

Vědecký výbor výživy zvířat

**Tvorba methanu v trávicím traktu
živočichů**

Milan Marounek, Dagmar Dušková

Praha, listopad 2019



Obsah

1. Antropogenní zdroje methanu:	3
2. Hydráty methanu.....	4
3. Tvorba methanu mikroorganismy.....	4
4. Nutriční požadavky methanogenů.....	6
5. Působení mezi methanogeny a dalšími mikroorganismy	6
6. Produkce methanu u živočichů s jednoduchým žaludkem.....	8
7. Inhibice methanogeneze	9
7.1. Inhibice methanogeneze sloučeninami chloru	9
7.2. Inhibice methanogeneze pomocí tuků.....	10
7.3. Inhibice methanogeneze látkami z rostlin	10
7.4. Další způsoby inhibice methanogeneze.....	11
8. Methanotrofní mikroorganismy	11
9. Tvorba methanu a užítkovost přežvýkavců	13
9.1. Měření velikosti tvorby methanu.....	13
9.2. Variabilita produkce methanu	13
9.3. Příjem krmiva.....	14
9.4. Podíl hrubé píče	14
9.5. Frakce vlákniny	14
9.6. Tuk	14
9.7. Inhibitory methanogeneze	15
Závěr.....	15
Summary.....	16
Seznam literatury	16

Seznam obrázků:

Obrázek 1. Struktura a fyzická podoba hydrátu methanu.	4
Obrázek 2. Syntéza methanu mikroorganismy	5
Obrázek 3. Struktura Chromoforu F 430	6
Obrázek 4. Dva způsoby metabolismu formaldehydu vzniklého oxidací methanu	12

Úvod

V současné době jsme svědky zájmu společnosti o globální změnu klimatu, která se projevuje nárůstem teploty klimatického systému Země. Změna klimatu se projevuje úbytkem mořského ledu, táním ledovců, vzestupem hladiny moří, vzestupem teploty vzduchu a povrchových vod, vzdušné vlhkosti, změnou srážek, táním permafrostu. Soudí se, že na změny klimatu má velký vliv lidská činnost od začátku 20. století. Ta má řadu podob a jednou z nich je produkce „skleníkových“ plynů, které absorbují infračervené záření, jinak vyzařované do vesmíru. Hlavními skleníkovými plyny jsou vodní pára (podíl na skleníkovém efektu 36-72%), oxid uhličitý (9-26%), metan (4-9%). Rozsah produkce skleníkových plynů a snaha o jeho snížení jsou předmětem mezinárodních dohod.

Methan absorbuje infračervené záření, patří mezi skleníkové plyny zvyšující teplotu atmosféry. Je v tomto 20x účinnější než CO₂, ale v atmosféře je jej 200x méně (0,0002% CH₄ a 0,04% CO₂). Doba setrvání CH₄ v atmosféře je asi 12 let. Před rozvojem průmyslu byla koncentrace methanu v atmosféře poloviční. V posledních letech stále roste, i když se růst zpomaluje (Dlugokencky a kol., 1998).

1. Antropogenní zdroje methanu:

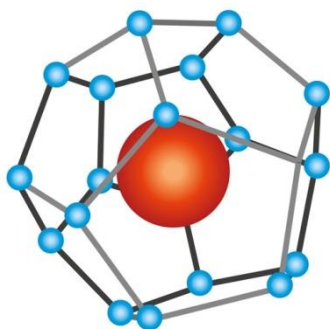
Podle Wikipedie: <http://en.wikipedia.org/wiki/methane> jsou tyto hlavní antropogenní zdroje methanu:

- chov hospodářských zvířat, především skotu (65-100 mil. tun /rok)
- emise z těžby fosilních paliv (40-100 mil. tun/rok)
- spalování biomasy (20-100 mil. tun/rok)
- skládky odpadů (10-70 mil. tun/rok)
- pěstování rýže (170 mil. tun/rok)
- chemický průmysl, koksárenství, čistírny odpadních vod

Z přehledu antropogenních zdrojů methanu je zřejmé, že se jedná o hrubé odhady, přesto za ca 70% emisí methanu odpovídají lidé (Demeyer a Fievez, 2000). Ještě větší nejistotou jsou zatíženy odhady tvorby methanu v přírodě, bez vlivu člověka. Methan vzniká anaerobním rozkladem organické hmoty, jeho zdroje jsou mokřady, povrchové vody i moře.

2. Hydráty methanu

V mořích se nachází veliké množství methanu ve formě hydrátů methanu. Hydráty methanu jsou klathráty v nichž molekula CH₄ je uzavřena v pevné kleci tvořené molekulami vody.



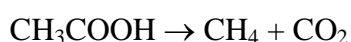
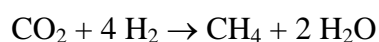
Obrázek 1. Struktura a fyzická podoba hydrátu methanu.

Hydráty methanu se nachází v pevném skupenství ve věčně zmrzlé půdě a v mořích blízkých kontinentům v hloubce do 2000 m. Odhaduje se, že v hydrátech se nachází methan v množství řádově 10⁴ gigatun uhlíku (1 Gt = 10¹⁵ g). Množství takto uloženého uhlíku je větší než to co se nachází ve všech fosilních palivech a asi 10x více než v dosud známých ložiscích přírodního plynu (Kvenvolden, 1988). Methan v této formě by mohl být zdrojem energie v budoucnu, zatím ale nejsou technologie k jejich využití. Bohužel se z nich může methan uvolnit do ovzduší při vzestupu teploty na Zemi. S hydráty methanu se lidé seznámili v 30. letech, když při těžbě přírodního plynu došlo k ucpání potrubí hmotou podobnou ledu.

Hydráty methanu vznikají v prostředí, kde je methan v dostatečném množství dostupný. Methan se v moři tvoří dvěma způsoby. Biogenní methan vzniká mikrobiálním rozkladem usazeného planktonu v hloubkách 10 m-3000 m). Předpokladem je nepřítomnost kyslíku. V mnohem větších hloubkách vzniká methan bez účasti mikroorganismů rozkladem organické hmoty vlivem teploty a vysokého tlaku. Hydráty methanu se netvoří ve velkých hloubkách, daleko od pobřeží.

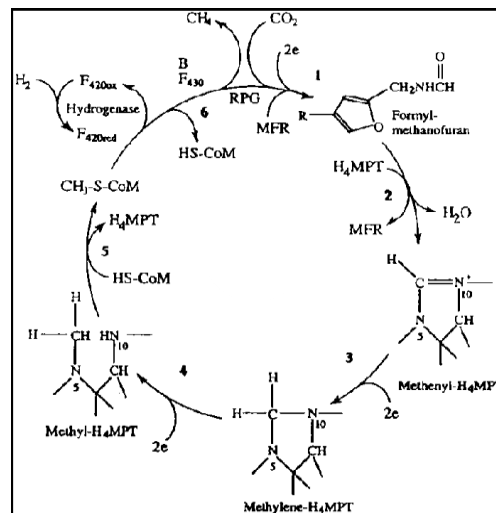
3. Tvorba methanu mikroorganismy

Tvorba methanu je druh anaerobní respirace, v níž je terminálním akceptorem elektronů uhlík. Tento uhlík dodává několik jednoduchých organických sloučenin, zejména oxid uhličitý a acetát:



Dalšími zdroji uhlíku mohou být kyselina mravenčí, methanol, metylaminy, tertamethylamonium, dimethylsulfid, methanethiol (Jarrell a Kalmokoff, 1988).

Tvorby methanu se účastní několik koenzymů a kofaktorů (Obr. 2). Methanogeneze z $H_2 + CO_2$ začíná tvorbou N-karboxymethanofuranu, který je pak redukován na formylmethanofuran. Formylová skupina je redukována na metylovou a přenesena na koenzym M. Nakonec redukční demethylace methyl-S-CoM dává vzniknout methanu (Deppenmeier a kol., 1996).



Obrázek 2. Syntéza methanu mikroorganismy

Methanobakterie jsou striktně anaerobní jednobuněčné organismy, které získávají energii tvorbou methanu z omezeného množství substrátů. Patří do domény Archea, což je doména prokaryotických organismů, nezávislá na ostatních doménách života (bakterie a eukaryota). Archea se liší stavbou buněčné membrány i metabolismem, často vyhledávají extrémní stanoviště s vysokou teplotou, extrémním pH nebo vysokým obsahem soli. Část methanobakterií postrádá cytochromy. V buněčné stěně methanobakterií chybí peptidoglykan a v membránách jsou etherové vazby glycerolu s polyisoprenoidy (Vogels a kol., 1984). Klasifikaci Archea není ustálena. Jarrell a Kalmokoff (1988) uvádějí v přehledu *Methanobacteriaceae* 75 organismů izolovaných z různých prostředí. Producenti methanu z rodu *Methanobrevibacter* jsou nejčastějšími zástupci Archea v trávicím traktu býložravců (St-Pierre a Wright, 2013).

Z bacheru skotu bylo izolováno a popsáno 6 kmenů *Methanobrevibacterium ruminantium*. Mikroskopicky se buňky jeví jako krátké gram-positivní kokobacily. K tvorbě methanu využívaly $H_2 + CO_2$, nikoliv formiát (Miller a kol., 1986). Jeyanathan a kol. (2011) srovnávali zastoupení methanogenů z bacheru ovcí, skotu a jelenů při různých dietách.

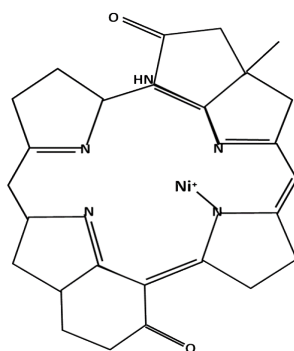
Společenství methanogenů byla relativně stejná, navzdory různým druhům a dietám. Jednalo se o druhy *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanobrevibacter olleyae*, *Methanobrevibacter thaueri*, *Methanobrevibacter millerae* a druhy rodu *Methanosphaera*. Tuto práci doplňují pozorování brazilských autorů, kteří uvádějí přítomnost zástupců rodu *Methanobrevibacter* a *Methanosphaera* v bacheru koz (Cunha a kol., 2011).

4. Nutriční požadavky methanogenů

Methanogeny jsou striktně anaerobní organismy, předpokladem růstu a tvorby methanu je proto absence kyslíku a také vhodné pH prostředí. V případě *Methanobacterium bryantii*. Sprott a kol. (1985) našli optimální pH pro růst 6,6 – 7,1. Uvádějí i nálezy z jiných studií s 9-ti methanogeny, vesměs s hodnotami blízkými 7,0.

Všechny methanogeny využívají k růstu $H_2 + CO_2$. Dalšími substráty mohou být formiát, acetát, methanol, methylaminy a oxid uhelnatý. Některé methanogeny asimilují aminokyseliny, růst dalších je stimulován vitaminy. Methanogeny potřebují pro růst také síru, nejlépe ve formě sulfidů nebo sirných aminokyselin a dusík, nejlépe NH_4^+ . Požadavky na ionty kovů jsou variabilní (Jarrell a Kalmokoff, 1988).

Významný je požadavek methanogenů na nikl, který je součástí faktoru F430 (Obr. 3.). Je vázán v porfyrinovém kruhu (podobně jako kobalt ve vitaminu B12). Faktor 430 je v buňkách methanogenů jednak volný, jednak vázaný na protein, který je součástí methyl-CoA reductasy. Tento enzym představoval 12% proteinu buněk *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Ankel-Fuchs a kol., 1984).



Obrázek 3. Struktura Chromoforu F 430

5. Působení mezi methanogeny a dalšími mikroorganismy

Klasik anaerobní mikrobiologie profesor Hungate (1982) vyslovil názor, že jediný mikrobiální druh nemůže vykonat maximální biochemickou práci. Efektivnější je komunita specializovaných mikroorganismů vázaných vzájemnými interakcemi. Přežití v anaerobním

systému není dáno účinností fermentace (ATP/glukosa), ale maximem ATP získaným za jednotku času. Produkce acetátu či propionátu dává 4 ATP/glukosa, ale kombinována s methanogeny 4,5 ATP/glukosa.

Bakterie žijící v anaerobiose potřebují vhodný akceptor elektronů uvolňovaných v oxidačních reakcích (pozn: oxidace je ztráta elektronu). Není-li jiné cesty, mohou uvolňovat elektrony ve formě H_2 . Mechanismus uvolnění H_2 je různý – přímo z $NADH_2$, formiát hydrogenlyasou, NAD-ferrodoxin oxidoreduktasou (Kuhn a kol., 1984). Úlohou methanogenů (a jejich přínosem) je udržovat koncentraci molekulárního H_2 na nízké úrovni, aby uvolnění H_2 nebylo bráněno. K producentům H_2 , či formiátu, který je hned štěpen formiát lyasou na $H_2 + CO_2$, patří v bachoru významné bakterie: *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Eubacterium limosum*, *Megasphaera elsdenii*, *Ruminococcus albus* a *Ruminococcus flavefaciens* (Joyner a kol., 1977).

Významný je vztah mezi bachorovými methanogeny a prvoky, jak popisují Stumm a kol. (1982). Vztahem mezi bachorovými prvoky se zabývá meta-analýza, která shrnuje výsledky 76 *in vivo* experimentů (Guyader a kol., 2014). Výsledky 31% pokusů uvádí souběžnou redukci počtu prvoků a tvorby methanu. V těchto pokusech byl vesměs použit přídatek tuku. Naopak, u 21% pokusů kolísala tvorba methanu nezávisle na počtu prvoků. Autoři vyvozují, že ne vždy mají prvoci vliv na tvorbu methanu.

Prvoci tvoří velké množství molekulárního H_2 , který je substrátem methanogeneze. Na význam prvoků v tvorbě methanu ukazuje skutečnost, že defaunací (odstraněním prvoků) se sníží tvorba methanu o 11% (Tapio a kol., 2017). Stejní autoři uvádějí, že vysoká tvorba methanu se pojí s nízkým zastoupením Proteobakterií. Anaerobní bachorové houby tvoří mnoho H_2 a formiátu. Svou přítomností v bachoru tvorbu methanu podporují.

V bachoru existuje početná populace acidogenních bakterií (řádově $10^8/1$ g), které z H_2 a CO_2 tvoří kyseliny, zjevně acetát (Leedle a Greening, 1988). Soutěží o substrát mezi methanogeny a acidogenními bakteriemi se dá vysvětlit skutečnost, že ionofory, které jsou známými inhibitory tvorby methanu v prostředí slepého střeva králíků, tvorbu methanu naopak stimulují (Marounek a kol., 1997). K tomuto pokusu byl použit monensin, salinomycin, lasalocid a maduromicin. Ionofory o koncentraci 5 μ g/ml zvýšily při inkubacích slepého střeva králíků tvorbu methanu o 26-35% a snížily tvorbu acetátu. Tvorba acetátu byla v kulturách s atmosférou vodíku významně vyšší než s atmosférou dusíku.

Byl učiněn pokus zabránit hromadění methanu přidáním acetogenních bakterií *Acetivibrio ruminis*, *Eubacterium limosum* a *Ruminococcus productus* do bachorové tekutiny při inkubaci *in vitro*. Produkce methanu po přidavku *E. limosum* klesla o 5%, další acetogenní bakterie ale neměly na produkci methanu vliv. Vyplývá z toho, že acetogenní

bakterie neobstojí v soutěži o H₂ s methanogeny a jsou schopny zvýšit produkci acetátu jen, je-li methanogeneze inhibována, v tomto případě kyselinou 2-bromethansulfonovou (Lopez a kol., 1999). Methanogeny využívají H₂ i při jeho nízkých koncentracích až do tlaku 6,5 Pa (Lovley, 1985).

6. Produkce methanu u živočichů s jednoduchým žaludkem

Produkce methanu probíhá i u živočichů s jednoduchým žaludkem, její velikost je ale málo významná ve srovnání s přežvýkavci. Pozornost byla věnována tvorbě methanu v slepém střevě králíků, v souvislosti s postnatálním vývojem trávení. Marounek a kol. (1999) zjistili, že tvorba methanu v slepém střevu je zpožděna za tvorbou ostatních produktů fermentace, tj. za tvorbou těkavých mastných kyselin. Tvorba methanu začínala u jednoho ze čtyř králíků až ve věku 6 týdnů. Dokonce i ve věku 11 týdnů jeden ze čtyř králíků neprodukoval methan. Ve věku 3 až 6 měsíců však mezi 84 dospělými králíky nebyl ani jeden, který by methan neprodukoval (Marounek a kol., 1998).

Mišta a kol. (2015) prokázali tvorbu methanu v slepém střevu zajíců (*Lepus europaeus*), byla však nižší za srovnatelných podmínek než u králíků (*Oryctolagus cuniculus*).

Význačnými producenty methanu jsou prasata. Jensen (1996) v přehledném referátu o methanogenezi u zvířat s jednoduchým žaludkem uvádí, že prase o hmotnosti 120 kg denně vytvoří 1,4 l methanu, je-li v jeho krmivu málo vlákniny, avšak 12,5 l methanu za den při krmivu s vysokým obsahem vlákniny. Methan vzniká u všech prasat v kontrastu s lidmi, u nichž methan tvoří jen polovina jedinců. Tvorba methanu u prasat při různých dietách je přímo úměrná množství přijatých neškrobových polysacharidů.

Jensen (1996) uvádí denní tvorbu methanu po přepočtu na 1 kg tělesné hmotnosti.

Tabulka 1. Denní tvorba methanu po přepočtu na 1 kg tělesné hmotnosti (l):

Kráva	0,46
Ovce	0,75
Kůň	0,16
Osel	0,16
Prase	0,10
Husa	0,01
Potkan	0,03
Zebra	0,10
Nosorožec	0,07
Hroch	0,07
Slon	0,06
Člověk (je-li producentem)	0,05

Zde je zřejmé, že mezi producenty CH₄ dominují přežvýkavci. Produkce methanu u ostatních zvířat je mnohem menší, i když jsou býložravá. Pokud bychom tvorbu methanu nekorigovali tělesnou hmotností, pak by u velkých zvířat dosahovala značných hodnot. Názor, že tvorba methanu u dinosaurů byla tak velká, že způsobila (skleníkovým efektem) teplé počasí v druhohorách, je ale asi přehnaný (Wilkinson a kol., 2012).

Rozsah tvorby methanu ovlivňuje i věk. U potkanů se s věkem zvyšuje použití elektronů pro redukci CO₂ na CH₄, na úkor redukce CO₂ na acetát, tzn., roste význam methanogeneze na úkor acetogeneze (Maczulak a kol., 1989). Podobná situace je i u lidí. Tvorba methanu, měřená jeho koncentrací v dechu korelovala s věkem, příjmem vlákniny potravou a počty Archaea ve výkalech (Fernandes a kol., 2013).

Produkce methanu různými živočichy je velmi variabilní. Málo záleží na povaze potravy. Hackstein a van Alen (1996) ve své studii uvádí, že aligátoři a velcí hadi uvolňují z výkalů 50-150x více CH₄ než býložravé pandy. Afričtí pštrosi produkují methan, ale jim příbuzní australští emu nikoliv. Pokud nějaký druh ztratí methanogeny, pak ztráta je nevratná. Producenti methanu udržují nízkou koncentraci molekulárního H₂ ve střevu, čímž zvyšují účinnost fermentace. Přítomnost methanogenů vedla k rozvoji anatomických struktur, které je hostí – bachor, slepé střevo, členěný předžaludek. Jak bylo zmíněno, polovina lidí v Evropě tvoří methan, polovina nikoliv. I lidé, kteří methan netvoří mají trávicím traktu malé množství methanobakterií a není jasné proč se tvorba methanu nerozvinula. I v rámci jedné rodiny mohou být současně producenti i neproducenti CH₄. Zdá se, že neproducenti methanu nemají gen pro receptor methanobakterií ve střevu.

7. Inhibice methanogeneze

Tvorba methanu v bacheru představuje ztrátu energie obsažené v krmivu. Snaha o omezení tvorby methanu má dlouhou tradici.

7.1. Inhibice methanogeneze sloučeninami chloru

V pokusech s inkubací bacherového obsahu byly zkoušeny chlorované analogy methanu, tj. methylenchlorid, chloroform a chlorid uhličitý, z nich chlorid uhličitý byl nejúčinnější, neboť k 50% inhibice postačovala koncentrace 1,4 μM (Bauchop, 1967). Halogenované sloučeniny inhibují metabolické dráhy tvorby methanu. Další chlorovanou sloučeninou použitelnou k inhibici tvorby methanu byl chloralhydrát (trichlorethandiol). V koncentraci 0,1 mmol/l inhiboval tvorbu methanu *in vitro* v bacherovém obsahu, zvýšil tvorbu kyseliny propionové a

molekulárního H₂. Pokus byl opakován *in vivo* infusemi chloral hydrátu do bachoru (Van Nevel a kol., 1969). Tvorbu methanu lze inhibovat i siřičitany. V podmínkách *in vitro* i *in vivo* byla inhibována siřičitanem sodným za vzniku H₂ a vzrůstu propionátu (Van Nevel a kol., 1970). Chloral hydrát a siřičitan byly testovány i v dalším pokuse, a doplněny o hydrolyzát lněného oleje (Marty a Domeyer, 1973). Dalšími vhodnými sloučeninami s obsahem chloru jsou trichlorethyl pivalát a trichlorethyl adipát (Czerkawski a Breckenridge, 1975; Clapperton, 1977), a chlorečnan (Barry a kol., 1978).

7.2. Inhibice methanogeneze pomocí tuků

Další skupinou látek inhibujících tvorbu methanu v bachoru jsou tuky. Při srovnání oleje řepkového, rybího a kokosového byl nejvíce účinný olej kokosový (Dong a kol., 1997). I v dalším pokuse byl kokosový olej účinnější v potlačení methanogeneze než drcená semena řepky, slunečnice a lnu. Účinkem kokosového oleje vymizeli prvoci a došlo k snížení tvorby methanu o 43% (Machmuller a kol., 1998). Snížení tvorby methanu vlivem kokosového oleje nastává nezávisle na vlivu na bachorové prvoky (Dohme a kol., 1999). Stejný účinek jako kokosový olej má kyselina laurová (C 12:0), za předpokladu nízké koncentrace vápníku v dietě (Machmuller a kol., 2002). Soliva a kol. (2003) doporučují nahradit část kyseliny laurové kyselinou myristovou z důvodu lepší chutnosti krmiva. Výsledky pokusů s účinkem tuků na tvorbu methanu, bachorovou fermentaci a mléčnou užitkovost shrnula studie Paara (2013). S rostoucí koncentrací tuku v dietě klesá stravitelnost sušiny a zprvu roste nádoj, pak klesá. Koncentrace nasycených mastných kyselin má malý vliv na tvorbu methanu, účinné jsou kyselina laurová a polynenasycené mastné kyseliny.

7.3. Inhibice methanogeneze látkami z rostlin

Další skupinou látek, které mohou inhibovat tvorbu methanu, jsou antimikrobiální látky obsažené v rostlinách. Zájem o ně vzrostl po zákazu používání antibiotik ke stimulaci růstu po roce 2006. Patří sem látky, které působí proti prvokům (saponiny a tanniny) a esenciální oleje s přímým účinkem proti methanogenům (Cieslak a kol., 2013). O antimethanogenním účinku saponinů pojednávají (Cieslak a kol., 2014), o účinku tanninů např. Cieslak a kol., (2012). Esenciální oleje jsou účinné inhibitory tvorby methanu, avšak mohou potlačovat bachorovou fermentaci, snižovat chutnost krmiva, jeho příjem a následně užitkovost přežvýkavců (Benchaar a Greathead, 2011).

7.4. Další způsoby inhibice methanogeneze

Zajímavost představuje inhibice tvorby methanu v bachoru cyklickými hexapeptidy (Freidinger a kol., 1980).

Známými inhibitory tvorby methanu jsou ionofory. Jsou to látky nebílkovinné povahy, které zvyšují propustnost biologických membrán pro ionty. Jejich molekuly mají hydrofobní část, která zajišťuje rozpustnost v lipidové dvojvrstvě, a hydrofilní část, která umožní vazbu iontů. Ionofory selektují mikroorganismy. Působí proti producentům H_2 , CO_2 a formiátu. Ionofory se osvědčily ve výživě drůbeže a králíků proti kokcidiím. Monensin, produkt *Streptomyces cinnamonensis* byl vyráběn i u nás a používal se ve výkrmu skotu. Jeho příznivý účinek na užitkovost se odvozoval z vyšší tvorby propionátu na úkor acetátu a methanu. Monensin snižuje aktivitu deaminas v bachoru, což vede k lepšímu využití proteinu krmiva. Práci, které tyto účinky popisují je velké množství. Zde stačí uvést jednu typickou (Wallace a kol., 1981). Ionofory, na rozdíl od chlorovaných uhlovodíků nevedou k hromadění H_2 . Snižují poměr acetát/propionát Russell a Martin, 1984).

Tvorbu methanu inhibují také žlučové kyseliny, tam kde ve střevu je jejich koncentrace významná (Florin a Jabbar, 1994). Tvorbu methanu inhibují těžké kovy jako železo, nikl, mangan, měď a zinek. Váží se na SH-skupiny enzymů, které inaktivují. Při nízkých koncentracích se methanobakterie adaptují (Sanchez a kol., 1996).

Tvorbu methanu lze inhibovat i pomocí látek, které mají k elektronům větší afinitu než oxid uhličitý. Mohou to být nitráty, sulfáty, Fe^{+++} . Ty pak soutěží o vodík. Nitrity jsou silné a nitráty slabé inhibitory methanogeneze (Klüber a Conrad, 1998). Podobné výsledky jako s nitrity byly získány *in vivo* na ovcích po podání nitroethanu per os. Potlačení methanogeneze nevedlo k vzestupu propionátu a butyrátu (Anderson a kol., 2004). Nitráty jsou toxické tvorbou methemoglobinu, zvířata však lze na příjem nitrátů adaptovat (Lee a Beauchemin, 2014).

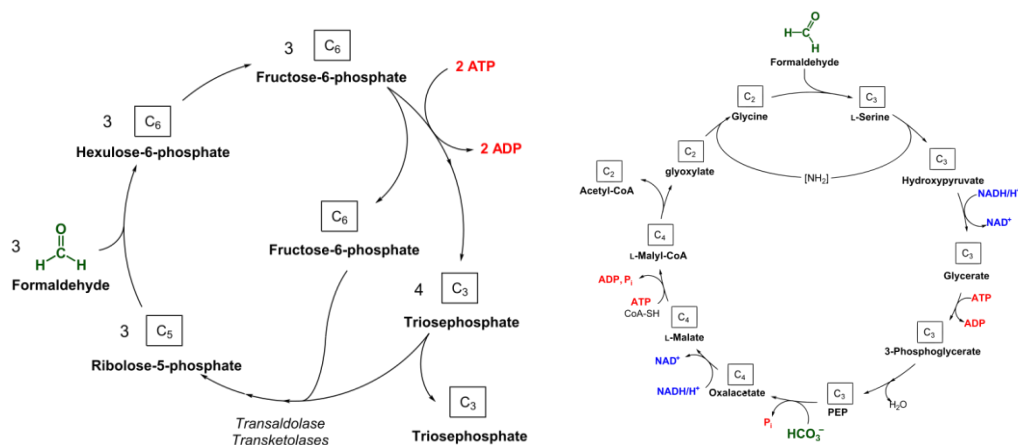
Ve stádiu návrhu je vývoj vakcín proti bachorovým methanogenům. Do bachoru by se protilátky mohly dostat slinami (Wedlock a kol., 2013).

8. Methanotrofní mikroorganismy

Methanotrofní organismy se řadí k Archea nebo k bakteriím. Metabolizují methan jako jediný zdroj uhlíku a energie. Jsou aerobní i anaerobní. V největších počtech se nachází tam, kde methan vzniká, mohou ale využívat i methan v atmosféře (Holmes et al., 1999). Taxonomie

methanotrofů je složitá, dle Wikipedie je 18 rodů kultivovatelných Grammaproteobakterií a 5 rodů Alphaproteobakterií, což představuje asi 60 různých druhů.

Aerobní methanotrofní organismy oxidují methan na formaldehyd, který se zabuduje do organických sloučenin dvěma různými způsoby ukázanými na Obr. 4, buď přes ribuloso-5-fosfát, nebo přes serin. V prvním případě vznikne fruktosa-6-fosfát, který je meziproduktem glykolýzy, v druhém vzniká acetyl-CoA, který vstoupí do Krebsova cyklu. Konečným produktem aerobní oxidace methanu je pak CO₂.



Obrázek 4. Dva způsoby metabolismu formaldehydu vzniklého oxidací methanu

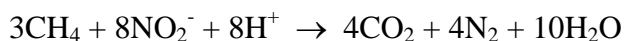
Anaerobní methanotrofní organismy potřebují pro oxidaci methanu vhodný akceptor elektronů. Těmito akceptory mohou být ionty železa a manganu, častěji ale sulfáty, případně nitráty. Schubert a kol. (2011) popisují oxidaci methanu bakteriemi redukujícími sulfáty v sedimentu sladkovodního jezera. Pro oxidaci methanu spřaženou s redukcí sulfátů platí tato rovnice:



Anaerobní oxidace methanu může být také spřažena s redukcí nitrátů:



nebo redukcí nitritů:



I v těchto případech je konečným produktem oxidace methanu oxid uhličitý.

Methanotrofní mikroorganismy mají hlavní roli v odstraňování methanu v prostředí, kde methan vzniká, zatímco v atmosféře to je reakce methanu s reaktivními formami kyslíku.

9. Tvorba methanu a užitkovost přežvýkavců

Již bylo uvedeno, že mezi živočišnými producenty methanu dominují přežvýkavci. Hungate (1975) uvádí, že v ovci vzniká denně asi 20 litrů methanu, u skotu 10x víc. Methan vznikající v bachoru odchází ze zvířete jícnem (95%), methan vznikající v tlustém střevu odchází plícemi (89%) a 11% řití (Murray a kol. 1976). Přežvýkavci tvoří asi 97% methanu vznikajícího v trávicím traktu hospodářských zvířat, z toho $\frac{3}{4}$ přísluší skotu. Celosvětově toto představuje 77.10^6 t/rok (McAllister a kol. 1996). Další aspekt tvorby methanu u zvířat představuje využití energie krmiva. Tvorba methanu v trávicím traktu vede ke ztrátě energie obsažené v krmivu, konkrétně 39,55 kJ/l (Moe a Tyrrell, 1979). Tvorba methanu v trávicím traktu zvířat má proto význam pro různé oblasti lidské činnosti. Největší význam má tvorba methanu v trávicím traktu přežvýkavců, v dalším textu jsou proto uvedeny faktory, které ji ovlivňují.

Úvodem je třeba zmínit, že studium tvorby methanu u zvířat v podmínkách *in vivo* bylo možné až po zavedení metod, které měření methanogeneze umožňují.

9.1. Měření velikosti tvorby methanu

Nejlepší, ale i nejnákladnější metodou jsou měření v respiračních komorách. Existují komory pro ovce i pro skot. Jsou vybaveny přesným měřením složení plynu, který z komory odchází. Alternativou je použití hexafluoridu síry (SF_6), který je plynem. K odhadům velikosti tvorby methanu lze použít korelace s příjmem sušiny a NDF (Lee a kol., 2012). Velikost produkce methanu u laktujících dojnic lze odhadnout díky vztahu mezi produkcí CH_4 a zastoupením mastných kyselin s lichým počtem atomů C a mastných kyselin s rozvětveným řetězcem v mléčném tuku (Montoya a kol., 2011).

9.2. Variabilita produkce methanu

Několik studií upozorňuje, že nálezy velikosti tvorby methanu dosti kolísají, i tehdy byly-li zjištěny u zvířat stejného druhu, věku na stejné krmné dávce (např. Clark, 2013; Bell a kol., 2014). To vede k názoru, že tvorba methanu je zčásti geneticky podmíněna a bude možné provést selekci zvířat s nízkou tvorbou methanu v trávicím traktu. Zvířata s vysokou užitkovostí produkují méně CH_4 na jednotku produkce. Selektce zvířat na nejlepší konverzi krmiva vede k relativnímu snížení tvorby methanu (Waghorn a Hegarty, 2011). Pinares-Patino a kol. (2013) však z výsledků pokusu s 1225 ovce v respiračních komorách zjišťují, že korelace mezi produkcí methanu a několika parametry užitkovosti je nízká. Pickering a kol.

(2015) jsou názoru, že genomická selekce zvířat má potenciál pro snížení emisí methanu. Bude ale nutno měřit produkci methanu u tisíců zvířat, což předpokládá mezinárodní spolupráci.

9.3. Příjem krmiva

Příjem krmiva je jeden z hlavních faktorů, které tvorbu methanu u přežvýkavců ovlivňují. Produkce methanu se lineárně zvyšuje s rostoucím příjmem krmiva (Kirchgessner et al., 1995). Záleží také na složení krmiva, jak je ukázáno dále.

9.4. Podíl hrubé píče

Vlivu této zásadní složky krmné dávky byla věnována značná pozornost (viz Hippenstiel a kol., 2013). Platí, že produkce methanu roste se zvyšujícím se podílem hrubé píče v krmivu. Velký podíl stavebních polysacharidů zvyšuje tvorbu acetátu a methanu, naopak náhrada píče koncentráty tvorbu methanu snižuje. Důvodem je změna poměru acetát/propionát ve prospěch propionátu, současně s poklesem pH. Tvorba propionátu představuje alternativu k využití vodíku, vede proto k poklesu tvorby methanu (Van Nevel a Demeyer, 1996).

9.5. Frakce vlákniny

Celulosa podporuje tvorbu methanu trojnásobně ve srovnání s hemicelulosami (Moe a Tyrell, 1979). Celulosa i hemicelulosa jsou fermentovány pomaleji než ostatní polysacharidy (McAllister a kol., 1996). Delší doba zdržení vlákniny v bachoru zvyšuje poměr acetát/propionát, následně pak tvorbu methanu (Hegarty a Gerdes, 1998).

9.6. Tuk

Grainger a Beauchemin (2011) shrnuli výsledky 27 studií, z nichž vyplynulo, že zvýšení obsahu tuku v krmivu o 10 g/kg sníží produkci methanu o 1 g/kg příjmu sušiny. Nezáleží na tom, byl-li přidán olej nebo semena olejnin, ani na původu oleje. Paara (2013) ve své meta-analýze shrnul výsledky 29 experimentů s použitím tuků u dojníc. S přidavkem tuků se zvyšovala mléčná produkce a jako optimální se jevil přidavek k dosažení koncentrace tuku v krmné dávce 3,9-6,0%, poté mléčná užitkovost klesala. Přidavek tuku neměl vliv na koncentraci těkavých mastných kyselin v bachorové tekutině, ale zvýšil koncentraci propionátu a snížil tvorbu methanu.

Záporem přidavku tuků při jeho vyšších koncentracích v dietě může být snížení stravitelnosti vlákniny a neúplná spotřeba krmiva (Giger-Reverdin a kol., 2003).

9.7. Inhibitory methanogeneze

O inhibitech methanogeneze pojednává kapitola 7. Zde možno uvést, že vůči sloučeninám chloru jsou námitky hygieniků a použití ionoforových antibiotik již není od 1. 1. 2006 možné. Přijatelné je použití látek získaných z rostlin. Joch a kol. (2016) zkoušel 11 látek obsažených v esenciálních olejích z rostlin. Všechny snížily *in vitro* tvorbu methanu, ale jen 5 neinhibovalo tvorbu těkavých mastných kyselin. Jen jedna látka (bornyl acetát) snížila tvorbu methanu na 1 mol těkavých mastných kyselin.

Ne vždy se látky z rostlin k inhibici tvorby methanu osvědčí. Benchaar (2016) uvádí, že skořicový olej a skořicový aldehyd nemají vliv na příjem krmiva, retenci N, stravitelnost živin, bacherové parametry a prvky. Benchaar a Greathead (2011) upozorňují, že esenciální oleje jsou často účinné až při vysokých koncentracích, které zhoršují chutnost krmiva, nebo mohou být i toxické. Zpráv o negativních účincích inhibitorů tvorby methanu je víc (Horton, 1980), rovněž o adaptaci bacherových mikroorganismů na tyto látky (Anderson a kol., 2004).

K tvorbě methanu dochází i v hnoji. Methanogenezi v hnoji lze omezit oddělením tekuté a pevné fáze a docílením přístupu vzduchu. Lepším řešením je použití hnoje v bioplynových stanicích, kdy se z větší či menší části likvidují semena plevelů a pathogenní organismy (např. Baylis a Paulson, 2011).

Závěr

Tvorba methanu v trávicím traktu hospodářských zvířat je částí antropogenní produkce skleníkových plynů a představuje příspěvek ke globálnímu oteplování. Není reálné očekávat, že stavy zvířat se v budoucnu budou snižovat, proto roste význam možností jak produkci methanu omezit, aniž by došlo k velkému poklesu užitkovosti. Možností jak toho dosáhnout je několik, každá ale má omezení. Použití inhibitorů methanogeneze má zpravidla víc záporů než pozitiv. Výhodné může být použití tuků v krmných dávkách. Pokud to bude reálné, lze snížit tvorbu methanu zvýšením produktivity přežvýkavců, protože tvorba methanu na jednotku produkce se s rostoucí užitkovostí snižuje. V budoucnu se může uplatnit selekční program s cílem získat genotypy s nízkou tvorbou methanu.

Summary

Methane is a greenhouse gas and contributes to the global warming of the Earth. Production of methane in the animal digestive tract should be lowered, however without a decrease in animal performance. Ruminants are the most important methane producers. The inhibition of methane production is often controversial. The exception to this is the supplementation of feeds of ruminants with fats. The increase of animal performance is advantageous as methane formation per unit of production decreases in this way. In future, animals with a low methane production may be selected to obtain genotypes with reduced methane emissions.

Seznam literatury

- Anderson R.C., Carstens G.E., Miller R.K., Callaway T.R. a kol. Effect of nitroethane administration on ruminal VFA production and specific activity of methane production. *J. Anim. Feed Sci.* 13: 23-26, 2004.
- Ankel-Fuchs D., Jaenchen R., Gebhardt N.A., Thauer R.K. Functional relationship between protein-bound and free factor F430 in *Methanobacterium*. *Arch. Microbiol.* 139: 332-337, 1984.
- Barry T.N., Harte F.J., Perry B.N., Armstrong D.G. Some effects of potassium chlorate administration on in vitro and in vivo rumen fermentation. *J. Agric. Sci. Camb.* 90: 345-353, 1978.
- Bauchop T. Inhibition of methanogenesis by methane analogues. *J. Bacteriol.* 94: 171-175, 1967.
- Baylis K., Paulson N.D. Potential for carbon offsets from anaerobic digesters in livestock production. *Anim. Feed Sci. Tech.* 166-67: 446-456, 2011.
- Bell M.J., Potterton S.L., Craigon J., Saunders N., Wilcox R.H., Hunter M., Goodman J.R., Garnsworthy P.C. Variation in enteric methane emissions among cows on commercial dairy farms. *Animal* 8: 1540-1546, 2014.
- Benchaar C. Diet supplementation with cinnamon oil, cinnamaldehyde, or monensin does not reduce enteric methane production in dairy cows. *Animal* 10: 418-425, 2016.
- Benchaar C., Greathead H. Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants. *Anim. Feed Sci. Tech.* 166-67: 338-355, 2011.
- Clapperton J.L. The effect of a methane-suppressing compound, trichlorethyl adipate, on rumen fermentation and the growth of sheep. *Anim. Prod.* 34: 169-181, 1977.

- Cieslak A., Szumacher-Strabel M., Stochmal A., Oleczek W. Plant components with specific activities against rumen methanogens. *Animal* 7: 253-265, Suppl. 2, 2013.
- Cieslak A., Zmora P., Pers-Kamczyc E., Szumacher-Strabel M. Effect of tannins source (*Vaccinium vitis idaea* L.) on rumen microbial fermentation *in vivo*. *Anim. Feed Sci. Tech.* 176: 102-106, 2012.
- Cieslak A., Zmora P., Stochmal A., Pecio L. a kol. Rumen antimethanogenic effect of *Saponaria officinalis* L. phytochemicals *in vitro*. *J. Agr. Sci.* 152: 981-993, 2014.
- Clark H. Nutritional and host effects on methanogenesis in the grazing ruminant. *Animal* 7: 41-48, 2013.
- Cunha I.S., Barreto C.C., Costa O.Y.A., Bomfim M.A., Castro A.P., Kruger R.H., Quirino B.F. Bacteria and Archaea community structure in the rumen microbiome of goats (*Capra hircus*) from the semiarid region of Brasil. *Anaerobe* 17: 118-124, 2011.
- Czerkawski J.W., Breckenridge G. New inhibitors of methane production by rumen microorganisms. Experiments with animals and other practical possibilities. *Br. J. Nutr.* 34: 447-457, 1975.
- Demeyer D., V. Fievez. Ruminants and environment: methanogenesis. *Ann. Zootech.* 49: 95-112, 2000.
- Deppenmeier U., Müller, V., Gottschalk, G. Pathways of energy conservation in methanogenic archaea. *Arch. Microbiol.* 165: 149-163, 1996.
- Dlugokencky E.J., Masarie K.A., Lang P.M., Tans P.P. Continuing decline in the growth rate of atmospheric methane burden. *Nature* 393: 447-450, 1998.
- Dohme F., Machmuller A., Estermann B.L., Pfister P., Wasserfallen A., Kreuzer M. The role of ciliate protozoa for methane suppression caused by coconut oil. *Lett. Appl. Microbiol.* 29: 187-192, 1999.
- Dong Y., Bae H.D., Mc Allister T.A., Mathison G.W., Cheng K.J. Lipid-induced depression of methane production and digestibility in the artificial rumen system (RUSITEC). *Can. J. Anim. Sci.* 77: 269-278, 1997.
- Fernandes J., Wang A., Su W., Rozenbloom S.R., Taibi A., Comelli E.M., Wolever T.M.S. Age, dietary fiber, breath methane, and fecal short chain fatty acids are interrelated in Archaea-positive humans. *J. Nutr.* 143: 1269-1275, 2013.
- Florin T.H.J., Jabbar I.A. A possible role for bile-acid in the control of methanogenesis and the accumulation of hydrogen gas in the human colon. *J. Gastroen. Hepatol.* 9, 112-117, 1994.

- Freidinger R.M., Veber D.F., Hirschmann R., Paegle L.M. Lactam restriction of peptide conformation in cyclic hexapeptides which alter rumen fermentation. *Int. J. Peptide Protein Res.* 16: 464-470, 1980.
- Giger-Reverdin S., Morand-Fehr P., Tran G. Literature survey of the influence of dietary fat composition on methane production in dairy cattle. *Liv. Prod. Sci.* 82: 73-79, 2003.
- Grainger C., Beauchemin K.A. Can enteric methane emissions from ruminants be lowered without lowering their production? *Anim. Feed Sci. Tech.* 166-67: 308-320, 2011.
- Guyader J., Eugene M., Noziere P., Morgavi D.P., Doreau M., Matrin C. Influence of rumen protozoa on methane emission in ruminants: a meta-analysis approach. *Animal* 8: 1816-1825, 2014.
- Hackstein J.H.P., van Alen T.A. Fecal methanogens and vertebrate evolution. *Evolution* 50: 559-572, 1996.
- Hegarty R.S., Gerdes R. Hydrogen production and transfer in the rumen. *Rec. Adv. Anim. Nutr. Aust.* 12: 37-44, 1998.
- Hippenstiel F., Pries M., Büscher W., Südekum K.-H. Comparative evaluation of equations predicting methane production of dairy cattle from feed characteristics. *Arch. Anim. Nutr.* 67: 279-288, 2013.
- Holmes A.J., Roslev P., McDonald I.R., Iversen N., Henriksen K., Murell J.C. Characterization of methanotrophic bacterial populations in soils showing atmospheric methane uptake. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3312, 1999.
- Horton G.M.J. Use of feed additives to reduce ruminal methane production and deaminase activity in steers. *J. Anim. Sci.* 50: 1160-1164, 1980.
- Hungate R.E. Methane formation and cellulose digestion-biochemical ecology and microbiology of the rumen ecosystem. *Experientia* 39: 189-192, 1982.
- Hungate R.E. The rumen fermentation. *Sonderdruck aus Microbial Production and Utilization of Gases.* p. 119-124. Akademie der Wissenschaften zu Göttingen, 1975.
- Jarrell K.F., Kalmokoff M.L. Nutritional requirements of methanogenic archaeobacteria. *Can. J. Microbiol.* 34: 557-576, 1988.
- Jensen B.B. Methanogenesis in monogastric animals. *Environ. Monit. Assess.* 42: 99-112, 1996.
- Jeyanathan J., Kirs M., Ronimus R.S., Hoskin S.O., Janssen P.H. Methanogen community structure in the rumens of farmed sheep, cattle and red deer fed different diets. *FEMS Microbiol. Ecol.* 76: 311-326, 2011.

- Joch M., Cermak L., Haki J., Hucko B., Duskova D., Marounek M. In vitro screening of essential oilactive compounds for manipulation of rumen fermentation and methane mitigation. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 29: 952-959, 2016.
- Joyner A.E., Winter W.T., Godbout D.M. Studies on some characteristics of hydrogen production by cell-free extracts of rumen anaerobic bacteria. *Can. J. Microbiol.* 23: 346-353, 1977.
- Kirchgessner M., Windisch W., Müller H.L. Nutritional factors for the quantification of methane production. In: Proc. 8th Symp. "Ruminant Physiology", Stuttgart 1995.
- Klüber H.D., Conrad R. Inhibitory effects of nitrate, nitrite, NO and N₂O on methanogenesis by *Methanosarcina barkeri* and *Methanobacterium bryantii*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 25: 331-339, 1998.
- Kvenvolden K.A. Methane hydrate - a major reservoir of carbon in the shallow geosphere? *Chem. Geol.* 71: 41-51, 1988.
- Kuhn M., Steinbüchel A., Schlegel H.G. Hydrogen evolution by strictly aerobic hydrogen bacteria under anaerobic conditions. *J. Bacteriol.* 159: 633-639, 1984.
- Lee C., Beauchemin K.A. A review of feeding supplementary nitrate to ruminant animals: nitrate toxicity, methane emissions, and production performance. *Can. J. Anim. Sci.* 94: 557-570, 2014.
- Lee S.M., Jeong J.S., Lee S.C., Park K.H., Seo S. Prediction of ruminal methane production from cattle. *J. Anim. Vet. Adv.* 11: 3228-3233, 2012.
- Leedle J.A.Z., Greening R.C. Postprandial changes in methanogenic and acidogenic bacteria in the rumens of steers fed high- or low-forage diets once daily. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 502-506, 1988.
- Lopez S., McIntosh E., Wallace R.J., Newbold C.J. Effect of adding acetogenic bacteria on methane production by mixed rumen microorganisms. *Anim. Feed Sci. Technol.* 78: 1-9, Mar 31, 1999.
- Lovley D.R. Minimum threshold for hydrogen metabolism in methanogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 1530-1531, 1985.
- Machmuller A., Ossowski D.A., Wanner M., Kreuzer M. Potential of various fatty feeds to reduce methane release from rumen fermentation in vitro (Rusitec). *Anim. Feed Sci. Technol.* 71: 117-130, 1998.
- Machmuller A., Soliva C.R., Kreuzer M. In vitro ruminal methane suppression by lauric acid as influenced by dietary calcium. *Can. J. Anim. Sci.* 82: 233-239, 2002.

- Maczulak A.E., Wolin M.J., Miller T.L. Increase in colonic methanogens and total anaerobes in aging rats. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 2468-2473, 1989.
- Marounek M., Fievez V., Mbanzamihiho L., Demeyer D., Maertens L. Age and incubation time effects on in vitro caecal fermentation pattern in rabbits before and after weaning. *Arch. Anim. Nutr.* 52: 195-201, 1999.
- Marounek M., Rada V. Age effect on in vitro fermentation pattern and methane production in the caeca of chickens. *Physiol. Res.* 47: 259-263, 1998.
- Marounek M., Simunek J., Duskova D., Skrivanova V. Effect of ionophores on in vitro caecal fermentation in rabbits. *J. Agr. Sci.* 128: 495-498, 1997.
- Marty R.J., Demeyer D.I. The effect of inhibitors of methane production on fermentation pattern and stoichiometry in vitro using rumen contents from sheep given molasses. *Br. J. Nutr.* 30: 369-376, 1973.
- McAllister T.A., Okine E.K., Mathison G.W., Cheng K.-J. Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. *Can. J. Anim. Sci.* 76: 231-243, 1996.
- Miller T.L., Wolin M.J., Zhao Hongxue, Bryant M.P. Characteristics of methanogens isolated from bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 201-202, 1986.
- Mišta D., Króliczewska B., Marounek M., Pecka E., Zawadzki W., Nicpoń J. *In vitro* study and comparison of caecal methanogenesis and fermentation pattern in the brown hare (*Lepus europaeus*) and domestic rabbit (*Oryctolagus uniculus*). *Plos One*, doi: 10.1371/journal.pone.0117117, Jan. 28, 2015.
- Moe P.W., Tyrrell H.F. Methane production in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 62: 1583-1586, 1979.
- Montoya J.C., Bhagwat A.M., Peiren N., De Campeneere S., De Baets B., Fievez V. Relationship between odd- and branched-chain fatty acid profiles in milk and calculated enteric methane proportion for lactating dairy cattle. *Anim. Feed Sci. Tech.* 166-67: 596-602, 2011.
- Murray R.M., Bryant A.M., Leng R.A. Rates of production of methane in the rumen and large intestine of sheep. *Br. J. Nutr.* 36: 1-14, 1976.
- Parra A.K. The effect of dietary fats on methane emissions, and its other effects on digestibility, rumen fermentation and lactation performance in cattle: A meta-analysis. *Liv. Sci.* 155: 244-254, 2013.
- Pickering N.K., Oddy V.H., Basarab J., Cammack K., et al. Animal board invited review: genetic possibilities to reduce enteric methane emissions from ruminants. *Animal* 9 : 1431-1440, 2015.

- Pinares-Patino C.S., Hickey S.M., Young E.A., Dodds K.E. et al. Heritability estimates of methane emissions from sheep. *Animal* 7: 316-321, 2013.
- Russell J.B., Martin S.A. Effects of various methane inhibitors on the fermentation of amino acids by mixed rumen microorganisms in vitro. *J. Anim. Sci.* 59: 1329-1338, 1984.
- Sanchez J.M., Valle L., Rodriguez F., Morinigo M.A., Borrego J.J. Inhibitor of methanogenesis by several heavy metals using pure cultures. *Lett. Appl. Microbiol.* 23: 439-444, 1996.
- Schubert C.J., Vazques F., Losekann-Behrens T., Knittel K., Tonolla M., Boetius A. Evidence for anaerobic oxidation of methane in sediments of a freshwater system (Lago di Cadagno). *FEMS Microbiol. Ecol.* 76: 26-38, 2011.
- Soliva C.R., Hindrichsen I.K., Meile L., Kreuzer M., Machmuller A. Effects of mixtures of lauric and myristic acid on rumen methanogens and methanogenesis. *Lett. Appl. Microbiol.* 37: 35-39, 2003.
- Sprott G.D., Bird S.E., McDonald I.J. Proton motive force as a function of the pH at which *Methanobacterium bryantii* is grown. *Can. J. Microbiol.* 31: 1031-1034, 1985.
- St-Pierre B., Wright A.-D.G. Diversity of gut methanogens in herbivorous animals. *Animal* 7: 49-56, 2013.
- Stumm C.K., Gijzen H.J., Voges G.G. Association of methanogenic bacteria with ovine rumen ciliates. *Br. J. Nutr.* 47: 95-99, 1982.
- Tapio I., Snelling T.J., Strozzi F., Wallace R.J. The ruminal microbiome associated with methane emission from ruminant livestock. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 2017 Jan 19; 8:7.e Collection.
- Van Nevel C.J., Demeyer D.I. Control of rumen methanogenesis. *Environ. Monit. Assess.* 42: 73-97, 1996.
- Van Nevel C.J., Demeyer D.I., Cottyn B.G., Henderickx H.K. Effect of sodium sulfite on methane and propionate in the rumen. *Z. Tierphys. Tiernahrg. Futtermitt.* 26: 91-100, 1970.
- Van Nevel C.J., Henderickx H.K., Demeyer D.I., Martin J. Effect of chloral hydrate on methane and propionic acid in the rumen. *Appl. Microbiol.* 17: 695-700, 1969.
- Vogels G.D., van der Drift C., Stumm C.K., Keltjens J.T.M., Zwart K.B. Methanogenesis: surprising molecules, microorganisms and ecosystems. *A. van Leeuw. J. Microb.* 50: 557-567, 1984.
- Waghorn G.C., Hegarty R.S. Lowering ruminant methane emissions through improved feed conversion. *Anim. Feed Sci. Tech.* 166-67: 291-301, 2011.

- Wallace R.J., Czerkawski J.W., Breckenridge G. Effect of monensin on the fermentation of basal rations in the Rumen Simulation Technique (Rusitec). *Br. J. Nutr.* 46: 131-148, 1981.
- Wedlock D.N., Janssen P.H., Leahy S.C., Shu D., Buddle B.M. Progress in the development of vaccines against rumen methanogens. *Animal* 7: 244-252, 2013.
- Wilkinson D.M., Nisbet E.G., Ruxton G.D. Could methane produced by sauropod dinosaurs have helped drive Mesozoic climate warmth? *Curr. Biol.* 22: R292-R293, 2012.