

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Vliv účinných látek silic na bachorovou produkci metanu  
in vitro**

**Diplomová práce**

**Bc. Kristýna Cupa Štěpánková  
Chov hospodářských zvířat**

**Ing. Miroslav Joch, Ph.D.**



## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci „Vliv účinných látek silic na bachorovou produkci metanu *in vitro*“ 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 neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 15. 4. 2025

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Miroslavu Jochovi, Ph.D., za vedení diplomové práce, cenné rady a nespočet vyměněných e-mailů. Velké díky patří všem mým přátelům, kteří se zájmem poslouchali o silicích a bachorovém mikrobiomu.

# Vliv účinných látek silic na bachorovou produkci metanu *in vitro*

## Souhrn

Bachorová fermentace, která umožňuje přežvýkavcům trávit na živiny málo bohatá vláknitá krmiva a vytvářet z nich kvalitní produkty jako maso a mléko, produkuje metan, významný skleníkový plyn, jehož tvorba snižuje energetickou účinnost krmiv až o 12 %. Vědci hledají nutriční strategie ovlivňující metanogenezi a po zákazu používání antibiotik EU se stále více zaměřují na přírodní látky, jako jsou silice a jejich účinné látky. V této studii byly hodnoceny účinky pěti účinných látek silic (isobornyl acetate, carene, citronellol, caryophyllene, benzylidene acetone) v koncentraci 250 mg/l a 500 mg/l na celkovou produkci plynů, metanu, stravitelnost sušiny, pH, dusíku, celkové produkce těkavých mastných kyselin a poměru acetátu ku propionátu.

Všechny účinné látky snížily celkovou produkci plynu ( $P < 0,05$ ), metanu ( $P < 0,05$ ), ale i stravitelnost sušiny (až na citronellol 250 mg/l a benzylidenacetone 500 mg/l;  $P < 0,001$ ). Všechny látky zvýšily pH (pouze caryophyllene  $P < 0,001$ ). Všechny látky kromě isobornyl acetate 250 mg/l ( $P < 0,001$ ) snížily množství amoniakálního dusíku (kromě citronellol 250 mg/l a caryophyllene 250 mg/l;  $P < 0,05$ ).

Celková produkce těkavých mastných kyselin byla potlačena všemi testovanými látkami (pouze isobornyl acetate 250 mg/l a caryophyllene 250 mg/l  $P < 0,001$ ), isobornyl acetate 250 mg/l neovlivnil poměr acetátu:propionátu, citronellol v obou koncentracích zvýšil poměr k prospěchu acetátu (citronellol 250 mg/l;  $P < 0,05$ ), ostatní látky poměr snížily (isobornyl acetate 500 mg/l, caryophyllene 500 mg/l a benzylidenacetone 500 mg/l;  $P < 0,05$ ).

Benzylidenacetone, carene a isobornyl acetate (všechny v koncentraci 500 mg/l) přinesly nejlepší výsledky v poměru snížení metanogeneze vůči poklesu tvorby celkových těkavých mastných kyselin. Účinné látky silic prokázaly potenciál být praktickým způsobem k úpravě bachorové fermentace bez negativních dopadů na produkci. Tento potenciál je nutné ověřit pokusy *in vivo*.

**Klíčová slova:** bachor, metan, metanogeneze, přežvýkavci, silice

# Effect of essential oil active compounds on rumen methane production *in vitro*

## Summary

Rumen fermentation, which allows ruminants to digest nutrient-poor, fibrous feed and produce high-quality products such as meat and milk, produces methane. A major greenhouse gas whose production reduces the energy efficiency of feeds by up to 12%. Scientists are looking for nutritional strategies to influence methanogenesis and, following the EU antibiotic ban, are increasingly focusing on natural substances such as essential oils and their active ingredients. In this study, the effects of five active ingredients of essential oils (isobornyl acetate, carene, citronellol, caryophyllene, benzylidene acetone) at concentrations of 250 mg/l and 500 mg/l on total gas production, methane, dry matter digestibility, pH, nitrogen, total volatile fatty acid production and acetate to propionate ratio were evaluated. All active ingredients increased total gas production ( $P < 0.05$ ), methane ( $P < 0.05$ ), but also dry matter digestibility (except for citronellol 250 mg/l and benzylidene acetone 500 mg/l;  $P < 0.001$ ). All ingredients increased pH (only caryophyllene  $P < 0.001$ ). All substances except isobornyl acetate 250 mg/l ( $P < 0.001$ ) reduced ammonia nitrogen (except citronellol 250 mg/l and caryophyllene 250 mg/l;  $P < 0.05$ ).

Total volatile fatty acid production was suppressed by all tested substances (only isobornyl acetate 250 mg/l and caryophyllene 250 mg/l  $P < 0.001$ ), isobornyl acetate 250 mg/l did not affect the acetate:propionate ratio, citronellol at both concentrations increased the acetate to acetate ratio (citronellol 250 mg/l;  $P < 0.05$ ), the other substances decreased the ratio (isobornyl acetate 500 mg/l, caryophyllene 500 mg/l and benzylideneacetone 500 mg/l;  $P < 0.05$ ).

Benzylideneacetone, carene and isobornyl acetate (all at 500 mg/l) produced the best results in the ratio of reduction in methanogenesis to decrease in total volatile fatty acid production. Essential oil active ingredients have shown the potential to be a practical way to modify rumen fermentation without negative impacts on production. This potential needs to be verified by *in vivo* experiments.

**Keywords:** essential oil, methane, methanogenesis, rumen, ruminants

# Obsah

1	Úvod.....	9
2	Vědecká hypotéza a cíle práce .....	10
3	Literární rešerše .....	11
3.1	Unikátnost trávicí soustavy přežvýkavců .....	11
3.2	Bachor.....	13
3.2.1	Bachorový ekosystém .....	13
3.2.2	Bachorová fermentace.....	17
3.2.3	Metanogeneze .....	19
3.3	Cesty ke snížení metanogeneze.....	21
3.4	Silice.....	23
3.4.1	Chemické vlastnosti silic .....	24
3.4.1.1	Rozdělení silic.....	24
3.4.2	Vlastnosti silic.....	25
3.4.2.1	Vliv na metanogenezi.....	26
3.4.2.2	Další výhody silic v krmivech.....	28
3.4.2.3	Rizika využití silic .....	29
4	Metodika .....	30
4.1	Design experimentu.....	30
4.2	Zvířata, krmivo a substráty .....	30
4.3	In vitro inkubace.....	30
4.4	Odběr vzorků a chemická analýza .....	31
4.5	Statistická analýza .....	31
5	Výsledky .....	32
5.1	Tabulka 1.....	33
5.2	Tabulka 2.....	34
5.3	Graf 1 .....	35
6	Diskuze .....	I
6.1	Isobornyl acetate .....	I
6.2	3-carene .....	II
6.3	Citronellol .....	IV
6.4	$\beta$ -caryophyllene.....	VI
6.5	Benzylideneacetone.....	VII
7	Závěr .....	IX
8	Literatura.....	X



# 1 Úvod

Bachorová fermentace, díky které jsou přežvýkavci schopni z rostlinných polysacharidů nestravitelných pro člověka vytvořit kvalitní bílkovinné produkty – maso a mléko – uvolňuje jako vedlejší produkt  $H_2$ . Vodík je následně spotřebováván bachorovými archaea za vzniku metanu. Tato látka je významným skleníkovým plynem, který negativně ovlivňuje životní prostředí, ale zároveň jeho tvorba spotřebovává až 12 % energie z krmiva. S ohledem na rostoucí světovou populaci a tím zvyšující se poptávku po potravinách je snaha snížit vliv přežvýkavců na životní prostředí a zvýšit jejich produkci (Punya et al. 2015, Bruns 2023, Cañete 2024). Řešení vědci hledají v nutričních strategiích, které by měly vliv na procesy mikrobiální fermentace s minimálním dopadem na tvorbu těkavých mastných kyselin. Ty ve svých ionizovaných formách pokrývají až 80 % energetické potřeby hostitele (Liu et al. 2020). S ohledem na zákaz Evropské unie na používání antibiotik (Evropský Parlament a rada 2003) a stále silnější povědomí a zájem konzumentů o složení a původ potravin se přírodní látky nabízejí jako atraktivní řešení. Silice jsou od středověku používány pro baktericidní, virucidní, fungicidní, antiparazitické, insekticidní účinky (Bakkali et al. 2007), a proto se jejich využitím pro úpravu bachorového mikrobiomu zabývají vědci již desítky let (McAllister et al. 2008). Jsou to přírodní látky, což s sebou nese velké rozdíly v kvalitativním i kvantitativním složení, a to v důsledku jak vnitřních tak vnějších faktorů (Bechaar & Greathead 2011, Zuzarte & Salgueiro 2015). Zároveň každá silice může být složena z 20–60 různých chemických látek, které mohou mít aditivní, antagonistické nebo synergické účinky (Hüsnü et al. 2007, Calsamiglia et al. 2007), proto se tato studie zaměřuje na dopad konkrétních účinných látek. Ty byly vybrány pro jejich snadnou dostupnost a zároveň nízkou cenu – řešení metanogeneze musí být pro masové zavedení do praxe pro zemědělce dostupné prakticky i ekonomicky.

Tato práce v první části shrnuje výjimečnost bachoru, principy bachorové fermentace, dosavadní cesty ke snížení metanogeneze, chemické vlastnosti silic a jejich známý vliv na metanogenezi. Výzkumná část se věnovala pěti látkám – isobornyl acetate, 3-carene, citronellol,  $\beta$ -caryophyllene a benzyldeneacetone v koncentracích 250 mg/l a 500 mg/l a jejich vlivu na tvorbu celkových plynů, metanu, stravitelnost krmiva, pH, tvorbu těkavých mastných kyselin a koncentrace amoniakálního dusíku. Ukázalo se, že některé z látek mají potenciál na snížení metanogeneze za únosného snížení tvorby těkavých mastných kyselin.

## 2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Tato práce se zabývala dvěma hypotézami. Předpokládalo se, že účinné látky silic sníží bachorovou produkci metanu bez negativního vlivu na koncentrace těkavých mastných kyselin v bachorové tekutině. Zároveň se předpokládalo, že účinné látky silic sníží bachorový obrat dusíku, který se projeví sníženými koncentracemi amoniakálního dusíku v bachorové tekutině.

Cílem práce je ověřit vliv vybraných účinných látek silic na *in vitro* bachorovou produkci metanu.

### 3 Literární rešerše

Světová populace překročí do roku 2059 10 miliard obyvatel (United Nations 2022), pro které je nutné zajistit potravinovou bezpečnost s ohledem na omezenou dostupnost půdy při zajištění minimálního dopadu na životní prostředí (Huws et al. 2018).

Pro zabezpečení potravinové bezpečnosti lidstva mají domestikovaní přežvýkavci obrovský význam jako zdroj masa (25,5 % světové produkce) (FAO 2022) a mléka (prakticky celá světová produkce). Navíc k produkci dokáží díky pozoruhodnému komplexnímu ekosystému bacheru využít pro člověka většinou nestravitelnou rostlinnou potravu skládající se převážně z celulózy a hemicelulózy. Tyto polysacharidy v bacheru degradují, následně jsou přeměněny na chemické sloučeniny, které může zvíře absorbovat a trávit (Mizrahi 2013) a vytvářet z nich produkty, které jsou bohatým zdrojem vysoce kvalitních bílkovin, minerálů a vitaminů (Huws et al. 2018).

Vedle produktů ovšem bacherový mikrobiom (respektive jeho metanogenní archaea) tvoří i metan ( $\text{CH}_4$ ), a tak chov přežvýkavců přináší i zcela zásadní problém (Zhao & Zhao 2021). Metan je významným skleníkovým plynem a přežvýkavci se na jeho celosvětové produkci podílejí z 27 % (oproti 23 % vzniklých z ropného a plynárenského průmyslu) (Bruns 2023). Podle Puniya et al. (2015) nejen, že metan negativně ovlivňuje životní prostředí (jeho potenciál globálního oteplování je  $25\times$  vyšší než u oxidu uhličitého), ale zároveň 2–8 % z energie krmiva je u hospodářských zvířat využíváno právě na metanogenezi, což vede k vyšším nákladům v chovech. Snížení produkce metanu u přežvýkavců má tedy velký význam pro udržitelný rozvoj jejich chovu (Zhao & Zhao 2021) a je jí v posledních desetiletích věnována odpovídající pozornost. Strategie ke snížení metanogeneze přináší několik scénářů, mezi nimi i přímou inhibici metanogeneze (respektive inhibici produkce vodíku jako substrátu pro produkci metanu) pomocí rostlinných extraktů a jejich sekundárních metabolitů (McAllister & Newbold 2008; Mizrahi et al. 2021).

Silice jako sekundární metabolity rostlin dokáží díky svým vlastnostem inhibovat růst některých grampozitivních a gramnegativních bakterií, přičemž tento výzkum je obzvláště důležitý po zákazu používání antibiotik Evropskou unií v roce 2006 (Calsamiglia et al. 2007, Sun et al. 2021). Silice zároveň ovlivňují příjem krmiva, mohou mít pozitivní vliv na metabolismus proteinů, produkci těkavých mastných kyselin a trávení vlákniny. Především ale mohou regulovat bacherovou fermentaci a snižovat emise metanu, a tak jsou nadějnými rostlinnými látkami v boji proti metanogenezi (Cobellis et al. 2016).

#### 3.1 Unikátnost trávicí soustavy přežvýkavců

Přežvýkavci, dnes vůbec nejrozmanitější skupina savců (197 druhů v 6 čeledích) (Hackmann a Spain 2010), se objevili na Zemi před zhruba 50 miliony lety. První zástupci měli méně než 5 kg, byli všežraví, nepřežvykovali a funkční bacherový mikrobiom neměli ještě dalších 10 milionů let. Další čeledi se vyvinuly před 18–23 miliony lety během druhé evoluční radiace (Fernandéz a Vrba 2005, Hackmann a Spain 2010). Podle Toljagic et al. (2018) měl na jejich evoluci pravděpodobně vliv rozvoj a dominance trav v průběhu kenozoika (před 66 miliony lety). Jejich rychlá diversifikace a geografická expanze byla jednou z nejpůsobivějších

v evoluci savců. Během své další evoluce si zachovali důležitou genetickou vlastnost: variaci v řadě regresivních i progresivních změn trávicího traktu (Hofmann 1989), jejímž výsledkem je schopnost trávit celulózu – hlavní součást podpůrných buněk rostlin, nejrozšířenější organickou sloučeninu biosféry (Vodrážka 1996) a nezastupitelný zdroj energie. Využívání krmiva, které není stravitelné pro ostatní savce, je možné díky mikrobiální fermentaci, která se odehrává primárně v bachoru, předžaludku přežvýkavců, ve kterém žije v symbiotickém vztahu s hostitelem velmi koncentrovaná a rozmanitá anaerobní mikrobiální populace (Dehority 2002, Malmuthuge & Guan 2017). Konečným produktem fermentace jsou těkavé mastné kyseliny, absorbované především stěnou bachoru (Dijkstra et al. 2002). Aby mohlo dojít k dokonalému fermentačnímu trávení bakteriemi bachoru, je nutné potravu rozmělnit na menší částice. To se neděje při příjmu potravy, ale zejména při přežvykování – zásadním procesu pro efektivní využívání vláknité potravy, kdy je potrava regurgitována z bachoročepcové části předžaludků přes jícnu do dutiny ústní, kde je mechanicky rozmělněna na menší částice. Anatomické odlišnosti trávicí soustavy přežvýkavců se týkají orgánů, které se na přežvykování přímo podílejí, tedy ústní dutiny, hltanu, jícnu a předžaludků (Membrive 2016).

Z rozdílností můžeme zmínit následující:

- na místě horních řezáků mají přežvýkavci zubní polštář,
- sliny neobsahují  $\alpha$ -amylázu, nejsou tedy důležité pro samotné trávení, ale hrají podstatnou roli v udržování bachorového pH,
- hltan je ovladatelný oběma směry, kaudálně během polykání a kraniálně během eruktace,
- v jícnu se nachází kraniální a kaudální svěrač, který se opět významně podílí na eruktaci,
- existence bezžláznatých předžaludků (Membrive 2016).

Bachor, první a největší z předžaludků, zabírá levou polovinu břišní dutiny. Jeho obrovský prostor je zaplněn natráveným a částečně natráveným krmivem. Vnitřek bachoru je rozdělen brázdami a pilířemi na několik vaků. Pilíře, zesílené svalovými vlákny, napomáhají kontrakci vaků, což přispívá k cirkulaci a promíchávání krmiva. Samotný bachor je lemován papilami, které se liší jak velikostí, tak tvarem a jsou nejhustější ve ventrálních vacích, kde pravděpodobně dochází k největší absorpci živin (Dehority 2002, Puniya et al. 2015). Od čepce je bachor oddělen čepcobachorovým ústím. Přesto, že jsou oba předžaludky diferenciovány, společně tvoří jednu komoru. (Membrive 2016). Bachoročepcové ústí se pravidelně otevírá a malé částice natráveniny přecházejí do čepce. Větší částice jsou zachyceny kuželovitými zrohovatělými epiteliálními výběžky a nemůžou pokračovat v průchodu trávicí trubicí, dokud nebudou přežvykány do vhodné velikosti. V čepci se absorbují těkavé mastné kyseliny a hydrogenuhličitany, což snižuje pufrací kapacitu tráveniny v dalších částech žaludku (Hungate 1975). Kniha leží napravo od bachoru a je pokryta záhyby ve tvaru listů, které jsou tvořené sliznicí známou jako omasální laminae. Ta je pokryta množstvím zrohovatělých papil, jejichž účelem je lisování a drcení částic krmiva. Oválné knihoslezové ústí je obklopeno silným svalovým pilířem knihy a slizničními záhyby slezu, které fungují jako ventily zabraňující proniknutí obsahu slezu. V knize se absorbuje voda (Puniya et al. 2015). Slez neboli pravý žaludek, je již vystlán sliznicí obsahující specializované sekreční nebo žláznové buňky, které produkují pepsin a kyselinu chlorovodíkovou, a je tedy velmi podobný žaludku monogastrů

(Dehority 2002). Pankreatické šťávy obsahují výjimečně vysokou koncentraci ribonukleázy, což je adaptace na hojné množství ribozomů z trávených bakterií (Hungate 1975).

## 3.2 Bachor

Přežvýkavci mají objemnou fermentační komoru reprezentovanou bachorem a širokou populací mikroorganismů, které žijí v symbióze se svým hostitelem (Membrive 2016). Patří mezi ně všechny formy primitivních druhů, od archaea po protozoa, které ovlivňují využití živin a zdraví hostitele přes specifické metabolické dráhy (Liu et al. 2020). Prostředí bachoru je ovlivňováno jak hostitelem, tak mikroorganismy a jeho fyzikálně chemické vlastnosti (teplota se obvykle pohybuje mezi 38–41 °C, pH 5,5–6,9) jsou poměrně konstantní. Narušení bachorového ekosystému ovlivní produkci u zdraví celého zvířete (Bartoš 1987, Puniya et al. 2015).

### 3.2.1 Bachorový ekosystém

Podle Liu et al. (2020) je bachorový mikrobiom považovaný za nový orgán. Slova „mikro“ a „biom“ a znamenají v překladu ze starověké řečtiny „malý“ a „život“. Mikrobiota je slovo stejného původu, kde „biota“ znamená „živé organismy žijící v konkrétním ekosystému“ (Berg et al. 2020). Mikrobiom je v ekologickém kontextu společenství komenzálních, symbiotických a patogenních mikroorganismů žijících v tělesném prostoru nebo jiném prostředí. Neobsahuje pouze živé organismy, ale i molekuly těmito organismy produkovány, včetně strukturálních elementů (nukleové kyseliny, proteiny, lipidy, polysacharidy), metabolitů (signální molekuly, toxiny, organické a anorganické molekuly) a molekuly produkové hostitelem a strukturami vnějšího prostředí. V prostředí bachoru najdeme i fágy, viry, plazmidy a mobilní genetické elementy, nicméně jejich zařazení jako součást mikrobiomu je podle Berg et al. (2020) kontroverzní. Osídlení bachoru mikrobiomem je pro životaschopnost hostitele naprosto nezbytné (Friedman et al. 2017). Mikrobiom je schopný rozložit organickou hmotu požitou zvířetem. Není zde ale žádný organismus, který má tuto schopnost sám o sobě. Na kooperativním katabolismu substrátu se podílí sled mikroorganismů. Rozkládají přijatou potravu na jednoduché cukry, transportované a fermentované dalšími členy mikrobiální populace, které vytváří mastné kyseliny s rozvětveným řetězcem, vitaminy nebo další kofaktory pro další bakterie zodpovědné za rozklad krmiva (Puniya et al. 2015). Konečným produktem eukaryotické fermentace jsou těkavé mastné kyseliny, které jsou využívány nemetanogenními prokaryoty s produkcí H<sub>2</sub>, který je znovu využit metanogeny. Protozoa mají z tohoto vztahu prospěch, protože odstranění H<sub>2</sub> usnadňuje kompletnější oxidaci fermentovaných substrátů a větší rekuperaci energie (Lange et al. 2004). Mikrobiální populace spolu mají významné interakce nejen v jedné environmentální nise ale i mezi nimi (Puniya et al. 2015). Bachor je mikrobiomem osídlován od narození, přes sliny matky, během laktace, příjmu krmiva a kontaktem s vnějším prostředím. Mikrobiom v bachoru mláďat má menší diverzitu, dospělý bachor je potom hustě osídlen rozmanitým mikrobiomem, který je odolný vůči změnám a po zásahu si obnovuje svoje původní složení. Pozorování naznačují, že obnovení složení je z části ovlivňováno hostitelem (Malmuthuge & Guan 2017, Lie et al. 2020). Mikrobiom je ve stejné chvíli dynamický a interaktivní mikroekosystém, podléhá změnám v čase i měřítku (Berg et al. 2020), přičemž existuje silná korelace mezi typem krmiva a profilem bachorového mikrobiomu,

který dále reaguje na zdraví, věk a prostředí hostitele (Liu et al. 2020). Kolonizace bachoru je charakterizována rychlými a dynamickými změnami ve složení počínaje kolonizací různými aerobními a fakultativně anaerobními organismy, které jsou postupně nahrazeny anaerobními zodpovědnými za fermentaci a řádný fyziologický vývoj. Anaerobní metabolismus nutný pro degradaci a fermentaci rostlinného materiálu je řízen tokem elektronů přes gradient redoxního potenciálu, který končí převážně tvorbou metanu (Friedman et al. 2017).

Podle Bartoše (1987) a Hofmanna (1989) vytváří bachorová mikrobiální populace jeden z nejkompexnějších mikrobiálních ekosystémů, který lze rozdělit do těchto skupin:

- organismy volně nebo pevně přichycené na částičky krmiva, na prvoky a houby,
- populace žijící na epitelálních buňkách bachoru,
- populace nacházející se volně v bachorové tekutině, kam přechází i mikrobiom uvolněný z prvních dvou skupin po vyčerpání substrátu nebo po odumření.

Epimurální komunita (žijící na epitelálních buňkách) je rozmanitější než komunita spojená s obsahem bachoru. Změny v hustotě epimurálních bakteriálních ovlivňuje kromě krmiva i exprese genu hostitele (Malmuthuge a Guan 2017). Všechna mikrobiota v bachoru můžeme rozdělit do tří domén: Bacteria (bakterie), Archaea (metanogeny) a Eucaryota (prvoci a houby), přičemž většina zástupců je vzhledem k prostředí bachoru striktně anaerobní (Puniya et al. 2015).

Bakteriální populace v bachoru je vysoce různorodá, ale množství aktivních bakterií závisí na druhu zvířete, typu a chemickém složení krmiva, frekvenci krmení a dalších, prozatím neidentifikovaných faktorech. V jakémkoliv okamžiku je v bachoru zvířat přítomno pouze 15–20 rodů v dostatečně velkém množství (více než milion buněk v mililitru bachorové tekutiny), aby vykonávaly jakoukoliv důležitou funkci. Ve chvíli, kdy je do krmiva zařazena nová složka, bakterie potřebné pro její využití/detoxikaci vzrostou ve svém množství. Na degradaci vlákniny se podílejí nejaktivněji právě bakterie, což naznačuje fakt, že bakterie spojené s částicemi krmiva tvoří téměř 50–75 % celkové mikrobiální populace (Puniya et al. 2015). Podle Hofmann (1989) můžeme bakterie rozdělit podle funkce: na vlákninu degradující bakterie, bakterie zpracovávající kyselinu mléčnou, acetogeny, bakterie zpracovávající škrob a další. Bachorové bakterie jsou téměř vždy anaerobní, aerobních a kyslík tolerujících bakterií je v bachoru 1000krát méně než anaerobních (Hungate 1975). Na anaerobním prostředí se podílejí fakultativně aerobní bakterie žijící na epitelu bachoru, kde vychytávají kyslík a rozkládají močovinu (kterou získávají i z krve), které přeměňují na CO<sub>2</sub> a NH<sub>3</sub>. Amoniak se stává zdrojem dusíku pro bakterie, zatímco oxid uhličitý je nezbytný pro růst bakterií rozkládajících vlákninu (Naharaja 2016).

K bachorovým bakteriím patří neodmyslitelně i bakteriofágy. Přes to, že je podle Berg et al. (2020) jejich zařazení do mikrobiomu kontroverzní, Puniya et al. (2015) je naopak považují za nejdůležitější komponentu. Tyto fágy, specifické pro různé bakterie bachoru, pomáhají v obratu bakteriální masy, ale především lýzou bakteriálních buněk se bakteriální protein stává snadno dostupným pro hostitele jako zdroj aminokyselin. Také zajišťují lýzu nechtěných bakterií z ekosystému, kterým je například *Streptococcus bovis* a metanogeny. I přes nedostatek informací, bachorové fágy a jejich enzymy reprezentují významnou příležitost ke kontrole jak populace metanogenů, tak dalších (Puniya et al. 2015).

Další skupinou bachorového mikrobiomu jsou archaea. Jako jediní dokáží využívat vodík produkovaný nemetanogenními prokaryoty, který využívají k redukci bachorového oxidu uhličitého za vzniku metanu a ATP. Metanogenní archaea jsou považovány za jedny z prvních organismů na naší planetě, jsou dominantním archaeálním organismem nalezeným ve většině zvířat, od jednobuněčných protozoí po lidi a téměř všude na Zemi bez ohledu na teplotu, tlak nebo pH (Lange et al. 2004, Puniya et al. 2015). Stejně jako bakterie jsou archaea prokaryota. Tyto dvě skupiny rozlišuje několik genotypových a fenotypových rysů. Původně byla existence dvou domén založena na porovnání ribozomové struktury, ale rozdíly byly nalezeny i například ve složení buněčné stěny a glycerolypidů membrány (Lange et al. 2004). Podle Friedman et al. (2017) obsahuje bachor dospělého jedince 2–5 % metanogenních archaeí, které jsou hnací silou komplexního metabolismu mikrobiálních komunit bachoru (Nagarja 2016). Například *Ruminococcus albus*, významný druh celulotických bakterií, produkuje bez metanogenů ethanol, acetát, H<sub>2</sub> a CO<sub>2</sub>. S metanogeny potom produkuje více acetátu a méně nebo vůbec žádný ethanol. Protože produkce acetátu má za výsledek syntézu ATP, tato interakce vede ke zvýšenému růstu a trávení celulózy (Pavlostatis et al. 1989). Archaea zároveň slouží jako cesta využití elektronů pro celý systém. Produkce metanu umožňuje uvolnění přebytečných vodíkových iontů z bachoru do vnějšího prostředí a tím je zcela zásadní pro udržení bachorového pH. Metan nemůže být akumulován v bachorové dutině a z dorsální části bachoru se uvolňuje eruktací, která je pro přežití jedince životně důležitý a fyziologicky nezbytný mechanismus. Takto je denně dospělým skotem uvolněno mezi 500 a 1 000 litry plynu, který obsahuje 0,2 % vodíku, 0,5 % kyslíku, 7 % dusíku, 26,8 % metanu a 65,5 % oxidu uhličitého (Nagarja 2016). Z pohledu životního prostředí i výživy nejsou metanogeny vhodným způsobem pro likvidaci vodíku vzhledem k tomu, že konečným produktem je skleníkový plyn, který zároveň znamená ztrátu 2–8 % energie krmiva (Puniya et al. 2015). Friedman et al. (2017) zjistili, že proces metanogeneze se vyvíjí s věkem zvířete. Brzká metanogenní aktivita je charakterizována vysokou aktivitou metylotrofní metanogeneze (akceptorem elektronů je methanol nebo methylaminy), pravděpodobně vedenou řádem *Methanosarcinales*, nalezeným výhradně v bachoru mladých zvířat. K nejznámějším zástupcům archaeí dospělého mikrobiomu využívající vodík patří *Methanobacterium ruminantium* a *Wolinella succinogenes* (Bartoš 1987). Vytvoření a udržení stabilní dospělé populace metanogenů je ovlivňována výživou, její úrovní a frekvencí krmění. Symbiotická asociace metanogenních archaeí s producenty H<sub>2</sub> je většinou vnímána díky jejich připojení nebo tvorbou hejna. Protozoa jsou jediní, u kterých můžeme tuto interakci sledovat pomocí mikroskopu. Symbiotický vztah mezi metanogeny a nálevníky může produkovat až 37 % bachorového metanu. Další z této domény se podílejí na výrobě acetátu, propionátu, sulfanu a butyrátu (Puniya et al. 2015).

Až 50 % masy bachorového mikrobiomu zabírají protozoa – prvoci. Jejich morfologická diverzita a složitost může být porovnána s ekosystémem pralesa, kde příznivé prostředí podporuje vysokou produktivitu a druhovou rozmanitost (Hungate 1975). Oproti bakteriím se protozoa množí velmi pomalu, proto žijí v pomalu se pohybující bachorové matraci, takže nejsou přesunuty dále do čepce před tím, než mají možnost se rozmnožit (Puyia et al. 2015). Většina z protozoí jsou třídy *Ciliata* (nálevníci) a *Flagellata* (bičíkovci). *Ciliates* jsou menší, početnější a podílejí se na trávení krmiva, zatímco *Flagellates* jsou větší, využívají pouze rozpustné živiny, a tudíž jsou bachorovou fermentací zanedbatelní, o jejich metabolismu toho ovšem není mnoho známo (Williams & Coleman 1997, Nagarja 2016). Pod *Ciliates* zahrnujeme

různé rody a druhy prvoků, v bachorovém mikrobiomu jsou nejvýznamnější řády Holotricha a Entodiniomorphida (Nagarja 2016). Podle Firkins et al. (2020) protozoa ovlivňují profil aminokyselin (obzvláště lyzinu) v mikrobiálním proteinu. Hlavním zdrojem dusíkatých sloučenin pro ně jsou pravděpodobně bakterie, přičemž některé druhy selektivně pohlcují nebo odmítají. Některé druhy dokáží využít i rostlinný protein a volné aminokyseliny (Williams & Coleman 1997). Další druhy prvoků mají organelu zvanou hydrogenzom, která se podílí na využití kyslíku z bachoru a zajišťování anaerobního prostředí (Nagarja 2016).

*Ciliates* jsou důležitou součástí bachorového mikrobiomu, protože jsou vybaveni hydrolytickými enzymy důležitými pro fermentaci, přispívají k metanogenezi (některé metanogeny jsou k nim ve skutečnosti přichycené a mají tak bezprostřední přístup k H<sub>2</sub>), proteolýze a zejména k bachorové recyklaci mikrobiálního proteinu. Nicméně naše znalosti o jejich biochemických aktivitách v bachoru jsou omezené kvůli komplikovanosti jejich kultivace *in vitro* (Firkins et al. 2020). Podle Puniya et al. (2015) produkují koncové produkty fermentace podobné bakteriálním, tedy acetát, butyrát a H<sub>2</sub>. Kromě obecné funkce fermentace krmiva jsou důležití při ochraně snadno fermentovaných sacharidů před cukr a škrob zpracovávajícími bakteriemi. Důsledkem je, že organické kyseliny nejsou okamžitě po nakrmení vytvářeny v příliš vysokém množství, a namísto toho se postupně uvolňují v průběhu dne, takže je v bachoru konstantní zdroj energie ve formě těkavých mastných kyselin s krátkým řetězcem. Naopak holotricha využívají nestrukturální sacharidy a škrob, který ukládají a využívají v době nedostupnosti cukrů. Nicméně pokud mají přístup k přebytku cukru, ukládají škrob, dokud neprasknou, protože si nevyvinuly mechanismus, který by kontroloval proces ukládání (Hungate 1975, Williams & Coleman 1997). Víme, že protozoa nejsou u skotu pro trávení nezbytná, nicméně defaunace (odstranění prvoků) bachoru je asociována se snížením počtu hub a některých důležitých celulótických bakterií, což naznačuje jejich celkový přínos. Obecně intenzivně interagují s dalšími členy mikrobiomu. Predace, symbióza a vzájemný metabolismus jsou jedny z hlavních interakcí, které mezi prvoky a dalšími členy mikrobiomu probíhají. Tyto interakce mohou ovlivňovat bachorový mikrobiom (rozmanitost, složení i dynamiku) a jeho funkčnost, a tím být klíčem k pokročilému porozumění bachorového mikrobiálního ekosystému (Firkins et al. 2020).

V bachoru najdeme anaerobní houby, které se nevyskytují nikde jinde a hrají dominantní roli při odbourávání lignocelulóзовých složek krmiv (Puniya et al. 2015). Rhizoidy (kořínky) anaerobních hub jsou totiž schopné penetrovat rostlinným pletivem lépe, než bakterie a prvoci, takže získávají přístup k materiálu, který není dostupný pro jiné bachorové mikroorganismy. Takovéto pronikání vede k rychlejší a úplnější degradaci krmiva (Wubah 2004). Bachorové houby produkují hydrolytické enzymy potřebné k rozložení hlavních komponent rostlinné biomasy, zahrnující celulózu, hemicelulózu, pektin-lyázu, amylázu a proteázy (Nagarja 2016). Podle Puniya et al. (2015) jsou v rozkládání vlákniny považovány za nejefektivnější. Bachorové houby mají na rozdíl od aerobních pro tvorbu energie, namísto mitochondrií, hydrogenozomy. Ty produkují jako odpadní látky H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> a acetát. Fakt, že můžeme houby najít i ve slinách, naznačuje přítomnost struktury, která je odolná proti kyslíku i vysychání. Přizpůsobení hub podmínkám bachoru je dokonalé a poukazuje na paralelní vývoj mikrobiálního trávení vlákniny, při které houby zastávají nezanedbatelnou úlohu (Bartoš 1987). Houby významně přispívají k celkovému metabolismu hostitele díky své vysoké celulótické aktivitě a hrají větší roli v degradaci lignifikovaných rostlinných pletiv (Puniya et al. 2015).

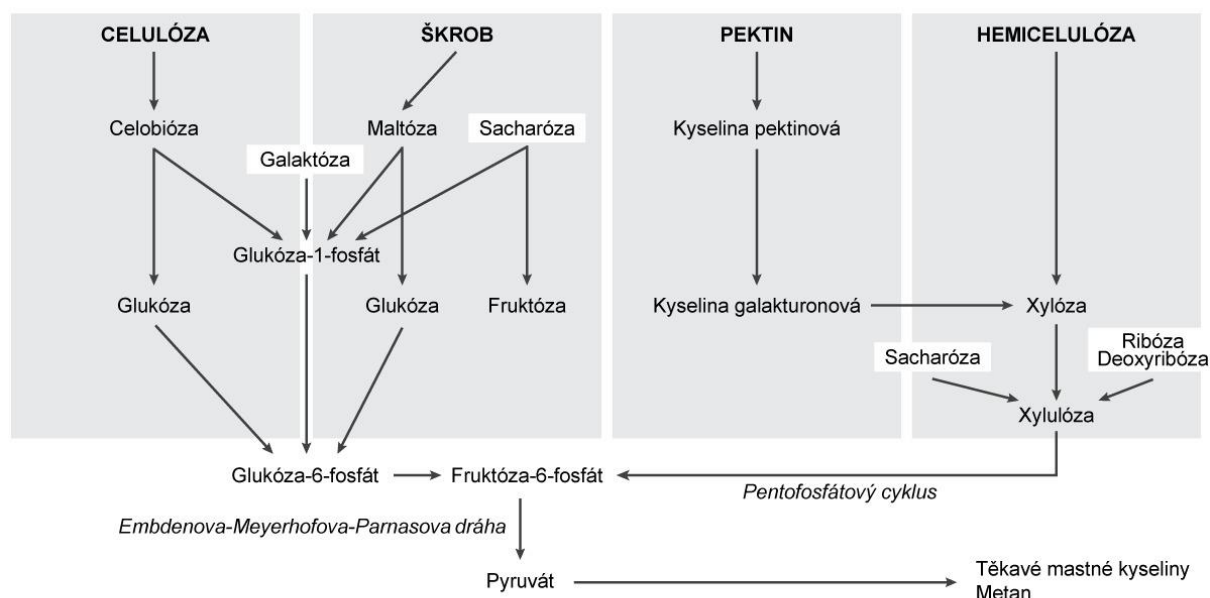
Znalosti o dopadech variací v bachorové mikrobiotě na biologii a funkci hostitele jsou stále omezené (Malmuthuge & Guan 2017), ale podle Liu et al (2020) studie dokazují, že využití krmiva, trávení dusíku a produkce metanu jsou ovlivněny více než jednou skupinou bachorových mikrobiomů. Mikroby mezi sebou interagují a tyto interakce mají různé důsledky pro mikrobiální fitness, populační dynamiku a funkční kapacitu mikrobiomu, nicméně sociální adaptace mikrobiomu nejsou dostatečně prostudovány. Podle Berg et al. (2020) dává komunikace mezi členy mikrobiální komunity vzniknout složité krajině, ve které fitness nebo funkce buněk závisí nejen na genetickém potenciálu a chemickém prostředí každé jedné buňky, ale také na biotickém prostředí. Budoucnost vidí v řešeních na míru, protože každý hostitel a jeho mikrobiom může reagovat na jakýkoliv zásah různě.

### 3.2.2 Bachorová fermentace

Zdrojem energie pro bachorové mikroorganismy i pro samotné přežvýkavce jsou zejména strukturální polysacharidy, celulóza, hemicelulóza a pektin, obsažené v listech a stoncích rostlin (Bartoš 1987). Schopnost přežvýkavců přeměnit rostlinná krmiva na žádané potravinářské produkty do značné míry závisí na procesu fermentace v bachoru. Ta je definována jako anaerobní buněčný proces, při kterém komponenty krmiva (polymery zahrnující sacharidy, dusíkaté látky a tuky) hydrolyzují na jednodušší sloučeniny (monomery) za uvolnění energie (ATP, NADH, NADPH), která je následně dostupná mikrobiomu pro jeho růst a množení. Dospělí přežvýkavci mají bachor a čepec dostatečně objemný na to, aby udrželi vláknitá rostlinná krmiva po dobu nutnou k tomu, aby anaerobní mikrobiom rozkládající vlákninu fermentoval buněčné stěny na těkavé mastné kyseliny, především octovou, propionovou a máselnou. (Owens & Basalan 2016). Ty jsou podle Liu et al. 2020 okamžitě transformovány na své ionizované formy, známé jako acetát, propionát a butyrát a absorbovány přes stěnu bachoru do krevního řečiště, kde jsou využívány a pokrývají až 80 % energetické potřeby hostitele.

Podle Mizrahi et al. (2021) můžeme rozdělit bachorový metabolismus do tří stupňů chemické transformace makromolekul a polymerů rostlinných vláken. Prvním krokem je degradace a metabolismus hemicelulózy, celulózy a pektinu, které jsou nejhojnějšími sacharidovými polymery ve stěnách rostlin. Na tomto stupni jsou struktury rostlinné buněčné stěny kolonizovány mikroorganismy, které využívají enzymy spadající do různých glykosylázových skupin k rozložení těchto polymerů na rozpustné formy. V bakteriích a houbách jsou hydrolyzovány na malé oligomery (<6 monomer) a monomery extracelulárně. V protozoích se degradace odehrává uvnitř buňky, protože částice krmiva jsou požitý a následně tráveny v potravní vaukole v endoplazmě (Nagarja 2016). Celulotickou aktivitu má několik druhů bakterií, mezi nimi nejhojněji zastoupené *Fibrobacter succinogenes*, *Rumonococcus albus* a *Ruminococcus flavefaciens*, dále někteří nálevníci a všechny houby. Hlavní celulotické bakterie dokáží rozložit i hemicelulózu a pektin. Necelulotické bakterie, které dokáží rozložit hemicelulózu, zahrnují *Prevotella* sp. (*albensis*, *brevis*, *bryanti* a *rumincola*), *Butyrivibrio fibrisolvens* anebo *Pseudobutyrvibrio xylanivorans*. Přes to, že je pektin strukturálním sacharidem, je v bachoru kompletně stráven, především bakteriemi zahrnujícími *Prevotella* sp., *Lachnospira multiparus*, *Streptococcus bovis* a dalšími. Zajímavostí je, že existují nálevníci rozkládající pektin, kteří ovšem následně nedokáží využít produkty

metabolismu (Nagaraja 2016). V druhém kroku jsou tyto polymery rozloženy na rozpustné formy (zahrnující kratší polymery a monomery glukózy v případě celulózy a různé pentózové cukry v případě hemicelulózy) importovány do mikrobiálních buněk specifickým transportérem a metabolizovány přes různé dráhy, jako je například dráha Embden-Meyerhoff-Parnas (glykolýza) pro glukózu a xylózu a pentózový cyklus pro využití pentóz, stejně jako další atypické metabolické dráhy, které jsou pravděpodobně zakódovány v genomech bachorových mikroorganismů. Tyto atypické dráhy zahrnují neúplnou Embden-Meyerhoff-Parnas a PPI dependentní fosfofruktinázovou dráhu. Vzhledem k anaerobní povaze metabolismu v bachoru je velké množství cukrů fermentováno přes různé dráhy s pyruvátém jako hlavním meziproduktem. Typ fermentačních produktů z pyruvátu závisí na mikroorganismech a aktuálním stavu bachoru vzhledem k pH nebo rychlosti ředění, což vede k tvorbě organických a těkavých mastných kyselin, stejně jako různých metabolitů, například plynů (CO<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>). Konečně posledním krokem je konverze metabolitů, například laktátu, sukinátu, vodíku a oxidu uhličitého na propionát, butyrát, acetát, metan a další (Nagaraja 2016, Mizrahi et al. 2021).



Obrázek 1: Fermentace sacharidů v bachoru (Najgara 2016)

Odstranění produktů fermentace z bachoru se děje třemi cestami – eruktací, difuzí do krve nebo lymfatického systému a přesunem tráveniny do slezu. Část oxidu uhličitého difunduje do krevního řečiště, nicméně většina je spolu s metanem a většinou sulfanu odstraněna eruktací. Organické kyseliny (těkavé mastné kyseliny a laktát) jsou vstřebávány skrz stěnu bachoru pasivním transportem nebo usnadněnou difuzí. Další složky (amoniak, ionizované minerály) jsou absorbovány do krve nebo lymfatického systému v závislosti na jejich rozpustnosti. Mikrobiální produkty a nestrávené, dostatečně malé, zbytky krmiv se přesouvají dále bachoročepcovým otvorem (Owens & Basalan 2016).

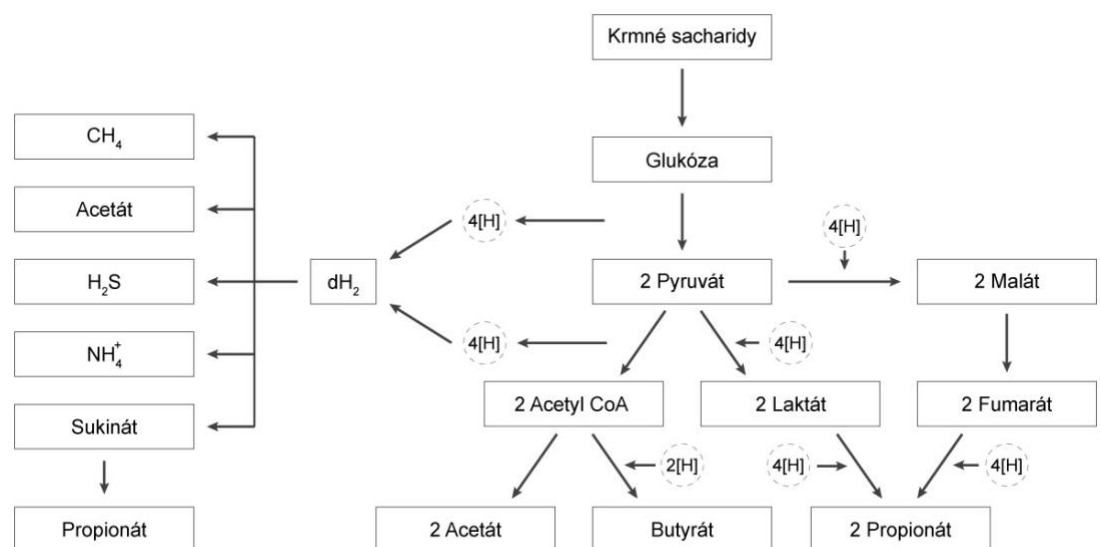
### 3.2.3 Metanogeneze

Během metabolismu monosacharidů na těkavé mastné kyseliny a oxid uhličitý se uvolňuje vodík, jehož rovnováha v prostředí batoru je stěžejní z hlediska jednotlivých mikroorganismů i jejich vzájemných interakcí. Podle Bartoše (1987) se procesy zapojené do udržování rovnováhy vodíku logicky rozpadají na 4 celky:

- re-oxidace redukovaných koenzymů  $\text{NADH}_2$  spřažené s redukcí pyruvátu na propionát, laktát nebo butyrát a případně s produkcí vyšších těkavých mastných kyselin,
- redukční syntetické procesy v rostoucích mikrobiálních buňkách,
- odstraňování plynného  $\text{H}_2$  v procesu fosforylace spojené s anaerobním transportem elektronů,
- metanogeneze, tedy odstraňování  $\text{H}_2$  z batorového prostředí metanogenními bakteriemi, které vodík využívají pro redukcí  $\text{CO}_2$  a dalších jednoduhlíkatých sloučenin za vzniku metanu (Bartoš 1987, Beauchemin et al. 2020).

Podle Mizahri et al. (2021) jsou metanogeny esenciální jako „výlevka“ elektronů a představují klíčovou hnací sílu celého potravního řetězce batoru.

Procesy v batoru jsou nerozlučně spojeny s produkcí vodíku, ať již ve formě redukovaných koenzymů  $\text{NADH}_2$  nebo ve formě plynného  $\text{H}_2$  a je nezbytné, aby vodík byl v obou formách ze systému průběžně odstraňován. Plynný vodík by sám o sobě nemusel průběh metabolických procesů v buňce ovlivňovat, pokud by ovšem rychle unikal. Vodík však vstupuje do plynné fáze mnohem pomaleji než  $\text{CO}_2$  a více vodíku tak zůstává rozpuštěno v batorové tekutině, kde je převeden k metanogenním archaeím (Bartoš 1987, Beauchemin et al. 2020). Přenos může být usnadněn fyzickým spojením mezi fermentujícími druhy a metanogeny a nazývá se mezidruhový přenos vodíku (Moss et al. 2000).



Obrázek 2: Schéma hlavních cest fermentace v batoru včetně tvorby a inkorporace metabolického vodíku (Beauchemin et al. 2020)

Všechny metanogeny jsou archaea a zahrnují 7 řádů, přičemž Methanobacteriales, Methanomassiliicoccales a Methanosarcinales jsou běžně k nalezení v bachorovém ekosystému (Mizrahi et al. 2021). Při globálním výzkumu složení bachorového mikrobiomu (501 vzorků bakterií a archaeí), který bych uskutečněn na 379 kusech skotu, 106 ovcích, 59 jelenech, 52 kozách a 72 dalších přežvýkavcích z 35 států bylo zjištěno, že dominantní archaea jsou překvapivě stejná. Ve většině vzorků byla nalezena *Methanobrevibacter gottschalkii* a *Methanobrevibacter ruminantium* z řádu Methanobacteriales, tvořící v průměru 74 % všech archaeí (Seshardi et al. 2018). Požadavky metanogenů jsou prosté. Prakticky se omezují na minerální látky, amoniak, CO<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>. Optimální pH pro jejich činnost se pohybuje v intervalu 6,7–7,4 a při poklesu pH pod 6, zastavují svou činnost (Bartoš 1987).

Přítomnost metanogenních bakterií můžeme považovat za rozhodující činitele, který přispívá k odstraňování plynného H<sub>2</sub> a umožňuje další mikrobiální růst (Bartoš 1987). Příkladem uveďme *Ruminococcus albus* a *R. flavefaciens*. Tyto hlavní celulótické mikroorganismy jsou považovány za klíčové pro degradaci vlákniny v bachoru. Ukázalo se, že *in vitro* tyto druhy mění svůj metabolismus tak, aby zvýšily energetické výtěžky v přítomnosti metanogenů, které spotřebovávají produkovaný vodík a snižují jeho parciální tlak, což zvyšuje volnou energii spojenou s fermentací glukózy a následně zisky ATP a energetické výtěžky. Obecně platí, že nadbytek metanogenů a celulótických mikroorganismů spolu pozitivně koreluje (Mizrahi et al. 2021). Naopak pokud vodík není odstraněn a akumuluje se, inhibuje reoxidaci NADH, NADPH a FADH, které nemohou dokončit fermentaci cukrů, což má za následek snížení produkce těkavých mastných kyselin (Canul-Solis et al. 2000, Zhao & Zhao 2022).

Podle Zhao & Zhao (2022) existují 3 dráhy produkce CH<sub>4</sub> v bachoru. První dráha využívá pro tvorbu metanu acetátu a formátu. Přes to, že je acetátu v bachoru vysoké množství, tato metanogeneze má zanedbatelný význam vzhledem k nízkému počtu acetát využívající archaea *Methanosarcinales* a nízké afinitě acetogenů k H<sub>2</sub>. Další dráhou, produkující pouze 3–5 % CH<sub>4</sub>, je využívání metanových skupin přítomných v metanolu a metylaminech jako substrátu pro metanogenezi. Hlavní dráhou produkující cca 82 % metanu je tedy reakce redukcí CO<sub>2</sub> vodíkem jako primárním donorem elektronu přes formyl, methenyl, methylen a methyl jako meziproducty. Z jednoho molu CO<sub>2</sub> a 4 molů H<sub>2</sub> vznikne 1 mol CH<sub>4</sub> a 2 moly H<sub>2</sub>O (CO<sub>2</sub> + 4 H<sub>2</sub> → CH<sub>4</sub> + 2 H<sub>2</sub>O). Redukce uhlíkových zbytků zahrnuje 7 kroků katalizovaných řadou unikátních kofaktorů a enzymů. z nichž 3 se nevyskytují u jiných organismů než metanogenních bakterií. Podle Bartoše (1987) a Puniya et al. (2015) se jedná o:

- faktor 420 zapojený do přenosu elektronu z vodíku na oxid uhličitý. Jde o nezvyklý derivát flavinmononukleotidu. V oxidovaném stavu má výrazný absorpční pík při 420 nm a jeho fluorescenčních vlastností se využívá pro detekci metanogenních bakterií fluorescenčním mikroskopem. V redukovaném stavu své fluorescenční vlastnosti, včetně absorpčního píku při 420 nm, ztrácí.
- Koenzym M zapojený do přenosu metylové skupiny (2-merkaptotansulfonová kyselina: HS-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>), který je pozoruhodný svou nejnižší molekulovou hmotností ze všech dosud známých koenzymů.
- Koenzym B s nízkou molekulární hmotností citlivý na O<sub>2</sub>, zapojený do konečné reakce produkce metanu z metylkoenzymu M.

Tvorba metanu představuje ztrátu energie pro zvíře. Přirozeným zájmem výživy přežvýkavců je dosáhnout co nejvyšší efektivity krmení, tedy mít nejlepší vztah mezi příjmem sušiny a přírůstkem, respektive produkcí. V této perspektivě je snížení energetických ztrát eruktací plynu důležité, protože zvíře může tvorbou metanu ztratit 2–12 % hrubé energie z potravy. Nicméně zjištění, že metan je silným skleníkovým plynem otevírá další možnosti výzkumu. Víme, že metan má kapacitu absorbovat infračervené záření 23krát vyšší než oxid uhličitý a, s ohledem na jeho 10letou životnost v atmosféře, se podílí zhruba na 18 % veškerého potenciálu globálního oteplování (Rodrigues 2016).

### 3.3 Cesty ke snížení metanogeneze

V posledních 50 letech byly provedeny rozsáhlé výzkumy s cílem nalézt účinné strategie ke snížení emisí metanu ze zemědělského sektoru. Kromě skleníkového efektu tyto emise také v případě přežvýkavců představují podstatnou ztrátu energie a přispívají ke snížení účinnosti krmiv. Studie naznačují souvislost mezi inhibicí metanogeneze a zvýšením produktivity u zvířat (Mizrahi a Moraïs 2021). Strategie ke snížení metanogeneze můžeme dle Knapp et al. (2014) rozdělit do tří širokých kategorií.

#### 1. **Zvýšení produkce** díky šlechtění a dalším přístupům k managementu.

Heritabilita produkce metanu se odhaduje na 0,29 a 0,40 u ovcí respektive krav a předpokládá se, že je závislá na dědičném složení bachorového mikrobiomu. Podle Løvendal et al. (2018) existuje příznivá korelace mezi emisemi  $\text{CH}_4$  a kg vyrobeného mléka, přičemž výkonnější krávy mohou na kilogram mléka tvořit méně metanu. Beauchemin et al. (2020) upozorňuje na korelaci 0,49–0,54 mezi produkcí metanu a tvorbou mléka, která ukazuje, že šlechtěním na menší tvorbu metanu se může snižovat produktivita. Další cestou je selekce zvířat se zvýšením využíváním krmiv, respektive živin, s cílem snížení produkce metanu na jednotku masa nebo mléka (Knapp et al. 2014). Nicméně dle Baeuchemin et al. (2019) mohou absolutní emise (g/zvíře/den) růst, protože zvířata spotřebují více krmiva, aby pokryla své energetické požadavky. Aby tedy poklesly emise, musí se nutně snížit počty zvířat.

#### 2. **Krmení kvalitními krmivy** a správný management krmení a výživy může opět zvýšit produktivitu zvířat. Některá krmiva mohou zvýšit produkci propionátu nebo snížit produkci acetátu a snížit tak $\text{H}_2$ , který by se přeměnil na $\text{CH}_4$ .

Úprava krmné dávky může být vysoce efektivní při snižování tvorby metanu. Složky krmiva poskytují substrát pro mikrobiální fermentaci a rozdíly ve stravitelnosti krmiva a chemickém složení mění množství energie extrahované mikrobiomem a typy produkovaných těkavých mastných kyselin a  $\text{CH}_4$ . Podíl těkavých mastných kyselin ovlivňuje množství produkovaného metanu, protože tvorba propionátu spotřebovává redukční ekvivalenty, zatímco tvorba acetátu a butyrátu vytváří  $\text{H}_2$  pro metanogenezi (Knapp et al. 2014). Účinnost konkrétní strategie závisí na jejích účincích na tok a koncentraci  $\text{H}_2$  v bachoru, mikrobiální komunitě, fermentačních cestách, době, po kterou je krmivo v bachoru a interakci mezi těmito faktory. Cestou by mohlo být zkrmování koncentrovaných krmiv, při jejichž fermentaci vzniká více butyrátu a propionátu, které jsou přímým konkurentem metanogeneze v boji o vodík. Přináší s sebou sníženou stravitelnost vlákniny a zvýšené riziko vzniku acidóz. Zároveň krmení obilím zpochybňuje výhodu přežvýkavců, kteří dokáží přeměnit rostlinnou vlákninu nevhodnou pro člověka na živočišné produkty. Metanogenezi lze snížit i zkrmováním tuků, které nahrazují

fermentovatelný materiál – to ale může změnit složení mastných kyselin v produktech. Nejpriznivěji s ohledem na přirozené snižování N<sub>2</sub>O emisí a dalších ekologických přínosů jsou pícniny, které při vysoké kvalitě celkovou produkci metanu snižují (Beauchemin et al. 2020).

3. **Úprava bacheru**, tedy krmení specifickými látkami, které přímo či nepřímo modifikují metanogenezi nebo využívají biologickou kontrolu zaměřenou na redukci metanogenů.

Podle Knapp et al. (2014) existuje široká škála doplňků, které mohou být podávány ke snížení CH<sub>4</sub>, jako jsou chemické inhibitory, organické kyseliny nebo rostlinné sekundární metabolity. Způsob účinku závisí na konkrétní látce, ale může zahrnovat přímou inhibici metanogenů nebo metanogeneze, potlačení nálevníků a poskytnutí nebo stimulaci kompetitivní cesty pro využití H<sub>2</sub>.

Jedním z populárních přístupů je využití syntetických látek, které přímo omezují metanogenezi. Tyto sloučeniny musí ovšem snižovat emise bez toxického účinku na zvíře, člověka nebo životní prostředí. Přes to, že jsou v současnosti nákladné, měly by mít ve výzkumu prostor. Dalším atraktivním řešením je zkrmování řas. Některé typy obsahují halogenové sloučeniny florotanin a bromoformy, které inhibují koenzym M během metanogeneze a tím následně omezují tvorbu metanu. Nicméně některé druhy metanogenů jsou k těmto látkám méně citlivé než jiné. Tento přístup vyžaduje do budoucna posouzení životního cyklu řas. Během jejich produkce, sklizení, sušení a transportu vzniká oxid uhličitý, jehož množství by potenciálně mohlo předčít produkci metanu bacherem (McAllister a Newbold 2008, Beauchemin et al. 2018). S podobnou problematikou se setkáváme při použití dusičnanů. Ty by mohly při své redukci na dusitany a dále amoniak potenciálně sloužit jako konkurenční cesta využití H<sub>2</sub> na úkor metanogeneze. Dusičnany i dusitany mohou být ale z bacheru absorbovány, zvýšit tak risk otrav a dusitany mohou být metabolizovány na N<sub>2</sub>O, další významný skleníkový plyn (Beauchemin et al. 2018). V posledních letech stále roste zájem o využití sekundárních metabolitů rostlin jako jsou silice, taniny, saponiny a flavonidy. Vznikl dokonce projekt Evropské Unie Rumen-Up, který hodnotí 500 rostlin a jejich extraktů a jejich vliv na metanogenezi *in vitro* (McAllister a Newbold 2008, Beauchemin et al. 2018). Mechanismy účinku jsou široké a zahrnují potlačení nálevníků, ovlivnění trávení vlákniny a zvýšení produkce propionátu (McAllister a Newbold 2008). Přes to, že sekundární metabolity rostlin mají potenciálně význaný efekt na produkci metanu, většina mechanismů účinku není jasná. Některé z extraktů (například taniny) potlačují metanogenezi, ale zároveň snižují chutnost krmiva, které následně snižuje produkci zvířat (Sun et al. 2021). Vakcinace proti metanogenům by byla vynikajícím řešením především pro pastevní zvířata. Koncept je založen na myšlence, že očkovaná zvířata budou slinami produkovat protilátky, které při vstupu do bacheru zamezí růst metanogenů. V současné chvíli jsou pozitivní výsledky především *in vitro* a je potřeba dalšího výzkumu (Beauchemin et al. 2018), zároveň velkou část bacherových metanogenů nejsme schopni kultivovat v laboratorních podmínkách a je tedy možné, že tyto nahradí metanogeny, proti kterým je vakcína vyvinuta (McAllister a Newbold 2008). Se stejnou výzvou se setkáváme při využití bakteriofágů. Využití bakteriofágů nebo bakteriocinů by mohla být efektivní ve snížení metanogenů a přesměrování H<sub>2</sub> k redukčním bacherovým bakteriím jako jsou producenti propionátu anebo acetogeny. Obecně ale stále platí, že fágy jsou vysoce specifické pro jednotlivé hostitele a diverzita bacherového mikrobiomu tedy představuje hlavní výzvu pro tento výzkum (McAllister a Newbold 2008).

Mnoho aditiv a inhibitorů potlačuje *in vitro* metanogenezi o 60–100 %. Pokud jsou ale tyto látky podávány zvířatům, snížení emisí buď není zřejmé nebo je jen přechodné. Při zaměření na mikrobiální populace je třeba mít na paměti základní ekologické principy. S neuvěřitelnou rozmanitostí bachorových mikrobu je velmi pravděpodobné, že odstranění nebo potlačení jedné skupiny povede k tomu, že se jiná skupina přizpůsobí, aby zaplnila jejich místo (Knapp et al. 2014, Mizrahi et al. 2021). Některé z navrhovaných strategií jsou náročné na realizaci (například defaunace), další mají nízký potenciál na snížení metanogeneze (například využití droždí, přímo zkrmované mikrobiální látky, saponiny, ionofory), anebo jsou na počátku výzkumu (bakteriociny, fágy) (Baeuchemin et al. 2019). Pokud chceme, aby zemědělci přijali opatření ke snížení metanogeneze, musí být nákladově efektivní nebo přinejmenším neutrální. (Knapp et al. 2014).

### 3.4 Silice

V posledních dekádách se stále zvyšuje zájem o využívání rostlinných extraktů k manipulaci bachorové fermentace, možná v důsledku změn zavedených Evropskou unií, která zakazují používání antibiotik podporujících růst (McAllister et al. 2008). Výzkumy prokazují potenciál sekundárních metabolitů při manipulaci s fermentací v bachoru prostřednictvím antibakteriální aktivity, zmírnění emisí metanu z bachoru, stejně jako zlepšení podílu bachorového propionátu a bypass proteinu do střeva, zlepšení výkonnosti a zdraví zvířat (Calabrò 2015, Torres et al. 2020). Mezi sekundární metabolity, které se nacházejí pouze u některých druhů rostlin, patří i silice. Ty hrají důležitou roli v antibiotické, antivirotické, antimykotické a insekticidní ochraně rostlin, v přitahování organismů, které rostliny opylují a rozšiřují jejich semena, brání klíčení semen a zároveň dodávají rostlinám a kořeni jejich charakteristickou chuť, vůni a barvu (Benchaar et al. 2007, Benchaar & Greathead 2011, Bakali et al. 2018, Hanif et al. 2019). Jejich molekulová hmotnost pod 300 umožňuje jejich fyzické oddělení od jiných rostlinných složek nebo membránové tkáně (Turek & Stintzing 2013). Tradičně se extrahují z rostlin vodou a destilací párou, další metody zahrnují extrakci rozpouštědlem, superkritickou extrakcí oxidem uhličitým a expresní extrakcí. Mezi rostlinami stejného druhu a v různých částech stejné rostliny mohou existovat velké rozdíly ve složení silic a to jak v důsledku vnitřních (sezónní, ontogenetické a genetické variace), tak vnějších (ekologické a environmentální aspekty) faktorů. Genetické variace mohou mít za následek expresi různých metabolických drah a následně mohou nastat kvantitativní a kvalitativní variace ve složení silic (Bechaar & Greathead 2011, Zuzarte & Salgueiro 2015). Podle Hanif et al. (2019) je můžeme najít v květech rostlin (růže, pomeranč, levandule), listech (máta, eukalyptus, bobkový list, tymián, šalvěj), oddencích (zázvor), kořenech (vetiverie), semenech (koriandr), plodech (anýz, fenykl) a dřevě a kůře (santalové a růžové dřevo). Mezi hlavní čeledi rostlin obsahující silice patří miříkovité, hvězdicovité, cypřišovité, hluchavkovité, vavřínovité, myrtovité, borovicovité, pepřovníkovité, santálovité a zázvorníkovité (Zuzarte & Salgueiro 2015). Podle Bechaar & Greathead (2011) zůstává výzvou identifikace silic, které selektivně inhibují bachorovou metanogenezi s trvalými účinky, bez snížení příjmu a trávení krmiva a produktivity zvířat.

### 3.4.1 Chemické vlastnosti silic

V přírodě se setkáváme s dvěma druhy metabolitů: primárními a sekundárními. Primární jsou univerzální látky, vyskytující se u všech živých organismů, tedy bílkoviny, cukry, tuky a nukleové kyseliny. Sekundární metabolity se vyskytují jen u některých druhů a, na rozdíl od primárních metabolitů, se pravděpodobně nepodílejí na růstu, vývoji, reprodukci rostlin ani ukládání živin. Silice jsou komplexní směsí těkavých, většinou lipofilních (rozpuštěných v tucích) sekundárních metabolitů rostlin, s obecnou hustotou nižší než je hustota vody, kapalných při pokojové teplotě. Hlavní základní uhlovodíkovou jednotkou silic je isopren, ale každá silice může být složena z 20–60 různých chemických látek jako jsou alkoholy, aldehydy, ketony, estery, ethery či sulfidy (Hüsnu et al. 2007, Benchaar & Greathead 2011, Cobellis et al. 2016). Různé sloučeniny mohou mít aditivní, antagonistické nebo synergické účinky. Nejdůležitější účinné látky jsou zahrnuty do dvou chemických skupin: terpenoidy a fenylypropanoidy. Pocházejí z různých prekurzorů primárního metabolismu a jsou syntetizovány samostatnými metabolickými drahami, ale jsou mezi nimi minimální strukturální a chemické rozdíly (Calsamiglia et al. 2007, Hanif et al. 2019). Některé ze silic jsou přítomny vždy a přispívají ke specifické vůni, chuti a barvě rostlin, zatímco jiné jsou vylučovány v reakci na stres jakým je infekce, poškození, predátoři a environmentální změny. Mají také zásadní roli v interakci mezi rostlinami a prostředím (Cobellis et al. 2016, Dhanasekaran et al. 2019, Angane et al. 2022). V rostlinách se silice vyskytují v olejových buňkách, sekrečních kanálcích nebo dutinách nebo ve žlázových chlupcích. V některých případech jsou vázány se sacharidy ve formě glykosidů (Hüsnu et al. 2007).

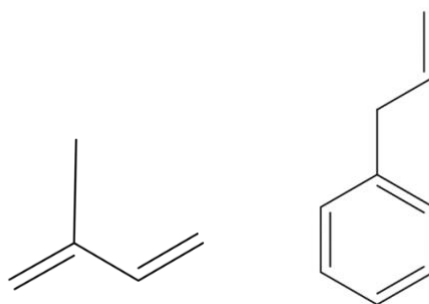
Mezi rostlinami stejného druhu a v různých částech stejné rostliny mohou existovat velké rozdíly v kvalitativním i kvantitativním složení silic chemické složky silic jsou náchylné ke změnám i závislosti na metodě extrakce (Angage et al. 2022).

#### 3.4.1.1 Rozdělení silic

Silice jsou typicky složeny z terpenových a fenylypropanových sekundárních metabolitů, které určují jejich biologické vlastnosti. Obecně v jedné rostlině dominují sloučeniny jedné třídy. Terpeny jsou početnější a diverzifikovanější skupinou (podle Calsamiglia et al. 2007 bylo popsáno kolem 15 000 různých sloučenin), jsou odvozené od základní struktury isoprenu (základní struktura 5 uhlíků, 8 vodíků – C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>) a jsou klasifikovány v závislosti na počtu jednotek v její kostře (Bakkali 2007, Calsamiglia et al. 2007, Zuzarte & Salgueiro 2015). V silicích se nejčastěji vyskytují monoterpeny (C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>) a seskviterpeny (C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>). Monoterpeny tvoří až 90 % mnohých silic a seskviterpeny mající podobnou strukturu a funkci, se s monoterpeny většinou společně hromadí (Zuzarte & Salgueiro 2015, Cobellis et al. 2016). Biosyntéza terpenů zahrnuje dva univerzální prekurzory: isopenenylpyrofosfát a dimethylallyldifosfát. Ve vyšších rostlinách je isopenenylpyrofosfát biosyntetizován v cytosolu z kyseliny mevalonové Mevalonátovou nebo nemevalonátovou (tedy nezávislou na mevalonátu) dráhou nebo v chloroplastech deoxyxylulosofosfátovou dráhou. Většina seskviterpenů je tvořena první zmíněnou cestou, většina mono a diterpenů druhou (Zuzarte & Salgueiro 2015). Jejich kondenzací vzniká monoterpen (C<sub>10</sub>), ze kterého se tvoří další typy monoterpenů a z nich se následně tvoří řada lineárních a cyklických monoterpenů (Benchaar &

Greathead 2011). Terpeny mají různé stupně nasycení, substitucí a kyslíkaté deriváty, obecně nazývané jako terpenoidy (Zuzarte & Salgueiro 2015).

Fenylpropanoidy jsou sloučeniny s řetězcem 3 uhlíků vázaných na aromatický kruh s 6 uhlíky. Jsou syntetizovány šikimátovou metabolickou drahou, kterou využívají rostliny k syntéze aromatických aminokyselin fenylalaninu a tyrosinu. Deaminací fenylalaninu se získá kyselina skořicová, deaminací tyrosinu kyselina p-hydrokskořicová, základní stavební jednotky fenylpropylu (aromatický C6 kruh s připojeným C3 řetězcem). Fenylpropyl poskytne po hydroxylaci kyselinu 4-kumarovou, ze které se řadou reakcí syntetizují fenylpropeny (Benchaar & Greathead 2011). Ty obsahují jednu nebo více jednotek C6-C3 (C6 je benzenový kruh). Mnohé jsou fenoly nebo fenolethery a v některých případech (např. u methylsalicylátu) je postranní řetězec zkrácen (C1) (Zuzarte & Salgueiro 2015).



Obrázek 3. Základní stavební jednotky terpenů a fenylpropenu, izoprenová a fenylpropylová jednotka (Benchaar & Greathead 2011), molview.org

### 3.4.2 Vlastnosti silic

Mnohé ze složek sekundárních metabolitů silic a tím pádem i silice samotné, mají antibakteriální, antivirovou, protiplísňovou a insekticidní aktivitu (Sun et al. 2021). Přes to, že se podle Bechaar & Greathead (2011) citlivost mikrobů na silice různí, jsou předmětem zájmu odborníků na výživu zvířat, kteří je chtějí využívat jako krmných aditiv k úpravě bacherové fermentace, zvýšení užitkovosti a zdraví hospodářských zvířat, zlepšení využití krmiv a snížení metanogeneze (Benchaar & Greathead 2011, Kholif & Olafadehan 2021). Antimikrobiální aktivita silic proti bacherovému mikrobiomu (houby, prvoci a bakterie) je v potenciálu fenolických i nefenolických složek proniknutí do membrány bakteriální buňky a jejího rozložení, což vede k úniku iontů. Jejich vliv na bacherový mikrobiom závisí na druhu zkonsumované rostliny (Kholif & Olafadehan 2021). K antibakteriální aktivitě přispívají další četné sloučeniny silic jako terpeny, terpenoidy, estery, alkoholy, kyseliny a další, ale podle Angane et al. (2022) není rozpoznání nejúčinnějších složek silic díky jejich složitému chemickému složení jednoduché, navíc k jejich antibakteriální aktivitě nepřispívá pouze jediná sloučenina.

### 3.4.2.1 Vliv na metanogenezi

Metanogeneze je důležitý metabolický proces v bachoru, který funguje jako cesta využití vodíku. Vodík produkovaný během fermentace vlákniny je okamžitě využit metanogeny pro tvorbu metanu, a proto se nehromadí v bachoru, kde by jinak bránil další fermentaci. Vzhledem k tomu, že metan je skleníkovým plynem s vysokým potenciálem globálního oteplování a zároveň pro jeho tvorbu představuje pro zvíře ztrátu 2–15 % energie přijaté potravou, jsou cesty ke snížení jeho produkce v hledáčku vědců (Pawar et al. 2014, Mizrahi et al. 2021). V současné chvíli můžeme předpokládat několik cest ke snížení metanogeneze:

- snížení počtu prvoků v bachoru a inhibice metanogeneze s nutností přeměrovat  $H^+$  do alternativních produktů,
- snížení produkce vodíku v bachoru,
- zvýšení produkce kyseliny propionové, alternativní cesty využití  $H^+$  (McAllister & Newbold 2008, Sun et al. 2021).

Jak bylo popsáno v kapitole 3.2.1. Bachorový ekosystém, některé z metanogenních archaeí mají symbiotický vztah s bachorovými nálevníky a žijí buď uvnitř nebo vně jejich těl. To je podle Calabrò (2015) pravděpodobný důvod, proč je defaunace (odstranění prvoků) bachoru spojována s redukcí produkce metanu. Metanogeny ztratí své symbiotické partnery a tím dojde ke snížení jejich biologické aktivity. Nicméně vliv silic na prvoky není zcela jednoznačný. Zatímco Kholif & Olafadehan (2021), Sun et al. (2021) mluví o možné inhibici růstu prvoků silicemi, Benchaar et al. (2008) a Bodas et al. (2012) píší o nekohorentních a proměnlivých výsledcích, Khiaosa-ard & Zebeli (2013) ve své metaanalýze zmiňují, že zatímco malé dávky silic (< 0,20 g/kg krmiva/den) počet prvoků zvyšují, vyšší dávky dramaticky jejich počet snižují. Potenciál vybrat silice, které redukuje produkci metanu selektivní inhibicí prvoků je tedy jednou z výzev budoucího výzkumu. Za zmínku stojí i možné využití vodíky díky biohydrataci (mikrobiální přeměna nenasycených mastných kyselin na nasycené a tím snížení biologické dostupnosti vodíku), zde je ale potenciál využití vodíku příliš malý, protože biohydratace jej spotřebovává pouze 1–2 % (Mizrahi et al. 2021). Podle Sun et al. (2021) je prostředkem ke snížení produkce metanu využití krmných aditiv rostlinného původu hlavně vzhledem k jejich ovlivňování složení bachorového mikrobiomu a zvýšení konkurence o vodík díky jejich antibakteriálním vlastnostem. Způsob účinku, kterým silice ovlivňují produkci metanu, se u každé silice liší, svou roli hraje přítomnost terpenoidů, fenolů a dalších složek, které mají silné antimikrobiální účinky (Kholif & Olafadehan 2021), proto se tato studie věnuje využití konkrétních účinných látek silic. Změna ve složení bachorového mikrobiomu se projevuje zvýšeným obsahem kyseliny propionové v produktech fermentace, která je vytvářena většinou gramnegativními bakteriemi (Benchaar & Greathead 2011). Kyselina propionová, respektive propionát, je hlavním prekurzorem glukózy pro přežvýkavce, a její zvýšení je žádoucí u zvířat s vysokými nároky na glukogenní prekurzory. Redukční acetogeneze (tvorba acetátu z  $CO_2$  a  $H^2$ ) by byla také žádoucím procesem, protože acetát je nejen zdrojem energie, ale slouží i k syntéze mastných kyselin s dlouhým řetězcem, nicméně je termodynamicky překonána metanogenezí (Beachemin et al. 2019). Teoreticky by tedy přeměrování vodíku z metanogeneze do konečných produktů fermentace, které mohou být absorbovány a využity hostitelem, stejně tak bachorovým mikrobiomem, nepomohlo jen snížit produkci vodíku, ale

potenciálně zvýšit produkci hostitele (Beauchemin et al. 2019).

#### 3.4.2.1.1 Mechanismus účinku

Co přesně rozhoduje o antimikrobiální aktivitě sekundárních metabolitů je nejasné. Je pravděpodobně závislá na obsažených chemických složkách a funkčních skupinách obsažených v silicích, jejich poměrů a vzájemné interakci mezi nimi (Benchaar et al. 2008, Benchaar & Greathead 2011). Použití silic s obsahem fenypropanoidů (karvakrol – fenolová sloučenina, cinnamaldehyd – karbonylová sloučenina) se prokázalo silnější antimikrobiální aktivitou než silic, které obsahují monoterpeny (Dhanasekaran et al. 2019). Antimikrobiální účinnost silic je závislá na nejen na jejich chemickém složení, ale i podmínkách prostředí a strukturách cílových bakterií (buď grampozitivních nebo gramnegativních bakterií) (Angane et al. 2022).

Zcela zásadní pro antimikrobiální aktivitu silic a jejich účinných látek se zdá být jejich hydrofobní podstata. Silice se přesunují z vodné fáze do lipidové dvouvrstvy cytoplazmatické membrány, kde se hromadí (Bechnaar & Greathead 2011). Předpokládá se, že právě v lipidové dvouvrstvě dochází k jednomu nebo více jejich antimikrobiálních účinků, kdy mění propustnost membrány a tím narušují transport iontů, interagují s membránovými proteiny a/nebo s dalšími cytoplazmatickými složkami. Těchto reakcí je dosahováno difuzí silic do membrány nebo do cytoplazmy. Silice jsou směsí sekundárních metabolitů a je tedy pravděpodobné, že existuje řada mechanismů účinku (Benchaar & Greathead 2011). Antimikrobiální aktivita silic může být zároveň viděna jako inhibice buněčného růstu nebo zabíjení buněk. Podle Angane et al. (2022) není snadné od sebe tyto způsoby působení odlišit.

Většina silic i jejich účinných látek je aktivnější proti grampozitivním bakteriím než gramnegativním bakteriím kvůli rozdílu ve struktuře buněčné stěny, kdy vnější membrána gramnegativních bakterií, obsahující více lipopolysacharidů, zřejmě působí jako bariéra proti silicím. Existují ovšem silice, například karvakrol, karvon, thymol a další (Cobellis et al. 2016, Ju et al. 2020, Kholif & Olafadehan 2021), jejichž sekundární metabolity jsou natolik malé, že projdou poriny (bílkovinovými kanály) ve vnější membráně, nebo molekuly, které mohou interagovat prostřednictvím vodíkových můstků s vodou a pomalu procházet buněčnou stěnou difuzí (Calsamiglia et al. 2007, Benchaar & Greathead 2011, Angane et al. 2022), dále pak snižovat expresi genů souvisejících s membránovým porinem a ničit transportéry aminokyselin (Ju et al. 2020).

Ztráta stability membrány grampozitivních bakterií má za následek únik iontů přes buněčnou membránu, což způsobuje pokles transmembránového iontového gradientu. Například cinnamaldehyd se snadno rozpouští v mastném acylovém řetězci buněčné membrány a ničí její vnější membránu, což má za následek zvýšení permeability buněčné membrány, odtok adenosintrifosfátu a buněčnou smrt. Další silice interagují s molekulami fosfolipidů, čímž se mění podíl a struktura mastných kyselin v membráně (Ju et al. 2020). Podle Bechaar & Greathead (2011) je dobře zdokumentovaná antimikrobiální aktivita thymolu a karvakolu, fenylových monoterpenů, které jsou ve vysokých koncentracích v silicích oregana a tymiánu. Oba zvyšují tekutost a propustnost buněčné membrány, která vede ke ztrátě obsahu buňky a její lýze. Obě tyto látky také ovlivňují pohyb vodíkových a draslíkových kationtů, tím ovlivňují protonovou hybnou sílu (elektrochemický gradient, energie pohánějící syntézu ATP), což vede

k vyčerpání intracelulárního ATP v důsledku inhibice jeho syntézy nebo zvýšení rychlosti hydrolyzy. Studie Ultee et al. (2002) ukazuje, že hydroxylová skupina těchto metabolitů a přítomnost delokalizovaných elektronů je pro jejich antimikrobiální aktivitu zásadní. Kolaps protonové hybné síly, snížení pH gradientu cytoplazmatické membrány a vyčerpání ATP nakonec vedou k buněčné smrti. V některých případech mohou bakterie vyvážit tyto účinky pomocí iontových pump a buněčná smrt nenastane, ale velké množství energie je přeměrováno na tuto funkci a růst bakterií je zpomalen (Calsamiglia et al. 2007).

Hlavní účinek silic a jejich účinných látek jako antimikrobiálních látek je zaměřen na jejich působení na buněčnou membránu, není to ovšem jediný mechanismus účinku. Gill & Holley (2004) říkají, že mechanismus účinku eugenolu, hlavní složky silic hřebíčku, je v účincích na výrobu energie. Možný mechanismus účinku je v inhibici glykolytických enzymů a tím znemožnění využívání buněčné glukózy nebo příjmu glukózy a změny propustnosti membrány jak gramnegativních tak grampozitivních bakterií. Buněčné dýchání (schopnost mikroorganismů produkovat energii), je v podstatě oxidativní rozklad sacharidů. Při inhibici oxidace a rozkladu cukrů jsou narušeny normální metabolické procesy organismu, což může vést až ke smrti. Například silice tymiánu inhibují aktivitu ATP syntázy, čímž narušují cyklus trikarboxylových kyselin, čímž narušují normální metabolismus buňky a inhibují růst mikroorganismu. Mezi další antimikrobiální aktivity silic je například působení česneku, zřejmě spojené se sulfidy allicinu a diallylu. Allicin interaguje s proteiny a aminokyselinami obsahující sulfhydrylovou skupinu, což vede k poškození funkcí buňky (Benchaar & Greathead 2011, Ju et al. 2020). Eugenol, fenolická sloučenina silice skořice, může inaktivovat některé mikrobiální enzymy (Cobellis et al. 2016).

Antibakteriální aktivita silic závisí na jejich hlavních složkách nebo vztahu mezi složkami. Antibakteriální mechanismy různých antimikrobiálních látek se mohou lišit. Antibakteriální mechanismus silic proto obvykle nespočívá v jediném mechanismu účinku, ale v koexistenci více způsobů účinku (Ju et al. 2020). Antimikrobiální aktivita silic může být zároveň viděna jako inhibice buněčného růstu nebo zabíjení buněk. Podle Angane et al. (2022) není snadné od sebe tyto způsoby působení odlišit.

#### 3.4.2.2 Další výhody silic v krmivech

Sekundární metabolity rostlin jsou využívány pro své antimikrobiální vlastnosti, ale atraktivní doplňky krmiv z nich dělá i jejich schopnost zlepšit využívání krmiv, výkonnosti a zdraví zvířat. Orzuna-Orzuna et al. (2022) ve své metaanalýze shrnuje výsledky 34 studií z let 2010–2022 z deseti zemí a výsledky jsou následující.

Zařazení silic do krmné dávky zvýšilo příjem sušiny, dusíkatých látek, neutrální a kyselé detergentní vlákniny. Některé silice mají pozitivní efekt na bachorové houby a populace fybriolytických bakterií trávících neutrální detergentní vlákninu, což může vést ke zrychlení průchodu částic bachorem a tím zvýšit příjem sušiny. Silice mohou zlepšit chuť a chutnost krmiv a dokonce jejich kvalitu. Některé silice totiž obsahují bioaktivní sloučeniny (např. terpeny a terpenoidy) s antioxidačními a antimikrobiálními vlastnostmi.

Zahrnutí silic do krmné dávky také zvýšilo denní přírůstek, konverzi krmiva, finální živou hmotnost zvířat a váhu jatečně upraveného těla. Jak je zmíněno výše, silice zvyšují příjem sušiny a živin, což částečně vysvětluje vyšší denní přírůstek. Nízké dávky silic (260 mg/den)

navíc zvyšují délku bachorových papil až o 30 %, tím se zvyšuje plocha pro absorpci těkavých mastných kyselin a i to může vést ke zvýšení denního přírůstku a zlepšit účinnost krmiv. Orzuna-Orzuna et al. (2022) také předpokládá, že snížení dusíku v moči naznačuje, lepší využití dusíku mikrobiomem potažmo hostitelem. Silice podle Kholif & Olafaden (2021) obvykle snižují produkci amoniakálního dusíku v bachoru, což vede ke zvýšenému využití krmných bílkovin hostitelem a tento účinek je způsoben především poklesem populace prvoků, protože jejich role při degradaci dusíku v bachoru je nepopíratelná. Podle Khiaosa-ard & Zebeli (2013) zkrmování silic v množství 0,43 g/kg krmiva/ den zvýšilo obsah proteinu.

Přes to, že výzkumy ukazují pozitivní výsledky zkrmování silic, je nutné si uvědomit, že mechanismus účinku většiny silic zůstává neznámý a většina studií probíhá *in vitro*. Je tedy potřeba nadále zkoumat účinky silic i jejich účinných látek a jejich specifických účinků na bachorový ekosystém. Podle Sun et al. (2021) stále chybí extenzivní výzkum použití rostlinných extraktů u zvířat a účinek dlouhodobého využívání rostlinných extraktů na zvířata je stále nejasný.

#### 3.4.2.3 Rizika využití silic

Výzvou podle Benchaar & Greathead (2011) zůstává identifikace silic a konkrétních účinných látek, které selektivně inhibují bachorovou metanogenezi při běžném krmení s dlouhotrvajícím efektem bez snížení příjmu krmiva nebo produkce. Ve studiích se setkáváme se specifickou problematikou jednotlivých látek spíše než s celkovými negativními následky. Například sloučeniny česneku a cibule obsahující síru se ukázali jako hemotoxické pro hovězí dobytek a koně (Benchaar & Greathead 2011). Jedním z nejdůležitějších problémů krmení silicemi je však dočasná a nejednoznačná adaptace bachorové mikroflóry po určité době suplementace. Výzkum možné adaptace bachorových mikroorganismů je stále omezený. Nedostatečný účinek silic může být způsoben schopností bachorových mikrobů přizpůsobit se (Benchaar & Greathead 2011, Kholif & Olafadehan 2021). Také množství silic v krmivu by mělo být stanoveno velmi pečlivě, protože silné aroma některých silic může mít negativní vliv na příjem krmiva, stejně tak některé sekundární metabolity mohou být svými antimikrobiálními a antinutričními účinky ve vysokých dávkách toxické pro celý bachorový mikrobiom (Kholif & Olafadehan 2021, Orunza-Orunza et al. 2022). Účinky některých silic jsou závislé na pH a krmivu a jejich použití může být přínosné pouze za specifických podmínek a výrobních systémů (Calsamiglia et al. 2007). Navíc významné zvýšení příjmu sušiny díky silicím nastává po zkrmování po více než 90 dní, což naznačuje, že skot si musí na příjem silic navyknout, ale tato adaptace může vyžadovat zkrmování silic po delší dobu (Orunza-Orunza et al. 2022), na druhou stranu je možné, že se bachorový mikrobiom silicím po určité době přizpůsobí.

Silice mohou být cestou pro zmírnění metanogeneze přežvýkavci, je však potřeba dalšího výzkumu, který zodpoví na otázky týkající se účinných látek, dávek, mechanismů účinku, vlivu na organoleptické vlastnosti živočišných produktů a poměr nákladů a přínosů (Cobellis et al. 2016).

## 4 Metodika

Veškeré pokusy se zvířaty byly vedeny v souladu s českou legislativou (zákon č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání) a platnými evropskými směrnici a nařízeními (směrnice 2010/63/EU, o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely). Experimentální protokol byl schválen Etickou komisí zvířat Ústavu živočišné výroby (Praha, Česká republika). Tato studie byla pro zajištění vhodné péče o zvířata provedena v souladu s pokyny ARRIVE. Testované krávy byly ustájeny na experimentální farmě Ústavu živočišné výroby (Netluky, Praha, Česká republika).

### 4.1 Design experimentu

K vyhodnocení účinků dvou koncentrací (250 a 500 mg/l) pěti silic (isobornyl acetate, carene, citronellol, caryophyllene, benzylideneacetone) na produkci CH<sub>4</sub> a fermentaci v bacheru byla použita 24hodinová vsádková inkubace.

Byly provedeny 3 série (samostatné inkubace), v průběhu každé série bylo každé ošetření opakováno ve dvou inkubačních lahvích. Průměr z těchto dvou opakování byl použit do statistické analýzy.

### 4.2 Zvířata, krmivo a substráty

Vzorky obsahu v bacheru byly odebírány ručně bacherovou kanylou (vnitřní průměr 10 cm) z různých míst v bacheru 3 hodiny po ranním krmení. Jako dárkyně byly použity dvě holštýnské krávy na začátku laktace (tělesná hmotnost  $584 \pm 20$  kg; produkce  $32 \pm 2$  kg mléka/den). Krávy byly krmeny směsnou krmnou dávkou, která se (v sušině) skládala z kukuřičné siláže (337 g/kg), luštěninovo-obilné siláže (58 g/kg), vojtěškové siláže (53 g/kg), kukuřičné siláže s vysokou vlhkostí (50 g/kg), pivovarského zrna (37 g/kg), pšeničné slámy (18 g/kg), tekutého doplňku (50:50 směs melasy a glycerolu; 83 g/kg) a koncentrované směsi (364 g/kg). Krmivo bylo podáváno dvakrát denně (04:00 a 16:00) ad libitum.

Odebrané vzorky obsahu bacheru byly okamžitě transportovány do laboratoře v termolahvích. Interval mezi odběrem vzorků a dalším zpracováním vzorku byl 20–30 minut. V laboratoři byl pro získání bacherové tekutiny obsah bacheru za průběžného proplachování CO<sub>2</sub> a scezen přes nerezové síto (250 μm; Retsch, Haan, Německo). Bacherové tekutiny od dvou dárcovských krav byly smíchány ve stejném poměru.

Experimentální substrát byl složen z (na základě sušiny) kukuřičné siláže (300 g/kg), vojtěškové siláže (300 g/kg) a ječmene (400 g/kg). Vysušené suroviny byly rozemlety a protlačeny přes 1 mm síť. Chemické složení na kilogram substrátu (v sušině) bylo následující: organická hmota 951 g/kg; hrubý protein 154 g/kg; etherový extrakt 25 g/kg; škrob 306 g/kg; neutrálně detergentní vláknina (NDF) 354 g/kg; acidodetergentní detergentní vláknina (ADF) 193 g/kg.

### 4.3 In vitro inkubace

*In vitro* inkubace byly prováděny po dobu 24 hodin ve 120 ml serum bottle. Sušený mletý substrát (200 mg) byl navážen do sterilních sérových lahví propláchnutých CO<sub>2</sub> den před

inkubací. Kultivační tekutina (20 ml) byla dávkována do každé sérové lahve pomocí dávkovače s uzávěrem lahve (Calibrex 530 Salutae, Socorex, Švýcarsko) pod proudem CO<sub>2</sub>. Kultura byla připravena smícháním kompozitní (od dvou dojníc) bachorové tekutiny s médiem (1:3, v/v), jak bylo popsáno výše. Výsledná směs byla okamžitě proplachována CO<sub>2</sub> při 39 °C po dobu 10 minut před přidáním do lahví. Účinné látky silic byly dávkovány v roztoku etanolu. Byly připraveny zásobní roztoky tak, aby přidáním 200 Do kontrolních a slepých lahví bylo přidáno ekvivalentní množství vody a ethanolu, aby se kompenzovaly možné účinky rozpouštědel na fermentaci. Počáteční plynná fáze v horním prostoru lahve ve všech inkubacích byl CO<sub>2</sub>. Všechny lahvičky se sérem byly uzavřeny a umístěny do vodní lázně s řízenou teplotou (SW 22; Julabo, Německo) při 39 °C s frekvencí 90 ot./min. po dobu 24 hodin.

#### 4.4 Odběr vzorků a chemická analýza

Celkový objem vyprodukovaného fermentačního plynu byl odhadnut z tlaku plynu v horním prostoru lahve (headspace) pomocí Boyleova zákona. Tlak plynu byl měřen po 24 hodinách inkubace pomocí manometru (Traceable; Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA). Plyn z horního prostoru byl poté odebírán vytěsněním do zkumavky (5 ml) předem naplněné destilovanou vodou zavedením jehly o průměru 23 zátkou lahve. Koncentrace CH<sub>4</sub> v ve fermentačním plynu byla měřena pomocí plynové chromatografie dle Joch et al. (2019).

Koncentrace každé těkavé mastné kyseliny v kulturách byla stanovena pomocí plynové chromatografie. Koncentrace TMK byly vypočteny jako rozdíl mezi koncentracemi ve vzorku tekutiny po 24 hodinách inkubace a počátečními koncentracemi, a proto byly uvedeny jako čisté produkované (net VFA; nVFA. ADMd) bylo stanoveno gravimetricky výpočtem rozdílu mezi hmotností inkubovaného substrátu a suchou hmotností fermentačního zbytku, normalizované na hmotnost zbytku ve slepém pokusu.

#### 4.5 Statistická analýza

Hlavní účinek ošetření byl analyzován pomocí postupu PROC MIXED v SAS (SAS Enterprise Guide 6.1, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) podle randomizovaného kompletního blokového designu. Blokovacím faktorem byla série (n = 3). Před statistickou analýzou byly laboratorní opakování (paralelní lahve z jedné série s každým ošetřením) zprůměrovány na sérii. Model byl: kde  $Y_{ij}$  je závislá proměnná,  $\mu$  je celkový průměr,  $T_i$  je fixní účinek ošetření ( $i = 11$  úrovní; kontrola, 5 silic  $\times$  2 koncentrace),  $R_j$  je náhodný účinek série ( $j = 1, 2$  a 3) a  $e_{ij}$  je reziduální chyba. Průměry ošetření byly porovnány s kontrolou pomocí Dunnettova testu a rozdíly mezi každou léčbou a kontrolou byly považovány za významné při  $P < 0,05$ .

## 5 Výsledky

Výsledky (Tabulka 1) ukazují, že produkce metanu byla snížena všemi vybranými silicemi obou koncentrací. Nejlepší výsledky z pohledu procentuálního snížení celkové produkce metanu v mililitrech na gram inkubované sušiny mají tyto tři silice: citronellol v koncentraci 500 mg/l snížil produkci metanu oproti kontrolní skupině o 70,7 %, isobornyl acetate v koncentraci 500 mg/l – 51,7 % a benzylideneacetone v koncentraci 500 mg/l – 42,7 % ( $P < 0,05$ ).

Na celkovou produkci plynů působil nejvíce citronellol (500 g/l), isobornyl acetate (500 mg/l) a carene (500 mg/l). Respektivě snížili produkci plynů o 36,4 %, 20,7 % a 17,4 %. Nejméně potlačil celkovou tvorbu plynů benzylideneacetone (250 g/l) – 3,7 %.

Na stravitelnost sušiny měl významější vliv citronellol v koncentraci 250 mg/l (snížení stravitelnosti sušiny o 15 %) a benzylideneacetone koncentrace 500 mg/l (12,1 %). Žádná z dalších látek nesnížila stravitelnost o více než 6,7 % ( $P < 0,05$ ).

Až na caryophyllene o koncentraci 250 mg/l statisticky významně zvýšily pH všechny látky a koncentrace.

Isobornyl acetate v koncentraci 250 mg/l byl jedinou sloučeninou, která vedla ke zvýšení koncentrace  $\text{NH}_3\text{-N}$ , a to o 2,1 % ( $P < 0,01$ ). Citronellol ve stejné koncentraci způsobil pouze nevýznamné snížení 0,69 % ( $P < 0,01$ ). Ostatní testované látky při koncentraci 250 mg/l vedly ke snížení hladiny  $\text{NH}_3\text{-N}$  maximálně o 9 % ( $P < 0,05$ ). Nejvýraznější pokles byl zaznamenán u citronellolu při koncentraci 500 mg/l, kde došlo ke snížení koncentrace  $\text{NH}_3\text{-N}$  o 36,1 % ( $P < 0,05$ ).

Výsledky v Tabulce 2 ukazují, že celkovou tvorbu těkavých mastných kyselin nejméně ovlivnil isobornyl acetat a caryophyllene v koncentraci 250 mg/l (snížení obsahu celkových TMK o 1,3 %) a benzylideneacetone (koncentrace 500 mg/l) – snížení celkové produkce o 5,3 % ( $P < 0,05$ ). Nejvíce byla celková tvorba TMK snížena citronellolem v koncentraci 500 mg/l o 40,4 % ( $P < 0,05$ ). Poměr acetátu a propionátu vůbec neovlivnil isobornyl acetate 250 mg/l; o 3,5 % změnil poměr produkce A:P citronellol (250 mg/l) a carene (250 mg/l) ( $P < 0,05$ ).

Pro srovnání úspěšnosti snížení celkové produkce metanu a celkové produkce těkavých mastných kyselin (viz Graf 1) jsou v nejlepším poměru (nejvyšší hodnoty snížení produkce celkového metanu oproti nejmenšímu snížení celkové produkce těkavých mastných kyselin) následující silice: isobornyl acetate (koncentrace 500 mg/l), carene (koncentrace 500 mg/l) a benzylideneacetone (koncentrace 500 mg/l), které snižují metanogenezi o 51,7 respektive 41,00 a 42,7 % ml/g inkubované sušiny substrátu oproti kontrolní skupině a snižují celkovou produkci TMK o 14, respektive 14,3 a 16,2 % mmol/l ( $P < 0,05$ ) celkových těkavých mastných kyselin oproti kontrolní skupině.

## 5.1 Tabulka 1.

Vliv účinných látek silic na produkci plynu a metanu *in vitro*, stravitelnost sušiny a pH. ISS = inkubovaná sušina substrátu; CPP celková produkce plynů. Hvězdičkou jsou označeny hodnoty, které se od kontrolní skupiny (0 mg/l) výrazně liší (P < 0,05).

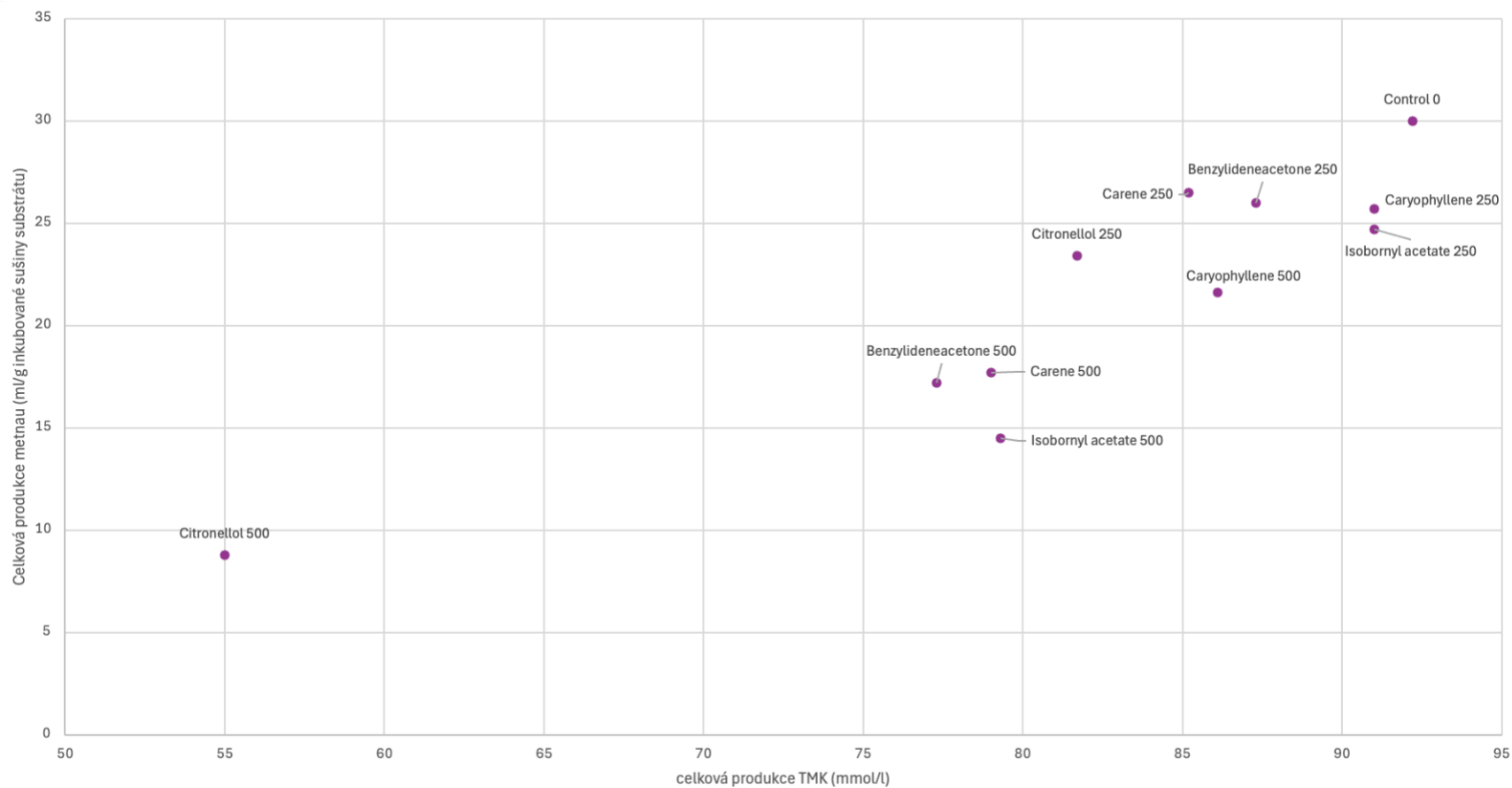
Ošetření	Koncentrace (mg/l)	Celková produkce plynů (ml/g ISS)	Metan			Stravitelnost sušiny (g/g)	pH	NH <sub>3</sub> -N (mg/dl)
			(ml/g ISS)	(% z CPP)	(ml/g strávené sušiny)			
<b>Kontrola</b>	0	213,4	30,0	14,0	55,7	0,536	6,29	29,1
<b>Isobornyl acetate</b>	250	201,3*	24,7*	12,2*	46,4*	0,527	6,33*	29,7
	500	169,2*	14,5*	8,5*	27,5*	0,530	6,40*	25,7*
<b>Carene</b>	250	201,9*	26,5*	13,1*	49,8*	0,535	6,32*	26,5*
	500	176,3*	17,7*	10,0*	33,8*	0,522	6,38*	23,4*
<b>Citronellol</b>	250	193,4*	23,4*	12,1*	51,8*	0,456*	6,36*	28,9
	500	135,8*	8,8*	6,4*	17,0	0,512	6,43*	18,6*
<b>Caryophyllene</b>	250	201,0*	25,7*	12,8*	51,6	0,500	6,30	27,8
	500	187,4*	21,6*	11,5*	42,7*	0,503	6,32*	24,3*
<b>Benzylideneacetone</b>	250	205,5*	26,0*	12,6*	51,3	0,509	6,31*	26,7*
	500	181,0*	17,2*	9,5*	36,7*	0,471*	6,38*	24,5*
<b>SEM</b>		2,4	0,75	0,28	1,38	0,0057	0,007	0,38
<b>P hodnota</b>		P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001

## 5.2 Tabulka 2.

Účinky účinných látek silic na *in vitro* celkovou produkci těkavých mastných kyselin (TMK) a jejich molární podíl; poměr A:P je poměr acetátu a propiátu. Hvězdičkou jsou označeny hodnoty, které se od kontrolní skupiny (0 mg/l) výrazně liší ( $P < 0,05$ ).

Ošetření (mg/l)	Koncentrace (mg/l)	Celková produkce TMK (mmol/l)	Molární podíl TMK (mol/100 mol)						A:P
			Acetát	Propionát	Butyrát	<i>iso</i> -butyrát	Valerát	<i>iso</i> -valerát	
<b>Kontrola</b>	0	92,2	59,3	22,7	13,2	0,72	2,3	1,8	2,6
<b>Isobornyl acetate</b>	250	91,0	58,9	23,3	12,5	0,70	2,7	1,8	2,6
	500	79,3*	55,0*	26,7*	13,4	0,57*	2,6	1,6	2,1*
<b>Carene</b>	250	85,2*	57,2	23,1	14,2	0,72	3,0*	1,7	2,5
	500	79,0*	56,1*	23,9	14,8*	0,47*	3,4*	1,4*	2,4
<b>Citronellol</b>	250	81,7*	57,2	21,8	15,6*	0,70	2,8	1,9	2,7
	500	55,0*	58,6	18,9*	16,0*	0,45*	4,3*	1,6	3,2*
<b>Caryophyllene</b>	250	91,0	58,2	24,9*	12,0	0,68	2,7	1,7	2,3
	500	86,1*	56,9*	26,4*	11,6*	0,61*	3,0*	1,5*	2,2*
<b>Benzylideneacetone</b>	250	87,3*	57,1	23,7	14,5	0,67	2,4	1,7	2,4
	500	77,3*	54,9*	24,1	15,8*	0,68	2,8	1,7	2,3*
<b>SEM</b>		1.33	0.25	0.31	0.22	0.016	0.07	0.02	0.04
<b>P hodnota</b>		$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,001$

### 5.3 Graf 1



Graf dává do souvislosti hodnotu Tabulky 1 – celková produkce metanu a hodnotu Tabulky 2 – celková produkce těkavých mastných kyselin.



## 6 Diskuze

Cílem této studie bylo prozkoumat vliv pěti účinných látek silic ve dvou koncentracích (250 a 500 mg/l) na tvorbu metanu bez negativního vlivu na tvorbu těkavých mastných kyselin v *in vitro* podmínkách. V diskuzi je dbán zřetel také na podíl těkavých mastných kyselin, který ovlivňuje množství produkovaného metanu. Látky s nejvýhodnějším poměrem mezi snížením produkce metanu a snížením produkce těkavých mastných kyselin byly benzylideneacetone, carene a isobornyl acetate v koncentraci 500 mg/l.

Dalším cílem práce bylo posoudit vliv vybraných silic na metabolismus dusíku v bacheru. Většina látek při vyšší koncentraci (500 mg/l) hladiny  $\text{NH}_3\text{-N}$  snižovala. Nicméně se zdá, že toto snížení bylo dáno spíše celkovou inhibicí fermentace, jak naznačuje snížení hladin těkavých mastných kyselin, než vyšší efektivitou využití dusíku.

### 6.1 Isobornyl acetate

Isobornyl acetate je bicyklický monoterpen primárně získávaný z pryskyřice různých jehličnatých stromů jako je borovice, jedle a cedr, vyrábí se ale i synteticky. Kromě své příjemné vůně, pro kterou je široce využíván v kosmetickém průmyslu a jeho světová spotřeba přesahuje 1000 tun za rok je znám i pro své insekticidní, antimikrobiální, protizánětlivé a antioxidační vlastnosti (Bakshi et al. 2021, Chemical Book 2024, PubChem 2025). Kromě toho se isobornyl acetate ukázal jako efektivní proti široké škále grampozitivních i gramnegativních bakterií (Chemical Book 2023).

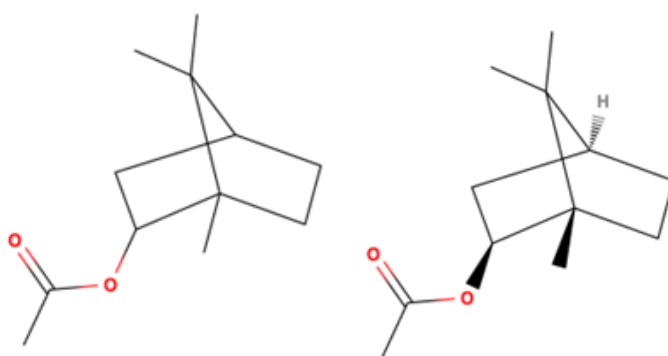
Konkrétní studie zkoumající čistý isobornyl acetate a jeho vliv na bakteriální populace bacheru nejsou dosud dostupné. Z tohoto důvodu jsou v této práci diskutovány výsledky studií zabývajících se blízkou příbuznou látkou bornyl acetate. Bornyl acetate je stereoizomer isobornylu a molekuly se tedy liší jen v endo/exo izomerii (Bernart 2016). Bornyl acetate je bicyklický monoterpen a hraje důležitou roli při léčbě zánětů, infekcí, rakoviny a neurodegenerativních onemocnění. Je součástí například černého kardamomu (*Amomum villosum*), omanu vonného (*Inula graveolens*) nebo sandarakovníka článkovaného (*Tetraclinis articulata*) (Zao et al. 2023).

Výsledky isobornyl acetate v tomto pokusu byly silně závislé na koncentraci. Při 250 mg/l byla celková produkce metanu snížena o 17,7 %, koncentrace 500 mg/l přinesla snížení o 51,7 %. Podobné koncentrace bornyl acetate (240 a 480 mg/l) ve studii Joch et al. (2018) prokázaly podstatně nižší schopnost snížit produkci, a to o 4,2 %, respektive 14,3 %. Rozdíly ve výsledcích mohou být způsobeny chemickými a fyzikálními rozdíly mezi izomery, dárcem bacherové tekutiny nebo obsahem substrátu (Colombini et al. 2021). Celková produkce plynů byla snížena o 5,7 % a 20,7 % respektive. Bornyl acetate (Joch et al. 2018) snížil produkci plynů o 4,8 % a 10,9 %, tedy téměř o polovinu méně při vyšší koncentraci. Silice rozmarýnu (*Rosmarinus officinalis*, obsah bornyl acetate do 3 % z obsahu účinných látek) (Cobellis et al. 2020) v koncentraci 2 g/l produkci metanu snížila o 9 %, bez vlivu na produkci plynů. V koncentraci 250 mg/l neměl isobornyl acetate silné účinky na celkovou produkci plynů, což se odrazilo v minimálních změnách při celkové produkci těkavých mastných kyselin. Snížení produkce TMK o téměř 14 % bylo pozorováno až při vyšší koncentraci (500 mg/l). Bornyl

acetate (Joch et al. 2018) snížil produkci TMK pouze o 7 % při koncentraci 480 mg/l. Zvýšení produkce propionátu o 17,6 % při 500 mg/l koncentraci isobornyl acetate mohlo být způsobeno sníženou populací metanogenních archaeí využívajících vodíkové kationty (McAllister & Newbold 2008, Sun et al. 2021).

Z hlediska metabolismu dusíku isobornyl acetate v koncentraci 250 mg/l zvýšil dostupnost amoniakálního dusíku, což může naznačovat snížené využití amoniaku bachorovým mikrobiomem (Bach et al. 2005). Naopak při koncentraci 500 mg/l byla dostupnost amoniakálního dusíku snížena o 11,7 %. Studie Joch et al. (2018), Garcia et al. (2020) ani Cobellis et al. (2020) žádná data týkající se metabolismu dusíku neuvádí.

Rozdíly mezi výsledky této studie a výsledky ostatních studií zdůrazňují nutnost dalšího výzkumu s ohledem na možné aditivní, antagonistické nebo synergické účinky jednotlivých aktivních látek silic (Calsamiglia et al. 2007).



Obrázek 4: Chemická struktura bornyl acetate a isobornyl acetate, molview.org

## 6.2 3-carene

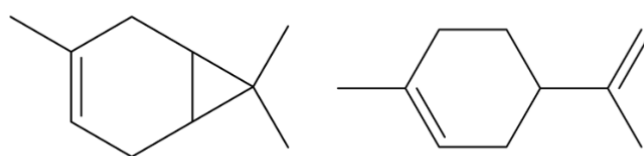
3-carene je bicycklý monoterpen, který je součástí silic různých rostlin jako je *Rosmarinus officinalis* (rozmarýn lékařský), semínka *Piper nigrum* (pepřovník černý) nebo *Lavandula x intermedia* (levandule prostřední). Je také jednou z hlavních složek terpentýnu (ten vzniká destilací pryskyřice) široké škály borovic, smrků a jedlí (Sell 2010, Adal et al. 2016, Perumalsamy et al. 2024). Je zajímavý svými dvěma aktivními skupinami – dvojitou vazbou uhlík-uhlík a gem-dimethylovému cyklopropanovému kruhu (existují tedy dvě reaktivní části, které mu umožňují reagovat s dalšími látkami). To přináší široké spektrum aktivit jako jsou mikrobiální, antioxidantní, sedativní, protizánětlivé, antifungální a potenciálně proti rakovinové účinky (Adal et al. 2016, Perumalsamy 2024). Potenciální účinky 3-carene proti gramnegativním i grampozitivním bakteriím jsou popsány včetně mechanismu účinku v mnoha studiích. Shu et al. (2019) ve své práci zjistil, že 3-carene má silnou antibakteriální aktivitu proti *Brochothrix thermosphacta* a *Pseudomonas fluorescens*, protože poškozuje buněčné membrány, narušuje bakteriální metabolismus a inhibuje syntézu energie. Dále pravděpodobně narušuje strukturu DNA, čímž ovlivňuje buněčné funkce a vede až k buněčné smrti. Tang et al. (2022) ve dvou samostatných studiích potvrdil, že 3-carene narušuje buněčné stěny a membrány bakterií *Pseudomonas lundensis* a *Pseudomonas fragi* a snižuje jejich pružnost. Kromě toho studie uvádí, že 3-carene ovlivňuje důležité proteiny spojené s tvorbou buněčné stěny, složením buněčné membrány a syntézou ATP, metabolismem aminokyselin nebo odbouráváním tuku. Silné antimikrobiální účinky silice s obsahem 4-carene v zastoupení 27,3 % potvrdil i Azghar

et al. (2023). Podle mého nejlepšího vědomí a na základě dostupných vědeckých dat neexistují žádné publikované studie, které by se zabývaly vlivem 3-carene přímo na bachorový mikrobiom, výsledky této studie jsou tedy srovnávány se studiemi, které se věnují vlivu limonene na bachorový mikrobiom a to z důvodu podobné struktury i vlastností obou látek.

V této studii měl 3-carene v koncentraci 500 mg/l ve srovnání s ostatními látkami zásadní vliv na celkovou produkci plynů a metanu (snížení o 41 %) bez výraznějšího snížení stravitelnosti sušiny (2,6 %) při zachování vysoké produkce těkavých mastných kyselin. Vliv účinné látky limonene na bachorovou fermentaci a metanogenezi zkoumal Joch et al. (2016) při koncentraci 844 mg/l. V této studii limonene nedosáhl mezi 11 zkoumanými látkami zdaleka takových výsledků jako 3-carene v této studii. I přes vysokou koncentraci, která v jiných studiích indikuje vysoké potlačení metanogeneze včetně negativně korelujícího snížení TMK, výsledky Joch et al. (2016) umístily limonene se snížením o 22,5 % tuto látku na 8. místo mezi testovanými. Zároveň, dle předpokladu, nesnížila tvorbu těkavých mastných kyselin (pouze o 11,8 %). Ve srovnání s 3-carene tedy snížil metanogenezi o polovinu (22,5 % vs 41 %), ale produkci TMK o téměř stejnou procentuální hodnotu (11,8 % vs 14,3 %). Při pohledu na Graf 1 vidíme, že poměr tvorby TMK a snížení metanu byl v nejlepším poměru ze všech testovaných látek. Tvorba TMK byla snížena 14,3 % s prospěchem vůči propionátu. Zvýšení celkové produkce propionátu (zde o 5,3 %) je žádoucí, stejně tak snížení poměru acetátu k propionátu (7,7 %), protože právě tvorba acetátu vytváří H<sub>2</sub> pro metanogenezi (Knapp et al. 2014, Pawar et al. 2014). Musíme přihlídnout i k butyrátu, protože i jeho tvorba vytváří vodík pro metanogenezi a v tomto pokusu stoupla jeho hodnota o 12,1 %. 3-carene o koncentraci 250 mg/l nepřinesl významné snížení celkové produkce plynů, metanu (5,4 a 11,7 %) a v důsledku toho ani celkové produkce těkavých mastných kyselin (7,6 %). Obě testované koncentrace isobornyl acetate vedly ke snížení koncentrace NH<sub>3</sub>-N v bachorové tekutině – o 8,9 % (250 mg/l) a 19,6 % (500 mg/l).

Vliv citrusových silic, obsahujících 28 složek (z toho d-limonene v zastoupení 80,1 %) na snížení produkce metanu *in vivo* se věnovala studie Wu et al. (2018). Experiment se zaměřil především na vliv intermitentního zkrmování látky na adaptaci mikrobiomu, a uvádí, že antimetanogenní výsledky nebyly mezi jednotlivými týdny pokusu perzistentní a po krátkodobé expozici mohlo dojít k adaptaci mikrobiomu, což je zajímavý poznatek, který by měl být vzat v úvahu i v budoucích experimentech s látkou 3-carene. Dostupnost dusíku byla naopak v průběhu týdnů konzistentní a byla snížena o 30 % v prvních dvou týdnech a o 28 % ve třetím týdnu. Zajímavostí této studie je zmínka o schopnosti archaeí naopak využívat limonene jako jediný zdroj uhlíku pro produkci metanu.

I když jsou 3-carene a limonene látky podobné struktury a vlastností, výsledky se od sebe zásadně liší a je tedy nutné provést více experimentů s účinnou látkou 3-carene, která v této studii přinesla velmi pozitivní výsledky, včetně experimentů *in vivo*.



Obrázek 5: Chemická struktura 3-carene a limonene, molview.org

### 6.3 Citronellol

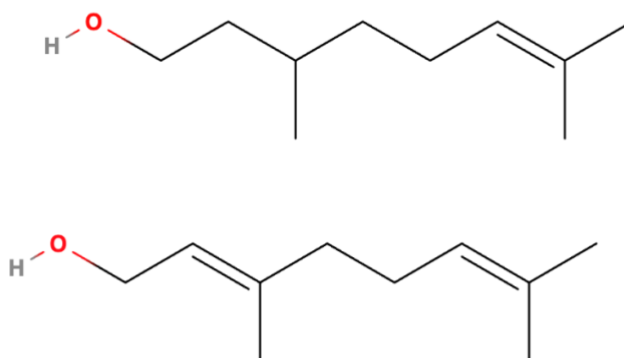
Citronellol (CT) je monoterpenový alkohol, přirozeně se vyskytující v silicích různých rodů aromatických rostlin, jako je například *Cymbopogon – citratus* (voňatka citronová) (Brito et al. 2012) nebo *winterianus* (citronela jávská) (Nunes et al. 2009). Silice těchto rostlin a složky v nich přítomné, například právě citronellol, citral nebo geraniol, jsou již dlouhou dobu známé svými antibakteriálními, antifungálními a protikvasinkovými účinky (Ganjewala et al. 2009). Kotan et al. (2007) testoval antimikrobiální aktivitu citronellolu a popsal jeho efekt proti gramnegativním i grampozitivním bakteriím. Z celkových 63 kmenů bakterií byl CT efektivní proti 33. Uvádí, že tato studie je první, která se antimikrobiálními aktivitami čistých monoterpenů věnuje. Není překvapivé, že studie, které by zkoumaly vliv této účinné látky přímo na bacherový mikrobiom stále chybí.

V našem experimentu se citronellol v obou koncentracích (250 a 500 mg/l) projevil jako vysoce účinný na snížení produkce metanu, a to o 22 respektive 70,7 %. Studie Vázquez-Carrillo et al. (2020), která se věnovala vlivu voňatky citronové (*Cymbopogon citratus*) (obsahující kolem 30 % citronellolu) na metanogenezi, zjistila významné snížení produkce metanu (g CH<sub>4</sub>/kg DMI) o 33 % při dávkování 100 g sušiny voňatky citronové na den. S ohledem na informace uvedené v kapitole 3.4.1 Chemické vlastnosti silic, není rozpoznání nejúčinnějších složek silic díky jejich složitému chemickému složení jednoduché, navíc k jejich antibakteriální aktivitě nepřispívá pouze jediná sloučenina a Ganjewala et al. (2009), podle kterého jsou složky silic značně ovlivněny genetickými, environmentálními a geografickými podmínkami, má srovnání s výzkumem Vázquez-Carrillo et al. (2020) určitá omezení.

Sell (2009) uvádí skutečnost, že citronellol je dihydrogeraniol (a tedy velmi strukturou podobný geraniolu), a proto s ohledem na neexistující studie jsou výsledky diskutovány s prací Joch et al. (2017), která se věnuje efektu právě geraniolu na bacherovou metanogenezi. V souladu s touto prací se i geraniol ukázal být vysoce účinný (snížení produkce metanu u koncentrace 900 mg/l až o 98 %). Jak Joch et al. (2017) uvádí, snížení samotného metanu může být důsledkem přímého účinku geraniolu na metanogenní archaea. Tato hypotéza se dá aplikovat i na výsledky této studie, kde snížení produkce metanu dosáhlo až 70,7 %. Výsledky naznačují, že účinné látky silic – citronellol i geraniol, mají v literatuře zmiňované vysoké antibakteriální účinky, které ovšem v komplexní ekologii bacherového ekosystému nesnižují jen tvorbu metanu, ale i fermentaci a tvorbu těkavých mastných kyselin. Nežádoucím účinkem citronellolu v tomto experimentu bylo snížení celkové produkce plynů, které oproti ostatním testovaným látkám dosáhlo nejvyšších hodnot (snížení o 9,4 % a 36,4 % respektive). Studie Joch et al. (2017) rovněž zaznamenala významné snížení celkové produkce plynů při aplikaci

geraniolu (o 10,5 % při 300 mg/l, 98 % při 900 mg/l). Tento výsledek je v souladu s našimi zjištěními, což naznačuje podobný mechanismus účinku obou látek. V koncentraci 500 mg/l bylo také zvýšeno pH o 0,14 bodu během 24hodinové inkubace, což reflektuje nežádoucí sníženou celkovou produkci těkavých mastných kyselin, především propionové kyseliny (propionátu), která je hlavním prekurzorem glukózy u přežvýkavců (Beachemin et al. 2019). Kvůli snížení produkce propionátu se zásadně mění i poměr acetátu a propionátu (A:P). Dostupnost  $\text{NH}_3\text{-N}$  byla silně ovlivněná koncentrací citronellolu – u koncentrace 250 mg/l bylo snížení minimální (o 0,7 %) a u koncentrace 500 mg/l výrazné – 36,1 %. Vzhledem k silnému potlačení produkce plynů, metanu i těkavých mastných kyselin, můžeme předpokládat, že ke snížení dostupnosti dusíku dochází nedostatečnou deaminací aminokyselin způsobenou sníženou populací mikroorganismů spíše než jeho efektivním zpracováním pro tvorbu mikrobiálního proteinu. Tuto oblast práce Joch et al. (2017) detailně nerozebírá, proto srovnání přímého účinku geraniolu na metabolismus dusíku nebylo možné.

V souladu s výše uvedenými výsledky je tedy zřejmé, že účinky citronellolu i strukturálně podobných sloučenin (např. geraniolu) jsou komplexní a ovlivňují nejen metanogenezi, ale celou fermentační aktivitu bacheru. Proto je potřeba provedení dalších detailních studií, které by objasnily přesné mechanismy jejich působení, včetně zjištění synergických nebo antagonistických efektů, které mohou tyto látky v bacherovém ekosystému vyvolávat.



Obrázek 6: Chemická struktura – citronellol a geraniol, molview.org

## 6.4 $\beta$ -caryophyllene

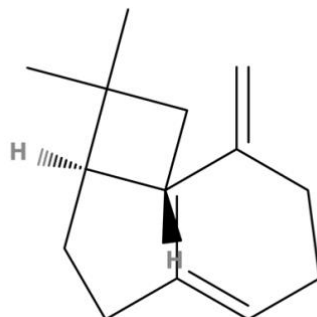
$\beta$ -caryophyllene (BCP) je polycyklický seskviterpen široce rozšířený v přírodě. Nejznámějšími zdroji této účinné látky jsou *Syzygium aromaticum* (hřebíčkovce kořený) a *Humulus lupulus* (chmel). Vyskytuje se také v *Piper nigrum* (pepř černý), *Rosmarinus officinalis* (rozmarýn lékařský), *Cinnamomum* spp. (skořicovník), *Aframomum giganteum* nebo *Origanum vulgare* (oregano) (Franz & Novak 2010, Sell 2010, Francomano et al. 2019). Vyznačuje se sedativními účinky a pozitivním vlivem na centrální nervovou soustavu, zejména proti neurozánětlivým a neurodegenerativním onemocněním. Byla rovněž prokázána jeho významná antibakteriální aktivita proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím, přičemž efektivnější je vůči grampozitivním bakteriím, jako například *Staphylococcus aureus* (Francomano et al. 2019; Santos et al. 2021).

V tomto experimentu neměl  $\beta$ -caryophyllene v koncentracích 250 a 500 mg/l významný vliv na většinu sledovaných hodnot. Snížení produkce metanu činilo pouze 7,4 % (250 mg/l) a 23,4 % (500 mg/l), což byly v porovnání s ostatními látkami o stejné koncentraci druhé nejméně a nejméně významné hodnoty. Bokharaeian et al. (2023) sledoval snížení metanogeneze u silice z hřebíčku (koncentrace 900 mg/l), kde  $\beta$ -caryophyllene tvořil 12,7 %. Tento experiment přinesl silně pozitivní výsledky se snížením produkce metanu o 51,7 %. Tento rozdíl je však pravděpodobně způsoben dominantním zastoupením eugenolu (69,5 %), který mohl mít větší vliv na snížení metanogeneze. Oproti tomu Tabiś et al. (2024) uvádí, že při aplikaci silic *Cannabis sativa* a *Cannabis indica* (s obsahem  $\beta$ -caryophyllene 18,4 a 24,1 %) došlo paradoxně k zvýšení produkce metanu o 36,2 % respektive 38,3 %. Jedná se tedy o první diskutovanou látku v této studii, která zvyšuje produkci metanu navzdory obsahu  $\beta$ -caryophyllene. Celková produkce těkavých mastných kyselin poklesla v aktuálním experimentu o 1,3 % (250 mg/l) a o 6,6 % (500 mg/l). V experimentu Bokharaeian et al. (2023) došlo ke srovnatelnému snížení produkce těkavých mastných kyselin (o 7,6 %), zatímco Tabiś et al. (2024) zaznamenali u *Cannabis sativa* zvýšení produkce těkavých mastných kyselin o 12,7 % a u *Cannabis indica* naopak jejich snížení o 19,5 %. Výrazné rozdíly v produkci těkavých mastných kyselin mezi těmito studii naznačují možnou roli dalších účinných látek silic a nutnost detailnějšího zkoumání jednotlivých účinných látek.

V této studii byla zaznamenána výrazná změna poměru acetátu k propionátu (11,5 % při 250 mg/l a 15,4 % při 500 mg/l), způsobená zvýšením produkce propionátu (o 9,7 % a 16,3 %). Bokharaeian et al. (2023) uvádí podobný trend, kde koncentrace acetátu klesla o 11,5 %, zatímco koncentrace propionátu vzrostla o 20,5 %. Tyto výsledky naznačují, že  $\beta$ -caryophyllene nebo směsi s jeho obsahem by mohly selektivně ovlivnit bakterie produkující propionát, což povede k vyšší produkci této mastné kyseliny. Zároveň zřejmě méně ovlivní bakterie tvořící acetát. Rozdíly mezi studii mohou naznačovat, že  $\beta$ -caryophyllene má selektivní antibakteriální aktivitu, pravděpodobně výraznější vůči grampozitivním bakteriím.

Dostupnost  $\text{NH}_3\text{-N}$  byla v tomto experimentu snížena o 4,5 % a 16,5 % (250 mg/l a 500 mg/l), což nebyly ve srovnání s ostatními látkami této studie významné hodnoty. Bokharaeian et al. (2023) uvádí podobné snížení dostupného dusíku (o 16,9 %), což naznačuje obdobný efekt obou testovaných látek. Nicméně vzhledem k dominanci jiných účinných látek v silicích (zejména eugenolu) nelze přisuzovat tento efekt výhradně  $\beta$ -caryophyllenu.

Tyto studie naznačují nutnost důkladnějšího pochopení vztahů mezi jednotlivými látkami silic, případně testování čistých účinných látek pro jasnější interpretaci jejich účinků pro pochopení možných synergických nebo antagonistických efektů jednotlivých složek, včetně  $\beta$ -caryophyllenu, a jejich přesného mechanismu působení na bacherový mikrobiom.



Obrázek 7: Chemická struktura – caryophyllene, molview.org

## 6.5 Benzylideneacetone

Benzylideneacetone (BZA) je fenypropen, který je znám jako účinná látka silic *Basella alba* (malabarský špenát) nebo *Polygala senega* (vítod senega) (PubChem 2025), ale především jako sekundární metabolit gramnegativní bakterie *Xenorhabdus nematophila*. Ta je symbiotická s nematody způsobující onemocnění hmyzu (Kwon & Kim 2008). Je známá pro své insekticidní a imunosupresivní aktivity, vykazuje také antibakteriální aktivitu vůči širokému spektru bakterií, včetně gramnegativních patogenů rostlin, jako jsou *Agrobacterium vitis* nebo *Pectobacterium carotovorum* (Ji et al. 2004, Mollah et al. 2020).

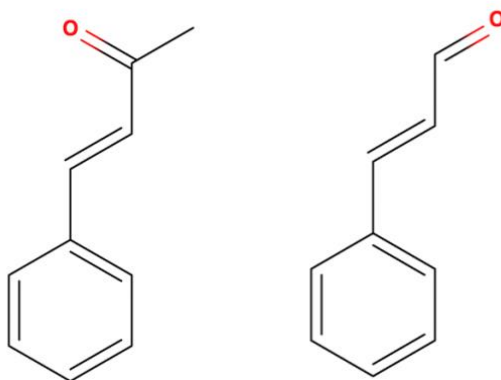
Výsledky BZA o koncentraci 250 mg/l nebyly v této studii významné (snížení celkové produkce plynů o 3,7 % a snížení celkové produkce těkavých mastných kyselin o 5,3 %, snížení dostupného dusíku o 8,3 %). Naproti tomu benzylideneacetone v koncentraci 500 mg/l patřil mezi tři látky s nejvýhodnějším poměrem mezi snížením produkce metanu a snížením produkce těkavých mastných kyselin. Zatímco celkovou produkci plynů snížil o 15,2 %, produkci metanu snížil o 42,7 %, což indikuje antimikrobiální aktivitu směrem k metanogenním organismům. Celková produkce těkavých mastných kyselin byla BZA snížena o 16,2 % s příznivou změnou poměru acetátu:propionátu z 2,6 na 2,3. Tato změna naznačuje, že BZA ovlivňuje také bakterie tvořící acetát, čímž snižuje tvorbu vodíku, který je substrátem pro metanogenezi, což vede ke snížení celkové metanogeneze. Celkově dostupný  $\text{NH}_3\text{-N}$  je v této koncentraci snížen o 15,8 % a vzhledem k ostatním výsledkům můžeme předpokládat zvýšenou efektivitu využívání volného dusíku na tvorbu mikrobiálního proteinu spíše než nedostatečnou deaminaci způsobenou sníženou mikrobiální populací.

Studie Ji et al. (2004) deklaruje, že je vůbec první, která identifikuje antibakteriální vlastnosti benzylideneacetone. Současně tato látka není součástí široce známých nebo rozšířených rostlin, a proto i chybí studie, které by se věnovali jejímu vlivu nebo vlivu silic nebo rostlin na metanogenezi. Další diskuze tedy bude probíhat oproti látce cinnamaldehyd, která stejně jako BZA patří mezi fenypropeny, má podobnou základní strukturu a obdobné účinky. Cinnamaldehyd je hlavní složkou nejběžnějších druhů *Cinnamomum Cassia* (skořice

čínská) a *Cinnamomum verum* (pravá skořice) a to v obsahu až 90 %. Bylo prokázáno, že izolovaný cinnamaldehyd účinně inhibuje růst řady mikroorganismů, jako jsou bakterie, plísně a kvasinky (Doyle & Stephens 2019).

Výsledky studie Benchaar (2016) uvádí, že přidání cinnamaldehydu do krmiva nemělo žádný vliv na bacheřovou fermentaci, stravitelnost živin, počet bacheřových prvoků ani tvorbu metanu. Stejně výsledky zaznamenal také Hadianto et al. (2020). Busquet et al. (2005) přímo nezkoumali vliv cinnamaldehydu na metanogenezi, nicméně jejich výsledky ukazují, že při koncentraci cinnamaldehydu 312 mg/l došlo ke snížení produkce acetátu o 57 %, zatímco hladina propionátu zůstala blízká hodnotám kontrolní skupiny. Jak již bylo vysvětleno výše, snížení produkce acetátu by teoreticky mohlo vést ke snížení tvorby metanu pouze tehdy, pokud by současně došlo k navýšení produkce propionátu, jehož tvorba spotřebovává vodík, čímž snižuje dostupný vodík pro metanogenezi. Nezměněné hodnoty propionátu v této studii však naznačují, že snížení tvorby metanu nebylo pravděpodobné.

Stejně jako u jiných zkoumaných látek bude i v případě benzylideneacetone nutné provést další detailní studie k získání dostatečného množství informací o jeho skutečném vlivu na bacheřovou fermentaci a metanogenezi. Nelze totiž předpokládat, že látky s podobnou chemickou strukturou automaticky vykazují podobné biologické účinky. Zároveň antimikrobiální aktivita látky neimplikuje přímý vliv na mikrobiom bacheře.



Obrázek 8: Chemická struktura – benzylidenacetone a cinnamaldehyd, molview.org

## 7 Závěr

Tato studie potvrdila potenciál některých účinných látek na snížení metanogeneze při zachování tvorby žádoucích těkavých mastných kyselin *in vitro*. První hypotéza říkající, že bude produkce metanu snížena bez negativního vlivu na koncentrace těkavých mastných kyselin byla vyvrácena, nicméně výsledky tří látek o koncentraci 500 mg/l byly ve velmi příznivém poměru snížené metanogeneze a celkových těkavých mastných kyselin. Některé z dalších účinných látek působily na celkovou tvorbu plynů a některé se prokázaly jako účinné proti konkrétní části bachorového mikrobiomu, když snížily větším podílem tvorbu metanu. Druhá hypotéza předpokládající, že účinné látky silic sníží bachorový obrat dusíku se potvrdila.

Ze studií citovaných v této práci silně vyznívá potřeba hlubšího pochopení bachorového ekosystému a mechanismů jeho adaptace na podávané látky. Nicméně účinné látky silic se ukazují jako potenciálně vhodná přírodní látka, která by mohla zamezit tvorbě metanu a tím nejen snížit množství skleníkového plynu v atmosféře, ale ušetřit i energii z krmiva.

## 8 Literatura

- Adal AM, Sarker LS, Lemke AD, Mahmoud SS. 2017. Isolation and functional characterization of a methyl jasmonate-responsive 3-carene synthase from *Lavandula x intermedia*. *Plant Molecular Biology*, **93**: 641-657.
- Bach, A., Calsamiglia, S., & Stern, M. D. 2005. Nitrogen metabolism in the rumen. *Journal of dairy science*, **88**: E9-E21.
- Bakhshi O, Bagherzade G, Ghamari Kargar P. 2021. Biosynthesis of organic nanocomposite using *Pistacia vera* L. hull: an efficient antimicrobial agent. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, **2021(1)**:4105853.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, **46(2)**: 446-475.
- Beauchemin KA, Ungerfeld EM, Eckard RJ, Wang M. 2020. Fifty years of research on rumen methanogenesis: Lessons learned and future challenges for mitigation. *Animal* **14(S1)**:2-16.
- Benchaar C, Calsamiglia S, Chaves AV, Fraser GR, Colombatto D, McAllister TA, Beauchemin KA. 2008. A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal feed science and technology* **145(1-4)**:209-228.
- Benchaar C, Greathead H. 2011. Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants. *Animal Feed Science and Technology* **166**:338-355.
- Benchaar C. 2016. Diet supplementation with cinnamon oil, cinnamaldehyde, or monensin does not reduce enteric methane production of dairy cows. *Animal*, **10(3)**: 418-425.
- Berg G, et al. 2020. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome* **8(1)**:1-22.
- Bernant M. 2016. Closely eluting bornyl and isobornyl acetates are chemotaxonomic markers in the Pinaceae by virtue of their unique mass spectra. *American J Essential Oils Nat Pds* **4(2)**:41-46.
- 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(1-4)**:78-93.
- Bokharaeian M, Ghoorchi T, Toghdory A, Esfahani IJ. 2023. The dose-dependent role of sage, clove, and pine essential oils in modulating ruminal fermentation and biohydrogenation of polyunsaturated fatty acids: a promising strategy to reduce methane emissions and enhance the nutritional profile of ruminant products. *Applied Sciences*, **13(20)**: 11605.
- Brito RG, Guimarães AG, Quintans JSS, Santos MRC, De Sousa DP, Badaue-Passos Jr. D, de Luca Jr. W, Broto FA, Barreto EO, Oliviera AP, Quintans Jr. LJ. 2012. Citronellol, a monoterpene alcohol, reduces nociceptive and inflammatory activities in rodents. *Journal of natural medicines* **66**:637-644.

- Bruns MA. 2023. Ruminant Methanogens as a Climate Change Target. American Society for Microbiology, Washington. Available from <https://asm.org/Articles/2023/June/Ruminant-Methanogens-as-a-Climate-Change-Target> (accessed August 2023).
- Busquet M, Calsamiglia S, Ferret A, Kamel C. 2006. Plant extracts affect in vitro rumen microbial fermentation. *Journal of dairy science*, **89(2)**: 761-771.
- Calabrò S. 2015. Plant Secondary Metabolites. Pages 153-160 in Puniya AK, Singh R, Kamra DN, editors. Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution. Springer, Cham.
- Calsamiglia S, Busquet M, Cardozo PW, Castillejos L, Ferret A. 2007. Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of dairy science* **90(6)**:2580-2595.
- Cañete Jr RN. 2025. Methanogenesis and Its Strategic Mitigation through Dietary Intervention and Rumen Manipulation: a Review. *Philippine Journal of Science*, **154(1)**: 109-121.
- Canul-Solis J, Campos-Navarrete M, Piñeiro-Vázquez A, Casanova-Lugo F, Barros-Rodríguez M, Chay-Canul A, Cárdenas-Media J, Castillo-Sánchez L. 2020. Mitigation of rumen methane emissions with foliage and pods of tropical trees. *Animals* **10(5)**:843.
- Cobellis G, Acuti G, Forte C, Menghini L, De Vincenzi S, Orru M, Valiani A., Pacetti D, Trabalza-Marinucci M. 2015. Use of *Rosmarinus officinalis* in sheep diet formulations: Effects on ruminal fermentation, microbial numbers and in situ degradability. *Small Ruminant Research* **126**:10-18.
- Cobellis G, Petrozzi A, Forte C, Acuti G, Orrù M, Marcotullio MC, Aquino A, Nicolini A, Mazza V, Trabalza-Marinucci M. 2015. Evaluation of the effects of mitigation on methane and ammonia production by using *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. essential oils on in vitro rumen fermentation systems. *Sustainability* **7(9)**:12856-12869.
- Cobellis G, Trabalza-Marinucci M, Yu Z. 2016. Critical evaluation of essential oils as rumen modifiers in ruminant nutrition: A review. *Science of the Total Environment* **545**:556-568.
- Colombini S, Graziosi AR, Parma P, Iriti M, Vitalini S, Sarnataro C, Spanghero M. 2021. Evaluation of dietary addition of 2 essential oils from *Achillea moschata*, or their components (bornyl acetate, camphor, and eucalyptol) on in vitro ruminal fermentation and microbial community composition. *Animal Nutrition* **7(1)**:224-231.
- Dehority BA. 2002. Gastrointestinal tracts of herbivores, particularly the ruminant: anatomy, physiology and microbial digestion of plants. *Journal of applied animal research* **21(2)**:145-160.
- Dhanasekaran DK, Dias-Silva TP, Filho ALA, Sakita GZ, Abdalla AL, Louvandini H, Elghandour MM. 2020. Plants extract and bioactive compounds on rumen methanogenesis. *Agroforestry Systems*, **94**:1541-1553.
- Doyle AA, Stephens JC. 2019. A review of cinnamaldehyde and its derivatives as antibacterial agents. *Fitoterapia*, **139**: 104405.
- Eurostat. 2023. EU livestock population continued to decline in 2022. EU, Kirchberg. Available from <https://ec.europa.eu/eurostat/> (accessed October 2023).

- Evropský parlament a Rada. 2003. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1831/2003 ze dne 22. září 2003 o doplňkových látkách používaných ve výživě zvířat. Pages 3-25 in Úřední věstník Evropské unie L268, Evropská unie.
- FAO. 2023. Meat and Meat production. FAO, Rome. Available from <https://www.fao.org/> (accessed August 2023).
- Fernández MH, Vrba ES. 2005. A complete estimate of the phylogenetic relationships in Ruminantia: a dated species-level supertree of the extant ruminants. *Biological reviews* **80(2)**:269-302.
- Firkins J L, Yu Z, Park T, Plank J E. 2020. Extending Burk Dehority's perspectives on the role of ciliate protozoa in the rumen. *Frontiers in Microbiology* **11**:123.
- Francomano F, Caruso A, Barbarossa A, Fazio A, La Torre C, Ceramella J, Mallamaci R, Saturnino C, Iacopetta D, Sinicropi MS. 2019.  $\beta$ -Caryophyllene: a sesquiterpene with countless biological properties. *Applied Sciences*, **9(24)**: 5420.
- Franz C, Novak J. 2009. Sources of Essential Oils. Pages 39-82 in Baser KHC, Buchbauer G, editors. *Handbook of essential oils: science, technology, and applications*. CRC press, USA.
- Friedman N, Jami E, Mizrahi I. 2017. Compositional and functional dynamics of the bovine rumen methanogenic community across different developmental stages. *Environmental microbiology* **19(8)**:3365-3373.
- Ganjewala D. 2009. Cymbopogon essential oils: Chemical compositions and bioactivities. *International journal of essential oil therapeutics* **3.2-3**:56-65.
- Garcia F, Colombatto D, Brunetti MA, Martínez MJ, Moreno MV, Scorcione Turcato MC, Lucini E, Frosacco G, Martínez Ferrer J. 2020. The reduction of methane production in the in vitro ruminal fermentation of different substrates is linked with the chemical composition of the essential oil. *Animals* **10(5)**:786.
- Gill AO, Holley RA. 2004. Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. *Applied and environmental microbiology* **70.10**: 5750-5755.
- Hackmann TJ, Spain JN. 2010. Invited review: ruminant ecology and evolution: perspectives useful to ruminant livestock research and production. *Journal of dairy science* **93.4**:1320-1334.
- Hadianto I, Yusiati LM, Bachrudin Z, Suhartanto B, Hanim C, Kurniawati A. 2020. Effect of cinnamon bark meal (*Cinnamomun burmanni* Ness ex Bl) on in vitro methane production and rumen methanogens diversity. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* **478(1)**: 012027.
- Hanif MA, Nisar S, Khan GS, Mushtaq Z, Zubair M. 2019. Essential oils. Pages 3-17 in Malik S, editor. *Essential Oil Research: Trends in Biosynthesis, Analytics, Industrial Applications and Biotechnological Production*. Springer, Cham.

- Hofmann RR. 1989. Evolutionary steps of exophysiological adaptation and diversification of ruminants: a comparative view of their digestive system. *Oecologia* **78(4)**: 443-457.
- Hungate RE. 1975. The rumen microbial ecosystem. *Annual Review of Ecology and Systematics* **6.1**: 39-66.
- Hüsni K, Başer C, Demirci F. 2007. Chemistry of essential oils. Pages 43-86 in Berger, editor. *Flavours and fragrances: chemistry, bioprocessing and sustainability*. Springer, Berlin.
- Huws SA, Creevey CJ, Oyama LB, Mizrahi I, Denman SE, Popova M, Morgavi DP. 2018. Addressing global ruminant agricultural challenges through understanding the rumen microbiome: past, present, and future. *Frontiers in microbiology* **9**:2161.
- ChemicalBook. 2023. Isobornyl acetate: properties, applications and toxicity. ChemicalBook, Beijing. Dostupné z: <https://www.chemicalbook.com/article/isobornyl-acetate-properties-applications-and-toxicity> (accessed March 2025).
- ChemicalBook. 2024. Isobornyl acetate: a versatile compound with wide origin and biological activities. ChemicalBook, Beijing. Dostupné z: <https://www.chemicalbook.com/article/isobornyl-acetate-a-versatile-compound-with-wide-origin-and-biological-activities> (accessed March 2025).
- Jeyanathan J, Kirs M, Ronimus RS, Hoskin SO, Janssen PH. 2011. Methanogen community structure in the rumens of farmed sheep, cattle and red deer fed different diets. *FEMS Microbiology Ecology* **76(2)**:311-326.
- Ji D, Yi Y, Kang GH, Choi YH, Kim P, Baek NI, Kim Y. 2004. Identification of an antibacterial compound, benzylideneacetone, from *Xenorhabdus nematophila* against major plant-pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, **239(2)**: 241-248.
- Joch M, Cermak L, Hakl J, Hucko B, Duskova D, Marounek M. 2015. In vitro screening of essential oil active compounds for manipulation of rumen fermentation and methane mitigation. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, **29(7)**: 952.
- 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, Kudrna V, Hučko B, Marounek M. 2017. Effects of geraniol and camphene on In vitro rumen fermentation and methane production. *Scietia Agriculturae Bohemica* **48**:63-69.
- 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(4)**:869-881.
- Ju J, Xie Y, Yu H, Guo Y, Cheng Y, Qian H, Yao W. 2022. Synergistic interactions of plant essential oils with antimicrobial agents: A new antimicrobial therapy. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **62(7)**:1740-1751.
- Kaiser TM, Fickel J, Streich WJ, Hummel J, Clauss M. 2010. Enamel ridge alignment in upper molars of ruminants in relation to their natural diet. *Journal of Zoology* **281(1)**:12-25.

- Khiaosa-Ard R, Zebeli Q. 2013. Meta-analysis of the effects of essential oils and their bioactive compounds on rumen fermentation characteristics and feed efficiency in ruminants. *Journal of Animal Science*, **91(4)**:1819-1830.
- Kholif AE, Olafadehan OA. 2021. Essential oils and phytogenic feed additives in ruminant diet: Chemistry, ruminal microbiota and fermentation, feed utilization and productive performance. *Phytochemistry Reviews*, **20(6)**:1087-1108.
- 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(6)**:3231-3261.
- Kotan R, Kordali S, Cakir A. 2007. Screening of antibacterial activities of twenty-one oxygenated monoterpenes. *Zeitschrift für Naturforschung C* **62.7-8**: 507-513.
- Kwon B, Kim Y. 2008. Benzylideneacetone, an immunosuppressant, enhances virulence of *Bacillus thuringiensis* against beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, **101(1)**: 36-41.
- Lange M, Westermann P, Kiær Ahring B. 2005. Archaea in protozoa and metazoa. *Applied microbiology and biotechnology* **66**:465-474.
- Liu K, Zhang Y, Yu Z, Xu Q, Zheng N, Zhao S, Huang G, Wang J. 2021. Ruminal microbiota–host interaction and its effect on nutrient metabolism. *Animal Nutrition* **7(1)**:49-55.
- Løvendahl P, et al. 2018. Selecting for improved feed efficiency and reduced methane emissions in dairy cattle. *Animal*, **12(s2)**:s336-s349.
- Malmuthuge N, Guan LL. 2017. Understanding host-microbial interactions in rumen: searching the best opportunity for microbiota manipulation. *Journal of animal science and biotechnology* **8(1)**:1-7.
- McAllister TA, Newbold CJ. 2008. Redirecting rumen fermentation to reduce methanogenesis. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **48.2**:7-13.
- Membrive CMB. 2016. Anatomy and Physiology of the Rumen. Pages 1-38 in Millen DD, Arrigoni MDB, Pacheco RDL, editors. *Rumenology*. Springer, Cham.
- Mizrahi I, Wallace RJ, Morais S. 2021. The rumen microbiome: balancing food security and environmental impacts. *Nature Reviews Microbiology* **19.9**:553-566.
- Mizrahi I. 2013. Rumen symbioses. Pages 533-544 in Resenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F, editors. *The Prokaryotes: Prokaryotic Biology and Symbiotic associations*. Springer Berlin, Heidelberg.
- Mollah MMI, Yeasmin F, Kim Y. 2020. Benzylideneacetone and other phenylethylamide bacterial metabolites induce apoptosis to kill insects. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, **23(2)**: 449-457.
- Moss AR, Jouany JP, Newbold J. 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Annales de zootechnie* **49.3**:231-253.

- Nagaraja TG. 2016. Microbiology of the Rumen. Pages 39-61 in Millen DD, Arrigoni MDB, Pacheco RDL, editors. Rumenology. Springer, Cham.
- National Center for Biotechnology Information. 2025. PubChem Compound Summary for CID 247573, Isobornyl acetate. National Library of Medicine, Bethesda. Available from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Isobornyl-acetate> (accessed March 2025).
- National Center for Biotechnology Information. 2025. PubChem Compound Summary for CID 637759, Benzylideneacetone. National Library of Medicine, Bethesda. Available from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Benzylideneacetone>. Accessed March 2025).
- Nunes SN, Linck VM, Silva AL, Figueiro M, Elisabetsky E. 2009. Psychopharmacology of Essential Oils. Pages 297-314 in Baser KHC, Buchbauer G, editors. Handbook of essential oils: science, technology, and applications. CRC press, USA.
- Orzuna-Orzuna JF, Dorantes-Iturbide G, Lara-Bueno A, Miranda-Romero LA, Mendoza-Martínez GD, Santiago-Figueroa I. 2022. A meta-analysis of essential oils use for beef cattle feed: Rumen fermentation, blood metabolites, meat quality, performance and, environmental and economic impact. *Fermentation* **8(6)**:254.
- Owens FN, Basalan M. 2016. Rumen Fermentation. Pages 63-1002 in Millen DD, Arrigoni MDB, Pacheco RDL, editors. Rumenology. Springer, Cham.
- Pavlostathis SG, Miller TL, Wolin MJ. 1990. Cellulose fermentation by continuous cultures of *Ruminococcus albus* and *Methanobrevibacter smithii*. *Applied microbiology and biotechnology* **33**:109-116.
- Pawar MM, Kamra DN, Agarwal N, Chaudhary LC. 2014. Effects of essential oils on in vitro methanogenesis and feed fermentation with buffalo rumen liquor. *Agricultural Research*, **3**:67-74.
- Perumalsamy, H., Sukweenadhi, J., Ranjan, A., Dubey, A., Mahadev, M., Elsadek, M. F., Saedah Musaed Almutairi g, Daewon Sohn ... & Balusamy, S. R. (2025). Structural isomers of carene persuade apoptotic cell death by inhibiting cell cycle in breast cancer cells: An in silico and in vitro approach. *Tissue and Cell*, *93*, 102701.
- Puniya AK, Singh R, Kamra DN. 2013. Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution. Springer, India.
- Rodrigues PHM. 2016. Control and Manipulation of Ruminant Fermentation. Pages 157-187 in Millen DD, Arrigoni MDB, Pacheco RDL, editors. Rumenology. Springer, Cham.
- Santos EL, Freitas PR, Araújo ACJ, Almeida RS, Tintino SR, Paulo CLR, Coutinho HD. 2021. Enhanced antibacterial effect of antibiotics by the essential oil of *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. and its major constituent beta-caryophyllene. *Phytomedicine Plus*, **1(4)**: 100100.
- Sell C. 2009. Chemistry of Essential Oils. Pages 121-150 in Baser KHC, Buchbauer G, editors. Handbook of essential oils: science, technology, and applications. CRC press, USA.

- Seshadri R, et al. 2018. Cultivation and sequencing of rumen microbiome members from the Hungate1000 Collection. *Nature biotechnology* **36(4)**:359-367.
- Shu H, Chen H, Wang X, Hu Y, Yun Y, Zhong Q, Chen W, Chen W. 2019. Antimicrobial activity and proposed action mechanism of 3-Carene against *Brochothrix thermosphacta* and *Pseudomonas fluorescens*. *Molecules*, **24(18)**: 3246.
- Sperandio V, Torres AG, Jarvis B, Nataro JP, Kaper JB. 2003. Bacteria–host communication: the language of hormones. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100(15)**:8951-8956.
- Sun K, Lio H, Fan H, Liu T. 2021. Research progress on the application of feed additives in ruminal methane emission reduction: a review. *PeerJ* **9**:e11151.
- Tabiś A, Szumny A, Bania J, Pacyga K, Lewandowska K, Kupczyński R. 2024. Comparison of the effects of essential oils from *Cannabis sativa* and *Cannabis indica* on selected bacteria, rumen fermentation, and methane production—in vitro study. *International Journal of Molecular Sciences*, **25(11)**: 5861.
- Tang Z, Chen H, Zhang M, Fan Z, Zhong Q, Chen W, Yun Y, Chen, W. 2021. Antibacterial mechanism of 3-Carene against the meat spoilage bacterium *Pseudomonas lundensis* and its application in pork during refrigerated storage. *Foods*, **11(1)**: 92.
- Tang, Z., Chen, H., Chen, W., Zhong, Q., Zhang, M., Chen, W., & Yun, Y. H. (2022). Unraveling the antibacterial mechanism of 3-carene against *Pseudomonas fragi* by integrated proteomics and metabolomics analyses and its application in pork. *International Journal of Food Microbiology*, 379, 109846.
- Toljagić O, Voje KL, Matschiner M, Liow LH, Hansen TF. 2018. Millions of years behind: slow adaptation of ruminants to grasslands. *Systematic Biology* **61(1)**:145-157.
- Turek C, Stintzing FC. 2013. Stability of essential oils: a review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, **12(1)**:40-53.
- Ultee A, Bennik MHJ, Moezelaar R. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and environmental mikrobiology*, **68.4**: 1561-1568.
- United Nations Departement of Economic and Social Affairs, Population Division. 2022. *World Population Prospect 2022: Summary of Results*.
- Vázquez-Carrillo MF, Montelongo-Pérez HD, González-Ronquillo M, Castillo-Gallegos E, Castelán-Ortega OA. 2020. Effects of three herbs on methane emissions from beef cattle. *Animals* **10(9)**:1671.
- Williams AG, Coleman GS. 1997. The rumen protozoa. Pages 73-139 in Hobson PN, Stewart CS editors. *The rumen microbial ecosystem*. Blackie Academic & Professional, London.
- Wu P, Liu ZB, He WF, Yu SB, Gao G, Wang JK. 2018. Intermittent feeding of citrus essential oils as a potential strategy to decrease methane production by reducing microbial adaptation. *Journal of cleaner production*, **194**: 704-713.

- Zhao Y, Zhao G. 2022. Decreasing ruminal methane production through enhancing the sulfate reduction pathway. *Animal Nutrition* **9**:320-326.
- Zhao ZJ, Sun YL, Ruan XF. 2023. Bornyl acetate: A promising agent in phytomedicine for inflammation and immune modulation. *Phytomedicine* **114**:154781.
- Zuzarte M, Salgueiro L. 2015. Essential oils chemistry. Pages 19-61 in de Sousa DP editor. *Bioactive essential oils and cancer*. Springer, Cham.