub>4</sub> *yield* B è rilevabile una significatività, seppur debole. L'effetto ordine di parto mostra relazioni significative solo con la CH<sub>4</sub> *production*, mentre l'interazione tra razza e ordine di parto non risulta statisticamente significativa. La razza mostra significatività moderate nelle equazioni B e C del CH<sub>4</sub> *production* e in entrambe le equazioni relative allo *yield*. Al contrario, le relazioni tra razza e il CH<sub>4</sub> *intensity* sono deboli e presenti solo nelle prime due equazioni.

### 4.4 Effetto razza

In Tabella 9 sono riportate le medie stimate per i diversi caratteri di CH<sub>4</sub> calcolati nelle diverse razze.

**Tabella 9.** Medie stimate (LSM) ed errore standard (ES) dei caratteri di CH<sub>4</sub> per l'effetto razza. Le lettere entro carattere indicano medie significativamente diverse fra loro (*post hoc* test di Bonferroni,  $P < 0,05$ ).

Carattere <sup>1</sup>	Frisona Italiana		Pezzata Rossa Italiana		Rendena	
	LSM	ES	LSM	ES	LSM	ES
CH <sub>4</sub> Production A (g/d)	430,00 <sup>a</sup>	5,85	447,00 <sup>a</sup>	8,89	430,00 <sup>a</sup>	10,19
CH <sub>4</sub> Production B (g/d)	452,00 <sup>a</sup>	7,95	437,00 <sup>a</sup>	12,06	379,00 <sup>b</sup>	13,84
CH <sub>4</sub> Production C (g/d)	446,00 <sup>a</sup>	9,17	416,00 <sup>ab</sup>	13,9	378,00 <sup>b</sup>	15,94
CH <sub>4</sub> Yield A (g/kg SS)	18,60 <sup>b</sup>	0,31	20,60 <sup>a</sup>	0,46	21,20 <sup>a</sup>	0,53
CH <sub>4</sub> Yield B (g/kg SS)	19,50 <sup>b</sup>	0,63	21,30 <sup>b</sup>	0,94	25,70 <sup>a</sup>	1,09
CH <sub>4</sub> Intensity A (g/kg latte)	15,20 <sup>b</sup>	0,21	16,30 <sup>b</sup>	0,32	16,30 <sup>b</sup>	0,32
CH <sub>4</sub> Intensity B (g/kg latte)	15,50 <sup>b</sup>	0,28	15,50 <sup>ab</sup>	0,43	16,40 <sup>a</sup>	0,61
CH <sub>4</sub> Intensity C (g/kg latte)	13,80 <sup>a</sup>	0,39	14,00 <sup>a</sup>	0,60	13,70 <sup>a</sup>	0,69

<sup>1</sup> CH<sub>4</sub> Production, CH<sub>4</sub> Yield e CH<sub>4</sub> Intensity calcolati con le equazioni riportate in Tabella 3.

Al momento della stesura di questo lavoro, non sono presenti in letteratura equazioni predittive specifiche per ciascuna razza, sviluppate tenendo conto delle differenze tra di esse. Solitamente, gli animali utilizzati come modello di riferimento per la costruzione delle varie equazioni appartengono alla razza Frisona (Bougouin et al., 2019; van Lingen et al., 2014), la più studiata in quanto altamente produttiva e ampiamente allevata a livello globale. La fisiologia animale viene generalmente considerata uniforme tra le razze; le uniche differenze prese in considerazione riguardano le caratteristiche fisiche dell'animale e quelle produttive.

Per quanto riguarda il fenotipo *production*, tralasciando la prima equazione che non è risultata significativa, si può notare come la produzione media giornaliera di CH<sub>4</sub> sia statisticamente differente tra le tre razze. La Frisona Italiana è la razza che mostra le maggiori emissioni, arrivando a produrre fino al 17% di CH<sub>4</sub> in più rispetto alla Rendena, quella che produce meno CH<sub>4</sub>. La Pezzata Rossa Italiana si colloca in modo intermedio tra le due, ma con una tendenza ad essere più simile alla Frisona Italiana che alla Rendena. La produzione di CH<sub>4</sub> è correlata positivamente con la quantità di sostanza secca che assume l'animale, maggiore è la quantità di alimento che entra nel rumine e maggiore sarà l'attività dei microrganismi con una conseguente produzione di CH<sub>4</sub>. Gli animali più produttivi sono anche gli animali con la maggiore capacità di ingestione perché questa deve sostenere la formazione di tutte le sostanze presenti nel latte. Le differenti emissioni rispecchiano chiaramente le

caratteristiche delle diverse razze. La Frisona è un animale molto produttivo che ha un'alta capacità di ingestione e di conseguenza produce la più alta quantità di CH<sub>4</sub>. Al contrario, la Rendena è un animale che non è stato selezionato per un'elevata produzione di latte, è più rustico e ha minore capacità di ingestione che porta ad una minore emissione di gas. La Pezzata Rossa Italiana, allo stesso tempo, ha subito negli anni un programma di selezione per innalzare le medie giornaliere di latte, ma non in egual maniera rispetto alla Frisona Italiana (Tabella 4).

Osservando il fenotipo *yield* e *intensity*, si può notare come l'andamento sia invertito rispetto a quanto analizzato in *production*. In tutti e due i fenotipi, la Frisona Italiana è la razza con la minore quantità di CH<sub>4</sub> emessa per kg di fattore considerato. La Pezzata Rossa Italiana è intermedia e la Rendena è caratterizzata dalla maggiore emissione. Tra la razza con le minori o le maggiori emissioni non corrono poi così grandi variazioni, 2-5 g/kg SS per *yield* e 1-2 g/kg latte per *intensity*, ma risultano comunque significative e importanti dal punto di vista del prodotto finale. Quello che ci si aspetta è che più un animale è produttivo e minore è il suo impatto nell'ambiente. Un'alta produzione di latte richiede molta energia che deve provenire dall'esterno e quindi molta sostanza secca ingerita. C'è da considerare che gli animali più spinti verso il latte di solito vengono alimentati con diete a più alto contenuto di concentrati per far in modo di esprimere al massimo le loro capacità. Le razze più produttive hanno quindi una maggiore ingestione di alimento. Eppure, per unità di sostanza secca ingerita, l'emissione di CH<sub>4</sub> è minore grazie al diverso equilibrio creato nelle popolazioni microbiche al diminuire dei carboidrati strutturali nella dieta. Di conseguenza anche l'incidenza del gas per litro di latte diminuisce a causa della migliore efficienza del sistema. Ed è per questo che la Frisona mostra livelli di emissioni minori rispetto alle altre razze. Si capisce a questo punto che le differenze che si possono notare sono date maggiormente dalle caratteristiche dell'alimento e dal livello produttivo, piuttosto che dalle peculiarità intrinseche delle razze.

Interessante notare è anche la variabilità all'interno dei tratti produttivi del CH<sub>4</sub> tra le razze e quindi di conseguenza la differenza che esiste tra queste. La Frisona Italiana è la razza che mostra la minore variabilità nelle medie stimate per tutti i fenotipi calcolati, seguono la Pezzata Rossa Italiana e la Rendena con i valori maggiori. Questa situazione è la cartina tornasole di come la selezione genetica porti ad ottenere degli animali molto più costanti nelle loro caratteristiche e più omogenei. In razze autoctone, come la Rendena, poco sviluppate e ancora legate a una biodiversità intrinseca della razza, si può osservare molta più variabilità che può essere un problema per la gestione in allevamento, ma che è anche il motore di tutto il sistema della conservazione e della tutela delle razze storiche.

## 4.5 Effetto dello stadio di lattazione

In Tabella 10 sono riportate le medie stimate dei diversi fenotipi di CH<sub>4</sub> studiati durante la lattazione. Analizzando il CH<sub>4</sub> *production*, è possibile osservare come all'inizio della lattazione l'emissione di CH<sub>4</sub> sia bassa per poi crescere ed avere un picco corrispondente alla terza classe (106-155 DIM) e successivamente diminuire fino al momento dell'asciutta con valori simili a quelli di inizio lattazione. Questo andamento parabolico è in linea con quanto già riportato in letteratura. Come ci aspettavamo, la curva che spiega l'evoluzione del CH<sub>4</sub> durante la lattazione è simile a quella della produzione giornaliera con un picco posticipato nel tempo. Tutto ciò è dovuto dalla diversa quantità di sostanza secca che assume l'animale dal parto in poi. Come è conosciuto, l'assunzione di alimento non segue la produzione del latte. Specialmente in vacche molto produttive, nel primo periodo di lattazione la vacca non riesce ad assorbire con l'alimento la quantità di energia necessaria a rimpiazzare quella che perde con la secrezione del latte portando l'animale in uno stato di bilancio energetico negativo (Bach, 2019). Questo stato metabolico costringe l'animale a usare le proprie riserve corporee per mantenere efficiente il metabolismo. L'assunzione di alimento incrementa lentamente fino a raggiungere un picco, tra i 40 e gli 80 giorni, decretando di fatto il passaggio ad un bilancio energetico positivo che consente all'animale di ricostituire le proprie riserve (Harder et al., 2019). Come già descritto precedentemente, la quantità di sostanza secca ingerita è un parametro chiave che influisce sulla produzione giornaliera di CH<sub>4</sub>. Gran parte dell'energia assunta viene indirizzata per sostenere la produzione e per questo motivo esiste una stretta relazione tra la quantità di latte prodotto e l'emissione di CH<sub>4</sub> giornaliero (Martínez-Marín et al., 2023). La correlazione tra questi due caratteri è stata valutata essere pari circa a 68%, quindi abbastanza forte (Hristov et al., 2018).

**Tabella 10.** Medie stimate (LSM) ed errore standard (ES) per i diversi caratteri di CH<sub>4</sub> nei diversi stadi di lattazione (DIM). Lettere diverse entro carattere indicano medie significativamente diverse fra loro (*post hoc* test di Bonferroni,  $P < 0,05$ ).

Carattere <sup>1</sup>	5-55 DIM		56-105 DIM		106-155 DIM		156-205 DIM		206-255 DIM		>255 DIM	
	LSM	ES	LSM	ES	LSM	ES	LSM	ES	LSM	ES	LSM	ES
CH <sub>4</sub> Production A (g/d)	414,00 <sup>c</sup>	5,69	436,00 <sup>b</sup>	5,40	444,00 <sup>ab</sup>	5,42	446,00 <sup>a</sup>	5,21	441,00 <sup>ab</sup>	6,12	434,00 <sup>b</sup>	5,42
CH <sub>4</sub> Production B (g/d)	411,00 <sup>b</sup>	7,58	434,00 <sup>a</sup>	7,25	437,00 <sup>a</sup>	7,29	430,00 <sup>a</sup>	7,02	421,00 <sup>ab</sup>	8,11	404,00 <sup>b</sup>	7,28
CH <sub>4</sub> Production C (g/d)	399,00 <sup>b</sup>	8,71	422,00 <sup>a</sup>	8,34	424,00 <sup>a</sup>	8,37	420,00 <sup>a</sup>	8,08	413,00 <sup>ab</sup>	9,31	401,00 <sup>b</sup>	8,35
CH <sub>4</sub> Yield A (g/kg SS)	19,40 <sup>d</sup>	0,28	19,90 <sup>c</sup>	0,27	20,20 <sup>bc</sup>	0,27	20,40 <sup>ab</sup>	0,26	20,30 <sup>abc</sup>	0,29	20,50 <sup>a</sup>	1,27
CH <sub>4</sub> Yield B (g/kg SS)	21,50 <sup>c</sup>	0,53	22,10 <sup>b</sup>	0,53	22,40 <sup>ab</sup>	0,53	22,50 <sup>a</sup>	0,53	22,40 <sup>ab</sup>	0,54	22,40 <sup>ab</sup>	0,53
CH <sub>4</sub> Intensity A (g/kg latte)	15,60 <sup>d</sup>	0,19	15,80 <sup>cd</sup>	0,18	15,90 <sup>bcd</sup>	0,18	16,00 <sup>b</sup>	0,18	16,10 <sup>abc</sup>	0,19	16,20 <sup>a</sup>	0,18
CH <sub>4</sub> Intensity B (g/kg latte)	15,30 <sup>b</sup>	0,27	15,40 <sup>b</sup>	0,27	15,40 <sup>bc</sup>	0,27	15,50 <sup>ab</sup>	0,27	15,50 <sup>ab</sup>	0,29	15,60 <sup>a</sup>	0,27
CH <sub>4</sub> Intensity C (g/kg latte)	12,80 <sup>c</sup>	0,38	13,10 <sup>c</sup>	0,36	13,20 <sup>c</sup>	0,36	14,10 <sup>c</sup>	0,35	14,40 <sup>b</sup>	0,40	15,40 <sup>a</sup>	0,36

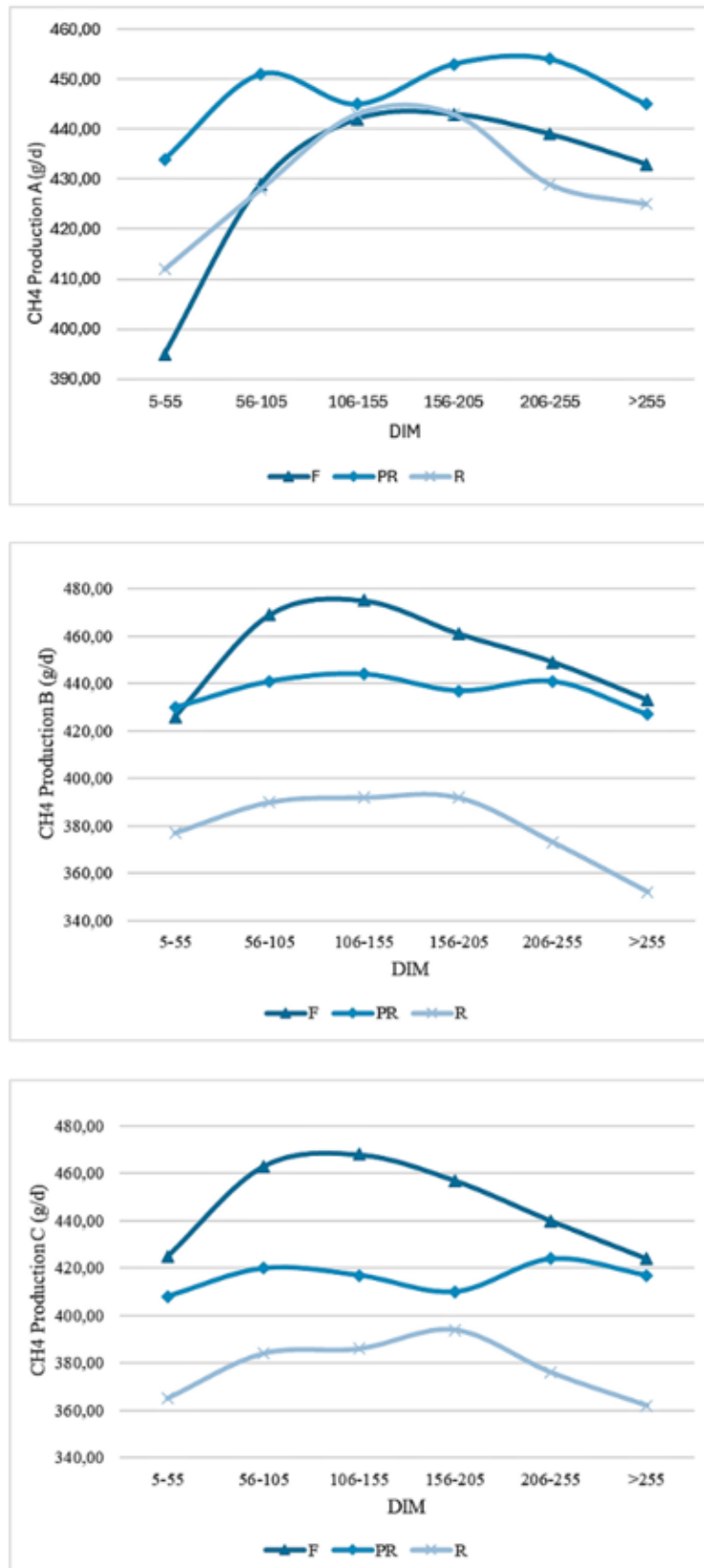
<sup>1</sup> CH<sub>4</sub> Production, CH<sub>4</sub> Yield e CH<sub>4</sub> Intensity calcolati con le equazioni riportate in Tabella 3.

Osservando la Figura 10, che riporta le medie stimate per i caratteri di *CH<sub>4</sub> production* calcolati attraverso lo stadio di lattazione nelle tre razze, possiamo notare come nella Frisona Italiana il picco di emissione del gas si colloca all'incirca tra la seconda e la terza classe di DIM. In questo studio non abbiamo analizzato l'andamento della produzione del latte, ma quanto trovato è in contrasto con quanto riportato in Martínez-Marín et al. (2024). Questi autori hanno stimato un picco di produzione di latte a circa 37 giorni dopo il parto e un picco di *CH<sub>4</sub> production* a 53 giorni dopo il parto in animali di razza Frisona Italiana e derivanti da incrocio a tre vie. Sono più in linea con i nostri risultati i valori riportati da Bittante et al. (2018), con un picco posizionato attorno al 90° giorno di lattazione. In Martínez-Marín et al. (2024) i caratteri di *CH<sub>4</sub>* sono stati stimati utilizzando la spettroscopia a infrarosso trasformata di Fourier (FTIR) e non con il contenuto in acidi grassi. Con questa tecnica viene predetta la produzione di gas a partire dagli spettri del latte senza passare per l'analisi degli acidi grassi. È una tecnica più veloce ma che trova difficoltà a fornire delle informazioni quantitative adeguate necessarie per stimare il *CH<sub>4</sub> production* (Martínez-Marín et al., 2023). Per questo motivo si possono ottenere dei valori medi tra i due metodi molto lontani che rende la comparazione abbastanza inaffidabile. Inoltre, le produzioni giornaliere di *CH<sub>4</sub>* sono influenzate dall'ingestione di sostanza secca che è direttamente collegata al livello di produttività dell'animale e il suo stato metabolico e al tipo di alimentazione utilizzato in azienda (Martínez-Marín et al., 2023; Ross et al., 2014). Più l'animale arriva al parto impreparato e maggiore sarà il tempo necessario per ristabilire l'equilibrio metabolico dell'organismo. Questo causa una più lenta crescita dell'ingestione che può spiegare picchi tardivi nella curva del carattere *CH<sub>4</sub> production*. Molto importante è anche l'effetto stalla sull'evoluzione dello stato dell'animale. Anche con lo stesso sistema di allevamento, la differenza tra mandrie di stalle differenti può spiegare dal 50% al 60% della variazione dei caratteri *CH<sub>4</sub> yield e intensity* e attorno a circa il 30% per quanto riguarda il fenotipo *production* (Bittante et al., 2018).

In Figura 10 si può osservare che la Frisona Italiana mantiene un andamento di emissione maggiore rispetto alla Pezzata Rossa Italiana, e a sua volta quest'ultima rispetto alla Rendena. Questo dimostra molto bene quanto le diverse ingestioni di sostanza secca influiscono sulla produzione di *CH<sub>4</sub>* giornaliero. Il trend della Pezzata Rossa Italiana è simile a quello della Frisona Italiana con un andamento però più appiattito. Infatti, le produzioni di *CH<sub>4</sub>* a inizio e fine lattazione sono simili, con la sola differenza che la Frisona Italiana produce un picco molto maggiore. Anche la Rendena mostra un andamento prima decrescente, un picco, e poi una decrescita a fine lattazione. Ma, il punto di massima emissione di gas si ha più tardivamente nella lattazione, 50-60 giorni dopo rispetto alle altre due razze. Probabilmente, essendo una razza più rustica e meno produttiva, l'ingestione di sostanza secca non subisce grossi picchi all'inizio della lattazione ma si protrae nel

tempo, indice di una produzione di latte che avviene in modo più costante. Una situazione più complessa si verifica osservando le stime del fenotipo *CH<sub>4</sub> production A*. L'andamento è simile alle altre curve descritte precedentemente ma con la Frisona Italiana che mostra emissioni minori rispetto alle altre razze. In questo caso, si presume che non ci sia una vera motivazione fisiologica che giustifichi questa situazione ma che la causa sia il tipo di equazione utilizzata. Quest'ultima si basa solo sulle quantità di acidi grassi presenti nel latte, senza tener conto di altre variabili come la produzione di latte presente nelle altre due. Questo potrebbe giustificare la difficoltà dell'equazione di seguire l'evoluzione fisiologica della bovina durante la lattazione, soprattutto per quanto riguarda il livello di ingestione.

**Figura 10.** Medie stimate per i caratteri di *CH<sub>4</sub> production* calcolati con le equazioni riportate in Tabella 3 dell'interazione razza (F= Frisona Italiana, PR= Pezzata Rossa Italiana, R = Rendena) per stadio di lattazione (DIM).

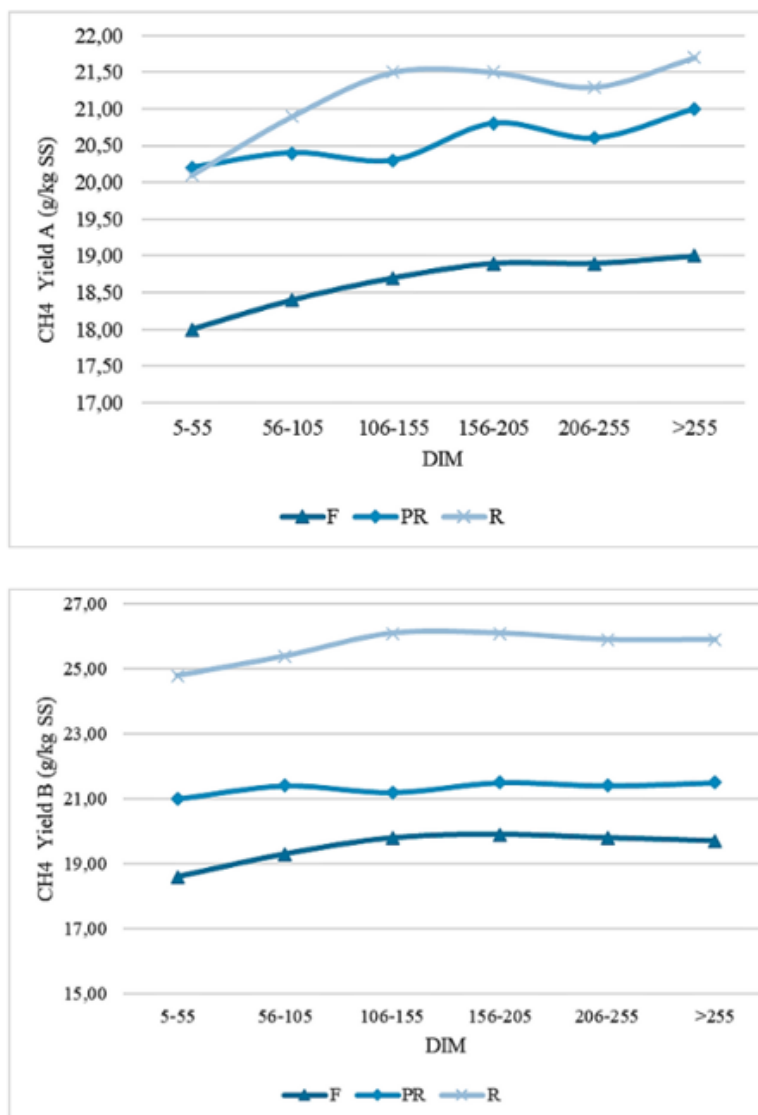


In generale, l'andamento del fenotipo  $\text{CH}_4$  *yield* (Tabella 10) è di tipo crescente, con valori minimi appena dopo il parto che via via incrementano con il proseguire della lattazione. Le medie maggiori si hanno da metà lattazione in poi. Le due equazioni, anche se hanno fornito delle stime leggermente diverse in termini quantitativi, sono molto in linea tra loro stesse. Quanto trovato in questo lavoro è in contrasto con quanto riportato in Martinez-Marin et al. (2024) e Massaro et al. (2024). In questi studi viene riportato che non esiste significatività tra il fenotipo *yield* e i giorni di lattazione. Questo sta a significare che le emissioni secondo questo carattere non dovrebbero variare, ma rimanere pressoché costanti lungo tutta la lattazione. Se la dieta rimane costante dal parto all'asciutta, anche il  $\text{CH}_4/\text{kg SS}$  dovrebbe essere costante (Martínez-Marín et al., 2024). Le uniche variazioni si riscontrerebbero nel caso cui venissero somministrate razioni differenziate tra animali freschi e ad alta produzione e quelli in uno stadio più avanzato della lattazione. Questo perché, oltre al contenuto energetico, varierebbero in particolare il livello di sostanza secca e la sua digeribilità. Più in linea con i nostri risultati è quanto trovato da Stocco et al. (2018). Infatti, è riportato che questo fenotipo ha un andamento crescente e lineare, con una variazione tra il momento del parto e la fine lattazione di circa 2-3 g/kg SS, che si avvicina molto a quanto riportato in Tabella 10. In questo caso la variazione è attribuita a un progressivo aumento durante la lattazione di carboidrati strutturali che rallentano il transito ruminale e favoriscono il lavoro dei microbi, tra cui quelli metanogeni. Serve sottolineare anche che durante la lattazione l'efficienza di conversione dell'alimento non rimane la stessa. Infatti, questa diminuisce all'aumentare dei giorni di lattazione (Hurley et al., 2018). Si può quindi presumere che, al diminuire dell'efficienza, aumenti la quota di  $\text{CH}_4$  prodotto per kg di sostanza fermentata per via di un diverso rapporto concentrato/fibra che sussiste nella razione e una maggiore permanenza dell'alimento nel ruminale.

In Figura 11 sono riportati gli andamenti del fenotipo  $\text{CH}_4$  *yield* durante la lattazione nelle diverse razze esaminate. È possibile notare come tra le due equazioni i trend siano simili, anche se con qualche differenza in termini quantitativi delle stime effettuate. La Frisona Italiana è la razza che presenta la minore emissione di gas, seguita poi da Pezzata Rossa Italiana e Rendena. Questo differisce da quanto riportato da Martinez-Marin et al. (2024), dove viene riportato che l'emissione di  $\text{CH}_4$  calcolato sulla base della sostanza secca non presenta variazioni tra razze rilevabili. Una possibile causa di questa divergenza è la differenza nella composizione delle diete dei diversi animali. Probabilmente, gli allevamenti di razza Frisona utilizzavano diete con un maggiore contenuto di concentrati; al contrario, quelle di Rendena utilizzavano più foraggi provocando una maggiore emissione. Inoltre, maggiore è la quantità di alimento che l'animale ingerisce e maggiore è la quantità di  $\text{CH}_4$  prodotto, ma allo stesso tempo si riduce l'incidenza  $\text{CH}_4/\text{kg SS}$  (Jentsch et al., 2007). Animali più grandi con un'ingestione importante hanno delle emissioni calcolate con il

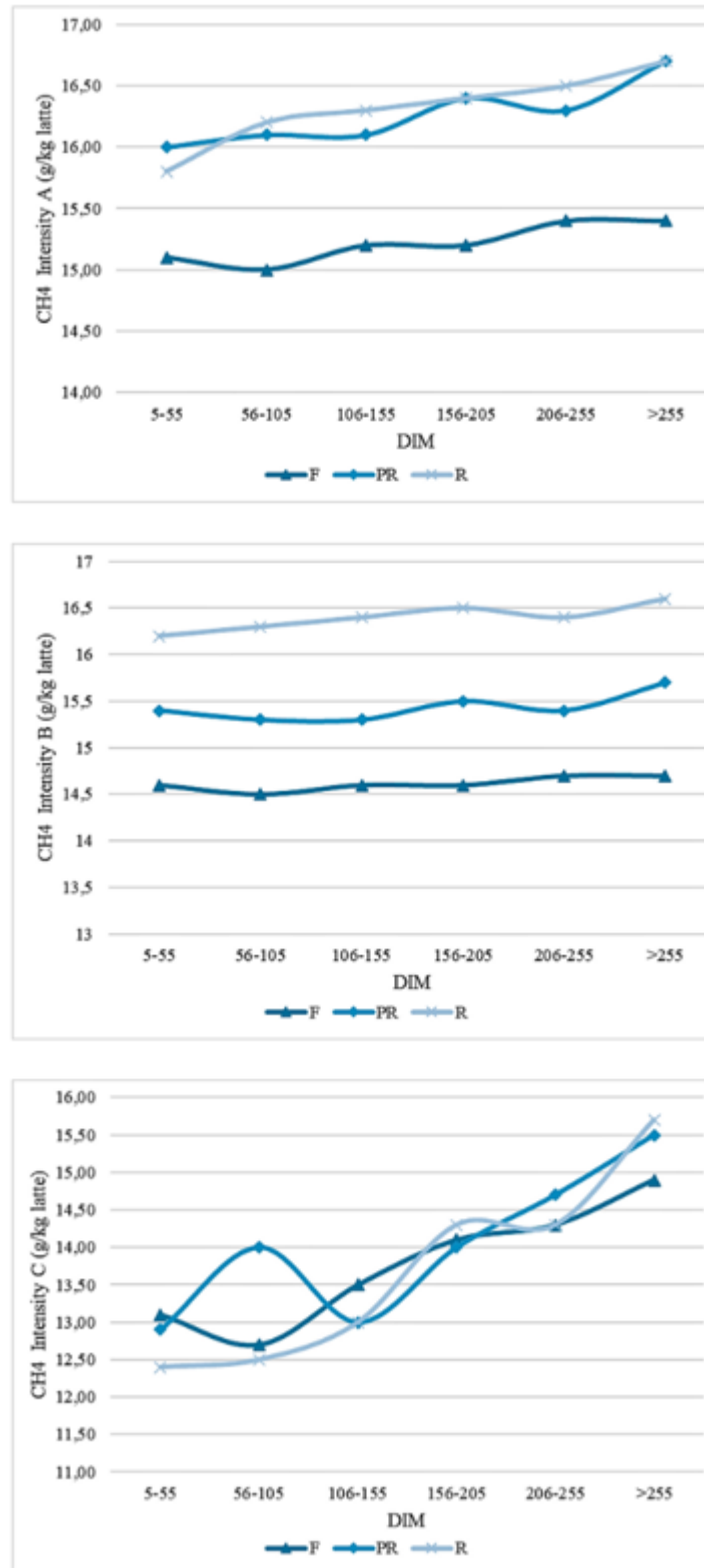
fenotipo *yield* più basse. Al momento non si conoscono in letteratura studi che riportano le diversità dei microrganismi ruminali nelle diverse razze e quindi non è possibile affermare con precisione che tutte e tre le razze hanno le stesse capacità di produzione di CH<sub>4</sub> sulla stessa unità di alimento ingerito. Per ora si considerano costanti e le uniche differenze da imputare sono a carico delle caratteristiche dell'alimento ingerito.

**Figura 11.** Medie stimate per i caratteri di *CH<sub>4</sub> yield* calcolati con le equazioni riportate in Tabella 3 dell'interazione razza (F= Frisone Italiana, PR= Pezzata Rossa Italiana, R = Rendena) per stadio di lattazione (DIM).



Per concludere, è possibile osservare le variazioni che subisce il  $\text{CH}_4$  *intensity* durante la lattazione (Tabella 10). Come per il fenotipo *yield*, l'andamento segue una tendenza crescente dal punto di minimo nella prima classe DIM fino a raggiungere il massimo nell'ultima classe. Le variazioni non sono enormi ma rientrano in range di 1-2 g/kg di latte durante tutta la lattazione. Questo tipo di evoluzione è in comune accordo con quanto viene riportato in letteratura (Bittante et al., 2018; Martínez-Marín et al., 2024). Leggera differenza si ha solo per la quantità di  $\text{CH}_4$  stimato ad inizio lattazione. Si può notare in Tabella 11 che appena dopo il parto la produzione si aggira sui 13-15 g/kg di latte a seconda dell'equazione utilizzata, al contrario, negli studi riportati precedentemente nel post-partum la produzione partiva era poco più di 10 g/kg di latte. Molto probabilmente questo carattere presenta una relazione inversamente proporzionale con la produzione giornaliera di latte. Ci si aspetta che questo carattere presenti il minimo dopo il parto, poi che mostri un andamento ascendente fino al picco di ingestione e rimanga poi stabile o cresca molto più lentamente (Kandel et al., 2017). Come sappiamo, all'inizio della lattazione la produzione latte è molto superiore rispetto a quanto la dieta riesca a sostenere e perciò parte del latte viene prodotto mobilitando le riserve corporee. Questo meccanismo non si riflette su una produzione maggiore di  $\text{CH}_4$  ed è per questo motivo che l'emissione è bassa appena dopo il parto. Successivamente, con il proseguo della lattazione, l'animale aumenta la quantità di alimento ingerita e si riduce l'escrezione di latte contribuendo così ad aumentare l'incidenza del  $\text{CH}_4$  per kg di prodotto. La curva ha una tendenza a crescere fino alla fine perché riflette la necessità dell'animale di ricostituire le riserve corporee perse precedentemente e preparare il corpo a una nuova gravidanza (Martínez-Marín et al., 2024; Massaro et al., 2024). Teoricamente, l'incidenza dell'emissione di  $\text{CH}_4$  per unità di prodotto durante il periodo di bilancio energetico negativo è superiore a quanto stimato. Questo perché, in tale fase, l'animale utilizza riserve corporee accumulate durante la lattazione precedente e il periodo di asciutta, quando non viene prodotto latte e la quantificazione del  $\text{CH}_4$  risulta impossibile. Va però considerato che, durante il periodo di asciutta, la vacca ingerisce una quantità relativamente modesta di alimento, contribuendo in misura limitata al bilancio totale delle emissioni di  $\text{CH}_4$ .

**Figura 12.** Medie stimate per i caratteri di  $CH_4$  intensity calcolati con le equazioni riportate in Tabella 3 dell'interazione razza (F= Frisona Italiana, PR= Pezzata Rossa Italiana, R = Rendena) per stadio di lattazione (DIM).



In Figura 12 sono riportati gli andamenti del fenotipo *intensity* stimato con le tre equazioni a disposizione. Le prime due equazioni mostrano delle stime che rispecchiano appieno quanto descritto in precedenza. Come riportato anche da Martinez-Marin et al. (2023), la Frisona Italiana presenta un'emissione minore rispetto alle altre razze. Al contrario la Rendena è quella che mostra le medie maggiori con la Pezzata Rossa Italiana che si posiziona su valori intermedi. Sussiste circa una differenza di circa 1,5-2 g/kg di latte tra la Frisona Italiana e la Rendena. Questo fenotipo è basato sull'unità di prodotto, ma segue comunque quella che è la curva di ingestione di sostanza secca, prima causa diretta della produzione di CH<sub>4</sub> nel ruminante. La Frisona è la razza più produttiva e la più efficiente a parità di alimento ingerito. C'è da aspettarsi che gli animali più produttivi presentino delle medie minori per questo fenotipo rispetto a quelli con produzione più modesta perché tutto il CH<sub>4</sub> che si forma si spalma su una maggiore quantità di latte. Questa è la principale causa delle differenze che si possono notare. In CH<sub>4</sub> *intensity* A non si notano grandi differenze tra Pezzata Rossa Italiana e Rendena. L'equazione utilizzata conteneva solo la composizione in acidi grassi e si presume che questi fossero molto simili e non in grado di evidenziare particolari diversità. Una situazione ancora più particolare è quella evidenziata in CH<sub>4</sub> *intensity* C, dove, ad eccezione di qualche movimento oscillatorio delle curve, l'andamento è sempre di tipo ascensionale in maniera molto più decisa dall'inizio alla fine della lattazione. Inoltre, si può osservare come le tre razze in questo caso non differiscono particolarmente in termini quantitativi nelle medie trovate.

## 4.6 Effetto ordine di parto

In Tabella 11 sono riportate le medie stimate dei diversi caratteri di CH<sub>4</sub> durante i diversi parti. Come è stato descritto nell'analisi della varianza, gli unici effetti statisticamente significativi si sono evidenziati solo per quanto riguarda il fenotipo *production*. Questi risultati sono in linea con quanto riportato in letteratura (Bittante et al., 2018; Massaro et al., 2024). Le variazioni negli altri caratteri, anche se presenti, sono minime e quindi non verranno analizzate.

**Tabella 11.** Medie stimate (LSM) ed errore standard (ES) dei caratteri di CH<sub>4</sub> nei diversi ordini di parto. Lettere diverse entro carattere indicano medie significativamente diverse fra loro (*post hoc* test di Bonferroni,  $P < 0,05$ ).

Carattere <sup>1</sup>	1		2		≥3	
	LSM	ES	LSM	ES	LSM	ES
CH <sub>4</sub> Production A (g/d)	431,00 <sup>b</sup>	5,12	439,00 <sup>a</sup>	5,19	437,00 <sup>ab</sup>	5,11
CH <sub>4</sub> Production B (g/d)	413,00 <sup>b</sup>	6,91	427,00 <sup>a</sup>	6,99	429,00 <sup>a</sup>	6,90
CH <sub>4</sub> Production C (g/d)	403,00 <sup>b</sup>	7,95	418,00 <sup>a</sup>	8,05	419,00 <sup>a</sup>	7,95
CH <sub>4</sub> Yield A (g/kg SS)	20,10 <sup>a</sup>	0,26	20,10 <sup>a</sup>	0,26	20,10 <sup>a</sup>	0,26
CH <sub>4</sub> Yield B (g/kg SS)	22,10 <sup>a</sup>	0,53	22,20 <sup>a</sup>	0,53	22,20 <sup>a</sup>	0,53
CH <sub>4</sub> Intensity A (g/kg latte)	16,00 <sup>a</sup>	0,18	15,90 <sup>a</sup>	0,18	15,90 <sup>a</sup>	0,18
CH <sub>4</sub> Intensity B (g/kg latte)	15,50 <sup>a</sup>	0,27	15,40 <sup>a</sup>	0,27	15,50 <sup>a</sup>	0,27
CH <sub>4</sub> Intensity C (g/kg latte)	13,80 <sup>a</sup>	0,34	14,00 <sup>a</sup>	0,35	13,70 <sup>a</sup>	0,34

<sup>1</sup> CH<sub>4</sub> Production, CH<sub>4</sub> Yield e CH<sub>4</sub> Intensity calcolati con le equazioni riportate in Tabella 3

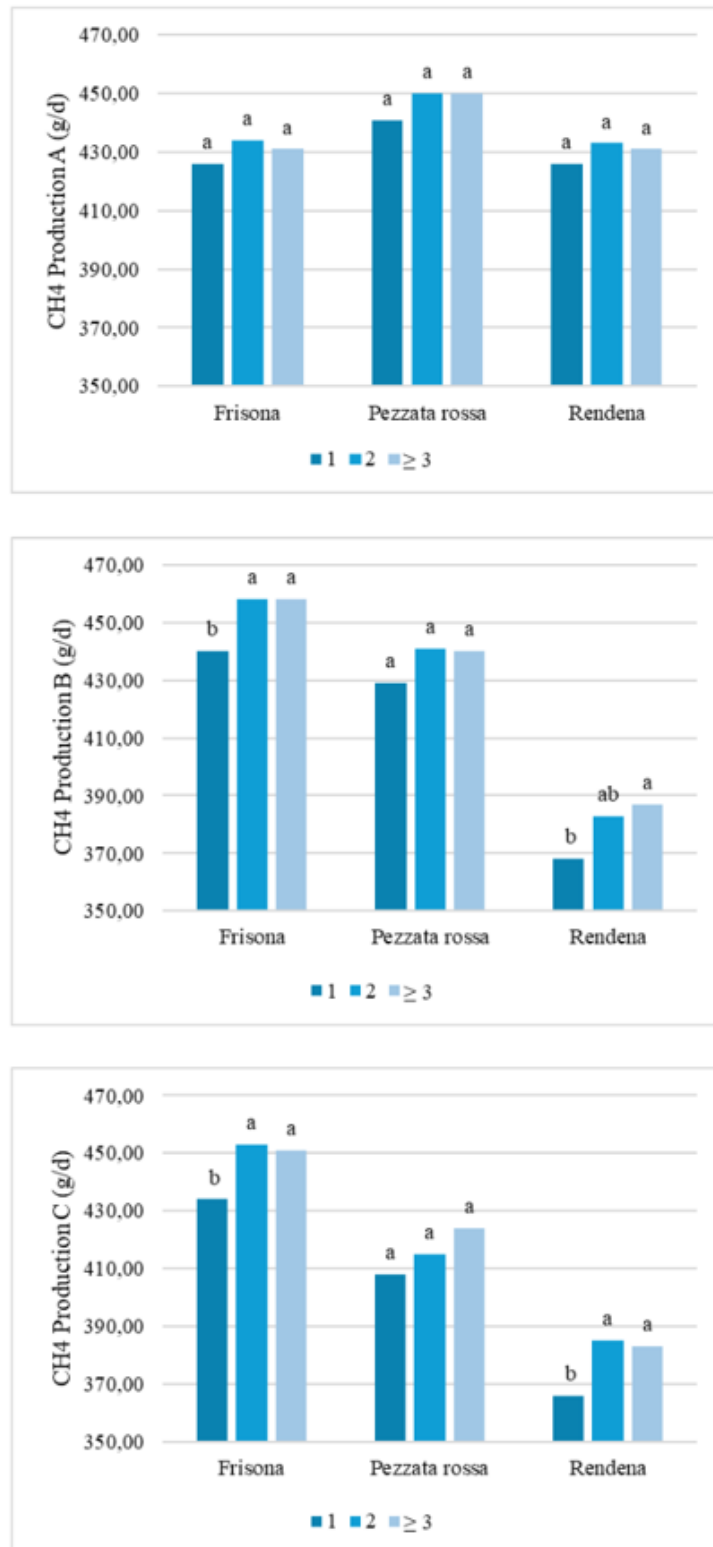
Per quanto riguarda gli effetti significativi, si può notare come l'emissione di CH<sub>4</sub> assuma un andamento ascendente dal primo parto in poi con una differenza importante tra il primo e il secondo. Infatti, dalla seconda lattazione in poi, le medie stimate attraverso i parti sono pressoché simili. L'effetto dell'ordine di parto è una conseguenza puramente quantitativa su quella che è la fisiologia dell'animale (Massaro et al., 2024). Con l'avanzare dell'età dell'animale e, quindi, con l'aumentare dei parti, specialmente tra il primo e il secondo, aumenta anche la sua ingestione di sostanza secca e di conseguenza la produzione in latte. La causa principale di questo andamento crescente è l'aumento dell'ingresso di alimento nel rumine che quindi causa una maggiore

emissione giornaliera di gas. Di solito le diete degli animali non vengono variate tra i parti, mantenendo così inalterata anche quello che è il pattern di fermentazione all'interno del rumine.

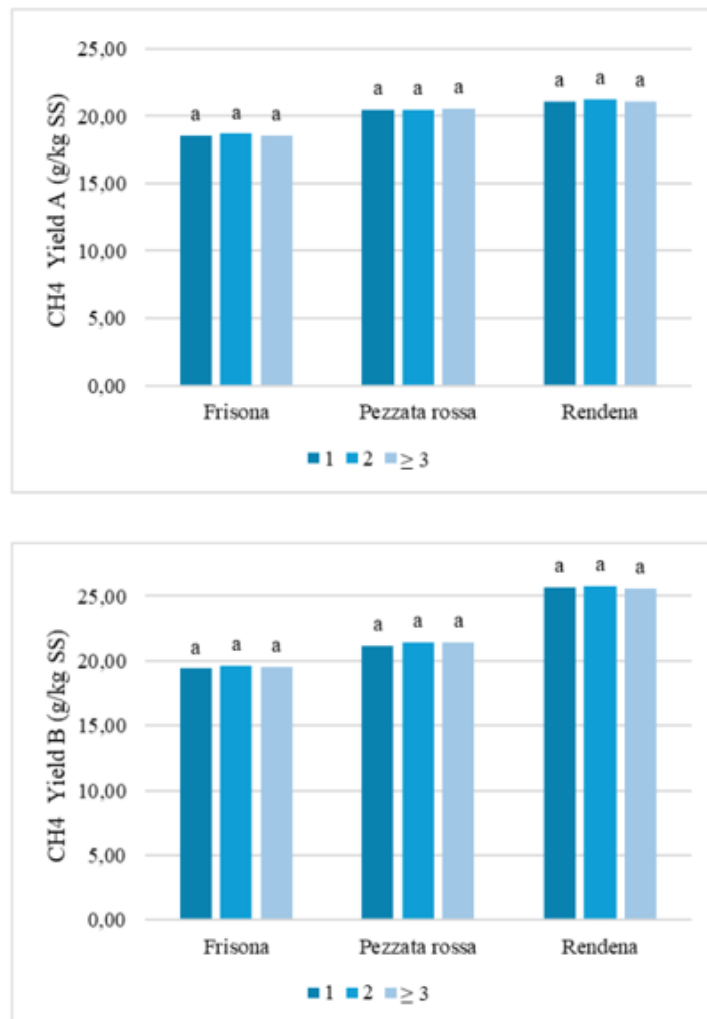
In Figura 13 sono riportate le medie stimate del fenotipo *production* per l'interazione razza e ordine di parto. Come riportato nell'analisi della varianza, questi effetti non sono risultati significativi, ma in questo fenotipo si possono notare delle tendenze. È possibile osservare che l'andamento per tutte e tre le razze rispecchia quanto descritto in precedenza. Il primo parto presenta la minore emissione media giornaliera di CH<sub>4</sub>, dal secondo parto in poi questa si mantiene su valori pressoché costanti.

Per i motivi riportati in precedenza, non si evidenziano variazioni significative nel fenotipo *yield* e *intensity*. Come è possibile osservare anche in Figura 14 e 15, le differenze sono talmente minime che non sono analizzabili.

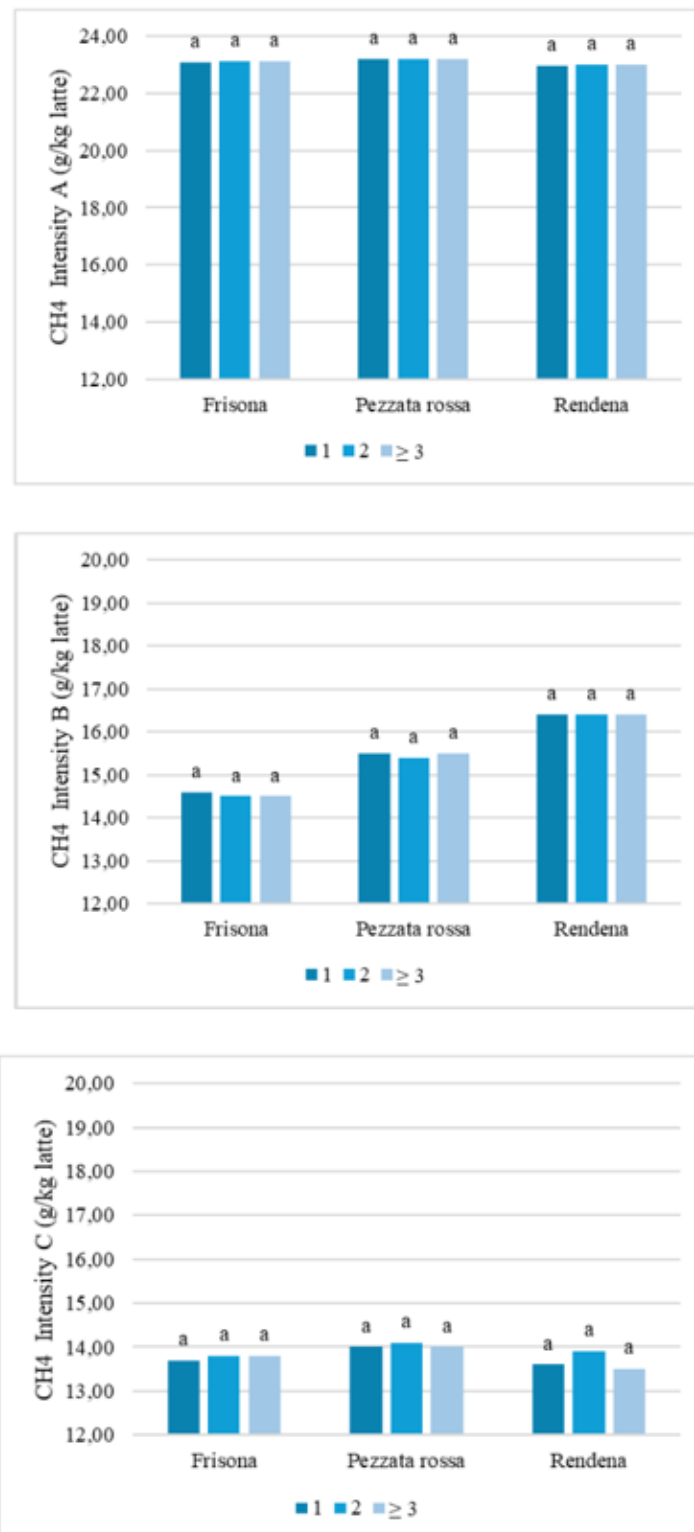
**Figura 13.** Medie stimate per i caratteri di *CH<sub>4</sub> production* calcolati con le equazioni riportate in Tabella 3 per l'interazione razza per ordine di parto. Lettere diverse entro razza indicano medie significativamente diverse fra loro (*post hoc* test di Bonferroni,  $P < 0,05$ ).



**Figura 14.** Medie stimate per i caratteri di  $CH_4$  yield calcolati con le equazioni riportate in tabella 3 per l'interazione razza per ordine di parto. Lettere diverse entro razza indicano medie significativamente diverse fra loro (posthoc test di Bonferroni,  $P < 0,05$ ).



**Figura 15.** Medie stimate per i caratteri di CH4 *intensity* calcolati con le equazioni riportate in tabella 3 per l'interazione razza per ordine di parto. Lettere diverse entro razza indicano medie significativamente diverse fra loro (posthoc test di Bonferroni,  $P < 0,05$ ).



## 5. CONCLUSIONI

In questo lavoro di tesi sono state analizzate le fonti di variazione delle emissioni di CH<sub>4</sub> in vacche di razza Frisona Italiana, Pezzata Rossa Italiana e Rendena. Queste tre razze sono state scelte perché rappresentano animali con differenti attitudini produttive, dalla più specializzata alla meno specializzata nella produzione di latte.

Le emissioni di CH<sub>4</sub> sono state stimate sulla base di diversi fenotipi utilizzando equazioni presenti in letteratura.

Lo stadio di lattazione è risultato l'unico effetto che ha mostrato significatività per tutti i fenotipi considerati, decretandosi come la più importante fonte di variazione del CH<sub>4</sub> nelle vacche da latte. L'ordine di parto è risultato significativo solo per il fenotipo *production*, mentre l'interazione razza per stadio di lattazione ha avuto delle significatività anche se non con tutti i caratteri considerati. Al contrario, l'interazione razza per ordine di parto non ha fornito alcuna associazione degna di nota. È stato quindi possibile affermare che le razze più produttive emettono più CH<sub>4</sub> giornalmente, poiché ingeriscono una maggiore quantità di sostanza secca, determinando un'attività ruminale più intensa. Tuttavia, il CH<sub>4</sub> emesso viene distribuito su una maggiore quantità di latte prodotto, riducendone così l'incidenza sul prodotto finale. Il minore impatto osservato anche in rapporto alla sostanza secca ingerita è attribuibile principalmente alle diverse caratteristiche della dieta nelle differenti razze.

Va sottolineato che questo è uno studio relativamente preliminare, poiché la letteratura sulla comparazione tra razze in termini di emissioni di CH<sub>4</sub> è ancora limitata. Inoltre, i modelli utilizzati per stimare le emissioni sono stati sviluppati specificamente per la razza Frisona Italiana. Si è quindi assunto che non vi siano grandi differenze fisiologiche sostanziali tra le razze considerate.

Le strategie volte a mitigare l'impatto ambientale dell'allevamento bovino da latte dovrebbero essere basate su una visione di insieme, in quanto numerosi sono i fattori che influenzano la produzione di CH<sub>4</sub> e molte potrebbero essere le conseguenze di una gestione non ottimale. Considerare la produzione giornaliera di CH<sub>4</sub> è sviante in quanto la sua riduzione porta inequivocabilmente a una minore produzione sul fronte latte e quindi una maggiore incidenza del gas emesso sul latte venduto. Per questi motivi, massimizzare l'efficienza dell'allevamento ed ottenere animali più produttivi per unità di alimento ingerito è la soluzione più corretta per ridurre l'impatto ambientale del settore.



# BIBLIOGRAFIA

- AIA- Associazione Italiana Allevatori. (2025). *Bollettino Online- Controlli sulla produttività del latte 2024*.
- Alessio, D. R. M., Velho, J. P., McManus, C. M., Knob, D. A., Vancin, F. R., Antunes, G. V., Busanello, M., De Carli, F., & Neto, A. T. (2021). Lactose and its relationship with other milk constituents, somatic cell count, and total bacterial count. *Livestock Science*, 252, 104678. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2021.104678>
- ANAFIBJ, A. N. A. della R. F. B. e J. I. (2025). *Medie Produzioni Nazionali Frisone 2024*.
- Bach, À. (2019). Effects of nutrition and genetics on fertility in dairy cows. *Reproduction, Fertility and Development*, 31(1), 40. <https://doi.org/10.1071/RD18364>
- Baldwin, R. L., & Connor, E. E. (2017). Rumen Function and Development. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 33(3), 427–439. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2017.06.001>
- Bannink, A., Kogut, J., Dijkstra, J., France, J., Kebreab, E., Van Vuuren, A. M., & Tamminga, S. (2006). Estimation of the stoichiometry of volatile fatty acid production in the rumen of lactating cows. *Journal of Theoretical Biology*, 238(1), 36–51. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2005.05.026>
- Basarab, J. A., Beauchemin, K. A., Baron, V. S., Ominski, K. H., Guan, L. L., Miller, S. P., & Crowley, J. J. (2013). Reducing GHG emissions through genetic improvement for feed efficiency: effects on economically important traits and enteric methane production. *Animal*, 7, 303–315. <https://doi.org/10.1017/S1751731113000888>
- 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>
- Bernard, L., Leroux, C., & Chilliard, Y. (2008). Expression and Nutritional Regulation of Lipogenic Genes in the Ruminant Lactating Mammary Gland. In *Bioactive Components of Milk* (pp. 67–108). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-74087-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-0-387-74087-4_2)
- Berton, M., Bittante, G., Sturaro, E., & Gallo, L. (2024). Thirty years of global warming potential evolution for the Italian dairy cow sector measured by two different metrics. *Italian Journal of Animal Science*, 23(1), 1002–1017. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2024.2373211>
- Bertram, R., Gram Pedersen, M., Luciani, D. S., & Sherman, A. (2006). A simplified model for mitochondrial ATP production. *Journal of Theoretical Biology*, 243(4), 575–586. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2006.07.019>
- Bittante, G. (2022). Effects of breed, farm intensiveness, and cow productivity on infrared predicted milk urea. *Journal of Dairy Science*, 105(6), 5084–5096. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21105>
- Bittante, G., Amalfitano, N., Cipolat-Gotet, C., Lombardi, A., Stocco, G., & Tagliapietra, F. (2022). Major Causes of Variation of External Appearance, Chemical Composition, Texture, and Color Traits of 37 Categories of Cheeses. *Foods*, 11(24), 4041. <https://doi.org/10.3390/foods11244041>
- Bittante, G., & Cecchinato, A. (2020). Heritability estimates of enteric methane emissions predicted from fatty acid profiles, and their relationships with milk composition, cheese-yield and body size and condition. *Italian Journal of Animal Science*, 19(1), 114–126. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2019.1698979>
- Bittante, G., Cecchinato, A., & Schiavon, S. (2018). Dairy system, parity, and lactation stage affect enteric methane production, yield, and intensity per kilogram of milk and cheese predicted from gas

- chromatography fatty acids. *Journal of Dairy Science*, *101*(2), 1752–1766.  
<https://doi.org/10.3168/jds.2017-13472>
- Bittante, G., & Cipolat-Gotet, C. (2018). Direct and indirect predictions of enteric methane daily production, yield, and intensity per unit of milk and cheese, from fatty acids and milk Fourier-transform infrared spectra. *Journal of Dairy Science*, *101*(8), 7219–7235.  
<https://doi.org/10.3168/jds.2017-14289>
- Bougouin, A., Appuhamy, J. A. D. R. N., Ferlay, A., Kebreab, E., Martin, C., Moate, P. J., Benchaar, C., Lund, P., & Eugène, M. (2019). Individual milk fatty acids are potential predictors of enteric methane emissions from dairy cows fed a wide range of diets: Approach by meta-analysis. *Journal of Dairy Science*, *102*(11), 10616–10631. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15940>
- Bunglavan, S. J. (2014). Methanogenesis and recent techniques for mitigation of methanogenesis in ruminants. In *Journal of Livestock Science* (Vol. 5).
- Chagunda, M. G. G., Ross, D., Rooke, J., Yan, T., Douglas, J.-L., Poret, L., McEwan, N. R., Teeranavattanakul, P., & Roberts, D. J. (2013). Measurement of enteric methane from ruminants using a hand-held laser methane detector. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A - Animal Science*, *63*(2), 68–75. <https://doi.org/10.1080/09064702.2013.797487>
- Cinar, M., Serbester, U., Ceyhan, A., & Gorgulu, M. (2015). Effect of Somatic Cell Count on Milk Yield and Composition of First and Second Lactation Dairy Cows. *Italian Journal of Animal Science*, *14*(1), 3646. <https://doi.org/10.4081/ijas.2015.3646>
- Consistenza Di Capi Bovini (2022).
- Cottle, D. J., Velazco, J., Hegarty, R. S., & Mayer, D. G. (2015). Estimating daily methane production in individual cattle with irregular feed intake patterns from short-term methane emission measurements. *Animal*, *9*(12), 1949–1957. <https://doi.org/10.1017/S1751731115001676>
- de Haas, Y., Pszczola, M., Soyeurt, H., Wall, E., & Lassen, J. (2017). Invited review: Phenotypes to genetically reduce greenhouse gas emissions in dairying. *Journal of Dairy Science*, *100*(2), 855–870. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11246>
- De Marchi, M., Toffanin, V., Cassandro, M., & Penasa, M. (2014). Invited review: Mid-infrared spectroscopy as phenotyping tool for milk traits. *Journal of Dairy Science*, *97*(3), 1171–1186. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6799>
- Demeyer, D. I., & C. J. van Nevel. (1975). Methanogenesis, an integrated part of carbohydrate fermentation and its control. In *Digestion and Metabolism in the Ruminant* (pp. 366–382).
- Dhakal, S., J.C. Minx, F.L. Toth, A. Abdel-Aziz, M.J. Figueroa Meza, K. Hubacek, I.G.C. Jonckheere, Yong-Gun Kim, G.F. Nemet, S. Pachauri, X.C. Tan, & T. Wiedmann. (2022). Emissions Trends and Drivers. In *IPCC, 2022: Climate Change 2022 - Mitigation of Climate Change. Contribution of Working Group III to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change: Vol.* (pp. 215–294). Cambridge University Press.  
<https://doi.org/10.1017/9781009157926.004>
- Dijkstra, J., van Zijderveld, S. M., Apajalahti, J. A., Bannink, A., Gerrits, W. J. J., Newbold, J. R., Perdok, H. B., & Berends, H. (2011). Relationships between methane production and milk fatty acid profiles in dairy cattle. *Animal Feed Science and Technology*, *166–167*, 590–595.  
<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.04.042>
- ELLIS, J. L., BANNINK, A., FRANCE, J., KEBREAB, E., & DIJKSTRA, J. (2010). Evaluation of enteric methane prediction equations for dairy cows used in whole farm models. *Global Change Biology*, *16*(12), 3246–3256. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2010.02188.x>

- ELLIS, J. L., DIJKSTRA, J., KEBREAB, E., BANNINK, A., ODONGO, N. E., McBRIDE, B. W., & FRANCE, J. (2008). Aspects of rumen microbiology central to mechanistic modelling of methane production in cattle. *The Journal of Agricultural Science*, 146(2), 213–233. <https://doi.org/10.1017/S0021859608007752>
- Enciclopedia treccani. (n.d.). *Metano*.
- FAO. (2021). *FAO Dairy Market Review 2021*.
- FAO. (2023). *Methane emissions in livestock and rice systems*. FAO. <https://doi.org/10.4060/cc7607en>
- Flis, S. A., & Wattiaux, M. A. (2005). Effects of Parity and Supply of Rumen-Degraded and Undegraded Protein on Production and Nitrogen Balance in Holsteins. *Journal of Dairy Science*, 88(6), 2096–2106. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72886-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72886-1)
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2024). *DAIRY MARKET REVIEW: Overview of global market developments in 2024*.
- Gardiner, T. D., Coleman, M. D., Innocenti, F., Tompkins, J., Connor, A., Garnsworthy, P. C., Moorby, J. M., Reynolds, C. K., Waterhouse, A., & Wills, D. (2015). Determination of the absolute accuracy of UK chamber facilities used in measuring methane emissions from livestock. *Measurement*, 66, 272–279. <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2015.02.029>
- Garnsworthy, P. C., Difford, G. F., Bell, M. J., Bayat, A. R., Huhtanen, P., Kuhla, B., Lassen, J., Peiren, N., Pszczola, M., Sorg, Diana., Visker, M. H. P. W., & Yan, T. (2019). Comparison of Methods to Measure Methane for Use in Genetic Evaluation of Dairy Cattle. *Animals*, 9(10), 837. <https://doi.org/10.3390/ani9100837>
- 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*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Global Warming Potential.
- Gonçalves, J. L., Cue, R. I., Botaro, B. G., Horst, J. A., Valloto, A. A., & Santos, M. V. (2018). Milk losses associated with somatic cell counts by parity and stage of lactation. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 4357–4366. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13286>
- Hammond, K. J., Crompton, L. A., Bannink, A., Dijkstra, J., Yáñez-Ruiz, D. R., O’Kiely, P., Kebreab, E., Eugène, M. A., Yu, Z., Shingfield, K. J., Schwarm, A., Hristov, A. N., & Reynolds, C. K. (2016). Review of current in vivo measurement techniques for quantifying enteric methane emission from ruminants. In *Animal Feed Science and Technology* (Vol. 219, pp. 13–30). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.05.018>
- Hammond, K. J., Humphries, D. J., Crompton, L. A., Green, C., & Reynolds, C. K. (2015). Methane emissions from cattle: Estimates from short-term measurements using a GreenFeed system compared with measurements obtained using respiration chambers or sulphur hexafluoride tracer. *Animal Feed Science and Technology*, 203, 41–52. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.02.008>
- Harder, I., Stamer, E., Junge, W., & Thaller, G. (2019). Lactation curves and model evaluation for feed intake and energy balance in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 102(8), 7204–7216. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15300>
- Hegarty, R. S. (1999). Mechanisms for competitively reducing ruminal methanogenesis. *Australian Journal of Agricultural Research*, 50(8), 1299. <https://doi.org/10.1071/AR99007>

- Herd, R. M., Bird, S. H., Donoghue, K. A., Arthur, P. F., & Hegarty, R. S. (2013). Phenotypic associations between methane production traits, volatile fatty acids and animal breeding traits. In *Proceedings of the Association for the Advancement of Animal Breeding and Genetics* (Vol. 20, pp. 286–289).
- Hristov, A. N., Kebreab, E., Niu, M., Oh, J., Bannink, A., Bayat, A. R., Boland, T. M., Brito, A. F., Casper, D. P., Crompton, L. A., Dijkstra, J., Eugène, M., Garnsworthy, P. C., Haque, N., Hellwing, A. L. F., Huhtanen, P., Kreuzer, M., Kuhla, B., Lund, P., ... Yu, Z. (2018). Symposium review: Uncertainties in enteric methane inventories, measurement techniques, and prediction models. *Journal of Dairy Science*, *101*(7), 6655–6674. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13536>
- Hristov, A. N., Oh, J., Giallongo, F., Frederick, T., Harper, M. T., Weeks, H., Branco, A. F., Price, W. J., Moate, P. J., Deighton, M. H., Williams, S. R. O., Kindermann, M., & Duval, S. (2016). Short communication: Comparison of the GreenFeed system with the sulfur hexafluoride tracer technique for measuring enteric methane emissions from dairy cows. *Journal of Dairy Science*, *99*(7), 5461–5465. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-10897>
- Huhtanen, P., Cabezas-Garcia, E. H., Utsumi, S., & Zimmerman, S. (2015). Comparison of methods to determine methane emissions from dairy cows in farm conditions. *Journal of Dairy Science*, *98*(5), 3394–3409. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-9118>
- Hungate, R. E., Smith, W., Bauchop, T., Yu, I., & Rabinowitz, J. C. (1970). Formate as an Intermediate in the Bovine Rumen Fermentation. *Journal of Bacteriology*, *102*(2), 389–397. <https://doi.org/10.1128/jb.102.2.389-397.1970>
- Hurley, A. M., Lopez-Villalobos, N., McParland, S., Lewis, E., Kennedy, E., O'Donovan, M., Burke, J. L., & Berry, D. P. (2018). Characteristics of feed efficiency within and across lactation in dairy cows and the effect of genetic selection. *Journal of Dairy Science*, *101*(2), 1267–1280. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12841>
- IPCC. (2023). *Intergovernmental Panel on Climate Change*.
- ISMEA. (2022). *Settore agroalimentare*.
- ISMEA. (2024). *Settore agroalimentare*.
- ISPRA, I. S. per la P. e la R. A. (2022). *Le emissioni nazionali di gas serra Settore Agricoltura*.
- Jentsch, W., Schweigel, M., Weissbach, F., Scholze, H., Pitroff, W., & Derno, M. (2007). Methane production in cattle calculated by the nutrient composition of the diet. *Archives of Animal Nutrition*, *61*(1), 10–19. <https://doi.org/10.1080/17450390601106580>
- Jiao, H. P., Yan, T., McDowell, D. A., Carson, A. F., Ferris, C. P., Easson, D. L., & Wills, D. (2013). Enteric methane emissions and efficiency of use of energy in Holstein heifers and steers at age of six months<sup>1</sup>. *Journal of Animal Science*, *91*(1), 356–362. <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5259>
- Johnson, K. , Huyler, M. , Westberg, H. , H., L. B., & Zimmerman, P. (1994). Measurement of methane emissions from ruminant livestock using a sulfur hexafluoride tracer technique . *Environmental Science & Technology*, *28*(2), 359–362.
- 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>
- Kamalanathan, S., Houlahan, K., Miglior, F., Chud, T. C. S., Seymour, D. J., Hailemariam, D., Plastow, G., de Oliveira, H. R., Baes, C. F., & Schenkel, F. S. (2023). Genetic Analysis of Methane Emission Traits in Holstein Dairy Cattle. *Animals*, *13*(8), 1308. <https://doi.org/10.3390/ani13081308>
- Kandel, P. B., Vanrobays, M.-L., Vanlierde, A., Dehareng, F., Froidmont, E., Gengler, N., & Soyeurt, H. (2017). Genetic parameters of mid-infrared methane predictions and their relationships with milk

- production traits in Holstein cattle. *Journal of Dairy Science*, 100(7), 5578–5591. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11954>
- Karakurt, I., Aydin, G., & Aydiner, K. (2012). Sources and mitigation of methane emissions by sectors: A critical review. *Renewable Energy*, 39(1), 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2011.09.006>
- Knapp, J. R., Laur, G. L., Vadas, P. A., Weiss, W. P., & Tricarico, J. M. (2014). Invited review: Enteric methane in dairy cattle production: Quantifying the opportunities and impact of reducing emissions. *Journal of Dairy Science*, 97(6), 3231–3261. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7234>
- Kweku, D., Bismark, O., Maxwell, A., Desmond, K., Danso, K., Oti-Mensah, E., Quachie, A., & Adormaa, B. (2018). Greenhouse Effect: Greenhouse Gases and Their Impact on Global Warming. *Journal of Scientific Research and Reports*, 17(6), 1–9. <https://doi.org/10.9734/jsrr/2017/39630>
- Lacková, P. T., Maskal'ová, I., Mihok, T., Zigo, F., & Zigo, A. F. (2024). Effect of parity number and days in milk on somatic cell count in dairy cows \*For Correspondence. *International Journal of Veterinary Science and Agriculture Research*, 6(4).
- Lassey, K. R. (2013). On the importance of background sampling in applications of the SF6 tracer technique to determine ruminant methane emissions. *Animal Feed Science and Technology*, 180(1–4), 115–120. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2012.11.012>
- Le Treut, H., Somerville, R., Cubasch, U., Allen, M., Treut, L., Somerville, R., Cubasch, U., Ding, Y., Mauritzen, C., Mokssit, A., Peterson, T., Prather, M., Marquis, M., Averyt, K., & Tignor, M. (2007). *Historical Overview of Climate Change Science Coordinating Lead Authors: Lead Authors: Contributing Authors: This chapter should be cited as.*
- 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>
- Madsen, J., Bjerg, B. S., Hvelplund, T., Weisbjerg, M. R., & Lund, P. (2010). Methane and carbon dioxide ratio in excreted air for quantification of the methane production from ruminants. *Livestock Science*, 129(1–3), 223–227. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2010.01.001>
- Maltz, E. (2020). Individual dairy cow management: achievements, obstacles and prospects. *Journal of Dairy Research*, 87(2), 145–157. <https://doi.org/10.1017/S0022029920000382>
- Martínez-Marín, G., Schiavon, S., Tagliapietra, F., Cecchinato, A., Toledo-Alvarado, H., & Bittante, G. (2023). Interactions among breed, farm intensiveness and cow productivity on predicted enteric methane emissions at the population level. *Italian Journal of Animal Science*, 22(1), 59–75. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2022.2158953>
- Martínez-Marín, G., Toledo-Alvarado, H., Amalfitano, N., Gallo, L., & Bittante, G. (2024). Lactation modeling and the effects of rotational crossbreeding on milk production traits and milk-spectra-predicted enteric methane emissions. *Journal of Dairy Science*, 107(3), 1485–1499. <https://doi.org/10.3168/jds.2023-23551>
- Massaro, S., Giannuzzi, D., Amalfitano, N., Schiavon, S., Bittante, G., & Tagliapietra, F. (2024). Review of equations to predict methane emissions in dairy cows from milk fatty acid profiles and their application to commercial dairy farms. *Journal of Dairy Science*, 107(8), 5833–5852. <https://doi.org/10.3168/jds.2024-24814>
- Maurice-Van Eijndhoven, M. H. T., Soyeurt, H., Dehareng, F., & Calus, M. P. L. (2013). Validation of fatty acid predictions in milk using mid-infrared spectrometry across cattle breeds. *Animal*, 7(2), 348–354. <https://doi.org/10.1017/S1751731112001218>

- Mc Geough, E. J., O'Kiely, P., Foley, P. A., Hart, K. J., Boland, T. M., & Kenny, D. A. (2010). Methane emissions, feed intake, and performance of finishing beef cattle offered maize silages harvested at 4 different stages of maturity<sup>1</sup>. *Journal of Animal Science*, *88*(4), 1479–1491. <https://doi.org/10.2527/jas.2009-2380>
- McAllister, T. A., Meale, S. J., Valle, E., Guan, L. L., Zhou, M., Kelly, W. J., Henderson, G., Attwood, G. T., & Janssen, P. H. (2015). RUMINANT NUTRITION SYMPOSIUM: Use of genomics and transcriptomics to identify strategies to lower ruminal methanogenesis<sup>1,2,3</sup>. *Journal of Animal Science*, *93*(4), 1431–1449. <https://doi.org/10.2527/jas.2014-8329>
- Medeiros, I., Fernandez-Novio, A., Astiz, S., & Simões, J. (2022). Historical Evolution of Cattle Management and Herd Health of Dairy Farms in OECD Countries. *Veterinary Sciences*, *9*(3), 125. <https://doi.org/10.3390/vetsci9030125>
- Morales Piñeyrua, J. T., Fariña, S. R., & Mendoza, A. (2018). Effects of parity on productive, reproductive, metabolic and hormonal responses of Holstein cows. *Animal Reproduction Science*, *191*, 9–21. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.01.017>
- Morgavi, D. P., Cantalapiedra-Hijar, G., Eugène, M., Martin, C., Nozière, P., Popova, M., Ortigues-Marty, I., Muñoz-Tamayo, R., & Ungerfeld, E. M. (2023). Review: Reducing enteric methane emissions improves energy metabolism in livestock: is the tenet right? *Animal*, *17*, 100830. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2023.100830>
- Morgavi, D. P., Forano, E., Martin, C., & Newbold, C. J. (2010). Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal*, *4*(7), 1024–1036. <https://doi.org/10.1017/S1751731110000546>
- Moss, A. R. (1994). *Methane production by ruminants - Literature review of I. Dietary manipulation to reduce methane production and II. Laboratory procedures for estimating methane potential of diets*. *64*(12), 785–806.
- 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>
- Nagaraja, T. G. (2016). Microbiology of the Rumen. In *Rumenology* (pp. 39–61). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-30533-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-30533-2_2)
- Negussie, E., de Haas, Y., Dehareng, F., Dewhurst, R. J., Dijkstra, J., Gengler, N., Morgavi, D. P., Soyeurt, H., van Gastelen, S., Yan, T., & Biscarini, F. (2017). Invited review: Large-scale indirect measurements for enteric methane emissions in dairy cattle: A review of proxies and their potential for use in management and breeding decisions. *Journal of Dairy Science*, *100*(4), 2433–2453. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12030>
- Negussie, E., Lehtinen, J., Mäntysaari, P., Bayat, A. R., Liinamo, A.-E., Mäntysaari, E. A., & Lidauer, M. H. (2016). Non-invasive individual methane measurement in dairy cows. *Animal*, *11*(5), 890–899. <https://doi.org/10.1017/S1751731116002718>
- Neuenschwander, T., Kadarmideen, H. N., Wegmann, S., & de Haas, Y. (2005). Genetics of Parity-Dependant Production Increase and its Relationship with Health, Fertility, Longevity, and Conformation in Swiss Holsteins. *Journal of Dairy Science*, *88*(4), 1540–1551. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72823-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72823-X)
- Newbold, C. J., de la Fuente, G., Belanche, A., Ramos-Morales, E., & McEwan, N. R. (2015a). The Role of Ciliate Protozoa in the Rumen. *Frontiers in Microbiology*, *6*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01313>

- Newbold, C. J., de la Fuente, G., Belanche, A., Ramos-Morales, E., & McEwan, N. R. (2015b). The Role of Ciliate Protozoa in the Rumen. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01313>
- Newbold, C. J., Lassalas, B., & Jouany, J. P. (1995). The importance of methanogens associated with ciliate protozoa in ruminal methane production in vitro. *Letters in Applied Microbiology*, 21(4), 230–234. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1995.tb01048.x>
- Niero, G., Cendron, F., Penasa, M., De Marchi, M., Cozzi, G., & Cassandro, M. (2020). Repeatability and Reproducibility of Measures of Bovine Methane Emissions Recorded using a Laser Detector. *Animals*, 10(4), 606. <https://doi.org/10.3390/ani10040606>
- Østerås, O., Sølverød, L., & Reksen, O. (2006). Milk Culture Results in a Large Norwegian Survey—Effects of Season, Parity, Days in Milk, Resistance, and Clustering. *Journal of Dairy Science*, 89(3), 1010–1023. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72167-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72167-1)
- Patrick R. Zimmerman, & Robert Scott Zimmerman. (2012). *Method and system for monitoring and reducing ruminant methane production* (Patent US8307785B2).
- Pickering, N. K., Oddy, V. H., Basarab, J., Cammack, K., Hayes, B., Hegarty, R. S., Lassen, J., McEwan, J. C., Miller, S., Pinares-Patiño, C. S., & de Haas, Y. (2015). Animal board invited review: genetic possibilities to reduce enteric methane emissions from ruminants. *Animal*, 9(9), 1431–1440. <https://doi.org/10.1017/S1751731115000968>
- Pinares-Patiño, C. S., Lassey, K. R., Martin, R. J., Molano, G., Fernandez, M., MacLean, S., Sandoval, E., Luo, D., & Clark, H. (2011). Assessment of the sulphur hexafluoride (SF6) tracer technique using respiration chambers for estimation of methane emissions from sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 166–167, 201–209. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.04.067>
- Ramírez-Restrepo, C. A., Waghorn, G. C., Gillespie, H., & Clark, H. (2020). Partition of dietary energy by sheep fed fresh ryegrass (*Lolium perenne*) with a wide-ranging composition and quality. *Animal Production Science*, 60(8), 1008. <https://doi.org/10.1071/AN19285>
- Regulation (EU) No 1151/2012 of the European Parliament and of the Council of 21 November 2012 on Quality Schemes for Agricultural Products and Foodstuffs (2012).
- Ricci, P., Chagunda, M. G. G., Rooke, J., M. Houdijk, J. G., Duthie, C.-A., Hyslop, J., Roehe, R., & Waterhouse, A. (2014). Evaluation of the laser methane detector to estimate methane emissions from ewes and steers1. *Journal of Animal Science*, 92(11), 5239–5250. <https://doi.org/10.2527/jas.2014-7676>
- Ross, S. A., Chagunda, M. G. G., Topp, C. F. E., & Ennos, R. (2014). Effect of cattle genotype and feeding regime on greenhouse gas emissions intensity in high producing dairy cows. *Livestock Science*, 170, 158–171. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2014.09.011>
- Saunio, M., Martinez, A., Poulter, B., Zhang, Z., Raymond, P., Regnier, P., Canadell, J. G., Jackson, R. B., Patra, P. K., Bousquet, P., Ciais, P., Dlugokencky, E. J., Lan, X., Allen, G. H., Bastviken, D., Beerling, D. J., Belikov, D. A., Blake, D. R., Castaldi, S., ... Zhuang, Q. (2024). *Global Methane Budget 2000–2020*. <https://doi.org/10.5194/essd-2024-115>
- Scholtz, M. M., Neser, F. W. C., & Makgahlela, M. L. (2020). A balanced perspective on the importance of extensive ruminant production for human nutrition and livelihoods and its contribution to greenhouse gas emissions. *South African Journal of Science*, 116(9/10). <https://doi.org/10.17159/sajs.2020/8192>
- Segers, R. (1998). Methane production and methane consumption: a review of processes underlying wetland methane fluxes. *Biogeochemistry*, 41(1), 23–51. <https://doi.org/10.1023/A:1005929032764>

- SHIBATA, M., & TERADA, F. (2010). Factors affecting methane production and mitigation in ruminants. *Animal Science Journal*, 81(1), 2–10. <https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2009.00687.x>
- Storm, I. M. L. D., Hellwing, A. L. F., Nielsen, N. I., & Madsen, J. (2012). Methods for Measuring and Estimating Methane Emission from Ruminants. *Animals*, 2(2), 160–183. <https://doi.org/10.3390/ani2020160>
- Sutton, J. D., Dhanoa, M. S., Morant, S. V., France, J., Napper, D. J., & Schuller, E. (2003). Rates of Production of Acetate, Propionate, and Butyrate in the Rumen of Lactating Dairy Cows Given Normal and Low-Roughage Diets. *Journal of Dairy Science*, 86(11), 3620–3633. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73968-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73968-X)
- Tapio, I., Snelling, T. J., Strozzi, F., & Wallace, R. J. (2017). The ruminal microbiome associated with methane emissions from ruminant livestock. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 8(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0141-0>
- Ungerfeld, E. M. (2018). Inhibition of Rumen Methanogenesis and Ruminant Productivity: A Meta-Analysis. *Frontiers in Veterinary Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00113>
- Ungerfeld, E. M., & Pitta, D. (2024). Review: Biological consequences of the inhibition of rumen methanogenesis. *Animal*, 101170. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2024.101170>
- V. Masson-Delmotte, P. Zhai, H. O. Pörtner, D. Roberts, J. Skea, P. R. Shukla, A. Pirani, W. Moufouma-Okia, C. Péan, R. Pidcock, S. Connors, J. B. R. Matthews, Y. Chen, X. Zhou, M. I. Gomis, E. Lonnoy, T. Maycock, M. Tignor, & T. Waterfield. (2018). *Global warming of 1.5°C: An IPCC Special Report on the impacts of global warming of 1.5°C above pre-industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways, in the context of strengthening the global response to the threat of climate change, sustainable development, and efforts to eradicate poverty*. IPCC.
- van Gastelen, S., Antunes-Fernandes, E. C., Hettinga, K. A., Klop, G., Alferink, S. J. J., Hendriks, W. H., & Dijkstra, J. (2015). Enteric methane production, rumen volatile fatty acid concentrations, and milk fatty acid composition in lactating Holstein-Friesian cows fed grass silage- or corn silage-based diets. *Journal of Dairy Science*, 98(3), 1915–1927. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8552>
- van Gastelen, S., & Dijkstra, J. (2016). Prediction of methane emission from lactating dairy cows using milk fatty acids and mid-infrared spectroscopy. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(12), 3963–3968. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7718>
- van Gastelen, S., Mollenhorst, H., Antunes-Fernandes, E. C., Hettinga, K. A., van Burgsteden, G. G., Dijkstra, J., & Rademaker, J. L. W. (2018). Predicting enteric methane emission of dairy cows with milk Fourier-transform infrared spectra and gas chromatography-based milk fatty acid profiles. *Journal of Dairy Science*, 101(6), 5582–5598. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13052>
- van Lingen, H. J., Crompton, L. A., Hendriks, W. H., Reynolds, C. K., & Dijkstra, J. (2014). Meta-analysis of relationships between enteric methane yield and milk fatty acid profile in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 97(11), 7115–7132. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8268>
- Vanegas, J. L., González, J., & Carro, M. D. (2017). Influence of protein fermentation and carbohydrate source on *in vitro* methane production. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 101(5). <https://doi.org/10.1111/jpn.12604>
- Vlaeminck, B., Fievez, V., Cabrita, A. R. J., Fonseca, A. J. M., & Dewhurst, R. J. (2006). Factors affecting odd- and branched-chain fatty acids in milk: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 131(3–4), 389–417. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.06.017>
- Waghorn, G. (2014). *Technical Manual on Respiration Chamber Designs*.

- Waghorn, G. C., & Clark, D. A. (2006). Greenhouse gas mitigation opportunities with immediate application to pastoral grazing for ruminants. *International Congress Series, 1293*, 107–110. <https://doi.org/10.1016/j.ics.2006.02.025>
- Williams, A. G., & Coleman, G. S. (1992). *Role of Protozoa in the Rumen* (pp. 317–347). [https://doi.org/10.1007/978-1-4612-2776-2\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4612-2776-2_10)
- Wolin, M. J., Miller, T. L., & Stewart, C. S. (1997). Microbe-microbe interactions. In P. N. Hobson & C. S. Stewart (Eds.), *The Rumen Microbial Ecosystem* (pp. 467–491). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-009-1453-7\\_11](https://doi.org/10.1007/978-94-009-1453-7_11)
- Zhao, Y. G., O’Connell, N. E., & Yan, T. (2016). Prediction of enteric methane emissions from sheep offered fresh perennial ryegrass (*Lolium perenne*) using data measured in indirect open-circuit respiration chambers1. *Journal of Animal Science, 94*(6), 2425–2435. <https://doi.org/10.2527/jas.2016-0334>
- Zhao, Y., Nan, X., Yang, L., Zheng, S., Jiang, L., & Xiong, B. (2020). A Review of Enteric Methane Emission Measurement Techniques in Ruminants. *Animals, 10*(6), 1004. <https://doi.org/10.3390/ani10061004>
- Zimmerman, P. R. ., (1993). *System for measuring metabolic gas emissions from animals* (Patent US005265618A).



# **RINGRAZIAMENTI**

Cinque anni di università sono ormai giunti al termine, e non c'è modo migliore per concludere questo intenso percorso con il presente elaborato di tesi.

Vorrei ringraziare innanzitutto il Prof Massimo De Marchi per avermi concesso la possibilità di lavorare con lui e di poter scrivere questa tesi. Vorrei ringraziare anche il Prof Mauro Penasa per avermi aiutato nella stesura della tesi e per avermi fornito i migliori consigli per completarla al meglio. Proseguo con il ringraziare la dott.ssa Silvia Magro per la sua grande pazienza, per i suoi tempestivi consigli e per tutto il tempo che mi ha dedicato negli ultimi mesi. Un grazie di cuore va anche ad Alberto Guerra per il lavoro fatto nella fase di campionamento e raccolta dati e a tutto il team che accanto a lui ha lavorato.

Non posso esimermi nel ringraziare l'Associazione Italiana Allevatori Veneto (ARAV) per avermi fornito i dati e avermi concesso la possibilità di partecipare al progetto aggiuntivi FAME: studio degli aspetti fenotipici e genetici delle emissioni di metano nel latte di vacche in allevamenti della regione veneto (Milk Fatty Acids and Methane Emission).

Non per ultimo, ringrazio immensamente tutta la mia famiglia per la loro pazienza e per avermi sostenuto durante tutto questo lungo percorso di studi, e tutti i miei amici per i bei momenti passati assieme.