



**JÚLIA MARA CAMPOS DE SOUZA**

**EFFECTS OF BIOCHAR ON *IN VITRO* RUMINAL  
FERMENTATION OF BEEF CATTLE DIETS**

**LAVRAS - MG**

**2022**

**JÚLIA MARA CAMPOS DE SOUZA**

**EFFECTS OF BIOCHAR ON *IN VITRO* RUMINAL  
FERMENTATION OF BEEF CATTLE DIETS**

Master's thesis presented to the  
Universidade Federal de Lavras, as part of  
the requirements of Graduate Program in  
Animal Science, area of concentration in  
Ruminant Production and Nutrition, to obtain  
the title of Master.

Prof. Dr. Erick Darlisson Batista

Advisor

**LAVRAS – MG**

**2022**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Souza, Júlia Mara Campos de.

Effects of biochar on *in vitro* ruminal fermentation of beef  
cattle diets / Júlia Mara Campos se Souza. - 2022.

61 p.

Orientador(a): Erick Darlison Batista.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. Biocarvão. 2. Fermentação ruminal. 3. Metano. I. Batista,  
Erick Darlison. II. Título.

**JÚLIA MARA CAMPOS DE SOUZA**

**EFEITOS DO BIOCARVÃO SOB A FERMENTAÇÃO RUMINAL  
*IN VITRO* EM DIETAS DE BOVINOS DE CORTE**

**EFFECTS OF BIOCHAR ON *IN VITRO* RUMINAL  
FERMENTATION OF BEEF CATTLE DIETS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Nutrição e Produção de Ruminantes, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 17 de fevereiro de 2022.

Dr. Erick Darlison Batista, Universidade Federal de Lavras

Dr. Daniel Rume Casagrande, Universidade Federal de Lavras

Dr. Gabriel de Oliveira Ribeiro, Universidade do Saskatchewan

---

Prof. Dr. Erick Darlison Batista  
Orientador

## **AGRADECIMENTOS**

Início meu agradecimento a Deus pelas bênçãos, oportunidades e por sempre iluminar minhas escolhas.

Aos maiores amores da minha vida, meus pais, Robson e Silvia, que são meu refúgio e meu porto seguro. Muito obrigada por todas as renúncias que me fizeram chegar aonde eu estou.

Ao meu irmão Matheus e minha cunhada Lays, por serem referência e sempre me apoiarem em tudo. Obrigada, eu amo vocês.

Gratidão imensa ao professor Erick Batista, por ter me aceitado em 2020 sem ao menos me conhecer e desde então ser uma referência pra mim, como profissional e como pessoa.

Ao meu orientador da Graduação Daniel Cunha e a professora Janaina Martuscello, carregue seus ensinamentos comigo, meu muito obrigada!

Aos membros da banca da qualificação, Dr. Daniel Casagrande, Dr. Rafael Leite e Dr. Thierry Tomich, que contribuíram tanto com o trabalho e realizaram uma discussão riquíssima.

Aos membros da banca examinadora que aceitaram participar e colaborar com a minha dissertação.

A todos os membros do NEPEC, que foram essenciais na condução do experimento.

Ao Márcio do Laboratório que foi essencial na condução do trabalho e nos cafezinhos.

As minhas amigas antigas, Fernanda, Renata, Amália e Aninha e aos novos amigos Gian, Leticia, Gustavinho, Aurélio, Igor, Pri, Yan, Rayane, Gabizinha, Zé e Rafa e mais uma moçada, que me garantiram risadas, apoio e cerveja gelada sempre que precisei. Ao Felipe, que foi peça chave para que conseguisse concluir essa etapa. Meu muito obrigada, vocês não fazem ideia o quanto cada um de vocês foi importante pra mim.

**MUITO OBRIGADA!**

## RESUMO

O objetivo foi avaliar os efeitos do biocarvão na fermentação ruminal, produção de metano e degradação *in vitro* em dietas de bovinos de corte tropicais com alto ou baixo teor de forragem e comparar com aditivos que já estão sendo utilizados. Os efeitos foram avaliados em três estudos diferentes: I) Determinação do nível de inclusão do biocarvão; II) Comparação dos efeitos do biocarvão com monensina e nitrato na fermentação ruminal e produção de gases *in vitro*; III) Comparação dos efeitos do biocarvão com monensina e nitrato na digestibilidade *in vitro*. Foram cinco tratamentos para o estudo I (0, 10, 20, 30 e 40mg/kg MS) e quatro tratamentos para os Estudos II e III (controle, biocarvão (40mg/kg MS e 20mg/kg MS para dietas com alta forragem e alto concentrado, respectivamente), monensina (30mg/kg MS) e nitrato (20g/kg MS)). Para os estudos I e II, os dados foram coletados e analisados seguindo o delineamento de blocos ao acaso e para o estudo III foram de acordo com o delineamento quadrado latino. No primeiro estudo, níveis crescentes de biocarvão reduziram linearmente o DIVMO ( $P < 0,01$ ), proporção (%), produção (mL/g MS) e rendimento (mL/g MSd) de CH<sub>4</sub> ( $P = 0,01$ ) em dietas com alta inclusão de forragem. Para dietas com alta inclusão de concentrado, não foram detectados efeitos de tratamento para digestibilidades *in vitro*, mas a proporção, produção e rendimento de CH<sub>4</sub> apresentaram efeito cúbico ( $P < 0,02$ ). Os menores valores de CH<sub>4</sub> foram observados para 40g de biocarvão para dietas com alta inclusão de forragem e 20g para dietas com alta inclusão de concentrado. Para o estudo II e dietas com alta inclusão de forragem a concentração de DIVMO ( $P = 0,05$ ) e NH<sub>3</sub>-N ( $P = 0,02$ ) foi afetada pelos aditivos, mas os rendimentos de CH<sub>4</sub> não foram afetados ( $P = 0,14$ ). Para as dietas com alta inclusão de concentrado, a maior PG total foi verificada com a inclusão de biocarvão em relação à monensina ( $P < 0,05$ ). Os tratamentos não afetaram as digestibilidades *in vitro* e a proporção, a produção, bem como o rendimento de CH<sub>4</sub> ( $P > 0,13$ ), a concentração de NH<sub>3</sub>-N aumentou por biocarvão e nitrato em relação ao controle e monensina ( $P < 0,05$ ). Para o estudo III e dietas com alta inclusão de forragem, o DIVMS foi maior para a monensina ( $P < 0,05$ ), o nitrato teve o maior DIVMO ( $P < 0,01$ ) e o DIVPB foi menor para o nitrato que os demais tratamentos ( $P < 0,001$ ). Para dietas com alta inclusão de concentrado, biocarvão e nitrato tiveram o maior DIVMS ( $P < 0,001$ ). Neste caso, o DIVMO foi maior para nitrato em relação ao controle, mas biocarvão e monensina não foram diferentes entre eles ( $P > 0,05$ ). Biocarvão apresentou um DIVPB maior que o controle e nitrato, enquanto a monensina apresentou o menor valor ( $P < 0,02$ ). O DIVFDN e DIVHEM foram melhorados com adição de biocarvão e nitrato ( $P < 0,001$ ). Demonstramos que 2 e 4% do nível de inclusão de biocarvão diminuem em cerca de 10 e 20% do rendimento de CH<sub>4</sub> quando dietas de alto e baixo concentrado foram incubadas, respectivamente. No entanto, estudos subsequentes não apresentaram reduções significativas de CH<sub>4</sub> com adição de biocarvão, independentemente do tipo de dieta.

Palavras-chave: biocarvão, metano, monensina, nitrato, ruminantes.




## ABSTRACT

The objective was to evaluate the effects of biochar on *in vitro* ruminal fermentation, methane production and diet degradation of tropical beef cattle diets high or low in forage and compare with additives that are already being used. The effects were assessed in three different studies: I) Determination of the inclusion level of biochar; II) Comparison of the effects of biochar with monensin and nitrate on ruminal fermentation and gas production; III) Comparison of the effects of biochar with monensin and nitrate on *in vitro* digestibility. There were five treatments for study I (0, 10, 20, 30 and 40mg/kg DM) and four treatments for Studies II and III (control, biochar (40mg/kg DM and 20mg/kg DM for high forage and high concentrate, respectively), monensin (30mg/kg DM) and nitrate (20g/kg DM)). For study I and II, data were collected and analyzed following the randomized block design and for study III were according to a latin square design. In the first study, biochar increasing levels linearly decreased IVDMO ( $P < 0.01$ ), CH<sub>4</sub> proportion (%), production (mL/g DM) and yield (mL/g OMd) ( $P = 0,01$ ) in diets with high inclusion of forage. For diets with high inclusion of concentrate, treatment effects were not detected for *in vitro* digestibilities, but CH<sub>4</sub> proportion, production, and yield presented a cubic effect ( $P < 0.02$ ). The lowest values for CH<sub>4</sub> were observed for 40g of biochar for diets with high forage inclusion and 20 g for diets with high inclusion of concentrate. For study II and diets with high forage inclusion the IVDOM ( $P = 0.05$ ) and NH<sub>3</sub>-N concentration ( $P = 0,02$ ) was affected by the additives, but CH<sub>4</sub> yields were not affected ( $P = 0.14$ ). For the diets with high concentrate inclusion, the highest total GP was verified with biochar inclusion compared to monensin ( $P < 0.05$ ). Treatments did not affect *in vitro* digestibilities and CH<sub>4</sub> proportion, production, as well as yield ( $P > 0.13$ ), NH<sub>3</sub>-N concentration increased by biochar and nitrate compared to control and monensin ( $P < 0.05$ ). For study III and diets with high forage inclusion, IVDMD was highest for monensin ( $P < 0.05$ ), nitrate had greatest IVDMO ( $P < 0.01$ ) and IVDGP was smallest for nitrate than the other treatments ( $P < 0.001$ ). For diets with high concentrate inclusion, biochar and nitrate had the greatest IVDMD ( $P < 0.001$ ). In this case, the IVDMO was higher for nitrate compared to the control, but biochar and monensin were not different to them ( $P > 0.05$ ). Biochar had a greater IVDGP than control and nitrate, while monensin presented the lowest value ( $P < 0.02$ ). The IVDNDF and IVDHEM were improved with biochar and nitrate addition ( $P < 0.001$ ). We demonstrated that 2 and 4% of biochar inclusion level decrease in about 10 and 20% of CH<sub>4</sub> yield when high- and low-

concentrate diets were incubated, respectively. However, subsequent studies did not present significant CH<sub>4</sub> reductions with biochar addition, regardless of type of diet.


Keywords: biocarbon, methane, monensin, nitrate, ruminants.



## EFFECTS OF BIOCHAR ON *IN VITRO* RUMINAL FERMENTATION IN BEEF CATTLE DIETS

O METANO é um GEE proveniente dos processos de fermentação anaeróbicas, que além de implicações AMBIENTAIS, significa PERDA DE EFICIÊNCIA ENERGÉTICA na fermentação ruminal



ESTRATÉGIAS NUTRICIONAIS são amplamente discutidas para diminuir a METANOGÊNESE, principalmente ADITIVOS

### OBJETIVO

Avaliar os efeitos do biocarvão sobre a fermentação ruminal e digestibilidade, bem como comparar com aditivos já utilizados

### TRATAMENTOS

- 1 NÍVEIS CRESCENTES DE BIOCARVÃO: 0, 10, 20, 30 e 40 g/kg de MS
- 2 **CONTROLE**: Sem adição de aditivo
- 3 **MONENSINA**: Controle positivo sob microrganismos
- NITRATO**: Controle positivo para dreno de H
- BIOCARVÃO**: Aditivo natural com potencial de alteração microbiana

### RESULTADOS

#### 1

↑ BIOCARVÃO  
↓ METANO  
↓ DIVMO

#### 2

CONTROLE BIOCARVÃO NITRATO	}	MAIOR DIVMO	}	BIOCARVÃO NTRATO	}	MAIOR NAR
----------------------------------	---	-------------	---	---------------------	---	-----------

Em dietas simulando pastejo

BIOCARVÃO NTRATO	}	MAIOR NAR
---------------------	---	-----------

Em dietas simulando confinamento

#### 3

MONENSINA	→	MAIOR DIVMS
CONTROLE E NITRATO	→	MAIOR DIVMO
BIOCARVÃO E NITRATO	→	MAIOR DIVPB

Em dietas simulando pastejo

BIOCARVÃO	}	MAIOR DIVMS, DIVPB, DIVFDN, DIVFDA E DIVHEM
-----------	---	---

Em dietas simulando confinamento

Em dietas simulando pastejo

↑ BIOCARVÃO  
↓ METANO

Em dietas simulando confinamento

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	12
1. INTRODUÇÃO .....	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1 Emissão de metano .....	13
2.1.1 Sistema de produção a pasto .....	15
2.1.2 Confinamento.....	17
2.2 Estratégias de redução de emissão de metano .....	18
2.2.1 Monensina .....	18
2.2.2 Nitrato.....	21
2.2.3 Biocarvão.....	22
2.3 Sistemas <i>in vitro</i> fermentação ruminal .....	25
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	28
4. ARTICLE.....	37
4.1 Abstract.....	37
4.2 Introduction .....	38
4.3 Material and methods .....	39
4.3.1 Biochar production.....	39
4.3.2 Study I - Determination of the inclusion level of biochar of beef cattle diets.....	40
4.3.2.1 Ruminal fluid collection and buffer solutions preparation.....	40
4.3.2.2 <i>In vitro</i> gas production and digestibility .....	41
4.3.2.3 Chemical analysis .....	42
4.3.2.4 Definition of Biochar Inclusion Level .....	42
4.3.3 Study II – Comparison effects between biochar, monensin and nitrate on ruminal <i>in vitro</i> fermentation and gas production of beef cattle diets.....	42
4.3.3.1 Partioning Factor.....	43
4.3.3.2 <i>In vitro</i> gas production .....	44
4.3.3.3 Ammonia nitrogen (NH <sub>3</sub> -N).....	44
4.3.4 Study III – Comparison of the effects of biochar with monensin and nitrate on <i>in vitro</i> digestibility of beef cattle diets .....	45
4.3.5 Statistical Analysis.....	46
4.4 Results .....	47
4.4.1 Effects of biochar increasing levels of beef cattle diets (Exp. 1 and 2) .....	47
4.4.2 Comparative effects between biochar, monensin, and nitrate on ruminal <i>in vitro</i> fermentation of beef cattle diets (Exp. 3 and 4) .....	47

<u>4.4.3</u> Comparative effects between biochar, monensin, and nitrate on ruminal <i>in vitro</i> digestibilities of beef cattle diets (Exp. 5 and 6).....	48
4.5 Discussion.....	48
<u>4.5.1</u> Effects of biochar increasing levels of beef cattle diets (Exp. 1 and 2) .....	48
<u>4.5.2</u> Comparative effects between biochar, monensin, and nitrate on ruminal <i>in vitro</i> fermentation and digestibility of beef cattle diets (Exp. 3 to 6).....	50
4.6 Conclusion.....	52
4.7 References .....	53
4.8 Tables .....	62

## CAPÍTULO 1

### 1. INTRODUÇÃO

A expressiva representação da cadeia produtiva da carne brasileira no mercado mundial, em conjunto com a crescente preocupação dos consumidores em relação aos efeitos da produção de carne no aquecimento global, incentiva a busca por estratégias que diminuam a emissão de gases de efeito estufa (GEE) em condições tropicais. O Brasil tem a pecuária baseada em sistemas de produções à pasto, o que resulta em uma maior emissão de metano devido as vias metabólicas que são favorecidas em dietas com altas concentrações de fibra.

O metano ( $\text{CH}_4$ ) é um dos GEE produzido durante a fermentação entérica anaeróbica, considerado 21 vezes mais potente que o dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), em termos de potencial para aquecimento global (IPCC 2007). Apesar disso, o metano é um GEE que permanece por menos tempo na atmosfera (LYNCH et al. 2020) e por isso, seu impacto no aquecimento global, não é tão evidenciado.

Porém, além das questões ambientais, a formação do metano durante a fermentação ruminal significa uma perda de eficiência energética para o animal, devido ao direcionamento de carbonos a metanogênese que poderiam estar sendo utilizados para produção de ácidos graxos voláteis (AGV).

Algumas estratégias nutricionais, bem como alguns aditivos, vêm sendo utilizados com o objetivo de reduzir a metanogênese e consequentemente aumentar a eficiência energética. Um aditivo bem-sucedido é a monensina, um ionóforo que age sobre comunidades específicas de microrganismos que estão associados a vias metanogênicas, principalmente. Apesar de sua eficácia, o uso de antibióticos como promotor de crescimento vem sofrendo restrições devido à pressão de mercado por uma possível associação ao desenvolvimento de patógenos resistentes a antibióticos.

Em alternativa aos inóforos, alguns aditivos não antibióticos estão sendo testados, como é o caso do nitrato. O nitrato age como uma via alternativa energeticamente mais favorável de utilização do hidrogênio. Apesar disso, a redução de  $\text{NO}_3^-$  pode diminuir o pH na superfície dos biofilmes favorecendo crescimento de bactérias sintróficas que oxidam propionato e butirato a acetato com liberação de  $\text{H}_2$  (LENG, 2014). Além da

possível influência negativa sobre os microrganismos, o nitrato ainda oferece risco de envenenamento caso seja fornecido sem adaptação (VAN ZIJDERVELD et al. 2011).

Diante desse contexto, tem crescido o interesse em aditivos naturais para manipular a fermentação ruminal e reduzir a produção de metano, como é o caso do biocarvão. O biocarvão é um material sólido, rico em carbono resultante do processo decomposição termoquímica na ausência de oxigênio sob temperaturas elevadas, chamado pirólise (KAMBO e DUTTA, 2015). Esse processo atribui características como porosidade e conseqüentemente grande área de superfície carregada negativamente com capacidade de troca catiônica. Este já vem sendo utilizado com objetivo de alterar a composição e a abundância microbiológica do solo (LEHMANN et al. 2011; FENG et al. 2012; FARRELL et al. 2013) e também os biofilmes microbianos ruminais, diminuindo a população dos microrganismos metanogênicos do rúmen e aumentando os metanotróficos (LENG et al. 2012a; b; LENG et al. 2012; TOTH e DOU, ZHENGXIA 2016).

A hipótese do trabalho foi que a utilização do biocarvão em dietas de bovinos de corte, tanto em pastejo quanto em confinamento, seria capaz de diminuir a emissão de metano e melhorar a fermentação ruminal *in vitro*. Com isso, objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos do biocarvão sobre a fermentação ruminal, digestibilidade *in vitro* e produção de metano *in vitro*, de forma a permitir melhor delineamento de programas de alimentação de bovinos em pastejo e em confinamento com maior eficiência nutricional e menor emissão de metano e também comparar com aditivos que já vem sendo comercialmente utilizados.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Emissão de metano**

O Metano é um GEE e foi mensurado pela primeira vez na atmosfera nos anos 40 (MIGEOTTE, 1948). Desde então, o aumento da concentração de metano na atmosfera é positivamente correlacionado com o crescimento populacional, sendo que as atividades antropogênicas são responsáveis por 70% da produção de metano (MOSS et al. 2000). Dentre essas atividades antropogênicas se encontra a agricultura, que de acordo com SEEG (2020), foi responsável por 28% do total de emissões de GEE do Brasil no ano de

2019, onde a fermentação entérica representou 61,1%. O MCTIC (2020) afirma que o metano representa 62,6% do total de GEE emitidos pela agropecuária.

O metano é proveniente de processos anaeróbicos (pântanos, fermentação entérica e processamento de resíduos) (MOSS et al. 2000) e campos de arroz cultivados por inundação (PEREIRA et al. 2015). O metano emitido pelos bovinos pode ser proveniente da fermentação ruminal (85 a 90%) e também oriundo da fermentação fecal (PEREIRA et al. 2015). De acordo com MURRAY et al. (1976), 95% do metano produzido na fermentação ruminal é excretado por eructação. Em relação a emissão de metano fecal esta é maior quando ocorre manejo do estrume (SMITH et al. 2021).

A fermentação ruminal de carboidratos tem como principais produtos finais os ácidos graxos voláteis (AGVs),  $\text{CH}_4$  e  $\text{CO}_2$  e esta necessita de cofatores oxidados para que possa acontecer (NAD, NADP e FAD). Durante a glicólise, o  $\text{NAD}^+$  é reduzido a NADH e este precisa ser reoxidado para a próxima fosforilação. Com isso, o  $\text{H}_2$  é liberado e deve ser capturado. A metanogênese é considerada o maior dreno ruminal de  $\text{H}_2$  (ELLIS et al. 2008), funcionando com um acceptor de elétrons (PEREIRA et al. 2015). Portanto, as vias metabólicas envolvidas na produção e utilização de hidrogênio são os fatores mais importantes que devem ser considerados ao desenvolver estratégias para reduzir a emissão de  $\text{CH}_4$  (MARTIN et al. 2010).

O metano é formado a partir de substratos, como  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2$ , compostos de metila, acetato e formato, porém a participação deste último na produção total de metano é pequena (18%) (HUNGATE et al. 1970). A formação do metano possui papel importante para o funcionamento ruminal, ao evitar o acúmulo de hidrogênio no rúmen que pode inibir a atividade da desidrogenase em cofatores de reoxidação (PEREIRA et al. 2015). A eficiência da fermentação ruminal depende da manutenção de potencial redox baixo (LENG e PRESTON, 2010), que é atingido em situações com baixa concentração de  $\text{H}_2$  dissolvido.

A participação do metano nos GEE traz preocupações no tocante ao mercado para a produção de ruminantes devido aos seus efeitos sobre o aquecimento global e a mudança climática. Em termos de potencial para aquecimento global, o  $\text{CH}_4$  é 21 vezes mais potente que o  $\text{CO}_2$  (IPCC 2007).

Apesar do maior potencial para aquecimento global do  $\text{CH}_4$ , o tempo de permanência do metano na atmosfera varia de 8,1 a 11,8 anos (CICERONE e OREMLAND, 1988), enquanto o  $\text{CO}_2$  antropogênico pode persistir na atmosfera por milênios se não houver esforços efetivos para retirá-los (ARCHER e BROVKIN, 2008).

Porém, os GEE são necessários para a manutenção da vida na terra, sem eles o calor do sol seria todo irradiado de volta para o espaço. Entretanto, o limite para a concentração desses gases na atmosfera não é conhecido, mas é aceito pela comunidade científica que esses valores não podem continuar crescendo (MOSS et al. 2000).

Além do ponto de vista ambiental, a produção de metano nos ruminantes representa de 6% a 12% de perda de energia ingerida (RUSSELL e STROBEL, 1989; JOHNSON e JOHNSON, 1995), reduzindo assim o potencial de conversão de energia alimentar em energia metabolizável.

Desta forma, tem havido grande interesse de entidades governamentais e não governamentais, bem como da sociedade em discutir e delinear estratégias para reduzir a emissão dos GEE provenientes das ações antrópicas, especialmente da pecuária. O Brasil instituiu por meio da Lei 12.187/2009 um compromisso nacional voluntário de adoção de ações com objetivo de reduzir as emissões de GEE entre 36,1% e 38,9% em relação às emissões calculadas para 2020 (MCTIC 2020). Esse compromisso é o Plano Política Nacional sobre a Mudança do Clima (PNMC), para a consolidação de uma economia de Baixa Emissão de Carbono na Agricultura e Pecuária. Além disso, durante a conferência do clima das Nações Unidas (COP26), o Brasil assumiu o compromisso de redução de 50% das emissões dos gases associados ao efeito estufa até 2030 e a neutralização das emissões de carbono até 2050, usando como linha de base o ano de 2005.

### **2.1.1 Sistema de produção a pasto**

A pecuária brasileira é baseada na produção à pasto, que muitas vezes está associada a níveis produtivos abaixo do real potencial. Segundo IPCC (2007), essa ineficiência é responsável por maiores emissões de GEE. Em situações de manejos mais intensos de pastagem a eficiência de produção aumenta e está relacionada a menores perdas na forma de metano (CEZIMBRA et al. 2021). A intensificação do manejo de pastagens proporciona melhora nutricional e conseqüentemente redução do ciclo de produção, o que reduz a emissão de metano ao longo do ciclo de vida do animal (BERCHIELLI et al. 2012).

Sistemas de produção a pasto apresentam maiores emissões de metano comparados aos sistemas de produção de animais confinados (MOMBACH et al. 2016) e isso se dá principalmente devido ao perfil fermentativo que a fibra proveniente da

forragem promove. Alimentos ricos em fibra produzem mais metano (VAN ZIJDERVELD et al. 2011).

ARCHIMÈDE et al. (2011) relataram que a composição da dieta e a ingestão de alimentos são um dos principais fatores que afetam a produção de CH<sub>4</sub> em ruminantes devido a alterações nas concentrações dos AGVs finais do processo. A proporção de propionato relativo ao acetato tem grande efeito sobre a produção de metano. Se a fermentação estiver direcionada para a formação de acetato, a produção de CH<sub>4</sub> será maior devido a presença do CO<sub>2</sub> e do formato como metabólitos intermediários e a liberação de H<sub>2</sub> no ambiente ruminal (JOHNSON e JOHNSON, 1995).

Segundo (VAN SOEST, 1994), a formação do acetato e do butirato geram um excedente de hidrogênio, enquanto o propionato utiliza o hidrogênio. As plantas tropicais (C4) favorecem a fermentação acética devido a alterações na composição fibrosa e por isso geram uma maior produção de metano (BERCHIELLI et al. 2012).

Esse problema relacionado a maior produção de CH<sub>4</sub> e conseqüentemente maiores perdas de energia, podem ser minimizados com um manejo mais intenso das pastagens aumentando o valor nutritivo da mesma. CEZIMBRA et al. (2021) mostraram que em situações de intensidade de pastejo baixas e médias, a melhora na estrutura do pasto pode trazer benefícios no tocante a emissão de metano.

A suplementação de bovinos em sistema de pastejo e o pasto com alto valor nutritivo geram uma menor produção de CH<sub>4</sub> em relação a animais ingerindo maior quantidade de carboidrato fibroso (DERAMUS et al. 2003). HARPER et al. (1999) mostraram que as perdas de energia na forma de metano quando os animais estavam em pastejo eram de 7,7 a 8,4%, mas quando foram alimentados com dieta rica em grãos essa perda diminuiu para 1,9 a 2,2 %.

Além dos fatores dietéticos, o estudo da emissão de metano em sistemas de pastagens possui outros fatores importantes, como o solo, que pode ser um potencial sumidouro e fonte de CH<sub>4</sub> e as excretas que pode exercer efeito significativo (LOCKYER e JARVIS, 1995).

Porém, as análises devem ser realizadas de maneira holística. As pastagens atuam como sumidouros de CH<sub>4</sub> na atmosfera, contribuindo mais que florestas e solos com vegetações naturais (TATE, 2015). Além disso o sistema a pasto favorecer a transformação de um material impróprio para o consumo humano em um produto final com alto valor nutritivo, sem disputa com alimentos que potencialmente podem ser usados alimentação humana.



Portanto, a utilização de aditivos que auxiliem na diminuição de produção de metano entérico em sistemas de pastejo é uma alternativa para minimizar a emissão de metano entérico de bovinos a pasto e com isso alcançar uma produção mais sustentável ecologicamente.

### **2.1.2 Confinamento**

De acordo com a ABIEC (2020), animais provenientes de confinamento representavam 14,1% do total de abate. No Beef Report de 2021 (ABIEC, 2021), essa participação subiu para 15,62% o que mostra que a intensificação da produção brasileira está em ascensão. Animais terminados em confinamento, recebem dietas com alta inclusão de energia, tendo o milho como principal ingrediente (97,2% dos nutricionistas usam) (SILVESTRE e MILLEN, 2021).

Esse perfil dietético, diferente do usado em animais terminados a pasto, favorece outras vias metabólicas na fermentação ruminal. ØRSKOV et al. (1968) avaliaram o padrão de AGV e a produção de CH<sub>4</sub> com níveis crescentes de inclusão de concentrado, eles observaram um aumento na proporção de propionato e queda na proporção de acetato, bem como na produção de CH<sub>4</sub>. Essa mudança permite melhor conversão da energia bruta em energia metabolizável. Com o deslocamento da via de fermentação para o propionato mais carbono será fixado como AGV aumentando a disponibilidade de energia para o animal (VAN NEVEL e DEMEYER, 1996). A via do propionato é redutora, ou seja, carrega moléculas de H<sup>+</sup> (KOZLOSKI, 2017). Além da questão das vias metabólicas, dietas com maior proporção de concentrado resulta em níveis de pH mais baixos o que inibe o crescimento das bactérias metanogênicas (DEMEYER e HENDERICKX, 1967). Portanto, ocorre uma diminuição da metanogênese devido a rota metabólica favorecida ser mais reduzida e a diminuição das metanogênicas.

Além das questões nutricionais, a intensificação da produção através do confinamento aumenta a produtividade, o que diminui a emissão de metano por unidade de produto pecuário (OLIVEIRA et al. 2016) devido ao encurtamento do ciclo de vida produtiva do animal.

Por conta disso, o uso de aditivos focados na diminuição da metanogênese em situações de confinamento são utilizados com o objetivo de aumentar a eficiência

energética da fermentação ruminal. Isso pois, naturalmente, a produção de metano será menor em animais em confinamento do que em animais sob pastejo.

## **2.2 Estratégias de redução de emissão de metano**

Na fermentação no rúmen, a metanogênese pode ser regulada de três formas: (1) pela quantidade de carboidrato fermentável no rúmen, (2) pela disponibilidade de hidrogênio através da proporção de AGV e (3) por drenos alternativos de hidrogênio (JOHNSON e JOHNSON, 1995). Portanto, as estratégias de mitigação da produção de metano entérico devem se concentrar em diminuir a disponibilidade de H<sub>2</sub>, estimular vias alternativas para o uso do hidrogênio bem como alterar a atividade microbiana daqueles envolvidos na metanogênese e alterar a disponibilidade de carboidratos no rúmen. Todavia, as estratégias não devem gerar prejuízos na digestão e não causar acúmulo de hidrogênio (PEREIRA et al. 2015).

### **2.2.1 Monensina**

Os antibióticos ionóforos foram inicialmente utilizados como anticoccidianos para aves e são produzidas a partir da cepa de *Streptomyces cinnamonensi*. (BERGEN e BATES, 1984). O uso de ionóforo como modulador da fermentação ruminal se dá pela capacidade de inibir ou deprimir seletivamente o crescimento de certos microrganismos. A base do mecanismo de inibição ionóforos é a capacidade de modificar o movimento de íons através das membranas celulares (SCHELLING, 1984).

A interação com íons metálicos, permite o transporte de íons pelas membranas (OVCHINNIKOV, 1979). Porém, essa interação só é possível com bactérias gram-positivas, tendo pouca eficácia sobre as gram-negativas. As bactérias gram-positivas possuem uma membrana externa simples protegida por uma camada espessa de glicolipídios, enquanto as gram-negativas possuem duas membranas externas ligadas por uma camada de glicolipídios (KOZLOSKI, 2017). Essas diferenças citológicas, levam a uma alteração na permeabilidade da membrana. As bactérias gram-negativas são mais resistentes aos ionóforos do que bactérias gram-positivas devido ao tamanho dos canais de porinas presentes na membrana. Esses canais tem tamanho máximo de 600 daltons

(Da) enquanto a maioria dos ionóforos são maiores que 600Da, inclusive a monensina que tem peso molecular de 671Da (NAGARAJA et al. 1997).

A monensina é um ionóforo antiportador, que são moléculas capazes de ligar mais de um cátion (RUSSELL e STROBEL, 1989), sendo sua ordem de seletividade  $\text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Li} > \text{Cs}^+$  (PRESSMAN, 1976) com alta seletividade para o sódio.

Em relação ao equilíbrio iônico, a concentração intracelular de  $\text{K}^+$  das bactérias é maior que no meio extracelular, que permite a troca de  $\text{K}^+/\text{H}^+$  a fim de controlar o pH externo. Com o fornecimento do ionóforo, um complexo lipofílico cátion-ionóforo é formado permitindo o transporte de íons através dele. Como a monensina possui maior afinidade com o  $\text{Na}^+$ , a rápida saída de  $\text{K}^+$  e entrada de  $\text{H}^+$  é realizada em função da mudança do gradiente iônico extracelular. O acúmulo de  $\text{H}^+$  leva a uma queda no pH, que em primeiro momento é controlado pela bactéria ao permitir a entrada de  $\text{Na}^+$ , porém esse mecanismo perde a eficiência ao longo do tempo. Na tentativa de controle do balanço iônico, as bactérias usam de mecanismos homeostáticos que gastam energia para retirada forçada do excesso de prótons. Esse processo leva ao esgotamento do ATP intracelular, impedindo o crescimento e reprodução da bactéria, levando a bactéria a morte (RUSSELL e STROBEL, 1989).

A monensina vem sendo amplamente utilizada desde 1975 (SCHELLING, 1984). No Brasil, 99,8% dos nutricionistas utilizam algum aditivo em dietas de terminação e 86,1% utilizam a monensina (SILVESTRE e MILLEN, 2021).

Em uma revisão feita por PAGE (2003) são relatados os efeitos da monensina em diversos aspectos. Sobre a fermentação ruminal os efeitos apresentados foram: aumento na concentração de propionato, diminuição de butirato, inibição de microrganismos produtores de ácido láctico, estabilização da concentração total de AGV, inibição das bactérias produtoras de hidrogênio e formato e elevado pH em situações de desafio com carboidratos. No tocante a ingestão de alimentos, foram relatados que o efeito parece ser dependente da relação volumoso concentrado da dieta, queda no consumo de 5 a 16% em dietas a base de grãos, o aumento no consumo de 15% nas dietas a base de forragem e diminuição da variação na ingestão de alimentos. Em relação a metanogênese, foram descritas quedas de 4 a 31% na produção de metano.

SCHELLING (1984) categorizou o modo de ação da monensina em seis alterações ruminais e metabólicas que em conjunto explicam as respostas de desempenho no animal, são elas: alterações na produção de AGVs, na ingestão de alimentos, na

produção de gás, na digestibilidade, na utilização da proteína e na taxa de passagem e no enchimento ruminal.

APPUHAMY et al. (2013) mostraram em uma metanálise os efeitos antimetanogênicos da monensina, relatando resultados de queda na emissão de CH<sub>4</sub>. E (ZHANG et al. 2021) relataram a efetividade da monensina sobre a queda na emissão de metano onde foi fornecido 40 mg/kg de monensina resultando em uma queda de 12,7%.

Apesar dos resultados já encontrados, a persistência desses efeitos positivos a longo prazo é questionada. MELCHIOR et al. (2018) observaram uma queda na ação da monensina sobre as bactérias metanogênicas ao longo do tempo em animais confinados recebendo monensina. A justificativa é de que a monensina não afeta totalmente a classe de gram positivas, mas sim faz pequenas mudanças na microbiota que são capazes de alterar a metanogênese apenas momentaneamente. VYAS et al. (2018) testaram a monensina em um experimento longo de 238 dias e não observaram efeito sobre a produção de metano e constataram que a resposta adaptativa dos microrganismos é mais lenta em dietas ricas em forragem. Já GUAN et al. (2006) relataram que os efeitos inibitórios da monensina se dissipam com quatro a oito semanas de uso tanto em dietas ricas em forragem ou grãos. HOOK. et al. (2009) relataram que não houve diferença na diversidade de bactérias metanogênicas no rúmen de vacas em lactação alimentadas com monensina a longo prazo.

### 2.2.2 Nitrato

O nitrato é um composto químico natural que possui nitrogênio e oxigênio ( $\text{NO}_3$ ), sendo, portanto, uma fonte de nitrogênio não proteico (NNP). Porém, ao ser comparado a ureia, que é um aditivo amplamente utilizado com fonte de NNP, o custo de implementação nas dietas é mais elevado por equivalente de nitrogênio, tornando a utilização desse aditivo para este fim limitada (CALLAGHAN et al. 2014; BLACK et al. 2021). Contudo, como um efeito não-antibiótico, este age como um dreno de  $\text{H}_2$  reduzindo a metanogênese (VAN ZIJDERVELD et al. 2011) e, conseqüentemente, aumenta a eficiência de fermentação.

O mecanismo de ação do nitrato sob a fermentação é explicado principalmente pelo processo de redução, onde primeiramente ele é reduzido a nitrito ( $\text{NO}_3^- + \text{H}_2 \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$ ) e depois é reduzido a amônio ( $\text{NO}_2^- + 3\text{H}_2 + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{NH}_4^+ + 2\text{H}_2\text{O}$ ). Do ponto de vista energético, esse processo é mais favorável do que a metanogênese, onde a energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) é de -130kJ para a redução a nitrito e de -317kJ para a redução do nitrito em amônio, enquanto a  $\Delta G$  da metanogênese é de -67 kJ ;(UNGERFELD e KOHN, 2006). No tocante a estequiometria, se todo o nitrato for reduzido para  $\text{NH}_3$ , a produção de  $\text{CH}_4$  deverá diminuir 25,8 g para cada 100 g de nitrato (LENG e PRESTON, 2010).

O fornecimento de nitrato vem sendo associado a quedas na produção de metano (LENG e PRESTON, 2010; VAN ZIJDERVELD et al. 2010; VAN ZIJDERVELD et al. 2011; HULSHOF et al. 2012; LUND et al. 2014; GUYADER et al. 2015) devido a sua capacidade de drenar o hidrogênio. O fornecimento varia de 2 a 3% da matéria seca e as quedas na produção de metano vão até 31%. Recentemente, ADEJORO et al. (2020) relataram o maior ganho de peso e menor emissão de metano em cordeiros recebendo 32 g/kg de nitrato.

Contudo, um possível fornecimento repentino pode levar ao envenenamento do animal (VAN ZIJDERVELD et al. 2011), onde o  $\text{NO}_2^-$  é absorvido e diminui a capacidade de transporte de oxigênio da hemoglobina através da oxidação do ferro férrico. Além da formação do óxido nitrito que é capaz de reduzir a pressão arterial e levar o animal a morte (NOLAN et al. 2016). Essa possibilidade de intoxicação torna o fornecimento de nitrato limitado, o que pode levar a pequenos impactos como dreno de  $\text{H}_2$ , não gerando o resultado esperado na metanogênese (BLACK et al. 2021).

### 2.2.3 Biocarvão

O biocarvão é um material proveniente do processo de pirólise, que consiste no aquecimento controlado da biomassa sobre alta temperatura em baixa concentração de oxigênio. Essa operação confere algumas características ao biocarvão, que podem variar de acordo com a extensão desse procedimento (tempo e pico de temperatura). Este material pode ser proveniente de diversas matérias primas, porém isso também interfere no uso potencial (JOSEPH e LEHMANN, 2009; HANSEN et al. 2012; MCFARLANE et al. 2017)

A composição química do biocarvão é caracterizada pela presença de compostos aromáticos policondensados que proporcionam estabilidade a longo prazo contra a degradação microbiana. As propriedades químicas avaliadas para os biocarvões incluem o carbono total, nitrogênio total e pH (GURWICK et al. 2013). Em relação a composição física, o biocarvão é caracterizado por uma grande área superficial, porosidade e capacidade de troca catiônica.

A diferença do biocarvão em relação a outros produtos provenientes da pirólise como o carvão e o carvão ativado é basicamente em relação a suas aplicações. O carvão é utilizado para aquecer e cozinhar, o carvão ativado por processos físicos ou químicos é utilizado em purificações de água, produção de biodiesel e compostagem de resíduos orgânicos (MAN et al. 2020).

Alguns estudos relataram alterações na comunidade microbiana do solo com a utilização do biocarvão (LEHMANN et al. 2011; FENG et al. 2012; FARRELL et al. 2013; WANG et al. 2016). O mecanismo de ação ainda não está bem elucidado, porém o biocarvão parece melhorar a atividade microbiana, aumentando a degradabilidade de substratos. Algumas características inerentes ao biocarvão que podem ser responsáveis por esse comportamento são a alta capacidade de adsorção, alta porosidade, recalcitrância e a capacidade de retenção de nutrientes no solo (HARVEY et al. 2012; FARRELL et al. 2013).

FENG et al. (2012) ao avaliar o uso do biocarvão em solos plantados com arroz observaram a mudança na comunidade microbiana onde houve um aumento nas proteobactérias e diminuição da relação entre microrganismos metanogênicos e metanotróficos, além da maior retenção de carbono e o aumento da produtividade do solo e consequentemente o rendimento de grãos.

O comportamento do biocarvão na alimentação de ruminantes vem sendo investigado tanto *in vitro* (HANSEN et al. 2012; LENG 2012a; b; LENG et al. 2013; CALVELO PEREIRA et al. 2014; MCFARLANE et al. 2017; PORSAVATHDY et al. 2017; SALEEM et al. 2018; PAULTAMAYAO et al. 2021; TAMAYAO et al. 2021; MENGISTU et al. 2022; TAMAYAO et al. 2022) quanto *in vivo* (RAO e CHOPRA, 2001; MUI e LEDIN, 2006; ERICKSON et al. 2011; LENG et al. 2012; PHONGPANITH et al. 2013; JOSEPH et al. 2015; TOTH e DOU, 2016; PHONGPHANITH, e PRESTON, 2018; TERRY et al. 2019). A hipótese da maioria desses estudos é de que o biocarvão seja eficaz na diminuição da produção de metano, na complexação de toxinas e consequentemente aumentando eficiência produtiva. SCHMIDT et al. (2019) relataram que o biocarvão como aditivo tem o potencial de melhorar a saúde animal, eficiência alimentar e a produtividade do rebanho, reduzir as emissões de gases de efeito estufa e as perdas de nutrientes, bem como melhorar a qualidade do estrume e consequentemente a fertilidade do solo.

Os resultados relacionados a emissão de metano possui uma certa inconstância, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, apresentando quedas de até 24% (LENG et al. 2012a; b; LENG e PRESTON et al. 2012; LENG et al. 2013; PORSAVATHDY et al. 2017; SALEEM et al. 2018) e outros trabalhos não apresentando resultado algum sob a produção de metano (HANSEN et al. 2012; MCFARLANE et al. 2017; TEOH et al. 2019; PAULTAMAYAO et al. 2021; TAMAYAO, et al. 2021; TAMAYAO et al. 2021; MENGISTU et al. 2022; TAMAYAO et al. 2022). Essa inconsistência nos resultados foi justificada por possíveis diferenças no delineamento, amostragem de gases e também diferenças no biocarvão utilizado.

A forma de ação do biocarvão no ambiente ruminal vem sendo discutida. Uma das hipóteses é suportada pela capacidade de adsorção do biocarvão, devido a sua alta porosidade que possivelmente adsorve o metano produzido no rúmen (HANSEN et al. 2012; TOTH e DOU, 2016). Porém, a produção de metano é maior que a quantidade de biocarvão disponível tornando difícil o entendimento de como a queda na produção é tão eficiente e se esse é de fato o modo de ação do biocarvão, necessita de mais estudos (SALEEM et al. 2018).

Outra hipótese que vem sendo apresentada seria que o biocarvão tem a capacidade de favorecer a formação de biofilmes ruminais nos poros e assim altera a relação entre bactérias metanogênicas e metanotróficas, de forma que a oxidação do metano seja maior que a produção do mesmo (LENG et al. 2012a; b; LENG e PRESTON et al. 2012; TOTH

e DOU 2016; SALEEM et al. 2018). Essa hipótese é suportada pelos resultados encontrados em FENG et al. (2012). Porém a importância e até mesmo a existência de metanotróficas no rúmen ainda é controverso, (HENDERSON et al. 2015) relataram a ausência destes no rúmen.

Além dos efeitos sobre a produção de metano, a digestibilidade dos alimentos também foi uma variável estudada e apresentou inconstância de resultados, alguns trabalhos apresentaram melhoras com adição do biocarvão (ERICKSON et al. 2011; LENG et al. 2012a). Porém, em alguns casos, esse resultado não foi encontrado (HANSEN et al. 2012; TAMAYAO et al. 2021; TAMAYAO et al. 2021; MENGISTU et al. 2022; TAMAYAO et al. 2022). O aumento na digestibilidade, provavelmente está ligada a um desenvolvimento de população microbiana mais eficiente na degradação do alimento (SALEEM et al. 2018) ou a uma complexação de metabólitos secundários que podem atrapalhar na digestão (MUI e LEDIN, 2006).

O processo pelo qual o biocarvão passou, bem como qual foi a matéria prima utilizada, interferem em características e propriedades do produto final que podem ser responsáveis pela variabilidade de resultados (JOSEPH e LEHMANN, 2009; HANSEN et al. 2012; MCFARLANE et al. 2017).

Recentemente, WINDERS et al. (2019) avaliaram os efeitos do biocarvão sob a digestibilidade e produção de metano em bovinos em crescimento e terminação e relataram resultados diferentes para os dois estágios de produção. Para animais em crescimento recebendo 0,8% da MS de biocarvão, houve uma tendência a queda quadrática do metano de 10,7%, enquanto os animais em terminação não apresentaram diferença estatística.

QOMARIYAH et al. (2021) avaliaram níveis crescentes de biocarvão em dietas com 60% de forragem e relataram resultados diferentes do esperado, como o aumento da produção de acetato e a falta de efeito sob a produção de metano. Em relação a população microbiana, houve queda na quantidade de bactérias e protozoários.

Ademais a alguns benefícios relatados em estudos sobre o biocarvão, alguns estudos não relataram efeitos positivos. SALEEM et al. (2018) observaram um aumento na degradação da proteína ruminal e na concentração de  $\text{NH}_3\text{-N}$ , sugerindo que o biocarvão não afetou o metabolismo proteolítico e aumentou a deaminação de aminoácidos.

Buscando investigar os efeitos da suplementação de biocarvão em dietas com de relação volumoso concentrado 70:30 TEOH et al. (2019), relataram que o biocarvão não



afetou características da fermentação ruminal e potencialmente pode reduzir a concentração de metano entérico em altas doses.

TAMAYAO et al. (2021) testaram a inclusão de 2% biocarvão em dietas a base de silagem de cevada e o mesmo não afetou as variáveis de digestibilidade, produção total de gás, AGV, NH<sub>3</sub>-N, síntese de proteína microbiana e apenas uma tendência de diminuição da proporção de metano. TAMAYAO et al. (2021), MENGISTU et al. (2022) e TAMAYAO et al. (2022) também relataram a falta de resultados para as variáveis de digestibilidade, produção de gás, metano, AGV, NH<sub>3</sub>-N, protozoários e síntese de proteína microbiana. Sob características de desempenho e qualidade de carcaça, TERRY et al. (2020) não encontraram diferenças significativas, exceto pela melhora no grau de rendimento de carcaça magra.

Além das fontes já utilizadas como matéria prima para a fabricação de biocarvão, o esterco bovino é uma alternativa barata e sustentável de biomassa para ser usado no processo de pirólise. Essa alternativa já se mostrou ser um possível adsorvente de antibióticos na água no futuro (ZHAO et al. 2021).

Em uma revisão feita por MAN et al. (2020), foram relatados e sumarizados os efeitos do biocarvão em diferentes espécies. O autor mostra efeitos como aumento no ganho de peso, diminuição da emissão de metano e diminuição da taxa de conversão alimentar. Efeitos positivos também são relatados em cabras, suínos, aves e peixes.

### **2.3 Sistemas *in vitro* fermentação ruminal**

As pesquisas sobre digestibilidade e produção de gases são de extrema importância para a compreensão da nutrição de ruminantes, porém, algumas técnicas *in vivo* e *in situ* tem o uso limitado devido ao alto custo, questões éticas e necessidade de animais fistulados. Portanto, técnicas *in vitro* são uma alternativa para o estudo de alimentos e da fermentação ruminal.

A técnica *in vitro* é um modelo biológico que simula a digestão *in vivo* e os seus processos em diferentes níveis de complexidade. Essa técnica é utilizada para teste de novos alimentos, investigação do metabolismo fermentativo bem como os mecanismos de ação dos microrganismos, novos aditivos, suplementos alimentares e avaliação de fatores antinutricionais (DIJKSTRA et al. 2005).

Segundo HRISTOV et al. (2012) três vantagens da metodologia *in vitro* podem ser citadas: (1) a possibilidade de testar um grande número de tratamentos em um curto período de tempo; (2) capacidade de testar níveis altos de aditivos e até mesmo aditivos potencialmente tóxicos e (3) o baixo custo experimental comparado com metodologias que requerem o uso animal.

Porém, o método possui alguns pontos críticos em relação a digestibilidade: (1) o baixo peso da amostra; (2) dificuldade de manter um alimento padrão para correção de erros causados pela atividade do líquido ruminal; (3) o alimento pode ter baixa produção de gás, mas na digestão *in vivo* pode ter alta digestibilidade e (4) pH dos alimentos e do líquido ruminal influenciando negativamente o crescimento microbiano (MENKE et al. 1979).

Na década de 70, pesquisadores reconheceram que a avaliação da produção de gases da fermentação em conjunto com a composição química da dieta seriam capazes de estimar energia metabolizável do alimento e a degradabilidade ruminal de matéria orgânica (YÁÑEZ-RUIZ et al. 2016).

Para simular o ambiente fermentativo, é necessário um inóculo, que introduz um grau de variação além da variação associada a metodologia. Porém a capacidade de controlar o ambiente ruminal é vista como uma vantagem e favorece o uso dos procedimentos *in vitro* (MOULD et al. 2005). Segundo estes autores, o inóculo utilizado tem o papel de fornecer microrganismos para fermentar e degradar alimentos e assim fornecer uma estimativa de digestibilidade. Portanto, a qualidade desse inóculo bem como as técnicas de amostragem e armazenamento são de extrema importância para resultados com uso preditivo.

YÁÑEZ-RUIZ et al. (2016) escreveram uma revisão com os principais fatores que afetam o procedimento *in vitro* para avaliar a mitigação de metano entérico. Os aspectos chave para considerar em experimentações *in vitro* são: (1) espécie do doador e número de animais usados; (2) dieta do animal doador; (3) coleta e processamento do fluido ruminal; (4) escolha do substrato e tampão de incubação; (5) procedimentos de incubação e medições de CH<sub>4</sub>; (6) composição de gases no *headspace* e (7) comparabilidade com o *in vivo*. Os autores ainda relataram as recomendações indicadas para cada um desses pontos chaves. A padronização de um único método universal não é possível, porém para garantir melhor interpretação dos dados, a harmonização dos procedimentos é desejada.

LÓPEZ (2005) classificou os sistemas *in vitro* em dois tipos: culturas contínuas e incubações em massa (ou culturas *batch*). As culturas contínuas têm adição de tampão e nutrientes e remoção de produtos finais de fermentação, alcançando *steady-state*. Enquanto as incubações em massa são mais simples estimando a digestibilidade ou a extensão da degradação por um ponto final.

Em relação a cultura em massa, a principal desvantagem se dá pelo não alcance do estado de equilíbrio e pela falta do padrão no crescimento microbiano, diminuindo o prazo de avaliação para dias. A medida que o tempo passa, o substrato diminui, os resíduos da fermentação aumentam e a população microbiana diminui (NETO, 2015).

Uma das primeiras metodologias *in vitro* focadas em medições de ponto final e extensão da degradação do substrato foi TILLEY e TERRY (1963). Já em 1979, Menke desenvolveu uma metodologia de medição da pressão proveniente do processo de fermentação de alimentos volumosos em seringas de vidro. Em 1993, Pell e Schofield, adaptaram o modelo de Menke (1979) e foi o primeiro sistema de base de pressão automatizados fornecendo medições em tempo real. Com medições mais frequentes da produção de gases, a cinética de fermentação também pode ser estimada (YÁÑEZ-RUIZ et al. 2016). BLÜMMEL e ØRSKOV (1993) modificaram a metodologia das seringas, incubando-as em banho maria ao invés de uma incubadora rotativa.

WILKINS (1974) descreveu um método diferente para medir os gases usando um transdutor de pressão para detectar o acúmulo de pressão. Ele observou curvas de respostas que seguiam um padrão de três períodos: (1) latência sem aumento na pressão; (2) aumento rápido de pressão e (3) período de nivelamento.

THEODOROU et al. (1994) propuseram modificações nas metodologias que vinham sendo usadas, onde as incubações foram conduzidas em garrafas herméticas permitindo a acumulação de fases no *headspace* durante a fermentação. Dessa forma, esse sistema permite a geração de curvas de produção cumulativa de gases dentro dos frascos de incubação. Recentemente, MUETZEL et al. (2014) desenvolveram um sistema de análise de produção de gás metano e hidrogênio verdadeiramente automático no qual a produção de gases é monitorada em tempo real por meio de sensores de pressão e a proporção de CH<sub>4</sub> e H<sub>2</sub> é medido automaticamente por cromatografia gasosa.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIEC. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. **Beef Report – Perfil da Pecuária no Brasil**. 2021. Disponível em: <http://abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2021/> Acesso em: 05/01/2022.

ADEJORO, F. A. et al. Replacing urea with nitrate as a non-protein nitrogen source increases lambs' growth and reduces methane production, whereas acacia tannin has no effect. **Animal Feed Science and Technology**, v. 259, p. 114360, 2020.

APPUHAMY, J. R. N. et al. Anti-methanogenic effects of monensin in dairy and beef cattle: A meta-analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 8, p. 5161-5173, 2013.

ARCHER, D.; BROVKIN, V. The millennial atmospheric lifetime of anthropogenic CO<sub>2</sub>. **Climatic Change**, v. 90, n. 3, p. 283-297, 2008.

ARCHIMÈDE, H. et al. Comparison of methane production between C3 and C4 grasses and legumes. **Animal Feed Science and Technology**, v. 166, p. 59-64, 2011.

BERCHIELLI, T. T.; MESSANA, J. D.; CANESIN, R. C. Produção de metano entérico em pastagens tropicais. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 13, n. 4, p. 954-968, 2012.

BERGEN, W. G.; BATES, D. B. Ionophores: their effect on production efficiency and mode of action. **Journal of animal science**, v. 58, n. 6, p. 1465-1483, 1984.

BLACK, J. L.; DAVISON, T. M.; BOX, I. Methane Emissions from Ruminants in Australia: Mitigation Potential and Applicability of Mitigation Strategies. **Animals**, v. 11, n. 4, p. 951, 2021.

BLÜMMEL, M.; ØRSKOV, E. R. Comparison of in vitro gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. **Animal Feed Science and Technology**, v. 40, n. 2, p. 109-119, 1993/01/01/ 1993.

CALLAGHAN, M. et al. How feasible is it to replace urea with nitrates to mitigate greenhouse gas emissions from extensively managed beef cattle? **Animal Production Science**, v. 54, n. 9, p. 1300-1304, 2014.

CALVELO PEREIRA, R. et al. Assessment of the influence of biochar on rumen and silage fermentation: A laboratory-scale experiment. **Animal Feed Science and Technology**, v. 196, p. 22-31, 2014/10/01/ 2014.

CEZIMBRA, I. M. et al. Potential of grazing management to improve beef cattle production and mitigate methane emissions in native grasslands of the Pampa biome. **Science of The Total Environment**, v. 780, p. 146582, 2021/08/01/ 2021.

CICERONE, R. J.; OREMLAND, R. S. Biogeochemical aspects of atmospheric methane. **Global biogeochemical cycles**, v. 2, n. 4, p. 299-327, 1988.

COSTA, K. C.; LEIGH, J. A. Metabolic versatility in methanogens. **Current opinion in biotechnology**, v. 29, p. 70-75, 2014.

DEMEYER, D.; HENDERICKX, H. Methane production from glucose in vitro by mixed rumen bacteria. **Biochemical Journal**, v. 105, n. 1, p. 271-277, 1967.

DERAMUS, H. A. et al. Methane emissions of beef cattle on forages: efficiency of grazing management systems. **Journal of environmental quality**, v. 32, n. 1, p. 269-277, 2003.

DIJKSTRA, J.; FORBES, J. M.; FRANCE, J. **Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism**. CABI Pub. Cambridge, 2005.

ELLIS, J. et al. Aspects of rumen microbiology central to mechanistic modelling of methane production in cattle. **The Journal of Agricultural Science**, v. 146, n. 2, p. 213, 2008.

ERICKSON, P. S.; WHITEHOUSE, N. L.; DUNN, M. Activated carbon supplementation of dairy cow diets: Effects on apparent total-tract nutrient digestibility and taste preference. **The Professional Animal Scientist**, v. 27, n. 5, p. 428-434, 2011.

FARRELL, M. et al. Microbial utilisation of biochar-derived carbon. **Science of The Total Environment**, v. 465, p. 288-297, 2013/11/01/ 2013.

FENG, Y. et al. Mechanisms of biochar decreasing methane emission from Chinese paddy soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 46, p. 80-88, 2012.

GURWICK, N. P. et al. A Systematic Review of Biochar Research, with a Focus on Its Stability in situ and Its Promise as a Climate Mitigation Strategy. **PLOS ONE**, v. 8, n. 9, p. e75932, 2013.

GUYADER, J. et al. Additive methane-mitigating effect between linseed oil and nitrate fed to cattle. **Journal of Animal Science**, v. 93, n. 7, p. 3564-3577, 2015.

HANSEN, H.; STORM, I. D.; SELL, A. Effect of biochar on in vitro rumen methane production. **Acta Agriculturae Scandinavica, Section A–Animal Science**, v. 62, n. 4, p. 305-309, 2012.

HARPER, L. et al. Direct measurements of methane emissions from grazing and feedlot cattle. **Journal of Animal Science**, v. 77, n. 6, p. 1392-1401, 1999.

HARVEY, O. R. et al. An Index-Based Approach to Assessing Recalcitrance and Soil Carbon Sequestration Potential of Engineered Black Carbons (Biochars). **Environmental Science & Technology**, v. 46, n. 3, p. 1415-1421, 2012/02/07 2012.

HRISTOV, A. N. et al. A meta-analysis of variability in continuous-culture ruminal fermentation and digestibility data. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 9, p. 5299-5307, 2012.

HULSHOF, R. et al. Dietary nitrate supplementation reduces methane emission in beef cattle fed sugarcane-based diets. **Journal of animal science**, v. 90, n. 7, p. 2317-2323, 2012.

HUNGATE, R. et al. Formate as an intermediate in the bovine rumen fermentation. **Journal of Bacteriology**, v. 102, n. 2, p. 389-397, 1970.

**IPCC. Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.** M.L. PARRY, O. F. C., J.P. PALUTIKOF, P.J. VAN DER LINDEN AND C.E. HANSON: Cambridge University Press 2007.

JOHNSON, K. A.; JOHNSON, D. E. Methane emissions from cattle. **Journal of animal science**, v. 73, n. 8, p. 2483-2492, 1995.

JOSEPH, S.; LEHMANN, J. **Biochar for environmental management: science and technology.** London, GB: Earthscan, 2009.

JOSEPH, S. et al. Feeding Biochar to Cows: An Innovative Solution for Improving Soil Fertility and Farm Productivity. **Pedosphere**, v. 25, p. 666-679, 08/21 2015.

KAMBO, H. S.; DUTTA, A. A comparative review of biochar and hydrochar in terms of production, physico-chemical properties and applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 45, p. 359-378, 2015.

KOZLOSKI, G. V. **Bioquímica dos ruminantes**. Fundação de Apoio a Tecnologia e Ciencia-Editora UFSM, 2017.

LEHMANN, J. et al. Biochar effects on soil biota—a review. **Soil biology and biochemistry**, v. 43, n. 9, p. 1812-1836, 2011.

LENG, R. Interactions between microbial consortia in biofilms: a paradigm shift in rumen microbial ecology and enteric methane mitigation. **Animal Production Science**, v. 54, n. 5, p. 519-543, 2014.

LENG, R.; INTHAPANYA, S.; PRESTON, T. Biochar lowers net methane production from rumen fluid in vitro. **Livestock Research for Rural Development**, v. 24, n. 6, p. 103, 2012a.

\_\_\_\_\_. Methane production is reduced in an in vitro incubation when the rumen fluid is taken from cattle that previously received biochar in their diet. **Gas**, v. 1050, n. 1488, p. 1367, 2012b.

\_\_\_\_\_. All biochars are not equal in lowering methane production in in vitro rumen incubations. **Livest. Res. Rural Dev**, v. 12, p. 12, 2013.

LENG, R.; PRESTON, T. Further considerations of the potential of nitrate as a high affinity electron acceptor to lower enteric methane production in ruminants. **Livestock Research for Rural Development**, v. 22, n. 221, 2010.

LENG, R.; PRESTON, T.; INTHAPANYA, S. Biochar reduces enteric methane and improves growth and feed conversion in local “Yellow” cattle fed cassava root chips and fresh cassava foliage. **Livestock Research for Rural Development**, v. 24, n. 11, 2012.

LOCKYER, D.; JARVIS, S. The measurement of methane losses from grazing animals. **Environmental Pollution**, v. 90, n. 3, p. 383-390, 1995.

- LÓPEZ, S. In vitro and in situ techniques for estimating digestibility. 2005.
- LUND, P. et al. The acute effect of addition of nitrate on in vitro and in vivo methane emission in dairy cows. **Animal Production Science**, v. 54, n. 9, p. 1432-1435, 2014.
- LYNCH, J. et al. Demonstrating GWP\*: a means of reporting warming-equivalent emissions that captures the contrasting impacts of short-and long-lived climate pollutants. **Environmental Research Letters**, v. 15, n. 4, p. 044023, 2020.
- MAN, K. Y. et al. Use of biochar as feed supplements for animal farming. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 51, n. 2, p. 187-217, 2021/01/17 2020.
- MARTIN, C.; MORGAVI, D. P.; DOREAU, M. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. **Animal**, v. 4, n. 3, p. 351-365, 2010.
- MCFARLANE, Z. D. et al. Effect of biochar type and size on in vitro rumen fermentation of orchard grass hay. 2017.
- MCTIC. Estimativas Anuais de Emissões de Gases de Efeito Estufa no Brasil. **5. ed. -- Brasília: Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações.** , v. 71 p. : il., 2020.
- MENKE, K. et al. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. **The Journal of Agricultural Science**, v. 93, n. 1, p. 217-222, 1979.
- MIGEOTTE, M. V. Spectroscopic evidence of methane in the earth's atmosphere. **Physical Review**, v. 73, n. 5, p. 519, 1948.
- MOMBACH, M. A. et al. Emissão de metano entérico por bovinos: o que sabemos e que podemos fazer? , Embrapa Agrossilvipastoril-Artigo em anais de congresso (ALICE), 2016, In: SIMPÓSIO DE PECUÁRIA INTEGRADA, 2., 2016, Sinop.
- MOSS, A. R.; JOUANY, J.-P.; NEWBOLD, J. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Annales de zootechnie*, 2000, EDP Sciences. p.231-253.
- MOULD, F. et al. In vitro microbial inoculum: A review of its function and properties. **Animal Feed Science and Technology**, v. 123, p. 31-50, 2005.



MUETZEL, S.; HUNT, C.; TAVENDALE, M. H. A fully automated incubation system for the measurement of gas production and gas composition. **Animal Feed Science and Technology**, v. 196, p. 1-11, 2014.

MUI, N. T.; LEDIN, I. Effect of method of processing foliage of *Acacia mangium* and inclusion of bamboo charcoal in the diet on performance of growing goats. **Animal Feed Science and Technology**, v. 130, n. 3-4, p. 242-256, 2006.

MURRAY, R.; BRYANT, A.; LENG, R. Rates of production of methane in the rumen and large intestine of sheep. **British Journal of Nutrition**, v. 36, n. 1, p. 1-14, 1976.

NAGARAJA, T. et al. Manipulation of ruminal fermentation. In: (Ed.). **The rumen microbial ecosystem**: Springer, 1997. p.523-632.

NETO, J. T. D. N. Óleo bruto de *Pterodon Emarginatus* Vogel (sucupira) como manipulador da fermentação ruminal em sistema de cultura contínua de duplo fluxo. **Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015., 2015.**

NOLAN, J. V. et al. Managing the rumen to limit the incidence and severity of nitrite poisoning in nitrate-supplemented ruminants. **Animal Production Science**, v. 56, n. 8, p. 1317-1329, 2016.

OLIVEIRA, L. et al. Feed efficiency and enteric methane production of Nellore cattle in the feedlot and on pasture. **Animal Production Science**, v. 58, n. 5, p. 886-893, 2016.

ØRSKOV, E.; FLATT, W.; MOE, P. Fermentation balance approach to estimate extent of fermentation and efficiency of volatile fatty acid formation in ruminants. **Journal of dairy science**, v. 51, n. 9, p. 1429-1435, 1968.

OVCHINNIKOV, Y. A. Physico-chemical basis of ion transport through biological membranes: ionophores and ion channels. **European Journal of Biochemistry**, v. 94, n. 2, p. 321-336, 1979.

PAGE, S. The role of enteric antibiotics in livestock production. **Canberra, Australia: Avcare Ltd, 2003.**

PELL, A.; SCHOFIELD, P. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion in vitro. **Journal of dairy science**, v. 76, n. 4, p. 1063-1073, 1993.

PEREIRA, L. G. R. et al. Enteric methane mitigation strategies in ruminants: a review. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 28, n. 2, p. 124-143, 2015.

PHONGPANITH, S.; INTHAPANYA, S.; PRESTON, T. Effect on feed intake, digestibility and N balance in goats of supplementing a basal diet of Muntingia foliage with biochar and water spinach (*Ipomoea aquatica*). **Livestock Research for Rural Development**, v. 25, n. 2, 2013.

PHONGPHANITH, S.; PRESTON, T. Effect of rice-wine distillers' byproduct and biochar on growth performance and methane emissions in local "Yellow" cattle fed ensiled cassava root, urea, cassava foliage and rice straw. **Livestock Research for Rural Development**, v. 28, p. Article# 178, 2018.

PORSAVATHDY, P. et al. Methane production in an in vitro rumen fermentation of molasses-urea was reduced by supplementation with fresh rather than dried cassava (*Manihot esculenta*, Crantz) leaves and by biochar. **in vitro**, v. 12, n. 12, p. 12, 2017.

PRESSMAN, B. C. Biological applications of ionophores. **Annual review of biochemistry**, v. 45, n. 1, p. 501-530, 1976.

QOMARIYAH, N. et al. Influence of biochar and liquid smoke additives from cacao-pod husks on in vitro ruminal fermentation characteristics. **Adv. Anim. Vet. Sci**, v. 9, n. 4, p. 533-543, 2021.

RAO, S. N.; CHOPRA, R. Influence of sodium bentonite and activated charcoal on aflatoxin M1 excretion in milk of goats. **Small Ruminant Research**, v. 41, n. 3, p. 203-213, 2001.

RUSSELL, J. B.; STROBEL, H. Effect of ionophores on ruminal fermentation. **Applied and environmental microbiology**, v. 55, n. 1, p. 1, 1989.

SALEEM, A. M. et al. Effect of engineered biocarbon on rumen fermentation, microbial protein synthesis, and methane production in an artificial rumen (RUSITEC) fed a high forage diet1. **Journal of Animal Science**, v. 96, n. 8, p. 3121-3130, 2018.

SCHELLING, G. T. Monensin mode of action in the rumen. **Journal of Animal Science**, v. 58, n. 6, p. 1518-1527, 1984.

SCHMIDT, H.-P. et al. The use of biochar in animal feeding. **PeerJ**, v. 7, p. e7373, 2019.

SEEG. Análises das Emissões Brasileiras de Gases de Efeito Estufa e Suas Implicações para as Metas de Clima no Brasil 1970-2019. **Sistema de estimativa de emissões de gases de efeito estufa**, 2020.

SILVESTRE, A. M.; MILLEN, D. D. The 2019 Brazilian survey on nutritional practices provided by feedlot cattle consulting nutritionists. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 50, 2021.

SMITH, P.; REAY, D.; SMITH, J. Agricultural Methane Emissions and the Potential for Mitigation. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical & Engineering Sciences**, 2021.

TATE, K. R. Soil methane oxidation and land-use change—from process to mitigation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 80, p. 260-272, 2015.

TEOH, R. et al. Effects of hardwood biochar on methane production, fermentation characteristics, and the rumen microbiota using rumen simulation. **Frontiers in Microbiology**, p. 1534, 2019.

TERRY, S. A. et al. Effect of a pine enhanced biochar on growth performance, carcass quality, and feeding behavior of feedlot steers. **Translational Animal Science**, v. 4, n. 2, p. 831-838, 2020.

TERRY, S. A. et al. A pine enhanced biochar does not decrease enteric CH<sub>4</sub> emissions, but alters the rumen microbiota. **Frontiers in Veterinary Science**, p. 308, 2019.

THEODOROU, M. K. et al. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. **Animal feed science and technology**, v. 48, n. 3-4, p. 185-197, 1994.

TILLEY, J. M. A.; TERRY, R. A. A TWO-STAGE TECHNIQUE FOR THE IN VITRO DIGESTION OF FORAGE CROPS. **Grass and Forage Science**, v. 18, n. 2, p. 104-111, 1963.

TOTH, J. D.; DOU, Z. Use and impact of biochar and charcoal in animal production systems. **Agricultural and environmental applications of biochar: advances and barriers**, v. 63, p. 199-224, 2016.

UNGERFELD, E.; KOHN, R. The role of thermodynamics in the control of ruminal fermentation. **Ruminant physiology: digestion, metabolism and impact of nutrition on gene expression, immunology and stress**, p. 55-85, 2006.

VAN NEVEL, C. J.; DEMEYER, D. I. Control of rumen methanogenesis. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 42, n. 1, p. 73-97, 1996/09/01 1996.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. Cornell university press, 1994.

VAN ZIJDERVELD, S. et al. Persistency of methane mitigation by dietary nitrate supplementation in dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 94, n. 8, p. 4028-4038, 2011.

VAN ZIJDERVELD, S. M. et al. Nitrate and sulfate: Effective alternative hydrogen sinks for mitigation of ruminal methane production in sheep. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 12, p. 5856-5866, 2010/12/01/ 2010.

WANG, J.; XIONG, Z.; KUZYAKOV, Y. Biochar stability in soil: meta-analysis of decomposition and priming effects. **Gcb Bioenergy**, v. 8, n. 3, p. 512-523, 2016.

WILKINS, J. R. Pressure transducer method for measuring gas production by microorganisms. **Applied microbiology**, v. 27, n. 1, p. 135-140, 1974.

WINDERS, T. M. et al. Evaluation of the effects of biochar on diet digestibility and methane production from growing and finishing steers. **Translational Animal Science**, v. 3, n. 2, p. 775-783, 2019.

YÁÑEZ-RUIZ, D. R. et al. Design, implementation and interpretation of in vitro batch culture experiments to assess enteric methane mitigation in ruminants—a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 216, p. 1-18, 2016/06/01/ 2016.

ZHANG, Z.-W. et al. The Dietary Supplemental Effect of Nitroethanol in Comparison with Monensin on Methane Emission, Growth Performance and Carcass Characteristics in Female Lambs. **Animals**, v. 11, n. 2, p. 327, 2021.

ZHAO, J. et al. New use for biochar derived from bovine manure for tetracycline removal. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 4, p. 105585, 2021/08/01/ 2021.

## CHAPTER 2

*Article formatted according to the Animal Feed Science and Technology.*

### 4. ARTICLE

#### 4.1 Abstract

The objective was to evaluate the effects of biochar on *in vitro* ruminal fermentation, methane production and diet degradation of tropical beef cattle diets high or low in forage and compare with additives that are already being used. The effects were assessed in three different studies: I) Determination of the inclusion level of biochar; II) Comparison of the effects of biochar with monensin and nitrate on ruminal fermentation and gas production; III) Comparison of the effects of biochar with monensin and nitrate on *in vitro* digestibility. There were five treatments for study I (0, 10, 20, 30 and 40mg/kg DM) and four treatments for Studies II and III (control, biochar (40mg/kg DM and 20mg/kg DM for high forage and high concentrate, respectively), monensin (30mg/kg DM) and nitrate (20g/kg DM)). For study I and II, data were collected and analyzed following the randomized block design and for study III were according to a latin square design. In the first study, biochar increasing levels linearly decreased IVDMO ( $P < 0.01$ ), CH<sub>4</sub> proportion (%), production (mL/g DM) and yield (mL/g OMd) ( $P = 0,01$ ) in diets with high inclusion of forage. For diets with high inclusion of concentrate, treatment effects were not detected for *in vitro* digestibilities, but CH<sub>4</sub> proportion, production, and yield presented a cubic effect ( $P < 0.02$ ). The lowest values for CH<sub>4</sub> were observed for 40g of biochar for diets with high forge inclusion and 20 g for diets with high inclusion of concentrate. For study II and diets with high forage inclusion the IVDOM ( $P = 0.05$ ) and NH<sub>3</sub>-N concentration ( $P = 0,02$ ) was affected by the additives, but CH<sub>4</sub> yields were not affected ( $P = 0.14$ ). For the diets with high concentrate inclusion, the highest total GP was verified with biochar inclusion compared to monensin ( $P < 0.05$ ). Treatments did not affect *in vitro* digestibilities and CH<sub>4</sub> proportion, production, as well as yield ( $P > 0.13$ ), NH<sub>3</sub>-N concentration increased by biochar and nitrate compared to control and monensin ( $P < 0.05$ ). For study III and diets with high forage inclusion, IVDMD was highest for monensin ( $P < 0.05$ ), nitrate had greatest IVDMO ( $P < 0.01$ ) and IVDGP was smallest for nitrate than the other treatments ( $P < 0.001$ ). For diets with high concentrate inclusion, biochar and nitrate had the greatest IVDMD ( $P < 0.001$ ). In this case, the IVDMO was higher for nitrate compared to the control, but biochar and monensin were not different

to them ( $P > 0.05$ ). Biochar had a greater IVDCP than control and nitrate, while monensin presented the lowest value ( $P < 0.02$ ). The IVDNDF and IVDHEM were improved with biochar and nitrate addition ( $P < 0.001$ ). We demonstrated that 2 and 4% of biochar inclusion level decrease in about 10 and 20% of  $\text{CH}_4$  yield when high- and low-concentrate diets were incubated, respectively. However, subsequent studies did not present significant  $\text{CH}_4$  reductions with biochar addition, regardless of type of diet.

Keywords: biocarbon, methane, monensin, nitrate, ruminants.

## 4.2 Introduction

Methane ( $\text{CH}_4$ ) is a greenhouse gas produced by anaerobic fermentation in the rumen (Moss et al., 2000) and has been considered a concern due to its negative effects on the environment. Despite having a higher global warming potential (IPCC, 2007),  $\text{CH}_4$  has a shorter residence time in the atmosphere than carbon dioxide ( $\text{CO}_2$ ) (Lynch et al., 2020). In addition to environmental issues, methanogenesis means a loss of energy efficiency on the ruminal fermentation process (Russell and Strobel, 1989; Johnson and Johnson, 1995).

Therefore, to reduce the production of enteric methane many nutritional strategies have been evaluated. Ionophores, such as monensin, which act on the microorganisms involved in the methanogenesis is an example of additive that have shown to reduce methane production in the rumen. However, antibiotics utilization in animal feed has been restricted by international market, due to a possibility to develop resistant pathogens. In this scenario, nitrate is an alternative because it works as a drain for hydrogen, decreasing its availability for methanogens. However, nitrate can pose a risk of poisoning if supplied without adaptation and have a deleterious effect on microorganisms (Van Zijderveld et al., 2011; Leng, 2014).

Hence, natural alternatives, such as biochar, could be able to reduce methane production and thus increase the energy efficiency of fermentation. Biochar is a product from the pyrolysis process that gives to the product characteristics of adsorption, porosity, and recalcitrance (Harvey et al., 2012; Farrell et al., 2013), which brings features such as: changes in the microbiological community soil, carbon retention in soil, complexation of toxins, changes in rumen biofilms, changes in the ratio of methanogenic to methanotrophic bacteria (Erickson et al., 2011; Lehmann et al., 2011; Feng et al., 2012;

Leng et al., 2012a; b; Leng et al., 2012c; Farrell et al., 2013; Toth and Dou, 2016; Wang et al., 2016).

In this scenario, we hypothesize that the use of biochar of beef cattle diets, would reduce methane production and improve ruminal fermentation *in vitro*. Therefore, the aim of the present study was to evaluate biochar effects on ruminal *in vitro* fermentation parameters and methane production of tropical beef cattle diets containing high or low forage proportion.

### **4.3 Material and methods**

All experimental procedures involving animals followed the ethical precepts for animal studies. For this purpose, this project was reviewed and approved by the Committee of Ethics in the Use of Animals of the Federal University of Lavras (Protocol number 029/20). The experiment was conducted at the Animal Research Laboratory and in the feedlot facilities of Department of Animal Science, College of Animal Science and Veterinarian Medicine (DZO/FZMV) in Lavras, Minas Gerais, Brazil.

This experiment was divided in three studies, that will be discriminated ahead. The Study I was conducted to define the optimal dose of biochar that reduces the CH<sub>4</sub> production without negatively affecting the digestibility. With the optimal dose, more two studies were conducted to determinate the effects of biochar on ruminal fermentation, methane production and gas production (Study II) and *in vitro* digestibility (Study III) of beef cattle diets. All the studies were conducted in two different productive scenarios, simulating high forage inclusion (Exp.1, Exp.3, Exp.5) and high inclusion of concentrate (Exp.2, Exp.4, Exp.6) (Figure 1).

#### **4.3.1 Biochar production**

The biochar for the present study was produced from sawmill waste (sawdust) collected in wood industries. To obtain the biochar, the saw powder was processed in a slow pyrolysis reactor, whose temperature was progressively increased 100°C to 100°C until the final carbonization phase, which took place at 600°C. Biochar was activated with the injection of superheated steam in the final step of the pyrolysis process. This activation treatment was carried out to eliminate condensable volatile compounds formed during the

pyrolysis process, unclogging the pores, and increasing the specific surface area. Some chemical and physical characteristics of biochar are shown in Table 1.

#### **4.3.2 Study I - Determination of the inclusion level of biochar of beef cattle diets**

The first study was performed to evaluate the effects of increasing levels of biochar on gas and CH<sub>4</sub> production of two beef cattle diets to simulate: diet with high forage inclusion (**Exp. 1**), and diet with high concentrate inclusion (**Exp. 2**). The treatments were five levels of biochar: 0, 10, 20, 30 e 40 g/kg dry matter (DM) in four independent incubation runs with four replicate per treatment and four blanks for each type of substrate, totalizing 48 observations per run. For the Exp. 1, substrate was constituted by 800g of low-quality grass/kg DM to simulate the situation of high forage inclusion as observed in similar *in vivo* experiments (Detmann et al., 2001; Porto et al., 2011). For the Exp. 2, the substrate had a high proportion of concentrate (800 g of concentrate/kg DM) and will be established in order to represent the current feeding condition in Brazilian feedlots (Pinto and Millen, 2016). The forage was collected during the dry season cutting of the forage available in a signal grass pasture located in the southwest region of Brazil. For the high inclusion of concentrate situation, substrate was constituted by 200 g of corn silage and 800 g/kg DM of concentrate. Each one of the substrates was implemented to represent a practical situation that could have beneficial results of additives, related to the supplementation of grazing rearing cattle or finishing phase in the feedlot.

##### **4.3.2.1 Ruminal fluid collection and buffer solutions preparation**

Rumen inoculum for Exp. 1 was collected from 2 non-pregnant cows ruminally cannulated zebu cattle (average BW of  $560 \pm 102.5$  kg) grazing Marandu palisade grass (*Brachiaria brizantha*) pasture and received 2.0 kg/day of concentrate (DM basis; approximately 77% corn, 5% soybean meal, 8% urea, and 10% mineral mixture) provided once daily. On the other hand, inoculum for Exp. 2 was collected from 2 ruminally fistulated Nelore heifers (average BW of  $481 \pm 107,5$  kg) fed a total mixed ration with 20:80 forage:concentrate ratio (DM basis). The diets were provided for cows and steers for 2 weeks to ensure the ruminal microbial ecosystem had properly adapted to the



respective diets. The ruminal digesta of each animal was collected before the morning feed in different points of the rumen. About 1 L of rumen fluid was collected from each heifer, immediately filtered through cheesecloth and kept into pre-warmed thermal containers and immediately transported to the lab. The rumen fluid of the two animals for each experiment was mixed following the recommendations of Yáñez-Ruiz et al. (2016).

The buffer mineral solutions of both experiments were prepared according Menke and Steingass (1988), with the addition of sodium sulfite (Gemedá et al., 2014). The buffer solution was kept in a water bath at 39°C and purged continuously under anaerobic conditions by flushing CO<sub>2</sub>. The ruminal fluid was mixed with the buffer solution by the ratio 1:2 vol/vol and then later was added to the incubation flasks.

#### **4.3.2.2 *In vitro* gas production and digestibility**

Aliquots of each substrate (500 mg DM) was weighed into serum bottles (120 mL). Before inclusion into the substrates, all ingredients were air dried for at least 48 h and ground to pass a 1-mm screen (except, urea and calcium ammonium nitrate which was ground using mortar and pestle, and mineral supplement which was in a powdered form). Before incubation, substrates were hydrated with 2 mL of deionized water to avoid the particle dispersion. Then, 50 mL of the mixture of ruminal fluid and buffer solution were added into each bottle under CO<sub>2</sub> flushing, following by the sealing with rubber stoppers.

The bottles were maintained in a climatized room (39 ± 1°C) for 48 hours. The pressure of gas produced was recorded at 0, 6, 12, 24, and 48h using the pressure transducer (Extech Instruments, Waltham, USA) as described by Theodorou et al. (1994). The gas volume produced (ml) was calculated as 6.571 × measured pressure (psi), according to an equation adjusted in the UFLA Animal Research Laboratory that was prepared after injecting increasing volumes of gas into vials and measuring their corresponding pressures. The net cumulative GP was obtained during 48 h of incubation.

Methane was determined after 48 h of incubation by collecting 20 ml of gas from the bottle headspace using a 20 ml syringe and stored in a 10 ml vacuum tube of the bottles that were not emptied during the incubation. The proportion of methane was analyzed by gas chromatography. After the gas sampling, bottles were then opened, and contents of each serum bottle were filtered under vacuum through glass crucibles with a sintered filter (coarse porosity no. 1, pore size 100 to 160 µm; Pyrex, Stone, UK). The

fluid pH was measured with a pH meter (HI 2221, Portable pH meter; Hanna Instruments) by submerging the probe approximately 3 cm in the fermentation media. After that, fermentation residues in grass crucibles were dried at 105°C overnight to estimate DM disappearance with loss in weight after drying being the measure of undegradable DM. For the evaluation of the OM residue, crucibles were incinerated in a muffle (500°C/4 h) to obtain the inorganic residue and to estimate the *in vitro* digestibility of OM (DIVOM).

#### **4.3.2.3 Chemical analysis**

Samples of ingredients were analyzed for dry matter content (INCT-CA method G-003/1), organic matter (OM, INCT-CA method M-001/1), crude protein (CP, INCT-CA method N-001/1), neutral detergent fiber (NDF, using thermostable  $\alpha$ -amylase and omitting the use of sodium sulfite; INCT-CA method F-002/1) and acid detergent fiber (ADF, INCT-CA method F-002/2) according to the methods defined by the National Institute of Science and Technology in Animal Science (INCT-CA;(Detmann et al., 2012)). Ingredient proportion and chemical composition of the experimental diets are presented in Table 2.

#### **4.3.2.4 Definition of Biochar Inclusion Level**

The criterion used to select the best biochar inclusion level for forage-based and feedlot diets was the lowest level that reduces CH<sub>4</sub> production by at least 15% [based on studies of Leng et al. (2012c) e Saleem et al. (2018)] and that does not have any adverse effect on the *in vitro* digestibility and the total gas production. After evaluating the increasing levels of biochar and defining the best level of inclusion, Study II and Study III were conducted to compare the effects of biochar, monensin, and nitrate on ruminal fermentation (Study II); and *in vitro* digestibility (Study III) of beef cattle diets in two contrasting situations, high forage inclusion and high inclusion of concentrate.

#### **4.3.3 Study II – Comparison effects between biochar, monensin and nitrate on ruminal *in vitro* fermentation and gas production of beef cattle diets**

After defined the best biochar inclusion level at study I, study II was carried out to compare the effects of biochar, monensin, and nitrate on *in vitro* gas and CH<sub>4</sub>

production. By using similar substrates described in Study I, another four independent incubations runs were conducted following a randomized block design. As reported above for Exp. 1 and Exp. 2, **Exp. 3** was assigned to simulate a diet with high forage inclusion, and **Exp. 4** for diet with high inclusion of concentrate. Then, there were four treatments: i) negative control, without additive; ii) better level of inclusion of biochar (40 and 20 g/kg DM at Exp. 3 and Exp. 4, respectively); iii) monensin (30 mg/kg DM; Bovensin® 200, Phibro, EUA), and iv) calcium ammonium nitrate (20 g/kg DM; Calcinit, Yara International ASA, Oslo, Norway). Monensin was added as a positive control on methanogenic microorganisms, while nitrate was a positive control for H<sub>2</sub> uptake and reduction of methanogenesis. Ingredient proportion and chemical composition of the experimental diets are presented in Table 3.

The ruminal fluids of Exp. 3 and Exp. 4 were obtained from four ruminal cannulated Nellore non-pregnant cows (467 ± 69.5 kg body weight). The cows were assigned to a 4 × 4 balanced Latin square design (4 animals × 4 periods). The treatments consisted of the use of ruminal fluid adapted for 12 days within each period to the four treatments (control, biochar, monensin, and nitrate; Machado et al., 2016). The cows were fed a corn-silage based diet with a forage-to-concentrate ratio of 60:40 to maximize microbial activity (Nagadi et al., 2000). Solid fraction was also collected with the ruminal fluid. The inoculum was prepared after mixing the ruminal fluid plus the solid fraction in a blender and filtered by a cheesecloth (Holden, 1999). Treatments at Exp. 3 and 4 were incubated in four 96- and 48-h to assess the *in vitro* GP profiles and enteric CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> production. It was incubated six repetitions and four blanks for each dietary situation in each experiment, totalized 52 repetitions per run.

#### 4.3.3.1 Partitioning Factor

The partitioning factor at the end of incubations (**PF**; a measure of fermentation efficiency) was calculated as the ratio of DM degraded *in vitro* (DMD, mg) to the volume (mL) of GP (i.e., DMD/total GP), according to Blümmel et al. (1997). A higher PF means that a greater proportion of substrate was assimilated by microbial cells and a lower proportion of substrate used for volatile fatty acids and gas production. This variable is expressed as mg DM degrade/mL of gas (Baba et al., 2002) and express the amount of energy actually degraded to produce 1 mL of gas (Blümmel et al., 1997).

$$PF (mg OM_d/mL) = \frac{OM_d}{GP}$$

#### 4.3.3.2 *In vitro* gas production

Following the same procedure of incubation used in Study I, gas pressure was measured at 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 30, 36, 48, 72 and 96 hours, according to each dietary conditions. With six repetitions, two of them was designated to measurements at all times, two was designated to the initial and final measurement and the other two was exclusive for sampling gas for methane analysis. The sample for methane analysis was collected all at the same time, 48 hours after the incubation, for both experiments. For all times of measured, the bottle was vented. For the total gas production over the time, the cumulative pressure values were adjusted to assess biological values using the following dual-pool model (Schofield et al., 1994):

$$V_t = \frac{V_1}{1 + \left( \exp \left( 2 + 4 \times (C_1 \times (L - time)) \right) \right)} + \frac{V_2}{1 + \left( \exp \left( 2 + 4 \times (C_2 \times (L - time)) \right) \right)}$$

where:  $V_t$  = gas volume produced up to the specific time, mL;  $V_1$  and  $V_2$  = maximum gas volume achieved from complete digestion of each pool, mL;  $C_1$  and  $C_2$  = specific rate of digestion of each pool,  $h^{-1}$ ;  $L_t$  = lag time, h.

#### 4.3.3.3 Ammonia nitrogen (NH<sub>3</sub>-N)

For both experiments, subsamples of 2 mL from the filtrate liquid after each incubation. Samples were collected and placed into Eppendorfs with 20  $\mu$ L of sulfuric acid to preserve and frozen at -20°C until analysis. Samples were used to determinate NH<sub>3</sub>-N concentration by the colorimetric method (INCT-CA method N-006/1; Detmann et al., 2012).

#### 4.3.4 Study III – Comparison of the effects of biochar with monensin and nitrate on *in vitro* digestibility of beef cattle diets

The **Exp. 5** was assigned to simulate a diet with high forage inclusion, and **Exp. 6** for diet with high inclusion of concentrate and the rumen fluid collection procedures were similar to the previous study. Four runs of incubation were realized, for each of the dietary situations, utilizing artificial fermenter TE-150 (Tecnal Equipamentos Científicos, Piracicaba, SP, Brasil) (Silva et al., 2017; Camacho et al., 2019). The treatments were similar to Study II and were evaluated following a balanced Latin square design  $4 \times 4$ , each of the four treatments being applied to one of the jars in each battery, totaling 4 repetitions per treatment.

The substrates of each treatment were heavy individually (500 mg) in heat-sealed nonwoven textile filter bags ( $100 \text{ g/m}^2$ ) of  $4 \times 4.5 \text{ cm}$  (Valente et al., 2011). The filter bags were washed following the method suggested by Detmann et al. (2012). The fermenter possessed 4 jars and each jar randomly received 1 treatment for each battery. Besides, each jar received 24 filter bags (18 containing substrate and six blank filter bag) and 400 mL of ruminal inoculum and 1,600 mL of buffer solution, which were prepared according McDougall (1948). Before close and placed the jar into the fermenter, the head space was exhaust by  $\text{CO}_2$ .

After 96-h for diets with high forage inclusion and 48-h of incubation for diets with high inclusion of concentrate, as reported at Exp. 3 and Exp. 4, respectively, filter bags were washed using hot distilled water until the water became clear, and bags were gently pressed to remove gases. Then, to estimate the apparently undigested DM residue, the others filter bags were oven-dried ( $55 \text{ }^\circ\text{C}/24 \text{ h}$  and  $105^\circ\text{C}/16 \text{ h}$ , sequentially), placed in a desiccator, and weighed. All filter bags were submitted to the oven-dried process. After this, five filter bags plus 2 blanks were submitted to the analyzes of organic matter (OM), neutral and acid detergent fiber (NDF and ADF) and crude protein (CP) to calculated *in vitro* digestibility of dry matter (IVDMD), *in vitro* digestibility of organic matter (IVDOM), *in vitro* digestibility of NDF (IVDNDF), *in vitro* digestibility of ADF (IVDADF) and *in vitro* digestibility of PB (IVPBD), respectively.

For the IVMDO evaluations, filter bags containing the incubation residues after over-dried were placed into crucibles and were incinerated in a muffle ( $600^\circ\text{C}/4 \text{ h}$ ) to obtain the inorganic residue. For the IVDNDF evaluations, the filter bags were placed into a plastic beaker with 50 mL of neutral detergent solution per sample and 250  $\mu\text{L}$  of

a heat-stable amylase (Termamyl 2X, Novozymes, São Paulo, Brazil). Then, the beaker was autoclaved for 1 hour at 100 °C according Detmann et al. (2012). Sequentially, the filter bags were washed again with hot distilled water and acetone, dried and weighted to obtain the NDF residue. Posteriorly, the filter bags were autoclaved again with the acid detergent solution to obtain the IVDADF, following the same procedure for the NDF residue. The hemicellulose (HEM) was calculated by the difference between NDF and ADF. To evaluate the IVPBD, five filter bags and two blanks were analyzed for the nitrogen content (INCT-CA N-001/1; Detmann *et al.*, 2012) considering the factor 6.25, the residue of CP was obtained.

The digestibility coefficients were calculated according to the following equation

$$(g/kg) = \frac{[M - (R - B)]}{M} \times 1000$$

where; M = mass of DM, OM, NDF, ADF or CP incubated (g); R= residue of DM, OM, NDF, ADF or CP from incubation (g); B = residue of DM, OM, NDF, ADF or CP obtained in “white” filter bags (g).

#### 4.3.5 Statistical Analysis

All the results were tested for normality ( $P > 0,05$ ). For study I, the mean of the bottles ( $n = 4$ ) of each treatment in each incubation (true replication) were considered as experimental units. Comparisons between means of treatments with increasing levels of inclusion of biochar were performed by decomposing the sum of squares related to this source of variation in orthogonal contrasts comparing the control treatment (without addition of additives) vs. treatments containing biochar (10, 20, 30 and 40 g/kg DM); the other related to the effects of linear, quadratic, and cubic order of biochar inclusion levels. Data were collected and analyzed following the randomized block design using the mixed model methodology with treatments considered as fixed factors (4 degrees of freedom) and batteries of incubation considered as a random effect (3 degrees of freedom). For study II, the true replication and the experimental design was the same as study I, but with different degrees of freedom for treatments (3 degrees of freedom). For Study III, the experimental units were the mean of the filter bags of each jar in each battery of incubation (true replication), being IVDMD,  $n = 15$ , IVDOM, IVDNDF, IVDADF,  $n = 5$ , and data were collected and analyzed according to a Latin square design, with treatments and jar considered fixed effects and incubation battery as random effect.

All the statistical procedures were conducted using PROC MIXED implemented in the SAS (Statistical Analysis System, version 9.4) program, adopting the critical level of 0.05 probability for type I error, with tendencies associated with P-values between 0.05 and 0.10.

## **4.4 Results**

### **4.4.1 Effects of biochar increasing levels of beef cattle diets (Exp. 1 and 2)**

For the Exp. 1, biochar increasing levels linearly decreased IVDMO ( $P < 0.01$ ; Table 4), without affect total GP. Methane proportion (%), production (mL/g DM), and yield (mL/g OMD) linearly decreased according to the biochar inclusion ( $P = 0.01$ ). The addition of 40 g of biochar/kg DM reduced CH<sub>4</sub> yield in about 15% compared with the control. For Exp. 2, total GP was also not affected to the increasing levels of biochar (Table 4). Treatment effects were not detected for *in vitro* digestibilities, but CH<sub>4</sub> proportion, production, and yield presented a cubic effect ( $P < 0.02$ ) with provision of biochar. Following a similar pattern of total GP, lowest values of CH<sub>4</sub> yield were observed for 20 g of biochar. In average, CH<sub>4</sub> yield reduction was 11% compared to the control.

### **4.4.2 Comparative effects between biochar, monensin, and nitrate on ruminal *in vitro* fermentation of beef cattle diets (Exp. 3 and 4)**

The IVDOM in Exp. 3 (Table 5) was affected by the additives ( $P = 0.05$ ). Monensin showed the lowest value compared to control and nitrate ( $P < 0.05$ ). Moreover, NH<sub>3</sub>-N concentration was affected by the treatments ( $P = 0.02$ ). When nitrate was included, NH<sub>3</sub>-N concentration significantly increased ( $P < 0.05$ ) compared to control and monensin, but it was similar to biochar. The CH<sub>4</sub> yields were not affected by the treatments ( $P = 0.14$ ), although they reduced in about 20% when biochar and nitrate was included. For Exp. 4, tendency of treatment effects was observed on total GP ( $P = 0.08$ ). The highest total GP was verified with biochar inclusion compared to monensin, but control and nitrate was similar to them ( $P < 0.05$ ). Treatments did not affect the *in vitro* digestibilities and CH<sub>4</sub> proportion, production, as well as yield ( $P > 0.13$ ). However, NH<sub>3</sub>-N concentration increased by biochar and nitrate compared to control and monensin (53.3

and 55.9 vs. 45.8 and 44.9 mg/dL, respectively;  $P < 0.05$ ). The kinetic variables (Table 7) were not affected by the different additives ( $P > 0.05$ ) in both experiments (Exp. 3 and 4).

#### **4.4.3 Comparative effects between biochar, monensin, and nitrate on ruminal *in vitro* digestibilities of beef cattle diets (Exp. 5 and 6)**

A description of the *in vitro* digestibilities for the Exp. 5 for diets with high inclusion of forage and Exp. 6 for diets with high inclusion of concentrate are shown in Table 6. For Exp. 5, IVDMD was highest for monensin, intermediate for nitrate and biochar, and lowest for control ( $P < 0.05$ ). On the other hand, nitrate had greatest IVDMO than monensin and biochar ( $P < 0.01$ ), while control did not differ between them ( $P > 0.05$ ). The IVDCP was smallest for nitrate than the other treatments ( $P < 0.001$ ). For Exp. 6, biochar and nitrate had the greatest IVDMD ( $P < 0.001$ ) than control and monensin. The IVDMO was higher for nitrate compared to the control, but biochar and monensin were not different to them ( $P > 0.05$ ). Biochar had a greater IVDCP than control and nitrate, while monensin presented the lowest value ( $P < 0.02$ ). The IVDNDF and IVDHEM were improved with biochar and nitrate addition ( $P < 0.001$ ). The lowest fibrous digestibilities were verified with monensin ( $P < 0.001$ ), while control had intermediate values between other additives.

### **4.5 Discussion**

#### **4.5.1 Effects of biochar increasing levels of beef cattle diets (Exp. 1 and 2)**

We evaluated the inclusion of biochar on the rumen fermentation, methane production and digestibility because it has been suggested positive effects by previous studies (Hansen et al., 2012; Leng et al., 2012b; Saleem et al., 2018). It was demonstrated that biochar has a potential as a feed additive to control the methanogenesis and consequently efficiency of fermentation. But recent studies did not show positives effects on the ruminal fermentation, digestibility, volatile fatty acids, N-NH<sub>3</sub>, microbial protein synthesis, and methane production (Teoh et al., 2019; PaulTamayao et al., 2021; Tamayao et al., 2021a; Mengistu et al., 2022; Tamayao et al., 2022).



Our results show that the biochar did not affect the *in vitro* GP, independent of the dietary characteristics (Table 4) which are consistent with previous studies (Hansen et al., 2012; Leng et al., 2012a; Pereira et al., 2014; Saleem et al., 2018; Teoh et al., 2019; Qomariyah et al., 2021). The present study reveals that the addition of biochar in increasing levels in more fibrous diets (Exp. 1) reduces linearly the IVDMO. Erickson et al. (2011) and Teoh et al. (2019) suggests that the effectiveness of biochar can be related with the quality of the forage used, which was also reported by McFarlane et al. (2017). These authors proposed that biochar selectively improved fermentation kinetics when incubated with forage of intermediate quality, in contrast to higher-quality roughages. Our first experiment used a low-quality tropical grass harvest during the dry season, while Exp. 2 carried out to simulate a diet with high-concentrate inclusion and corn silage as forage. In accordance with these authors, we did not found significance in DM digestibility with increasing levels of biochar at Exp.2, but we had linear decrease on IVDMO at Exp. 1.

When more fibrous diets were incubated (Exp. 1) the increasing level of biochar reduces linearly the CH<sub>4</sub> production. However, when high-concentrate diet was incubated (Exp. 2), CH<sub>4</sub> proportion, production, and yield responded cubically. Despite this unexpected pattern, differences between the two contrasting diets were expected. In general, CH<sub>4</sub> variables were lowest with addition of 20 g biochar/kg. These results are also consistent with previous studies where biochar reduced CH<sub>4</sub> emissions *in vitro* and *in vivo* (Leng et al., 2012a; b; Leng et al., 2012c; Leng et al., 2013; Porsavathdy et al., 2017; Saleem et al., 2018). Leng et al. (2012a) evaluated the increasing level of biochar and found a reduction of 12% in methane production by adding 1% of biochar. These authors suggested that this is due of the large surface area of biochar, which can provide a favorable habit changing the methanogenic methanotrophic interaction, increasing the methane oxidation. Also, they discard the possibility of a toxic effect of biochar on methanogenic. Another possibility is that the biofilms increase the efficiency of ATP production and utilization (Leng et al., 2012c) because microbial cells are more reduced then the substrate they use and are therefore a hydrogen sink. Another theory of how biochar works is that the porous structure possibly adsorbed the CH<sub>4</sub> (Hansen et al., 2012; Toth and Dou, 2016). But this physical theory is questionable due to the volume of CH<sub>4</sub> produced and the availability of biochar in the rumen (Saleem et al., 2018). The large surface area of biochar allows the formation of biofilms that increase the microbial efficiency (Leng et al., 2012c). Our biochar has an surface area of 571 m<sup>2</sup>/g, while Leng

et al. (2012c) reported the mean of 2-40 m<sup>2</sup>/g and are also different from the number reported by Terry et al. (2019) that was 200-250 m<sup>2</sup>/g. In most cases, the methodology used to measure the surface area is not reported, different methodologies can change the final porosity value and therefore it is difficult to compare the results between works.

We hypothesized that inclusion level of biocarbon to reduce CH<sub>4</sub> production and improve the ruminal fermentation is dependent of dietary characteristics. Our hypothesis was confirmed because the inclusion level to reduce CH<sub>4</sub> yield, at least 10%, it was 40 g/kg for high-forage diet (Exp. 1) and 20 g/kg for high-concentrate diet (Exp. 2). Nevertheless, following experiments carried out to compare biochar inclusion with other additives did not demonstrate differences regarding CH<sub>4</sub> production.

#### **4.5.2 Comparative effects between biochar, monensin, and nitrate on ruminal *in vitro* fermentation and digestibility of beef cattle diets (Exp. 3 to 6)**

The ruminal CH<sub>4</sub> is dependent on carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) and hydrogen (H<sub>2</sub>) availability (Miller, 1995). In this sense, metabolic pathways which the H<sub>2</sub> production and utilization are involved are important factors that should be considered when developing strategies to reduce CH<sub>4</sub> emissions from ruminants (Martin et al., 2010). In the rumen, nitrate is reduced to ammonia (NH<sub>3</sub>), and this reaction provides an alternative - and energetically more favorable - pathway for disposal of H<sub>2</sub> generated during fermentation (Ungerfeld and Kohn, 2006). Stoichiometrically, if all nitrate is reduced to NH<sub>3</sub>, then CH<sub>4</sub> production should decrease by 25.8 g/100 g NIT (Leng and Preston, 2010). On the other hand, monensin reduces acetate-producing bacteria and protozoal populations, especially *Entodinium* spp., that utilize CO<sub>2</sub> for H<sub>2</sub> disposal (Chen and Wolin, 1979; Guan et al., 2006), consequently reducing CH<sub>4</sub> production. As reported before, biochar affects CH<sub>4</sub> production due to large surface area, possibility of a toxic effect of biochar on methanogenic, porous structure that adsorbed the CH<sub>4</sub>, and other theories. Due to the different mechanism of the biochar to control methanogenesis than nitrate and monensin, we compare them after defining the best level of inclusion with the different diets.

Due to the lower CH<sub>4</sub> production in feedlot than grazing cattle, there are few studies that test additives for this purpose. Winders et al. (2019) evaluated the effects of increasing biochar levels on digestibility, CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> production of beef cattle receiving finishing diets. These authors found no difference in CH<sub>4</sub> production in the finishing

study, but a numeric decreased in about 10 and 18% on CH<sub>4</sub> production and yield, respectively, there was no explanation about why this happened. Others studies also did not find significance difference about CH<sub>4</sub> production (Hansen et al., 2012; McFarlane et al., 2017; Teoh et al., 2019; PaulTamayao et al., 2021; Tamayao et al., 2021a; Mengistu et al., 2022; Tamayao et al., 2022). In agreement with these studies, we did not find significant effect on CH<sub>4</sub> production and yield when biochar was included at the Exp. 3 and 4, even with a reduction of about 20 and 10% on CH<sub>4</sub> yield, respectively. According to Terry et al. (2019), the point that biochar favors the formation of more efficient biofilms is questionable. These biofilms maybe favors more the increase of methanogens than methanotrophic microorganisms. Other justifications for the lack of results it is related to differences on the experimental design, gas sampling, and also intrinsic characteristics of each biochar.

The lack of significance observed on the GP, *in vitro* digestibility and methane variables in Exp. 3 and 4 differ from Capelari and Powers (2017), which were observed a reduction in the total GP and methane using when nitrate and monensin were added. In the trials of these authors, CH<sub>4</sub> mitigation observed with nitrate and monensin was about 67 and 52%, respectively. Different that study, we collected ruminal fluid samples from cattle fed the additives. Therefore, differences compared to our experiments could be due to the ruminal fluid characteristics.

The NH<sub>3</sub>-N concentrations in the *in vitro* fluid were improved when nitrate and biochar were included, while reduced with monensin addition in the Exp. 3 and 4. This variable is a protein metabolism indicator that represents the extent of protein degradation by rumen microbes (Sujarnoko et al., 2020). With a high availability of NH<sub>3</sub>-N, microorganisms are able to increase the protein synthesis (Qomariyah et al., 2021). However, only the greater NH<sub>3</sub>-N concentrations for biochar suggest an increase on AA deamination (Saleem et al., 2018), because the IVDCP was significantly enhanced (Table 6) at Exp. 4. The higher NH<sub>3</sub>-N concentration in fluid with nitrate was not expected, because all diets were isonitrogenous and nitrate was replaced by another nitrogen source in the control diet. On the other hand, monensin lowered protein degradation due to the effects on inhibition of Gram-positive bacteria presented in ruminal fluid (Van Nevel and Demeyer, 1977). This is corroborated by the lowest IVDCP verified in Exp. 5 and 6.

The results of *in vitro* digestibility in Exp. 5 were consistent with previous studies that do not show positive effects of biochar on *in vitro* or *in vivo* digestibility (Hansen et al., 2012; Tamayao et al., 2021a; Tamayao et al., 2021b; Mengistu et al., 2022; Tamayao

et al., 2022). However, other studies had found improvements in digestibility (Erickson et al., 2011; Leng et al., 2012a). These differences among studies may be due to differing sources of biochar, biomass source, particle size, and pyrolysis conditions which may alter rumen fermentation to varying degrees (Hansen et al., 2012; McFarlane et al., 2017). The biochar-starting material as well as temperature of pyrolysis may also contribute to the absorptive potential of biochar (Lehmann and Joseph, 2009). When biochar is subjected to low temperatures of pyrolysis during carbonization, it has been noted that surface area per unit weight is reduced, potentially decreasing its capacity to adsorb nutrients and provide a habitat suitable for the formation of biofilms (Leng, 2014). Other factor is the differences regarding the methodology. Biochar used in the Hansen et al. (2012) and Saleem et al. (2018) studies was made from wood or straw, whereas biochar in the Leng et al. (2012a, 2012b, 2013) studies was derived from rice husks. On the other hand, our biochar is from sawmill waste (sawdust) collected in wood industries.

Contrary to the Exp.5, at Exp. 6 our hypothesis that biochar can enhance the digestibility was confirmed. The greater *in vitro* digestibility in biochar treatment may be explained by an increase in microbial efficiency (Saleem et al., 2018) or the complexation of secondary metabolites that may interfere in the digestion (Mui and Ledin, 2006). The increase on the *in vitro* digestibility suggests that ruminal microbial population were more efficient than other treatments. Nevertheless, partitioning factor which is an indicator of microbial efficiency (ratio of substrate truly degraded to gas volume; Blümmel et al., 1997a) was not affected.

#### **4.6 Conclusion**

We demonstrated that 2 and 4% of biochar inclusion level decrease in about 10 and 20% of CH<sub>4</sub> yield when high- and low-concentrate diets were incubated, respectively. However, subsequent studies did not present significant CH<sub>4</sub> reductions with biochar addition, regardless of type of diet. Nevertheless, an improvement in substrate digestibility with high-concentrate diet was verified.

## 4.7 References

- Adejoro, F. A. et al. Replacing urea with nitrate as a non-protein nitrogen source increases lambs' growth and reduces methane production, whereas acacia tannin has no effect. *Animal Feed Science and Technology*, v. 259, p. 114360, 2020.
- Appuhamy, J. R. N. et al. Anti-methanogenic effects of monensin in dairy and beef cattle: A meta-analysis. *Journal of Dairy Science*, v. 96, n. 8, p. 5161-5173, 2013.
- Archer, D.; BROVKIN, V. The millennial atmospheric lifetime of anthropogenic CO<sub>2</sub>. *Climatic Change*, v. 90, n. 3, p. 283-297, 2008.
- Archimède, H. et al. Comparison of methane production between C3 and C4 grasses and legumes. *Animal Feed Science and Technology*, v. 166, p. 59-64, 2011.
- Berchielli, T. T.; MESSANA, J. D.; CANESIN, R. C. Produção de metano entérico em pastagens tropicais. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v. 13, n. 4, p. 954-968, 2012.
- Bergen, W. G.; BATES, D. B. Ionophores: their effect on production efficiency and mode of action. *Journal of animal science*, v. 58, n. 6, p. 1465-1483, 1984.
- Black, J. L.; DAVISON, T. M.; BOX, I. Methane Emissions from Ruminants in Australia: Mitigation Potential and Applicability of Mitigation Strategies. *Animals*, v. 11, n. 4, p. 951, 2021.
- Blümmel, M.; ØRSKOV, E. R. Comparison of in vitro gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. *Animal Feed Science and Technology*, v. 40, n. 2, p. 109-119, 1993/01/01/ 1993.
- Baba, A., Castro, F., Ørskov, E., 2002. Partitioning of energy and degradability of browse plants in vitro and the implications of blocking the effects of tannin by the addition of polyethylene glycol. *Animal Feed Science and Technology* 95, 93-104.
- Blümmel, M., Steingaß, H., Becker, K., 1997. The relationship between in vitro gas production, in vitro microbial biomass yield and 15N incorporation and its implications for the prediction of voluntary feed intake of roughages. *British Journal of Nutrition* 77, 911-921.
- Callaghan, M. et al. How feasible is it to replace urea with nitrates to mitigate greenhouse gas emissions from extensively managed beef cattle? *Animal Production Science*, v. 54, n. 9, p. 1300-1304, 2014.
- Calvelo pereira, R. et al. Assessment of the influence of biochar on rumen and silage fermentation: A laboratory-scale experiment. *Animal Feed Science and Technology*, v. 196, p. 22-31, 2014/10/01/ 2014.
- Camacho, L.F., Silva, T.E., Palma, M.N., Assunção, A.S., Rodrigues, J.P., Costa e Silva, L.F., Detmann, E., 2019. Evaluation of buffer solutions and urea addition for estimating the in vitro digestibility of feeds. *J. Anim. Sci.* 97, 922-931.
- Capelari, M., Powers, W., 2017. The effect of nitrate and monensin on in vitro ruminal fermentation. *Journal of animal science* 95, 5112-5123.

Cezimbra, I. M. et al. Potential of grazing management to improve beef cattle production and mitigate methane emissions in native grasslands of the Pampa biome. *Science of The Total Environment*, v. 780, p. 146582, 2021/08/01/ 2021.

Cicerone, R. J.; OREMLAND, R. S. Biogeochemical aspects of atmospheric methane. *Global biogeochemical cycles*, v. 2, n. 4, p. 299-327, 1988.

Demeyer, d.; henderickx, h. Methane production from glucose in vitro by mixed rumen bacteria. *Biochemical Journal*, v. 105, n. 1, p. 271-277, 1967.

Deramus, H. A. et al. Methane emissions of beef cattle on forages: efficiency of grazing management systems. *Journal of environmental quality*, v. 32, n. 1, p. 269-277, 2003.

Detmann, E., Paulino, M.F., Zervoudakis, J.T., Filho, S.d.C.V., Lana, R.d.P., Queiroz, D.S.d., 2001. Suplementação de novilhos mestiços durante a época das águas: parâmetros ingestivos e digestivos. *Revista Brasileira de Zootecnia* 30, 1340-1349.

Detmann, E., Souza, M.d., Valadares Filho, S.d.C., Queiroz, A.d., Berchielli, T., Saliba, E.d.O., Cabral, L.d.S., Pina, D.d.S., Ladeira, M., Azevedo, J., 2012. Métodos para análise de alimentos. *Visconde do Rio Branco: Suprema* 214.

Dijkstra, j.; forbes, j. M.; france, j. Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism. *CABI Pub. Cambridge*, 2005.

Ellis, J. et al. Aspects of rumen microbiology central to mechanistic modelling of methane production in cattle. *The Journal of Agricultural Science*, v. 146, n. 2, p. 213, 2008.

Erickson, P.S., Whitehouse, N.L., Dunn, M., 2011. Activated carbon supplementation of dairy cow diets: Effects on apparent total-tract nutrient digestibility and taste preference. *The Professional Animal Scientist* 27, 428-434.

Farrell, M., Kuhn, T.K., Macdonald, L.M., Maddern, T.M., Murphy, D.V., Hall, P.A., Singh, B.P., Baumann, K., Krull, E.S., Baldock, J.A., 2013. Microbial utilisation of biochar-derived carbon. *Sci. Total Environ.* 465, 288-297.

Feng, Y., Xu, Y., Yu, Y., Xie, Z., Lin, X., 2012. Mechanisms of biochar decreasing methane emission from Chinese paddy soils. *Soil Biol. Biochem.* 46, 80-88.

Guan, H. et al. Efficacy of ionophores in cattle diets for mitigation of enteric methane. *Journal of animal science*, v. 84, n. 7, p. 1896-1906, 2006.

Gurwick, N. P. et al. A Systematic Review of Biochar Research, with a Focus on Its Stability in situ and Its Promise as a Climate Mitigation Strategy. *PLOS ONE*, v. 8, n. 9, p. e75932, 2013.

Guyader, J. et al. Additive methane-mitigating effect between linseed oil and nitrate fed to cattle. *Journal of Animal Science*, v. 93, n. 7, p. 3564-3577, 2015.

Hansen, H., Storm, I.D., Sell, A., 2012. Effect of biochar on in vitro rumen methane production. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A—Animal Science* 62, 305-309.

Harper, L. et al. Direct measurements of methane emissions from grazing and feedlot cattle. *Journal of Animal Science*, v. 77, n. 6, p. 1392-1401, 1999.

Harvey, O.R., Kuo, L.-J., Zimmerman, A.R., Louchouart, P., Amonette, J.E., Herbert, B.E., 2012. An Index-Based Approach to Assessing Recalcitrance and Soil Carbon Sequestration Potential of Engineered Black Carbons (Biochars). *Environ. Sci. Technol.* 46, 1415-1421.

Henderson, G. et al. Global Rumen Census Collaborators and Janssen PH 2015. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. *Scientific Reports*, v. 5, p. 14567, 2015.

Holden, L., 1999. Comparison of methods of in vitro dry matter digestibility for ten feeds. *J. Dairy Sci.* 82, 1791-1794.

Hook, S. E. et al. Long-term monensin supplementation does not significantly affect the quantity or diversity of methanogens in the rumen of the lactating dairy cow. *Appl Environ Microbiol*, v. 75, n. 2, p. 374-80, Jan 2009.

Hristov, A. N. et al. A meta-analysis of variability in continuous-culture ruminal fermentation and digestibility data. *Journal of Dairy Science*, v. 95, n. 9, p. 5299-5307, 2012.

Hulshof, R. et al. Dietary nitrate supplementation reduces methane emission in beef cattle fed sugarcane-based diets. *Journal of animal science*, v. 90, n. 7, p. 2317-2323, 2012.

Hungate, R. et al. Formate as an intermediate in the bovine rumen fermentation. *Journal of Bacteriology*, v. 102, n. 2, p. 389-397, 1970.

IPCC, 2007. *Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. In: M.L. Parry, O.F.C., J.P. Palutikof, P.J. van der Linden and C.E. Hanson (Ed.), Cambridge University Press.

Johnson, K.A., Johnson, D.E., 1995. Methane emissions from cattle. *J. Anim. Sci.* 73, 2483-2492.

Joseph, S.; Lehmann, J. *Biochar for environmental management: science and technology*. London, GB: Earthscan, 2009.

Joseph, S. et al. Feeding Biochar to Cows: An Innovative Solution for Improving Soil Fertility and Farm Productivity. *Pedosphere*, v. 25, p. 666-679, 08/21 2015.

Kambo, H. S.; Dutta, A. A comparative review of biochar and hydrochar in terms of production, physico-chemical properties and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 45, p. 359-378, 2015.

Kozloski, G. V. *Bioquímica dos ruminantes*. Fundação de Apoio a Tecnologia e Ciencia-Editora UFSM, 2017.

Lehmann, J., Rillig, M.C., Thies, J., Masiello, C.A., Hockaday, W.C., Crowley, D., 2011. Biochar effects on soil biota—a review. *Soil Biol. Biochem.* 43, 1812-1836.

Leng, R., 2014. Interactions between microbial consortia in biofilms: a paradigm shift in rumen microbial ecology and enteric methane mitigation. *Animal Production Science* 54, 519-543.

Leng, R., Inthapanya, S., Preston, T., 2012a. Biochar lowers net methane production from rumen fluid in vitro. *Livestock Research for Rural Development* 24, 103.

Leng, R., Inthapanya, S., Preston, T., 2012b. Methane production is reduced in an in vitro incubation when the rumen fluid is taken from cattle that previously received biochar in their diet. *Gas* 1050, 1367.

Leng, R., Inthapanya, S., Preston, T., 2013. All biochars are not equal in lowering methane production in in vitro rumen incubations. *Livest. Res. Rural Dev* 12, 12.

Leng, R., Preston, T., Inthapanya, S., 2012c. Biochar reduces enteric methane and improves growth and feed conversion in local "Yellow" cattle fed cassava root chips and fresh cassava foliage. *Livestock Research for Rural Development* 24.

Lockyer, D.; Jarvis, S. The measurement of methane losses from grazing animals. *Environmental Pollution*, v. 90, n. 3, p. 383-390, 1995.

López, S. In vitro and in situ techniques for estimating digestibility. 2005.

Lund, P. et al. The acute effect of addition of nitrate on in vitro and in vivo methane emission in dairy cows. *Animal Production Science*, v. 54, n. 9, p. 1432-1435, 2014.

Lynch, J., Cain, M., Pierrehumbert, R., Allen, M., 2020. Demonstrating GWP\*: a means of reporting warming-equivalent emissions that captures the contrasting impacts of short-and long-lived climate pollutants. *Environmental Research Letters* 15, 044023.

Man, K. Y. et al. Use of biochar as feed supplements for animal farming. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, v. 51, n. 2, p. 187-217, 2021/01/17 2020.

Martin, C.; Morgavi, D. P.; Doreau, M. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal*, v. 4, n. 3, p. 351-365, 2010.

McDougall, E., 1948. The composition and output of sheep's saliva. *The Biochemical Journal* 43, 99-109.

McFarlane, Z.D., Myer, P.R., Cope, E.R., Evans, N.D., Bone, T.C., Bliss, B.E., Mulliniks, J.T., 2017. Effect of biochar type and size on in vitro rumen fermentation of orchard grass hay.

MCTIC. Estimativas Anuais de Emissões de Gases de Efeito Estufa no Brasil. 5. ed. -- Brasília: Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações., v. 71 p. : il., 2020.

Melchior, E. et al. The effects of feeding monensin on rumen microbial communities and methanogenesis in bred heifers fed in a drylot. *Livestock science*, v. 212, p. 131-136, 2018.

Mengistu, G., McAllister, T.A., Tamayao, P., Ominski, K., Ribeiro, G., Okine, E., McGeough, E., 2022. Evaluation of biochar products at two inclusion levels on ruminal in vitro methane production and fermentation parameters in a Timothy hay-based diet. *Canadian Journal of Animal Science*, 1-5.

Menke, K. et al. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. *The Journal of Agricultural Science*, v. 93, n. 1, p. 217-222, 1979.



Migeotte, M. V. Spectroscopic evidence of methane in the earth's atmosphere. *Physical Review*, v. 73, n. 5, p. 519, 1948.

Mombach, M. A. et al. Emissão de metano entérico por bovinos: o que sabemos e que podemos fazer? , Embrapa Agrossilvipastoril-Artigo em anais de congresso (ALICE), 2016, In: SIMPÓSIO DE PECUÁRIA INTEGRADA, 2., 2016, Sinop. Recuperação de ....

Moss, A.R., Jouany, J.-P., Newbold, J., 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming, *Ann. Zootech.*, EDP Sciences, pp. 231-253.

MOULD, F. et al. In vitro microbial inoculum: A review of its function and properties. *Animal Feed Science and Technology*, v. 123, p. 31-50, 2005.

Muetzel, S.; Hunt, C.; Tavendale, M. H. A fully automated incubation system for the measurement of gas production and gas composition. *Animal Feed Science and Technology*, v. 196, p. 1-11, 2014.

Mui, N. T.; Ledin, I. Effect of method of processing foliage of *Acacia mangium* and inclusion of bamboo charcoal in the diet on performance of growing goats. *Animal Feed Science and Technology*, v. 130, n. 3-4, p. 242-256, 2006.

Murray, R.; Bryant, A.; Leng, R. Rates of production of methane in the rumen and large intestine of sheep. *British Journal of Nutrition*, v. 36, n. 1, p. 1-14, 1976.

Nagaraja, T. et al. Manipulation of ruminal fermentation. In: (Ed.). *The rumen microbial ecosystem*: Springer, 1997. p.523-632.

Neto, J. T. D. N. Óleo bruto de *Pterodon Emarginatus* Vogel (sucupira) como manipulador da fermentação ruminal em sistema de cultura contínua de duplo fluxo. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015., 2015.

Nolan, J. V. et al. Managing the rumen to limit the incidence and severity of nitrite poisoning in nitrate-supplemented ruminants. *Animal Production Science*, v. 56, n. 8, p. 1317-1329, 2016.

Oliveira, L. et al. Feed efficiency and enteric methane production of Nellore cattle in the feedlot and on pasture. *Animal Production Science*, v. 58, n. 5, p. 886-893, 2016.

Ørskov, E.; Flatt, W.; Moe, P. Fermentation balance approach to estimate extent of fermentation and efficiency of volatile fatty acid formation in ruminants. *Journal of dairy science*, v. 51, n. 9, p. 1429-1435, 1968.

Ovchinnikov, Y. A. Physico-chemical basis of ion transport through biological membranes: ionophores and ion channels. *European Journal of Biochemistry*, v. 94, n. 2, p. 321-336, 1979.

Page, S. *The role of enteric antibiotics in livestock production*. Canberra, Australia: Avcare Ltd, 2003.

PaulTamayao, O.Ribeiro, G., A.McAllister, T., H.Ominski, K., M.Saleem, A., EunYang, H., K.Okine, E., J.McGeough, E., FilippoMiglior, 2021. Effect of pine-based biochars with differing physiochemical properties on methane production, ruminal fermentation, and rumen microbiota in an artificial rumen (RUSITEC) fed barley silage. *Canadian Journal of Animal Science* 101, 577-589.

- Pell, A.; Schofield, P. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion in vitro. *Journal of dairy science*, v. 76, n. 4, p. 1063-1073, 1993.
- Pereira, L. G. R. et al. Enteric methane mitigation strategies in ruminants: a review. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, v. 28, n. 2, p. 124-143, 2015.
- Pereira, R.C., Muetzel, S., Arbestain, M.C., Bishop, P., Hina, K., Hedley, M., 2014. Assessment of the influence of biochar on rumen and silage fermentation: A laboratory-scale experiment. *Animal Feed Science and Technology* 196, 22-31.
- Phongpanith, S.; Inthapanya, S.; Preston, T. Effect on feed intake, digestibility and N balance in goats of supplementing a basal diet of *Muntingia* foliage with biochar and water spinach (*Ipomoea aquatica*). *Livestock Research for Rural Development*, v. 25, n. 2, 2013.
- Phongphanith, S.; Preston, T. Effect Of Rice-Wine Distillers' Byproduct And Biochar On Growth performance and methane emissions in local "Yellow" cattle fed ensiled cassava root, urea, cassava foliage and rice straw. *Livestock Research for Rural Development*, v. 28, p. Article# 178, 2018.
- Pinto, A.C., Millen, D.D., 2016. Recomendações nutricionais e práticas de manejo adotadas por nutricionistas de bovinos em confinamento: a pesquisa brasileira de 2016.
- Porsavathdy, P., Phongphanith, S., Preston, T., Leng, R., 2017. Methane production in an in vitro rumen fermentation of molasses-urea was reduced by supplementation with fresh rather than dried cassava (*Manihot esculenta*, Crantz) leaves and by biochar. *in vitro* 12, 12.
- Porto, M.O., Paulino, M.F., Detmann, E., Valadares Filho, S.d.C., Sales, M.F.L., Cavali, J., Nascimento, M.L.d., Acedo, T.S., 2011. Ofertas de suplementos múltiplos para tourinhos Nelore na fase de recria em pastagens durante o período da seca: desempenho produtivo e características nutricionais. *Revista brasileira de Zootecnia* 40, 2548-2557.
- Pressman, B. C. Biological applications of ionophores. *Annual review of biochemistry*, v. 45, n. 1, p. 501-530, 1976.
- Qomariyah, N., Retnani, Y., Jayanegara, A., Wina, E., Permana, I., 2021. Influence of biochar and liquid smoke additives from cacao-pod husks on in vitro ruminal fermentation characteristics. *Adv. Anim. Vet. Sci* 9, 533-543.
- Rao, S. N.; Chopra, R. Influence of sodium bentonite and activated charcoal on aflatoxin M1 excretion in milk of goats. *Small Ruminant Research*, v. 41, n. 3, p. 203-213, 2001.
- Russell, J.B., Strobel, H., 1989. Effect of ionophores on ruminal fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1.
- Saleem, A.M., Ribeiro, G.O., Jr, Yang, W.Z., Ran, T., Beauchemin, K.A., McGeough, E.J., Ominski, K.H., Okine, E.K., McAllister, T.A., 2018. Effect of engineered biocarbon on rumen fermentation, microbial protein synthesis, and methane production in an artificial rumen (RUSITEC) fed a high forage diet<sup>1</sup>. *J. Anim. Sci.* 96, 3121-3130.
- Schelling, G. T. Monensin mode of action in the rumen. *Journal of Animal Science*, v. 58, n. 6, p. 1518-1527, 1984.
- Schmidt, H.-P. et al. The use of biochar in animal feeding. *PeerJ*, v. 7, p. e7373, 2019.

Schofield, P., Pitt, R., Pell, A., 1994. Kinetics of fiber digestion from in vitro gas production. *J. Anim. Sci.* 72, 2980-2991.

SEEG. Análises das Emissões Brasileiras de Gases de Efeito Estufa e Suas Implicações para as Metas de Clima no Brasil 1970-2019. Sistema de estimativa de emissões de gases de efeito estufa, 2020.

Silva, T., Detmann, E., Camacho, L., Saliba, E., Palma, M., Valadares Filho, S., 2017. Comparação de métodos in vitro para a quantificação da digestibilidade da matéria seca e da fibra em detergente neutro de forragens e concentrados. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 69, 1635-1644.

Silvestre, A. M.; Millen, D. D. The 2019 Brazilian survey on nutritional practices provided by feedlot cattle consulting nutritionists. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 50, 2021.

Smith, P.; Reay, D.; Smith, J. Agricultural Methane Emissions and the Potential for Mitigation. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical & Engineering Sciences*, 2021.

Sujarnoko, T., Ridwan, R., Nahrowi, J.A., 2020. Extraction of tannin from acacia (*Acacia mangium*) bark and its use as a feed additive for protecting in vitro ruminal degradation of tofu dregs. *Adv. Anim. Vet. Sci* 8, 761-765.

Tamayao, P., Ribeiro, G., McAllister, T., Yang, H., Saleem, A., Ominski, K., Okine, E., McGeough, E., 2021a. Effects of post-pyrolysis treated biochars on methane production, ruminal fermentation, and rumen microbiota of a silage-based diet in an artificial rumen system (RUSITEC). *Animal Feed Science and Technology* 273, 114802.

Tamayao, P., Ribeiro, G.O., McAllister, T.A., Ominski, K.H., Okine, E.K., McGeough, E.J., 2022. Effects of biochar source, level of inclusion, and particle size on in vitro dry matter disappearance, total gas, and methane production and ruminal fermentation parameters in a barley silage-based diet. *Canadian Journal of Animal Science*, 1-12.

Tamayao, P., Ribeiro, G.O., McAllister, T.A., Ominski, K.H., Saleem, A.M., Yang, H.E., Okine, E.K., McGeough, E.J., 2021b. Effect of pine-based biochars with differing physiochemical properties on methane production, ruminal fermentation, and rumen microbiota in an artificial rumen (RUSITEC) fed barley silage. *Canadian Journal of Animal Science* 101, 577-589.

Tate, K. R. Soil methane oxidation and land-use change—from process to mitigation. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 80, p. 260-272, 2015.

Teoh, R., Caro, E., Holman, D.B., Joseph, S., Meale, S.J., Chaves, A.V., 2019. Effects of hardwood biochar on methane production, fermentation characteristics, and the rumen microbiota using rumen simulation. *Frontiers in Microbiology*, 1534.

Terry, S. A. et al. Effect of a pine enhanced biochar on growth performance, carcass quality, and feeding behavior of feedlot steers. *Translational Animal Science*, v. 4, n. 2, p. 831-838, 2020.

Terry, S.A., Ribeiro, G.O., Gruninger, R.J., Chaves, A.V., Beauchemin, K.A., Okine, E., McAllister, T.A., 2019. A pine enhanced biochar does not decrease enteric CH<sub>4</sub> emissions, but alters the rumen microbiota. *Frontiers in Veterinary Science*, 308.

Theodorou, M. K. et al. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal feed science and technology*, v. 48, n. 3-4, p. 185-197, 1994.

Tilley, J. M. A.; Terry, R. A. A TWO-STAGE TECHNIQUE FOR THE IN VITRO DIGESTION OF FORAGE CROPS. *Grass and Forage Science*, v. 18, n. 2, p. 104-111, 1963.

Toth, J.D., Dou, Z., 2016. Use and impact of biochar and charcoal in animal production systems. *Agricultural and environmental applications of biochar: advances and barriers* 63, 199-224.

Ungerfeld, E.; Kohn, R. The role of thermodynamics in the control of ruminal fermentation. *Ruminant physiology: digestion, metabolism and impact of nutrition on gene expression, immunology and stress*, p. 55-85, 2006.

Valente, T.N.P., Detmann, E., Queiroz, A.C.d., Valadares Filho, S.d.C., Gomes, D.I., Figueiras, J.F., 2011. Evaluation of ruminal degradation profiles of forages using bags made from different textiles. *Revista Brasileira de Zootecnia* 40, 2565-2573.

Van Nevel, C. J.; Demeyer, D. I. Control of rumen methanogenesis. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 42, n. 1, p. 73-97, 1996/09/01 1996.

Van Soest, P. J. *Nutritional ecology of the ruminant*. Cornell university press, 1994.

Van Zijderveld, S., Gerrits, W., Dijkstra, J., Newbold, J., Hulshof, R., Perdok, H., 2011. Persistency of methane mitigation by dietary nitrate supplementation in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94, 4028-4038.

Van Zijderveld, S. M. Et al. Nitrate and sulfate: Effective alternative hydrogen sinks for mitigation of ruminal methane production in sheep. *Journal of Dairy Science*, v. 93, n. 12, p. 5856-5866, 2010/12/01/ 2010.

Vyas, D. et al. The combined effects of supplementing monensin and 3-nitrooxypropanol on methane emissions, growth rate, and feed conversion efficiency in beef cattle fed high-forage and high-grain diets. *Journal of animal science*, v. 96, n. 7, p. 2923-2938, 2018.

Wang, J., Xiong, Z., Kuzyakov, Y., 2016. Biochar stability in soil: meta-analysis of decomposition and priming effects. *Gcb Bioenergy* 8, 512-523.

Winders, T.M., Jolly-Breithaupt, M.L., Wilson, H.C., MacDonald, J.C., Erickson, G.E., Watson, A.K., 2019. Evaluation of the effects of biochar on diet digestibility and methane production from growing and finishing steers. *Translational Animal Science* 3, 775-783.

Wilkins, J. R. Pressure transducer method for measuring gas production by microorganisms. *Applied microbiology*, v. 27, n. 1, p. 135-140, 1974.

Winders, T. M. et al. Evaluation of the effects of biochar on diet digestibility and methane production from growing and finishing steers. *Translational Animal Science*, v. 3, n. 2, p. 775-783, 2019.

YÁÑez-Ruiz, D. R. Et al. Design, implementation and interpretation of in vitro batch culture experiments to assess enteric methane mitigation in ruminants—a review. *Animal Feed Science and Technology*, v. 216, p. 1-18, 2016/06/01/ 2016.

Zhang, Z.-W. et al. The Dietary Supplemental Effect of Nitroethanol in Comparison with Monensin on Methane Emission, Growth Performance and Carcass Characteristics in Female Lambs. *Animals*, v. 11, n. 2, p. 327, 2021.

Zhao, J. Et Al. New use for biochar derived from bovine manure for tetracycline removal. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 9, n. 4, p. 105585, 2021/08/01/ 2021.

## 4.8 Tables and figures

**Table 1** – Physical and chemical properties of biochar

Item	Value
Surface Area, m <sup>2</sup> /g	571
Density, g/cm <sup>3</sup>	0,32
Dry Matter, g/kg	810
Oxidizable Carbon, g/kg	31
Carbon, g/kg	810
Nitrogen, g/kg	28

**Table 2** – Ingredients and chemical composition of incubated experimental substrates for Study I.

Item <sup>a</sup>	Exp. 1 – Grazing cattle diet					Exp. 2 – Feedlot diet				
	Levels of biochar g/kg DM									
	0	10	20	30	40	0	10	20	30	40
Ingredient, % of DM										
Low-quality tropical Grass	80	80	80	80	80	-	-	-	-	-
Corn Silage	-	-	-	-	-	20	20	20	20	20
Ground corn	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	61.2	61.2	61.2	61.2	61.2
Soybean Meal	10.9	10.9	10.9	10.9	10.9	9.3	9.3	9.3	9.3	9.3
Urea	1	1	1	1	1	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
Mineral Mixture	2	2	2	2	2	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1
Biochar	0	1	2	3	4	-	1	2	3	4
Kaolim	4	3	2	1	-	4	3	2	1	-
Chemical composition, % of DM										
DM	91.3	91.1	91.1	91.0	90.9	91.3	91.2	91.1	91.0	90.9
OM	73.9	73.9	73.9	73.9	73.9	20.4	20.4	20.4	20.4	20.4
CP	12.0	12.0	12.1	12.2	12.3	13.6	13.6	13.7	13.7	13.8
NDF	45.0	45.0	45.1	45.2	45.3	20.9	20.9	21.0	21.0	21.1

<sup>a</sup> % of dry matter (DM); OM: organic matter; NDF = neutral detergent fiber.

**Table 3** – Ingredients and chemical composition of incubated experimental substrates for Study II.

Item <sup>a</sup>	Exp. 1 – Grazing cattle diet				Exp. 2 – Feedlot diet			
	Control	Biochar	Monensin	Nitrate	Control	Biochar	Monensin	Nitrate
<b>Ingredient</b>								
Low-quality tropical grass	80	80	80	80	-	-	-	-
Corn silage	-	-	-	-	20	20	20	20
Ground corn	1.4	1.5	1.5	3.3	60.1	60.2	60.1	59.8
Soybean Meal	10.3	10.3	10.3	10.3	9.5	9.6	9.5	9.5
Urea	1.2	1.2	1.2	0.3	1.2	1.2	1.2	0.4
Mineral Mixture	2.0	2.0	2.0	2.0	4.1	4.1	4.1	4.1
Calcium limestone	1.0	1.0	1.0	-	1.0	1.0	1.0	-
Kaolin	4.0	-	3.9	2.0	2.0	-	1.9	2.0
Biochar	-	4.0	-	-	-	2.0	-	-
Monensin	-	-	0.1	-	-	-	0.1	-
Nitrate	-	-	-	2.0	-	-	-	2.0
<b>Chemical composition</b>								
DM	91.4	91.0	91.4	91.0	91.4	93.1	91.4	93.1
OM	86.2	89.5	86.2	88.6	89.5	91.4	89.5	89.9
CP	12.3	12.3	12.3	12.0	14.1	14.2	14.1	13.9
NDF	57.1	57.1	57.1	57.4	19.4	19.5	19.4	19.4
ADF	34.5	34.5	34.5	34.6	6.5	6.5	6.5	6.4

<sup>a</sup>% of dry matter (DM); OM: organic matter; CP: crude protein; NDF: neutral detergent fiber; ADF: acid detergent fiber.

**Table 4** – Effects of different additives on gas production (GP), *in vitro* dry matter (IVDMD) and organic matter digestibilities (IVDMO), and methane production in Study I.

Item <sup>a</sup>	Biochar levels					SEM	<i>p-value</i>		
	0 g	10 g	20 g	30 g	40 g		<i>Linear</i>	<i>Quadratic</i>	<i>Cubic</i>
Exp. 1 – High forage inclusion									
Total GP, mL/g DM	134.01	135.36	138.12	130.37	127.85	11.67	0.18	0.23	0.76
IVDMD (%)	54.9	53.9	55.2	54.1	53.5	1.56	0.63	0.80	0.74
IVDMO (%)	57.4	56.4	56.0	54.8	54.3	0.85	0.01	0.94	0.97
Methane, %	4.7	5.5	4.3	4.3	3.7	0.52	0.01	0.25	0.22
Methane, ml/g DM	9.4	11.0	8.6	8.6	7.43	1.04	0.01	0.25	0.22
Methane, mL/g OMd	18.9	21.9	17.2	17.4	15.0	1.96	0.01	0.22	0.20
Exp. 2 – High concentrate inclusion									
Total GP, mL/g DM	237.9	228.7	219.4	246.3	269.2	34.5	0.28	0.54	0.59
IVDMD (%)	86.4	86.1	82.4	85.9	86.9	2.3	0.90	0.25	0.91
IVDMO (%)	87.8	88.7	84.3	86.2	86.6	1.9	0.36	0.41	0.48
Methane, %	6.5	9.3	6.9	7.2	8.0	0.8	0.68	0.59	0.02
Methane, ml/g DM	15.9	22.3	13.8	15.5	17.3	2.0	0.42	0.85	0.01
Methane, mL/g OMd	21.8	30.0	19.4	20.9	23.7	3.2	0.43	0.88	0.01

<sup>a</sup>DM: dry matter; OMd: organic matter digested.



**Table 5** – Effects of different additives on gas production (GP), *in vitro* dry matter (IVDMD) and organic matter digestibilities (IVDMO), methane production, and ammonia nitrogen (NH<sub>3</sub>-N) in Study II.

Item <sup>a</sup>	Treatments				SEM	P-value
	Control	Biochar	Monensin	Nitrate		
Exp. 3 – High forage inclusion						
Total GP, mL/g DM	570.3	599.4	550.8	618.7	32.6	0.47
IVDMD, %	44.95 <sup>a</sup>	45.37 <sup>a</sup>	42.87 <sup>b</sup>	48.93 <sup>a</sup>	1.85	0.09
IVDMO, %	52.01 <sup>a</sup>	50.50 <sup>ab</sup>	47.55 <sup>b</sup>	52.30 <sup>a</sup>	1.62	0.05
Methane, %	13.6	11.9	12.9	13.1	1.08	0.72
Methane, mL/ g DMI	87.1	65.1	79.5	78.0	7.95	0.27
Methane, mL/ g OMD	182.6	145.6	180.1	137	19.2	0.14
PF, mg OMD/mL	0.88	0.88	0.82	0.89	0.1	0.92
NH <sub>3</sub> -N, mg/dL	49.2 <sup>b</sup>	52.6 <sup>ab</sup>	51.7 <sup>b</sup>	56.4 <sup>a</sup>	1.63	0.02
Exp. 4 – High concentrate inclusion						
Total GP, mL/g DM	659.5 <sup>ab</sup>	690.4 <sup>a</sup>	624.6 <sup>b</sup>	647.0 <sup>ab</sup>	24.6	0.08
IVDMD, %	80.0	79.1	80.8	83.9	1.64	0.21
IVDMO, %	83.7	82.6	85.4	82.5	1.37	0.35
Methane, %	11.56	11.1	11.54	12.33	6.3	0.40
Methane, mL/ g DMI	83.51	76.32	74.43	81.67	4.83	0.41
Methane, mL/ g OMD	105.2	95.1	89.8	105.4	6.19	0.13
PF, mg OMD/mL	1.06	1.08	1.23	1.21	0.07	0.23
NH <sub>3</sub> -N, mg/dL	45.8 <sup>b</sup>	53.3 <sup>a</sup>	44.9 <sup>b</sup>	55.9 <sup>a</sup>	1.89	<0.0001

<sup>a</sup> IVDMD: *in vitro* digestibility of dry matter; IVDMO: *in vitro* digestibility of organic matter; PF: partitioning factor; RAN: ruminal ammonia nitrogen.

**Table 6** – Effects of different additives on *in vitro* digestibilities of dry matter (IVDMD), organic matter (IVDMO), crude protein (IVDCP), neutral detergent fiber (IVDNDF), acid detergent fiber (IVDADF), and hemicellulose (IVDHEM) using an artificial fermenter of four 4-L digestion vessels in four fermentation runs in Study III.

Item <sup>a</sup>	Treatments				SEM	P-value
	Control	Biochar	Monensin	Nitrate		
Exp. 5 – High forage inclusion						
IVDMD, %	57.78 <sup>c</sup>	57.02 <sup>b</sup>	58.94 <sup>a</sup>	57.08 <sup>b</sup>	228.73	<0.0001
IVDMO, %	56.96 <sup>ab</sup>	55.78 <sup>b</sup>	56.43 <sup>b</sup>	57.91 <sup>a</sup>	0.45	0.01
IVDCP, %	87.01 <sup>a</sup>	86.68 <sup>a</sup>	84.61 <sup>a</sup>	81.45 <sup>b</sup>	0.92	0.0001
IVDNDF, %	41.22	42.8	41.26	41.38	0.74	0.33
IVDADF, %	14.03	16.03	14.04	14.72	0.79	0.16
IVDHEM, %	34.54	35.6	33.87	34.64	1.75	0.90
Exp. 6 – High concentrate inclusion						
IVDMD, %	81.11 <sup>b</sup>	82.82 <sup>a</sup>	80.58 <sup>b</sup>	83.48 <sup>a</sup>	0.42	<0.0001
IVDMO, %	81.88 <sup>b</sup>	82.62 <sup>ab</sup>	83.23 <sup>ab</sup>	84.78 <sup>a</sup>	0.91	0.06
IVDCP, %	81.26 <sup>b</sup>	85.50 <sup>a</sup>	77.10 <sup>c</sup>	81.57 <sup>b</sup>	1.27	<0.0001
IVDNDF, %	61.33 <sup>b</sup>	67.73 <sup>a</sup>	54.52 <sup>c</sup>	67.91 <sup>a</sup>	1.5	<0.0001
IVDADF, %	2.87 <sup>c</sup>	4.45 <sup>a</sup>	2.35 <sup>c</sup>	3.73 <sup>b</sup>	5.51	<0.0001
IVDHEM, %	69.68 <sup>b</sup>	77.21 <sup>a</sup>	64.27 <sup>c</sup>	74.05 <sup>ab</sup>	1.74	<0.0001

**Table 7** – Effects of different additives on kinetic variables of gas production in Study II.

Item <sup>a</sup>	Treatments				SEM	P-value
	Control	Biochar	Monensin	Nitrate		
Exp. 3 – High forage inclusion						
KR	0.106	0.084	0.091	0.100	0.005	0.12
LAG	3.43	3.23	3.19	3.12	0.32	0.92
V1	234.94	232.47	216.12	237.59	10.65	0.51
KL	0.02	0.02	0.02	0.02	0.00008	0.17
Exp. 4 – High concentrate inclusion						
KR	0.13	0.13	0.13	0.12	0.06	0.53
LAG	3.31	3.62	3.41	2.94	23.33	0.11
V1	240.79	294.06	246.75	266.77	814.7	0.08
KL	0.03	0.03	0.03	0.03	0.26	0.356

<sup>a</sup> LAG: lag time; V1: Maximum gas volume of each pool, mL; KR and KL: Specific rate of digestion of each pool

## Study I

Exp. 1 high forage inclusion

Exp. 2 high concentrate inclusion

Treatments :  
0, 10, 20, 30, 40 g/kg of DM



Four replicate + four blank  
Four independent incubation run per Exp.



best biochar inclusion level: 40 g/kg of DM

best biochar inclusion level: 20 g/kg of DM

## Study II

Exp. 3 high forage inclusion

Exp. 4 high concentrate inclusion

Treatments :  
Control  
Biochar (40 g/kg of DM)  
Monensin (30 mg/kg of DM)  
Nitrate (20 g/kg of DM)

Treatments :  
Control  
Biochar (20 g/kg of DM)  
Monensin (30 mg/kg of DM)  
Nitrate (20 g/kg of DM)



Six replicate + four blank  
Four independent incubation run per Exp.

## Study III

Exp. 5 high forage inclusion

Exp. 6 high concentrate inclusion

Treatments :  
Control  
Biochar (40 g/kg of DM)  
Monensin (30 mg/kg of DM)  
Nitrate (20 g/kg of DM)

Treatments :  
Control  
Biochar (20 g/kg of DM)  
Monensin (30 mg/kg of DM)  
Nitrate (20 g/kg of DM)



24 filters bags (18 containing substrate + 6 blanks)  
Four independent incubation run per Exp.

Figure 1- Experiment flowchart