



Nutri·Time

Revista Eletrônica

Vol. 12, Nº 06, nov/dez de 2015
ISSN: 1983-9006
www.nutritime.com.br

A Revista Eletrônica Nutritime é uma publicação bimensal da Nutritime Ltda. Com o objetivo de divulgar revisões de literatura, artigos técnicos e científicos e também resultados de pesquisa nas áreas de Ciência Animal, através do endereço eletrônico: <http://www.nutritime.com.br>.

RESUMO

O efeito estufa vem se agravando no planeta, em especial pela emissão de dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄) e óxido nitroso (N₂O). No Brasil, uma das principais fontes antrópicas de metano na agropecuária é a criação de bovinos. O Brasil, no protocolo de Kyoto, assumiu o compromisso de controlar a emissão de gases do efeito estufa. Para isso as maiores fontes de emissão de CH₄ necessitam ser caracterizadas com o objetivo de aprimorar o inventário nacional de emissão, bem como de estabelecer as estratégias de redução. Diferentes métodos para quantificar essas emissões são utilizados e estão em desenvolvimento, todos com diferentes condições de aplicação. Um conhecimento profundo das vantagens e desvantagens desses métodos é muito importante para planejar experimentos, compreender e interpretar resultados experimentais, e compará-los com outros estudos.

Palavras-chave: Hexafluoreto de enxofre, produção de gases *in vitro*, respirometria.

Métodos para medir a emissão individual de metano por ruminantes

Hexafluoreto de enxofre, produção de gases *in vitro*, respirometria.

André Morais Moura^{1*}
Lúcio Carlos Gonçalves²
Pedro Dias Sales Ferreira¹
Isabella Hoske Gruppioni Côrtes³
Diego Soares Gonçalves Cruz¹
Felipe Pedrosa Melgaço³
João Pedro da Costa Alves Oliveira⁴
Thiago Henrique Fagundes Diniz⁴

¹ Doutorando em Zootecnia, Escola de Veterinária da UFMG. *E-mail: amoraismoura@yahoo.com.br

² Professor Associado IV, Escola de Veterinária da UFMG

³ Graduando (a) Medicina Veterinária, Escola de Veterinária da UFMG

⁴ Mestrando em Zootecnia, Escola de Veterinária da UFMG

METHODS FOR MEASURING INDIVIDUAL METHANE EMISSION BY RUMINANTS: A REVIEW ABSTRACT

The greenhouse effect has become worse on the planet, in particular by the emission of carbon dioxide (CO₂), methane (CH₄) and nitrous oxide (N₂O) emissions. In Brazil, one of the main anthropogenic sources of methane in livestock is cattle. Because of the commitment made by Brazil to the Kyoto Protocol to control the emission of greenhouse gases, the major sources of CH₄ emissions need to be characterized, with the aim of improving the national emission inventory, as well as to establish strategies for reduction. Different methods to quantify these emissions are used and are in development, all with different application conditions. A thorough understanding of the advantages and disadvantages of these methods is very important to plan experiments, to understand and interpret experimental results and compare them with other studies.

Keywords: *In vitro* gas production, respirometric chamber, sulfur hexafluoride.

INTRODUÇÃO

O efeito estufa vem se agravando no planeta, em especial pela emissão de dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄) e óxido nitroso (N₂O). No Brasil, uma das principais fontes antrópicas de metano na agropecuária é a criação de bovinos.

A produção de CH₄ é parte do processo digestivo dos herbívoros ruminantes e ocorre no rúmen. A fermentação, que ocorre durante o metabolismo dos carboidratos, é um processo anaeróbico efetuado pela população microbiana ruminal, que converte os carboidratos em ácidos graxos de cadeia curta. Nesse processo, parte do carbono é concomitantemente transformada também em CO₂, sendo o CH₄ oriundo da redução deste pelas *Archaeas metanogênicas*. Este processo é uma via metabólica importante para a retirada de H₂ do rúmen e recuperação de agentes redutores.

A emissão de CH₄ varia entre 4% e 9% da energia bruta do alimento ingerido, e a média encontrada é de 6% (USA, 2000). A emissão global de CH₄ pelos processos digestivos é estimada em cerca de 80 teragramas ao ano (Tg), correspondendo a 22% da emissão total de CH₄ gerada por fontes antrópicas (USA, 2000).

O Brasil, no protocolo de Kyoto, assumiu o compromisso de controlar a emissão de gases do efeito estufa. Para isso as maiores fontes de emissão de CH₄ necessitam ser caracterizadas com o objetivo de aprimorar o inventário nacional de emissão, bem como de estabelecer as estratégias de redução. Além disso, maior compreensão e quantificação do CH₄ no rúmen faz-se necessária para dimensionar seus impactos no meio ambiente e também para promover o aumento da eficiência na produção animal.

Diferentes métodos, com distintas condições de aplicação, são utilizados e estão sendo desenvolvidos para quantificar essas emissões de metano. O conhecimento profundo das vantagens e desvantagens desses métodos é muito importante para planejar experimentos, compreender, interpretar resultados experimentais e compará-los com outros estudos.

Objetivou-se com esse trabalho descrever os princípios, as vantagens e as desvantagens dos diferentes

métodos utilizados para quantificar a emissão de metano ruminal por ruminantes.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Técnica da câmara respirométrica

A câmara respirométrica tem sido usada para medir as trocas gasosas, a fim de se determinar as exigências nutricionais de energia em ruminantes, sendo a mensuração de metano parte desse processo. Basicamente, a respirometria pode ser realizada de duas formas: em sistema de circuito fechado ou circuito aberto, sendo o último o mais utilizado.

No sistema de mensuração em circuito aberto, o animal é alojado em uma câmara com sistema de vedação que não permite qualquer troca gasosa entre o meio interior e o meio externo, a não ser pelo próprio sistema de circulação de ar. Uma tubulação de ar é acoplada a uma bomba, a qual realiza a renovação do ar no interior desta, em fluxo constante. Durante cada período de mensuração, um equipamento automatizado canaliza uma alíquota de ar para os analisadores de O₂, CO₂ e CH₄. A cada cinco minutos é realizada a leitura de alíquotas do ar que sai da câmara e do ar atmosférico que entra na câmara. Sendo assim é possível determinar a concentração média dos gases analisados no ar que entrou, e no ar que saiu da câmara (GRAINGER et al., 2007; ODONGO et al., 2007; SILVA, 2011).

Estas concentrações, multiplicadas pelo volume de ar que passou pela câmara durante o tempo de mensuração, permite calcular quanto de O₂ foi consumido e quanto de CO₂ e CH₄ foram produzidos (SILVA, 2011).

Devido ao ambiente controlado e possibilidade de mensuração da confiabilidade e estabilidade, as câmaras respirométricas são consideradas como o método padrão para a estimativa de emissão de metano por ruminantes (STORM et al., 2012). Quase todos os aspectos da alimentação e nutrição podem ser investigados em um sistema de câmara: o nível de alimentação, o efeito do alimento, o efeito da composição química e física, alimentação ad libitum contra restrita, esquemas de alimentação diferentes, aditivos, etc. Além disso, esta técnica permite a descrição das variações de emissão de CH₄ durante o dia.

No entanto, existe o risco da criação de um ambiente artificial, que afeta o comportamento animal, como por exemplo, o consumo de matéria seca (CMS). Como o CMS é um dos principais fatores que afetam a emissão de metano, a diminuição no CMS afeta não apenas as emissões totais de metano, mas também as estimativas derivadas como perda de energia bruta (ELLIS et al., 2007). Portanto, os resultados obtidos em câmaras podem ser diferentes dos aplicados a animais livres (OKELLY & SPIERS, 1992; JOHNSON et al., 1994). Outras desvantagens desse método são os custos elevado de aquisição e manutenção do equipamento, além da sua reduzida capacidade em avaliar vários animais simultaneamente.

Técnica do marcador hexafluoreto de enxofre (SF₆)

O método do marcador hexafluoreto de enxofre (SF₆) é relativamente novo e foi descrito pela primeira vez em 1994 (JOHNSON et al., 1994). A técnica do gás marcador SF₆ tem sido utilizada, principalmente, para mensurar a emissão de metano em animais sob pastejo (WOODWARD et al., 2006). A ideia básica do método é medir a emissão de metano a partir taxa de emissão conhecida de um gás marcador pelo rúmen. Para este resultado, um gás não tóxico, fisiologicamente inerte e estável é necessário. O SF₆ atende a esses critérios, é barato, tem um limite de detecção extremamente baixo e é simples de analisar (JOHNSON et al., 1992).

Para que o SF₆ possa ser liberado em taxa constante a partir do rúmen, o gás é colocado dentro de tubos de permeação de pequenas dimensões com taxa de permeação conhecida. Estes tubos são colocados no interior do rúmen dos animais experimentais. O ar expirado é amostrado através de um tubo capilar de aço inoxidável, colocado na narina do animal adaptado a um cabresto. Este tubo deve estar conectado a uma canga que consiste em um cano de PVC de alta resistência, submetido a vácuo interno, ao qual é acoplada uma válvula de metal para amostragens dos gases. As concentrações de CH₄ e SF₆ são determinadas por cromatografia gasosa. A partir da taxa conhecida de liberação do SF₆ no rúmen e das concentrações de CH₄ e SF₆ nas amostras de gás medidas, calcula-se o fluxo de metano liberado pelo animal (JOHNSON e JOHNSON, 1995).

A técnica pode ser usada para investigar quase todos os aspectos da alimentação e nutrição, como por

exemplo, o nível de alimentação, o efeito do alimento, o efeito da composição química e física, diferentes aditivos e pastagens (STORM et al., 2012).

O método tem sido testado durante as duas últimas décadas, e algumas dificuldades têm sido relatadas. Manter uma taxa de liberação constante a partir dos tubos de permeação é importante, porque variações na taxa de liberação de SF₆ podem afetar as estimativas de emissões de CH₄. A taxa de liberação de SF₆ é determinada, sob condições de laboratório, pesando os tubos de permeação regularmente por pelo menos durante 45 dias (JOHNSON et al., 2007). Apenas os tubos de permeação com taxas de liberação altamente lineares devem ser utilizados (PINARES-PATIÑO e CLARK, 2008). No entanto, as curvas de permeabilidade têm se mostrado ligeiramente curvilíneas em condições de laboratório, o que tem despertado para a necessidade do desenvolvimento de cálculos para corrigir este fenômeno (ULYATT et al., 1999; LASSEY et al., 2001).

Também tem sido demonstrado que os tubos de permeação com elevadas taxas de liberação podem estimar maior emissão de metano do que os tubos com as velocidades de liberação mais baixas. Portanto, é recomendável o uso de tubos de permeação com a mesma taxa de liberação (VLAMING, 2008; PINARES-PATIÑO et al., 2008).

Johnson et al. (1994), Mcginn et al. (2006), Pinares-Patiño et al. (2007) observaram emissões de metano ligeiramente menores com a técnica de SF₆ quando comparada às câmaras. (5 a 10%). Este fato pode ser explicado em parte pela pequena percentagem de metano produzida no intestino que não é mensurada na técnica do marcador SF₆, diferentemente da técnica da câmara respirométrica.

Grainger et al. (2007) compararam as emissões de metano por vacas leiteiras, utilizando a técnica do traçador SF₆ e a câmara respirométrica e observaram valores semelhantes (331 x 322g de CH₄/dia/vaca). Maiores variações entre os dias de mensuração e entre vacas foram obtidas para o SF₆ (CV = 6,1 e 19,6%) do que para as câmaras (CV = 4,3 e 17,8%). Os autores realizaram meta-análise dos dados de emissão de três diferentes locais e observaram que a técnica

do traçador SF₆ resultou em valores 8% inferiores aos mensurados em câmaras. Assim, é importante o desenvolvimento de fatores de correção para as emissões mensuradas pela técnica SF₆.

O método do marcador SF₆ apresenta resultados de emissões de metano mais variáveis em relação a medições em câmaras. Desta forma, faz-se necessário aumentar o número de animais avaliados e dias de mensuração para detectar diferenças entre os tratamentos. O método é o único disponível para a medição individual de animais livres em pastejo (STORM et al., 2012).

Técnica *in vitro* de produção de gases para medições de metano

A técnica *in vitro* de produção de gases (TIVPG) tem sido usada há décadas para simular a fermentação ruminal de alimentos e dietas (RYMER et al., 2005). Nos últimos anos tem sido modificada para estimar a produção de metano (NAVARRO-VILLA et al., 2011; PELLIKAN et al., 2011).

O princípio básico da TIVPG é fermentar alimentos sob condições laboratoriais controladas empregando-se amostras de líquido ruminal para simular as condições de fermentação ruminal, em cultura contínua ou em frascos de fermentação. As amostras são incubadas a 39°C com uma mistura de solução tampão, líquido ruminal, e minerais por um determinado período de tempo (24, 48, 72, 96 ou 144h). De preferência, o inóculo é produzido por uma mistura de líquidos do rúmen de vários animais doadores, a fim de obter um inóculo com a maior quantidade possível de micro-organismos ruminais. Portanto, o método requer acesso ao fluido do rúmen fresco, obtido a partir de ruminantes fistulados (MOULD et al., 2005).

A medição do volume de gases pode ser realizada com o auxílio de um transdutor de pressão ou voltímetros. A coleta de alíquotas de gases dos frascos de fermentação, e a análise da concentração de CH₄ por cromatografia gasosa pode ser realizadas de acordo com Chaves et al. (2006). Ao mesmo tempo, é possível determinar *in vitro* a degradação dos alimentos e seus constituintes, tornando-se possível avaliar as relações entre a quantidade de CH₄ produzida por grama de matéria seca (MS), por grama de MS de-

gradada (MSD) ou por gramas de fibra em detergente neutro (FDN) degradada (FDND), por exemplo.

O método *in vitro* geralmente é a opção inicial para a avaliação de estratégias de redução ou de inibição da produção de metano. A técnica *in vitro* é a menos onerosa e a mais rápida, sendo possível realizar um número grande de incubações paralelas de cada vez. Isso permite uma quantidade suficiente de repetições mesmo em experimentos com uma quantidade maior de dietas e suas combinações. Além de permitir a avaliação dos efeitos de aditivos e dos ingredientes alimentares sobre a metanogênese (STORM et al., 2012).

Bhatta et al. (2006) e Bhatta et al. (2008) observaram boa concordância entre as técnicas *in vitro* e *in vivo*, quando compararam mensurações de CH₄ pelas técnicas TIVPG, marcador SF₆ e câmara respirométrica.

As principais desvantagens da TIVPG são simular somente as emissões de CH₄ referentes à fermentação ruminal, negligenciando as emissões de CH₄ e a digestão do alimento no trato gastrointestinal pós-rúmen. Além disso, esta técnica não inclui a adaptação dos micro-organismos do rúmen para os alimentos testados. É comum a utilização de fluido ruminal de animais alimentados com uma ração padrão, que nem sempre corresponde aos alimentos testados.

Devido a essas limitações os resultados da TIVPG devem ser sempre interpretados com cuidado, mas é uma técnica muito útil, como primeira abordagem para testar potenciais alimentos e aditivos, ou quando são necessárias condições de incubação controlada.

Técnica do marcador interno CO₂

Este método foi recentemente desenvolvido e descrito por Madés et al. (2010) com o objetivo de estimar as emissões de CH₄ por ruminantes. Utiliza-se o CO₂ como gás marcador interno, como na técnica do marcador SF₆, com a diferença de o CO₂ ser naturalmente emitido pelos animais.

A técnica baseia-se na mensuração da relação CH₄/CO₂ nos gases excretados pelos animais, em intervalos regulares. Com o conhecimento da produção diária de CO₂ pelo animal, torna-se possível o cálculo da produção diária de CH₄. A produção diária de CO₂

pelo animal pode ser calculada a partir de dados obtidos em experimentos que determinam as exigências nutricionais com câmaras respirométricas. Estes experimentos mostram estreita relação entre a produção de CO₂ e a de calor quando diferentes nutrientes são metabolizados (MADES et al., 2010).

Animais em manutenção produzem aproximadamente 1L CO₂ por 22,0KJ de calor produzido. As correções podem ser feitas também para animais lactantes ou ganhando peso (MADES et al., 2010).

As medições de CH₄ e CO₂ são realizadas por um equipamento portátil chamado Gasmeter (Gasmeter Technologies Oy, Helsínquia, Finlândia), por meio de medições de infravermelho (TEYE et al., 2009). O equipamento é portátil e pode ser facilmente utilizado em circunstâncias muito diferentes.

A principal desvantagem da técnica é que a produção de CO₂ dos animais é influenciada pela intensidade da atividade física exercida pelo animal e sua produção. Essa restrição da técnica juntamente com a coleta de volumes pequenos do ar expirado pelo animal pode produzir maior variação nas estimativas das emissões de CH₄. O método pode ser facilmente aplicado a muitos animais permitindo reduzir o erro padrão das médias estimadas nos experimentos (STORM et al., 2012).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Todos os métodos descritos para a mensuração das emissões de metano pelos ruminantes parecem promissores, alguns possuem metodologias já consolidadas e outros ainda estão em desenvolvimento. Nenhum deles, no entanto, é aplicável em todas as situações e todos eles requerem uma análise cuidadosa das condições experimentais antes de sua aplicação. Um adequado conhecimento sobre os métodos é importante no planejamento de experimentos e na interpretação dos resultados obtidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BHATTA, R.; ENISHI, O.; TAKUSARI, N.; HIGUCHI, K.; NONAKA, I.; KURIHARA, M. Diet effects on methane production by goats and a comparison between measurement methodologies. **J. Agric. Sci.**, v.146, p. 705–715, 2008.
- BHATTA, R.; TAJIMA, K.; TAKUSARI, N.; HIGUCHI, K.; ENISHI, O.; KURIHARA, M. Comparison of sulfur hexafluoride tracer technique, rumen simulation technique and *in vitro* gas production techniques for methane production from ruminant feeds. **Int. Congr. Ser.**, v.1293, p. 58–61, 2006.
- CHAVES, A. V.; THOMPSON, L. C.; IWAASA, A. D. Effect of pasture type (alfafa vs. grass) on methane and carbon dioxide production by yearling beef heifers. **Can. J. Anim. Sci.**, v. 86, p. 409–418, 2006.
- ELLIS, J.L.; KEBREAB, E.; ODONDO, N.E.; MCBRIDE, B.W.; OKINE, E.K.; FRANCE, J. Prediction of methane production from dairy and beef cattle. **J. Dairy Sci.**, v.90, p.3456–3467, 2007.
- GRAINGER, C.; CLARKE, T.; MCGINN, S. M.; AULDIST, M. J.; BEAUCHEMIN, K. A.; HANNAH, M. C.; WAGHORN, G. C.; CLARK, H.; ECKARD, R. J. Methane emissions from dairy cows measured using the sulfur hexafluoride (SF₆) tracer and chamber techniques. **J. Dairy Sci.**, v. 90, p. 27455-2766, 2007.
- JOHNSON, K.A.; HUYLEYER, M.; PIERCE, C.S.; WESTBERG, H.; LAMB, B.; ZIMMERMAN, P. The use of SF₆ as an inert gas tracer for use in methane measurements. **J. Anim. Sci.**, v.70, p. 302, 1992.
- JOHNSON, K. A.; HUYLEYER, M.; WESTBERG, H.; LAMB, B.; ZIMMERMAN, P. Measurement of methane emissions from ruminant livestock using a SF₆ tracer technique. **Environ. Sci. Technol.** v.28, p.359–362, 1994.
- JOHNSON, K. A.; JOHNSON, D. E. Methane emissions from cattle. **J. Anim. Sci.**, v. 73, p. 2483-2492, 1995.
- JOHNSON, K.A.; WESTBERG, H.H.; MICHAL, J.J.; COSSALMAN, M.W. The SF₆ Tracer Technique: Methane measurement from ruminants. In: MAKKAR, H. P. S.; VERCOE, P. E. **Measuring Methane production from ruminants**, Dordrecht, The Netherlands: Springer, 2007. cap. 3.
- LASSEY, K.R.; WALKER, C.F.; MCMILLAN, A.M.S.; ULYATT, M.J. On the performance of SF₆ permeation tubes used in determining methane emission from grazing livestock. **Chemosphere Glob. Chang. Sci.**, v.3, p.367–376, 2001.
- MADES, J.; BJERG, B. S.; HVELPLUND, T.; WEISBJERGB, M. R.; LUNDB, P. Methane and carbon dioxide ratio in excreted air for quantification of the

- methane production from ruminants. **Livest. Sci.**, v. 129, p. 223-227, 2010.
- MCGINN, S.M.; BEAUCHEMIN, K.A.; IWAASA, A.D.; MCALLISTER, T.A. Assessment of the sulfur hexafluoride (SF₆) tracer technique for measuring enteric methane emissions from cattle. **J. Environ. Qual.**, v.35, p.1686–1691, 2006.
- MOULD, F.L.; KLIEM, K.E.; MORGAN, R.; MAURICIO, R.M. In vitro microbial inoculum: A review of its function and properties. **Anim. Feed Sci. Technol.** v.123, p.31–50, 2005.
- NAVARRO-VILLA, A.; O'BRIEN, M.; LOPEZ, S.; BOLAND, T.M.; O'KIELY, P. Modifications of a gas production technique for assessing in vitro rumen methane production from feedstuffs. **Anim. Feed Sci. Technol.** v.166, p.163–174, 2011.
- ODONGO, N. E.; BAGG, R.; VESSIE, G.; DICK, P.; OR-RASHID, M. M.; HOOK, S. E.; GRAY, J. T.; KEBREAB, E.; FRANCE, J.; MCBRIDE, B. W. Long-term effects of feeding monensin on methane production in lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v. 90, p. 1781– 1788, 2007.
- OKELLY, J.C.; SPIERS, W.G. Effect of monensin on methane and heat productions of steers fed lucerne hay either ad-libitum or at the rate of 250 g/hour. **Aust. J. Agric. Res.**, v.43, p.1789–1793, 1992.
- PELLIKAAN, W.F.; HENDRIKS, W.H.; UWIMANA, G.; BONGERS, L.J.G.M.; BECKER, P.M.; CONE, J.W. A novel method to determine simultaneously methane production during *in vitro* gas production using fully automated equipment. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v.168, p.196–205, 2011.
- PINARES-PATIÑO, C.S.; CLARK, H. Reliability of the sulfur hexafluoride tracer technique for methane emission measurement from individual animals: An overview. **Aust. J. Exp. Agric.**, v.48, p.223–229, 2008.
- PINARES-PATIÑO, C.S.; D'HOOR, P.; JOUANY, J.P.; MARTIN, C. Effects of stocking rate on methane and carbon dioxide emissions from grazing cattle. **Agric. Ecosyst. Environ.**, v.121, p.30–46, 2007.
- PINARES-PATIÑO, C.S.; MACHMULLER, A.; MOLANO, G.; SMITH, A.; VLAMING, J.B.; CLARK, H. The SF₆ tracer technique for measurements of methane emission from cattle—Effect of tracer permeation rate. **Can. J. Anim. Sci.**, v.88, p.309–320, 2008.
- RYMER, C.; HUNTINGTON, J.A.; WILLIAMS, B.A.; GIVENS, D.I. In vitro cumulative gas production techniques: History, methodological considerations and challenges. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v.123, p.9–30, 2005.
- SILVA, R.R. **Respirometria e determinação das exigências de energia e produção de metano de fêmeas bovinas leiteiras de diferentes genótipos**. 2011. 61f. Tese (Doutor em Zootecnia) Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- STORM I. M. L. D.; HELLWING A. L. F.; NIELSEN N. I. E MADSEN J. Methods for measuring and estimating methane emission from ruminants. **Animals**, v.2, p.160-183, 2012.
- TEYE, F.K.; ALKKIOMAKI, E.; SIMOJOKI, A.; PASTELL, M.; AHOKAS, J. Instrumentation, measurement and performance of three air quality measurement systems for dairy buildings. **Appl. Eng. Agric.**, v.25, p.247–256, 2009.
- ULYATT, M.J.; BAKER, S.K.; MCCRABB, G.J.; LASSEY, K.R. Accuracy of SF₆ tracer technology and alternatives for field measurements. **Aust. J. Agric. Res.** v.50, p.1329–1334, 1999.
- UNITED STATES OF AMERICA. Environmental Protection Agency. Evaluating ruminant livestock efficiency projects and programs. In: **PEER review draft**. Washington: Environmental Protection Agency, 2000. 48p.
- VLAMING, J.B. **Quantifying Variation in Estimated Methane Emission from Ruminants Using the SF₆ Tracer Technique**. 2008. 186f. Tese (Ph.D.), Massey University, Palmerston North, New Zealand, 2008.
- WOODWARD, S. L.; WAGHORN, G. C.; THOMSON, N. A. Supplementing dairy cows with oils to improve performance and reduce methane – does it work? **Procee. N. Zeal. Soci. Anim. Produc.**, v. 66, p. 176–181, 2006.