

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Vliv kombinace kyseliny kaprinové a kyseliny laurové  
s dusičnany na bachorovou fermentaci a produkci metanu  
in vitro**

**Diplomová práce**

**Pavla Krausová**

**Výživa zvířat**

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

© 2024 ČZU v Praze

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vliv kombinace kyseliny kaprinové a kyseliny laurové s dusičnany na bachorovou fermentaci a 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 neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 19.4.2024

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Miroslavovi Jochovi, Ph.D., že jsem mohla psát diplomovou práci pod jeho vedením a za jeho ochotu, trpělivost a cenné rady v průběhu psaní této práce.

# Vliv kombinace kyseliny kaprinové a kyseliny laurové s dusičnany na bachorovou fermentaci a produkci metanu *in vitro*

## Souhrn

Metan je jedním z hlavních skleníkových plynů, jehož produkce je stále alarmujícím problémem v souvislosti s globálním oteplováním. Značný podíl na produkci metanu pochází z fermentačního procesu v bachoru skotu, což vedlo k hledání strategií snižování této produkce. Jednou z navrhaných metod bylo využití kombinace kyseliny kaprinové a laurové s dusičnany, u kterých byl v minulosti již prokázán antimetanogenní účinek. Předpokládalo se, že by tato kombinace mohla mít synergický nebo aditivní efekt.

Diplomová práce se proto zaměřila na zjištění vlivu kombinace těchto látek na produkci metanu a bachorovou fermentaci. Metoda experimentu zahrnovala kontinuální vsádkovou *in vitro* kultivaci s využitím bachorové tekutiny. Experimentální design byl postaven na 2×2 faktoriálním modelu s následujícími ošetřeními: kontrola (bez aditiv), dusičnany ( $\text{NO}_3^-$ ) (1,825 mmol/l), směs kyseliny kaprinové a laurové (C10/12) (250 mg/l, kde 125 mg/l připadalo na každou z kyselin) a kombinace dusičnanů a směsi kyselin kaprinové a laurové ( $\text{NO}_3^- + \text{C10/12}$ ) (1,825 mmol/l  $\text{NO}_3^- + 250 \text{ mg/l C10/12}$ ). Koncentrace metanu ve fermentačním plynu a koncentrace těkavých mastných kyselin v kultivačním médiu se měřila pomocí plynové chromatografie a koncentrace amoniakálního dusíku byla měřena indofenolovou metodou s využitím spektrofotometrie.

Výsledky ukázaly významné snížení produkce metanu ( $P < 0,05$ ) o 9,2 % při použití  $\text{NO}_3^-$  a o 21,3 % při použití C10/12. Avšak kombinace  $\text{NO}_3^- + \text{C10/12}$  neprokázala ( $P < 0,05$ ) významné zvýšení účinku ve srovnání se samostatným použitím směsi kyselin. Bylo rovněž zjištěno, že hlavním faktorem ovlivňujícím antimetanogenní účinek byla C10/12, přičemž  $\text{NO}_3^-$  měly menší vliv. Dále bylo zjištěno významné snížení ( $P < 0,05$ ) amoniakálního dusíku o 18 % u C10/12 a naopak významné zvýšení ( $P < 0,05$ ) o 12,7 % u  $\text{NO}_3^-$ . Koncentrace těkavých mastných kyselin se změnila u ošetření  $\text{NO}_3^- + \text{C10/12}$  a C10/12. U mastných kyselin použitých samostatně bylo snížení těkavých mastných kyselin statisticky významné a snížilo se ( $P < 0,05$ ) o 13,2 %. Poměr acetyl:propionát se naopak se zvýšil u  $\text{NO}_3^- + \text{C10/12}$  a C10/12.

Tímto bylo potvrzeno, že jak  $\text{NO}_3^-$ , tak C10/12 mají potenciál snižovat produkci metanu u skotu při samostatném použití. Nicméně, v případě jejich kombinace nedošlo k žádnému zjevnému synergickému či aditivnímu efektu. Tyto výsledky přispívají k pochopení mechanismů ovlivňujících produkci metanu u přežvýkavců a mohou vést k vylepšení strategií snižování emisí skleníkových plynů v sektoru živočišné výroby.

**Klíčová slova:** skot, bachorová fermentace, metanogeneze, mastné kyseliny, dusičnany

# Effect of the combination of capric and lauric acids with nitrates on rumen fermentation and methane production *in vitro*

## Summary

Methane is one of the main greenhouse gases which production is an increasingly alarming problem in the context of global warming. A significant proportion of methane production comes from the fermentation process in the rumen of cattle, which has led to a search for strategies to reduce this production. One of the proposed methods was the use of a combination of capric and lauric acids with nitrates, which have already been shown to have an anti-methogenic effect in the past. It was thought that this combination could have a synergistic or additive effect.

The thesis therefore focused on determining the effect of the combination of these substances on methane production and rumen fermentation. The experimental method involved continuous *in vitro* culture using rumen fluid. The experimental design was based on a 2×2 factorial model with the following treatments: control (no additives), nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) (1.825 mmol/l), a mixture of capric and lauric acids (C10/12) (250 mg/l, where 125 mg/l was attributed to each acid), and a combination of nitrate and a mixture of capric and lauric acids ( $\text{NO}_3^- + \text{C10/12}$ ) (1.825 mmol/l  $\text{NO}_3^- + 250 \text{ mg/l C10/12}$ ). The concentration of methane in the fermentation gas and the concentration of volatile fatty acids in the culture medium were measured by gas chromatography, and the concentration of ammoniacal nitrogen was measured by the indophenol method using spectrophotometry.

The results showed a significant reduction in methane production ( $P < 0.05$ ) of 9.2% using  $\text{NO}_3^-$  and 21.3% using C10/12. However, the  $\text{NO}_3^- + \text{C10/12}$  combination did not show ( $P < 0.05$ ) a significant increase in effect compared to the use of the acid mixture alone. It was also found that C10/12 was the main factor influencing the antimethanogenic effect, with  $\text{NO}_3^-$  having a lesser effect. Furthermore, there was a significant decrease ( $P < 0.05$ ) in ammonia nitrogen of 18% for C10/12 and conversely a significant increase ( $P < 0.05$ ) of 12.7% for  $\text{NO}_3^-$ . The concentration of volatile fatty acids changed only in the C10/12 treatment, with a statistically significant decrease ( $P < 0.05$ ) of 13.2% and an increase ( $P < 0.05$ ) in the acetate:propionate ratio.

This confirmed that both  $\text{NO}_3^-$  and C10/12 have the potential to reduce methane production in cattle when used alone. However, there was no apparent synergistic or additive effect when they were combined. These results contribute to the understanding of the mechanisms affecting methane production in ruminants and may lead to improved greenhouse gases reduction strategies in the livestock sector.

**Keywords:** cattle, rumen fermentation, methanogenesis, fatty acids, nitrates

# Obsah

<b>1 Úvod .....</b>	<b>8</b>
<b>2 Vědecká hypotéza a cíle práce .....</b>	<b>9</b>
<b>3 Literární rešerše .....</b>	<b>10</b>
<b>3.1 Proces trávení u přežvýkavců .....</b>	<b>10</b>
3.1.1 Bachorové mikroorganismy .....	11
3.1.1.1 Bakterie .....	11
3.1.1.2 Archea .....	12
3.1.1.3 Protozoa.....	13
3.1.1.4 Houby .....	14
3.1.1.5 Bakteriofágy .....	14
<b>3.2 Produkce metanu .....</b>	<b>15</b>
3.2.1 Produkce metanu v bachoru .....	16
<b>3.3 Způsoby snižování metanu .....</b>	<b>16</b>
3.3.1 Složení a kvalita krmiv .....	17
3.3.1.1 Koncentrovaná krmiva .....	17
3.3.1.2 Typ píce a její kvalita .....	18
3.3.1.3 Konzervace krmiv .....	18
3.3.2 Doplnňkové látky .....	19
3.3.2.1 Lipidy .....	19
3.3.2.2 Dusičnany .....	21
3.3.2.3 Sířany .....	22
3.3.2.4 3-Nitrooxypropanol.....	23
3.3.2.5 Ionofory .....	24
3.3.2.6 Makrořasy .....	25
3.3.2.7 Silice.....	26
3.3.2.8 Třísloviny .....	27
3.3.2.9 Saponiny .....	28
3.3.2.10 Kyanogenní glykosidy.....	29
3.3.2.11 Probiotika .....	30
<b>4 Metodika .....</b>	<b>32</b>
<b>4.1 Design experimentu .....</b>	<b>32</b>
4.1.1 Zvířata a pokusný substrát .....	32
4.1.2 Inkubace.....	32
4.1.3 Odběr vzorků a chemické analýzy .....	33

<b>4.2</b>	<b>Statistická analýza .....</b>	<b>33</b>
<b>5</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>34</b>
<b>6</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>36</b>
<b>6.1</b>	<b>Mastné kyseliny .....</b>	<b>36</b>
<b>6.2</b>	<b>Dusičnany .....</b>	<b>38</b>
<b>6.3</b>	<b>Kombinace dusičnanů a mastných kyselin .....</b>	<b>38</b>
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>40</b>
<b>8</b>	<b>Literatura .....</b>	<b>41</b>

# 1 Úvod

Skleníkové plyny v atmosféře přispívají k intenzifikaci klimatického jevu zvaný skleníkový efekt a k následnému globálnímu oteplování. Mezi hlavní skleníkové plyny se řadí oxid uhličitý, metan a oxid dusný. Řada důkazů potvrzuje, že hlavní příčinou globálního oteplování je od počátku 20. století lidská činnost. Důsledkem lidské činnosti se čím dál víc zvyšují koncentrace skleníkových plynů v atmosféře, které ovlivňují různé aspekty klimatu, včetně povrchových teplot vzduchu a oceánů, srážek a hladiny moří (IPCC 2021). Zemědělství je největším samostatným zdrojem globálních emisí metanu z lidské činnosti. Představuje přibližně 21 % celkových ročních antropogenních emisí skleníkových plynů a z toho 80 % připadá na živočišnou výrobu. Z tohoto sektoru pochází téměř 90 % metanu od přežvýkavců (Bačeninaitė et al. 2020). Důvodem, proč produkují nejvíce metanu přežvýkavci, je bachorová fermentace. Metan vzniká převážně při procesu zvaném hydrogenotrofní reakce, při kterém metanogenní archea přeměňují oxid uhličitý na metan za použití vodíku jako donoru elektronů (Friedman et al. 2017). Metan tudíž vzniká jako konečný produkt fermentace krmiva v bachoru a je známo, že ho domestikovaní přežvýkavci ročně vyprodukují až 86 Tg (milionů tun) (Hook et al. 2010). Metan zvíře nevyužije a uvolňuje ho do svého okolí, což pro něj představuje energetickou ztrátu 2–2 % hrubé energie (Danielsson et al. 2017). Snížená metanogeneze by tedy vedla nejen k menšímu uvolňování skleníkových plynů do atmosféry, ale také k omezenému plýtvání energie z krmiva, která může být využita zvířaty (Hook et al. 2010).

Proto se mnoho studií zabývá různými strategiemi, které umožní snižovat metanogenezi. Veškeré strategie fungují na třech základních principech: snížení populace bachorových metanogenů, snížení produkce vodíku a zajištění alternativních akceptorů vodíku (Sharifi et al. 2022). Jako účinné se prokázaly lipidy, které fungují na principu snížení bachorových mikroorganismů. V *in vitro* i v *in vivo* studiích bylo prokázáno, že snižují populaci protozoí a archeí (Yanza et al. 2021). Podle Dohmeho et al. (2000) kokosový a palmojádrový olej, které jsou zdrojem masných kyselin se středně dlouhým uhlíkatým řetězcem (MCFA) a to kyseliny laurové a myristové, významně redukují metanogeny a nálevníky pokud jsou v poměru 2,5:1. V dalším *in vitro* pokusu Goela et al. (2009) se rozebíraly účinky masných kyselin s krátkým uhlíkatým řetězcem (SCFA), jejichž zástupcem je např. kyseliny kaprinová (C10:0). V jejich pokusu bylo zaznamenáno dramatické snížení produkce metanu o 33 % v dávce 20 mg a 85 % v dávce 30 mg doplňku kyseliny kaprinové. Dalším aditivem, které může snížit metanogenezi se prokázaly dusičnany. Ty slouží jako akceptor vyprodukovaného vodíku a konkurují tak metanogenům. Dusičnany se vodíkem redukují na dusitany, což je termodynamicky výhodnější reakce, než methanogeneze a proto je tato reakce upřednostněna (Ungerfeld 2020; Sharifi et al. 2022). Wenner et al. (2020) hlásí 31% snížení denní produkce metanu, když byly do krmné dávky přidány dusičnany. Pochopení mechanismu účinku antimetanogenních aditiv a jejich možných interakcí je klíčové pro úspěšné snižování produkce metanu a zachování energie pro hostitelský organismus.



## 2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Tato práce se zabývala dvěma hypotézami. Jednak se předpokládalo, že samostatné použití dusičnanů a směsi kyseliny kaprinové a laurové sníží bachorovou produkci metanu. Další hypotézou byl předpoklad, že kombinace těchto látek bude mít aditivní nebo synergický účinek, který povede k nižší produkci metanu než při jejich samostatném použití.

Cílem práce je ověřit vliv kombinace kyseliny kaprinové a laurové s dusičnany na bachorovou fermentaci a produkci metanu *in vitro*.

### 3 Literární rešerše

Přežvýkavci jsou od ostatních monogastrických zvířat odlišni přítomností předžaludků. Ty jim umožňují efektivně zpracovávat vlákninu, která je jinak těžce stravitelná, protože nemůže být rozložena pouhou enzymatickou hydrolýzou probíhající v žaludku nepřežvýkavých zvířat. Takovému zvířeti tudíž nemůže poskytovat žádné kalorie a bez užitku se vyloučí (Graminha et al. 2008). Předžaludky se dělí na tři oddíly: bachor, kniha a čepec. Vlastní žaludek se nazývá slez. Největší a metabolicky neaktivnější částí předžaludků je bachor. V něm probíhá mikrobiální fermentace, při které se základní živiny krmiva přeměňují na metabolické produkty, a ty může zvíře dále využívat (Harfoot 1981).

#### 3.1 Proces trávení u přežvýkavců

Vývoj předžaludků má evoluční význam. Umožnil zvířeti rychle pozřít velké množství potravy s minimem žvýkání před polknutím, poté se mohlo přesunout na místo odpočinku, kde mohlo krmivo dokonale přežvýkat. Přežvýkavec tak mohl trávit většinu času v úkrytu před predátory (Miller 2012). Specifické trávící ústrojí umožňuje skotu vyvrhování soust do dutiny ústní (regurgitaci), kde jsou důkladně prožvýkána a opět polykána. Díky tomu se zmenší částice tráveného materiálu, čímž se zvětší povrch k mikrobiálnímu rozkladu. K fermentačnímu procesu rovněž přispívá dokonalejší proslinění potravy. Poté dochází k fermentaci potravy v čepci a bachoru (Reece 2011). Než se trávený materiál dostane do slezu, je z 60-70 % rozložen (Blair 2021). Fermentaci zajišťují anaerobní mikroorganismy, které mají se skotem symbiotický vztah. Hostitel jim poskytuje živiny a udržuje optimální fyzikální a chemické podmínky potřebné ke správnému průběhu fermentace. Mikroorganismy skotu poskytují energii, bílkoviny a vitamíny (Nagaraja 2016).

Nejvýznamnějším krmivem pro skot jsou rostliny, v jejichž stěnách se nacházejí strukturální sacharidy. Bachorové mikroorganismy si produkují vlastní enzymy k hydrolýze, díky které rozštěpí složité polysacharidy na di- a monosacharidy (da Cunha et al. 2023). Např. pouze mikrobiální enzymy dokáží rozštěpit  $\beta$ -1,4 glykosidickou vazbu mezi molekulami glukózy, které jsou součástí celulózy (Graminha et al. 2008). Následně tyto monomery mikroorganismy využijí pro jejich růst a proliferaci. Vznikají koncové produkty, které poskytují významné prekurzory pro metabolické dráhy hostitele (da Cunha et al. 2023). Jedná se především o těkavé mastné kyseliny (TMK), zejména kyselinu octovou, propionovou a máselnou. Tyto kyseliny zajišťují většinu energetických potřeb zvířete (Blair 2021). Obecně asi 60–80 % energie dostupné pro skot pochází z TMK. Vzhledem k tomu, že velká část sacharidů v píci sestává z celulózy a příbuzných sloučenin, může skot využít tato krmiva jako hlavní zdroj energie (Miller 2012). Podíl TMK se mění podle složení krmné dávky, i když hlavním produktem je vždy kyselina octová. Vysoký podíl této mastné kyseliny je důležitý pro syntézu mléčného tuku. U skotu, kterému je předkládáno krmivo s vysokým obsahem vlákniny, je molární poměr kyseliny octové, kyseliny propionové a kyseliny máselné přibližně 70:20:10 (Blair 2021). Bachorové mikroorganismy mohou za určitých situací (např. při překrmění škrobem) na TMK přeměňovat i jednoduché cukry a škrob. Tím je ale produkováno velké množství kyseliny mléčné, což může vést k rozvoji bachorové acidózy.

Dalším praktickým přínosem symbiocy s bachorovými mikroorganismy je využívání neproteinových dusíkatých sloučenin k syntéze bílkovin nebo aminokyselin. Skot tedy může přijímat syntetické nebo odpadní dusíkaté produkty a vytvářet z nich vysoce kvalitní bílkoviny, které mají v lidské výživě vysokou výživovou hodnotu. Mikroorganismy v bachoru dále produkují vitaminy skupiny B, vitamin K a esenciální aminokyseliny, takže skot (s výjimkou mladých telat) nepotřebuje dietní zdroj těchto základních živin (Miller 2012). Částečně strávený materiál dále přechází z bachoru a čepce do oddílu zvaného kniha, kde je vstřebána velká část vody a nakonec putuje do slezu (Blair 2021). Trávení ve slezu se už velmi podobá trávení v pravém žaludku monogastrických zvířat. Slez vylučuje značné množství žaludeční šťávy obsahující kyselinu chlorovodíkovou, díky které dochází ke snížení pH na 2,5 a tím vytváří vhodné prostředí k aktivitě enzymů (Miller 2012).

### 3.1.1 Bachorové mikroorganismy

Jak již bylo výše zmíněné, v bachoru jsou udržované určité fyzikální a chemické podmínky důležité pro optimální mikrobiální fermentaci. Do těchto podmínek se řadí např. hodnota pH, kterou má bachorová tekutina obecně v rozmezí 5,8-6,8. Teplota je stabilní a pohybuje se kolem 39°C. Kapalná fáze bachoru má oxidačně-redukční potenciál asi -350 mV, prostředí bachoru je tedy extrémně redukované a téměř bez kyslíku. V bachoru je miliarda mikroorganismů na ml bachorové tekutiny (Miller 2012). Tvoří ji tzv. autochtonní a alochtonní mikrobiota. Autochtonní mikrobiota je původní, která kolonizuje a roste. Tyto mikroorganismy většinou žijí v harmonii s hostitelem. Kdežto alochtonní mikrobiota z velké části pochází z přijaté potravy, vody a v malé míře z polykaného vzduchu nebo z jiného prostředí hostitele. Tyto mikroorganismy jsou v neaktivním stavu. Nepůvodní mikroorganismy ale také zahrnují různé gastrointestinální patogeny, které mohou kolonizovat a růst za účelem vzniku infekce. Když je ekosystém nějakým způsobem narušen, nebo dojde k porušení integrity bachorové stěny, mohou převzít roli patogena i někteří členové původního mikrobiomu, tzv. oportunní patogeny.

Mikrobiální populace v bachoru zahrnuje členy, kteří patří do všech tří domén: *Eubacteria* (bakterie), *Archaea* (methanogeny) a *Eukarya* (Protozoa a houby) (Nagaraja 2016). Bakterie a Protozoa představují 90 % mikrobiální populace v bachoru, avšak druhová skladba se v bachoru mění v závislosti na potravě (Miller 2012; Pfau et al. 2023). Mikroorganismy se vzájemně ovlivňují prostřednictvím různých biotických vztahů, jako je mutualismus a komensalismus. Jsou tradičně charakterizovány fyziologickými, morfologickými a ekologickými rozdíly. Většina z nich má však schopnost rozkládat, fermentovat a/nebo ukládat polysacharidy a bílkoviny pocházející z rostlin (Pfau et al. 2023).

#### 3.1.1.1 Bakterie

V bachoru je rozsáhlá populace bakterií s počtem v rozmezí  $10^{10}$ - $10^{11}$  na g obsahu, složenou z více jak 200 druhů. Z celkové mikrobiální populace zaujímají bakterie až 95 % (Cammack et al. 2018). Druhové složení je dáno řadou faktorů, včetně preference k určitým substrátům tj. krmivu, dostupností energie a odolností vůči určitým konečným metabolickým produktům, které mohou být pro některé druhy toxické (Matthews et al. 2019). Většina bakterií je obligátně anaerobní, ale vyskytují se i fakultativně anaerobní bakterie. Těch je většina

nepůvodní přechodná populace, která je přenášena do batoru prostřednictvím krmiva či vody (Nagaraja 2016). Z hlediska složení buněčné stěny je 80-90 % populace bakterií v batoru gramnegativní. Podíl grampozitivních bakterií, jako např. *Lactobacillus*, se však může změnit u zvířat krmených obilninami a dosahovat až 20-30 % z celkového počtu bakterií, protože v batoru poklesne pH v důsledku příjmu snadno fermentovatelných sacharidů (Matthews et al. 2019).

Bachorové bakterie se mohou rozdělit do pěti podskupin na základě jejich interakce s částicemi potravy na: 1) bakterie volně se vznášející v bachorové tekutině, 2) bakterie slabě spojené s částicemi krmiva, 3) bakterie pevně spojené s částicemi krmiva, 4) bakterie spojené s bachorovým epitelem, tzv. epimurální bakterie a 5) bakterie přilnuté k povrchu epiteliálních buněk, prvoků nebo sporangií hub (Matthews et al. 2019). Epimurální bakterie a bakterie plovoucí v bachorové tekutině tvoří minoritní složku (~30 %) celkové bakteriální populace. Naproti tomu bakterie ulpívající na částicích krmiva představují hlavní složku (70 %) celkové bakteriální populace. Bakterie, které volně plují v bachorové tekutině nebo jsou připojeny k částicím krmiva, se aktivně podílejí na trávení krmiv. Epimurální bakterie nijak významně nepřispívají k bachorovému trávení. Mnohé z epimurálních bakterií jsou fakultativně anaerobní a produkují enzym ureázu, čímž pomáhají v batoru udržet anaerobiózu (Cammack et al. 2018).

Dále se mohou bakterie klasifikovat podle toho jaké preferují substráty a jaký konečný produkt vytvoří. Mezi hlavní substráty patří celulóza, hemicelulóza, pektin, škrob a aminokyseliny. V batoru převládají rody *Prevotella*, *Butyrivibrio* a *Ruminococcus*. Větší mikrobiální rozmanitost podporuje komplexnější potrava. Mezi nejvýznamnější celulolytické bakterie patří *Fibrobacter succinogenes* a *Ruminococcus albus*. Jejich schopnost rozkládat celulózu je totiž mnohem vyšší než u jiných celulolytických bakterií, což je pravděpodobně způsobeno kvůli tomu, že disponují řadou genů kódujících enzymy, které se podílí při rozkladu vlákniny (Matthews et al. 2019). Významné bakterie, které rozkládají hemicelulózu jsou *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Prevotella ruminocola*, *Ruminococcus flavefaciens* a *Ruminococcus albus*. Pektin je fermentován nejčastěji bakteriemi *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Prevotella ruminocola*, *Lachnospira multiparus*, *Succinivibrio dextrinosolvens*, a *Fibrobacter succinogenes*. Do krmné dávky skotu je kvůli požadavku na velkou produkci často přidán i koncentrované krmivo, které bakteriím přináší větší množství škrobu jako substrátu. Mezi bachorové bakterie, které hrají významnou roli při fermentaci škrobu patří *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Prevotella ruminocola*, *Fibrobacter succinogenes*, *Clostridium species*, *Streptococcus bovis*, *Ruminobacter amylophilus*, *Succinimonas amylolytica* a *Selenomonas ruminantium*. Dalšími substráty, které jsou v batoru přítomny i mimo hlavní složky vlákniny a škrobu jsou např. aminokyseliny. Ty jsou snadno fermentovatelné bakteriemi rodu *Prevotella* za vzniku adenosin trifosfátu (ATP) (Cammack et al. 2018).

### 3.1.1.2 Archea

Archaea se fylogeneticky liší od bakterií, prvoků a hub absencí peptidoglykanů a neobvyklou lipidovou strukturou (Nagaraja 2016). Jsou jedinými známými mikroorganismy, kteří jsou schopní v batoru produkovat metan. Jsou zvané také jako metanogeny a vyskytují se v rozmezí  $10^6$ - $10^8$  buněk na ml, což představuje méně než 4 % mikrobiálního společenstva

(Matthews et al. 2019). Podobně jako bakterie plovou v bachorové tekutině nebo jsou vázány na pevné látky, prvoky či bachorový epitel (Cammack et al. 2018). Dle Nagaraja (2016) se methanogeny nachází buď na vnějším povrchu nálevníků (ektosymbionti), nebo uvnitř buňky (endosymbionti). Většina druhů metanogenů využívá jako zdroj ke svému růstu látky, které vytváří jiní mikroorganismy (často Protozoa). Těmito látkami je především vodík ( $H_2$ ) někdy i mravenčan ( $CHNaO_2$ ). Elektrony z těchto látek pak využijí k redukci oxidu uhličitého ( $CO_2$ ) na metan ( $CH_4$ ). Některé druhy mohou k produkci  $CH_4$  využívat také methylové skupiny z metanolu, metylaminů, nebo acetátu (např. *Methanosarcin abarkeri*) (Stewart et al. 1997). Nicméně těchto metanogenů je v bachoru zanedbatelné množství, protože je jejich růst pomalejší než průchod obsahu bachoru, a proto moc dlouho nepřežijí. V důsledku symbiózy metanogenů s nálevníky vzniká až 37 %  $CH_4$  produkovaného v bachoru (Cammack et al. 2018). Díky produkci  $CH_4$  se udržuje množství  $H_2$  v bachoru na nízké úrovni, což umožňuje efektivnější fermentaci (Matthews et al. 2019). Ačkoli bylo mimo bachorový biotop klasifikováno 23 rodů a stovky druhů metanogenů, v bachoru bylo zaznamenáno pouze několik rodů a druhů. V bachoru se z většiny vyskytují rody *Methanobrevibacter*, *Methanomicrobium*, do kterých patří až 92,3 % bachorových archeí a velká skupina nekultivovatelných methanogenů. Nejrozšířenějším a nejlépe charakterizovaným metanogenem v bachoru je *Methanobrevibacter ruminantium* (Cammack et al. 2018).

### 3.1.1.3 Protozoa

Říše protozoa neboli prvoci, byla ze souboru mikroorganismů obývajících bachor objevena hned jako první a to kvůli své nápadné velikosti (délka až 200  $\mu m$ ) a aktivním pohybu (Nagaraja 2016). I když je počet protozoí v celé bachorové mikrobiální populaci nízký, tvoří téměř 50 % biomasy v bachoru (Cammack et al. 2018). Protozoa jsou striktní anaerobové a jsou závislí na zásobování živin od hostitele. Někteří z nich (nálevníci a trichomonády) mají organelu zvanou hydrogenosom, která se podílí na využití kyslíku ( $O_2$ ) v bachoru. Díky nim prvoci do jisté míry tolerují aerobní prostředí a jsou také zodpovědní za odstraňování  $O_2$  a udržení anaerobiózy. Bachoroví prvoci se obecně dělí na bičíkovce a nálevníky podle toho, zda mají bičíky nebo brvy. Bičíky jsou ve srovnání s brvami větší na délku i tloušťku a slouží k pohybu. Bičíkovci se pohybují v počtu  $10^2$ - $10^3$  buněk na ml bachorové tekutiny a jsou oproti nálevníkům menší. Využívají pouze rozpustné živiny a jejich role při bachorové fermentaci je proto zanedbatelná. Nálevníci mají brvy, které jsou malé, tenké a početnější, fungují k pohybu a pomáhají při přijímání potravy. Nálevníci jsou v počtu  $10^4$ - $10^6$  buněk na ml bachorové tekutiny (Nagaraja 2016; Matthews et al. 2019). Jsou vysoce specializovaní a mají strukturu a vlastnosti podobné živočichům. Jejich buňka je ohraničena pelikulou nebo pokožkou a má vnitřní struktury jako je trávicí trakt, močový trakt, kosterní struktury atd. Jsou dvoujaderné, přičemž jedno jádro je velké (makrojádro) a druhé malé (mikrojádro) (Nagaraja 2016). V bachoru bylo identifikováno několik rodů a stovky druhů nálevníků. Jsou odpovědné z 30-40 % za celkové trávení vlákniny a mohou produkovat  $H_2$  přes hydrogenosomy (Matthews et al. 2019). Mají soubor hydrolytických enzymů, takže se aktivně podílejí na procesu trávení sacharidů, proteinů i tuků. Všichni nálevníci aktivně požírají bakterie a tráví jejich buňky. Tím se bakterie pro nálevníky stávají hlavním zdrojem bílkovin (Nagaraja 2016).

#### 3.1.1.4 Houby

Že jsou členem bachorové mikrobiální populace anaerobní houby, bylo zjištěné až v roce 1975 Colinem Orpinem. Před tímto objevem byly houbové struktury tj. spory mylně považovány za bičíkaté prvoky (Nagaraja 2016). Podíl hub z celkové hmotnosti bachorových mikroorganismů je obtížné posoudit kvůli dvoufázovému životnímu cyklu a extenzivnímu růstu na fragmentech rostlin. Odhaduje se, že houby tvoří 8–12 % celkové mikrobiální populace v bachoru, v závislosti na druhu krmení (Matthews et al. 2019).

V bachoru jsou buď houby fakultativně anaerobní a aerobní, které jsou přechodné a nepodílejí se na trávení v bachoru, nebo houby obligátně anaerobní, které jsou v bachoru původní a přispívají k bachorovému trávení. Na základě morfologických znaků se bachorové houby dělí na dvě velké skupiny: kvasinky a plísně. Kvasinky jsou jednobuněčné organismy, jejichž koncentrace se v bachoru pohybuje v rozmezí  $10^2$ – $10^3$  na gram obsahu a předpokládá se, že jde o přechodné populace, které významně nepřispívají k bachorové fermentaci. Plísně jsou naopak mnohobuněčné a tvoří síť filament zvaných hyfy, které dohromady tvoří mycelium. Jednou z významných hub, patřící do plísni je např. třída *Chytridomycete*, která se rozmnožuje pohyblivými zoosporami (Nagaraja 2016).

Přestože jsou v bachoru nejvýznamnější bakterie, houby jsou nejefektivnější v degradaci potravy. Bachorové houby mají celulosomy, tedy multienzymové komplexy přichycené na buněčné stěně (Matthews et al. 2019). Houby tak produkují hydrolytické enzymy potřebné k rozkladu hlavních složek rostlinné biomasy. Mezi produkované enzymy patří celulózy, hemicelulózy, pektinové lyázy, amylázy a proteázy. Houby v bachoru také produkují fenolické esterázy p-kumaroyl a feruloyl, které dokáží štěpit vazby mezi hemicelulózami a ligninem. Díky vývoji rhizoidů (větvičí se hyfy) jsou houby schopny pronikat do rostlinných pletiv lépe než bakterie a prvoci a krmivo je tak lépe rozloženo (Nagaraja 2016). Mohou metabolizovat hexózy nebo pentózy za vzniku látek, mezi nimiž je i  $H_2$  (Matthews et al. 2019). Vzhledem k tomu, že houby produkují hlavní prekurzory metanu (mravenčan a  $H_2$ ), je fermentační profil v přítomnosti metanogenů změněn (méně etanolu, laktátu a  $H_2$ ) (Nagaraja 2016).

#### 3.1.1.5 Bakteriofágy

Bakteriofágy tj. fágy jsou viry, které infikují bakterie. Vyskytují se v husté populaci o přibližné velikosti  $10^7$ – $10^9$  fágů na gram obsahu bachoru (Matthews et al. 2019). Ve virové komunitě bachoru dominují bakteriofágy řádu *Caudovirales*. Jsou vždy přítomny ve vysokém počtu a aktivně se replikují v hustých populacích bakterií bachoru, a proto jsou nejlépe prozkoumané a nejlépe pochopené (Gilbert et al. 2020). Když fág napadne bakteriální buňku, nejprve se připojí k receptoru na povrchu bakterie a poté do buňky uvolní nukleovou kyselinu. Jakmile se DNA dostane do buňky, dojde k jednomu ze dvou procesů zvaných lýza nebo lysogenie. Při lytickém procesu se viry replikují s využitím RNA polymerázy hostitele. Výsledkem je lýza (destrukce buňky) a uvolnění fágů. Oproti tomu při lysogenním procesu se fágová DNA rekombinací začlení do DNA hostitelské bakterie. Fág zůstává latentní a nezpůsobuje lýzu. Takový stav se nazývá lysogenní. Vložená fágová DNA se nazývá profág a při dělení hostitelské buňky se horizontálně předává dceřiným buňkám. Profág může hostitelské buňce propůjčit nové vlastnosti nebo se může vyjmout z bakteriálního chromozomu a vstoupit

do lytické fáze (Nagaraja 2016). Funkce bakteriofágů není přesně identifikována, ale je možné, že lytické fágy přispívají k recyklaci živin a mají určitý vliv na druhové nebo kmenové složení bakteriální populace v bachoru (Gilbert et al. 2020).

## 3.2 Produkce metanu

Některé plyny v atmosféře přispívají k intenzifikaci klimatického jevu zvaný skleníkový efekt a k následnému globálnímu oteplování. Proto nesou název skleníkové plyny. Řada důkazů potvrzuje, že hlavní příčinou globálního oteplování je od počátku 20. století lidská činnost. Důsledkem lidské činnosti se čím dál víc zvyšují koncentrace skleníkových plynů v atmosféře, které způsobují oteplování a ovlivňují různé aspekty klimatu, včetně povrchových teplot vzduchu a oceánů, srážek a hladiny moří (IPCC 2021). Teplota planety Země se od poloviny 19. století zvýšila o cca 1 °C. Oteplování vzniká tím, že skleníkové plyny pohlcují infračervené záření vyzařované z povrchu Země (Wang et al. 2016).

Mezi hlavní skleníkové plyny se řadí CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> a oxid dusný (N<sub>2</sub>O). V roce 2019 dosáhly roční průměry CO<sub>2</sub> 410 ppm (z angl. *parts per million*, tedy počet částic na milion částic celku), CH<sub>4</sub> 1866 ppb (*parts per billion*, čili počet částic na miliardu částic celku) a N<sub>2</sub>O 332 ppb (IPCC 2021). Z toho se CO<sub>2</sub> a CH<sub>4</sub> společně podílejí na oteplování z cca 80-85 %. Toto procento se za posledních 20-30 let nezměnilo, ale celkový radiační vliv, který způsobuje zvýšení teploty planety, se v tomto časovém rozmezí trvale zvyšuje (Wang et al. 2016). Přestože podle Cassia et al. (2018) koncentrace CH<sub>4</sub> představuje pouze 0,5 % koncentrace CO<sub>2</sub>, vznikají ze zvýšeného uvolňování CH<sub>4</sub> do atmosféry značné obavy. Jako skleníkový plyn totiž pohlcuje 30krát silněji infračervené záření než CO<sub>2</sub> a vydrží v atmosféře 10-12 let (Li et al. 2023). Navíc je také schopen zvyšovat množství ozonu v troposféře a zvyšovat množství vodní páry ve stratosféře, což může zvýšit radiační sílu přibližně o 70 % (Hook et al. 2010). Sauniois et al. (2020) uvádí, že v roce 2018 dosáhl molární podíl CH<sub>4</sub> v troposféře, tj. v přízemní vrstvě vzduchu 1857 ppb, což je přibližně 2,6krát více než jeho odhadovaná rovnovážná hodnota v roce 1750. CH<sub>4</sub> má přírodní i antropogenní původ. Emise antropogenního původu tvoří až 60 % z celkových emisí CH<sub>4</sub>. Největším zdrojem je výroba fosilních paliv (uhlí, ropa a zemní plyn). Další antropogenní zdroje tvoří anaerobní čištění odpadních vod, skládky a zemědělství. Do přírodních zdrojů, které tvoří zbylých 40 % emisí CH<sub>4</sub> patří mokřady, rašeliniště, divoká zvířata nebo sedimenty oceánů.

Zemědělství je největším samostatným zdrojem globálních emisí CH<sub>4</sub> z lidské činnosti. Zemědělství, včetně souvisejících emisí z odlesňování, představuje přibližně 21 % celkových ročních antropogenních emisí skleníkových plynů. Z toho 80 % pochází z živočišné výroby, z čehož téměř 90 % pochází od přežvýkavců a asi 10 % ze hnoje (Bačeninaitė et al. 2020). Tak velký podíl je způsoben rostoucí lidskou populací a zvyšující se poptávkou po živočišných produktech, které mají vysokou výživovou hodnotu (Reisinger et al. 2021). Zbývajících 20 % pochází především z rýžových polí s menším příspěvkem ze spalování zemědělských zbytků (Bačeninaitė et al. 2020). Emise CH<sub>4</sub> z chovu přežvýkavců však ve vyspělých zemích za posledních 50 let poklesly především díky neustálému zlepšování produktivity zvířat (Pickering et al. 2015).

### 3.2.1 Produkce metanu v bachoru

Důvodem, proč z živočišné výroby produkují nejvíce metanu právě přežvýkavci, je bachorová fermentace.  $\text{CH}_4$  vzniká jako konečný produkt fermentace krmiva v bachoru a jeho množství se liší v závislosti na zeměpisné poloze, produkčnímu využití či na kvalitě, příjmu, složení a zpracování krmiva (Hook et al. 2010). Rozdíly mohou být i mezi jednotlivými jedinci, přestože jsou podmínky krmení stejné (Danielsson et al. 2017). Domestikovaní přežvýkavci produkují celkově až 86 Tg (milionů tun)  $\text{CH}_4$  ročně. Přibližně 18,9 Tg pochází od dojníc, 55,9 Tg z masného skotu a pouhých 9,5 Tg z ovcí a koz.

Ačkoli k produkci metanu může docházet i v jiných částí trávicího traktu, v bachoru vzniká 89 % metanu, který zvíře uvolňuje především dutinou ústní a nosní (Hook et al. 2010). Jak bylo již zmíněné,  $\text{H}_2$  vznikající při fermentaci v bachoru využívají metogeny jako donor elektronů k redukci  $\text{CO}_2$  na  $\text{CH}_4$  (Ungerfeld 2020). Tento proces udržuje nízký parciální tlak  $\text{H}_2$ , který by mohl v opačném případě inhibovat metabolismus bachorových mikroorganismů. Díky odstraňování  $\text{H}_2$  v bachoru, metanogeny umožňují mikroorganismům zapojeným do fermentace optimální fungování a podporují úplnou oxidaci substrátů.  $\text{H}_2$  a  $\text{CO}_2$  využívá jako substrát skupina archeí kmene *Euryarcheota*. Existuje ale skupina metanogenů rodu *Methanosarcina*, pro které jsou  $\text{H}_2$  a  $\text{CO}_2$  nevýhodné pro jejich růst. Proto využívají metanol a metylaminy, přičemž také produkují  $\text{CH}_4$ .  $\text{CHNaO}_2$  vznikající při fermentaci může být také využit jako substrát pro methanogenezi, ale ten se místo toho často rychle přeměňuje na  $\text{H}_2$  a  $\text{CO}_2$  (Hook et al. 2010). Methanogeneze je jediným mechanismem syntézy ATP, který mají metanogenní archea k dispozici (Matthews et al. 2019).

### 3.3 Způsoby snižování metanu

$\text{CH}_4$  vyprodukovaný bachorovými metanogeny skot nevyužije a uvolňuje ho do svého okolí. To pro skot představuje energetickou ztrátu 2–12 % hrubé energie (Danielsson et al. 2017). Snižená produkce  $\text{CH}_4$  z bachorové fermentace by tedy vedla nejen k menšímu uvolňování skleníkových plynů do atmosféry, ale také k omezenému plýtvání energie z krmiva, která může být využita zvířaty (Hook et al. 2010). Proto byla provedena řada výzkumů, které se snažily přijít na způsoby, jak snížit produkci  $\text{CH}_4$ . Z dosavadních studií se dá konstatovat, že různé strategie snižování  $\text{CH}_4$  fungují na 3 základních principech: snížení populace bachorových metanogenů, snížení produkce  $\text{H}_2$  nebo zajištění alternativních akceptorů  $\text{H}_2$  (Sharifi et al. 2022). Způsobů jak snížit  $\text{CH}_4$  v bachoru je celá řada, proto jsou v následujících textech uvedené jen některé, přičemž se mohou vzájemně ovlivňovat. Může jít například o složení a kvalitu krmiva, kam by spadala koncentrovaná krmiva, konkrétní typ píce nebo konzervace krmiv. Dalšími strategiemi jsou krmná aditiva, kam by spadali lipidy, dusičnany, sírany, 3-nitrooxypropanol, ionofory, makrořasy, silice, třísloviny, saponiny, kyanogenní glykosidy či probiotika.



### 3.3.1 Složení a kvalita krmiv

#### 3.3.1.1 Koncentrovaná krmiva

Zvyšování množství koncentrovaných krmiv v krmné dávce skotu je již řadu let široce používanou strategií, i když původně hlavní snahou nebylo snížit emise  $\text{CH}_4$ , ale zvýšit užitkovost (Jiao et al. 2014). Krmiva s vysokým obsahem škrobů ovlivňuje bachorovou fermentaci, kdy se mění poměr těkavých mastných kyselin. Je podpořena tvorba kyseliny propionové, což má vliv na mikroorganismy a vzniká tím nižší množství  $\text{H}_2$  dostupného pro metanogeny. Janssen (2010) uvedl, že zvýšení tvorby propionátu je silně spojeno se snížením metanogeneze, protože proces vzniku propionátu tvoří alternativu tvorby  $\text{H}_2$ , a tak snižuje množství substrátu pro produkci  $\text{CH}_4$ . Navíc se snižuje pH, což dále inhibuje/snižuje populace celulolytických bakterií, prvoků a metanogenů (Ribeiro et al. 2015; Fouts et al. 2022). Kromě toho je část bachorových mikroorganismů citlivá na kolísání parciálního tlaku  $\text{H}_2$ , kdy i mírně zvýšené množství  $\text{H}_2$  v bachoru negativně ovlivňuje rozklad rostlinného materiálu (McAllister & Newbold 2008; Jobblin 1999). Vyšší množství koncentrovaných krmiv v krmné dávce by také mohlo vést ke rychlejšímu průchodu tráveného materiálu z bachoru, což by nasměrovalo více živin do zadních částí trávicí soustavy a nestihlo by dojít k vyšší produkci  $\text{CH}_4$  (Janssen 2010).

Van Gastelen et al. (2019) analyzovali 24 studií, ve kterých se sledoval vliv poměru objemného a koncentrovaného krmiva v krmné dávce a dospěli k závěru, že průměrné zvýšení koncentrovaných krmiv o 386 g/kg sušiny krmiva snížilo intenzitu produkce  $\text{CH}_4$  (g/kg produktu) o 27 % u mléčného skotu a o 31 % u masného skotu. Množství koncentrovaných krmiv v krmné dávce do 30-40 % snižuje emise  $\text{CH}_4$  relativně lineárně, ale při množství nad 80 % dochází k prudkému poklesu produkce metanu (Ribeiro et al. 2015; Islam & Lee 2019). Krmné dávky s takto vysokým podílem koncentrovaných krmiv však přináší riziko subakutní nebo akutní acidózy, laminitidy, jaterních abscesů a dalších poruch (Ribeiro et al. 2015). I když jsou koncentrovaná krmiva spojována s vyšší mléčnou užitkovostí, pokud jejich množství v krmné dávce přesáhne 50-55 %, projeví se negativní vliv na kvalitě mléka (Jiao et al. 2014; Ribeiro et al. 2015)

Vysoké zařazování koncentrovaných krmiv do krmné dávky skotu může také nepřímo zvyšovat celkové emise skleníkových plynů v důsledku intenzivnějšího pěstování obilovin. Tím by se kompenzovalo snížené množství skleníkových plynů vznikajících fermentací. Navíc by se tak intenzivně nevyužil fyziologický potenciál přežvýkavců přeměňovat nestravitelnou vlákninu na vysoce kvalitní zdroje bílkovin pro lidskou spotřebu. Vzhledem ke klimatickým změnám a skokovému nárůstu lidské populace bude pravděpodobně stále důležitější využívat obiloviny k výživě lidstva, nikoliv přežvýkavců (Olijhoek et al. 2022; Lileikis et al. 2023). Stejná krmná dávka se ale může účinkem lišit mezi jednotlivými plemeny. Např. Olijhoek et al. (2022) zjistili, že krmení krmnou dávkou s vysokým podílem koncentrovaných krmiv je méně účinnou strategií pro snížení emisí  $\text{CH}_4$  u jerseykých krav než u holštýnských krav, protože se plemeno jersey liší velikostí a fyziologií trávicího traktu.

### 3.3.1.2 Typ píce a její kvalita

Hlavním faktorem určující kvalitu píce je fenologická fáze růstu v době sklizně a botanické složení porostu. Se stárnutím rostoucího porostu se zvyšuje množství neutrálně detergentní (NDF) a aciododetergentní (ADF) vlákniny. Takové krmivo se stává méně chutným a hůře stravitelným. Pro zvířata v kategoriích s vysokými nároky na živiny nemusí mít takové krmivo dostatečnou výživovou hodnotu. Snižovala by se tím užítkovost a naopak rostla produkce CH<sub>4</sub> (Loza et al. 2021). Pro nižší produkci CH<sub>4</sub> jsou lepší krmiva z mladé trávy, kterým má nižší množství složek buněčné stěny a vyšší množství bílkovin a lehce stravitelných sacharidů (Eugène et al. 2021). Předpokládá se, že vysoký obsah rozpustných sacharidů podporuje produkci propionátu a snižuje pH v bacheru. To inhibuje růst metanogenů a snižuje produkci CH<sub>4</sub> na jednotku fermentované organické hmoty. Se zvyšující se stravitelností krmiv klesá produkce CH<sub>4</sub> (g/kg přijaté sušiny), stejně tak i intenzita produkce CH<sub>4</sub> (g/kg mléka) u mléčného skotu (Eugène et al. 2021).

Jak bylo již zmíněno, produkci CH<sub>4</sub> ovlivní druhy trav a přítomnost luskovin. Bylo prokázáno, že krmení určitými druhy trav, jako jsou trávy s vysokým obsahem lehce stravitelných cukrů, může snižovat produkci CH<sub>4</sub> u přežvýkavců (Meale et al. 2012). Krmné luskoviny jsou zajímavou strategií, jak dodat zvířatům dusík a zároveň snížit metanogenezi. Mohou navíc snížit emise skleníkových plynů díky nižší spotřebě dusíkatých hnojiv a produkci hnojiv (Eugène et al. 2021). Podobně zařazení krmiv majících vysoký obsah škrobu podporuje produkci propionátu, snižuje pH v bacheru a inhibuje růst metanogenů a protozoí (Meale et al. 2012). Druhy rostlin se mezi sebou liší i obsahem sekundárních metabolitů (třísloviny, saponiny, silice atd.), které mají toxický účinek na bakterie, protozoa. Vzhledem ke komenzálním vztahům mezi mikroorganismy ovlivňují změny v populacích bakterií a protozoí také populace metanogenních archeí, což dále sníží produkci CH<sub>4</sub> (Martin et al. 2010; Adesogan et al. 2013).

### 3.3.1.3 Konzervace krmiv

Na emise CH<sub>4</sub> mohou mít vliv také jednotlivé technologie konzervace krmiv. Intenzita metanogeneze má tendenci se snižovat, pokud je krmivo konzervováno. Silážování je účinnější než sušení. To lze vysvětlit tím, že silážovaná krmiva jsou již do určité míry fermentována, a stávají se tak snadněji a rychleji stravitelná (Martin et al. 2010; Beauchemin et al. 2020). Benchaar et al. (2001) zjistili, že při krmení siláže se snížila produkce CH<sub>4</sub> o 20 % víc než při krmení senem. Studie také prokázaly, že použití silážních inokulantů má taktéž pozitivní odezvu na snížení CH<sub>4</sub>. Nejen aplikace inokulantů, ale také použití kyseliny mravenčí v nepříznivých podmínkách sklizně. Díky ní se dosahuje lepšího příjmu sušiny, což spolu s výslednou zvýšenou užítkovostí zvířat vede k nižší produkci CH<sub>4</sub> na jednotku přijaté sušiny nebo užítkovosti (Adesogan et al. 2013; Navarro-Villa et al. 2013). Studie Hindrichsena et al. (2012) a Weinberga et al. (2003) navíc zdůrazňují příznivější podmínky anaerobní bacherové fermentace, pokud se silážní inokulanty *Lactobacillus* stávají součástí ekologie bacherových mikroorganismů, protože napomáhají pufrování bacheru a odstraňování O<sub>2</sub>. Tuto myšlenku většího výskytu *Lactobacillus plantarum* podpořila detekce DNA mikroorganismů a daktyloskopie u krav krmených siláží z vojtěšky ošetřenou inokulanty ve srovnání

s neinokulovanou siláží (Mohammed et al. 2012). Pro snižování emisí CH<sub>4</sub> se doporučuje, aby se při výrobě konzervovaných objemných krmiv věnovala pozornost zlepšování kvality konzervovaného materiálu, výběru rostlinných druhů a včasnému sečení porostu, aby se dosáhlo vyšší stravitelnosti a výživné hodnoty (Lileikis et al. 2023).

### 3.3.2 Doplnkové látky

#### 3.3.2.1 Lipidy

Z pohledu snižování emisí CH<sub>4</sub> se velká pozornost věnuje především některým mastným kyselinám, které po přidání do krmné dávky výrazně snižují emise CH<sub>4</sub>. Mastné kyseliny, které se používají jako doplňkové látky v krmivech, jsou důležitými složkami buněčné membrány, signálními molekulami buněk a metabolickými substráty v mnoha biochemických drahách a imunitními modulátory (Lee et al. 2017).

Obecně se mastné kyseliny rozdělují podle přítomnosti dvojné vazby na nasycené (obsahují dvojnou vazbu) a nenasycené (bez dvojné vazby) a podle délky uhlíkatého řetězce na masné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA, z angl. *short-chain fatty acids*), středně dlouhým řetězcem (MCFA, *medium-chain fatty acids*) a s dlouhým řetězcem (LCFA, *long-chain fatty acids*). Samostatnou skupinu tvoří tzv. PUFA (*polyunsaturated fatty acids*), což jsou nenasycené mastné kyseliny, jejichž chemická struktura se vyznačuje více než jednou dvojnou vazbou mezi atomy uhlíku (NZIP 2024).

Bylo prokázáno, že přídavek zejména PUFA a MCFA do krmiv pro skot významně snižuje emise CH<sub>4</sub>. Tyto mastné kyseliny mají toxický účinek na bakterie rozkládající vlákninu, protozoa a metanogeny (Rasmussen & Harrison 2011). Na bakterie mastné kyseliny působí tím, že pronikají do lipidové membrány bakteriální buňky v nedisociované formě. Jakmile se dostanou dovnitř buňky tak disociují a tím se v cytoplazmě sníží pH. Dojde k potlačení cytoplazmatických enzymů, systémů transportu živin, odpojení protonové pumpy a k buněčné smrti (Goel et al. 2009). Doplnění tuku bohatého na PUFA nebo MCFA do krmiva založeného na objemných krmivech snižuje stravitelnost vlákniny, produkci H<sub>2</sub> a nakonec i množství CH<sub>4</sub>. PUFA má také inhibiční účinek na produkci CH<sub>4</sub> prostřednictvím přímého využití H<sub>2</sub> nasycením (Rasmussen & Harrison 2011).

PUFA jsou pro tělo velmi důležité, neboť jsou esenciální (tělo si je není schopné samo syntetizovat) a hrají klíčovou roli v různých buněčných pochodech (Kapoor et al. 2021). Vyskytují se např. v rybím tuku a mikrořasách bohatých na kyselinu dekosahexaenovou (DHA) (Goel et al. 2009). Nejdůležitější zástupce těchto kyselin představují ω-3 a ω-6 mastné kyseliny, které se dále dělí na další podskupiny (Lee et al. 2017). Ze studie od Almana (2013) je patrné, že PUFA, především kyselina α-linolenová (ω-3 mastná kyselina) mají výrazné účinky na snižování CH<sub>4</sub>, zatímco nasycené mastné kyseliny jsou méně účinné.

MCFA mají kratší délku řetězce s 6-12 atomy uhlíku a jsou hojně zastoupeny v kokosovém a palmojádrovém oleji. Po požití jsou MCFA absorbovány epiteliálními buňkami gastrointestinálního traktu, přičemž některé z nich mohou být vstřebány epiteliálními buňkami na podporu integrity střevní sliznice a některé mohou vstoupit portální žilou do jater a zde se přímo metabolizovat. MCFA mohou v játrech regulovat metabolismus sacharidů a lipidů, podporovat tvorbu glykogenu a žlučových kyselin. Kromě toho mohou také regulovat uvolňování zánětlivých cytokinů, jako jsou IL-6 a IL-8 (interleukiny), čímž zabráňují vzniku

zánětu a snižují poškození způsobené zánětem. Proto může přídavek MCFA do určité míry zlepšit imunitní funkce skotu (Wang et al. 2023).

Že MCFA snižují produkci CH<sub>4</sub> bylo potvrzené jak v *in vitro* tak v *in vivo* studiích. Snižují populaci protozoí (*in vitro* i *in vivo* experimenty) a archeí (*in vitro* experimenty). Právě mikroorganismy, které mají funkci rozkladu vlákniny jsou na přidané tuky do krmné dávky citlivé. Citlivost mikroorganismů na účinky MCFA je určena strukturou buněčné stěny. Nálevníci a gram-pozitivní bakterie jsou ovlivněny silněji, než gram-negativní bakterie (Yanza et al. 2021).

Funkce mastných kyselin se mění podle dávky. Podle Luan et al. (2023) se metanogeneze snižuje při zařazení MCFA v množství nad 1 % sušiny krmiva. Čím vyšší množství mastných kyselin se přidává do krmné dávky, tím silnější bude inhibice mikroorganismů. Nadměrné množství však může výrazně snížit stravitelnost živin a užitkovost. Luan et al. (2023) zjistili, že čistá kyselina kaprinová v dávkách 220 g, 404 g a 543 g na den, lineárně snižuje stravitelnost živin u holštýnských krav. Síla účinku MCFA závisí na typu a koncentraci daného tuku, na složení krmiva a na typu zvířete. Čisté zdroje MCFA silněji snižují metanogenezi než dlouhé nasycené mastné kyseliny (Yanza et al. 2021). Silnější účinky by také měly mít, pokud by byl v krmné dávce větší poměr koncentrovaných než objemných krmiv (Luan et al. 2023).

MCFA lze najít v přírodních zdrojích, jako je např. kokosový olej, palmojádrový olej atd. Velmi účinné proti snižování metanogeneze mohou být kyselina laurová (C12:0) a kyselina myristová (C14:0). Tyto dvě kyseliny mohou mít také synergický efekt na snižování produkce CH<sub>4</sub> (Yanza et al. 2021). Podle Dohmeho et al. (2000) kokosový a palmojádrový olej, které jsou zdrojem kyseliny laurové a myristové, významně redukuje metanogeny a nálevníky pokud jsou v poměru 2,5:1 jak v *in vitro* tak v *in vivo* pokusech. Kombinace kyselin laurové a myristové, palmojádrový olej nebo kokosový olej, které se přidali do krmné dávky, snížili v *in vitro* experimentu produkci CH<sub>4</sub> o 32-42 % na jednotku stravitelné organické hmoty. Kokosový olej však snížil produkci CH<sub>4</sub> na jednotku strávené organické hmoty více než kyselina laurová (Yanza et al. 2021).

Dalším zajímavým způsobem redukce metanogeneze jsou SCFA jako je např. kyselina kaprinová (C10:0). V *in vitro* pokusu Goela et al. (2009) bylo zaznamenáno dramatické snížení produkce CH<sub>4</sub> o 33 % u 20 mg a 85 % u 30 mg doplňku kyseliny kaprinové (P<0,001). Přídavek kyseliny kaprinové v dávce 10 mg neměl na produkci CH<sub>4</sub> žádný vliv a při přídavku 30 mg kyseliny kaprinové byla pozorována akumulace H<sub>2</sub> (129 mmol/inkubace) (P<0,001). Dále se při inkubaci s 20 a 30 mg kyseliny kaprinové došlo ke změnám koncentrace SCFA, kde jejich čistá produkce poklesla o 23 % (3,1 až 2,4 mmol/inkubační baňku). Přídavek 30 mg kyseliny vedl k nárůstu o 39 % molární podíl propionátu (P<0,001), který byl doprovázený mírným poklesem acetátu a také byla zaznamenána úplná inhibice produkce isobutyrátu a isovalerátu (P<0,001). U přídavku 20 mg kyseliny kaprinové zase došlo ke zvýšení podílu butyrátu (26 %) a snížení acetátu (29 %) a propionátu (29,7 %).

Zbývající populace mikroorganismů, kterých se inhibice nedotkne, určuje rozsah produkce H<sub>2</sub> a proces jeho využití. Zvýšené množství H<sub>2</sub> v bachoru může mít vliv na změny v poměru těkavých mastných kyselin, kdy se v *in vivo* i *in vitro* studiích snížil poměr acetát:propionát. To je obvykle sledovaný jev, když na proces snižování produkce CH<sub>4</sub> působí činitelné, jako jsou právě mastné kyseliny (Yanza et al. 2021). Zařazení některých olejů jako např. sójový či lněný olej může také ovlivnit profil mastných kyselin v mléce (Gallardo &

Teixeira 2023). Z metaanalýzy Yanza et al. (2021) se ukázalo, že MCFA mají nepříznivého vlivu na mikroorganismy také na stravitelnost vlákniny (NDF). Zhoršená stravitelnost je pravděpodobně v důsledku změny populace mikroorganismů v bacheru, redukce fermentační aktivity nebo omezeným přístupem mikroorganismů a enzymů k částicím krmiva kvůli fyzickému povlaku, protože mastné kyseliny jsou v bacheru absorbovány buď mikroorganismy, nebo částicemi krmiva. Tím, že MCFA redukuje počet protozoí v bacheru, je tak nepříznivě ovlivněna stravitelnost NDF a to pak následně vede k větší inhibici metanogeneze.

### 3.3.2.2 Dusičnany

Účinky dusičnanů ( $\text{NO}_3^-$ ) na snížení metanogeneze jsou velmi dobře popsány a na účinnosti mezi studii panuje shoda. Metanogenezi ovlivňují na základě kompetice s metanogeny o  $\text{H}_2$ .  $\text{NO}_3^-$  se  $\text{H}_2$  redukuje a tato reakce je termodynamicky výhodnější, takže je upřednostněna před methanogenezí (Ungerfeld 2020; Sharifi et al. 2022).  $\text{NO}_3^-$  se redukuje na dusitany ( $\text{NO}_2^-$ ) a následně na amoniak ( $\text{NH}_4^+$ ). Redukce může v bacheru probíhat asimilační a disimilační cestou. Asimilační redukce energii využívá, zatímco disimilační redukce energie získává. Konečným produktem obou těchto procesů je  $\text{NH}_4^+$ , které lze využít jako zdroj dusíku ( $\text{N}_2$ ) pro syntézu mikrobiálních bílkovin (Moreno-Vivián et al. 1999; Fenn et al. 2021). V některých případech může nastat denitrifikace, což je disimilační redukce  $\text{NO}_3^-$ , jejímž meziproduktem je např. oxid dusný ( $\text{N}_2\text{O}$ ). Ten vzniká v plynné formě a zvíře ho uvolňuje z těla do ovzduší. Ačkoli je  $\text{N}_2\text{O}$  velmi silným skleníkovým plynem, denitrifikace není příliš významnou cestu metabolismu  $\text{NO}_3^-$  v bacheru a tak má uvolňování tohoto plynu malý význam (Brulc et al. 2009; Latham et al. 2016).

$\text{NO}_3^-$  ovlivňují fermentační procesy a mění společenstva mikroorganismů v bacheru. Veneman et al. (2015) uvádí, že použitím  $\text{NO}_3^-$  se zvýšil poměr acetátu a propionátu. Tím vzrostlo pH a změnila se mikrobiální populace v bacheru. (Sharifi et al. 2022). Vyšší produkce propionátu je pravděpodobně způsobena větším množstvím bakterií rodu *Prevotella*, které produkují propionát jako hlavní produkt fermentace (Veneman et al. 2015). Podle Sharifi et al. (2022) přidavek  $\text{NO}_3^-$  snižuje počet bacherových protozoí, archeí i bakterií s výjimkou *Fibrobacter* a *Proteobacteria*. Změny v mikrobiomu ale závisí na délce adaptace na příjem  $\text{NO}_3^-$  v krmivu. Účinky  $\text{NO}_3^-$  na bacherovou mikrobiální populaci jsou malé, ale konzistentní a není prokázáno, že by se reakce lišila v důsledku geografické polohy a rozdílných základních populací mikroorganismů v bacheru (Veneman et al. 2015).

Účinnost  $\text{NO}_3^-$  je proměnlivá a navíc mohou způsobit toxicitu (Van Wyngaard et al. 2019). Redukce  $\text{NO}_2^-$  na  $\text{CH}_4^+$  je pomalejší proces než redukce  $\text{NO}_3^-$  na  $\text{NO}_2^-$ , které se z bacheru snadno vstřebávají do krevního oběhu a při jejich akumulaci může vznikat methemoglobinémie (Van Zijderveld et al. 2010). Riziko toxicity může být ale významně sníženo postupnou adaptací zvířat, zařazením koncentrovaného krmiva a použitím enkapsulovaného  $\text{NO}_3^-$  (Van Wyngaard et al. 2019; Sharifi et al. 2022). Aby se toxickým účinkům předešlo, adaptační období by mělo trvat zhruba 2 týdny (Zhao et al. 2018). Koncentrované krmivo je vhodné zařadit proto, že se riziko toxicity  $\text{NO}_3^-$  zvyšuje při příjmu potravy s nízkým množstvím rychle zkvasitelné energie (Sharifi et al. 2022). Enkapsulované  $\text{NO}_3^-$  také napomáhají proti toxicitě

kvůli tomu, že se do bachoru uvolňují pomalu, což umožňuje pomalejší redukci a minimalizuje akumulaci toxických  $\text{NO}_2^-$  (Reynolds & Drewnoski 2022).

Přídavek  $\text{NO}_3^-$  by neměl způsobovat žádné nepříznivé účinky nebo jen minimální negativní účinky na živočišnou produkci. Sharifi et al. (2022) zjistili, že přidání 3,5 %  $\text{NO}_3^-$  ke krmné dávce s 60 % objemného krmiva nejenže snížilo emise metanu bez závažného vlivu na bachorovou mikrobiální populaci, ale nemělo ani významný negativní vliv na užitkovost dojnic. Wang et al. (2023) ale zaznamenali nižší množství bílkovin a laktózy v mléce po přidání  $\text{NO}_3^-$  do krmné dávky multiparních dojnic. Skot na pastvě může  $\text{NO}_3^-$  přijímat také z rostlin. Informací o jejich vlivu na produkci  $\text{CH}_4$ , užitkovost a zdraví zvířat je ale jen omezené množství, protože koncentrace  $\text{NO}_3^-$  v pastvinách kolísají. To ztěžuje zjištění přesného množství přijatého skotem (Van Wyngaard et al. 2019).

### 3.3.2.3 Sírany

Sírany ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) mají podobný účinek jako  $\text{NO}_3^-$ . Vážou na sebe  $\text{H}_2$  produkovaný mikroorganismy a tím se redukují. Za redukci jsou zodpovědné bakterie redukující  $\text{SO}_4^{2-}$ , který potřebují k získání energie, tedy ATP. Redukce  $\text{SO}_4^{2-}$  se také dělí na asimilační a disimilační. Při procesu asimilační redukce je  $\text{SO}_4^{2-}$  využíván ke vzniku cysteinu, který slouží jako stavební jednotka proteinů a enzymů (Drewnoski et al. 2014). U disimilační redukce jsou organické sloučeniny, především laktát, oxidovány a  $\text{SO}_4^{2-}$  je redukován na sirovodík ( $\text{H}_2\text{S}$ ). Při pH 6,5 je 87 %  $\text{H}_2\text{S}$  disociováno na sulfidové anionty ( $\text{HS}^-$ ), které zůstávají v bachorové tekutině a zbylá část se uvolňuje jako plyn, který je z bachoru odstraňován erukcemi (Ungerfeld 2020). Bylo ale zjištěné, že při vysokém příjmu S může být  $\text{H}_2\text{S}$  vylučován z bachoru opět vdechován plícemi, kde se vstřebává do krve a vyvolat tak poliencefalomalacii (Castro et al. 2022).  $\text{H}_2\text{S}$  jinak není považován za toxický, naopak jeho oxidace v bachoru může být prospěšná (Ungerfeld & Kohn 2006).  $\text{SO}_4^{2-}$  mohou pomoci také ke snížení toxicity  $\text{NO}_3^-$ . Pokud se přidají do krmné dávky dohromady, konečný produkt redukce  $\text{SO}_4^{2-}$ , tj.  $\text{H}_2\text{S}$  působí jako donor elektronů v procesu redukce  $\text{NO}_3^-$  na  $\text{NH}_4^+$ . Tím se zkrátí doba setrvání toxické sloučeniny v bachoru (Hubert & Voordouw 2007).

Bakterie redukující  $\text{SO}_4^{2-}$  poprvé izoloval Coleman (1960) z bachoru ovcí krmených senem a to konkrétně *Desulfotomaculum ruminis*. Později Huisingh et al. (1974) izolovali opět z bachoru ovcí krmených krmivem obsahující sírany bakterie rodu *Desulfovibrio*. Koncentrace těchto bakterií v bachoru je přibližně 105 až 106 buněk/ml (Huisingh et al. 1974). Zhao et al. (2020) v nedávné době zjistili pomocí sekvenování genu 16S rRNA, že bakterie redukující  $\text{SO}_4^{2-}$  tvoří hlavní tři rody *Desulfovibrio*, *Desulfobulbus* a *Desulfuromonas* a že zvyšující se doplněk  $\text{SO}_4^{2-}$  zvyšuje relativní množství *Desulfovibrio* a *Desulfobulbus*.

Skutečná redukce  $\text{SO}_4^{2-}$  v bachoru je omezená množstvím sloučenin obsahujících S (Zinder 1993). Doporučované množství S v krmné dávce představuje přibližně 0,15 % sušiny, což obvykle není dostačující množství na to, aby se mohla S dříve připojit k  $\text{H}_2$  a předstihnout tak metanogeny (National Academies of Science et al. 2016). Bylo však zjištěné, že koncentrace  $\text{SO}_4^{2-}$  od 10 do 22 mmol/l může účinně snížit rychlost metanogeneze v bachorové fermentaci *in vitro* (Siegert et al. 2011). Na druhou stranu by zvýšený příjem S mohl v bachoru zvýšit početnost bakterií redukující  $\text{SO}_4^{2-}$ , což by následně snížilo produkci  $\text{CH}_4$  díky redukci  $\text{SO}_4^{2-}$ . Wu et al. (2015) uvedli, že doplnění  $\text{SO}_4^{2-}$  zvýšilo relativní množství celkových bakterií a

bakterií redukující  $\text{SO}_4^{2-}$  *in vitro*, ale neovlivnilo celkové množství archeí a protozoí. Van Zijderveld et al. (2010) však zjistili, že zařazení  $\text{SO}_4^{2-}$  do krmiva ovcí mělo tendence snižovat relativní početnost metanogenů a zvyšovat početnost bachorových bakterií včetně bakterií redukujících  $\text{SO}_4^{2-}$ , zatímco na protozoa neměly vliv. Snížení počtu metanogenů mohlo být důsledkem negativního vlivu konečného produktu  $\text{H}_2\text{S}$  vznikajícího při redukci  $\text{SO}_4^{2-}$ .

Účinnost  $\text{SO}_4^{2-}$  ve snižování metanogeneze potvrzuje hned několik studií. Van Zijderveld et al. (2010) došli k závěru, že po zařazení  $\text{SO}_4^{2-}$  do krmné dávky v množství 2,6 % sušiny krmiva, klesla produkce  $\text{CH}_4$  o 16 %. Silivong et al. (2011) zase zjistili, že S získaný z  $\text{SO}_4^{2-}$  v množství 0,8 % sušiny v krmivu koz rovněž snížil produkci  $\text{CH}_4$  o 14,2 %. Bylo navíc zjištěno, že mají  $\text{SO}_4^{2-}$  synergický efekt s  $\text{NO}_3^-$ . Jejich antimetanogenní účinek se kumuloval a produkce  $\text{CH}_4$  se snížila o 47 % (Van Zijderveld et al. 2010). Ve studiích nebyly prokázány žádné negativní účinky, avšak je třeba dodat, že vysoký příjem S může u skotu zvyšovat vylučování S ve výkalech a moči a mít tím negativní vliv na životní prostředí (Hansen et al. 2016).

#### 3.3.2.4 3-Nitrooxypropanol

3-Nitrooxypropanol (3-NOP) je syntetická organická sloučenina, která byla poprvé syntetizována v roce 1990 a patentována v roce 2012 jako silný inhibitor metanogeneze (Ogawa et al. 1990; Duval & Kindermann 2018). Tato sloučenina inhibuje Methylkoenzym-M-reduktázu (MCR), což je enzym archeí, který působí v posledním kroku metanogeneze. Molekulární struktura 3-NOP je podobná struktuře methylovaného koenzymu M (methyl-CoM). Methyl-CoM je posledním meziproduktem, který završuje všechny cesty metanogeneze (Allen et al. 1999). Poslední reakci na cestě metanogeneze katalyzuje enzym MCR (Thauer 1998; Friedrich 2005). Vzhledem ke strukturní podobnosti 3-NOP s methyl-CoM se 3-NOP váže na MCR a tím tento enzym deaktivuje (Duin et al. 2016). McGinn et al. (2019) uvádí výrazné snížení produkce metanu o 70 % u masného skotu krmeného krmnou dávkou s vysokým podílem koncentráту pro výkrm v množství 125 mg 3-NOP/kg sušiny. Dojnému skotu by mohlo pro projevení účinku 3-NOP stačit nižší množství. Van Gastelen et al. (2022) zjistili, že 60 mg/kg sušiny stačí ke snížení produkce  $\text{CH}_4$  o 28,2 % u zvířat krmených travní siláží, 37 % směsí travní a kukuřičné siláže a 38 % kukuřičnou siláží. Arndt et al. (2021) v metaanalýze uvedli, že v jedenácti studiích se vlivem účinků 3-NOP snížily denní emise  $\text{CH}_4$  o 29-47 %.

Účinnost 3-NOP však klesá se zvyšujícím se množstvím NDF v krmivu. Na každých 10 g NDF/kg sušiny krmiva údajně účinnost 3-NOP klesá o  $1,64 \pm 0,33$  % (Dijkstra et al. 2018). Zatímco na každých 10 mg 3-NOP/kg sušiny krmiva se zvyšuje antimetanogenní účinek o  $2,56 \pm 0,55$  %. Při výpočtu dávky doplňku 3-NOP je proto třeba zohlednit složení krmiva (zejména NDF) (Honan et al. 2021). Zvyšující se množství 3-NOP možná negativně ovlivňuje příjem sušiny, ale výsledky různých studií se neshodují. Např. Alemu et al. (2021) uvádějí statisticky významné snížení příjmu sušiny u masného skotu při podávání 3-NOP. Naopak Kim et al. (2019) a Alemu et al. (2023) nezjistili žádný vliv 3-NOP na příjem sušiny.

Dříve se předpokládalo, že snížený příjem sušiny je způsoben tvorbou propionátu v bachoru, což ovlivňuje sytost krav (Zhang et al., 2021; van Gastelen et al., 2022). Studie Kjeldsen et al. (2024) však tento mechanismus nepodpořila, protože bylo zjištěno, že 3-NOP v bachoru snižuje celkovou koncentraci TMK, aniž by ovlivnil podíl propionátu. Kromě toho bylo dříve zjištěno, že množství propionátu 29 mol/100 mol celkových TMK (50 mmol/l)

neovlivňuje příjem sušiny (Hernández-Castellano et al. 2021). Snížený příjem sušiny však může způsobit akumulace  $H_2$ , která ovlivňuje termodynamiku bachorových procesů. Ve studii Kjeldsen et al. (2024) měl pokles příjmu sušiny nejspíš vliv na celkové množství TMK, které se snížilo, stejně jako fermentace organické hmoty v poměru s TMK. V důsledku toho, byl vlivem účinků 3-NOP snížen i acetát, tedy hlavní faktor ovlivňující pH, a tudíž došlo ke zvýšení hodnoty pH v bachoru. Co se týče mléčné produkce, Kjeldsen et al. (2024) uvedli, že 3-NOP mimo poklesu příjmu sušiny snížil také produkci mléka v kg/den, ale zvýšil o 3,7 % tuk mléka.

### 3.3.2.5 Ionofory

Ionofory jsou karboxylová polyetherová antibiotika přirozeně produkovaná vyskytující se kmenem *Streptomyces spp.* a perorálně podávána přežvýkavcům a jiným druhům hospodářských zvířat (Marques & Cooke 2021). Poprvé byly identifikovány v roce 1951, ale k jejich širokému používání došlo až do roku 1975. Původně byly vyvinuty za účelem zlepšení využití krmiva při výkrmu skotu. Dalším jeho využitím bylo prevence kokcidie pod názvem Rummensin. Fyziologická aktivita ionoforů spočívá v přesunu monovalentních kationtů, jako je Ca a Na, přes buněčnou stěnu výměnou za ionty K a  $H_2$ . Z tohoto důvodu se tato třída léčiv nazývá ionofory (Ensley 2020). Ionofory mohou také měnit metabolismus bachorového mikrobiomu tím, že vytvářejí účinnější zdroje energie pro přežvýkavce. Tyto změny mají přínosy, jako je snížení bachorové acidózy, snížené nadýmání, zvýšená využitelnost krmiva a změna mikrobiálního metabolismu exogenních sloučenin. Grampozitivní organismy v bachoru jsou potlačeny, což umožňuje převahu gramnegativních organismů (Nagaraje & Taylor 1987).

Při použití ionoforů v dávce uvedené na etiketě se obvykle neprojevují žádné nežádoucí účinky. K negativním dopadům na zdraví obvykle dochází při nesprávném smíchání krmiva a nesprávném dávkování. Při použití jednoho nebo více ionoforů ve stejné dietě může dojít k aditivnímu účinku ionoforů. Může se také stát, že se dohromady s ionoforem přidají i jiná léčiva, která zasahují do metabolismu ionoforu a zesílí tak toxikózu. To by mohlo ve zvířeti způsobit toxickou koncentraci, i když je v krmivu použita správná koncentrace ionoforu. Skot je ve srovnání s jinými druhy zvířat tolerantnější k toxické koncentraci ionoforu (Ensley 2020). Tuto sníženou citlivost k toxikóze může vysvětlovat několik faktorů, včetně rozkladu v bachoru, snížené absorpci, zvýšeného účinku při prvním průchodu játry atd. Smrtná dávka pro skot je LD50 (střední letální dávka) pro monensin 26,4 mg/kg krmiva a LD10 byla odhadnuta na 11,2 mg/kg krmiva (Potter et al. 1984).

Nejpoužívanější látkou této třídy v chovu zvířat je právě monensin, který byl poprvé izolován v roce 1967 ze *Streptomyces cinnamonensis*. Monensin je v Evropě schválen pouze pro použití u mléčného skotu jako kapsle s pomalým uvolňováním pro prevenci ketózy a v drůbežářském průmyslu se používá jako kokcidostatikum. V USA se tento ionofor široce používá při krmení přežvýkavců jako látka, která zlepšuje energetický metabolismus a zvyšuje využití spotřebovaného krmiva. Účinek monensinu na metanogenezi je nepřímý. Jeden z jeho mechanismů účinku poskytuje konkurenční výhodu bakteriím produkujícím propionát, které využívají  $H_2$  k syntéze kyseliny propionové, a jsou tak konkurenti metanogenním archeím (McGuffey et al. 2001). Dále pak monensin ovlivňuje protozoa, která jsou v bachoru hlavními producenty  $H_2$  (Melchior et al. 2018).



Výsledky studií s monensinem se v literatuře značně liší. Appuhamy et al. (2013) ve své metaanalýze zjistili, že dávka 32 mg/kg příjmu sušiny monensinu podávaná skotu ve výkrmu snížila produkci CH<sub>4</sub> v průměru o 19 g/den, zatímco výsledky u dojného skotu byly marginální (6 g/den). K tomu dodávají, že tento rozdíl mohl vyplývat ze skutečnosti, že příjem sušiny je u dojnic téměř třikrát vyšší než u masného skotu (18,6 vs. 7,2 kg/den), zatímco použité dávky monensinu byly naopak vyšší u masného skotu než u dojnic (32 vs. 21 mg/kg příjmu sušiny). K opačným výsledkům se ale dostali Melchior et al. (2018), kteří použili monensin v dávce 150 mg/ks/den a nezaznamenali žádný vliv na produkci CH<sub>4</sub>. Stejně tak Benchaar (2016) uvádí, že dávka monensinu 24 mg/kg DMI u dojnic neměla také žádný vliv na produkci CH<sub>4</sub>. Literatura se zabývá i o účinky monensinu na metanogenezi u ovcí. Zhang et al. (2021) zjistili, že dávka monensinu 40 mg/kg sušiny potlačila produkci CH<sub>4</sub> o 12,7 % u samic jehňat.

Lze také předpokládat, že díky lepšímu energetickému metabolismu a využití krmiva by mohla zvířata chovaná na maso rychleji dosáhnout cílové hmotnosti, čímž by se také snížily celkové emise CH<sub>4</sub> uvolňované během celého života zvířete (Duffield et al. 2012). Vzhledem k extrémně rozdílným údajům získaných ze studií provedených s monensinem je použití tohoto ionoforu ke snížení množství CH<sub>4</sub> spornou strategií. Navíc vzhledem k právním omezením v Evropské unii a některých zemích světa a rostoucímu tlaku na omezení používání antibiotik v odvětví živočišné výroby se strategie použití ionoforů ke snížení emisí CH<sub>4</sub> nejeví jako dlouhodobě udržitelné řešení tohoto problému (Ribeiro Pereira et al. 2015).

### 3.3.2.6 Makrořasy

Mořské makrořasy patří podle svého zbarvení do tří hlavních kmenů: *Chlorophyta* (zelené), *Phaeophyta* (hnědé) a *Rhodophyta* (červené). Odhaduje se, že existuje přibližně 6200 různých druhů červených makrořas a přibližně 1800 druhů hnědých a zelených makrořas (Pereira 2021). Výzkumy zaměřené na zmírňování emisí CH<sub>4</sub> se prováděly u všech tří kmenů, ale zatím nejslibnější a nejprozkoumanější jsou dva druhy červených mořských řas - *Asparagopsis taxiformis* a *Asparagopsis armata*. Ačkoli částečné zmírnění produkce CH<sub>4</sub> lze přičíst různým sloučeninám (florotaniny, saponiny, alkaloidy, flavonoidy atd.), nejdůležitější látkou těchto řas je halogenová sloučenina bromoform (CHBr<sub>3</sub>) (Machado et al. 2016; Min et al. 2021). CHBr<sub>3</sub> působí tak, že inhibuje metanogenezi v bacheru, konkrétně se zaměřuje na poslední krok procesu metanogeneze. Kompetitivně inhibuje substráty koenzym M transferázy a Methyl-CoM, čímž blokuje poslední krok metanogeneze (De Bhowmick & Hayes 2023). Účinek mořských řas se může měnit v důsledku techniky jejich zpracování. Zmrazení a lyofilizace jsou nejúčinnější pro zachování koncentrace CHBr<sub>3</sub> (Vucko et al. 2017).

Studie prokázaly, že krmení skotu mořskými řasami, zejména těmi červenými, může snížit emise metanu až o 99 % *in vitro* (Brooke et al. 2020). Pravděpodobně ale může *Asparagopsis spp.* negativně ovlivňovat příjem sušiny a to následně snížit užitkovost (Stefenoni et al. 2021). Také se vyskytují obavy z toxicity CHBr<sub>3</sub>. Glasson et al. (2022) proto hodnotili jeho toxické účinky u potkanů a dospěli k závěru, že množství CHBr<sub>3</sub> v *Asparagopsis spp.* je pro skot zanedbatelné a nezpůsobí mu žádné problémy. Bylo prokázáno, že se CHBr<sub>3</sub> nehromadí v mase ani v tuku a v mléce lze nalézt pouze jeho stopové množství (Muizelaar et al. 2021). V mléce se ale může vyskytovat větší množství jódu (I), což by mohlo přinést riziko pro zdraví člověka (Stefenoni et al. 2021). Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA)

doporučuje maximální množství jódu 2 mg I/kg krmiva pro dojnice a 10 mg I/kg krmiva pro masný skot, proto by měla být při sestavování krmných dávek s červenými řasami přijata přísná opatření, zejména pro mléčný skot, protože děti mohou být na zvýšené množství I obzvláště citlivé kvůli vyšší spotřebě mléka (FEEDAP 2013; Lean et al. 2021). Mořské řasy mají vysoký obsahu minerálních látek a stopových prvků, ale hromadí se v nich také těžké kovy. Ty mohou být obsaženy v přípustném rozmezí, avšak hodnoty se mohou vlivem různých zeměpisných lokalitách lišit (Selmi et al. 2021).

### 3.3.2.7 Silice

Silice jsou sekundárními metabolity rostlin. Jejich hlavní funkcí je ochrana rostlin před abiotickým stresem, infekcemi, poškozením a škůdci (Carrasco et al. 2020). Tyto metabolity v rostlinách často určují jejich vůni a barvu a proto se používají v kosmetice, parfumerii a léčivech (Honan et al. 2021). Hlavními účinnými látkami silic jsou obvykle terpenoidy a fenylpropanoidy, další látky jsou obsaženy v nižším poměru (alkoholy, kyseliny, aldehydy atd.) (Calsamiglia et al. 2007). Silice mají potenciál snižovat emise CH<sub>4</sub>, protože ovlivňují mikrobiální populace v batoru. Metanogenezi mohou ovlivňovat jak přímo, prostřednictvím toxického účinku na metanogenní archea, tak nepřímo, prostřednictvím toxických účinků na celulolytické bakterie a protozoa, čímž snižují množství H<sub>2</sub> dostupného pro metanogenezi (Cobellis et al. 2016). Účinky silic působí údajně víc na grampozitivní bakterie než na ostatní mikroorganismy (Chao et al. 2000).

Abdillah et al. (2024) se ve své studii zaměřili na účinky silic, které obsahuje muškátový ořech (*Myristica fragrans*). Parní destilací se z něho získává několik bioaktivních látek, včetně sabinenu (21 %), 4-terpineolu (14 %) a myristicinu (14 %), což jsou látky, které byly ve studii spojovány se snížením počtu protozoí a produkcí CH<sub>4</sub>. Složení účinných látek silic se však liší v závislosti na původu rostliny. Z výsledků zjistili, že silice z muškátového ořechu mají potenciál snížit produkci CH<sub>4</sub> v *in vitro* podmínkách již v dávkách 100 a 200 µl/ml vzorku. Podobných výsledků dospěli i Zhou et al. (2020) u výzkumu účinků silic oregana, obsahující např. eugenol. Ty vykazovaly tendence snižovat produkci CH<sub>4</sub> v dávkách od 13 µl/l a toto snižování bylo přímo úměrné zvýšeným dávkám aditiva. Ze studie, kterou prováděli Jiménez-Ocampo et al. (2022) se ukázalo, že přídavek 0,5 % silice z pomerančů do krmiva snížil u skotu emise CH<sub>4</sub> o 12 %, aniž by to ovlivnilo příjem sušiny. Abdillah et al. (2024) dále zaznamenali, že vlivem silic muškátového ořechu došlo ke změně koncentrací TMK, zejména kyseliny octové. Tyto změny lze přičíst k nižší produkci CH<sub>4</sub>, protože při vzniku kyseliny octové vzniká plynný H<sub>2</sub>, tedy substrát pro metanogenezi (Karlsson et al. 2019). Dávka 200 µl/ml navíc významně snížila hladinu NH<sub>3</sub>, pravděpodobně kvůli fenolickým sloučeninám, které redukuje bakterie produkující nadměrné množství NH<sub>3</sub>.

Targe & Krause (2011) ale zjistili, že zařazení silic do krmné dávky může negativně ovlivňovat batorovou fermentaci a že mnohem větší dávka 10 g/den není pro laktující dojnice přínosná. Použití silic ze skořice a citronu také snížilo stravitelnost bílkovin (Tager & Krause 2011; Zulfa et al. 2019). Stejně tomu bylo i v *in vitro* pokusu u silic z muškátového ořechu, kdy se po 48 hodinách snížila stravitelnost bílkovin při dávce 200 µl/l a teprve po 96 hodinách se významně zvýšila. Snížení degradace bílkovin v batoru se připisuje jednak selektivnímu antimikrobiálnímu účinku silic proti batorovým mikroorganismům, zejména proteolytickým

bakteriím. To tedy vede ke snížení aktivity bakteriálních enzymů proteáz (Hart et al. 2008). Dalším důvodem snížení stravitelnosti bílkovin je pravděpodobně ten, že bioaktivní sloučeniny silic obsahují funkční skupinu fenol s reaktivními vlastnostmi vůči makromolekulám, jako jsou bílkoviny, ke kterým se připojují prostřednictvím esterové vazby. Tyto vazby se obtížně hydrolyzují, čímž se snižuje aktivita enzymu proteázy (Xiao et al. 2011). Účinky různých silic a/nebo jejich směsí jsou velmi variabilní. Jsou závislé nejen na vlastnostech konkrétní silice, ale také na složení krmné dávky a typu zvířat, kterým je předkládána. Jejich použití nemusí být vhodné např. u masného skotu, kvůli možným negativním dopadům na jejich zdraví (Cobellis et al. 2016).

### 3.3.2.8 Třísloviny

Třísloviny jsou stejně jako silice sekundární metabolity rostlin, tudíž plní stejnou funkci, tedy ochranu před hmyzem, bakteriemi, býložravci apod. Jsou to polyfenolické sloučeniny vyskytující se v různých druzích rostlin a mají afinitu k vazbě na složky potravy, jako jsou bílkoviny či sacharidy (Waghorn 2008). Třísloviny se dělí na skupinu hydrolyzovaných a skupinu kondenzovaných tříslovin. Některé zdroje třísloviny rozdělují navíc ještě na skupinu tzv. florotaninů, které se vyskytují především v řasách (Huang et al. 2018). Třísloviny jsou toxické pro některé druhy bacherových mikroorganismů a tato schopnost může být tudíž využita pro snížení metanogeneze. Jejich účinky mohou být buď přímé, tím, že se navážou na buněčný obal metanogenů a inhibují je, nebo nepřímé, kdy jsou toxické pro některé bakterie a prvoky produkující  $H_2$ , tedy substrát pro tvorbu  $CH_4$  (Melchior et al. 2018). Jako nepřímý účinek by se dalo také brát jejich vazebná aktivita na proteiny a polysacharidy, čímž snižují dostupnost živin pro mikroorganismy (Bodas et al. 2012). Na druhou stranu se tak může snižovat dostupný zdroj energie pro zvíře a v důsledku snížené stravitelnosti krmiva by se do dalších částí trávicího traktu posuvalo více fermentovatelné organické hmoty, což by vedlo ke zvýšeným emisím  $CH_4$  z výkalů (Huhtanen et al. 2021).

Účinky tříslovin na metanogenezi jsou ale velmi proměnlivé, protože se jejich molekulová hmotnost, struktura, aktivita a koncentrace v rostlinách značně liší v závislosti na druhu, stáří a části zkrmovaných rostlin. Obecně platí, že tropické druhy rostlin obsahují vyšší množství tříslovin než rostliny mírného klimatu. Tropické druhy se však s největší pravděpodobností nemohou v mírném pásmu ve velké míře krmit, kvůli náročnosti pěstování v chladnějším podnebí (Lileikis et al. 2023). V metaanalýze Arndta et al. (2022) se autoři zmiňují o tom, že krmením směsí krmiva bohatého na třísloviny a krmiva obsahujícího dostatečné množství živin se snížila produkce  $CH_4$  o 12 %, aniž by to ovlivnilo mléčnou užitkovost nebo přírůstek hmotnosti, přestože stravitelnost sušiny byla snížena o 12 %. Yang et al. (2017) zase provedli studii, kde masnému skotu dávali 6,5 g, 13 g a 26 g tříslovin/kg sušiny a zjistili 11,1%, 14,7% a 33,6% snížení produkce  $CH_4$  (litru/kg spotřebované sušiny). Autoři také pozorovali pokles relativního počtu prvoků a metanogenů a sníženou stravitelnost organické hmoty při 26 g tříslovin/kg sušiny. Schopnost tříslovin modifikovat bacherový mikrobiom může mít za následek snížení degradace bílkovin. Arndt et al. (2022) také zjistili, že při doplňku 13 g a 26 g tříslovin do 1 kg sušiny snížilo koncentraci amoniakálního dusíku ( $N-NH_3$ ) v bacheru. Degradace bílkovin tak může být snížena v důsledku menší syntézy  $N-NH_3$  a většího toku neamoniakálního dusíku do dvanáctníku (Besharati et al. 2022).

V určité míře jsou třísloviny toxické. Hydrolyzované jsou oproti kondenzovaným tříslovinám toxickejší, kvůli tomu, že mají nižší molekulovou hmotnost a horší absorpci na proteiny. Kondenzované třísloviny mají silnější vliv na bachorový metabolismus a aktivitu mikroorganismů, ale mají nižší toxický potenciál než hydrolyzované třísloviny. Proto jsou právě kondenzované třísloviny atraktivnější jako možné inhibitory metanogeneze (Ku-Vera et al. 2020).

### 3.3.2.9 Saponiny

Saponiny jsou stejně jako předešlé dvě skupiny sekundární metabolity rostlin, pro které saponiny slouží jako chemická bariéra při ochraně svých tkání. Jsou to přírodní detergenty, chemicky definované jako vysokomolekulární glykosidy, v nichž jsou sacharidové jednotky spojeny s triterpenovou (avenacin) nebo steroidní (avenakosid) aglykonovou částí, přičemž v přírodě je větší zastoupení triterpenových typů než steroidních (Goel & Makkar 2012; Kholif 2023). Jejich název saponiny vychází z jejich schopnosti vytvářet stabilní pěnu ve vodných roztocích, jako např. mýdlo. Saponiny jsou rozšířeny v mnoha rostlinách, především v luštěninách (leguminózách) a jejich koncentrace je nejvyšší v kořenech a mladých listech (Kholif 2023).

Předpokládá se, že hlavní antimetanogenní účinek saponinů je nepřímý, tj. emulgací buněčných stěn protozoí saponiny narušují jejich propustnost, a tím způsobí buněčnou smrt (Goel & Makkar 2012). S poklesem populace protozoí se odpovídajícím způsobem snižuje i množství  $H_2$  potřebného pro metanogenezi. Jayanegara et al. (2014) provedli metaanalýzu zahrnující 23 studií, v nichž byly použity různé zdroje saponinů. Použitými rostlinami bohatých na saponiny byly juka (*Yucca schidigera*), mydlokor tupolistý (*Quillaja saponaria*) a čajovník čínský (*Camellia sinensis*). Autoři uvedli, že přídavek rostoucího množství zdroje bohatého na saponin snižoval emise metanu na jednotku inkubovaného substrátu i na jednotku celkového vyprodukovaného plynu. Podíl propionátu se zvyšoval se zvyšujícími se hladinami saponinů a počet prvoků se snižoval. Dále Kozłowska et al. (2020) při pokusech *in vitro* došli ke zjištění, že vlivem saponinů z různých částí odrůd vojtěšky seté (*Medicago sativa L.*) došlo k poklesu nejen populací protozoí, ale i populací metanogenů, takže nelze vyloučit možnost přímého toxického účinku saponinů na archea, i když dodávají, že menší populaci archeí lze přičíst také poklesu počtu protozoí v důsledku přerušení mezidruhového přenosu  $H_2$ . Navíc by mohly být účinky saponinů ovlivněny složením krmiva. Podle Hegartyho (1999) se projevil mírný vliv defaunace na produkci  $CH_4$ , pokud byla zvířata krmena objemnými krmivem a když přijímali krmivo bohaté na škrob, nebyl zaznamenán žádný vliv.

Rostliny bohaté na saponiny navíc mají potenciál zvýšit tok mikrobiálních bílkovin z bachoru a zvýšit využitelnost krmiva (Goel & Makkar 2012). Glykofrakce saponinů zachycují  $NH_3$  v bachoru, když jsou jeho koncentrace po krmení vysoké, a poté, když koncentrace  $NH_3$  opět klesají, jej postupně uvolňují pro mikrobiální syntézu bílkovin. Vzhledem k příznivému vlivu saponinů na metabolismus N lze doporučit jejich použití k překonání problémů spojených s neefektivní/špatnou retencí a využitím N (Kholif 2023). Jaký budou mít saponiny vliv na populace bachorové mikrobioty ale rozhoduje struktura a dávka saponinů, adaptace zvířat, složení krmné dávky a struktura mikrobiálního společenstva v bachoru. Většina saponinů je považována za zcela bezpečnou a prospěšnou, ale některé druhy mohou být pro zvířata

jedovaté, i když není zcela objasněn důvod, proč jsou některé saponiny prospěšné, zatímco jiné toxické.

### 3.3.2.10 Kyanogenní glykosidy

Kyanogenní glykosidy jsou další skupinou sekundárních metabolitů ochraňující rostliny před vlivy vnějšího prostředí ohrožující rostlinu (Bodas et al. 2009). Chemicky jsou definovány jako O- $\beta$ -glykosidy kyanohydrinů, které vznikají v důsledku glykosylace kyanohydrinů. Jsou to deriváty aminokyselin a v přírodě jsou jejich jedinými prekurzory l-valin, l-isoleucin, l-leucin, l-fenylalanin, l-tyrosin a cyklopentenylglykan (Møller et al. 2016). Kyanogenní glykosidy jsou přítomny ve více než 2650 rostlinných druzích, ale ve vyšších koncentracích je lze nalézt například v čiroku (*Sorghum spp.*), některých jetelích (*Trifolium spp.*), některých bylinách čeledi bařičkovité (*Triglochin spp.*) nebo manioku (*Manihot esculenta*) (Sun et al. 2019). V závislosti na druhu rostliny mohou být uloženy v listech, stoncích, semenech či kořenech. Kyanogenní glykosidy jsou uloženy ve vakuolách a samy o sobě jsou neaktivní. K jejich aktivaci je zapotřebí enzym  $\beta$ -glykosidáza, která je uložena v jiných buněčných kompartmentech, aby se zabránilo autotoxicitě (Gleadow & Møller 2014). Při kontaktu  $\beta$ -glykosidázy s kyanogenními glykosidy dojde ke štěpení na molekulu cukru a kyanohydrin, který je pak dále hydrolyzován na kyanovodík (HCN). Ten se v těle spojuje s krevním hemoglobinem a omezuje aktivitu dýchacích enzymů, což nakonec vyústí v buněčnou smrt (Khota et al. 2023a). Kvůli své schopnosti bránit normálnímu metabolismu O<sub>2</sub> může dojít u zvířat, které požíli určité množství této látky k závažným následkům, jako je histotoxická anoxie a smrt (Khota et al. 2023b).

HCN je považován za extrémně toxickou látku především pro přežvýkavce, protože hojnost mikroflóry v bachoru a příznivé pH umožňují rychlejší hydrolýzu než u monogastričních zvířat (Gensa 2019). Uvádí se, že smrtelná dávka HCN je pro přežvýkavce přibližně 2 mg/kg tělesné hmotnosti. Hlavním procesem detoxikace organismu u přežvýkavců je mikrobiální přeměna kyanidu (CN) na méně toxický thiokyanatan, přičemž tvorbu thiokyanatanu katalyzují enzymy jako je rhodan (Khota et al. 2023b). Koncentrace kyanogenních glykosidů se může extrémně lišit v závislosti na odrůdách rostlin, způsobech pěstování (mráz, sucho a aplikace herbicidů), fázích růstu a způsobech krmení zvířat (pastva, řezání a přenašení, seno a silážování). Např. je prokázáno, že silážování významně snižuje celkovou koncentraci kyanidů (Khota et al. 2023a).

Schopnost toxicity těchto látek lze využít při snižování CH<sub>4</sub>, protože HCN inhibuje také metanogeny (Valencia-Salazar et al. 2021). Inhibice archeí se vysvětluje schopností kyanidových iontů se pevně vázat na proteiny a enzymy obsahující kovy, které se hojně vyskytují u archeí. Výzkum účinků kyanidů na metanogenezi se skládá převážně z *in vitro* studií. Příkladem jsou studie s maniokem, ve kterém se kyanogenní glykosidy hojně vyskytují. Zavaleta et al. (2019) zjistili lineární snížení CH<sub>4</sub> při přidání čistého limarinu (kyanogenního glykosidu přítomného v anioku). V dávkách 6, 13, 20 a 26 mg/l poklesla produkce o 9,7; 9,2; 18,1 a 29,4 %. Vongsamphanh et al. (2018) rovněž zjistili snížení CH<sub>4</sub> při inkubaci listů manioku a přičítají to koncentracím sekundárních metabolitů, jako jsou kyanogenní glykosidy, inhibitory trypsinu, oxaláty, fytáty a trisloviny. Ke snížení CH<sub>4</sub> došlo i v *in vitro* pokusu u koz krmených hořkými a sladkými odrůdami manioku. Poměr CH<sub>4</sub> k CO<sub>2</sub> se snížil o 16 %, zvýšil

se příjem sušiny o 25 % a retence N o 23%, když byly kozy krmeny kombinací obou odrůd ve srovnání se samotnou sladkou odrůdou. Zároveň nebyly pozorovány žádné známky toxicity kyanidů, ačkoli hladina thiokyanatanu v moči se ve skupině se smíšenými odrůdami zvýšila o 100 % ve srovnání se skupinou krmenou sladkou odrůdou (Phuong et al. 2019). Je však nutné si uvědomit negativní účinky kyanogenních glykosidů, neboť i relativně malé množství těchto látek může být pro organismus toxické. Pro zavedení této strategie ve větších produkčních systémech by měly být proto důkladněji prozkoumány dlouhodobé účinky na zdravotní parametry přežvýkavců.

### 3.3.2.11 Probiotika

Probiotika jsou skupina vybraných prospěšných mikroorganismů a jejich kultur, které mají potenciál snižovat produkci CH<sub>4</sub>, ačkoli se do krmiv začala doplňovat ze zcela jiných důvodů (Chao et al. 2000). U telat se probiotika obvykle zaměřují na tlusté střevo a představují zajímavý prostředek ke stabilizaci střevní mikroflóry a snížení rizika kolonizace patogeny. Probiotika pro dospělé přežvýkavce se do krmiv přidávají za účelem zlepšení trávení vlákniny bachorovými mikroorganismy. Tato probiotika mají pozitivní vliv na různé trávicí procesy, zejména na trávení celulózy a syntézu mikrobiálních proteinů (Uyeno et al. 2015). Zlepšuje se tak bachorová fermentace, stravitelnost krmiva a reguluje se růst patogenů (Mahesh et al. 2021). Probiotika mohou snižovat produkci CH<sub>4</sub> tím, že buď specificky inhibují metanogeny, a nebo mění metabolické dráhy vedoucí ke snížení množství substrátu pro metanogenezi (Tseten et al. 2022). Existuje mnoho druhů probiotik a různé kmeny mají odlišné inhibiční účinky (Sun et al. 2021).

Kvasinky, jako *Saccharomyces cerevisiae*, mohou zlepšit celkový zdravotní stav zvířat, spotřebu krmiva a stravitelnost vlákniny, což následně vede ke zvýšení mléčné užitkovosti nebo přírůstkům tělesné hmotnosti. Přestože mají kvasinky tyto přínosy, pravděpodobně nejsou vhodnou strategií, pokud jde o emise CH<sub>4</sub>. Oh et al. (2019) krmili krávy v laktaci probiotiky na bázi *Saccharomyces cerevisiae* a nezaznamenali žádný významný vliv na produkci, intenzitu nebo užitkovost CH<sub>4</sub>. Mléčná užitkovost se však v ošetřované skupině zvýšila o 2 kg/den, aniž by to mělo vliv na příjem sušiny nebo stravitelnost krmiva. Stejně tak Darabighane et al. (2019), kteří provedli analýzu 46 studií publikovaných od roku 1990 do roku 2016 nezaznamenali žádný významný vliv na produkci CH<sub>4</sub>. I přes to by ale mohla zlepšená živočišná produkce vést k nižší intenzitě produkce CH<sub>4</sub> a následně ke snížené celkové uhlíkové stopy zvířat v určitých produkčních systémech. Např. rychleji rostoucí masná plemena by mohla rychleji dosáhnout cílové hmotnosti.

Na produkci CH<sub>4</sub> však mohou mít vliv bakterie produkující kyselinu mléčnou (např. *Lactobacillus*, *Enterococcus spp.*). Jejich účinek může být vysvětlen několika způsoby. Bakterie či jejich metabolity mění bachorovou fermentaci a tím snižují metanogenezi, nebo přímo inhibují bachorové metanogeny a mikroorganismy produkující H<sub>2</sub> (Doyle et al. 2019). Jeyanathan et al. (2016a) ve své studii s ovci do krmné dávky přidali *Lactobacillus pentosus* D31, *Lactobacillus bulgaricus* nebo *Propionibacterium freudenreichii* 53-W. Nezaznamenali žádný vliv na snížení emisí CH<sub>4</sub> u *Lactobacillus bulgaricus*, zatímco *Lactobacillus pentosus* D31 údajně snížil produkci CH<sub>4</sub> o 13 %. Naopak *Propionibacterium freudenreichii* 53-W zvýšil produkci CH<sub>4</sub> o 16 %. Jeyanathan et al. (2019b) byli ve svém pozdějším pokusu s dojným

skotem utvrzení, že *Propionibacterium fraudenreichii* zvyšuje produkci CH<sub>4</sub>, protože intenzita metanogeneze zvýšila o 27 %.

Bakterie využívající kyselinu mléčnou (např. *Propionibacterium spp.*, *Megasphaera spp.*) mohou v bacheru zvýšit produkci propionátu a tím zvýšit množství dostupné energie a snížit riziko acidózy snížením koncentrace kyseliny mléčné v bacheru. Propionát je navíc také alternativním akceptorem elektronů, který odvádí tok H<sub>2</sub> z procesu metanogeneze (Ungerfeld 2013). V pokusu, který provedli Jeyanathan et al. (2019b), však nebyly zjištěny žádné změny v profilu TMK a naopak vzrostla produkce CH<sub>4</sub>. To mohlo být způsobeno buď přímým účinkem kmene zavedeného do krmiva na metanogeny nebo nepřímým účinkem prostřednictvím metabolitů ovlivňujících bacherový ekosystém (Doyle et al. 2019).

Acetogenní bakterie, které se přirozeně vyskytují v bacherových kulturách, využívají H<sub>2</sub> k tvorbě acetátu v procesu zvaném reduktivní acetogeneze, který teoreticky může konkurovat metanogenezi. Redukce CO<sub>2</sub> na CH<sub>4</sub> je však termodynamicky výhodnější reakcí než redukce CO<sub>2</sub> na acetát (Lan & Yang 2019). Navíc metanogenní archea mají vyšší afinitu k H<sub>2</sub> a jsou tedy úspěšnými konkurenty acetogenních bakterií. Proto se prozatím zdá redukční acetogeneze jako nepravděpodobná metoda snižování emisí CH<sub>4</sub>.

Probiotika pravděpodobně mají potenciál snižovat produkci CH<sub>4</sub>, pokud se použijí ve spojení s jinými strategiemi (Latham et al. 2019). Jejich výhodou však je, že pokud se použijí společně s dalším aditivem redukující metanogenezi, posílí účinek společně přidávané doplňkové látky a navíc příznivě ovlivní zdraví a produkci. Některá probiotika, jako jsou bakterie redukující sírany nebo bakterie využívající kyselinu mléčnou mohou také minimalizovat negativní účinky spojené s určitými strategiemi snižující metanogenezi (Lileikis et al. 2023). Pomoci mohou také prebiotika, tady látky stimulující růst prospěšných mikroorganismů. K redukci metanogeneze přispívají tím, že mění strukturu bakteriálního společenstva (Tseten et al. 2022).

## 4 Metodika

S krávami, které sloužili jako zdroj bachorové tekutiny, bylo zacházeno v souladu s národní a Evropskou legislativou (Směrnice 2010/63/EU o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely; Evropská unie 2010). Veškeré postupy byly schváleny Etickou komisí Výzkumného ústavu živočišné výroby (Praha, Česká republika).

### 4.1 Design experimentu

Cílem experimentu bylo zjistit, zda má kombinace dusičnanů a směs kyseliny kaprinové a laurové aditivní či synergické účinky snižování produkce CH<sub>4</sub>. Byla použita *in vitro* metoda, vsádková inkubace, s bachorovou tekutinou jako zdrojem mikroorganismů. Ošetření byla testována v 2×2 faktoriálním designu, s následujícími ošetřeními: (CON; bez aditiv), dusičnany (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>; 1,825 mmol/l), kyseliny kaprinové/laurové (C10/12; 250 mg/l; 125 mg/l kyseliny kaprinové + 125 mg/l kyseliny laurové) a kombinaci dusičnanů a kyseliny kaprinové/laurové (NO<sub>3</sub><sup>-</sup> + C10/12; 1,825 mmol/l + 250 mg/l). Všechny použité sloučeniny byly komerční produkty s čistotou ≥98 % (Merck, Praha, Česká Republika) a použitým zdrojem dusičnanů byl dusičnan sodný. Provedlo se 5 sérií inkubace, které trvaly celkem 120 hodin.

#### 4.1.1 Zvířata a pokusný substrát

Bachorová tekutina byla získána od dvou kanylovaných krav plemene Holštýn, které byly ve střední fázi laktace (tělesná hmotnost 645 ± 9 kg; denní produkce 33 ± 8 kg). Bachorová tekutina se odebírala z různých míst bachoru po ranním krmení. Krmná směs, kterou byly krávy krmeny, sestávala z kukuřičné siláže, vojtěškové siláže, luštěnino-obilné siláže, silážovaných kukuřičných palic s listeny (LKS), pívovarského zrna, pšeničné slámy a tekuté směsi melasy a glycerolu (v poměru 50:50). Toto krmivo se krmilo dvakrát denně *ad libitum*. Po odběru bachorové tekutiny se vzorky uzavřely do termolahve a ihned se převezly do laboratoře. Doba mezi odběrem a zpracováním v laboratoři byla 20–30 minut. V laboratoři se vzorky následně zcedily přes síto z nerezové oceli za průběžného proplachu CO<sub>2</sub> a vzorky od dvou krav se smíchaly dohromady. Jako substrát (tzn., krmivo v inkubačních lahvích) do pokusu se použila směs z kukuřičné siláže (300 g/kg), vojtěškové siláže (300 g/kg) a ječmene (400 g/kg). Směs se v suchém stavu našrotovala tak, aby prošla přes síto s otvory o průměru 1 mm. Substrát obsahoval v sušině: organickou hmotu 951 g/kg, hrubý protein 154 g/kg, hrubý tuk 25 g/kg, škrob 206 g/kg, neutrálně detergentní vlákninu (NDF) 354 g/kg a acidodetergentní vlákninu (ADF) 193 g/kg.

#### 4.1.2 Inkubace

Připravený substrát byl navážen po 100 mg do sterilních lahví o objemu 60 ml, které byly propláchnuty CO<sub>2</sub>. Poté se ruční pipetou Acura nadávkovalo do každé láhve 10 ml kultivační tekutiny. Ta se připravila smícháním vzorku bachorové tekutiny s médiem v poměru 1:9 podle Menkeho et al. (1979) s tou změnou, že médium obsahovalo 30 % čisté bachorové tekutiny (autoklávováno při 121°C, 15 minut, odstředěno při 27000 × g, 20 minut). Kultivační tekutina se následně proplachovala CO<sub>2</sub> a udržovala se za stálého míchání při teplotě 39°C po dobu 10



minut pro dosažení úplné homogenizace. Dusičnany a kyseliny kaprinová/laurová se do lahví dodaly přidáním roztoku 100  $\mu$ l sterilizované destilované vody s dusičnanem a následně 100  $\mu$ l zásobního roztoku etanolu se směsí kyseliny kaprinové/laurové. Tím se dosáhlo požadované koncentrace 10 ml kultivační tekutiny. V kontrolních a slepých lahvích bylo stejné množství destilované vody i etanolu, aby se případně kompenzoval vliv rozpouštědel na fermentaci. Při všech inkubacích byl počáteční plynou fází v horním prostoru láhve pouze CO<sub>2</sub>. Všechny lahve se uzavřely a umístily do vodní lázně s řízenou teplotou 39°C a frekvencí třepání 90 otáček/minutu. Po počáteční 24 hodinové inkubaci se z každé kultury přenesl 1 ml do nové série s čerstvým médiem (9 ml), substrátem (100 ml) a s příslušnými testovanými sloučeninami nebo bez nich (kontrola) a následně byly opět inkubovány dalších 24 hodin. Jak bylo již zmíněno, provedlo se celkem 5 sériových kultur s inkubací trvajících celkem 120 hodin.

#### 4.1.3 Odběr vzorků a chemické analýzy

Celkový objem vzniklého plynu se odhadl z tlaku plynu v horním prostoru lahve pomocí rovnice Boylova zákona. Tlak plynu se měřil menometrem vždy po 24 hodinách inkubace. Poté se odebral vzorek plynu prostřednictvím jehly o průměru 23 napíchnuté přes zátku a přenesl se do 5 ml zkumavky předem naplněné destilovanou vodou. Koncentrace CH<sub>4</sub> v horním prostoru láhve byla měřena pomocí plynové chromatografie (Joch et al. 2019). Do kolony chromatografu bylo injekčně vpraveno 100  $\mu$ l vzorku plynu. Teplota injektoru činila 43°C, kolony 32°C a plamenového ionizačního detektoru 180°C. Jako nosný plyn byl použit vysoce čistý H<sub>2</sub>. Koncentrace těkavých mastných kyselin se analyzovala porovnáním se známými standardy pomocí plynového chromatografu vybaveného plamenovým ionizačním detektorem a kapilární kolonou Stabilwax (15 m  $\times$  0,53 mm ID  $\times$  0,5  $\mu$ m; Restek, USA), kde byl nosným plynem H<sub>2</sub> (Joch et al. 2022).

## 4.2 Statistická analýza

Údaje z *in vitro* vsádkového kultivačního pokusu se analyzovaly kompletně randomizovaným designem s 2 $\times$ 2 faktorovým uspořádáním ošetření, pomocí GLM programu SAS podle modelu:  $Y_{ijk} = \mu + N_i + C_j + (NC)_{ij} + e_{ijk}$ , kde  $Y_{ijk}$  je závislá proměnná,  $\mu$  celkový průměr,  $N_i$  vliv dusičnanů,  $C_j$  vliv směsi kyseliny kaprinové a kyseliny mléčné,  $(NC)_{ij}$  vliv interakce mezi dusičnany a směsí kyseliny kaprinové a kyseliny mléčné a  $E_{ijk}$  zbytková chyba. Před statistickou analýzou byly údaje z pěti dnů inkubace zprůměrovány pro každou láhev a tam, kde byla pozorovaná významná interakce se dokončila analýza jednoduchých účinků pomocí SLICE programu SAS, aby se porovnal účinky dusičnanů a kyselin kaprinové a laurové. Průměry ošetření se porovnal pomocí Tukeyho testu mnohonásobného porovnání. Rozdíly byly považovány za statisticky významné při  $P < 0,05$ .

## 5 Výsledky

Výsledky *in vitro* pokusu jsou uvedeny v tabulce 1 a 2. Při hodnocení se pozornost věnovala tomu, jaké hlavní účinky měli dusičnany ( $\text{NO}_3^-$ ), směs kyseliny kaprinové a laurové (C10/12) a jejich kombinace ( $\text{NO}_3^-$ +C10/12) na základní parametry bachorové fermentace. Proto jsou uvedeny pouze 3 hlavní parametry a jejich příslušné podíly (tabulka 1). Jedná se o celkovou produkci plynů (CPP), metanu ( $\text{CH}_4$ ) a těkavých mastných kyselin (TMK). CPP byla snížena všemi ošetřeními ( $P < 0,05$ ), efekt interakce však nebyl významný ( $P = 0,317$ ). Produkce TMK byla snížena ( $P < 0,05$ ) C10/12 a kombinací  $\text{NO}_3^- + \text{C10/12}$ . Efekt interakce však nebyl významný ( $P = 0,266$ ) (tabulka 2). Čistá produkce TMK se u C10/12 snížila ( $P < 0,001$ ) o 11,1 mmol/l a snížil ( $P < 0,001$ ) se taktéž poměr acetát:propionát.

Jak je vidět v tabulce 1, všechny sloučeniny a jejich kombinace použité v pokusu snížily ( $P < 0,05$ ) produkci  $\text{CH}_4$ . Největší snížení ( $P < 0,001$ ) bylo pozorováno u  $\text{NO}_3^-$ +C10/12, kde se snížil  $\text{CH}_4$  vyjádřený v ml/g DMi v porovnání s kontrolou o 56,1 % a u  $\text{NO}_3^-$ , které snížili ( $P < 0,001$ ) zastoupení  $\text{CH}_4$  v CPP o 1,41 procentního bodu.  $\text{CH}_4$  vyjádřený v mol/mol čisté produkce TMK byl v porovnání s kontrolou nejvíce snížen ( $P < 0,001$ ) u C10/12 a to o 41,3 %. Taktéž byl tento parametr snížen u  $\text{NO}_3^-$ +C10/12, ale efekt interakce významný nebyl. Nicméně byla u těchto parametrů zaznamenána silná interakce mezi  $\text{NO}_3^-$  a C10/12, tedy u  $\text{CH}_4$  vyjádřeného v ml/g DMi ( $P < 0,001$ ),  $\text{CH}_4$  z CPP ( $P < 0,001$ ) a  $\text{CH}_4$  vyjádřeného v mol/mol čisté produkce TMK ( $P = 0,0012$ ). Analýzou jednoduchého třídění, kdy byly  $\text{NO}_3^-$  porovnány s C10/12 se došlo ke zjištění, že  $\text{NO}_3^-$  snížily produkci  $\text{CH}_4$  vyjádřeného v ml/g DMi při absenci C10/12 ( $P < 0,001$ ), zatímco v kombinaci s C10/12 takové účinky nebyly ( $P = 0,154$ ). Relativní produkce  $\text{CH}_4$  z CPP se snížila jak u samostatně použitých  $\text{NO}_3^-$  ( $P < 0,001$ ), tak v kombinaci s C10/12 ( $P = 0,007$ ). Produkce  $\text{CH}_4$  z čisté produkce TMK se snížila u  $\text{NO}_3^-$  ( $P < 0,001$ ) ale účinek vymizel u kombinace s C10/12 ( $P = 0,169$ ). Naopak schopnost snižovat  $\text{CH}_4$  zůstala u C10/12 významná bez ohledu na úroveň  $\text{NO}_3^-$ . Souhrnně lze tedy říci, že má C10/12 silnější antimetanogenní potenciál než  $\text{NO}_3^-$ . Navíc  $\text{NO}_3^-$ +C10/12 nevykazovala žádný přínos v redukcí  $\text{CH}_4$  ve srovnání s použitím C10/12 samostatně.

Tabulka 1

Ošetření Koncentrace (mg/l)	CPP <sup>†</sup> (ml/g DMi <sup>§</sup> )	Metan (ml/g DMi)	Metan (%CPP)	Metan (mol/mol nTMK <sup>¶</sup> )	NH <sub>3</sub> -N (mg/100 ml)
Kontrola	210,1	13,49	6,42	0,063	25,45
$\text{NO}_3^-$	203,8	10,21	5,01	0,048	28,69
C10/12	202,0	6,78	3,35	0,037	20,85
$\text{NO}_3^-$ +C10/12	192,9	5,92	3,06	0,031	23,97
SEM	1,94	0,907	0,410	0,004	0,884
P-hodnota					
CO10/12	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
$\text{NO}_3^-$	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
$\text{NO}_3^- \times \text{C10/12}$	0,317	<0,001	<0,001	0,001	0,924

CPP<sup>†</sup>, Celková produkce plynů; DMi<sup>§</sup>, inkubovaná sušina substrátu; nTMK<sup>¶</sup>, čistá produkce těkavých mastných kyselin

Tabulka 2

Ošetření (mg/l)		Molární poměr TMK (mol/100mol)							A:P <sup>‡</sup>
Koncentrace (mg/l)	nTMK <sup>†</sup> (mmol/l)	Acetát	Propionát	Butyrát	<i>iso</i> -butyrát	Valerát	<i>iso</i> -velarát		
Kontrola	83,43	58,71	19,18	12,53	2,73	3,75	1,78		3,06
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	82,59	58,06	19,00	13,41	2,74	4,01	1,70		3,06
C10/12	72,38	54,38	13,71	19,49	3,76	4,79	1,49		3,97
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ×C10/12	74,51	56,04	12,68	18,34	3,68	4,79	1,43		4,44
SEM	1,555	0,529	0,898	0,915	0,155	0,141	0,044		0,181
P-hodnota									
C10/12	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001		<0,001
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0,620	0,117	0,005	0,567	0,742	0,011	0,012		0,003
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ×C10/12	0,266	0,004	0,027	0,002	0,643	0,013	0,510		0,003

nTMK<sup>†</sup>, čistá produkce těkavých mastných kyselin; A:P<sup>‡</sup>, poměr acetátu a propionátu

## 6 Diskuze

Metan ( $\text{CH}_4$ ) vznikající při bachorové fermentaci je druhým největším zdrojem antropogenních skleníkových plynů, a proto řada studií zkoumá možnosti snížení jeho produkce pomocí různých strategií krmení či přidáním doplňkových látek (Veneman et al. 2015). Studie této diplomové práce se zabývá účinky dusičnanů ( $\text{NO}_3^-$ ) a směsí kyselin kaprinové a laurové (C10/12) na produkci metanu ( $\text{CH}_4$ ) a bachorovou fermentaci *in vitro* podmínkách. Předpokládalo se, že tato krmná aditiva sníží produkci  $\text{CH}_4$  a že jejich kombinace bude mít aditivní nebo synergické účinky, což by vedlo k ještě nižší metanogenezi. Ve výsledku pokusu se zjistilo, že  $\text{NO}_3^-$  i C10/12 snižují metanogenezi, aniž by negativně ovlivnili bachorovou fermentaci, avšak synergický efekt se při jejich kombinaci nepotvrdil.

### 6.1 Mastné kyseliny

Při hodnocení efektu fermentace v *in vitro* experimentech je důležitým indikátorem produkce plynů. C10/12 v množství 250 mg/l snížila celkovou produkci plynů v porovnání s kontrolou z 210,1 ml/g inkubované sušiny substrátu na 202,0 ml/g. Již předchozí studie se shodují s tím, že C10 a C12 mohou významně snížit produkci plynů *in vitro*. Ve studii Klopa et al. (2017) se asymptomatická produkce plynu (ml/g inkubované organické hmoty) při přidavku C12 snížila a po celou dobu trvání studie byla perzistentní. Poukazují ale na myšlenku, že parametry produkce plynů daleko více záleží na krmivu, kterým jsou krmeny donorové krávy, kterým byla bachorová tekutina odebrána, než na samotném substrátu, protože v jejich *in vitro* studii byly tyto parametry velmi variabilní. Jejich studie se však lišila od pokusu této diplomové práce tím, že C12 přidali rovnou do krmné dávky dojnic. Další podobné účinky C10 a C12 jsou popsány ve studii Luana et al. (2023), kde byla produkce plynů *in vitro* v prostřední a konečné fázi výrazně nižší při zařazení C10 do vysoce koncentrované krmné dávky a C12 do vysoce i nízce koncentrované krmné dávky.

Z celkové produkce plynů se koncentrace  $\text{CH}_4$  po přidání C10/12 zmenšila o 3,07 procentního bodu, což naznačuje, že tyto mastné kyseliny dokáží snížit metanogenezi. Účinky C10 a C12 použitých samostatně zde sice nebyl zjišťován, ale existuje mnoho studií, které potvrzují jejich schopnost snižovat metanogenezi. Např. v metaanalýze Yanzi et al. (2021) dospěli k závěru, že zdroje nasycených MCFA jsou schopné inhibovat aktivitu mikroorganismů v bachoru, včetně protozoí, bakterií a metanogenů, kteří jsou zodpovědní za metanogenezi. Dospěli k tomu vzhledem ke sníženému počtu protozoí v *in vitro* a *in vivo* pokusech. Funkci MCFA popisují tak, že při jejich zařazení jsou absorbovány částicemi krmiva nebo mikroorganismy. Vzhledem k tomu, že se malé molekuly MCFA snadno rozpouštějí v lipidové vrstvě buněčné membrány, mohou tuto část buňky účinně narušit a zasahovat do energetického metabolismu a transportu živin, což vede ke smrti určitých mikrobiálních buněk jako jsou celulolytické bakterie a nálevníky. Klop et al. (2017) ve svém výzkumu přidali kravám do krmné dávky C12 a následně jim odebrali bachorovou tekutinu pro inkubaci. Zjistili, že se od 4 dne dále snížila produkce plynů i  $\text{CH}_4$  a současně se snížil příjem sušiny a FPCM (mléko korigované na obsah tuku a bílkovin) u donorových krav. Dále se shodují s účinky MCFA v této práci studie Goela et al. (2009), kde při *in vitro* inkubaci zjistili, že C10 v dávce 20 mg/0,5 g

bachorové tekutiny snižuje produkci  $\text{CH}_4$  a ještě vyšší pokles metanogeneze byl zjištěn u C10 v dávce 30 mg. Nižší dávka, tj. 10 mg/0,5 g ale již neměla na metanogenezi vliv. Se zvyšující se dávkou MCFA se více snižuje produkce  $\text{CH}_4$  a zároveň se snižuje stravitelnost sušiny, organické hmoty a celulózy (Luan et al. 2023). Faciola & Broderick (2013) zjistili že doplněk C12 v množství 220 g/den, 404 g/den a 543 g/den lineárně snižovalo stravitelnost živin.

Snížené koncentrace  $\text{CH}_4$  v závislosti na koncentraci TMK se zde u C10/12 snížila o 0,026 mol/mol TMK. Shoduje se s tím studie Goela et al. (2009), kde bylo pozorováno dramatické snížení produkce  $\text{CH}_4$  o 33 % a 85 % v poměru k celkové produkci SCFA u 20 mg a 30 mg C12. Již zmiňovaná dávka 10 mg neměla žádný vliv jak na metanogenezi při výpočtu absolutního množství vyprodukovaného  $\text{CH}_4$ , tak ani při produkci  $\text{CH}_4$  vyjádřeného k relativnímu množství SCFA.

Při C10/12 poklesla také koncentrace amonného dusíku ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ) o 24,6 mg/100 ml inkubovaného substrátu. Optimální hodnoty  $\text{NH}_3\text{-N}$  v bachoru jsou v rozmezí 10-50 mg/100 ml a tudíž se hodnoty v tomto pokusu pohybují v optimálním rozmezí. Některé studie tvrdí, že N může být spotřebovaný protozoi z 50 % a zbývající N se uvolní ve formě krátkých peptidů a aminokyselin díky působení proteáz a peptidáz, což zapříčiní zvyšující se produkci amoniaku ( $\text{NH}_3$ ) skrze deaminaci bachorovými mikroorganismy. Tudíž, snižujícím se počtem bachorových protozoí se bude snižovat také produkce  $\text{NH}_3$  v bachoru a tím pádem i snižovat obsah  $\text{NH}_3\text{-N}$  (Itabashi et al. 1984). Navíc ve studii Luana et al. (2023) se shodují se snížením koncentrací  $\text{NH}_3\text{-N}$  po zařazení MCFA s tím rozdílem, že se jim tyto výsledky potvrdili u aditiv, která byla smíchána s bachorovou tekutinou, ve které byl vyšší podíl koncentrovaného krmiva. Domnívají se, že nestrukturální sacharidy zvyšují proliferaci bachorových mikroorganismů, takže zlepšují míru využití  $\text{NH}_3\text{-N}$  a tím sniží jeho koncentrace.

TMK jsou koncovým produktem bachorového trávení živin a metabolismu přežvýkavců. Převládá kyselina octová a dalšími významnými kyselinami je kyselina propionová a máselná. Čím vyšší je podíl propionové kyseliny, tím je více dostupné energie pro tělo zvířete. V této práci se koncentrace TMK snížily oproti kontrole v přepočtu o 11,05 mmol/l inkubovaného substrátu. Z TMK nejvíce klesly hodnoty propionátu a to z 19,18 mol/100 ml bachorové tekutiny u kontrolního vzorku na 12,68 mol/100 ml. Hned poté následoval acetát, jehož koncentrace také klesly z 58,71 mol/100 ml u kontrolního vzorku na 54,38 mol/100 ml. Tyto změny se projeví v poměru acetát:propionát (A:P), který se oproti kontrole mírně zvýšil. Hlavní regulační mechanismus poměru A:P v bachoru souvisí se strukturou bachorového mikrobiomu (Goel et al. 2020). Některé studie věří, že početnost protozoí může změnit poměr TMK a zvýšit koncentrace kyseliny propionové kvůli inhibici mezidruhového přenosu  $\text{H}_2$  mezi protozoi a metanogeny, takže je více tohoto  $\text{H}_2$  využito ve dráze tvorby kyseliny propionové. Ve studii Luan et al. (2023) byly proto poměry A:P po vysoce koncentrované dietě u C12 skupiny výrazně nižší než u kontroly a naopak obsah propionové kyseliny se významně zvýšil v porovnání s kontrolou. Z toho vyplývá, že doplnění MCFA může změnit bachorovou fermentaci a přetransformovat ji na propionovou fermentaci. Klop et al. (2017) také zjistili, že C12 snížila koncentrace TMK, relativní molární podíl acetátu a butyrátu a naopak zvýšila molární podíl propionátu v bachoru. Dodávají, že podíl TMK odpovídal pozorovanému snižování produkce  $\text{CH}_4$ . Změna poměru TMK v bachorové tekutině při účinku C10/12 tedy naznačuje změny v mikrobiálním společenstvu.

## 6.2 Dusičnany

Dusičnany ( $\text{NO}_3^-$ ) taktéž snížili celkovou produkci plynů o 6,3 ml/g inkubované sušiny a spolu s tím z celkové produkce plynů klesla i produkce  $\text{CH}_4$  o 1,41 procentního bodu stejně tak jako produkce  $\text{CH}_4$  vyjádřená na produkci TMK, kde bylo snížení o 0,015 mol/mol TMK (Veneman et al. 2015). Se snížením se shodují autoři studie van Gastelena et al. (2019) a metaanalýzy Feng et al. (2020). Tito autoři tvrdí, že  $\text{NO}_3^-$  snížily produkci  $\text{CH}_4$  (g  $\text{CH}_4$ /kg sušiny) o 22 % a 16 % u dojníc.

Důvodem, proč dochází ke snižování metanogeneze je konkurence aditiva s metanogeny o dostupné molekuly  $\text{H}_2$  v batoru.  $\text{NO}_3^-$  jsou toxickou složkou, která může inhibovat mnoho mikroorganismů, a proto se některé studie domnívají, že snížení  $\text{CH}_4$  může být ovlivněno také inhibicí metanogenů (Guyader et al. 2016). Abdelbagi et al. (2023) ale za svých výsledků studie vyzorovali, že při zařazení  $\text{NO}_3^-$  došlo k významnému zvýšení koncentrace molekul  $\text{H}_2$  v batoru, zatímco počet metanogenů nebyl vůbec ovlivněn. Na základě tohoto zjištění se dospělo k závěru, že se  $\text{NO}_3^-$  v batoru přijímají  $\text{H}_2$  a redukují se na amoniak, protože je to výhodnější reakce než tvorba  $\text{CO}_2$ . Veneman et al. (2015) ale přicházejí s myšlenkou, že by ke snížení počtu metanogenů mohlo dojít kvůli vyčerpáním potřebného  $\text{H}_2$  v batoru.

Redukcí  $\text{NO}_3^-$  v batoru vzniká dusitan ( $\text{NO}_2^-$ ) a ten se následně přeměňuje na  $\text{NH}_3$ , jehož N je klíčovým substrátem pro syntézu mikrobiálního proteinu (Yang et al. 2016). Není tedy divu, že se v této studii po přidání  $\text{NO}_3^-$  zvýšily koncentrace  $\text{NH}_3\text{-N}$  o 3,24 mg/100 ml batorové tekutiny. Podobně vyšší koncentrace  $\text{NH}_3\text{-N}$  pozorovali i ve studii Sharifiho et al. (2022) o 0,067 mmol/l u 40 %  $\text{NO}_3^-$  a o 0,072 mmol/l u 60 %  $\text{NO}_3^-$  v objemném krmivu. S odlišným pohledem ale přichází Abdelbagi et al. (2023), kteří pozorovali, že koncentrace  $\text{NH}_3$  nebyla přidávkou  $\text{NO}_3^-$  nijak ovlivněna. Důvodem může být nízká rychlost přeměny molekul  $\text{NO}_3^-$  na  $\text{NH}_3$ .

Na koncentraci TMK v batoru neměly v tomto pokusu  $\text{NO}_3^-$  významný vliv. Některé studie však zaznamenaly určité změny. Např. ve studii Venemana et al. (2015)  $\text{NO}_3^-$  snížily emise  $\text{CH}_4$  a zároveň díky nim vzrostl poměr A:P. Snížily se jim koncentrace propionátu, což vysvětlují tím, že redukce  $\text{NO}_3^-$  může konkurovat s propiogenezí o redukční ekvivalenty, protože je to termodynamicky příznivější. Navíc si všimli, že v jejich pokusu byla nejpočetnějším bakteriálním rodem *Prevotella*, která je známá tím, že produkuje jako hlavní fermentační produkt propionát a tím podle *in vivo* studií zvyšuje poměr propionátu v batoru.

## 6.3 Kombinace dusičnanů a mastných kyselin

Směs C10/12 samostatně snížila produkci  $\text{CH}_4$  z celkové produkce plynů z 6,42 % na 3,35 % a  $\text{NO}_3^-$  samostatně na 5,01 % a obojí snížení bylo statisticky významné. To potvrzuje hypotézu, že tato aditiva individuálně snižují produkci  $\text{CH}_4$  vznikajícího při batorové fermentaci. Směs kyselin C10 a C12 byla použita proto, že se v předešlých studiích potvrdily jejich samostatné účinky (Klop et al. 2017; Luan et al. 2023). Kombinace mastných kyselin a jejich vliv na batorovou produkci  $\text{CH}_4$  zkoušeli testovat i v jiných studiích. Použití C12 nebo kyseliny myristové (C14) jako krmného aditiva, efektivně modulovalo batorovou fermentaci a působily jako silný defaunační agens v batoru (Dohme et al. 2001). Vypadalo to, že by mohly mít C12 a C14 synergický efekt při snižování  $\text{CH}_4$ , protože obě dohromady potlačily

silně metanogenezi (Soliva et al. 2003). Dohme et al. (2000) se shodli na tom, že zdroje bohaté na C12 a C14 jako je kokosový nebo palmojádrový olej, které mají C10:C14 v poměru alespoň 2,5:1 významně snižují metanogenezi a inhibují nálevníky. Že kokosový olej konzistentně snižuje metanogenezi vychází jak z *in vitro*, tak z *in vivo* studií. Vznik fermentačních produktů je však nižší kvůli synergickému mechanismu MCFA, kde je snížený počet mikroorganismů zodpovědný za snižování CH<sub>4</sub> a stravitelnosti, což vede ke snížení TMK. Poroto by mohla směs C10/C14 změnit metanogenní populace mikroorganismů.

V porovnání s oběma ošetřeními, tj. C10/12 a NO<sub>3</sub><sup>-</sup> vyplývá, že měly mastné kyseliny větší efekt na snižování CH<sub>4</sub>. Směs C10/12 ovlivnila koncentrace TMK, kdežto NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ne. To naznačuje účinek mastných kyselin měnit mikrobiální populaci v bacheru kvůli tomu, že inhibují určité mikroorganismy včetně protozoí, a tím ovlivňují celkovou fermentaci. NO<sub>3</sub><sup>-</sup> koncentrace TMK neměly pravděpodobně proto, že jejich účinkem je redukční reakce s molekulami H<sub>2</sub>. Změny v mikrobiální populaci by mohly vyvolat nejspíš až druhotně vyčerpáním dostupného H<sub>2</sub> pro metanogeny, které by neměli potřebné podmínky pro jejich aktivitu. To se na hladinách TMK neprojevovalo, protože byl pokus pravděpodobně rychlejší než vyčerpání dostupného H<sub>2</sub>.

Kombinace C10/12 a NO<sub>3</sub><sup>-</sup> snížila celkovou produkci plynů, ale toto snížení nebylo statisticky významné. Statisticky významná byla ale produkce CH<sub>4</sub> z celkové produkce plynů, která se snížila z 6,42 % na 3,06 %. Snížení však bylo podobné samotnému účinku C10/12, kdy produkci CH<sub>4</sub> směs snížila na 3,35 % z celkové produkce plynů. NO<sub>3</sub><sup>-</sup> přidané individuálně téměř neovlivnily TMK, jejich kombinace s C10/12 tyto koncentrace TMK snížila, ale ne statisticky významně. Statisticky významná změna v koncentraci TMK byla pouze u C10/12. Lze tedy shrnout, že synergický/aditivní účinek NO<sub>3</sub><sup>-</sup> a C10/12 nebyl potvrzen. Navíc díky analýze jednoduchých účinků se projevilo, že při kombinovaném suplementu NO<sub>3</sub><sup>-</sup> a C10/12 byl antimetanogenní účinek řízen především C10/12. Je to pravděpodobně proto, že NO<sub>3</sub><sup>-</sup> jsou do určité míry závislé na účinku C10/12, protože jak bylo již zmíněno, mastné kyseliny ovlivňují bacherové mikroorganismy, které produkují H<sub>2</sub> a ten je využíván při redukci NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Mohlo se tedy stát, že mastné kyseliny inhibovaly mikroorganismy odpovědné za disasimilační redukci NO<sub>3</sub><sup>-</sup> na NH<sub>3</sub>, čímž se snížilo využití molekul H<sub>2</sub> touto cestou. To by naznačoval i pokles NH<sub>3</sub>-N pozorovaný při kombinaci NO<sub>3</sub><sup>-</sup> a C10/12 z 25,45 mg/100 ml na 23,97 mg/100 ml. Navíc je také možné, že mastné kyseliny inhibovaly samotné metanogeny, a tím zamezily prostoru pro anitmetanogenní účinky NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Je zapotřebí více studií k vysvětlení, jak se tyto sloučeniny vzájemně ovlivňují a k jakým změnám dojde ve složení bacherových mikroorganismů.

## 7 Závěr

- Hypotéza o účinku samostatného použití směsi kyseliny kaprinové a laurové a dusičnanů byla touto prací potvrzena. Dusičnany snížily produkci metanu o 9,2 % a směs kyseliny kaprinové a laurové o 21,3 % (vyjádřeno v ml/g inkubovaného substrátu). U dusičnanů nebyl zjištěn negativní vliv na bachorovou fermentaci, ale u směsi kyselin byl zjištěn pokles produkce těkavých mastných kyselin.
- I přes to, že se směs kyseliny kaprinové a laurové a dusičnany samostatně prokázali jako účinný způsob snižování metanogeneze, jejich kombinace neměla synergický efekt. Tato hypotéza proto potvrzena nebyla. Při porovnání obou aditiv pomocí analýzy jednoduchých účinků se navíc zjistilo, že měly mastné kyseliny větší vliv na snižování metanu, než dusičnany.
- Tato práce přinesla nový vhled do možností použití antimetanogenních krmných aditiv pro skot a prokázání účinků směsi kyseliny kaprinové a laurové a dusičnanů i jejich kombinace na bachorovou fermentaci a produkci metanu *in vitro*. Při kombinaci obou sloučenin byl antimetanogenní účinek řízen především mastnými kyselinami. Není však přesně známo, proč tomu tak bylo. Je tedy třeba dalších studií na to, aby se dokázalo, jak se tato krmná aditiva vzájemně ovlivňují a k jakým dojde změnám ve složení bachorových mikroorganismů.



## 8 Literatura

- Abdelbagi M, Ridwan R, Fitri A, Jayanegara A. 2023. Performance, methane emission, nutrient utilization, and the nitrate toxicity of ruminants with dietary nitrate addition: a meta-analysis from in vivo trials. *Tropical Animal Science Journal* **46**:74-84.
- Abdillah AE, Sarah D, Ardian AA, Anas MA, Aprianto MA, Hanim C, Kurniawati A, Yusiati M, Yusiati LM. 2024. Effect of nutmeg essential oil (*Myristica fragrans* Houtt.) on methane production, rumen fermentation, and nutrient digestibility in vitro. *Scientific Reports* **14**:3554.
- Adesogan T, Yang W, Lee C, Gerber PJ, Henderson B, Tricarico JM. 2013. Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal—SPECIAL TOPICS. *Journal of Animal Science* **91**:5045-5069.
- Adesogan T, Yang W, Lee C, Gerber PJ, Henderson B, Tricarico JM. 2013. Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal—SPECIAL TOPICS. *Journal of Animal Science* **91**:5045-5069.
- Alemu AW, Gruninger RJ, Zhang XM, O'Hara E, Kindermann M, Beauchemin KA. 2023. 3-Nitrooxypropanol supplementation of a forage diet decreased enteric methane emissions from beef cattle without affecting feed intake and apparent total-tract digestibility. *Journal of Animal Science* **101**:skad001.
- Alemu AW, Pekrul LK, Shreck AL, Booker CW, McGinn SM, Kindermann M, Beauchemin KA. 2021. 3-Nitrooxypropanol decreased enteric methane production from growing beef cattle in a commercial feedlot: implications for sustainable beef cattle production. *Frontiers in Animal Science* **2**:641590.
- Allen JR, Clark DD, Krum JG, Ensign SA. 1999. A role for coenzyme M (2-mercaptoethanesulfonic acid) in a bacterial pathway of aliphatic epoxide carboxylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**:8432-8437.
- Appuhamy JRN, Strathe AB, Jayasundara S, Wagner-Riddle C, Dijkstra J, France J, Kebreab E. 2013. Anti-methanogenic effects of monensin in dairy and beef cattle: A meta-analysis. *Journal of Dairy Science* **96**:5161-5173.
- Arndt C et al. 2021. Strategies to mitigate enteric methane emissions by ruminants—a way to approach the 2.0° C target. *AgriRxiv* **2021**:2021.
- Arndt C et al. 2022. Full adoption of the most effective strategies to mitigate methane emissions by ruminants can help meet the 1.5 C target by 2030 but not 2050. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **119**:e2111294119.
- Bačėninaitė D, Džermeikaitė K, Antanaitis R. 2022. Global warming and dairy cattle: How to control and reduce methane emission. *Animals* **12**:2687.
- 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**:2-16.

- Benchaar C, Pomar C, Chiquette J. 2001. Evaluation of dietary strategies to reduce methane production in ruminants: a modelling approach. *Canadian Journal of Animal Science* **81**:563-574.
- Benchaar C. 2016. Diet supplementation with cinnamon oil, cinnamaldehyde, or monensin does not reduce enteric methane production of dairy cows. *Animal* **10**:418-425.
- Besharati M, Maggiolino A, Palangi V, Kaya A, Jabbar M, Eseceli H, De Palo P, Lorenzo JM. (2022). Tannin in Ruminant Nutrition. *Molecules* **27**:8273.
- Blair R. 2021. Nutrition and feeding of organic cattle. Cabi, Boston.
- Bodas R, López S, Fernández M, García-González R, Wallace RJ, González JS. 2009. Phytogenic additives to decrease in vitro ruminal methanogenesis. *Options Méditerranéennes* **85**:279-283.
- Bodas R, Prieto N, García-González R, Andrés S, Giráldez FJ, López S. 2012. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Animal Feed Science and Technology* **176**:78-93.
- Brooke CG et al. 2020. Methane reduction potential of two pacific coast macroalgae during in vitro ruminant fermentation. *Frontiers in Marine Science* **7**:561.
- Brulc JM et al. 2009. Gene-centric metagenomics of the fiber-adherent bovine rumen microbiome reveals forage specific glycoside hydrolases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**:1948-1953.
- 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**:2580-2595.
- Cammack KM, Austin KJ, Lamberson WR, Conant GC, Cunningham HC. 2018. Ruminant nutrition symposium: Tiny but mighty: The role of the rumen microbes in livestock production. *Journal of animal science* **96**:752-770.
- Carrasco AV, Peterson CB, Zhao Y, Pan Y, McGlone JJ, DePeters EJ, Mitloehner FM. 2020. The impact of essential oil feed supplementation on enteric gas emissions and production parameters from dairy cattle. *Sustainability* **12**:10347.
- Cassia R, Nocioni M, Correa-Aragunde N, Lamattina L. 2018. Climate change and the impact of greenhouse gasses: CO<sub>2</sub> and NO, friends and foes of plant oxidative stress. *Frontiers in plant science* **9**:273.
- Castro DJ, Cerón-Cucchi ME, Ortiz-Chura A, Depetris GJ, Irazoqui JM, Amadio AF, Cravero S, Cantón GJ. 2022. Ruminal effects of excessive dietary sulphur in feedlot cattle. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **106**:978-987.
- 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.
- Coleman GS. 1960. A sulphate-reducing bacterium from the sheep rumen. *Microbiology* **22**:423-436.

- da Cunha LL, Monteiro HF, Figueiredo CC, Canisso IF, Bicalho RC, Cardoso FC, Weimer BC, Lima FS. 2023. Characterization of rumen microbiome and metabolome from oro-esophageal tubing and rumen cannula in Holstein dairy cows. *Scientific reports* **13**:5854.
- Danielsson R, Dicksved J, Sun L, Gonda H, Müller B, Schnürer A, Bertilsson J. 2017. Methane production in dairy cows correlates with rumen methanogenic and bacterial community structure. *Frontiers in microbiology* **8**:226.
- Darabighane B, Salem AZM, Mirzaei Aghjehgheshlagh F, Mahdavi A, Zarei A, Elghandour MMY, López S. 2019. Environmental efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* on methane production in dairy and beef cattle via a meta-analysis. *Environmental Science and Pollution Research* **26**:3651-3658.
- De Bhowmick G, Hayes M. 2023. Potential of Seaweeds to Mitigate Production of Greenhouse Gases during Production of Ruminant Proteins. *Global Challenges* **8**:2200145.
- Dijkstra J, Bannink A, France J, Kebreab E, Van Gastelen S. 2018. Antimethanogenic effects of 3-nitrooxypropanol depend on supplementation dose, dietary fiber content, and cattle type. *Journal of dairy science* **101**:9041-9047.
- Dohme F, Machmüller A, Wasserfallen A, Kreuzer M. 2000. Comparative efficiency of various fats rich in medium-chain fatty acids to suppress ruminal methanogenesis as measured with RUSITEC. *Canadian Journal of Animal Science* **80**:473-484.
- Dohme F, Machmüller A, Wasserfallen A, Kreuzer M. 2000. Comparative efficiency of various fats rich in medium-chain fatty acids to suppress ruminal methanogenesis as measured with RUSITEC. *Canadian Journal of Animal Science* **80**:473-484.
- Dohme F, Machmüller A, Wasserfallen A, Kreuzer M. 2001. Ruminal methanogenesis as influenced by individual fatty acids supplemented to complete ruminant diets. *Letters in Applied Microbiology* **32**:47-51.
- Doyle N, Mbandlwa P, Kelly WJ, Attwood G, Li Y, Ross RP, Stanton C, Leahy S. 2019. Use of lactic acid bacteria to reduce methane production in ruminants, a critical review. *Frontiers in Microbiology* **10**:465542.
- Drewnoski ME, Pogge DJ, Hansen SL. 2014. High-sulfur in beef cattle diets: a review. *Journal of animal science* **92**:3763-3780.
- Duffield TF, Merrill JK, Bagg RN. 2012. Meta-analysis of the effects of monensin in beef cattle on feed efficiency, body weight gain, and dry matter intake. *Journal of Animal Science* **90**:4583-4592.
- Duin EC et al. 2016. Mode of action uncovered for the specific reduction of methane emissions from ruminants by the small molecule 3-nitrooxypropanol. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **113**:6172-6177.
- Duval S, Kindermann M. 2018. Use of nitrooxy organic molecules in feed for reducing methane emission in ruminants, and/or to improve ruminant performance. Patent and Trademark Office, USA. US 9902685.

- EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). 2013. Scientific Opinion on the safety and efficacy of iodine compounds (E2) as feed additives for all animal species: Calcium iodate anhydrous and potassium iodide, based on a dossier submitted by Ajay Europe SARL. *EFSA Journal* **11**:3099.
- Ensley S. 2020. Ionophore use and toxicosis in cattle. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice* **36**:641-652.
- Eugène M, Klumpp K, Sauvant D. 2021. Methane mitigating options with forages fed to ruminants. *Grass and Forage Science* **76**:196-204.
- Faciola AP, Broderick GA. 2013. Effects of feeding lauric acid on ruminal protozoa numbers, fermentation, and digestion and on milk production in dairy cows. *Journal of Animal Science* **91**:2243-2253.
- Feng XY, Dijkstra J, Bannink A, Van Gastelen S, France J, Kebreab E. 2020. Antimethanogenic effects of nitrate supplementation in cattle: A meta-analysis. *Journal of dairy science* **103**:11375-11385.
- Fenn S et al. 2021. NirA is an alternative nitrite reductase from *Pseudomonas aeruginosa* with potential as an antivirulence target. *Mbio* **12**:10-1128.
- Fouts JQ, Honan MC, Roque BM, Tricarico JM, Kebreab E. 2022. Board Invited Review: Enteric methane mitigation interventions. *Translation Animal Science* **6**:1-16.
- Friedman N, Jami E, Mizrahi I. 2017. Compositional and functional dynamics of the bovine rumen methanogenic community across different developmental stages. *Environmental microbiology* **19**:3365-3373.
- Friedrich MW. 2005. Methyl-coenzyme M reductase genes: unique functional markers for methanogenic and anaerobic methane-oxidizing Archaea. *Methods in enzymology* **397**:428-442.
- Gallardo WB, Teixeira IAMA. 2023. Associations between Dietary Fatty Acid Profile and Milk Fat Production and Fatty Acid Composition in Dairy Cows: A Meta-Analysis. *Animals* **13**:2063.
- Gensa U. 2019. Review on cyanide poisoning in ruminants. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare* **9**:1-12.
- Gilbert RA, Townsend EM, Crew KS, Hitch TC, Friedersdorff JC, Creevey CJ, Pope PB, Ouwerkerk D, Jameson E. 2020. Rumen virus populations: technological advances enhancing current understanding. *Frontiers in microbiology* **11**:450.
- Glasson CR, Kinley RD, de Nys R, King N, Adams SL, Packer MA, Svenson J, Eason CT, Magnusson, M. 2022. Benefits and risks of including the bromoform containing seaweed *Asparagopsis* in feed for the reduction of methane production from ruminants. *Algal Research* **64**:102673.
- Gleadow RM, Møller BL. 2014. Cyanogenic glycosides: synthesis, physiology, and phenotypic plasticity. *Annual review of plant biology* **65**:155-185.

- Goel G, Arvidsson K, Vlaeminck B, Bruggeman G, Deschepper K, Fievez V. 2009. Effects of capric acid on rumen methanogenesis and biohydrogenation of linoleic and  $\alpha$ -linolenic acid. *Animal* **3**:810-816.
- Goel G, Arvidsson K, Vlaeminck B, Bruggeman G, Deschepper K, Fievez V. 2009. Effects of capric acid on rumen methanogenesis and biohydrogenation of linoleic and  $\alpha$ -linolenic acid. *Animal* **3**:810-816.
- Goel G, Makkar HP. 2012. Methane mitigation from ruminants using tannins and saponins. *Tropical animal health and production* **44**:729-739.
- Goel G, Makkar HP. 2012. Methane mitigation from ruminants using tannins and saponins. *Tropical animal health and production* **44**:729-739.
- Graminha EBN, Gonçalves AZL, Pirola RDPB, Balsalobre MAA, Da Silva R, Gomes E. 2008. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. *Animal Feed Science and Technology* **144**:1-22.
- Grossi G, Goglio P, Vitali A, Williams AG. 2019. Livestock and climate change: impact of livestock on climate and mitigation strategies. *Animal Frontiers* **9**:69-76.
- Guyader J, Tavendale M, Martin C, Muetzel S. 2016. Dose-response effect of nitrate on hydrogen distribution between rumen fermentation end products: an in vitro approach. *Animal Production Science* **56**:224-230.
- Hansen MJ, Jonassen KE, Løkke MM, Adamsen APS, Feilberg A. 2016. Multivariate prediction of odor from pig production based on in-situ measurement of odorants. *Atmospheric Environment* **135**:50-58.
- Harfoot CG. 1981. Anatomy, physiology and microbiology of the ruminant digestive tract . Pages 1-19 in William WCH, editors. *Lipid metabolism in ruminant animals*. Pergamon Press, Amsterdam.
- Hart KJ, Yáñez-Ruiz DR, Duval SM, McEwan NR, Newbold CJ. 2008. Plant extracts to manipulate rumen fermentation. *Animal feed science and technology* **147**:8-35.
- Hegarty RS. 1999. Mechanisms for competitively reducing ruminal methanogenesis. *Australian Journal of Agricultural Research* **50**:1299-1306.
- Hernández-Castellano LE, Santos LP, Weisbjerg MR, Larsen M. 2021. Daily alternation of the dietary starch level in Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science* **104**:9735-9751.
- Hindrichsen IK, Augustsson EU, Lund B, Jensen MM, Raun M, Jatkauskas J, Vrotniakiene V, Ohlsson C. 2012. Characterisation of different lactic acid bacteria in terms of their oxygen consuming capacity, aerobic stability and pathogen inhibition. Pages 105-106 in Kuoppala K, Rinne M, Vanhatalo A, editors. *Proc. XVI International Silage Conference*. MTT Agrifood Research Finland, Finland.
- Honan M, Feng X, Tricarico JM, Kebreab E. 2021. Feed additives as a strategic approach to reduce enteric methane production in cattle: Modes of action, effectiveness and safety. *Animal Production Science* **62**:1303-1317.

- Hook SE, Wright ADG, McBride BW. 2010. Methanogens: methane producers of the rumen and mitigation strategies. *Archaea* **2010**:11.
- Huang Q, Liu X, Zhao G, Hu T, Wang Y. 2018. Potential and challenges of tannins as an alternative to in-feed antibiotics for farm animal production. *Animal Nutrition* **4**:137–150.
- Hubert C, Voordouw G. 2007. Oil field souring control by nitrate-reducing *Sulfurospirillum* spp. that outcompete sulfate-reducing bacteria for organic electron donors. *Applied and environmental microbiology* **73**:2644-2652.
- Huhtanen P, Krizsan SJ, Ramin M. 2021. A meta-analysis of faecal output and nutrient composition, and potential methane emission from manure of dairy cows. *Animal Feed Science and Technology* **282**:115120.
- Huisingh J, McNeill JJ, Matrone G. 1974. Sulfate reduction by a *Desulfovibrio* species isolated from sheep rumen. *Applied Microbiology* **28**:489-497.
- Chao SC, Young DG, Oberg CJ. 2000. Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. *Journal of essential oil research* **12**:639-649.
- Intergovernmental Panel on Climate Change. 2021. Climate change 2021: The physical science basis. Contribution of Working Group I to the IPCC Sixth Assessment Report. Cambridge.
- Islam M, Lee S. 2019. Advanced estimation and mitigation strategies: A cumulative approach to enteric methane abatement from ruminants. *Journal of Animal Science and Technology* **61**:122–137.
- Itabashi H, Kobayashi T, Matsumoto M. 1984. The effects of rumen ciliate protozoa on energy metabolism and some constituents in rumen fluid and blood plasma of goats. *Japanese Journal of Zootechnical Science* **55**:248-256.
- Janssen PH. 2010. Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics. *Animal Feed Science Technology* **160**:1–22.
- Janssen PH. 2010. Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics. *Animal feed science and technology* **160**:1-22.
- Jayanegara A, Wina E, Takahashi J. 2014. Meta-analysis on methane mitigating properties of saponin-rich sources in the rumen: influence of addition levels and plant sources. *Asian-Australasian journal of animal sciences* **27**:1426.
- Jeyanathan J, Martin C, Eugène M, Ferlay A, Popova M, Morgavi DP. 2019b. Bacterial direct-fed microbials fail to reduce methane emissions in primiparous lactating dairy cows. *Journal of Animal Science and Biotechnology* **10**:41.
- Jeyanathan J, Martin C, Morgavi DP. 2016a. Screening of bacterial direct-fed microbials for their antimethanogenic potential in vitro and assessment of their effect on ruminal fermentation and microbial profiles in sheep. *Journal of Animal Science* **94**:739-750.

- Jiao HP, Dale AJ, Carson AF, Murray S, Gordon AW, Ferris CP. 2014. Effect of concentrate feed level on methane emissions from grazing dairy cows. *Journal of Dairy Science* **97**:7043-7053.
- Jiménez-Ocampo R et al. 2022. Impact of orange essential oil on enteric methane emissions of heifers fed bermudagrass hay. *Frontiers in Veterinary Science* **9**:863910.
- Joblin KN. 1999. Ruminant acetogens and their potential to lower ruminant methane emissions. *Australian Journal of Agricultural Research* **50**:1307–1314.
- 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, Výborná A, Tyrolová Y, Kudrna V, Trakal L, Vadroňová M, Tichá D, Pohořelý M. 2022. Feeding biochar to horses: Effects on nutrient digestibility, fecal characteristics, and blood parameters. *Animal Feed Science and Technology* **285**:115242.
- Kapoor B, Kapoor D, Gautam S, Singh R, Bhardwaj S. 2021. Dietary Polyunsaturated Fatty Acids (PUFAs): Uses and Potential Health Benefits. *Current Nutrition Reports* **10**:232-242.
- Karlsson J, Ramin M, Kass M, Lindberg M, Holtenius K. 2019. Effects of replacing wheat starch with glycerol on methane emissions, milk production, and feed efficiency in dairy cows fed grass silage-based diets. *Journal of dairy science* **102**:7927-7935.
- Kholif AE. 2023. A review of effect of saponins on ruminal fermentation, health and performance of ruminants. *Veterinary Sciences* **10**:450.
- Khota W et al. 2023. Ensiling cyanide residue and In vitro rumen fermentation of cassava root silage treated with cyanide-utilizing bacteria and cellulase. *Fermentation* **9**:151.
- Khota W, Kaewpila C, Kimprasit T, Seemakram W, Kakaisorn S, Wanapat M, Cherdthong A. 2023. The isolation of rumen enterococci strains along with high potential utilizing cyanide. *Scientific Reports* **13**:13176.
- Kim SH, Lee C, Pechtl HA, Hettick JM, Campler MR, Pairis-Garcia MD, Beauchemin KA, Celi P, Duval SM. 2019. Effects of 3-nitrooxypropanol on enteric methane production, rumen fermentation, and feeding behavior in beef cattle fed a high-forage or high-grain diet. *Journal of animal science*: **97**:2687-2699.
- Kjeldsen MH, Weisbjerg MR, Larsen M, Højberg O, Ohlsson C, Walker N, Hellwing ALF, Lund P. 2024. Gas exchange, rumen hydrogen sinks, and nutrient digestibility and metabolism in lactating dairy cows fed 3-nitrooxypropanol and cracked rapeseed. *Journal of Dairy Science* **107**:2047-2065.
- Kozłowska M, Cieślak A, Józwik A, El-Sherbiny M, Stochmal A, Oleszek W, Kowalczyk M, Filipiak W, Szumacher-Strabel M. 2020. The effect of total and individual alfalfa saponins on rumen methane production. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **100**:1922-1930.

- Ku-Vera JC, Jiménez-Ocampo R, Valencia-Salazar SS, Montoya-Flores MD, Molina-Botero IC, Arango J, Gómez-Bravo CA, Aguilar-Pérez CF, Solorio-Sánchez FJ. 2020. Role of secondary plant metabolites on enteric methane mitigation in ruminants. *Frontiers in Veterinary Science* **7**:584.
- Lan W, Yang C. 2019. Ruminant methane production: Associated microorganisms and the potential of applying hydrogen-utilizing bacteria for mitigation. *Science of the Total Environment* **654**:1270-1283.
- Latham EA, Anderson RC, Pinchak WE, Nisbet DJ. 2016. Insights on alterations to the rumen ecosystem by nitrate and nitrocompounds. *Frontiers in microbiology* **7**:228.
- Latham EA, Pinchak WE, Trachsel J, Allen HK, Callaway TR, Nisbet DJ, Anderson RC. 2019. *Paenibacillus* 79R4, a potential rumen probiotic to enhance nitrite detoxification and methane mitigation in nitrate-treated ruminants. *Science of the total environment* **671**:324-328.
- Lean IJ, Golder HM, Grant TM, Moate PJ. 2021. A meta-analysis of effects of dietary seaweed on beef and dairy cattle performance and methane yield. *PLoS One* (e0249053) DOI: 10.1371/journal.pone.0249053.
- Lee SI, Kang KS. Function of capric acid in cyclophosphamide-induced intestinal inflammation, oxidative stress, and barrier function in pigs. *Scientific Reports* **7**:16530.
- Li Q, et al. 2023. Global environmental implications of atmospheric methane removal through chlorine-mediated chemistry-climate interactions. *Nature Communications* **14**:4045.
- Lileikis T, Nainienė R, Bliznikas S, Uchokis V. 2023. Dietary Ruminant Enteric Methane Mitigation Strategies: Current Findings, Potential Risks and Applicability. *Animals* **13**:2586.
- Lin X, Hu Z, Zhang S, Cheng G, Hou Q, Wang Y, Yan Z, Shi K, Wang, Z. 2020. A Study on the Mechanism Regulating Acetate to Propionate Ratio in Rumen Fermentation by Dietary Carbohydrate Type. *Advances in Bioscience and Biotechnology* **11**:369-390.
- Loza C, Reinsch T, Loges R, Taube F, Gere JI, Kluß C, Hasler M, Malisch CS. 2021. Methane emission and milk production from jersey cows grazing perennial ryegrass–white clover and multispecies forage mixtures. *Agriculture* **11**:175.
- Luan J, Feng X, Yang D, Yang M, Zhou J, Geng C. 2023. Effects of medium-chain fatty acids (MCFAs) on in vitro rumen fermentation, methane production, and nutrient digestibility under low-and high-concentrate diets. *Animal Science Journal* (e13818) DOI: 10.1111/asj.13818.
- Mahesh MS, Mohanta RK, Patra AK. 2021. Probiotics in livestock and poultry nutrition and health. *Advances in Probiotics for Sustainable Food and Medicine* **21**:149-179.
- Machado L, Magnusson M, Paul NA, Kinley R, de Nys R, Tomkins N. 2016. Identification of bioactives from the red seaweed *Asparagopsis taxiformis* that promote antimethanogenic activity in vitro. *Journal of Applied Phycology* **28**:3117-3126.



- Marques RDS, Cooke RF. 2021. Effects of ionophores on ruminal function of beef cattle. *Animals* **11**:2871.
- Martins LF, Cueva SF, Lage CFA, Ramin M, Silvestre T, Tricarico J, Hristov AN. 2024. A meta-analysis of methane-mitigation potential of feed additives evaluated in vitro. *Journal of dairy science* **107**:288-300.
- Matthews C, Crispie F, Lewis E, Reid M, O'Toole PW, Cotter PD. 2019. The rumen microbiome: a crucial consideration when optimising milk and meat production and nitrogen utilisation efficiency. *Gut microbes* **10**:115-132.
- McAllister TA, Newbold CJ. 2008. Redirecting rumen fermentation to reduce methanogenesis. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **48**:7-13.
- McGinn SM, Flesch TK, Beauchemin KA, Shreck A, Kindermann M. 2019. Micrometeorological methods for measuring methane emission reduction at beef cattle feedlots: evaluation of 3-Nitrooxypropanol feed additive. *Journal of environmental quality* **48**:1454-1461.
- McGuffey RK, Richardson LF, Wilkinson JID. 2001. Ionophores for dairy cattle: current status and future outlook. *Journal of Dairy Science* **84**:E194-E203.
- Meale SJ, Chaves AV, Baah J, McAllister TA. 2012. Methane production of different forages in in vitro ruminal fermentation. *Asian-Australasian Journal of animal sciences* **25**:86.
- Melchior EA, Hales KE, Lindholm-Perry AK, Freetly HC, Wells JE, Hemphill CN, Wickersham TA, Sawyer JE, Myer PR. 2018. The effects of feeding monensin on rumen microbial communities and methanogenesis in bred heifers fed in a drylot. *Livestock science* **212**:131-136.
- Melchior EA, Hales KE, Lindholm-Perry AK, Freetly HC, Wells JE, Hemphill CN, Wickersham TA, Sawyer JE, Myer PR. 2018. The effects of feeding monensin on rumen microbial communities and methanogenesis in bred heifers fed in a drylot. *Livestock science* **212**:131-136.
- Menke KH, Raab L, Salewski A, Steingass H, Fritz D, Schneider W. 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. *The Journal of Agricultural Science* **93**:217-222.
- Miller WJ. 2012. *Dairy cattle feeding and nutrition*. Elsevier, Georgia.
- Min BR, Parker D, Brauer D, Waldrip H, Lockard C, Hales K, Akbay A, Augyte S. 2021. The role of seaweed as a potential dietary supplementation for enteric methane mitigation in ruminants: Challenges and opportunities. *Animal Nutrition* **7**:1371-1387.
- Mohammed R, Stevenson DM, Beauchemin KA, Muck RE, Weimer PJ. 2012. Changes in ruminal bacterial community composition following feeding of alfalfa ensiled with a lactic acid bacterial inoculant. *Journal of Dairy Science* **95**:328-339.

- Møller BL, Olsen CE, Motawia MS. 2016. General and stereocontrolled approach to the chemical synthesis of naturally occurring cyanogenic glucosides. *Journal of Natural Products* **79**:1198-1202.
- Moreno-Vivián C, Cabello P, Martínez-Luque M, Blasco R, Castillo F. 1999. Prokaryotic nitrate reduction: molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. *Journal of bacteriology* **181**:6573-6584.
- Muizelaar W, Groot M, van Duinkerken G, Peters R, Dijkstra J. 2021. Safety and transfer study: Transfer of bromoform present in *Asparagopsis taxiformis* to milk and urine of lactating dairy cows. *Foods* **10**:584.
- Nagaraja TG, Taylor MB. 1987. Susceptibility and resistance of ruminal bacteria to antimicrobial feed additives. *Applied and Environmental Microbiology* **53**:1620-1625.
- Nagaraja TG. 2016. Microbiology of the rumen. Pages 39-61 in Millen D, De Beni Arrigoni M, Lauritano Pacheco R, editors. *Rumenology*. Springer, Cham.
- Národní zdravotnický informační portál (NZIP). 2024. Tuky (lipidy) a mastné kyseliny. NZIP, Praha. Available from <https://www.nzip.cz/clanek/1416-tuky-lipidy-mastne-kyseliny> (accessed January 2024).
- National Academies of Sciences, Engineering and Medicine; Division on Earth and Life Studies; Board on Agriculture a Natural Resources; Committee on Nutrient Requirements of Beef Cattle. 2016. Nutrient requirements of beef cattle. National Academies Press, Washington.
- Navarro-Villa A, O'Brien M, López S, Boland TM, O'Kiely P. 2013. In vitro rumen methane output of grasses and grass silages differing in fermentation characteristics using the gas-production technique (GPT). *Grass and Forage Science* **68**:228-244.
- Ogawa T, Nakazato A, Sato M, Hatayama K. 1990. Synthesis of 2-and 3-nitrooxypropanol by chemoselective reduction of methyl 2-and 3-nitrooxypropionate. *Synthesis* **1990**:459-460.
- Oh J, Harper M, Melgar A, Compart DP, Hristov AN. 2019. Effects of *Saccharomyces cerevisiae*-based direct-fed microbial and exogenous enzyme products on enteric methane emission and productivity in lactating dairy cows. *Journal of dairy science* **102**:6065-6075.
- Olijhoek DW, Hellwing ALF, Noel SJ, Lund P, Larsen M, Weisbjerg MR, Børsting CF. 2022. Feeding up to 91% concentrate to Holstein and Jersey dairy cows: Effects on enteric methane emission, rumen fermentation and bacterial community, digestibility, production, and feeding behavior. *Journal of Dairy Science* **105**:9523-9541.
- Patra AK. 2013. The effect of dietary fats on methane emissions, and its other effects on digestibility, rumen fermentation and lactation performance in cattle: A meta-analysis. *Livestock science* **155**:244-254.
- Pereira L. 2021. Macroalgae. *Encyclopedia* **1**:177-188.

- Pfau AP, Shepherd EA, Martin MG, Ascolese S, Mason KM, Egert-McLean AM, Voy BH, Myer PR. 2023. Beta-Adrenergic Agonists, Dietary Protein, and Rumen Bacterial Community Interactions in Beef Cattle: A Review. *Veterinary Sciences* **10**:579.
- Phuong LTB, Preston TR, Van NH, Dung DV. 2019. Effect of additives (brewer's grains and biochar) and cassava variety (sweet versus bitter) on nitrogen retention, thiocyanate excretion and methane production by Bach Thao goats. *Livestock Research for Rural Development* **31**:1.
- Pickering NK, et al. 2015. Animal board invited review: genetic possibilities to reduce enteric methane emissions from ruminants. *animal* **9**:1431-1440.
- Potter EL, VanDuyn RL, Cooley CO. 1984. Monensin toxicity in cattle. *Journal of Animal Science* **58**:1499-1511.
- Rasmussen J, Harrison A. 2011. The benefits of supplementary fat in feed rations for ruminants with particular focus on reducing levels of methane production. *International Scholarly Research Notices* **2011**:613172.
- Reece WO. 2011. *Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat*. Grada publishing, Praha.
- Reisinger A, Clark H, Cowie AL, Emmet-Booth J, Gonzalez Fischer C, Herrero M, Howden M, Leahy S. 2021. How necessary and feasible are reductions of methane emissions from livestock to support stringent temperature goals?. *Philosophical Transactions of the Royal Society A* **379**:20200452.
- Reynolds MB, Drewnoski ME. 2022. Is it time to rethink our one-size-fits-all approach to nitrate toxicity thresholds in forages?. *Translation Animal Science* **8**:6.
- Ribeiro LG, Machado FS, Campos MM, Guimaraes R, Tomich TR, Reis LG, Coombs C. 2015. Enteric methane mitigation strategies in ruminants: A review. *Revista Colombiana De Ciencias Pecuarias* **28**:124–143.
- Ribeiro Pereira LG, Machado FS, Campos MM, Guimaraes Junior R, Tomich TR, Reis LG, Coombs C. 2015. Enteric methane mitigation strategies in ruminants: a review. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* **28**:124-143.
- Saunois M, et al. 2020. The global methane budget 2000–2017. *Earth system science data* **12**:1561-1623.
- Selmi A, Khiari R, Snoussi A, Bouzouita N. 2021. Analysis of minerals and heavy metals using ICP-OES and FTIR techniques in two red seaweeds (*Gymnogongrus griffithsiae* and *Asparagopsis taxiformis*) from Tunisia. *Biological Trace Element Research* **199**:2342-2350.
- Sharifi M, Taghizadeh A, Hosseinkhani A, Palangi V, Macit M, Salem AZ, Elghndour MMY, Abachi S. 2022. Influence of nitrate supplementation on methane emission, milk production, ruminal fermentation, and microbial methanotrophs in dairy cows fed at two forage levels. *Annals of Animal Science*: **22**:1015-1026.

- Siegert M, Cichocka D, Herrmann S, Gründger F, Feisthauer S, Richnow HH, Springael D, Krüger M. 2011. Accelerated methanogenesis from aliphatic and aromatic hydrocarbons under iron-and sulfate-reducing conditions. *FEMS microbiology letters* **315**:6-16.
- Silivong P, Preston TR, Leng RA. 2011. Effect of sulphur and calcium nitrate on methane production by goats fed a basal diet of molasses supplemented with Mimosa (*Mimosa pigra*) foliage. *Livestock Research for Rural Development* **23**:2011.
- Soliva CR, Hindrichsen IK, Meile L, Kreuzer M, Machmüller A. 2003. Effects of mixtures of lauric and myristic acid on rumen methanogens and methanogenesis in vitro. *Letters in Applied Microbiology* **37**:35-39.
- Stefenoni HA et al. 2021. Effects of the macroalga *Asparagopsis taxiformis* and oregano leaves on methane emission, rumen fermentation, and lactational performance of dairy cows. *Journal of dairy science* **104**:4157-4173.
- Stewart CS, Flint HJ, Bryant MP. 1997. The rumen bacteria. Pages 10-72 in Hobson PN, Stewart CS, editors. *The Rumen microbial ecosystem*. 2nd ed. Blackie Academic and Professional, New York.
- Sun K, Liu H, Fan H, Liu T, Zheng C. 2021. Research progress on the application of feed additives in ruminal methane emission reduction: a review. *PeerJ* (e11151) DOI: 10.7717/peerj.11151.
- Sun Z, Zhang K, Chen C, Wu Y, Tang Y, Georgiev MI, Zhang X, Lin M, Zhou M. 2018. Biosynthesis and regulation of cyanogenic glycoside production in forage plants. *Applied Microbiology and Biotechnology* **102**:9-16.
- Tager LR, Krause KM. 2011. Effects of essential oils on rumen fermentation, milk production, and feeding behavior in lactating dairy cows. *Journal of dairy science* **94**:2455-2464.
- Tager LR, Krause KM. 2011. Effects of essential oils on rumen fermentation, milk production, and feeding behavior in lactating dairy cows. *Journal of dairy science* **94**:2455-2464.
- Thauer RK. 1998. Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson: 1998 Marjory Stephenson prize lecture. *Microbiology* **144**:2377-2406.
- Tseten T, Sanjorjo RA, Kwon M, Kim SW. 2022. Strategies to mitigate enteric methane emissions from ruminant animals. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **32**:269.
- Ungerfeld EM, Kohn RA. 2006. The role of thermodynamics in the control of ruminal fermentation. Pages 55-85 in Sejrsen K, Hvelplund T, Nielsen MO, editors. *Ruminant physiology: digestion, metabolism and impact of nutrition on gene expression, immunology and stress*. Wageningen Academic Publishers, Wageningen.
- Ungerfeld EM. 2013. A theoretical comparison between two ruminal electron sinks. *Frontiers in microbiology* **4**:64908.
- Ungerfeld EM. 2020. Metabolic hydrogen flows in rumen fermentation: principles and possibilities of interventions. *Frontiers in Microbiology* **11**:589.

- Unnawong N, Cherdthong A, So S. 2021. Crude saponin extract from *Sesbania grandiflora* (L.) Pers pod meal could modulate ruminal fermentation, and protein utilization, as well as mitigate methane production. *Tropical Animal Health and Production* **53**:1-9.
- Uyeno Y, Shigemori S, Shimosato T. 2015. Effect of probiotics/prebiotics on cattle health and productivity. *Microbes and environments* **30**:126-132.
- Valencia-Salazar SS, Jiménez-Ferrer G, Arango J, Molina-Botero I, Chirinda N, Piñeiro-Vázquez A, Jiménez-Ocampo R, Nahed-Toral J, Kú-Vera, J. 2021. Enteric methane mitigation and fermentation kinetics of forage species from Southern Mexico: in vitro screening. *Agroforestry Systems* **95**:293-305.
- Van Gastelen S, Dijkstra J, Bannink A. 2019. Are dietary strategies to mitigate enteric methane emission equally effective across dairy cattle, beef cattle, and sheep?. *Journal of dairy science* **102**:6109-6130.
- van Gastelen S, Dijkstra J, Bannink A. 2019. Are dietary strategies to mitigate enteric methane emission equally effective across dairy cattle, beef cattle, and sheep?. *Journal of dairy science* **102**:6109-6130.
- Van Gastelen S, Dijkstra J, Heck JM, Kindermann M, Klop A, de Mol R, Walker N, Bannink A. 2022. Methane mitigation potential of 3-nitrooxypropanol in lactating cows is influenced by basal diet composition. *Journal of Dairy Science* **105**:4064-4082.
- Van Wyngaard JDV, Meeske R, Erasmus LJ. 2019. Effect of dietary nitrate on enteric methane emissions, production performance and rumen fermentation of dairy cows grazing ryegrass pasture during spring. *Animal Feed Science and Technology* **252**:64-73.
- Van Zijderveld SM, Gerrits WJJ, Apajalahti JA, Newbold JR, Dijkstra J, Leng RA, Perdok HB. 2010. Nitrate and sulfate: Effective alternative hydrogen sinks for mitigation of ruminal methane production in sheep. *Journal of dairy science* **93**:5856-5866.
- Van Zijderveld SM, Gerrits WJJ, Apajalahti JA, Newbold JR, Dijkstra J, Leng RA, Perdok HB. 2010. Nitrate and sulfate: Effective alternative hydrogen sinks for mitigation of ruminal methane production in sheep. *Journal of dairy science* **93**:5856-5866.
- Veneman JB, Muetzel S, Hart KJ, Faulkner CL, Moorby JM, Perdok HB, Newbold CJ. 2015. Does dietary mitigation of enteric methane production affect rumen function and animal productivity in dairy cows?. *PloS one* (e0140282) DOI: 10.1371/journal.pone.0140282.
- Vongsamphanh P, Inthapanya S, Preston TR, Van Dung D, Ba NX. 2018. Effect of leaves from sweet or bitter cassava and brewers' grains on methane production in an in vitro rumen incubation of cassava root pulp-urea. *Livestock Research for Rural Development* **90**:23.
- Vucko MJ, Magnusson M, Kinley RD, Villart C, de Nys R. 2017. The effects of processing on the in vitro antimethanogenic capacity and concentration of secondary metabolites of *Asparagopsis taxiformis*. *Journal of Applied Phycology* **29**:1577-1586.
- Waghorn G. 2008. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production—Progress and challenges. *Animal Feed Science and Technology* **147**:116-139.

- Wang W, Lund P, Larsen M, Weisbjerg MR. 2023. Effect of nitrate supplementation, dietary protein supply, and genetic yield index on performance, methane emission, and nitrogen efficiency in dairy cows. *Journal of Dairy Science* **106**:5433-5451.
- Wang Y, Janssen PH, Lynch TA, van Brunt B, Pacheco D. 2016. A mechanistic model of hydrogen–methanogen dynamics in the rumen. *Journal of Theoretical Biology* **393**:75-81.
- Wang Z et al. 2023. Medium chain fatty acid supplementation improves animal metabolic and immune status during the transition period: A study on dairy cattle. *Frontiers in Immunology* **14**:1018867.
- Weinberg ZG, Muck RE, Weimer PJ. 2003. The survival of silage inoculant lactic acid bacteria in rumen fluid. *Journal of Applied Microbiology* **94**:1066-1071.
- Wenner BA, Wagner BK, St-Pierre NR, Yu ZT, Firkins JL. 2020. Inhibition of methanogenesis by nitrate, with or without defaunation, in continuous culture. *Journal of dairy science* **103**:7124-7140.
- Wu H, Meng Q, Yu Z. 2015. Effect of pH buffering capacity and sources of dietary sulfur on rumen fermentation, sulfide production, methane production, sulfate reducing bacteria, and total Archaea in in vitro rumen cultures. *Bioresource technology* **186**:25-33.
- Xiao J, Mao F, Yang F, Zhao Y, Zhang C, Yamamoto K. 2011. Interaction of dietary polyphenols with bovine milk proteins: Molecular structure–affinity relationship and influencing bioactivity aspects. *Molecular Nutrition & Food Research* **55**:1637-1645.
- Yang C, Rooke JA, Cabeza I, Wallace RJ. 2016. Nitrate and inhibition of ruminal methanogenesis: microbial ecology, obstacles, and opportunities for lowering methane emissions from ruminant livestock. *Frontiers in microbiology* **7**:172645.
- Yang K, Wei C, Zhao GY, Xu ZW, Lin SX. 2017. Effects of dietary supplementing tannic acid in the ration of beef cattle on rumen fermentation, methane emission, microbial flora and nutrient digestibility. *Journal of animal physiology and animal nutrition* **101**:302-310.
- Yanza YR, Szumacher-Strabel M, Jayanegara A, Kasenta AM, Gao M, Huang H, Patra AK, Warzych E, Cieślak A. 2021. The effects of dietary medium-chain fatty acids on ruminal methanogenesis and fermentation in vitro and in vivo: A meta-analysis. *Journal of animal physiology and animal nutrition* **105**:874-889.
- Zavaleta C, Orellana C, Vera N, Manterola H, Castellaro G, Parraguez VH. 2019. Reducción de metano in vitro con el glucósido cianogénico Linamarina. *Revista MVZ Córdoba* **24**:7291-7296.
- Zhang ZW, Wang YL, Chen YY, Zhang LT, Zhang YJ, Liu YQ, Guo YX, Yang HJ. 2021. The dietary supplemental effect of nitroethanol in comparison with monensin on methane emission, growth performance and carcass characteristics in female lambs. *Animals* **11**:327.
- Zhao L, Meng Q, Li Y, Wu H, Huo Y, Zhang X, Zhou Z. 2018. Nitrate decreases ruminal methane production with slight changes to ruminal methanogen composition of nitrate-adapted steers. *BMC Microbiol* **18**:21.

- Zhao Y, Xie B, Gao J, Zhao G. 2020. Dietary supplementation with sodium sulfate improves rumen fermentation, fiber digestibility, and the plasma metabolome through modulation of rumen bacterial communities in steers. *Applied and environmental microbiology* (e01412-20) DOI: 10.1128/AEM.01412-20.
- Zhou R, Wu J, Lang X, Liu L, Casper DP, Wang C, Zhang L, Wei S. 2020. Effects of oregano essential oil on in vitro ruminal fermentation, methane production, and ruminal microbial community. *Journal of Dairy Science* **103**:2303-2314.
- Zinder SH. 1993. Physiological ecology of methanogens. Pages 128-206 in Ferry JG, editor. *Methanogenesis: ecology, physiology, biochemistry & genetics*. Springer, Boston.
- Zulfa IH, Bachruddin Z, Kumiawati A. 2019. Effects of lemongrass leaves as essential oil sources on rumen microbial ecology and nutrient digestibility in an in vitro system. *Pakistan Journal of Nutrition* **18**:254-259.