

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

Statiny jako manipulátory bachorové fermentace

Diplomová práce

Bc. Mariana Vadroňová

Výživa zvířat a dietetika

Ing. Miroslav Joch, Ph.D.

© 2020 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Statiny jako manipulátory bachorové fermentace" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 30.6.2020

Poděkování

Ráda bych touto cestou velice poděkovala svému vedoucímu diplomové práce Ing. Miroslavu Jochovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a pomoc, trpělivost, ochotu a přátelský přístup při konzultacích a zpracování diplomové práce. Velký dík patří také mé rodině a blízkým za jejich podporu během studia.

Statiny jako manipulátory bachorové fermentace

Souhrn

Odvětví živočišné výroby významně přispívá k emisím skleníkových plynů, přičemž velká část má původ z enterické fermentace přežvýkavců. Za účelem snížení těchto emisí bylo zkoumáno mnoho strategií, které by současně zvýšily konverzi krmiva a zpřístupnily více energie využitelnou pro produkci. Jednou možností je přímé zacílení na metanogeny. Mikroorganismy produkující metan (CH_4), archea, mají jedinečné membránové lipidy, které obsahují izoprenoidní alkoholy s dlouhým řetězcem. Pro tvorbu těchto izoprenoidů je klíčovým prekurzorem mevalonát, který je tvořen redukcí 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl koenzymu A (HMG-CoA). Inhibicí enzymu HMG-CoA reduktázy dochází k narušení tvorby membrány archeí a následně ke snížení metanogeneze.

Tato práce se věnovala *in vitro* účinku statinů, tedy inhibitorů HMG-CoA reduktázy. Statiny mohou selektivně inhibovat metanogenní archea a některé skupiny bakterií či protozoí. To může zvýšit účinnost bachorové fermentace a tím také stravitelnost a využitelnost krmiv u přežvýkavců. V experimentu byly pomocí vsádkové *in vitro* fermentace s využitím bachorové tekutiny zkoumány účinky tří koncentrací (1, 10 a 100 mg/l) tří statinů (atorvastatinu, rosuvastatinu a simvastatinu) na efektivitu bachorové fermentace.

Statisticky významného snížení CH_4 ($p < 0,05$) bylo docíleno simvastatinem o koncentraci 10 mg/l (o 9,3 %) a atorvastatinem o koncentraci 100 mg/l (o 13,2 %) bez negativního ovlivnění fermentace a stravitelnosti krmiva. Ačkoliv koncentrace simvastatinu 100 mg/l snížila ($p < 0,05$) produkci CH_4 o 26,2 %, došlo současně k inhibici celkové fermentace. Rosuvastatin mírně snížil relativní zastoupení CH_4 ($p < 0,05$) při koncentracích 10 a 100 mg/l. Simvastatin a atorvastatin při koncentraci 100 mg/l zvýšily ($p < 0,05$) relativní zastoupení propionátu na úkor acetátu a butyrátu. Koncentrace amonného dusíku nebyly statiny ovlivněny ($p > 0,05$).

Tato práce ukázala, že statiny mohou selektivně snížit produkci CH_4 . Účinky statinů na metanogenezi a celkovou bachorovou fermentaci se lišily v závislosti na typu statinu a koncentraci. Hydrofobní statiny, simvastatin a atorvastatin, se zdají být účinnější ve srovnání s hydrofilními statiny, jako je rosuvastatin.

Klíčová slova: statin, inhibitor HMG-CoA reduktázy, metan, bachorová fermentace, *in vitro*

Statins as modifiers of rumen fermentation

Summary

The livestock sector contributes significantly to greenhouse gas emissions, much of which are derived from the enteric fermentation of ruminants. Many strategies have been explored to reduce these emissions. The goal is to simultaneously increase feed utilization and make more energy available for production. One possibility is to target methanogens directly. Methane producing microorganisms, archaea, have unique membrane lipids that contain long-chain isoprenoid alcohols. The key precursor for the formation of these isoprenoids is mevalonate, which is formed by the reduction of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A (HMG-CoA). Inhibition of the enzyme HMG-CoA reductase disrupts the formation of the archaea membrane and consequently reduces methanogenesis.

The present thesis investigates the *in vitro* effect of statins, i.e. HMG-CoA reductase inhibitors. Statins can selectively inhibit methanogenic archaea and certain groups of bacteria or protozoa. This can increase the efficiency of rumen fermentation, as well as the digestibility and feed utilization in ruminants. Therefore, the effects of increasing concentrations (1, 10, and 100 mg/l) of atorvastatin, rosuvastatin, and simvastatin on *in vitro* methane production and rumen fermentation were examined.

A statistically significant reduction in methane production ($p < 0.05$) was achieved with simvastatin 10 mg/l (9.3%) and atorvastatin 100 mg/l (13.2%) without adversely affecting the fermentation and feed digestibility. Although simvastatin (100 mg/l) reduced ($p < 0.05$) methane production by 26.2%, total fermentation was inhibited at the same time. Rosuvastatin slightly reduced the relative abundance of methane ($p < 0.05$) at concentrations of 10 and 100 mg/l. Simvastatin and atorvastatin (100 mg/l) increased ($p < 0.05$) the relative propionate proportion at the expense of acetate and butyrate. Ammonia-N concentrations were not affected by statins ($p > 0.05$).

This thesis has shown that statins can selectively reduce methane production. The effects of statins on methanogenesis and total rumen fermentation varied depending on the type of statin and concentration. Hydrophobic statins, simvastatin and atorvastatin, appear to be more effective than hydrophilic statins such as rosuvastatin.

Keywords: statin, HMG-CoA reductase inhibitor, methane, rumen fermentation, *in vitro*

Obsah

1 Úvod	8
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	9
2.1 Cíl práce	9
2.2 Hypotézy	9
3 Literární rešerše	10
3.1 Trávení u přežvýkavců	10
3.1.1 Bachor	10
3.1.1.1 Prostředí bachoru	11
3.1.2 Čepeć (reticulum).....	12
3.1.3 Kniha (omasum).....	13
3.1.4 Slez (abomasum).....	13
3.1.5 Bachorová fermentace a produkce CH ₄	13
3.1.6 Mikrobiální populace bachoru	15
3.1.6.1 Bachorové bakterie	15
3.1.6.2 Bachorová protozoa	16
3.1.6.3 Bachorové houby	16
3.1.6.4 Bachorové metanogeny (archea)	17
3.1.6.5 Bakteriofágy	17
3.2 Produkce CH₄ ze zemědělství	18
3.3 Metody snížení emisí CH₄	19
3.3.1 Strategie využívající genetické metody	19
3.3.2 Strategie využívající biotechnologické metody	20
3.3.3 Strategie spojené s výživou.....	21
3.3.3.1 Složení krmné dávky	21
3.3.3.2 Aditiva snižující metanogenezi.....	22
4 Metodika	29
4.1 Design experimentu a použité látky	29
4.2 Dárcovská zvířata a bachorová tekutina	29
4.3 <i>In vitro</i> inkubace	29
4.4 Vzorkování a analýza	30
4.5 Statistická analýza	31
5 Výsledky	32
5.1 Produkce CH₄	32
5.2 Celková produkce plynu, zdánlivá stravitelnost sušiny, pH a koncentrace amoniakálního dusíku	34

5.3	Koncentrace a poměry těkavých mastných kyselin	34
6	Diskuze	36
6.1	Produkce CH ₄	36
6.2	Mikroorganismy	39
6.3	Těkavé mastné kyseliny	39
6.4	Vliv na amoniakální dusík	40
6.5	Potenciální využití statinů na komerčních farmách a jejich omezení	40
7	Závěr	42
8	Literatura	43

1 Úvod

Klimatické změny jsou jednou z největších hrozeb současnosti (de Souza Filho et al. 2019). Klimatické změny a zemědělství jsou vzájemně propojené procesy. Na jedné straně je současná i budoucí produkce potravin ohrožena klimatickými změnami, a na druhé straně zemědělství obecně a zejména živočišná výroba přispívá ke globálnímu oteplování prostřednictvím emisí metanu (CH_4) (Grossi et al. 2019), velmi efektivnímu skleníkovému plynu (Ersoy & Ugurlu 2020). Emise CH_4 v chovu zvířat pocházejí z trávení potravy během fermentace v bachoru, skladování hnoje a jeho aplikace na polích. V rámci hospodářských zvířat jsou přežvýkavci (skot, ovce a kozy) primárním zdrojem emisí (Broucek 2018). Produkce CH_4 (metanogeneze) je přirozený proces probíhající v bachoru během fermentace, kdy dochází k odstranění vodíku z bachoru vzniklého při rozkladu sacharidů mikroorganismy (Jafari et al. 2019). Mikroorganismy, které produkují CH_4 , se nazývají metanogeny a využívají vodík jako zdroj energie (Janssen 2010). Pokud by v bachoru nebyl vodík kontinuálně odstraňován a došlo by k jeho akumulaci, byla by narušena fermentace krmiva, tím i zisk energie a následně by došlo k poklesu užitkovosti zvířat (Beauchemin et al. 2009).

Literatura uvádí, že skot denně vyprodukuje 250–500 litrů CH_4 a ovce 20–55 litrů CH_4 v závislosti na příjmu sušiny (Nawab et al. 2020). Kromě významného příspěvku k antropogenním emisím skleníkových plynů je energie ztracená v podobě CH_4 velkým nedostatkem v produkčních systémech přežvýkavců (Eckard et al. 2010). Metanogeneze pro zvíře totiž znamená ztrátu 2–15 % energie krmiva, která by mohla být využita k produkci (Ugbogu et al. 2019). To je podstatné vzhledem k rostoucímu počtu světové lidské populace, se kterým současně bude stoupat i poptávka po živočišných produktech jako je mléko a maso (Nawab et al. 2020). Aby se vyhovělo budoucím potřebám populace, bude nutné zvýšit produktivitu zvířat a současně snížit intenzitu emisí skleníkových plynů na jednotku produktu. K dosažení tohoto cíle je nutné zavádění účinných strategií pro snížení emisí CH_4 (Grossi et al. 2019).

Výzkum je zaměřen na širokou škálu strategií s cílem snížit emise CH_4 , například na úpravu složení krmné dávky, vývoj vakcín a přidání sekundárních metabolitů rostlin či hub do krmné dávky (Satyanagalakshmi et al. 2015). Jejich cílem je modifikace mikrobiálního ekosystému a kinetiky fermentace tak, aby došlo ke snížení emisí CH_4 a aby se současně nezměnila nebo v optimálním případě dokonce zlepšila konverze krmiva (Morgavi et al. 2013; Ugbogu et al. 2019). Mnohé zkoumané strategie jsou účinné pouze krátkodobě, protože postupem času dojde k přizpůsobení se bachorové mikrobioty na dané sloučeniny (Candyrine et al. 2018). Při implementaci těchto strategií je současně nutná jejich cenová dostupnost a dodržení legislativních předpisů. Především by však tyto strategie neměly mít škodlivé účinky na zdraví a welfare zvířat. Většina ze strategií je stále v rané fázi vývoje a je dále nutné ověřovat účinné dávky aditiv (Satyanagalakshmi et al. 2015).

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

2.1 Cíl práce

Cílem práce bylo ověřit schopnost inhibitorů HMG-CoA-reduktázy, tzn. statinů, zvýšit efektivitu bachorové fermentace.

Dílčím cílem bylo ověřit schopnost statinů:

- snížit produkci metanu v bachoru,
- ovlivnit zastoupení jednotlivých těkavých mastných kyselin ve fermentační tekutině
- snížit zastoupení $\text{NH}_4\text{-N}$ ve fermentační tekutině.

2.2 Hypotézy

Statiny jako inhibitory HMG-CoA mohou selektivně inhibovat metanogení archea a některé skupiny bakterií či protozoí. To může zvýšit účinnost bachorové fermentace a tím také stravitelnost a využitelnost krmiv u přežvýkavců.

Předpokládáme, že statiny:

- Sníží in vitro produkci metanu.
- Zvýší zastoupení kyseliny propionové na úkor kyseliny octové a máselné v inkubační tekutině.
- Sníží koncentrace $\text{NH}_4\text{-N}$ v inkubační tekutině.
- Neovlivní či zvýší stravitelnost sušiny a celkovou produkci těkavých mastných kyselin.

3 Literární rešerše

3.1 Trávení u přežvýkavců

Funkcí trávicí soustavy je dodávat organismu vodu, elektrolyty, vitaminy, proteiny, sacharidy a lipidy získané z potravy. K tomu, aby mohly být tyto živiny v organismu využity, musí být nejdříve fyzicky a chemicky zpracovány (Millen et al. 2016). Způsob tohoto zpracování může být u jednotlivých druhů zvířat rozdílný v závislosti na uspořádání trávicí soustavy.

Přežvýkavci se svým uspořádáním trávicí soustavy liší od monogastrických zvířat tím, že mají před pravým žaludkem vyvinuté tři komory. Tyto komory se označují jako předžaludky (bachor, čepec, kniha) (Harfoot 1981). K jejich vývoji došlo za účelem strávení strukturálních sacharidů, které jsou základní součástí diety přežvýkavce. Pouze poslední komora, slez, je srovnatelná svou strukturou a funkcí s jednoduchým žaludkem monogastrických zvířat (Ducharme 1990; Millen et al. 2016).

Přežvýkavci jsou schopni trávit krmiva s vysokým obsahem vlákniny prostřednictvím mikrobiální fermentace (bakteriemi, protozoi a houbami) v předžaludcích (Ducharme 1990; Puniya et al. 2015). Přežvýkavci by sami nestrávili rostlinné polysacharidy, protože postrádají náležité hydrolytické enzymy (Krehbiel 2014; Baldwin & Connor 2017).

Pregastrická fermentace poskytuje hostiteli energii z vláknitého materiálu, navíc samotná syntetizovaná mikrobiální těla následně slouží jako zdroj aminokyselin a mikrobi mimo jiné také produkují vitaminy skupiny B. Oproti tomu nevýhodou je, že biologická hodnota bílkovin vysoké kvality může být snížena a fermentace není zcela účinně regulována, tudíž může dojít k metabolickým dysfunkcím (např. bachorová acidóza) (Bodas et al. 2012; Krehbiel 2014).

3.1.1 Bachor

Bachor je největší komorou trávicí soustavy dospělého přežvýkavce s průměrnou kapacitou 150–200 litrů (Harfoot 1981; Lozier & Niehaus 2016). Pro přežvýkavce je bachor významný z pohledu zdraví i produkční výkonnosti (Diao et al. 2019). Nachází se v levé části dutiny břišní od sedmého až osmého žebra až po pánev (Puniya et al. 2015; Lozier & Niehaus 2016). Obsahuje struktury tvořené zesílenou svalovinou, které oddělují prostor bachoru na dorsální vak, ventrální vak, slepý dorsální vak a slepý ventrální vak (Harfoot 1981; Millen et al. 2016). Vnitřní povrch bachoru je tvořen stratifikovaným keratinizovaným epitelem bez žláz, tudíž všechny trávicí procesy probíhající v bachoru jsou výsledkem pouze fermentativního trávení (Harfoot 1981; Krehbiel 2014; Millen et al. 2016; Lozier & Niehaus 2016).

Epitel bachoru je pokryt velkým množstvím papil různých tvarů a velikostí v závislosti na jejich umístění v bachoru. Tyto papily slouží k absorpci živin, přičemž nejvyvinutější a nejčetnější jsou ve ventrálním vaku a na dně kaudodorsálního slepého vaku. Papily v dorsálním vaku jsou typicky jeden až dva milimetry dlouhé a ve ventrálním vaku dosahují délky 1,5 centimetru. Velký absorpční povrch zprostředkovaný těmito papilami umožňuje rychlý přechod živin přes epitelové buňky, které oddělují obsah předžaludku od krevního řečiště (Harfoot 1981; Millen et al. 2016; Baldwin & Connor 2017; Aschenbach et al. 2019).

Kontrakcemi bachoru dochází k promíchání obsahu bachoru a je umožněn opakovaný návrat větších částic z bachoru do dutiny ústní, kde mohou být přežvýkány a fyzicky zredukovány na menší částice (Harfoot 1981; Millen et al. 2016). To je zásadní pro bakterie, které tak mohou substráty účinně fermentovat. Přežvykování, které probíhá pravidelně, je dále důležitým stimulem pro produkci slin. Dospělý skot vyprodukuje 170–180 litrů slin denně. Objem denní produkce slin závisí na době žvýkání, dále příjem vláknitých krmiv vyvolává vyšší produkci slin a naopak k redukci tvorby slin dochází s příjmem koncentrovaného krmiva (Millen et al. 2016).

Kontrakční cykly jsou dále důležité za účelem eruktace plynů, které vznikly v průběhu fermentace (Lozier & Niehaus 2016). Eruktace, tedy uvolňování plynů z bachoru, je životně důležitý a nepostradatelný fyziologický mechanismus (Millen et al. 2016). Každé dvě minuty by měly proběhnout přibližně tři bachorové kontrakce (Lozier & Niehaus 2016).

3.1.1.1 Prostředí bachoru

Bachor je otevřený vnějšímu prostředí a dochází k neustálému toku materiálu do a z bachoru (Puniya et al. 2015). Detaily různých fyzických, chemických a mikrobiologických parametrů jsou uvedené v Tabulce 1. Prostředí bachoru poskytuje vhodné podmínky pro různorodé a početné společenství anaerobních mikroorganismů, které plní metabolickou úlohu (Henderson et al. 2015).

Mezi produkty fermentace patří těkavé mastné kyseliny (TMK), které jsou vstřebány přes bachorovou stěnu (Janssen 2010; Krehbiel 2014). Toto kontinuální odstraňování těkavých mastných kyselin absorpcí z čepcobachoru je důležité pro stabilní pH bachoru a pro stálý růst celulolytických organismů, které jsou nejaktivnější při pH 6,2–6,8 (Harfoot 1981; Krehbiel 2014). Rychlost absorpce z bachoru je ovlivněna délkou řetězce jednotlivých kyselin (kyselina máselná > propionová > octová) a hodnotou pH bachoru (Krehbiel 2014).

Jedním z nejvariabilnějších faktorů prostředí bachoru je právě hodnota pH, jejíž fyziologické rozmezí je 5,5 až 6,9 (Puniya et al. 2015). Sliny obsahují velké množství iontů hydrogenuhličitanu (HCO_3^-), fosfátu, chloridu, sodíku a draslíku (Millen et al. 2016). Sliny tak slouží jako bikarbonátový a fosfátový pufr (Harfoot 1981; Millen et al. 2016). Tyto dva anionty tvoří více než 90 % celkového počtu aniontů (Krehbiel 2014) a mají zásadní roli v udržování stálého bachorového pH (Harfoot 1981; Millen et al. 2016). Bachorová tekutina obsahuje koncentrace těkavých mastných kyselin od 50 milimolů do 150 milimolů. Relativní zastoupení jednotlivých mastných kyselin se liší v závislosti na dietě a stavu metanogenů v bachoru. Přibližné odhady koncentrací hlavních těkavých mastných kyselin jsou 50–70 % kyseliny octové, 15–35 % kyseliny propionové a 10–12 % kyseliny máselné (Harfoot 1981; Krehbiel 2014).

Kyselina octová je hlavním zdrojem energie pro přežvýkavce. Vzhledem k tomu, že glukóza vyprodukovaná v bachoru není zvířeti dostupná, dochází k přeměně kyseliny propionové na glukózu za účelem udržování relativně konstantní hodnoty glykémie v krevním oběhu. To je podstatné, protože například tkáň nervového systému využívají jako zdroj energie exkluzivně glukózu. Kyselina máselná je z 95 % využita jako zdroj energie pro buňky bachorového epitelu. Těkavé mastné kyseliny jsou zdrojem přibližně 80 % metabolizovatelné energie pro zvíře (Millen et al. 2016).

Tabulka 1. Fyzické, chemické a mikrobiální charakteristiky bachorového ekosystému.

Fyzikální vlastnosti	
Sušina	10–18 %
pH	5,5–6,9 (průměr 6,4)
Teplota	38–41 °C
Chemické vlastnosti	
Aminokyseliny a oligopeptidy	<1 mmol/l přítomné 2–3 hodiny po krmení
Amoniak	2–12 mmol/l
Komponenty krmiva (celulosa, hemicelulosa, pektin)	Vždy přítomné
Endogenní (mukopolysacharidy)	Vždy přítomné
Plyny	CO ₂ 65 %; CH ₄ 27 %; N ₂ 7 %; O ₂ 0,6 %; H ₂ 0,2 %
Lignin	Vždy přítomný
Minerály	Vysoké Na, obecně dobrý zdroj minerálů
Netěkavé kyseliny	Laktát <10 mmol/l
Rozpustné sacharidy	<1 mmol/l, přítomné 2–3 hodiny po krmení
Stopové prvky, vitaminy	Vždy přítomné, dobrý zdroj vitaminů B
Těkavé mastné kyseliny	Kyselina octová 60–90 mmol/l; Kyselina propionová 15–30 mmol/l; Kyselina máselná 10–25 mmol/l; Rozvětvené řetězce a vyšší 2–5 mmol/l
Mikrobiální vlastnosti	
Anaerobní houby	10 ^{3–6} /g (6 rodů)
Bakterie	10 ^{10–11} /g (>200 druhů)
Bakteriofágy	10 ^{7–9} /g částic/ml
Protozoa	10 ^{4–7} /g (25 rodů)
Archea	10 ^{6–9} buněk/ml

(Harfoot 1981; Kamra 2005; Janssen 2010; Krehbiel 2014; Puniya et al. 2015; Elghandour et al. 2020.)

3.1.2 Čepec (reticulum)

Čepec je nejmenší komorou s objemem přibližně 9 litrů u dospělého jedince a je umístěn kraniálně od bachoru (Millen et al. 2016; Lozier & Niehaus 2016). Čepec není zcela anatomicky oddělen od bachoru (Millen et al. 2016) a z důvodu anatomických a funkčních podobností těchto dvou oddělení jsou často označovány jako čepcobachor (Harfoot 1981). Vnitřní stavba čepce je charakteristická strukturou podobné včelí plástvi (Lozier & Niehaus 2016). Epitel čepce je vyvýšen do záhybů tkáně tvořené 4, 5 nebo 6 stranami. V těchto strukturách jsou přítomné malé papily (Krehbiel 2014). Pouze částice menší než 1,18 milimetru prochází do

posteriorní části trávicího traktu čepco-knižním otvorem (Millen et al. 2016), který velmi účinně separuje jemné částice obsahu čepce a bachoru. Do knihy vstupují jemné částice z čepce, které obsahují asi 90–95 % vody (Harfoot 1981).

3.1.3 Kniha (omasum)

Kniha se nachází dorsálně vpravo od čepce a její objem se pohybuje od 7 do 18 litrů (Millen et al. 2016; Lozier & Niehaus 2016). Vnitřek knihy je tvořen stovkami poloměsíčitých listů (laminae omasi), které jsou pokryté krátkými keratinizovanými papilami. Tyto útvary knihy zprostředkovávají velkou absorpční plochu pro vodu, Na^+ , K^+ a některé těkavé mastné kyseliny (Krehbiel 2014; Lozier & Niehaus 2016). Dále umožňují stisknutí a drcení částic krmiva (Puniya et al. 2015). Kniha má funkci pumpy, která nasává přijatou potravu a následně ji posouvá do slezu (Ducharme 1990).

3.1.4 Slez (abomasum)

Slez je trubicovitý orgán, který spojuje knihu s tenkým střevem (Harfoot 1981). Ve slezu je trávenina poprvé vystavena trávicímu procesu, který není mikrobiálního původu (Millen et al. 2016). Svou fyziologií i anatomií odpovídá jednoduchému žaludku nepřezvýkavých druhů (Puniya et al. 2015). Žláznatá sliznice pravého žaludku je vybavena specializovanými sekrečními buňkami, které produkují hlen, pepsinogen a kyselinu chlorovodíkovou (Harfoot 1981; Krehbiel 2014). Slez skotu má průměrný objem 18 litrů (Millen et al. 2016). Trávenina dále pokračuje do dvanáctníku (Puniya et al. 2015).

3.1.5 Bachorová fermentace a produkce CH_4

Fermentace je definována jako anaerobní (bez přístupu kyslíku) buněčný proces, kdy je organická hmota přeměněna na jednodušší sloučeniny za uvolnění energie (Millen et al. 2016). Přezvýkavci, stejně jako další býložravci, konzumují rostlinné strukturální sacharidy jako je celulóza, hemicelulóza a lignin. Sami přezvýkavci tyto polysacharidy nedokáží rozložit, protože neprodukují náležité hydrolytické enzymy. V průběhu evoluce však přezvýkavci vytvořili ve své trávicí soustavě symbiotický vztah s mikroorganismy (anaerobní bakterie, anaerobní houby, protozoa, metanogenní archea a bakteriofágy), které jim napomáhají rozkládat rostlinný materiál (Henderson et al. 2015; Huws et al. 2018; Faniyi et al. 2019). V předžaludcích přezvýkavců (převážně v bachoru) je organická hmota (škrob a polysacharidy rostlinné buněčné stěny, proteiny) fermentovaná a jsou uvolňovány konečné produkty, mezi které patří těkavé mastné kyseliny (kyselina octová, propionová a máselná), oxid uhličitý (CO_2), vodík (H_2), amonné kationty (NH_4^+) a CH_4 (Janssen & Kirs 2008; Iqbal et al. 2008; Cottle et al. 2011; Bodas et al. 2012; Wallace et al. 2019). Některé produkty jsou vstřebány bachorovou stěnou (těkavé mastné kyseliny, částečně CO_2), jiné jsou eruktovány (CH_4 , částečně CO_2) a ostatní komponenty postupují do dalších segmentů trávicí soustavy (mikrobiální biomasa, zbylé sacharidy, proteiny, lipidy, popel) k dalšímu trávení (Millen et al. 2016).

Pro správný průběh fermentace v bachoru je velice důležitý metabolismus vodíku, konkrétně jeho rychlé odstranění z bachoru za účelem udržení jeho nízkého tlaku (Ellis et al.

2008; Haque 2018). Vodík difunduje z mikroorganismů a je buď využitý ostatními mikroorganismy, především metanogeny (Janssen & Kirs 2008; Bodas et al. 2012), nebo se hromadí v plynném prostoru bachoru (Cottle et al. 2011). Rozpuštěný vodík inhibuje bachorovou fermentaci mechanismem zpětné vazby a pokud není odstraněn, snižuje celkový rozsah rozkladu sacharidů, produkci ATP, rychlost růstu mikroorganismů a syntézu mikrobiálního proteinu (Martin et al. 2010; Janssen 2010; Patra et al. 2017; Lan & Yang 2019).

Nejdůležitější cestou odstraňování vodíku z bachoru je metanogeneze (Haque 2018). Metanogeneze je proces produkce CH₄ v bachoru, při kterém metanogenní archea redukují CO₂ vodíkem dle následující rovnice: $\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$ (Moss et al. 2000; Sorokin et al. 2017). Prostřednictvím této reakce je zabráněno akumulaci vodíku v bachoru, který by bránil reoxidaci redukovaných kofaktorů (NADH, NADPH a FADH) a tak inhiboval kontinuální fermentaci (McAllister & Newbold 2008; Aboagye & Beauchemin 2019). Produkce CH₄ udržuje nízký parciální tlak vodíku v bachoru (Lan & Yang 2019).

Vyprodukovaný CH₄ v lumen GIT může být ze zvířete uvolněn třemi cestami (Ricci et al. 2014): CH₄ z bachoru a střev je vstřebán do krve a vydechnut z plic expirací, CH₄ je vyloučen přímo z bachoru eruktací anebo je vyloučen rektem jako flatus. Většina v bachoru vytvořeného plynu je buď přímo eruktována, či je transportována do plic a následně vydechnuta (Hill et al. 2016; Hammond et al. 2016).

Alternativou metanogeneze je pro odstranění vodíku z bachoru biohydrogenace mastných kyselin (Knapp et al. 2014). Dalšími způsoby odstranění vodíku v bachoru je reduktivní acetogeneze, a například sulfátová, nitrátová a dusičnanová redukce (Beauchemin et al. 2009; Hill et al. 2016; Lan & Yang 2019).

Těkavé mastné kyseliny poskytují zvířeti přibližně 80 % metabolizovatelné energie. Kyselina octová je v bachoru zastoupena v nejvyšších koncentracích ze všech mastných kyselin s krátkým řetězcem vyprodukovaných mikrobiotou. Produkce kyseliny octové a máselné vede k celkovému uvolnění vodíku a upřednostňuje produkci CH₄, zatímco tvorba kyseliny propionové je kompetitivní cestou pro využití vodíku v bachoru (Martin et al. 2010). Kyselina propionová je hlavním glukoneogenetickým substrátem, který může zodpovídat za 60 % glukózy využitě zvířetem (Miller & Wolin 2001; Baldwin & Connor 2017). Poslední klíčovou mastnou kyselinou je kyselina máselná (Baldwin & Connor 2017). Relativní zastoupení bachorových těkavých mastných kyselin je obvykle 50–70 % kyseliny octové, 15–35 % kyseliny propionové a 10–12 % kyseliny máselné (Krehbiel 2014). Těkavé mastné kyseliny s krátkým řetězcem jsou následně absorbovány bachorovou stěnou (Weimer et al. 2010), tudíž nedochází k inhibici fermentace jejími konečnými produkty. Dále dochází k pufrování bachoru slinami a fermentace tak může kontinuálně pokračovat. Fermentace v bachoru je omezená časem a koncové produkty (těkavé mastné kyseliny) jsou kontinuálně odstraňovány (Millen et al. 2016).

Díky tomu, že je fermentační prostor umístěn před tenkým střevem, přežvýkavci využijí protein a další živiny syntetizované mikroby v bachoru. Dále mikrobi detoxikují mnoho složek přítomných v určitých rostlinách a bylinách, které mohou být toxické pro nepřežvýkavce (Millen et al. 2016).

3.1.6 Mikrobiální populace bachoru

Schopnost přežvýkavců strávit a fermentovat polymery rostlinné biomasy je v rozhodující míře závislá na komplexní anaerobní mikrobiální komunitě, která se nachází v jejich bachoru (Krause et al. 2013; Wallace et al. 2019). Jedná se o symbiotický vztah, kdy mikroorganismy dodávají přežvýkavci energii, mikrobiální protein a vitaminy skupiny B. Na oplátku jim jsou poskytnuty vhodné životní podmínky a živiny pro růst (Janssen & Kirs 2008; Knapp et al. 2014; Huws et al. 2018). Tyto mikroorganismy jsou klasifikované do tří hlavních domén, tedy Bakterie (bakterie), Archea (metanogeny), a Eukaryota (protozoa a houby) (Puniya et al. 2015; Gottlieb et al. 2016).

Mikrobiální ekosystém bachoru je stabilní a dynamický zároveň. Ekosystém je stabilní, protože v určitém rozmezí podmínek odolává i vnějším zásahům, aniž by byly narušeny základní funkce (biokonverze krmiva na těkavé mastné kyseliny). U zdravého přežvýkavce k narušení ekosystému nedochází i přes to, že je na denním pořádku invaze milionů mikrobů do bachoru krmivem, vodou a vdechovaným vzduchem (Kamra 2005). Dynamika ekosystému spočívá ve značné schopnosti adaptace například na změnu krmné dávky, kdy také dochází ke změně v relativním zastoupení těkavých mastných kyselin (Krehbiel 2014). Všechny mikroorganismy mají preferované podmínky pro maximální růst s preferovanými nebo požadovanými substráty a typicky uvolňují specifické konečné produkty z daného substrátu (Millen et al. 2016).

Pro správnou funkci bachorového mikrobiálního komplexu je nutné udržování optimálních podmínek prostředí, konkrétní parametry jsou uvedené v Tabulce 1 (Kamra 2005; Hill et al. 2016). Hlavní omezení prostředí je anaerobióza, vysoká pufrační kapacita, osmotický tlak a saprofytická soupeření mezi mikroby o přežití (Kamra 2005). Bachorové mikroorganismy mají vysokou adaptační schopnost (McCann et al. 2014), přičemž jejich diverzita, hustota a funkce může být ovlivněna mnoha faktory včetně diety, její kvalitou a zpracováním, plemenem hostitele, ročním obdobím, geografickou polohou, krmnou strategií, krmnými aditivy, úrovní příjmu krmiva, fází růstu a fyziologickými podmínkami hostitele (Kumar et al. 2009; Hook et al. 2010; Weimer et al. 2010; McCann et al. 2014; Lan & Yang 2019; Faniyi et al. 2019). Dieta, bachorové prostředí a mikrobiota jsou úzce propojené a navzájem se ovlivňují. Tyto jednotlivé faktory a vztah mezi nimi mají významný vliv na zdraví a produktivitu zvířete, stravitelnost krmiva a ekologickou stopu přežvýkavců (Faniyi et al. 2019).

3.1.6.1 Bachorové bakterie

Bakterie reprezentují nejpočetnější a nejrozmanitější složku mikrobiální biomasy v bachoru s počtem v rozmezí 10^{10} – 10^{11} buněk na mililitr bachorové tekutiny s více než 50 rody (Patra et al. 2017; Lan & Yang 2019). Rozmanitost bakterií v bachoru je odhadována na 7000 druhů, přičemž 30 % je dodnes stále neznámých (Lan & Yang 2019). Většina druhů bakterií dokáže fermentovat více než jeden substrát (Krehbiel 2014). Jako celek vykazují širokou škálu enzymatické aktivity (produkují amylázy, celulózy, proteázy, lipázy), prostřednictvím které tráví škrob, rostlinné buněčné stěny, proteiny a lipidy v bachoru (Huws et al. 2018; Elghandour et al. 2020).

Většina aktivity bachorové endoglukanázy a xylanázy je zprostředkována bakteriemi, tudíž s vlákninou spojené bakterie jsou stěžejní k trávení v bachoru. Bakterie fermentující škrob a další fermentovatelné sacharidy reprezentují velkou část bakteriální populace bachoru. Vysokoprodukční mléčný skot je typicky krměn krmnou dávkou s obsahem více než 30 % škrobu a sacharidů, tudíž jsou tyto bakterie více než potřebné (Puniya et al. 2015).

3.1.6.2 Bachorová protozoa

Bachorová protozoa tvoří velkou část mikrobiální biomasy bachoru (přibližně 20–50 % za určitých podmínek) z důvodu velikosti jejich buněk (Newbold et al. 2015; Huws et al. 2018). Počty ciliárních protozoí se pohybují mezi 10^4 – 10^7 buněk na mililitr bachorové tekutiny, zastupují 25 rodů (Kamra 2005; Krause et al. 2013; Lan & Yang 2019), a tráví 30–40 % celkové vlákniny. V bachoru zastávají různé role, například při detoxikaci mykotoxinů a mají vliv na pH bachoru (Elghandour et al. 2020). Protozoa jsou predátoři bakterií, které jsou jejich hlavním zdrojem proteinu (Newbold et al. 2015; Huws et al. 2018), dále pohlcují částice krmiva, tráví sacharidy, proteiny a tuky. Využívají najednou velké množství škrobu a mohou ho skladovat ve svých tělech. To může být pro bachor výhodné z důvodu zpomalení produkce kyselin, jejichž rychlá produkce by snižovala bachorové pH (Puniya et al. 2015).

Populace protozoí v bachoru kolísá se změnami v dietě, kterou přijímá zvíře (Elghandour et al. 2020). Zvýšení procenta rychle degradovatelného škrobu ve stravě obecně podporuje vývoj protozoí, pokud pH bachoru neklesne pod 5,5. Ciliární protozoa by mohla být úplně eliminována, pokud pH klesne pod 5,0, což je proces známý jako defaunace (Krehbiel 2014; Faniyi et al. 2019). Studium defaunace (odstranění protozoí z bachoru za využití různých chemikálií a fyzikálních metod) a defaunovaných zvířat byla zkoumána role ciliárních protozoí ve funkci bachoru (Newbold et al. 2015; Huws et al. 2018). Bachorová protozoa nejsou v bachoru pro přežití zvířete nezbytné (Wallace et al. 2019). Eliminace ciliárních protozoí zvyšuje přísun mikrobiálního proteinu až o 30 % a redukuje produkci CH_4 až o 11 % (Morgavi et al. 2010; Elghandour et al. 2020). Ke snížení produkce CH_4 pravděpodobně dochází, protože bachorové protozoální hydrogenosomy produkují vodík, který dále slouží jako substrát pro metanogeny k redukci oxidu uhličitého na CH_4 (Lan & Yang 2019; Elghandour et al. 2020). Studie ukázaly, že defaunací je snížena rychlost rozkladu organické hmoty, především neutrálně detergetní a acidodetergetní vlákniny (Newbold et al. 2015; Elghandour et al. 2020).

3.1.6.3 Bachorové houby

Anaerobní houby patří mezi nejpotentnější organismy, které rozkládají lignocelulózní komponenty krmiva (Puniya et al. 2015; Wallace et al. 2019). V bachoru existuje 18 druhů anaerobních bachorových hub ze šesti rodů a jejich celkové množství je přibližně 10^3 až 10^6 hub na mililitr bachorové tekutiny (Kamra 2005; Kumar et al. 2009; Puniya et al. 2015; Patra et al. 2017; Lan & Yang 2019). Představují přibližně 10–20 % bachorového mikrobiomu (Krehbiel 2014; Elghandour et al. 2020).

Stejně jako protozoa v bachoru, bachorové houby produkují podstatné množství vodíku v hydrogenosomech (Bodas et al. 2012; McAllister et al. 2015). Micely hub penetrují částice rostlinného materiálu, který je tak oslaben, zmenšen a zpřístupněn dalším organismům (Krehbiel 2014; Faniyi et al. 2019). Houby produkují velkou škálu hydrolytických

polysacharidáz a komplementárních glykosidáz (Puniya et al. 2015; Elghandour et al. 2020). Mají amylytickou a proteolytickou aktivitu a jsou podpořeny metanogenními archei, která jsou vnitřně připevněna k anaerobní biomase hub (Huws et al. 2018; Elghandour et al. 2020).

3.1.6.4 Bachorové metanogeny (archea)

Doména archaea je v bachoru složena převážně z metanogenních archeí z kmene Euryarchaeota (Hook et al. 2010; Huws et al. 2018). Jedná se o prokaryotické organismy schopné prosperovat v extrémním prostředí (Gottlieb et al. 2016), přičemž u přežvýkavců se vyskytují převážně v bachoru a v koncových segmentech střev (Patra et al. 2017). Bachorová archaea jsou přísně anaerobní a jsou jedinými známými mikroorganismy v bachoru schopné produkce CH₄ (Hook et al. 2010; Elghandour et al. 2020). Počty archeí se pohybují mezi 10⁶–10⁹ buněk na mililitr bachorové tekutiny a představují méně než 4 % mikrobiální komunity (Kamra 2005; Tapio et al. 2017; Elghandour et al. 2020). Nachází se na dně trofického řetězce z důvodu jejich potřeby využívat konečné produkty fermentace jakožto substráty (Elghandour et al. 2020). Metanogeny existují v symbiotickém spojení s bachorovými bakteriemi, houbami a protozoi (Hook et al. 2010; van Gastelen et al. 2019) a mají stěžejní roli při odstraňování vodíku z fermentace bachoru (Huws et al. 2018).

Většina metanogenů odstraňuje vodík redukcí oxidu uhličitého plynným vodíkem za vzniku CH₄ (82 % celkového množství CH₄; Martin et al. 2010; Lan & Yang 2019) (Thauer et al. 2008). Přibližně 9–25 % bachorových metanogenů je spojeno s protozoi a jsou zodpovědné za 9–37 % produkce CH₄ (Hook et al. 2010; Haque 2018; Lan & Yang 2019). Produkce CH₄ udržuje nízké koncentrace vodíku v bachoru a je tak umožněn růst jiných druhů, následkem čehož probíhá účinnější kontinuální fermentace (Kamra 2005; McAllister et al. 2015).

Metanogenním archeím chybí v buněčných stěnách na rozdíl od bakterií peptoglykany, místo kterých mají v buněčných stěnách pseudomurein, heteropolysacharidy nebo proteiny (Kumar et al. 2009; Hook et al. 2010). Od bakterií se také liší svou morfologií, přičemž fosfolipidová vrstva membrány metanogenů je převážně složena z izoprenoidních alkoholů spojených etherovou vazbou s glycerolem nebo ostatními cukry. Oproti tomu pro bakterie a eukaryota je typická membrána složená z esterů glycerolu s mastnými kyselinami (Wolin & Miller 2006; Gottlieb et al. 2016). Těchto funkčních a morfologických rozdílů je možno využít k selektivní inhibici metanogenů (Wolin & Miller 2006). Část metanogenů je součástí biofilmu na částicích krmiva, kde bakterie aktivně produkují vodík. Vzhledem k tomu, že jsou chráněny biofilmem, je možné, že právě tyto metanogeny není možné tlumit metanogenními inhibitory do takové míry, jako ostatní zcela volně žijící (McAllister et al. 2015; Patra et al. 2017).

3.1.6.5 Bakteriofágy

Bakteriofágy jsou viry bakterií a na mililitr bachorové tekutiny je jich přibližně 10⁷–10⁹. Jsou považováni za obligátní patogeny bakterií, protože jsou schopni jejich destrukce. Tito fágové pomáhají obratu bakteriální masy v bachoru. Lýzou bakteriálních buněk činí bakteriální protein přístupnější pro zvíře jakožto zdroj aminokyselin (Kamra 2005; Puniya et al. 2015).

3.2 Produkce CH₄ ze zemědělství

CH₄ je po oxidu uhličitém druhým nejvýznamnějším skleníkovým plynem (Hook et al. 2010). Oproti oxidu uhličitému má CH₄ 25krát (Huhtanen et al. 2016; Arceo-Castillo et al. 2019) až 32krát (Bekuma et al. 2019; Neumann et al. 2019) vyšší potenciál globálního oteplování, což je způsobeno jeho dlouhou životností v atmosféře (12 let; Hook et al. 2010; Jiménez-Ocampo et al. 2019) a jeho vysokou absorpční kapacitou radiace (Moss et al. 2000).

CH₄ je emitován z různých antropogenních a přírodních zdrojů. Více než 70 % celosvětových emisí CH₄ souvisí s lidskou činností (tzv. antropogenní zdroje) (Bekuma et al. 2019). Mezi tyto antropogenní zdroje patří výroba a použití fosilních paliv (Kirschke et al. 2013; Gottlieb et al. 2016), chov zvířat (enterická fermentace v chovu hospodářských zvířat a hnoje) (Audsley & Wilkinson 2014; Neumann et al. 2019), pěstování rýže (Jiang et al. 2019), spalování biomasy a nakládání s odpady (Aboagye & Beauchemin 2019; Jiménez-Ocampo et al. 2019).

Vzrůstající koncentrace skleníkových plynů, včetně CH₄, vedou ke zvýšenému zadržování tepla v atmosféře, následnému oteplování Země a obecněji ke globálním změnám klimatu (Moss et al. 2000; Kweku et al. 2018). Změna klimatu má mimo jiné přímý dopad i na hospodářská zvířata (například tepelný stres, zvýšená nemocnost a úmrtnost) a také nepřímý (například prostřednictvím kvality a dostupnosti krmiv a vody). Vzájemné ovlivňování živočišné výroby a změny klimatu je složité a obousměrné (Bekuma et al. 2019). Velkochovy jsou jedním z hlavních zdrojů skleníkových plynů jako je CH₄, CO₂ a oxid dusný (N₂O) (Rira et al. 2015; Slade et al. 2016). Oproti oxidu uhličitému mají CH₄ a oxid dusný daleko vyšší potenciál globálního oteplování (oxid dusný 265krát vyšší; Lou et al. 2019), tudíž je cílené snižování těchto plynů efektivnější (Knapp et al. 2014).

Globální emise skleníkových plynů ze zemědělství dle odhadů představují 10–15 % celkových emisí (Gerber et al. 2013; Guerci et al. 2013) a mléčný skot se na antropogenních emisích podílí pouze 4 % (Knapp et al. 2014). Největším zdrojem CH₄ je enterická fermentace domestikovaných přežvýkavců (Leahy et al. 2010; Salami et al. 2019), kdy je uvolněno 18–22 % antropogenních a 11–13 % globálních emisí CH₄ (Beauchemin et al. 2009; Ugbogu et al. 2019). Předpokládá se, že mléčný skot produkuje 56,9 % ze všech emisí pocházejících ze živočišné produkce (Lan & Yang 2019).

Johnson & Johnson (1995) uvádí, že přežvýkavci denně vyprodukují a uvolní 250 až 500 litrů CH₄, dle Janssen (2010) skot vyprodukuje za den 150–420 litrů CH₄ a ovce přibližně 25–55 litrů za den. CH₄ je produkován převážně v batoru (87–89 %) a v menším rozsahu také v tlustém střevě (11–13 %) přežvýkavců (Aboagye & Beauchemin 2019; Jiménez-Ocampo et al. 2019). CH₄ vyprodukovaný batorovými metanogeny je přežvýkavcem uvolňován do atmosféry (Janssen 2010). Tvorba CH₄ také představuje pro zvíře významnou ztrátu 2–15 % energie v závislosti na typu krmiva (Patra & Yu 2012; Aboagye & Beauchemin 2019).

Tyto emise se s největší pravděpodobností ještě několik dalších desetiletí budou zvyšovat v důsledku růstu lidské populace, urbanizace a rostoucí poptávky po živočišných produktech zejména v zemích s rychlým hospodářským rozvojem (Patra 2013; Kipling et al. 2016; Wiedemann et al. 2017; Salami et al. 2019). Do roku 2050 se očekává, že poptávka po mase a dalších živočišných produktech (např. vejce, mléko a sýr) vzroste o 70–100 % a světová populace dosáhne počtu 9,6 miliard (Gerber et al. 2013; Caro et al. 2014; Tilman & Clark 2014;

Slade et al. 2016; Haque 2018). I když se ve vyspělých zemích emise skleníkových plynů od hospodářských zvířat mezi lety 1961–2010 snížily o 23 %, v rozvojových zemích se postupem času zvýšily o 117 % (Caro et al. 2014).

3.3 Metody snížení emisí CH₄

V současné době je výzkum po celém světě zaměřen na hledání způsobů, jakými je možné snížit emise CH₄ z bacherové fermentace (Kumari et al. 2019; van Gastelen et al. 2019). Nicméně přijetí mnohých z těchto strategií je omezeno kvůli nejistotám jejich účinnosti, kdy některé sloučeniny mohou efektivně snižovat emise CH₄, ale mohou také negativně ovlivňovat příjem krmiva, degradaci vlákniny a produktivitu zvířat. Nedostatkem výzkumu některých strategií je také fakt, že jejich efektivita byla v mnoha studiích zkoumána pouze krátkodobě. Za krátkou dobu trvání pokusu není možné zhodnotit míru přizpůsobení se mikrobioty na dané sloučeniny. Je proto důležité vyhodnotit strategie pro zmírnění emisí CH₄ v dlouhodobých experimentech (delší než 21–28 dní). Současně je nutné kvůli omezením vsádkových nebo kontinuálních kultivačních *in vitro* systémů testovat sloučeniny ke snížení CH₄ *in vivo* za využití zvířat s podobnou produktivitou, kterou mají zvířata na komerčních farmách. Dále došlo ke zpochybnění životaschopnosti několika chemických sloučenin (například bromochlorometan, chloroform) jakožto antimetanogenních látek, kvůli obavám o zdraví zvířat a bezpečnost potravin, nebo kvůli jejich vlivu na životní prostředí (Hristov et al. 2015). Předpokládá se, že snížení emisí CH₄ přežvýkavcům zpřístupní větší množství metabolizovatelné energie a následně více čisté energie pro produkci (Aboagye & Beauchemin 2019; van Lingen et al. 2019).

O implementaci mnohých dostupných technologií a strategií rozhoduje jejich vysoká cena (Iqbal et al. 2008; O'Mara 2011). Zároveň existuje malá pravděpodobnost, že producenti tyto strategie adaptují a implementují, pokud by mělo dojít ke snížení produkce zvířat, a tudíž i ziskovosti (Grainger & Beauchemin 2011; Knapp et al. 2014). Aditiva jsou ve studiích vybírána na základě jejich reálné nebo potenciální schopnosti inhibovat metanogenezi a jejich komerční dostupnosti (O'Brien et al. 2014). Strategie, pomocí kterých by došlo k inhibici metanogenů, způsobí i akumulaci vodíku v bachoru. Je proto nutné poskytnout i alternativní možnosti reakcí, které by odstranily vodík za účelem udržení fungující fermentace a prevence ztráty energie (Eckard et al. 2010; Knapp et al. 2014). Zkoumané strategie jsou rozmanité a lze je rozdělit do několika kategorií:

- a) Strategie využívající genetické metody (selekce zvířat s nízkou produkcí CH₄)
- b) Strategie využívající biotechnologické metody (vakcíny, defaunace)
- c) Strategie spojené s výživou:
 - Změna krmné dávky
 - Využití doplňkových látek v krmivech (sekundární metabolity rostlin, nitrosloučeniny, statiny atd.)

3.3.1 Strategie využívající genetické metody

Jednou z možností, jak snížit produkci CH₄ od přežvýkavců, je selekce zvířat s nízkou produkcí CH₄. K rozvoji této strategie došlo poté, co bylo zjištěno, že produkce CH₄ je dědičnou vlastností. Genetická selekce však vyžaduje delší časový rámec, a navíc koeficienty dědivosti

jsou pro produkci CH₄ poměrně nízké (Haque 2018; Breider et al. 2019). Mezi studie, které se věnovaly dědivosti produkce CH₄ u dojnic, patří například publikace Pickering et al. (2015), v níž byl zjištěn nevýznamný koeficient dědivosti produkce CH₄ (mg/kg vzduchu) 0,05 za využití laserového detektoru CH₄. V dalších studiích byla využita infračervená spektroskopie pro měření produkce CH₄ během dojení, kdy, dle výsledků Lassen & Løvendahl (2016), je koeficient dědivosti produkce CH₄ (g/den) 0,21 a Pszczola et al. (2017) uvádí koeficient dědivosti 0,27. Z analýzy ve studii Pinares-Patiño et al. (2013) vyplývá, že produkce CH₄ (g/kg sušiny) v bachoru ovcí je dědičnou vlastností (s koeficientem dědivosti 0,13).

Tento způsob snížení metanogeneze je atraktivní, protože redukuje cenu produkce snížením příjmu krmiva a snižuje emise CH₄ (a potenciálně emise oxidu dusného) bez ohrožení růstu zvířete (Hill et al. 2016). Ve studii Wallace et al. (2019) byla popsána dědičnost a tak i možnost předpovědi složení jádra bachorového mikrobiomu pomocí algoritmů. Dědičné stabilní mikroby pak představují primární cíle pro manipulaci bachoru.

3.3.2 Strategie využívající biotechnologické metody

Mezi biotechnologické metody snížení produkce CH₄ patří například vývoj vakcín, která by stimulovala imunitní systém přežvýkavců k tvorbě protilátek proti metanogenům (Hook et al. 2010). Například studie Williams et al. (2009) uvádí, že ačkoliv vakcína zacílila na 52 % metanogenů přítomných v bachoru ovcí, produkce CH₄ vzrostla po vakcinaci o 18 %. Metanogenní populace v bachoru jsou ovlivněné krmnou dávkou a geografickou polohou přežvýkavce, tudíž je obtížné vyvinout širokospektrální vakcínu proti všem metanogenům (Hook et al. 2010; Haque 2018). Dlouhodobý účinek vakcinace na snížení produkce CH₄ nebyl prokázán (Haque 2018).

Další potenciální metodou je defaunace, tedy odstranění protozoí z bachoru (Hook et al. 2010; Mosoni et al. 2011). Té lze dosáhnout například prostřednictvím halogenovaných analogů, monensinu, sulfátů, kyselin, povrchově aktivních chemikálií, lipidů, tříslovin a saponinů a je možné docílit podstatného snížení tvorby CH₄ (Kumar et al. 2009; Hook et al. 2010; Morgavi et al. 2012; Bodas et al. 2012). Dvě hlavní výhody defaunace spočívají ve zvýšení efektivity využití živin zvířetem a omezení přenosu vodíku mezi protozoí a metanogeny. Metanogeny, které jsou asociované s prvoky, přispívají přibližně 9–37 % k metanogenezi v bachoru (Haque 2018). Závěry defaunačních studií jsou nejednoznačné (Hook et al. 2010), avšak například Morgavi et al. (2012) uvádí, že v průměru bylo dosaženo snížení produkce CH₄ za nepřítomnosti protozoí *in vitro* a *in vivo* o 12 % s tím, že v mnoha pokusech nebyl účinek zjevný.

Důvody těchto odlišných výsledků nejsou dobře známy. Faktorem může být délka trvání defaunace, protože metanogenům trvá oproti bakteriím delší dobu přizpůsobit se změnám v prostředí bachoru. Defaunace navíc vyvolává posuny v jiných mikrobiálních skupinách, včetně celulólytických bakterií, které by také mohly ovlivnit fermentaci a metanogenezi (Morgavi et al. 2012). Využití sloučenin jako jsou halogenované analogy a monensin, je kontroverzní z důvodu možného rizika pro lidské zdraví (Hook et al. 2010; Bodas et al. 2012).

3.3.3 Strategie spojené s výživou

Nutriční strategie pro zmírňování CH₄ jsou jedny z nejrozsáhlejších a nejvýznamnějších. Tyto strategie lze rozdělit do dvou hlavních kategorií: strategie, kdy se mění složení krmné dávky a strategie, kdy se přidávají doplňkové látky do krmných dávek (Haque 2018).

Cena krmiv tvoří až 70 % celkových nákladů, a tak zefektivnění výživy může mít signifikantní dopad na ziskovost (McGrath et al. 2018). Manipulace s krmnou dávkou potenciálně sníží emise CH₄ až o 40 % v závislosti na stupni změny a druhu zásahu (Iqbal et al. 2008; Haque 2018).

3.3.3.1 Složení krmné dávky

Složky krmiva slouží jako substráty pro mikrobiální fermentaci, ovlivňují stravitelnost, množství energie vyprodukované mikroby a dále i relativní zastoupení vyprodukovaných těkavých mastných kyselin a CH₄ (Knapp et al. 2014; Patra et al. 2017; Lan & Yang 2019). Relativní zastoupení těkavých mastných kyselin ovlivňují emise CH₄, protože vznik kyseliny propionové spotřebovává redukční ekvivalenty, zatímco tvorba kyseliny octové a máselné generuje vodík pro metanogenezi (Hook et al. 2010; Knapp et al. 2014).

Zkrmování vyššího podílu koncentrovaných krmiv vede k relativnímu snížení tvorby CH₄ na megajoule hrubé energie přijatého krmiva oproti zkrmování vyššího podílu píce (O'Mara 2011; van Gastelen et al. 2019). K výraznému poklesu tvorby CH₄ dochází tehdy, když je v krmné dávce více než 40 % škrobu. V případě nahrazení vlákniny škrobem v krmné dávce dochází k posunu produkce těkavých mastných kyselin od kyseliny octové k propionové, což má za následek nižší produkci vodíku v bachoru (Zhang & Yang 2011; Bekuma et al. 2019). Je nutné podotknout, že zvýšené množství rychle fermentovatelných sacharidů (škrobu a cukrů) v krmné dávce může zrychlit průchod krmiva bachorem a dále snížit bachorové pH (Hook et al. 2010). Při implementaci této strategie je nezbytné brát v úvahu welfare zvířete. Mezi možné následky patří subakutní bachorová acidóza, která je u přežvýkavců vážným produkčním problémem narušující bachorový mikrobiom (Hook et al. 2010; Bodas et al. 2012; Jiménez-Ocampo et al. 2019).

S produkcí CH₄ je také spojena doba zadržení částic krmiva v bachoru (Bodas et al. 2012; Huhtanen et al. 2016), která je dědičnou vlastností přežvýkavců (Ørskov et al. 1988; Shi et al. 2014). Rychlost průchodu tráveniny ovlivňuje rozsah trávení, relativní zastoupení těkavých mastných kyselin a rychlost růstu mikroorganismů. Rychlejší průchod krmiva bachorem znamená menší rozsah bachorové fermentace (Knapp et al. 2014) a nižší produkci CH₄ na jednotku krmiva (Shi et al. 2014) v závislosti na tom, zda jsou živiny strávené v tenkém střevě (cukry a škroby) nebo fermentované v dalších segmentech trávicí soustavy (pektiny, glukany a NDF) (Knapp et al. 2014).

Rozsah produkce CH₄ může být ovlivněn druhem sacharidů, kvalitou a druhem píce, fyzickým zpracováním (rozdrcení krmiva zredukuje emise), konzervací píce, frekvencí krmení a úrovní příjmu krmiva, kdy produkce CH₄ roste téměř lineárně s příjmem krmiva (Hook et al. 2010; Bodas et al. 2012; Knapp et al. 2014; Hernández et al. 2017; van Gastelen et al. 2019).

Přídavek lipidů, jako jsou mastné kyseliny a oleje, do krmné dávky je také možností snížení emisí enterického CH₄, ačkoliv výsledky nejsou vždy jasné a definitivní (Hook et al.

2010; Knapp et al. 2014; Haque 2018). Zvýšený obsah lipidů v krmivu snižuje metanogenezi inhibicí prvoků, zvýšenou produkcí kyseliny propionové a biohydrogenací nenasycených mastných kyselin (Ellis et al. 2008; Janssen 2010; Bekuma et al. 2019). Nenasycené mastné kyseliny mohou být využity jako akceptory vodíku jakožto alternativa redukce oxidu uhličitého (Hook et al. 2010; Knapp et al. 2014). Rozsah inhibice produkce CH₄ je závislý na koncentraci, typu a profilu mastných kyselin tuků a složení živin v potravě. Vyšší koncentrace tuků sice výrazně snižují produkci CH₄, ale často mají negativní účinky na stravitelnost a fermentaci krmiv a na užitkovost zvířat (Beauchemin et al. 2008; Bekuma et al. 2019).

Ve studii Patra (2013) bylo zjištěno, že sušina krmné dávky s přídatkem maximálně 6 % tuku zvýší produkci mléka a výrazně sníží emise enterického CH₄ (o 15 %) u skotu ve srovnání s 2 % tuků. Přídavek olejů do krmné dávky přežvýkavce může snížit emise CH₄ až o 80 % *in vitro* a o přibližně 25 % *in vivo* (Bekuma et al. 2019). Mastné kyseliny, zejména mastné kyseliny se středním řetězcem, jako jsou kyselina myristová a laurová, preferenčně inhibují metanogenní bakterie (Dohme et al. 2001; Soliva et al. 2004; Bekuma et al. 2019). Kumar et al. (2009) uvádí, že přidáním kyseliny myristové do krmné dávky došlo ke snížení produkce CH₄ až o 36 %. Dále kyseliny olejová (C18: 1), linolová (C18: 2) a linoleová (C18: 3) při jednotlivé aplikaci do bachoru snížily denní tvorbu CH₄ o 27, 26, respektive 34 % (Czerkawski et al. 1966; Bodas et al. 2012). Využití kombinace mastných kyselin vede dle *in vitro* studií k největšímu potlačení metanogeneze z důvodu jejich synergistického účinku (Dohme et al. 2001; Hook et al. 2010).

3.3.3.2 Aditiva snižující metanogenezi

Existuje celá řada aditiv, která mohou být podávána ke snížení metanogeneze, například chemické inhibitory, organické kyseliny a rostlinné sekundární sloučeniny. Způsob účinku závisí na konkrétní přísadě, ale může zahrnovat přímou inhibici metanogenů či metanogeneze, potlačení ciliárních protozoí nebo poskytnutí či stimulaci alternativní cesty pro odstranění vodíku (Bodas et al. 2012; Broucek 2018; Jiménez-Ocampo et al. 2019). Na druhou stranu některá aditiva mohou být pro hostitelská zvířata toxická, u dojnic negativně ovlivnit produkci mléka nebo mít pouze přechodný účinek na metanogenezi (Patra & Saxena 2010; Knapp et al. 2014).

3.3.3.2.1 Ionofory

Ionofory jsou vysoce lipofilní polyethery, které se hromadí v buněčných membránách a katalyzují rychlý transport iontů (Broucek 2018). Ionoforová antibiotika, jako je monensin a lasalocid, byla obvykle v živočišné výrobě používána ke zvýšení produkce. Bylo také prokázáno, že v závislosti na dávce potlačují produkci CH₄ u přežvýkavců (Beauchemin et al. 2008; Martin et al. 2010). V literatuře je uvedeno, že s jejich využitím klesá metanogeneze až o 76 % *in vitro* a v průměru o 18 % *in vivo* (Patra 2012). Ionofory neovlivňují množství a rozmanitost metanogenů (Hook et al. 2010), ale mění bakteriální populaci z grampozitivních na gramnegativní organismy se současným posunem produktů fermentace z kyseliny octové na propionovou (Martin et al. 2010; Patra et al. 2017; McGrath et al. 2018). Tento fermentační posun snižuje metanogenům dostupnost vodíku pro produkci CH₄. Ionofory také mohou snížit počty protozoí (Patra et al. 2017; Broucek 2018), kdy při pokusech s dobyt看m snížení počtu protozoí odpovídalo poklesu CH₄ až o 30 % (Martin et al. 2010). Perzistence účinku je rovněž

proměnná mezi studii, od krátkodobých po dlouhodobé studie (např. několik dní až 6 měsíců) (Martin et al. 2010; Patra 2012; Haque 2018).

Využívání ionoforových antibiotik ve výživě zvířat má významná negativa, především se jedná o zvyšování rezistence bakterií k antibiotikům a výskyt reziduí antibiotik v potravním řetězci. Vědomí těchto rizik vedlo až k zákazu používání antibiotik jakožto krmných aditiv v Evropské unii od ledna 2006 (Langford et al. 2003; Cedillo et al. 2014). Proto je v těchto zemích nezbytné nalézt vhodné alternativy antibiotik (Hook et al. 2010).

3.3.3.2.2 Nitrosloučeniny

Nitrosloučeniny mohou být využity jako alternativní akceptory elektronů, které účinně spotřebují redukční ekvivalenty produkované během bacheřové fermentace a přeměňují tak tok elektronů pryč od redukce oxidu uhličitého na CH₄ (Zhang & Yang 2011; Liu et al. 2011). Mezi tyto sloučeniny patří například dusičnany (NO₃), nitroethan (NE), 2-nitroethanol (NEOH), 2-nitropropanol (NPOH) a kyselina 3-nitro-1-propionová (3-NOP). Nitrosloučeniny jsou obecně velmi účinné při snižování produkce CH₄, přičemž jsou schopny snížit produkci CH₄ o 57–98 % *in vitro* (Patra et al. 2017; Van Wesemael et al. 2019) a o 69 % *in vivo* (Anderson et al. 2006). Ve studii Anderson et al. (2016) bylo zjištěno, že píče obsahující dusičnany, kyselinu 3-NOP nebo NPOH účinně snížila *in vitro* produkci CH₄ o 35–87 %.

I přes výrazné antimetanogenní účinky nitrosloučenin má jejich využití u živých zvířat svá rizika. Ta se týkají především přestupu reziduí do živočišných produktů a negativního vlivu na zdraví zvířat (Patra 2012). Například pro snížení produkce CH₄ o 20 % je nutné zkrmit okolo 200 g nitrátu. Takové množství nitrátu by mělo na zvíře škodlivé až letální účinky, a to z důvodu redukce dusičnanů na dusitany, které způsobují methemoglobinemii (Knapp et al. 2014; McGrath et al. 2018; Haque 2018).

3.3.3.2.3 Sekundární metabolity rostlin

Sekundární metabolity rostlin jsou definovány jako látky, které nejsou zapojeny do primárních biochemických procesů jako buněčné dělení, růst, respirace či ukládání živin. Namísto toho rostlině poskytují ochranu proti hmyzu, býložravcům a mikrobiální infekci (Bodas et al. 2012; Patra et al. 2017; Haque 2018). Mezi tyto rostlinné látky se řadí především saponiny, trísloviny, flavonoidy a silice. V rostlinách se obvykle vyskytují v malých koncentracích (<1 % celkového uhlíku) (Puniya et al. 2015).

Zájem o použití rostlinných sekundárních sloučenin jakožto prostředků ke snížení produkce CH₄ roste (Jouany & Morgavi 2007; Patra & Yu 2012). Rostlinná aditiva jsou přírodní alternativy k chemickým přísadám, které byly zakázány nebo které mohou být vnímány spotřebiteli negativně (Cedillo et al. 2014; Elghandour et al. 2015). Sekundární metabolity rostlin obsahují jako hlavní aktivní složky fenolické sloučeniny, u kterých byl prokázán antimikrobiální účinek (Haque 2018), antiprotozoální účinek (Bodas et al. 2012) i přímý inhibiční vliv na metanogeny (Patra & Saxena 2010; Cieslak et al. 2013). Mechanismus účinku vychází především z jejich potenciálu proniknout do bakteriální buněčné membrány. To následně vede k úniku iontů, destrukci a smrti buňky (Kumar et al. 2009; Bodas et al. 2012). Je nutné dbát opatrnosti při používání rostlinných extraktů (především tríslovin či saponinů), protože mohou mít hemolytický účinek a způsobit až úmrtí. Není tudíž vhodné dlouhodobé krmení zvířat vysokými dávkami sekundárních metabolitů (Cedillo et al. 2014).

Většina pokusů s rostlinnými extrakty byla provedena *in vitro* a vliv těchto molekul na metanogenezi je vysoce variabilní (Martin et al. 2010; Broucek 2018). V *in vivo* pokusech nedošlo k poklesu produkce CH₄ (Holtshausen et al. 2009; Hook et al. 2010). Nejslibnějších výsledků bylo dosaženo využitím chemických rodin tríslovin, saponinů a heterogenní skupiny sloučenin označovaných jako silice (Hook et al. 2010; Martin et al. 2010).

3.3.3.2.3.1 Saponiny

Saponiny jsou glykosidy steroidů a triterpenoidů s pěnovými vlastnostmi vyskytující se v mnoha rostlinách. Mají přímý účinek na mikroby bachoru, snižují bachorovou degradaci proteinu krmiva a současně podporují syntézu mikrobiálních proteinů a biomasy (Tavendale et al. 2005; Broucek 2018; Ugbogu et al. 2019). Účinky saponinů na snížení metanogeneze jsou nejednoznačné, přičemž v některých studiích byl prokázán vliv na inhibici protozoí *in vitro*, kdy došlo i k omezení dostupnosti vodíku pro metanogenezi (Guo et al. 2008; Kumar et al. 2009; Hook et al. 2010). Ačkoliv *in vitro* došlo k poklesu produkce CH₄, redukce byla zapříčiněná především snížením bachorové fermentace a trávení krmiva (Holtshausen et al. 2009; Haque 2018). Oproti tomu v *in vitro* studii Goel & Makkar (2012) nebylo dosaženo pomocí rostlin obsahující saponiny podstatné redukce tvorby CH₄. Ve studii Pen et al. (2006) došlo ke snížení produkce CH₄ využitím saponinů, nicméně účinek se lišil v závislosti na původu saponinů.

3.3.3.2.3.2 Trísloviny

Trísloviny jsou polyfenolické sekundární rostlinné sloučeniny, jejichž biologický význam souvisí s ochranou rostliny před infekcí, hmyzem nebo okusem živočichy (Min et al. 2003; Broucek 2018). Hlavní dvě skupiny rostlinných polyfenolických sloučenin vyjma ligninu jsou kondenzované (polymery flavanoidů) a hydrolyzovatelné trísloviny (polyestery kyseliny gallové a různých cukrů) (Broucek 2018; Focant et al. 2019; Ugbogu et al. 2019). Hydrolyzovatelné trísloviny jsou pro zvíře potenciálně toxické (Min et al. 2003). Předpokládá se, že kondenzované trísloviny přímo inhibují metanogeny a nepřímo omezují metanogenezi snížením dostupnosti vodíku (Hook et al. 2010; Broucek 2018). Mimo jiné působí jako anthelmintika, herbicidy, jsou aktivní proti gastrointestinálním nematodům (Roldan et al. 2019) a jsou využívány ke zlepšení trávení bílkovin (Ugbogu et al. 2019).

Kondenzované trísloviny snížily metanogenezi o 57 % u koz, u ovcí o 13 %, u jehňat o 24 % (zde bylo snížení CH₄ spojené se sníženou stravitelností organické hmoty a vlákniny), ale u skotu nebylo snížení produkce CH₄ dosaženo (Hook et al. 2010; Martin et al. 2010). Trísloviny s vyšší molekulární hmotností nevykazují konzistentní účinky na redukci metanogeneze. V případě, že ve studiích došlo ke snížení metanogeneze, pokles byl pravděpodobně způsoben snížením příjmu sušiny nebo sníženou stravitelností krmiva. Naopak trísloviny s nižší molekulární hmotností mohou snižovat emise CH₄ bez negativních účinků na stravitelnost (Aboagye & Beauchemin 2019).

3.3.3.2.3.3 Silice

Silice jsou přírodní produkty, které se na základě způsobu biosyntézy dělí na dvě chemické skupiny: terpenoidy a fenylypropanoidy. Jsou to aromatické olejové sloučeniny v tekuté formě, které lze získat z různých částí rostlin (Ugbogu et al. 2019). Patra & Yu (2012)

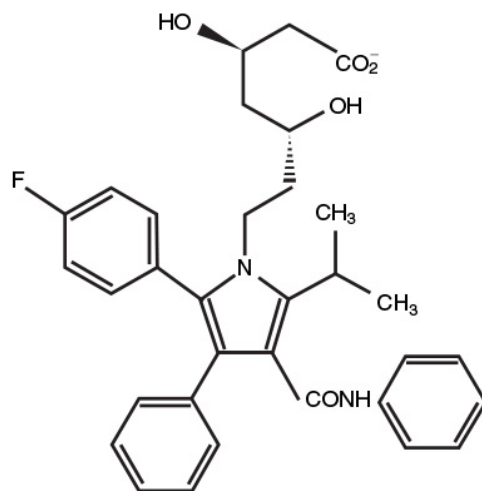
uvádějí, že silice mohou významně snížit produkci CH₄. Zatímco jediný typ silice při nízké dávce pravděpodobně významně produkci CH₄ v bachoru nesníží, kombinace několika silic v nízkých dávkách nebo jejich kombinace s jinými antimetanogenními látkami může být účinná. Mají však také nepříznivé účinky na trávení a fermentaci krmiva (Patra & Yu 2012). Silice mají antimikrobiální účinky, které působí podobně jako monensin prostřednictvím inhibice gram pozitivních bakterií (Martin et al. 2010; Haque 2018), nicméně jejich účinky jsou variabilní (Hook et al. 2010; Bodas et al. 2012).

3.3.3.2.4 Statiny

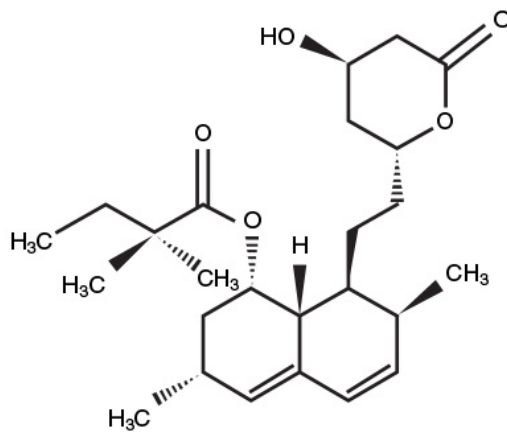
Statiny, také známé jako inhibitory 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl (HMG)-CoA reduktázy (Ting et al. 2016), jsou účinnou skupinou antihyperlipidemických léků, která se široce používá ke snížení hladiny cholesterolu u lidí (Patra et al. 2017; Parihar et al. 2019). Enzym HMG-CoA reduktáza katalyzuje přeměnu HMG-CoA na mevalonát, což je krok omezující rychlost syntézy cholesterolu a dalších izoprenoidů (Friesen & Rodwell 2004; Vuorio et al. 2011). Inhibice HMG-CoA vede ke snížení syntézy cholesterolu (Ashrafizadeh & Ahmadi 2019) a ke zvýšení syntézy receptorů lipoproteinů o nízké hustotě (LDL). To má za následek zvýšenou clearance LDL cholesterolu z krevního oběhu (Chatzizisis et al. 2010; Parihar et al. 2019).

Vyjma účinku na snížení lipidů mají statiny také takzvané pleiotropní účinky. Tyto pleiotropní účinky vedou ke zlepšení endoteliální funkce, modulaci zánětlivých reakcí a antioxidantních účinků, k prevenci kardiovaskulárních chorob (Sirtori 2014; Ashrafizadeh & Ahmadi 2019; Parihar et al. 2019; Garba et al. 2019) a dále řada statinů působí cytotoxicky (Mück et al. 2004; Tapia-Pérez et al. 2011; Ting et al. 2016).

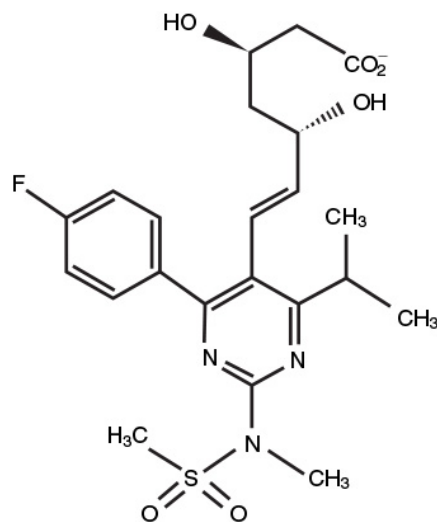
Všechny inhibitory HMG-CoA reduktázy jsou blízce příbuzné analogy (Wolin & Miller 2006). Statiny sice mají oboje skupiny hydrofobní i hydrofilní a jsou klasifikovány jako amfifilní, nicméně na základě rozdělovacího koeficientu oktanol/voda je lze rozdělit do dvou skupin, hydrofobní a hydrofilní (Gottlieb et al. 2016). Mezi lipofilní statiny patří atorvastatin (Obrázek 1), simvastatin (Obrázek 2), fluvastatin, lovastatin, cerivastatin (mevastatin) a pitavastatin. Druhou skupinou jsou hydrofilní statiny, rosuvastatin (Obrázek 3) a pravastatin, které jsou rozpustné ve vodě z důvodu přítomnosti polární hydroxylové, respektive metanové sulfoamidické skupiny (Schachter 2005; Gottlieb et al. 2016).



Obrázek 1. Chemická struktura atorvastatinu (Schachter 2005).



Obrázek 2. Chemická struktura simvastatinu (Schachter 2005).



Obrázek 3. Chemická struktura rosuvastatinu (Schachter 2005).

Dalším důležitým aspektem chemické podstaty statinů je existence hydroxykyselinových a laktonových forem s uzavřeným kruhem. Všechny statiny lze převést z jednoho na druhý. Nicméně například simvastatin a lovastatin jsou komerčně dostupné statiny ve formě laktonu. Jsou to prekurzory a k tomu, aby byly aktivní (inhibovaly HMG-CoA reduktázu), je nutné, aby došlo k otevření laktonového kruhu na hydroxykyselinovou formu (Gottlieb et al. 2016).

Laktonové formy cerivastatinu, simvastatinu, atorvastatinu, lovastatinu, fluvastatinu a pravastatinu (seřazeny dle klesající hydrofobnosti), jsou 3–4krát více lipofilní v porovnání s jejich kyselinovou formou. Laktony lipofilních statinů jsou nejnárodněji transportovány přes lipidovou membránu (Schachter 2005; Gottlieb et al. 2016). Kyselinové formy atorvastatinu, lovastatinu a simvastatinu jsou všechny více hydrofilní než jejich příslušné laktonové formy (Gottlieb et al. 2016).

Hydrofilní statiny se podávají přímo v aktivní hydroxylové formě. Rosuvastatin nové generace je však mnohem účinnější vzhledem k větší lipofilitě a delšímu poločas rozpadu. Lipofilní statiny pravděpodobně vstoupí do membrán endoteliálních buněk pasivní difúzí. Lipofilní statiny, včetně simvastatinu, lovastatinu a atorvastatinu, musí být podávány v laktonové formě (uzavřený kruh) a jaterními buňkami převedeny na aktivní hydroxylovou formu (otevřený kruh) (Parihar et al. 2019).

Na základě jejich metabolismu lze statiny rozdělit do dvou skupin. Lipofilní statiny podstupují hepatický a enterální metabolismus prostřednictvím cytochromu P450 (enzym CYP450) (Gottlieb et al. 2016; Parihar et al. 2019), zatímco ve vodě rozpustné statiny jsou vylučovány do značné míry nezměněné (Gottlieb et al. 2016).

3.3.3.2.4.1 Statiny jakožto inhibitory metanogeneze

Statiny současně specificky interferují s biosyntézou buněčných membrán archeí, a tak selektivně potlačují růst metanogenů (Candyrine et al. 2018). Všechny dosud identifikované membránové lipidy archeí se vyznačují neobvyklými strukturálními rysy, které lze považovat za specifické taxonomické markery této skupiny mikroorganismů. Zatímco všechny dosud známé živé organismy mají membrány založené na esterových vazbách vytvářené kondenzací alkoholů a mastných kyselin, archea mají lipidy na bázi etherových vazeb. Tyto molekuly jsou tvořeny kondenzací glycerolu nebo složitějších polyolů s izoprenoidními alkoholy, které obsahují 20, 25 nebo 40 atomů uhlíku (De Rosa et al. 1986; Busquet et al. 2005). Syntéza isoprenoidových jednotek methanogenních archeí je katalyzována HMG-CoA reduktázou podobným způsobem jako syntéza cholesterolu u lidí (Patra & Saxena 2010; Lillehoj et al. 2018). Izoprenoidní alkoholy se vyskytují u metanogenních archeí, ale nejsou přítomné u většiny eukaryot (Morgavi et al. 2013). Izoprenoidy regulují buněčné funkce, integritu buněčné membrány, buněčnou signalizaci, průběh buněčného cyklu, posttranskripční modifikace proteinů a syntézu cholesterolu (Ramírez-Restrepo et al. 2014). Unikátní membránové lipidy archeí se podílí na přežití a přizpůsobení těchto organismů extrémnímu prostředí a udržují permeabilitu a fluiditu membrány (Jain et al. 2014).

Jakožto inhibitory HMG-CoA reduktázy mohou statiny inhibovat růst metanogenů narušením syntézy mevalonátu (Patra et al. 2017) použitého při biosyntéze buněčných stěn metanogenních archeí (Garba et al. 2019), aniž by byly ovlivněny počty bakterií (Gottlieb et al. 2016). Z tohoto důvodu je statinům v posledních letech věnována značná pozornost jakožto zmírňujícím prostředkům k redukci emisí enterického CH₄ (Garba et al. 2019). Žádná

antibiotika nebo léky, s výjimkou statinů, nepotlačily růst metanogenů, aniž by zároveň neovlivňovaly ostatní fermentující bakterie (Bodas et al. 2012). Statiny mají inhibiční účinek na růst bachorových archeí, a tudíž mají vliv na metanogenezi *in vivo* (Klevenhusen et al. 2011; Morgavi et al. 2013; Wang et al. 2016) a *in vitro* (Miller & Wolin 2001; Ramírez-Restrepo et al. 2014; Hristov et al. 2015).

Mnoho lidí užívá statiny s minimálními vedlejšími účinky, tudíž by byly neškodným přídatkem do krmiva zvířat. Vzhledem k jejich schopnosti selektivně inhibovat bachorové metanogeny, inhibitory HMG-CoA reductázy mají excelentní potenciál k tomu, aby upravily bachorovou fermentaci a zvýšily tak užitečnost a konverzi krmiva (Wolin & Miller 2006). Statiny mohou být účinnou antimikrobiální alternativou nebo doplňkem vzhledem k vzrůstající odolnosti mikroorganismů vůči antibiotikům a toxicitě vysokých dávek antibiotik (Ting et al. 2016). Při použití těchto sloučenin však stále existuje několik nejasností, včetně optimálního dávkování a dlouhodobých účinků statinů pro účinné zmírnění enterické emise CH₄; jejich vliv na zdraví a pohodu zvířat; a možné hromadění statinů v tkáních a mléce zvířat (Candyne et al. 2018).

4 Metodika

4.1 Design experimentu a použité látky

V experimentu byly ověřovány účinky zvyšujících se koncentrací tří statinů na produkci CH₄ v bachoru s využitím *in vitro* 24hodinové vsádkové inkubace pufrované bachorové tekutiny. Koncentrace každého statinu byly 1, 10 a 100 mg/l inkubačního média. Použité statiny byly atorvastatin (vápenatá sůl atorvastatinu, čistota ≥ 98 %; Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika), rosuvastatin (vápenatá sůl rosuvastatinu, čistota ≥ 98 %; Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika) a simvastatin (čistota ≥ 97 %, Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika).

Statiny byly rozpuštěny ve 100% dimetylsulfoxidu (DMSO; Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika) za vzniku zásobního roztoku 10 mg/ml. Těsně před inkubací byly jednotlivé roztoky připraveny zředěním zásobních roztoků tak, aby následným přidáním 200 μ l bylo docíleno požadované koncentrace v inkubačním médiu. Každá koncentrace statinů byla testována ve třech opakováních během každé inkubace a inkubace byly opakovány ve třech samostatných dnech. Při každé inkubaci byly vždy zahrnuty tři kontrolní vzorky (bez aditiva) a tři slepé vzorky (blanky; bez substrátu, bez aditiva).

4.2 Dárcovská zvířata a bachorová tekutina

Bachorový obsah (pevná a kapalná frakce) byl ručně odebrán z různých míst v bachoru tří permanentně kanylovaných holštýnských krav (průměrná tělesná hmotnost 632 ± 47 kg, 183 ± 15 dnů laktace a 30 ± 2 kg mléka/den) 3 hodiny po ranním krmení. Krávy byly krmeny ad libitně směsnou krmnou dávkou (TMR), která byla zakládána čerstvá dvakrát denně a skládala se z vojtěškové siláže (284 g/kg sušiny), kukuřičné siláže (252 g/kg), směsi jadrných krmiv (358 g/kg), pivovarského mláta (95 g/kg) a pšeničné slámy (11 g/kg).

Obsah bachoru od každé dojnice byl umístěn do předeřhřáté termosky o objemu 500 ml vypláchnuté CO₂. Termosky byly naplněny až po okraj a uzavřeny šroubovacím uzávěrem s ventilem v otevřené poloze. Otevřený ventil měl zabránit hromadění CO₂ v termoláhvi, čímž by následně došlo ke snížení pH bachorového obsahu a potenciální změně složení mikrobiální komunity. Ihned po odběru vzorků byly termoláhve s obsahem bachoru umístěny do přenosného termoboxu (Icetime® 26 L, Campingaz, Francie) propláchnutého CO₂. V tomto termoboxu, ve kterém byla teplota okolo 23 °C, byly vzorky převezeny do laboratoře.

Bachorová tekutina byla získána ceděním bachorového obsahu sítím s velikostí pórů 250 μ m za stálého proplachování CO₂. Poté byly bachorové tekutiny dojnic smíchány ve stejné poměru a použity jako zdroj inokula. Čas od odběru bachorového obsahu po uzavření inkubačních lahví nepřesáhl 45 minut.

4.3 *In vitro* inkubace

In vitro vsádkové inkubace byly prováděny dle Joch et al. (2019) s určitými úpravami. Tyto úpravy (snížení množství substrátu a objemu inkubačního média) byly provedeny, aby se zajistilo, že tlak nahromaděného plynu v lahvích nebude vyšší než 483 hPa, dle doporučení Theodorou et al. (1994). Jeden den před inkubací bylo naváženo 200 mg sušeného mletého

(1 mm) substrátu do inkubačních láhví o kapacitě 120 ml, které předtím byly vypláchnuty CO₂. Experimentální substrát se skládal z vojtěškové siláže (350 g/kg sušiny), kukuřičné siláže (350 g/kg) a směsi jadrných krmiv (300 g/kg). Tyto tři komponenty byly také použité v krmné dávce dárcovských krav. Chemické složení substrátu bylo následující (na kilogram sušiny): 930 g organické hmoty, 157 g hrubého proteinu, 19 g hrubého tuku, 465 g NDF a 293 g ADF.

Inkubační médium bylo připraveno smícháním (v poměru 1:4, obj./obj.) bachorové tekutiny s fosfátovým pufrem (na litr destilované vody: 28,8 g Na₂HPO₄ · 12H₂O; 6,9 g NaH₂PO₄ · 2H₂O; 0,7 g NH₄Cl; vypláchnuto pomocí CO₂ a upraveno na pH 6,9 ± 0,1 za využití 5M NaOH). Inkubační médium bylo okamžitě propláchnuto CO₂, udržováno při teplotě 39 °C po dobu 10 minut do zahájení inkubace. Vzorek (1 ml) inkubačního média byl okyselen 20 µl 9M H₂SO₄ a skladován při teplotě -18 °C do doby analýzy těkavých mastných kyselin.

Statiny rozpuštěné v DMSO (200 µl) byly napipetovány do jednotlivých láhví a následně bylo do lahví přidáno inkubační médium. Do příslušných kontrolních lahví bylo pipetováno ekvivalentní množství DMSO bez rozpuštěných statinů. Konečná koncentrace DMSO v inkubačním médiu byla vždy menší než 1 %. Poté bylo do sérových lahví nadávkováno 20 ml inkubačního média pomocí dávkovače (Calibrex 530 saluta, Socorex, Švýcarsko). Horní prostor každé lahve byl napuštěn CO₂. Nakonec byly lahve uzavřeny zátkami z butylkaučuku a hliníkovými krimpovacími uzávěry a vloženy do vodní lázně (SW 22, Julabo, Německo). Lahve byly inkubovány při 39 °C po dobu 24 hodin za třepání o frekvenci 90 otáček za minutu.

4.4 Vzorkování a analýza

Na konci 24hodinové inkubace byl změřen tlak nashromážděného plynu v lahvích prostřednictvím manometru (Traceable, Fisher Scientific, Pittsburgh, USA) pro stanovení celkové produkce plynu (CPP). Toho bylo docíleno zavedením jehly 23G (0,6 mm) připojené k manometru přes zátku lahví. Následně bylo převedeno 5 ml fermentačního plynu do zkumavky naplněné destilovanou vodou pomocí výtlačku. Koncentrace CH₄ ve fermentačním plynu byly stanoveny plynovým chromatografem (GC 82 F, Labio, Česká republika) vybaveného plamenově ionizačním detektorem a kapilární kolonou dle Joch et al. (2019). Jako nosný plyn byl použit vodík. Vzorek 200 µl plynu byl převeden za použití 500 µl plynotěsné tlakové stříkačky Pressure-Lok® (Vici Precision Sampling, Baton Rouge, LA, USA). Kalibrace a výpočty podílu CH₄ ve vzorku byly provedeny podle López & Newbold (2007).

Po odběru vzorků plynu byla fermentace ukončena ochlazením lahví v lázni s ledovou vodou. Vzorky tekutin (1 ml; okyselené 20 µl 9M H₂SO₄ a uchovávané při teplotě -18 °C) inkubačního média byly analyzovány dle Joch et al. (2019) pro stanovení koncentrací TMK pomocí plynového chromatografu (GC 82F, Labio, Česká republika) vybaveného plamenově ionizačním detektorem a kapilární kolonou. Jako nosný plyn byl použit vodík. Došlo k převedení 1 µl vzorku plynu při teplotě vstřikovače 200 °C a vstupním tlaku 50 kPa. Na začátku injekce byl teplotní program nastaven na 75 °C, zvyšoval se o 5 °C/min až do 80 °C (udržován po dobu 80 s), dále se zvyšoval o 5 °C až do 128 °C (udržován po dobu 4 s), následně se zvyšoval o 20 °C/min až na 160 °C (udržován po dobu 180 s). Teplota detektoru byla 200 °C (Joch et al 2018). Koncentrace TMK jsou uváděny jako čisté vyprodukované množství a byly vypočteny jako rozdíl mezi koncentracemi ve vzorku tekutiny po 24 hodinách inkubace a

počáteční koncentrací. Koncentrace amoniakálního dusíku byly stanoveny fenol-chlornanovou metodou s NH_4Cl jako standardem (Weatherburn 1967).

Zdánlivá stravitelnost sušiny (ZSS) byla stanovena gravimetricky. Celý obsah každé fermentační láhve (s výjimkou vzorku 1 ml použitého pro analýzu TMK a amoniakálního dusíku) byl přemístěn do předem zvážené 50ml centrifugační zkumavky, opláchnut a odstředěn (507 x g, 10 minut, 4 °C, dvakrát). Poté byla tekutina nad sedimentem odstraněna a usazeniny byly sušeny po dobu 48 hodin při teplotě 50 °C. Rozdíl mezi hmotností inkubovaného substrátu a suchou hmotností zbytku fermentace normalizovaného na hmotnost zbytku ve slepém vzorku byl považován za hmotnost strávené sušiny.

4.5 Statistická analýza

Data byla podrobena ANOVA pomocí PROC MIXED v SAS (SAS Enterprise Guide 6.1, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) podle vzorce:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + R_j + e_{ij}$$

Kde Y_{ij} je závisle proměnná, μ je celkový průměr, T_i je účinek ošetření ($i = 10$ hladin, 3 statiny \times 3 koncentrace + kontrola), R_j je náhodný účinek dne testu ($j = 1, 2$ a 3), and e_{ij} je reziduální chyba. Průměry ošetřených vzorků byly porovnány s kontrolními vzorky pomocí Dunnettova post-hoc testu; rozdíly mezi každým testovaným vzorkem a kontrolou byly označeny za významné na hladině významnosti $p < 0,05$.

5 Výsledky

5.1 Produkce CH₄

Všechny testované statiny prokázaly schopnost snížit alespoň jeden z parametrů produkce CH₄, tj. CH₄ na inkubovanou sušinu (ml/g IS), celkovou produkci plynu (mmol/mol CPP), zdánlivý úbytek sušiny (ml/g ZSS) nebo čistou produkci TMK (mol/mol TMK) (viz Tabulka 2). Rozsah inhibice produkce CH₄ byl závislý na typu a koncentraci statinu.

Nejvýraznější inhibice byla zaznamenána pro simvastatin. Při dvou nejvyšších koncentracích, 10 a 100 mg/l, došlo ke statisticky významnému snížení ($p < 0,05$) produkce CH₄ (ml/g IS) o 9,3 %, respektive 26,2 %, ve srovnání s kontrolou.

Atorvastatin při nejvyšší koncentraci (100 mg/l) snížil metanogenezi o 13,2 % ($p < 0,05$). Nicméně nižší koncentrace atorvastatinu (1 a 10 mg/l) a všechny koncentrace rosuvastatinu (1, 10 a 100 mg/l) neměly signifikantní vliv na produkci CH₄ vyjádřenou na gram inkubované sušiny (IS).

Relativní podíl CH₄ (mmol/mol CPP) byl statisticky významně snížen ($p < 0,05$) dvěma nejvyššími koncentracemi rosuvastatinu o necelých 8 %. Dále 10 mg/l simvastatinu snížilo relativní podíl CH₄ o necelých 7 % a nejvyšší koncentrace simvastatinu (100 mg/l) způsobila téměř 17% pokles.

Pouze nejvyšší koncentrace simvastatinu (100 mg/l) statisticky významně snížila ($p < 0,05$) produkci CH₄ na zdánlivou stravitelnost sušiny (ml/g ZSS) a na čistou produkci TMK (mol/mol TMK) ve srovnání s kontrolou.

Tabulka 2. Vliv atorvastatinu, rosuvastatinu a simvastatinu na parametry *in vitro* bachorové fermentace.

Látka	Koncentrace (mg/l)	pH	CPP (ml/g IS)	CH ₄			ZSS (g/g)	Amonný dusík (mg/100 ml)	
				(ml/g IS)	(mmol/mol CPP)	(ml/g ZSS)			(mol/mol TMK)
Kontrola									
	0	6,39	224,0	30,2	134,8	53,2	0,192	0,580	35,5
Atorvastatin									
	1	6,41	220,4	28,2	128,0	50,0	0,186	0,566	35,3
	10	6,40	226,7	29,2	129,0	52,6	0,188	0,559	36,7
	100	6,41	215,7	26,2*	121,8*	48,8	0,175	0,539	36,5
Rosuvastatin									
	1	6,40	222,3	28,5	128,1	48,6	0,192	0,591	36,5
	10	6,39	221,5	27,6	124,5*	48,2	0,185	0,579	36,8
	100	6,39	223,8	28,0	125,1*	53,3	0,187	0,532	37,2
Simvastatin									
	1	6,38	228,3	30,4	133,0	56,7	0,211	0,540	37,7
	10	6,40	218,5	27,4*	125,4*	49,4	0,183	0,561	37,4
	100	6,41	198,6*	22,3*	112,1*	41,8*	0,165*	0,536	35,5
	SEM	0,004	1,47	0,33	1,04	0,84	0,0021	0,0053	0,35
	P-hodnota	0,1034	<0,001	<0,001	<0,001	0,0085	<0,001	0,1219	0,2718

*Průměry ve sloupci s významným rozdílem ($p < 0,05$) v porovnání s kontrolou (0 mg/l).

CPP = celková produkce plynu; TMK = těkavé mastné kyseliny; SEM = střední chyba průměru; ZSS = zdánlivá stravitelnost sušiny; IS = inkubovaná sušina.

5.2 Celková produkce plynu, zdánlivá stravitelnost sušiny, pH a koncentrace amoniakálního dusíku

Celková produkce plynu byla statisticky významně snížena ($p < 0,05$) pouze simvastatinem při koncentraci 100 mg/l ve srovnání s kontrolou o 11,3 % (Tabulka 2). Přidáním statinů nebyly ovlivněny koncentrace amoniakálního dusíku, zdánlivá stravitelnost sušiny ani pH.

5.3 Koncentrace a poměry těkavých mastných kyselin

Účinky statinů na relativní zastoupení TMK jsou uvedené v Tabulce 3. Přidání simvastatinu (100 mg/l) snížilo čistou produkci TMK (TMK mmol/l) o 14,2 % ve srovnání s kontrolou. Molární podíl kyseliny octové byl také snížen simvastatinem při koncentraci 100 mg/l, konkrétně o 4,4 %. Naopak atorvastatin ani rosuvastatin statisticky významně neovlivnily ($p > 0,05$) čistou produkci TMK ani molární podíl kyseliny octové. Molární podíl kyseliny propionové byl statisticky průkazně zvýšen ($p < 0,05$) a molární podíl kyseliny máselné byl snížen ($p < 0,05$) při aplikaci nejvyšší koncentrace (100 mg/l) simvastatinu a atorvastatinu.

Molární podíly kyselin iso-máselné, valerové a iso-valerové nebyly statisticky významně ovlivněny ($p > 0,05$) doplněním statinů. Nejvyšší koncentrace (100 mg/l) simvastatinu a atorvastatinu statisticky významně snížila ($p < 0,05$) poměr kyseliny octové ke kyselině propionové.

Tabulka 3. Účinky atorvastatinu, rosuvastatinu a simvastatinu na *in vitro* metanogenezi vyjádřenou relativním zastoupením TMK.

Látka	TMK (mmol/l)	Relativní zastoupení TMK (mol/100 mol)						O:P
		Kyselina octová	Kyselina propionová	Kyselina máselná	Kyselina <i>iso</i> -máselná	Kyselina valerová	Kyselina <i>iso</i> -valerová	
Kontrola								
0	64,8	56,7	23,3	13,5	1,45	2,14	2,90	2,4
Atorvastatin								
1	62,5	57,1	23,3	13,2	1,37	2,22	2,82	2,5
10	63,8	56,6	23,3	13,3	1,61	2,27	2,87	2,4
100	61,6	55,9	24,9*	12,7*	1,33	2,27	2,87	2,2*
Rosuvastatin								
1	61,0	56,7	23,5	13,3	1,41	2,21	2,87	2,4
10	61,5	56,1	23,8	13,5	1,47	2,24	2,84	2,4
100	62,1	56,4	24,0	13,3	1,26	2,27	2,79	2,3
Simvastatin								
1	60,7	56,0	23,6	13,8	1,51	2,28	2,93	2,4
10	61,6	56,1	23,8	13,5	1,61	2,25	2,84	2,4
100	55,6*	54,2*	27,0*	12,1*	1,50	2,33	2,74	2,0*
SEM	0,56	0,15	0,14	0,09	0,043	0,102	0,028	0,02
P-hodnota	0,0012	<0,001	<0,001	<0,001	0,4431	0,1623	0,0952	<0,001

*Průměry ve sloupci s významným rozdílem ($p < 0,05$) v porovnání s kontrolou (0 mg/l).

TMK = těkavé mastné kyseliny; O:P = kyselina octová: kyselina propionová; SEM = střední chyba průměru.

6 Diskuze

Využití statinů ke snížení emisí enterického CH₄ od přežvýkavců je relativně novou strategií. Výzkum byl doposud zaměřen na dva statiny, lovastatin a mevastatin. Byly ověřovány jejich účinky na bachorovou fermentaci (Patra et al. 2017), a to jak v pokusech *in vitro* (např. Miller & Wolin 2001; Soliva et al. 2004; Busquet et al. 2005; O'Brien et al. 2014), tak *in vivo* u různých hospodářských zvířat, například u koz (Wang et al. 2016; Mohd Azlan et al. 2018; Candyrine et al. 2018), ovcí (Klevenhusen et al. 2011; Morgavi et al. 2013) a skotu (Ramírez-Restrepo et al. 2014).

Cílem předkládané práce bylo zejména stanovit: (i) potenciál čistého atorvastatinu, rosuvastatinu a simvastatinu ve třech koncentracích pro selektivní inhibici produkce CH₄ a (ii) celkový vliv těchto statinů na účinnost bachorové fermentace, zejména na produkci TMK, stravitelnost krmiva a metabolismus dusíku. V rámci experimentu byly hodnoceny tři nejpopulárnější (Lippi et al. 2019) a nejrozšířenější statiny v humánní medicíně (Schachter 2005; Wang et al. 2019; Turner & Pirmohamed 2019) z hlediska jejich vlivu na fermentaci *in vitro* se smíšenými bachorovými mikroorganismy.

Hypotézou práce bylo, že statiny sníží produkci CH₄ bez negativního vlivu na bachorovou fermentaci, tzn. bez snížení produkce TMK a bez snížení zdánlivé stravitelnosti sušiny (ZSS).

6.1 Produkce CH₄

Nejvyšší statisticky průkazný potenciál pro snížení metanogeneze (ml CH₄/g inkubované sušiny (IS)) byl zaznamenán u simvastatinu při dvou nejvyšších koncentracích. Účinnost statinů na snížení produkce CH₄ u dvou dalších statinů byla nižší, přičemž atorvastatin byl efektivnější než rosuvastatin (ml/g sušiny). Minimální koncentrace simvastatinu, která za daných podmínek pokusu statisticky významně snížila metanogenezi, byla 10 mg/l.

Výsledky pokusu naznačují, že účinky statinů na bachorovou metanogenezi a na účinnost fermentace jsou závislé na typu a koncentraci statinu. To je v souladu s jinými studiemi, ve kterých byla také prokázána závislost účinku statinů na jejich koncentraci (například Soliva et al. 2011; Klevenhusen et al. 2011; O'Brien et al. 2014; Mohd Azlan et al. 2018).

Nejrannější studie zabývající se účinky statinů na metanogenezi, Miller & Wolin (2001), uvádí, že koncentrace zkoumaného analogu, lovastatinu, vyšší nebo rovny 10 mg/l zcela inhibovaly tvorbu CH₄. Tuto studii dále použili jako inspiraci například Busquet et al. (2005), kteří mimo jiné zkoumali *in vitro* účinek čistého lovastatinu (5 mg/l). Nebyli však úspěšní v prokázání statisticky významného poklesu metanogeneze. Rozdílné výsledky autoři vysvětlili možností rozdílu v používaných *in vitro* systémech (čisté kultury bachorových bakterií vs. smíšené bachorové bakterie). Oproti tomu Soliva et al. (2011) aplikovali 30krát vyšší dávku, tedy 150 mg (čistého) lovastatinu na litr bachorové tekutiny, a došlo ke snížení produkce CH₄ o přibližně 42 %. Studie O'Brien et al. (2014) hodnotila *in vitro* účinky různých koncentrací mevastatinu (0,25–4 mg/l) a lovastatinu (0,25–8 mg/l) na parametry bachorové fermentace, přičemž nebylo docíleno statisticky průkazné změny tvorby CH₄. O'Brien et al. (2014) vysvětlují rozdílné výsledky tím, že kultivační médium používané ve studii Miller & Wolin (2001) bylo syntetické a obsahovalo bachorovou tekutinu, zatímco médium studie O'Brien et al. (2014) obsahovalo umělé sliny, bachorovou tekutinu a žito nebo travní siláž s ječmenem.

Dále uvádí, že nezaznamenání změny produkce CH₄ mohlo být také způsobeno degradací nebo inaktivací statinů biologickou nebo chemickou složkou v médiu, která nebyla přítomna v médiu připraveném ve studii Miller & Wolin (2001).

Přestože bylo prokázáno, že komerční čistý lovastatin významně snižuje metanogenezi *in vitro* např. Miller & Wolin (2001) a *in vivo* (Klevenhusen et al. 2011; Wang et al. 2016), je příliš finančně nákladné jej používat jako aditivum do krmných dávek přežvýkavců na farmách pro snížení emisí CH₄ (Faseleh Jahromi et al. 2013b; Mohd Azlan et al. 2018; Candyrine et al. 2018). Došlo tedy ke studiu levnějších přírodních zdrojů statinů. Například lovastatin je sekundární metabolit hub a může být produkován kulturami druhů *Penicillium*, *Aspergillus terreus*, *Monascus*, *Hypomyces*, *Doratomyces*, *Phoma*, *Eupenicillium*, *Gymnoascus* a *Trichoderma* a nachází se v koncentracích až 2,8 % sušiny hub ústřic (*Pleurotus ostreatus*) (Soliva et al. 2011; Klevenhusen et al. 2011; Faseleh Jahromi et al. 2013b; Gottlieb et al. 2016; Patra et al. 2017). Jeden z těchto produktů obsahující statiny, extrakt z červené kvasnicové rýže, je používán jako doplněk stravy k řízení syntézy cholesterolu u lidí (Heber et al. 1999; Liu et al. 2006), nicméně jeho konzumace je kontroverzní (Dujovne 2017).

Ve studii Faseleh Jahromi et al. (2013a) byl produkován lovastatin fermentací rýžové slámy s *A. terreus* a závěrem bylo uvedeno, že tímto způsobem lze získat dostatečné množství lovastatinu. Faseleh Jahromi et al. (2013b) uvádí, že komerční lovastatin obsahuje primárně (98 %) biologicky neaktivní laktonovou (L) formu s uzavřeným kruhem. Touto formou statinu není možné docílit inhibice HMG-CoA reduktázy, pokud není hydrolyzována karboxylesterázami na aktivní formu s otevřeným kruhem (Faseleh Jahromi et al. 2013b; Wang et al. 2016). Naopak ve fermentované rýži je obsaženo 7,3 % biologicky aktivní hydroxykyselinové neboli H-formy (produkované *Aspergillus terreus*) lovastatinu. Tato hladina je dostatečná k narušení tvorby buněčných stěn u vybraného metanogenu *Methanobrevibacter smithii* v bachoru. Nejnižší koncentrace lovastatinu v extraktu z červené kvasnicové rýže je tedy v obsahu H-formy obdobná nejvyšší koncentraci komerčního lovastatinu, která byla v experimentech mnohem efektivnější (Faseleh Jahromi et al. 2013b).

Rýžová sláma je jedním z nejhojnějších vedlejších zemědělských produktů, přičemž téměř 90 % světové roční produkce pochází z Asie. Tradiční způsob likvidace rýžové slámy po sklizni zrna je spálení, které vede ke znečištění životního prostředí (Faseleh Jahromi et al. 2013a). Pokud by tyto houby byly kultivovány na nekvalitních krmivech jako je právě rýžová sláma, mohou být použity ke snížení produkce CH₄ u přežvýkavců. Mnoho hub však produkuje mykotoxiny, zejména citrinin, kterým je třeba se vyhnout při praktickém krmení zvířat (Shi & Pan 2011; Patra et al. 2017).

Účinnost přirozeně produkovaného lovastatinu, monakolinu K, byla zkoumána *in vitro* například ve studii Morgavi et al. (2013) ve fermentačním médiu v koncentracích 5 a 20 mg/l, prostřednictvím kterých došlo ke snížení produkce CH₄ o přibližně 54 %, respektive o přibližně 45 %. Oproti experimentu v této práci se jedná o vyšší účinky statinů při jejich nižší koncentraci. Možným vysvětlením je, že ve srovnání s čistým (purifikovaným) lovastatinem má monakolin K v extraktu červené kvasnicové rýže vyšší biologickou dostupnost, což činí jeho vlastnosti snižující cholesterol účinnější (Poli et al. 2018; Xiong et al. 2019).

Lovastatin extrahovaný z fermentované rýžové slámy významně zredukoval celkovou produkci CH₄ bachorovými metanogeny o téměř 28 % po 48hodinové *in vitro* inkubaci, aniž by ovlivnil produkci těkavých mastných kyselin. To znamená, že prostřednictvím lovastatinu bylo

možné snížit produkci CH₄ bez negativního ovlivnění účinnosti mikrobiální degradace (Faseleh Jahromi et al. 2013a). Lovastatin je zároveň schopný signifikantně pozměnit morfologii *M. Smithii* tak, že dojde k abnormální tvorbě membrán, asymetrickému dělení buňky a vyšší expresi genu HMG-S-CoA reduktázy (Faseleh Jahromi et al. 2013a; Patra et al. 2017).

Dle pokusů *in vivo* lze usoudit, že skot je vůči lovastatinu méně tolerantní ve srovnání s ovci a kozami (Candyrine et al. 2018). *In vivo* studie Ramírez-Restrepo et al. (2014) zkoumala u skotu účinky fermentované červené kvasnicové rýže *Monascus purpureus*, která obsahovala přirozeně produkovaný lovastatin (monakolin K). Pouze při dávce 40 gramů fermentované rýže na den (tj. přibližně 0,92 mg monakolinu K/kg ž.h.) byl zpozorován vyšší příjem sušiny a snížení emisí CH₄. Tento účinek byl však přechodný a při dávce 100 g fermentované rýže na den nebyl zaznamenán. Jakmile byla dávka rovna nebo vyšší než 110 g fermentované rýže na den (maximální dávka činila v této studii 120 g/den; tj. cca 2,88 mg monakolinu K/kg ž. h.), byly patrně nepříznivé účinky z hlediska příjmu sušiny a fyziologie zvířat. Zkrmování fermentované rýže obsahující 2,6 mg lovastatinu/kg ž. h. po dobu pouhých čtyř dní vedlo ke sníženému příjmu krmiva a výskytu klinických projevů poruch trávicího, svalového a močového systému skotu. Tímto kolektivem autorů není doporučen další výzkum vysokých dávek statinů z důvodu jejich nepříznivých účinků na zdraví zvířete. Pouze přechodné snížení emisí CH₄ bylo pravděpodobně důsledkem přizpůsobení mikroorganismů v bachoru (Ramírez-Restrepo et al. 2014).

Pro porovnání je vhodné zmínit, že u koz bylo dosaženo snížení produkce CH₄ o přibližně 20 % při koncentraci lovastatinu 4 mg/kg ž. h. (Candyrine et al. 2018), přičemž tato přibližná koncentrace je doporučena i v dalších studiích, například Wang et al. (2016) a Mohd Azlan et al. (2018). U ovcí bylo dosaženo ve studii Morgavi et al. (2013) 30% snížení produkce CH₄ při koncentraci monakolinu K 2,26 mg/kg ž. h. Oproti tomu studie Klevenhusen et al. (2011) zkoumala účinky lovastatinu u ovcí, kdy koncentrace 1,06 mg/kg ž. h. nebyla dostatečná pro snížení metanogeneze.

V tomto experimentu bylo nejvyšší snížení produkce CH₄ zaznamenáno při nejvyšší koncentraci simvastatinu (100 mg/l). Tato koncentrace však současně statisticky významně snížila celkovou produkci plynu a čistou produkci TMK spolu s numerickým poklesem zdánlivé stravitelnosti sušiny. Tento výsledek naznačuje, že snížená produkce CH₄ byla zčásti způsobená celkovou inhibicí fermentace. Použitím rosuvastatinu došlo k mírnému snížení relativního podílu CH₄ ve fermentačním plynu. Tato redukce byla podobná při 10 a 100 mg/l. Z tohoto výsledku vyplývá, že s vyššími dávkami pravděpodobně nelze očekávat další antimetanogenní potenciál. Různá účinnost statinů by mohla souviset s rozdíly ve způsobu působení statinů.

Způsob antimetanogenního účinku může souviset s několika mechanismy. Většina studií potvrzuje mechanismus účinku statinů na základě zkoumání mikrobiální komunity, kdy statiny mají specifický a toxický účinek na metanogeny, ale nikoliv na celulolytické bakterie (Miller & Wolin 2001; Faseleh Jahromi et al. 2013a, 2013b; Mohd Azlan et al. 2018). Tento možný způsob účinku statinů spočívá v přímé inhibici biosyntézy buněčné membrány metanogenů a zastavení buněčného dělení, přičemž bakterie zůstávají nedotčeny (Miller & Wolin 2001; Bodas et al. 2012). Princip účinku spočívá v odlišném složení membrány archeí, která je složená z nasycených rozvětvených izoprenoidových podjednotek vázaných etherovou vazbou na glycerol. Oproti tomu ostatní organismy mají tuto fosfolipidovou dvojvrstvu složenou z

glycerol-3-fosfátu spojeného jako ester s mastnými kyselinami. Inhibicí HMG-CoA reduktázy prostřednictvím statinů je zabráněno tvorbě mevalonátu použitého při biosyntéze izoprenoidů buněčných stěn metanogenních Archeí (Miller & Wolin 2001; Garba et al. 2019), aniž by byly ovlivněny počty bakterií (Gottlieb et al. 2016; Candyrine et al. 2018).

Produkce CH₄ může být také selektivně inhibována snížením aktivity enzymu F420-dependentní NADP oxidoreduktázy u *Methanobrevibacter smithii*, který katalyzuje důležitý krok metanogeneze spojený s transportem elektronů (Sharma et al. 2011). Potenciálně statiny mohou také potlačovat bakterie, které produkují vodík. Snížená dostupnost vodíku pak omezí produkci CH₄, protože vodík je primárním substrátem pro metanogenezi v bachoru (Liu & Whitman 2008; Rooke et al. 2014).

6.2 Mikroorganismy

Výsledky současného experimentu naznačují, že nižší koncentrace statinů, například simvastatinu (10 mg/l), selektivně inhibovaly metanogeny, kdežto vyšší koncentrace (100 mg/l) současně potlačily bachorové bakterie. I toto zjištění je v souladu s předešle publikovanými výsledky, které uvádí, že minimální koncentrace simvastatinu pro inhibici bakterií je přibližně 26 µg/mL (26 mg/l) (Masadeh et al. 2012).

Studie Welsh et al. (2009) uvádí, že atorvastatin a rosuvastatin mají *in vitro* spíše než bakteriocidní účinek bakteriostatický. Následně byla ve studii Masadeh et al. (2012) testována možná antimikrobiální aktivita statinů (atorvastatinu, simvastatinu a rosuvastatinu) proti několika bakteriálním kmenům. Bylo zjištěno, že statiny jsou schopné vyvolat různé stupně antibakteriální aktivity, přičemž atorvastatin a simvastatin byly účinnější než rosuvastatin. Tyto účinky mohou také souviset s rozdíly v chemické struktuře mezi statiny. Navíc se statiny liší svou afinitou k lipidům, takže mohou mít různou vnitřní aktivitu (Masadeh et al. 2012). Rozdílné výsledky pravděpodobně odráží různý antibakteriální potenciál konkrétních statinů, přičemž simvastatin je jedním z neúčinnějších (Bergman et al. 2011; Masadeh et al. 2012).

Studie Miller & Wolin (2001) uvádí, že 4 mg lovastatinu na mililitr kultivačního média vedlo k 50% inhibici růstu kmene *Methanobrevibacter*, jednoho z hlavních zástupců metanogenní populace v bachoru (Janssen & Kirs 2008; Lan & Yang 2019), a koncentrace 10 mg/l zcela inhibovala růst těchto metanogenů. Dle studie Wolin & Miller (2006) lovastatin *in vitro* významně inhiboval růst a aktivitu *Methanobrevibacter* bez jakéhokoli negativního účinku na celulolytické bakterie. Soliva et al. (2011) uvádějí, že růst a metanogenní aktivita kmene *Methanobrevibacter* byla více inhibována se zvyšujícími se dávkami lovastatinu a byla možná jejich úplná inhibice. Ve studiích Morgavi et al. (2013) i Mohd Azlan et al. (2018) byl zaznamenán vliv statinů na snížení počtu metanogenů *in vivo*. Soliva et al. (2011) píše, že lovastatin (150 mg/l bachorové tekutiny) neovlivnil počty bakterií v médiu v inkubované tekutině, podobně jako bylo zjištěno v krátkodobé *in vitro* studii autorů Busquet et al. (2005), kteří použili koncentraci lovastatinu 5 mg/l.

6.3 Těkavé mastné kyseliny

Předpokladem experimentu bylo, že statiny neovlivní nebo zvýší celkovou produkci TMK. Statisticky významné snížení celkové čisté produkce TMK bylo zaznamenáno pouze při

nejvyšší koncentraci simvastatinu (100 mg/l). To naznačuje, že zmíněná koncentrace je příliš vysoká pro pozitivní ovlivnění bachorové fermentace. Oproti tomu Soliva et al. (2011) uvádí, že lovastatin (150 mg/l bachorové tekutiny) neovlivnil koncentraci těkavých mastných kyselin v inkubované tekutině, podobně jako bylo zjištěno v krátkodobé *in vitro* studii autorů Busquet et al. (2005), kteří použili koncentraci lovastatinu 5 mg/l.

V praxi by snížení celkové produkce TMK znamenalo snížení výkonnosti přežvýkavců, protože TMK jsou jejich primárním zdrojem energie (Wang et al. 2020). Je však vhodné poznamenat, že jeden z nejúspěšnějších příkladů použití metanového inhibitoru ke zlepšení výkonnosti přežvýkavců, ionofor monensin, ve studiích Callaway et al. (1997) a Shen et al. (2017) *in vitro* snížil celkovou produkci TMK.

Pouze nejvyšší koncentrace simvastatinu a atorvastatinu (100 mg/l) statisticky významně ovlivnily relativní podíl TMK. Tyto dva statiny zvýšily podíl kyseliny propionové na úkor kyselin octové a máselné, což je v souladu s jednou z hypotéz této práce. Naše výsledky jsou také v souladu s dalšími studiemi, kdy podání přírodně produkovaného lovastatinu *in vitro* (Morgavi et al. 2013) a *in vivo* (Faseleh Jahromi et al. 2013a; Mohd Azlan et al. 2018; Candyrine et al. 2018) vedlo ke zvýšení podílu propionátu. Obecně jsou však hlášené účinky lovastatinu na relativní zastoupení TMK nekonzistentní (Soliva et al. 2011; Faseleh Jahromi et al. 2013a; Ramírez-Restrepo et al. 2014).

Účinky simvastatinu a atorvastatinu na relativní zastoupení TMK prezentované v této práci lze vysvětlit zvýšeným parciálním tlakem vodíku z důvodu snížené metanogeneze. Vyšší tlak vodíku pak mohl modifikovat fermentační cestu směrem k větší produkci kyseliny propionové jakožto alternativního akceptoru vodíku (Janssen 2010; Lan & Yang 2019). Simvastatin a atorvastatin mohou také selektivně inhibovat bakterie produkující kyselinu octovou a/nebo máselnou. Tato hypotéza je podporována silnějšími účinky hydrofobních statinů, simvastatinu a atorvastatinu, na produkci a relativní zastoupení TMK ve srovnání s hydrofilním rosuvastatinem. Bergman et al. (2011) uvádí, že hydrofobní statiny by mohly narušit bakteriální membrány, což by mělo za následek bakteriální smrt.

6.4 Vliv na amoniakální dusík

Dalším předpokladem experimentu bylo snížení koncentrace amoniakálního dusíku v inkubační tekutině prostřednictvím účinku statinů. Hladiny amoniakálního dusíku zůstaly nedotčeny, což poukazuje na nízkou schopnost těchto tří testovaných statinů ovlivňovat metabolismus dusíku v bachoru. Tento výsledek byl dále podpořen nezměněným relativním podílem TMK s rozvětveným řetězcem (kyselina *iso*-máselná a *iso*-valerová), protože tyto těkavé mastné kyseliny jsou primárně produkty deaminace aminokyselin (Patra & Yu 2014).

6.5 Potenciální využití statinů na komerčních farmách a jejich omezení

Případné použití čistých statinů jako antimetanogenních doplňkových látek ve výživě přežvýkavců by bylo primárně omezeno vysokými náklady na statiny, jak naznačují uvedené výsledky s účinnými koncentracemi simvastatinu a atorvastatinu při 10 mg/l, respektive 100 mg/l. Extrapolace výsledků *in vitro* na podmínky *in vivo* však může být nereprezentativní a někdy kontroverzní (Morgavi et al. 2013).

Co se týče reziduí ve tkáních zvířat, stopy po lovastatinu byly ve studii Candyrine et al. (2018) během analýzy detekovány v tkáních koz krmených lovastatinem (6 mg/kg ž. h.) po dobu 12 týdnů v množstvích mezi 0,01 a 0,03 µg/g, které jsou velmi nízké. Za předpokladu, že by někdo snědl 200 g masa obsahujícího výše uvedený zbytek lovastatinu, konzumoval by pouze 6 mikrogramů statinu. To je zhruba 1600krát méně než nejnižší denní dávka (10 mg/den) doporučená k léčbě hypercholesterolemie u lidí (Rubinstein & Lurie 1991; Candyrine et al. 2018).

Vzhledem k potenciálu statinů snížit cholesterol a jejich antioxidační aktivitě (Ting et al. 2016; Parihar et al. 2019) může zkrmování fermentované rýžové slámy potenciálně napomoci produkci vysoce kvalitních živočišných produktů s nižším obsahem cholesterolu (Faseleh Jahromi et al. 2013a).

Dlouhodobá konzumace statinů k léčbě hyperlipidémie může vést k mytoxicitě kosterního svalstva u lidí. U hospodářských zvířat nebyly hlášeny žádné informace o mytoxicitě v důsledku dlouhodobé spotřeby statinů (Candyrine et al. 2018), vyjma již zmíněné studie Ramírez-Restrepo et al. (2014), kdy doplněk lovastatinu do 2,6 mg/kg tělesné hmotnosti u skotu vykazoval nepříznivé účinky na trávení a způsoboval některé fyziologické poruchy. Předávkování této sloučeniny v živočišné výrobě by tak mohlo nepříznivě ovlivnit zdraví a obecně welfare zvířat. Vedlejší účinky statinů na kosterní svalstvo jsou závislé na dávce, proto je třeba stanovit bezpečnou dávku tohoto aditiva pro dané živočišné druhy (Candyrine et al. 2018). Studie Soliva et al. (2011), Klevenhusen et al. (2011) a Candyrine et al. (2018) uvádí, že lovastatin nevykazoval žádný specifický vliv na trávení v bacheru a využití živin a energie s tou výjimkou, že lovastatin může mít ve vyšších dávkách (6 mg lovastatinu/kg ž. h. dle Candyrine et al. (2018)) negativní vliv na chutnost krmiva.

Fakt, že vliv lovastatinu na emise CH₄ u koz byl ve studii Candyrine et al. (2018) konzistentní po dobu 12 týdnů, naznačuje jeho potenciální dlouhodobé účinky. To je podstatné vzhledem k tomu, že většina studií je krátkodobá (v rozmezí od několika dnů do přibližně čtyř týdnů) a není plně zohledněna schopnost bacherové mikrobioty přizpůsobovat se účinku lovastatinu v průběhu času, ani možné negativní účinky dlouhodobé konzumace lovastatinu na zdraví a dobré životní podmínky zvířat (Candyrine et al. 2018).

Je tedy zapotřebí dalšího výzkumu pro stanovení účinných *in vivo* koncentrací těchto hydrofobních statinů.

7 Závěr

Tato práce prokázala, že statiny mohou selektivně snižovat produkci CH_4 *in vitro*, čímž byla potvrzena hlavní hypotéza. Účinky statinů byly rozdílné v závislosti na typu statinu a jejich koncentraci. Simvastatin a atorvastatin při koncentracích 10 mg/l, respektive 100 mg/l, snížily metanogenezi bez negativních účinků na fermentaci a stravitelnost krmiva, což je opět v souladu s předpokladem této práce. Tyto hydrofobní statiny tak mohou pozitivně ovlivnit bachorovou fermentaci. V budoucím výzkumu je nutné stanovit efektivní dávky *in vivo*, které nebudou mít nežádoucí účinky.

8 Literatura

- Aboagye IA, Beauchemin KA. 2019. Potential of Molecular Weight and Structure of Tannins to Reduce Methane Emissions from Ruminants: A Review. *Animals* **9**:856.
- Anderson RC, Carstens GE, Miller RK, Callaway TR, Schultz CL, Edrington TS, Harvey RB, Nisbet DJ. 2006. Effect of oral nitroethane and 2-nitropropanol administration on methane-producing activity and volatile fatty acid production in the ovine rumen. *Bioresource Technology* **97**:2421–2426.
- Anderson RC, Ripley LH, Bowman JG, Callaway TR, Genovese KJ, Beier RC, Harvey RB, Nisbet DJ. 2016. Ruminal fermentation of anti-methanogenic nitrate-and nitro-containing forages in vitro. *Frontiers in veterinary science* **3**:62.
- Arceo-Castillo JI, Montoya-Flores MD, Molina-Botero IC, Piñeiro-Vázquez AT, Aguilar-Pérez CF, Ayala-Burgos AJ, Solorio-Sánchez FJ, Castelán-Ortega OA, Quintana-Owen P, Ku-Vera JC. 2019. Effect of the volume of methane released into respiration chambers on full system methane recovery. *Animal Feed Science and Technology* **249**:54–61.
- Aschenbach JR, Zebeli Q, Patra AK, Greco G, Amasheh S, Penner GB. 2019. Symposium review: The importance of the ruminal epithelial barrier for a healthy and productive cow. *Journal of Dairy Science* **102**:1866–1882.
- Ashrafizadeh M, Ahmadi Z. 2019. Effects of statins on gut microbiota (microbiome). *Reviews in clinical medicine* **6**:55–59.
- Audsley E, Wilkinson M. 2014. What is the potential for reducing national greenhouse gas emissions from crop and livestock production systems? *Journal of Cleaner Production* **73**:263–268.
- Baldwin RL, Connor EE. 2017. Rumen Function and Development. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* **33**:427–439.
- Beauchemin KA, McAllister TA, McGinn SM. 2009. Dietary mitigation of enteric methane from cattle. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* **4**:1–18.
- Beauchemin KA, Kreuzer M, O'Mara F, McAllister TA. 2008. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **48**:21.
- Bekuma A, Tadesse T, Galmessa U. 2019. Review on Negative Impacts of Livestock Production on Climate Change and Its Mitigation Strategies: A Global Issue:11.
- Bergman P, Linde C, Pütsep K, Pohanka A, Normark S, Henriques-Normark B, Andersson J, Björkhem-Bergman L. 2011. Studies on the antibacterial effects of statins--in vitro and in vivo. *PloS one* **6**:e24394–e24394.
- Bodas R, Prieto N, García-González R, Andrés S, Giráldez FJ, López S. 2012. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Animal Feed Science and Technology* **176**:78–93.

- Breider IS, Wall E, Garnsworthy PC. 2019. Short communication: Heritability of methane production and genetic correlations with milk yield and body weight in Holstein-Friesian dairy cows. *Journal of Dairy Science* **102**:7277–7281.
- Broucek J. 2018. Options to methane production abatement in ruminants: A review. *J. Anim. Plant Sci* **28**:348–364.
- Busquet M, Calsamiglia S, Ferret A, Carro MD, Kamel C. 2005. Effect of Garlic Oil and Four of its Compounds on Rumen Microbial Fermentation. *Journal of Dairy Science* **88**:4393–4404.
- Callaway TR, Carneiro De Melo AMS, Russell JB. 1997. The Effect of Nisin and Monensin on Ruminal Fermentations In Vitro. *Current Microbiology* **35**:90–96.
- Candyrine SCL et al. 2018. Effects of naturally-produced lovastatin on feed digestibility, rumen fermentation, microbiota and methane emissions in goats over a 12-week treatment period. *PLOS ONE* **13**:e0199840.
- Caro D, Davis SJ, Bastianoni S, Caldeira K. 2014. Global and regional trends in greenhouse gas emissions from livestock. *Climatic Change* **126**:203–216.
- Cedillo J, Vázquez-Armijo JF, González-Reyna A, Salem AZM, Kholif AE, Hernández-Meléndez J, Martínez-González JC, Jiménez RM de O, Rivero N, López D. 2014. Effects of Different Doses of *Salix Babylonica* Extract on Growth Performance and Diet in Vitro Gas Production in Pelibuey Growing Lambs. *Italian Journal of Animal Science* **13**:3165.
- Chatzizisis YS, Koskinas KC, Misirli G, Vaklavas C, Hatzitolios A, Giannoglou GD. 2010. Risk Factors and Drug Interactions Predisposing to Statin-Induced Myopathy: Implications for Risk Assessment, Prevention and Treatment. *Drug Safety* **33**:171–187.
- Cieslak A, Szumacher-Strabel M, Stochmal A, Oleszek W. 2013. Plant components with specific activities against rumen methanogens. *animal* **7**:253–265.
- Cottle DJ, Nolan JV, Wiedemann SG. 2011. Ruminant enteric methane mitigation: a review. *Animal Production Science* **51**:491.
- Czerkawski JW, Blaxter KL, Wainman FW. 1966. The metabolism of oleic, linoleic and linolenic acids by sheep with reference to their effects on methane production. *British Journal of Nutrition* **20**:349–362.
- De Rosa M, Gambacorta A, Gliozzi A. 1986. Structure, biosynthesis, and physicochemical properties of archaeobacterial lipids. *Microbiological reviews* **50**:70.
- de Souza Filho W, Nunes PA de A, Barro RS, Kunrath TR, de Almeida GM, Genro TCM, Bayer C, de Faccio Carvalho PC. 2019. Mitigation of enteric methane emissions through pasture management in integrated crop-livestock systems: Trade-offs between animal performance and environmental impacts. *Journal of Cleaner Production* **213**:968–975.
- Diao Q, Zhang R, Fu T. 2019. Review of Strategies to Promote Rumen Development in Calves. *Animals* **9**:490.

- Dohme F, Machmüller A, Wasserfallen A, Kreuzer M. 2001. Ruminal methanogenesis as influenced by individual fatty acids supplemented to complete ruminant diets. *Letters in Applied Microbiology* **32**:47–51.
- Ducharme NG. 1990. Surgery of the Bovine Forestomach Compartments. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* **6**:371–397.
- Dujovne CA. 2017. Red Yeast Rice Preparations: Are They Suitable Substitutions for Statins? *The American Journal of Medicine* **130**:1148–1150.
- Eckard RJ, Grainger C, de Klein CAM. 2010. Options for the abatement of methane and nitrous oxide from ruminant production: A review. *Livestock Science* **130**:47–56.
- Elghandour MM, Khusro A, Adegbeye MJ, Tan Z, Abu Hafsa S, Greiner R, Ugbogu E, Anele UY, Salem A. 2020. Dynamic role of single-celled fungi in ruminal microbial ecology and activities. *Journal of Applied Microbiology* **128**:950–965.
- Elghandour MMY, Salem AZM, Castañeda JSM, Camacho LM, Kholif AE, Chagoyán JCV. 2015. Direct-fed microbes: A tool for improving the utilization of low quality roughages in ruminants. *Journal of Integrative Agriculture* **14**:526–533.
- Ellis JL, Dijkstra J, Kebreab E, Bannink A, Odongo NE, McBRIDE BW, France J. 2008. Aspects of rumen microbiology central to mechanistic modelling of methane production in cattle. *The Journal of Agricultural Science* **146**:213–233.
- Ersoy E, Ugurlu A. 2020. The potential of Turkey’s province-based livestock sector to mitigate GHG emissions through biogas production. *Journal of Environmental Management* **255**:109858.
- Faniyi TO, Adegbeye MJ, Elghandour MMY, Pilego AB, Salem AZM, Olaniyi TA, Adediran O, Adewumi MK. 2019. Role of diverse fermentative factors towards microbial community shift in ruminants. *Journal of Applied Microbiology* **127**:2–11.
- Faseleh Jahromi M, Liang JB, Ho YW, Mohamad R, Goh YM, Shokryazdan P, Chin J. 2013a. Lovastatin in *Aspergillus terreus* : Fermented Rice Straw Extracts Interferes with Methane Production and Gene Expression in *Methanobrevibacter smithii*. *BioMed Research International* **2013**:1–10.
- Faseleh Jahromi M, Liang JB, Mohamad R, Goh YM, Shokryazdan P, Ho YW. 2013b. Lovastatin-Enriched Rice Straw Enhances Biomass Quality and Suppresses Ruminal Methanogenesis. *BioMed Research International* **2013**:1–13.
- Focant M, Froidmont E, Archambeau Q, Dang Van QC, Larondelle Y. 2019. The effect of oak tannin (*Quercus robur*) and hops (*Humulus lupulus*) on dietary nitrogen efficiency, methane emission, and milk fatty acid composition of dairy cows fed a low-protein diet including linseed. *Journal of Dairy Science* **102**:1144–1159.
- Friesen JA, Rodwell VW. 2004. The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A (HMG-CoA) reductases. *Genome Biology*:7.

- Garba S et al. 2019. Effects of naturally-produced lovastatin on carcass characteristics, muscle physico-chemical properties and lipid oxidation and cholesterol content in goats. *Meat Science* **154**:61–68.
- Gerber PJ et al. 2013. Technical options for the mitigation of direct methane and nitrous oxide emissions from livestock: a review. *animal* **7**:220–234.
- Goel G, Makkar HP. 2012. Methane mitigation from ruminants using tannins and saponins. *Tropical animal health and production* **44**:729–739.
- Gottlieb K, Wachter V, Sliman J, Pimentel M. 2016. Review article: inhibition of methanogenic archaea by statins as a targeted management strategy for constipation and related disorders. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* **43**:197–212.
- Grainger C, Beauchemin KA. 2011. Can enteric methane emissions from ruminants be lowered without lowering their production? *Animal Feed Science and Technology* **166–167**:308–320.
- Grossi G, Goglio P, Vitali A, Williams AG. 2019. Livestock and climate change: impact of livestock on climate and mitigation strategies. *Animal Frontiers* **9**:69–76.
- Guerci M, Bava L, Zucali M, Sandrucci A, Penati C, Tamburini A. 2013. Effect of farming strategies on environmental impact of intensive dairy farms in Italy. *Journal of Dairy Research* **80**:300–308.
- Guo YQ, Liu J-X, Lu Y, Zhu WY, Denman SE, McSweeney CS. 2008. Effect of tea saponin on methanogenesis, microbial community structure and expression of *mcrA* gene, in cultures of rumen micro-organisms. *Letters in Applied Microbiology* **47**:421–426.
- Hammond KJ et al. 2016. Review of current in vivo measurement techniques for quantifying enteric methane emission from ruminants. *Animal Feed Science and Technology* **219**:13–30.
- Haque MN. 2018. Dietary manipulation: a sustainable way to mitigate methane emissions from ruminants. *Journal of animal science and technology* **60**:15.
- Harfoot C. 1981. Lipid metabolism in ruminant animals. *Anatomy, physiology and microbiology of the ruminant digestive tract*. 1–19.
- Heber D, Yip I, Ashley JM, Elashoff DA, Elashoff RM, Go VLW. 1999. Cholesterol-lowering effects of a proprietary Chinese red-yeast-rice dietary supplement. *The American Journal of Clinical Nutrition* **69**:231–236.
- Henderson G, Cox F, Ganesh S, Jonker A, Young W, Abecia L, Angarita E, Aravena P, Arenas GN, Ariza C. 2015. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. *Scientific reports* **5**:14567.
- Hernández A, Kholif AE, Elghandour MMY, Camacho LM, Cipriano MM, Salem AZM, Cruz H, Ugbogu EA. 2017. Effectiveness of xylanase and *Saccharomyces cerevisiae* as feed additives on gas emissions from agricultural calf farms. *Journal of Cleaner Production* **148**:616–623.

- Hill J, McSweeney C, Wright A-DG, Bishop-Hurley G, Kalantar-Zadeh K. 2016. Measuring Methane Production from Ruminants. *Trends in Biotechnology* **34**:26–35.
- Holtshausen L, Chaves AV, Beauchemin KA, McGinn SM, McAllister TA, Odongo NE, Cheeke PR, Benchaar C. 2009. Feeding saponin-containing *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* to decrease enteric methane production in dairy cows. *Journal of Dairy Science* **92**:2809–2821.
- Hook SE, Wright A-DG, McBride BW. 2010. Methanogens: Methane Producers of the Rumen and Mitigation Strategies. *Archaea* **2010**:1–11.
- Hristov AN, Oh J, Giallongo F, Frederick TW, Harper MT, Weeks HL, Branco AF, Moate PJ, Deighton MH, Williams SRO. 2015. An inhibitor persistently decreased enteric methane emission from dairy cows with no negative effect on milk production. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**:10663–10668.
- Huhtanen P, Ramin M, Cabezas-Garcia EH. 2016. Effects of ruminal digesta retention time on methane emissions: a modelling approach. *Animal Production Science* **56**:501.
- Huws SA, Creevey CJ, Oyama LB, Mizrahi I, Denman SE, Popova M, Muñoz-Tamayo R, Forano E, Waters SM, Hess M. 2018. Addressing global ruminant agricultural challenges through understanding the rumen microbiome: past, present, and future. *Frontiers in microbiology* **9**:2161.
- Iqbal MF, Cheng Y-F, Zhu W-Y, Zeshan B. 2008. Mitigation of ruminant methane production: current strategies, constraints and future options. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **24**:2747–2755.
- Jafari S, Ebrahimi M, Goh YM, Rajion MA, Jahromi MF, Al-Jumaili WS. 2019. Manipulation of ruMen ferMentation and Methane gas production by plant secondary Metabolites (saponin, tannin and essential oil)—a review of ten-year studies. *Annals of animal science* **19**:3–29.
- Jain S, Caforio A, Fodran P, Lolkema JS, Minnaard AJ, Driessen AJ. 2014. Identification of CDP-archaeol synthase, a missing link of ether lipid biosynthesis in Archaea. *Chemistry & biology* **21**:1392–1401.
- Janssen PH. 2010. Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics. *Animal Feed Science and Technology* **160**:1–22.
- Janssen PH, Kirs M. 2008. Structure of the Archaeal Community of the Rumen. *Applied and Environmental Microbiology* **74**:3619–3625.
- Jiang Y, Qian H, Wang L, Feng J, Huang S, Hungate BA, van Kessel C, Horwath WR, Zhang X, Qin X. 2019. Limited potential of harvest index improvement to reduce methane emissions from rice paddies. *Global change biology* **25**:686–698.
- Jiménez-Ocampo R, Valencia-Salazar S, Pinzón-Díaz CE, Herrera-Torres E, Aguilar-Pérez CF, Arango J, Ku-Vera JC. 2019. The Role of Chitosan as a Possible Agent for Enteric Methane Mitigation in Ruminants. *Animals* **9**:942.

- Joch M, Kudrna V, Hakl J, Božik M, Homolka P, Illek J, Tyrolová Y, Výborná A. 2019. In vitro and in vivo potential of a blend of essential oil compounds to improve rumen fermentation and performance of dairy cows. *Animal Feed Science and Technology* **251**:176–186.
- Joch M, Mrázek J, Skřivanová E, Čermák L, Marounek M. 2018. Effects of pure plant secondary metabolites on methane production, rumen fermentation and rumen bacteria populations in vitro. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **102**:869–881.
- Johnson KA, Johnson DE. 1995. Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science* **73**:2483–2492.
- Jouany J-P, Morgavi DP. 2007. Use of ‘natural’ products as alternatives to antibiotic feed additives in ruminant production. *Animal* **1**:1443–1466.
- Kamra DN. 2005. Rumen microbial ecosystem. *Microbial Diversity* **89**:12.
- Kipling RP et al. 2016. Modeling European ruminant production systems: Facing the challenges of climate change. *Agricultural Systems* **147**:24–37.
- Kirschke S et al. 2013. Three decades of global methane sources and sinks. *Nature Geoscience* **6**:813–823.
- Klevenhusen F, Duval S, Zeitz JO, Kreuzer M, Soliva CR. 2011. Diallyl disulphide and lovastatin: effects on energy and protein utilisation in, as well as methane emission from, sheep. *Archives of Animal Nutrition* **65**:255–266.
- Knapp JR, Laur GL, Vadas PA, Weiss WP, Tricarico JM. 2014. Invited review: Enteric methane in dairy cattle production: Quantifying the opportunities and impact of reducing emissions. *Journal of Dairy Science* **97**:3231–3261.
- Krause DO, Nagaraja TG, Wright ADG, Callaway TR. 2013. Board-invited review: Rumen microbiology: Leading the way in microbial ecology^{1,2}. *Journal of Animal Science* **91**:331–341.
- Krehbiel CR. 2014. INVITED REVIEW: Applied nutrition of ruminants: Fermentation and digestive physiology¹. *The Professional Animal Scientist* **30**:129–139.
- Kumar S, Puniya AK, Puniya M, Dagar SS, Sirohi SK, Singh K, Griffith GW. 2009. Factors affecting rumen methanogens and methane mitigation strategies. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **25**:1557–1566.
- Kumari S, Hiloidhari M, Narayan Naik S, Pal Dahiya R. 2019. Methane Emission Assessment from Indian Livestock and Its Role in Climate Change Using Climate Metrics. *Climate Change and Agriculture*. IntechOpen.
- Kweku D, Bismark O, Maxwell A, Desmond K, Danso K, Oti-Mensah E, Quachie A, Adormaa B. 2018. Greenhouse Effect: Greenhouse Gases and Their Impact on Global Warming. *Journal of Scientific Research and Reports* **17**:1–9.

- Lan W, Yang C. 2019. Ruminant methane production: Associated microorganisms and the potential of applying hydrogen-utilizing bacteria for mitigation. *Science of The Total Environment* **654**:1270–1283.
- Langford FM, Weary DM, Fisher L. 2003. Antibiotic Resistance in Gut Bacteria from Dairy Calves: A Dose Response to the Level of Antibiotics Fed in Milk. *Journal of Dairy Science* **86**:3963–3966.
- Lassen J, Løvendahl P. 2016. Heritability estimates for enteric methane emissions from Holstein cattle measured using noninvasive methods. *Journal of Dairy Science* **99**:1959–1967.
- Leahy SC et al. 2010. The Genome Sequence of the Rumen Methanogen *Methanobrevibacter ruminantium* Reveals New Possibilities for Controlling Ruminant Methane Emissions. *PLoS ONE* **5**:e8926.
- Lillehoj H, Liu Y, Calsamiglia S, Fernandez-Miyakawa ME, Chi F, Cravens RL, Oh S, Gay CG. 2018. Phytochemicals as antibiotic alternatives to promote growth and enhance host health. *Veterinary research* **49**:76. BioMed Central.
- Lippi G, Mattiuzzi C, Cervellin G. 2019. Statins popularity: A global picture. *British Journal of Clinical Pharmacology* **85**:1614–1615.
- Liu H, Wang J, Wang A, Chen J. 2011. Chemical inhibitors of methanogenesis and putative applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* **89**:1333–1340.
- Liu J, Zhang J, Shi Y, Grimsgaard S, Alraek T, Fønnebø V. 2006. Chinese red yeast rice (*Monascus purpureus*) for primary hyperlipidemia: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Chinese Medicine* **1**:4.
- Liu Y, Whitman WB. 2008. Metabolic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of the Methanogenic Archaea. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1125**:171–189.
- López S, Newbold C. 2007. Measuring methane production from ruminants. *Springer Science & Business Media* 1–13.
- Lou Y, Ren L, Zhao S, Shi Y, Zhang Y, Zhu H. 2019. Effects of silicate application on CH₄ and N₂O emissions and global warming potentials in paddy soil under enhanced UV-B radiation. *Energy Science & Engineering* **7**:1784–1794.
- Lozier JW, Niehaus AJ. 2016. Surgery of the Forestomach. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* **32**:617–628.
- Martin C, Morgavi DP, Doreau M. 2010. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *animal* **4**:351–365.
- Masadeh M, Mhaidat N, Alzoubi K, Al-azzam S, Alnasser Z. 2012. Antibacterial activity of statins: a comparative study of Atorvastatin, Simvastatin, and Rosuvastatin. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* **11**:13.
- McAllister TA, Meale SJ, Valle E, Guan LL, Zhou M, Kelly WJ, Henderson G, Attwood GT, Janssen PH. 2015. RUMINANT NUTRITION SYMPOSIUM: Use of genomics and

- transcriptomics to identify strategies to lower ruminal methanogenesis^{1,2,3}. *Journal of Animal Science* **93**:1431–1449.
- McAllister TA, Newbold CJ. 2008. Redirecting rumen fermentation to reduce methanogenesis. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **48**:7.
- Mccann JC, Wickersham TA, Loor JJ. 2014. High-throughput Methods Redefine the Rumen Microbiome and Its Relationship with Nutrition and Metabolism. *Bioinformatics and Biology Insights* **8**:BBI.S15389.
- McGrath J, Duval SM, Tamassia LFM, Kindermann M, Stemmler RT, de Gouvea VN, Acedo TS, Immig I, Williams SN, Celi P. 2018. Nutritional strategies in ruminants: A lifetime approach. *Research in Veterinary Science* **116**:28–39.
- Millen DD, Arrigoni MDB, Pacheco RDL. 2016. Rumenology.
- Miller TL, Wolin MJ. 2001. Inhibition of Growth of Methane-Producing Bacteria of the Ruminant Forestomach by Hydroxymethylglutaryl~SCoA Reductase Inhibitors. *Journal of Dairy Science* **84**:1445–1448.
- Min BR, Barry TN, Attwood GT, McNabb WC. 2003. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. *Animal Feed Science and Technology* **106**:3–19.
- Mohd Azlan P, Jahromi MF, Ariff MO, Ebrahimi M, Candyrine SCL, Liang JB. 2018. *Aspergillus terreus* treated rice straw suppresses methane production and enhances feed digestibility in goats. *Tropical Animal Health and Production* **50**:565–571.
- Morgavi DP, Forano E, Martin C, Newbold CJ. 2010. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *animal* **4**:1024–1036.
- Morgavi DP, Martin C, Boudra H. 2013. Fungal secondary metabolites from *Monascus* spp. reduce rumen methane production in vitro and in vivo¹. *Journal of Animal Science* **91**:848–860.
- Morgavi DP, Martin C, Jouany J-P, Ranilla MJ. 2012. Rumen protozoa and methanogenesis: not a simple cause–effect relationship. *British Journal of Nutrition* **107**:388–397.
- Mosoni P, Martin C, Forano E, Morgavi DP. 2011. Long-term defaunation increases the abundance of cellulolytic ruminococci and methanogens but does not affect the bacterial and methanogen diversity in the rumen of sheep¹. *Journal of Animal Science* **89**:783–791.
- Moss AR, Jouany J-P, Newbold J. 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Annales de Zootechnie* **49**:231–253.
- Mück AO, Seeger H, Wallwiener D. 2004. Class-specific pro-apoptotic effect of statins on human vascular endothelial cells. *Zeitschrift für Kardiologie* **93**:398–402.
- Nawab A, Li G, An L, Nawab Y, Zhao Y, Xiao M, Tang S, Sun C. 2020. The potential effect of dietary tannins on enteric methane emission and ruminant production; as an alternative to antibiotic feed additives—a review. *Annals of Animal Science* **1**.

- Neumann RB, Moorberg CJ, Lundquist JD, Turner JC, Waldrop MP, McFarland JW, Euskirchen ES, Edgar CW, Turetsky MR. 2019. Warming Effects of Spring Rainfall Increase Methane Emissions From Thawing Permafrost. *Geophysical Research Letters* **46**:1393–1401.
- Newbold CJ, de la Fuente G, Belanche A, Ramos-Morales E, McEwan NR. 2015. The Role of Ciliate Protozoa in the Rumen. *Frontiers in Microbiology* **6**:1313.
- O'Brien M, Navarro-Villa A, Purcell PJ, Boland TM, O'Kiely P. 2014. Reducing in vitro rumen methanogenesis for two contrasting diets using a series of inclusion rates of different additives. *Animal Production Science* **54**:141.
- O'Mara FP. 2011. The significance of livestock as a contributor to global greenhouse gas emissions today and in the near future. *Animal Feed Science and Technology* **166–167**:7–15.
- Ørskov ER, Ojwang I, Reid GW. 1988. A study on consistency of differences between cows in rumen outflow rate of fibrous particles and other substrates and consequences for digestibility and intake of roughages. *Animal Science* **47**:45–51.
- Parihar SP, Guler R, Brombacher F. 2019. Statins: a viable candidate for host-directed therapy against infectious diseases. *Nature Reviews Immunology* **19**:104–117.
- Patra A, Park T, Kim M, Yu Z. 2017. Rumen methanogens and mitigation of methane emission by anti-methanogenic compounds and substances. *Journal of Animal Science and Biotechnology* **8**:13.
- Patra AK. 2012. Enteric methane mitigation technologies for ruminant livestock: a synthesis of current research and future directions. *Environmental Monitoring and Assessment* **184**:1929–1952.
- Patra AK. 2013. The effect of dietary fats on methane emissions, and its other effects on digestibility, rumen fermentation and lactation performance in cattle: A meta-analysis. *Livestock Science* **155**:244–254.
- Patra AK, Saxena J. 2010. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry* **71**:1198–1222.
- Patra AK, Yu Z. 2012. Effects of Essential Oils on Methane Production and Fermentation by, and Abundance and Diversity of, Rumen Microbial Populations. *Applied and Environmental Microbiology* **78**:4271–4280.
- Patra AK, Yu Z. 2014. Effects of vanillin, quillaja saponin, and essential oils on in vitro fermentation and protein-degrading microorganisms of the rumen. *Applied Microbiology and Biotechnology* **98**:897–905.
- Pen B, Sar C, Mwenya B, Kuwaki K, Morikawa R, Takahashi J. 2006. Effects of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* extracts on in vitro ruminal fermentation and methane emission. *Animal Feed Science and Technology* **129**:175–186.

- Pickering NK, Chagunda MGG, Banos G, Mrode R, McEwan JC, Wall E. 2015. Genetic parameters for predicted methane production and laser methane detector measurements¹. *Journal of Animal Science* **93**:11–20.
- Pinares-Patiño CS et al. 2013. Heritability estimates of methane emissions from sheep. *animal* **7**:316–321.
- Poli A et al. 2018. Nutraceuticals and functional foods for the control of plasma cholesterol levels. An intersociety position paper. *Pharmacological Research* **134**:51–60.
- Pszczola M, Rzewuska K, Mucha S, Strabel T. 2017. Heritability of methane emissions from dairy cows over a lactation measured on commercial farms¹. *Journal of Animal Science* **95**:4813–4819.
- Puniya AK, Singh R, Kamra DN, editors. 2015. *Rumen microbiology: from evolution to revolution*. Springer, New Delhi Heidelberg und andere.
- Ramírez-Restrepo CA, O’Neill CJ, López-Villalobos N, Padmanabha J, McSweeney C. 2014. Tropical cattle methane emissions: the role of natural statins supplementation. *Animal Production Science* **54**:1294.
- Ricci P, Chagunda MGG, Ramachandran K, Houdijk JGM, Duthie CA, Hyslop J, Roehe R, Waterhouse A. 2014. Evaluation of the laser methane detector to estimate methane emissions from ewes and steers. *Journal of animal science* **92**:5239–5250.
- Rira M, Chentli A, Boufenera S, Bousseboua H. 2015. Effects of Plants Containing Secondary Metabolites on Ruminal Methanogenesis of Sheep in vitro. *Energy Procedia* **74**:15–24.
- Roldan MB, Cousins G, Fraser K, Hancock KR, Collette V, Demmer J, Woodfield DR, Caradus JR, Jones C, Voisey CR. 2019. Elevation of Condensed Tannins in the Leaves of Ta-MYB14-1 White Clover (*Trifolium repens* L.) Outcrossed with High Anthocyanin Lines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **68**:2927–2939.
- Rooke JA, Wallace RJ, Duthie C-A, McKain N, de Souza SM, Hyslop JJ, Ross DW, Waterhouse T, Roehe R. 2014. Hydrogen and methane emissions from beef cattle and their rumen microbial community vary with diet, time after feeding and genotype. *British Journal of Nutrition* **112**:398–407.
- Rubinstein A, Lurie Y. 1991. Dose of Lovastatin in Patients with Initial Total Cholesterol Levels 200 to 240 mg/dl (5.18 to 6.21 mmol/liter) **68**:4.
- Salami SA, Luciano G, O’Grady MN, Biondi L, Newbold CJ, Kerry JP, Priolo A. 2019. Sustainability of feeding plant by-products: A review of the implications for ruminant meat production. *Animal Feed Science and Technology* **251**:37–55.
- Satyanagalakshmi K, Sridhar GT, Sirohi SK. 2015. An overview of the role of rumen methanogens in methane emission and its reduction strategies. *African Journal of Biotechnology* **14**:1427–1438.
- Schachter M. 2005. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fundamental and Clinical Pharmacology* **19**:117–125.

- Sharma A, Chaudhary PP, Sirohi SK, Saxena J. 2011. Structure modeling and inhibitor prediction of NADP oxidoreductase enzyme from *Methanobrevibacter smithii*. *Bioinformation* **6**:15.
- Shen J, Liu Z, Yu Z, Zhu W. 2017. Monensin and nisin affect rumen fermentation and microbiota differently in vitro. *Frontiers in Microbiology* **8**:1111.
- Shi W et al. 2014. Methane yield phenotypes linked to differential gene expression in the sheep rumen microbiome. *Genome Research* **24**:1517–1525.
- Shi Y-C, Pan T-M. 2011. Beneficial effects of *Monascus purpureus* NTU 568-fermented products: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology* **90**:1207–1217.
- Sirtori CR. 2014. The pharmacology of statins. *Pharmacological Research* **88**:3–11.
- Slade EM, Riutta T, Roslin T, Tuomisto HL. 2016. The role of dung beetles in reducing greenhouse gas emissions from cattle farming. *Scientific reports* **6**:1–9.
- Soliva CR, Amelchanka SL, Duval SM, Kreuzer M. 2011. Ruminal methane inhibition potential of various pure compounds in comparison with garlic oil as determined with a rumen simulation technique (Rusitec). *British Journal of Nutrition* **106**:114–122.
- Soliva CR, Meile L, Cieślak A, Kreuzer M, Machmüller A. 2004. Rumen simulation technique study on the interactions of dietary lauric and myristic acid supplementation in suppressing ruminal methanogenesis. *British Journal of Nutrition* **92**:689–700.
- Sorokin DY, Makarova KS, Abbas B, Ferrer M, Golyshin PN, Galinski EA, Ciordia S, Mena MC, Merkel AY, Wolf YI. 2017. Discovery of extremely halophilic, methyl-reducing euryarchaea provides insights into the evolutionary origin of methanogenesis. *Nature microbiology* **2**:17081.
- Tapia-Pérez JH, Kirches E, Mawrin C, Firsching R, Schneider T. 2011. Cytotoxic effect of different statins and thiazolidinediones on malignant glioma cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **67**:1193–1201.
- Tapio I, Snelling TJ, Strozzi F, Wallace RJ. 2017. The ruminal microbiome associated with methane emissions from ruminant livestock. *Journal of Animal Science and Biotechnology* **8**:7.
- Tavendale MH, Meagher LP, Pacheco D, Walker N, Attwood GT, Sivakumaran S. 2005. Methane production from in vitro rumen incubations with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa*, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. *Animal Feed Science and Technology* **123–124**:403–419.
- Thauer RK, Kaster A-K, Seedorf H, Buckel W, Hedderich R. 2008. Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. *Nature Reviews Microbiology* **6**:579–591.
- Theodorou MK, Williams BA, Dhanoa MS, McAllan AB, France J. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal feed science and technology* **48**:185–197.

- Tilman D, Clark M. 2014. Global diets link environmental sustainability and human health. *Nature* **515**:518–522.
- Ting M, Whitaker EJ, Albandar JM. 2016. Systematic review of the in vitro effects of statins on oral and perioral microorganisms. *European Journal of Oral Sciences* **124**:4–10.
- Turner RM, Pirmohamed M. 2019. Statin-Related Myotoxicity: A Comprehensive Review of Pharmacokinetic, Pharmacogenomic and Muscle Components. *Journal of Clinical Medicine* **9**:22.
- Ugbogu EA, Elghandour MMY, Ikpeazu VO, Buendía GR, Molina OM, Arunsi UO, Emmanuel O, Salem AZM. 2019. The potential impacts of dietary plant natural products on the sustainable mitigation of methane emission from livestock farming. *Journal of Cleaner Production* **213**:915–925.
- van Gastelen S, Dijkstra J, Bannink A. 2019. Are dietary strategies to mitigate enteric methane emission equally effective across dairy cattle, beef cattle, and sheep? *Journal of Dairy Science* **102**:6109–6130.
- van Lingen HJ et al. 2019. Prediction of enteric methane production, yield and intensity of beef cattle using an intercontinental database. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **283**:106575.
- Van Wesemael D, Vandaele L, Ampe B, Cattrysse H, Duval S, Kindermann M, Fievez V, De Campeneere S, Peiren N. 2019. Reducing enteric methane emissions from dairy cattle: Two ways to supplement 3-nitrooxypropanol. *Journal of dairy science* **102**:1780–1787.
- Vuorio A, Kuoppala J, Kovanen PT, Humphries SE, Tonstad S, Wiegman A, Drogari E, Ramaswami U. 2011. Statins for children with familial hypercholesterolemia. *Evidence-based Child Health: A Cochrane Review Journal* **6**:1086–1129.
- Wallace RJ et al. 2019. A heritable subset of the core rumen microbiome dictates dairy cow productivity and emissions. *Science Advances* **5**:eaav8391.
- Wang LZ, Zhou ML, Wang JW, Wu D, Yan T. 2016. The Effect of Dietary Replacement of Ordinary Rice with Red Yeast Rice on Nutrient Utilization, Enteric Methane Emission and Rumen Archaeal Diversity in Goats. *PLOS ONE* **11**:e0160198.
- Wang Y, Nichol MB, Yan BP, Wu J, Tomlinson B, Lee VW. 2019. Descriptive analysis of real-world medication use pattern of statins and antiplatelet agents among patients with acute coronary syndrome in Hong Kong and the USA. *BMJ Open* **9**:e024937.
- Wang, Zhang, Li, Zhang. 2020. Effects of High Forage/Concentrate Diet on Volatile Fatty Acid Production and the Microorganisms Involved in VFA Production in Cow Rumen. *Animals* **10**:223.
- Weatherburn M. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical chemistry* **39**:971–974.
- Weimer PJ, Stevenson DM, Mantovani HC, Man SLC. 2010. Host specificity of the ruminal bacterial community in the dairy cow following near-total exchange of ruminal contents. *Journal of Dairy Science* **93**:5902–5912.

- Welsh A-M, Kruger P, Faoagali J. 2009. Antimicrobial action of atorvastatin and rosuvastatin. *Pathology* **41**:689–691.
- Wiedemann SG, McGahan EJ, Murphy CM. 2017. Resource use and environmental impacts from Australian chicken meat production. *Journal of Cleaner Production* **140**:675–684.
- Williams YJ, Popovski S, Rea SM, Skillman LC, Toovey AF, Northwood KS, Wright A-DG. 2009. A Vaccine against Rumen Methanogens Can Alter the Composition of Archaeal Populations. *Applied and Environmental Microbiology* **75**:1860–1866.
- Wolin MJ, Miller TL. 2006. Control of rumen methanogenesis by inhibiting the growth and activity of methanogens with hydroxymethylglutaryl-SCoA inhibitors. *International Congress Series* **1293**:131–137.
- Xiong Z, Cao X, Wen Q, Chen Z, Cheng Z, Huang X, Zhang Y, Long C, Zhang Y, Huang Z. 2019. An overview of the bioactivity of monacolin K / lovastatin. *Food and Chemical Toxicology* **131**:110585.
- Zhang DF, Yang HJ. 2011. In vitro ruminal methanogenesis of a hay-rich substrate in response to different combination supplements of nitrocompounds; pyromellitic diimide and 2-bromoethanesulphonate. *Animal Feed Science and Technology* **163**:20–32.