

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Mastné kyseliny a jejich potenciál snižovat produkci  
metanu u přežvýkavců**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Bc. Jana Kovářová**

**Obor studia: Výživa zvířat**

**Vedoucí práce: Ing. Miroslav Joch, Ph.D.**

**Konzultant: Ing. Mariana Vadroňová**

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Mastné kyseliny a jejich potenciál snižovat produkci metanu u přežvýkavců" 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 13. 4. 2022

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Miroslavu Jochovi, Ph.D., který byl tak hodný a uvolil se být vedoucím mé práce. Také bych velmi ráda poděkovala Ing. Marianě Vadroňové, která mi vyšla vstříc s úpravou textu a zpracováním výsledků. Práci bych ráda věnovala své babičce MUDr. Evě Šindlerové, která mě ve studiu nejvíce podporovala.

# Mastné kyseliny a jejich potenciál snižovat produkci metanu u přežvýkavců

## Souhrn

Celosvětová produkce skleníkových je velmi probíraným tématem. Metan ( $\text{CH}_4$ ) patří mezi přední skleníkové plyny, přispívající ke globálnímu oteplování. Metan je vedlejší produkt mikrobiální fermentace krmiv u přežvýkavců. Existuje řada teorií, rad a strategií, které si kladou za cíl snížit emise metanu. Jednou z možností je přidání mastných kyselin do krmné dávky. Nasycené mastné kyseliny se střední délkou řetězce modifikují bachorovou fermentaci a ovlivňují tak emise metanu. Tyto kyseliny zprostředkovávají snížení počtu protozoí a inhibují metanogeny. Použití 3 % kyseliny laurové ( $\text{C}_{12}$ ) a myristové ( $\text{C}_{14}$ ) do krmiva snižuje tvorbu  $\text{CH}_4$  *in vivo* až o 50 %.  $\text{C}_{12}$  snižuje koncentraci amoniaku.

Tato práce se věnovala *in vitro* účinkům mastných kyselin v krmivu a jejich vlivu na produkci  $\text{CH}_4$ . Zároveň se u mastných kyselin hodnotil i účinek na zlepšení stravitelnosti. V experimentu byly za pomoci vsádkové *in vitro* fermentace s využitím bachorové tekutiny zkoumány kombinace mastných kyselin s dusičnany. V pokusu bylo použito 3,65 mM dusičnanu samostatně, nebo v kombinaci s jednou ze čtyř MCFA (250 mg/l) na efektivitu bachorové fermentace.

Statisticky významný ( $P < 0,05$ ) vliv na celkovou produkci plynů měly všechny kombinace dusičnanu i MCFA, kromě  $\text{C}_{14}$ . Na celkovou produkci metanu měly významný vliv ( $P < 0,05$ ) všechny použité kombinace dusičnanu i MCFA i samostatné MCFA. Jediný statisticky významný vliv ( $P < 0,05$ ) na zjevný účinek sušiny měla  $\text{C}_{14}$ , ostatní kombinace sušinu neovlivnily. Významný vliv ( $P < 0,05$ ) na koncentraci amoniaku-N a pH měly všechny kombinace. Statisticky významný vliv ( $P < 0,05$ ) na produkci acetátu, butyrátu, valerátu a iso-valerátu měla  $\text{C}_{10}$ . Dusičnany,  $\text{C}_{14}$  a kombinace  $\text{C}_{12}$  a  $\text{C}_{14}$  inhibovaly produkci butyrátu.  $\text{C}_8$  měla významný vliv ( $P < 0,05$ ) na valerát. Statisticky významný vliv měla kombinace  $\text{C}_{10}$  a  $\text{C}_{12}$  na valerát.

Tato práce ukázala, že mastné kyseliny, dusičnany a jejich kombinace dokáží snížit produkci metanu. Mastné kyseliny, ani dusičnany však nemají statisticky významný vliv na čistou produkci TMK.

**Klíčová slova:** metan, mastná kyselina, bachor, přežvýkavec, *in vitro*

# Anti-methanogenic potential of fatty acids in ruminants

## Summary

Global greenhouse production is a much-discussed topic. Methane (CH<sub>4</sub>) is one of the leading greenhouse gases contributing to global warming. Methane is a by-product of microbial fermentation of feed during digestion in ruminants. There are a number of theories, advice and strategies that aim to reduce methane emissions. One option is to add fatty acids to the ration. Medium-chain saturated fatty acids modify rumen fermentation and thus affect methane emissions. These acids mediate a reduction in protozoa numbers and inhibit methanogens. The use of 3% lauric (C12) and myristic (C14) acids in feed reduces CH<sub>4</sub> production in vivo by up to 50%. C12 reduces ammonia concentration.

This work looked at the in vitro effects of fatty acids in feed and their influence on CH<sub>4</sub> production. At the same time, the effect of fatty acids on the improvement of digestibility was also evaluated. In the experiment, combinations of fatty acids with nitrates were investigated using in vitro inoculation fermentation and rumen fluid. The experiment used 3.65 mM nitrate alone or combined with one of the four MCFAs (250 mg/L) on rumen fermentation efficiency.

All combinations of nitrate and MCFA, except C14, had a statistically significant ( $P < 0.05$ ) effect on total gas production. All ingested combinations of nitrate and MCFA, and MCFA alone had a significant ( $P < 0.05$ ) effect on total methane production. C14 had the only statistically significant effect ( $P < 0.05$ ) on the apparent dry matter effect; the other combinations did not affect dry matter. All combinations had a significant effect ( $P < 0.05$ ) on ammonia-N concentration and pH. C10 had a statistically significant effect ( $P < 0.05$ ) on acetate, butyrate, valerate, and iso-valerate production. Nitrate, C14, and the combination of C12 and C14 inhibited butyrate production. C8 had a significant effect ( $P < 0.05$ ) on valerate. The combination of C10 and C12 had a statistically significant effect on valerate.

This work showed that fatty acids, nitrates, and their combinations reduce methane production. However, neither fatty acids nor nitrates had a statistically significant effect on net TMK production.

**Keywords:** methan, fatty acids, ruminant, *in vitro*

# 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 Trávení u přežvýkavců</b> .....	<b>10</b>
3.1.1 Mikroorganismy bacheru.....	10
3.1.1.1 Bakterie.....	11
3.1.1.2 Protozoa .....	12
3.1.1.3 Houby .....	12
3.1.1.4 Archaea .....	13
3.1.1.5 Bakteriofágy .....	14
<b>3.2 Metan</b> .....	<b>14</b>
3.2.1 Produkce metanu v bacheru.....	15
<b>3.3 Mastné kyseliny</b> .....	<b>15</b>
3.3.1 Nasycené mastné kyseliny .....	17
3.3.2 Nenasycené mastné kyseliny .....	20
3.3.3 Antimikrobiální účinky.....	21
<b>3.4 Lipidy</b> .....	<b>21</b>
3.4.1 Metabolismus lipidů .....	21
<b>3.5 Dusičnany</b> .....	<b>22</b>
3.5.1 Metabolismus dusičnanů a dusitanů .....	23
3.5.2 Metabolismus nitrosloučenin.....	24
3.5.3 Faktory ovlivňující metabolismus dusičnanů a nitrosloučenin .....	25
3.5.4 Mikrobiální reakce na dusičnany .....	25
<b>3.6 Snižování produkce metanu</b> .....	<b>26</b>
3.6.1 Použití mastných kyselin .....	28
3.6.2 Použití lipidů.....	30
3.6.3 Použití dusičnanů.....	30
3.6.4 Použití doplňkových látek .....	31
3.6.5 Použití antimikrobiálních činidel.....	31
<b>4 Metodika</b> .....	<b>33</b>
<b>4.1 Design experimentu</b> .....	<b>33</b>
<b>4.2 Zvířata a diety</b> .....	<b>33</b>
<b>4.3 In vitro inkubace</b> .....	<b>34</b>
<b>4.4 Odběr vzorků a chemická analýza</b> .....	<b>34</b>
<b>4.5 Statistická analýza</b> .....	<b>34</b>
<b>5 Výsledky</b> .....	<b>36</b>

5.1	Vliv na produkci metanu .....	36
5.2	Vliv na produkci TMK .....	38
6	Diskuze .....	40
6.1	Mastné kyseliny .....	40
6.2	Dusičnany .....	41
7	Závěr .....	43
8	Literatura .....	44

# 1 Úvod

Metan (CH<sub>4</sub>) je významný skleníkový plyn. Díky jeho vlastnosti ohřívat atmosféru má za důsledek především globální oteplování (Hook et al. 2010). Je až 21 krát účinnější, než oxid uhličitý (CO<sub>2</sub>). Vzniká mimo jiné anaerobním kvašením krmiv v gastrointestinálním traktu přežvýkavců. Je také produkován metanogenními bakteriemi jako jeden z finálních produktů metabolismu sacharidů. Produkce CH<sub>4</sub> přežvýkavci může tvořit přibližně 15 % celosvětových emisí. Bachorovou fermentací a eruktací CH<sub>4</sub> přežvýkavců se ztrácí 2 -15 % hrubé energie (Czerkawski 1966), z toho důvodu není možné jeho výrobní zpracování (Johnson & Johnson 1995). Roste tedy zájem o hledání produktů, které by mohly snížit metanogenezi. Jelikož má veřejnost obavy z použití antibiotik a chemických látek v potravě zvířat, přichází v úvahu alternativy ve formě rostlinných produktů a bioaktivních sloučenin (IPCC 2007). S narůstajícím množstvím živočišné výroby se dbá na použití rostlinných doplňkových látek, které budou šetrné k životnímu prostředí.

Výzkumy se zabývaly snížením produkce CH<sub>4</sub> u přežvýkavců pomocí chemických látek, včetně halogenovaných analogů CH<sub>4</sub>, ionoforů, nebo odstraněním protozií z bachoru (Czerkawski 1966; Johnson & Johnson 1995; McAllister et al. 1996). Antimetanogenní látky mohou být toxické pro bakterie. Změna složení by mohla značit snížení efektivity trávení vlákniny. Snížení trávení vlákniny ale značí sníženou užitkovost, kterou si farmáři nemohou dovolit. Antimetanogenní strategie však nebyly v praxi využity.

Bylo prokázáno, že nasycené mastné kyseliny o střední délce řetězce (medium chain fatty acids; MCFA) potlačují tvorbu CH<sub>4</sub> *in vivo* (Machmüller et al. 2006). Při teplotě 39° jsou kyseliny laurová (C12) a myristová (C14) antimetanogenní v bachorové tekutině (Dohme et al. 2001). Naproti tomu nasycené mastné kyseliny (saturated fatty acids; SFA), například kyselina palmitová (C16) a kyselina stearová (C18), tyto účinky neprokázaly *in vitro* (Dohme et al. 2001; Soliva et al. 2003; Zhang et al. 2014) a *in vivo* (Hristov et al. 2015). Například studie Zeitz et al. z roku 2013, testovala, zda je účinek SFA na metanogenní archea ovlivněn délkou řetězce SFA, nebo kultivační teplotou. Další otázkou bylo, zda nasycené mastné kyseliny působí nezávisle na metabolické cestě používané při tvorbě CH<sub>4</sub>. Četné studie jasně naznačují, že rostoucí koncentrace mastných kyselin v krmivu ve větší míře snižují produkci CH<sub>4</sub>. Často ale mají nepříznivé účinky na stravitelnost a fermentaci krmiv (Patra & Yu 2014). Proto je žádoucí objevit rostlinné doplňkové látky bohaté na mastné kyseliny, které snižují produkci CH<sub>4</sub> a zároveň mají účinky na zlepšení stravitelnosti. Abychom dokázali účinně inhibovat metanogenezi u přežvýkavců za pomoci nasycených mastných kyselin, je potřeba znát faktory, které ovlivňují produkci CH<sub>4</sub> a následně pak i jeho snižování.



## 2 Vědecká hypotéza a cíle práce

### Hypotéza

Antimikrobiální účinky mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem (MCFA) zvýší efektivitu bachorové fermentace. Konkrétně předpokládáme, že vybrané MCFA a jejich kombinace sníží *in vitro* produkci metanu bez negativního vlivu na jiné parametry bachorové fermentace (tzn. bez snížení produkce těkavých mastných kyselin a stravitelnosti substrátu).

### Cíl práce

Cílem práce je nalezení kombinace mastných kyselin s nejvyšším potenciálem snížit produkci metanu bez omezení rozsahu bachorové fermentace.

### 3 Literární rešerše

Přežvýkavci jsou jedni z mála savců, kteří mají velmi dobře uzpůsobený trávicí trakt ke zpracování objemné rostlinné potravy. Trávicí trakt obecně tvoří dutina ústní, hltan, jícen, předžaludky, vlastní žaludek, tenké a tlusté střevo, konečník a řitní otvor. Dutina ústní se skládá z měkkého patra, dásní, tváří a pysků (Marvan et al. 1992).

#### 3.1 Trávení u přežvýkavců

Přežvýkavci dokáží trávit rostlinné strukturální sacharidy navzdory tomu, že si sami nevytvoří hydrolitické enzymy, které jsou pro toto trávení nezbytné (Choudhury et al. 2015). Díky tomu bylo potřeba bohaté společenství anaerobních mikroorganismů, které by plnilo nezbytné metabolické role (Henderson et al. 2015). Nejdůležitější úlohu při trávení krmiva zastává bachor (Jouany & Morgavi 2007). Fermentace krmiv bohatých na strukturální sacharidy v předžaludcích probíhá za různých podmínek, jako je anaerobní prostředí, teplota či obsah sušiny (Choudhury et al. 2015; Hill et al. 2016). Tyto podmínky udržují funkční bachorový mikrobiální systém.

Trávení krmiva v bachoru se dělí na dvě části. Nejprve se enzymaticky rozkládají polymery na monomery (cukry, aminokyseliny, mastné kyseliny a glycerol). Pak se právě tyto monomery fermentují bachorovými mikroorganismy (Hill et al. 2016). Konečnými produkty jsou těkavé mastné kyseliny, kyselina mravenčí, mléčná kyselina, etanol, sukcinát a těkavé mastné kyseliny s rozvětveným řetězcem. Během fermentace jsou uvolňovány plyny (amoniak, oxid uhličitý a vodík). Těkavé mastné kyseliny (TMK) jsou látky, které pokrývají 70 % potřeby energie a uhlíku a jsou zčásti vstřebány přes stěnu bachoru (Janssen 2010). Kyselina octová a máselná mohou být použity v metabolismu zvířete při lipogenezi. Kyselina propionová je prekurzorem glukózy a glykogenu (Van Soest 1994). Aminokyseliny, oligopeptidy a amoniak, které se uvolnily při mikrobiální degradaci proteinů, mohou být využity a přeměněny na mikrobiální protein.

Předžaludek je tvořen z bachoru, čepce a knihy a obsahuje bachorové mikroorganismy zastoupené pěti skupinami. Probíhá zde trávení a fermentace sacharidů, kdy jsou produkovány těkavé mastné kyseliny. Dále jsou syntetizované aminokyseliny z neproteinového dusíku nebo proteinů rozložitelných v bachoru. Také probíhá syntéza vitamínů B-komplexu a vitamínu K.

Trávicí trakt přežvýkavců obsahuje prvoky. Důležitá skupina endosymbiontů jsou metanogenní archibakterie. Archibakterie jsou známy hostitelskou specifitou, která je dána vertikálním přenosem (Van Hoek et al. 2000).

Prostředí bachoru není vlídné pro mikrobiální organismy a fermentace tak přestává. To je zajišťováno metanogeny (McAllister & Newbold 2008). Metanogenní bakterie přispívají k eliminaci redukčních ekvivalentů. Ty byly stvořeny při fermentaci, která probíhá díky anareobním organismům (Šurín et al. 2006).

##### 3.1.1 Mikroorganismy bachoru

V prostředí bachoru se vyskytuje rozsáhlý ekosystém mikroorganismů. Uvádí se až miliarda mikroorganismů na jeden mililitr. Mikroorganismy, přítomné v bachoru se sestávají

z bakterií (40 – 50 %), prvoků (40 – 50 %), hub (5 – 10 %) a prokaryot (1 – 2 %) (Asanuma et al. 2015).

Mikrobiální ekosystém reaguje na složky přijímané potravou. Proto je potřeba provádět postupné navykání na krmnou dávku, aby bylo dost času na adaptaci. Důvod delší adaptace je způsoben specializovaným rozkladem konkrétní složky potravy, eventuálně přizpůsobením se živinám (Zhang et al. 2014). Jestliže zkrátíme dobu potřebnou pro adaptaci, dojde k destabilizaci mikrobiální populace. Pokud z krmiva bohatého na celulózu přecházíme na krmivo s vyšším obsahem škrobu, dojde ke zvýšení počtu bakterií. Ty začnou produkovat kyselinu mléčnou a dojde k výkyvu pH bacheru ba dokonce i k acidóze (Rustan & Drevon 2005).

Podle toho, kde se mikroorganismy nachází, je dělíme na přichycené na potravě, přichycené na epiteliální stěně bacheru a na volně se pohybující mikroorganismy. Podíl volných částic je závislý na složení krmné dávky a na rychlosti degradace v bacheru (Dijkstra et al. 2005; Valente et al. 2016). Do stavu volně se pohybujících mikroorganismů se časem dostanou všechny mikroorganismy.

Mikroorganismy v průběhu fermentace produkují odpadní látky, jako je metan (CH<sub>4</sub>), oxid uhličitý (CO<sub>2</sub>), kyselina máselná, kyselina octová a kyselina propionová. Mikroorganismy v bacheru se dělí dvakrát až čtyřikrát denně (Busquet et al. 2006).

Fermentační dráhy související s využitím sacharidů v bacheru byly intenzivně zkoumány. Zatímco bacherová fermentace je obecně prováděna bacherovým mikrobiálním ekosystémem, jednotlivé bacherové mikroorganismy rozkládají specifické substráty pro svůj růst. Bacherové mikroorganismy nakonec uvolňují do bacheru konečné produkty svého metabolismu neboli produkty fermentace, z nichž jsou některé využívány jinými mikroorganismy. Například *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* a *Ruminococcus flavefaciens* mohou rozkládat celulózu a proto se označují jako celulolytické bakterie. *F. succinogenes* a *R. flavefaciens* produkují acetát a sukcinát jako hlavní produkty fermentace. *R. albus* produkuje pouze acetát (Mitsumori 2008). Sukcinát produkovaný *Prevotella ruminicola*, *Ruminobacter amylophilus*, *F. succinogenes*, *R. flavefaciens*, *Succinivibrio dextrinosolvens*, *Succinomonas amylolytica* a další bakterie, je kontinuálně přeměňován na propionát o CO<sub>2</sub> pomocí *Selenomonas ruminantium*, u které je sukcinát cestou generující propionát. *Veillonella alcalescella* a *Succiniclasticum ruminis* a další, které dekarboxylují sukcinát na produkt propionát. Proto je bacherová fermentace správně vyjádřena jako celkový metabolismus jednotlivých mikroorganismů obývajících bacher.

### 3.1.1.1 Bakterie

Bakterie jsou přizpůsobené k životu v teplotě 39 – 40 °C, bez přístupu kyslíku a průměrném pH od 5,5 do 7 (Allison & Reedy 1984). Podle Jelínka et al. (2003) jsou některé bakterie fakultativně anaerobní. Tím pádem jsou schopné zpracovat určité množství kyslíku.

Bakterie se z 80 % podílí na bacherovém metabolismu. Koncentrace bakterií je v rozpětí od 10<sup>7</sup> – 10<sup>12</sup> na 1 ml bacherové tekutiny (Reece 2011). Množství bakterií závisí na složení krmné dávky. Při zkrmování krmiv s vyšším obsahem snadno rozložitelných polysacharidů je počet vyšší. Z toho plyne, že při změně krmiv dochází i ke změně zastoupení bakteriální

populace (Gutierrez-Bañuelos et al. 2008). Podle (Görtz 2001) si bakterie zvykají na změnu krmné dávky 7 až 14 dní. Jedinci, krmeni převážně senem, mají v bachorové tekutině vyšší obsah gram-negativních bakterií. Pokud jsou zvířata krmena převážně obilnou potravou, je v bachorové tekutině více gram-positivních bakterií (Gutierrez-Bañuelos et al. 2008).

Bachorová mikroflóra obsahuje kolem 60 druhů bakterií, které můžeme dělit podle preferovaného substrátu a vzniklého metabolitu (Görtz 2001). Mezi nejvýznamnější bakterie patří celulolytické, hemicelulolytické, amylolytické, metanogenní, proteolytické a urealytické (Busquet et al. 2006). Některé bakterie rozloží preferovaný substrát částečně, jiné ho rozloží do konečných produktů.

Dalším způsobem dělení bakterií může být způsob výskytu v bachorové tekutině. Jak již bylo zmíněno, existují bakterie volně se vyskytující v bachorové tekutině. Ty tvoří 12 – 25 % z celkového počtu. Bakterie přichycené na povrchu tvoří 75 – 78 %. K přichycení na povrch využívají glykokalixy. Jsou to polysacharidová vlákna, mající negativní náboj. Kromě přichycení umožňují tvorbu polárních vazeb. Tato vlákna chrání, shromažďují a směřují uvolněné enzymy (Zhang et al. 2014).

### 3.1.1.2 Protozoa

Prvoci neboli protozoa jsou velice rozšířenou skupinou, která se z 20 % podílí na bachorovém metabolismu (Reece 2011). Mezi nejčastější produkty protozoálního metabolismu patří TMK, laktát, CO<sub>2</sub>, vodík (H<sub>2</sub>) a malé množství CH<sub>4</sub>. Protozoa mají pozitivní vliv na udržování pH v bachoru. Pohlcují totiž škrobová zrna, čímž znemožňují rozklad vlivem bakteriálního štěpení. Protozoa jsou schopna odbourat některé polysacharidy. Někteří zástupci odbourávají i lipidy a některé druhy jsou dokonce schopny degradovat i celulózu (Ivan et al. 2014).

Prvoci se rozdělují na základě rozmístění bičků na povrchu těla do dvou skupin. *Holotrichia* mají bičíky po celém těle. *Entodiniomorpha* mají bičíky na jednom místě ve svazečcích (Patra & Yu 2014). Bičík je tvořen z mikrotubulů. Kromě bičíku mohou mít protozoa i jiné pohybové orgány (brvy, membrány, panožky) (Belanche et al. 2014).

Prvoci jsou oproti bakteriím náročnější na potřebu živin a vitamínů. Podle toho se při hladovění zvířete snižuje jejich výskyt. Prvoci mají mechanismy příjmu živin rozdělené podle charakteru přijímaných částic. Malé částice jsou přijímány osmózou, kde je příjem realizován prostupem přes membránu. Tekuté částice jsou přijímány za pomoci pinocytózy. Velké částice jsou přijímány fagocytózou, kde dochází k obklopení panožkami (Stillwell 2014).

Hydrogenosomy jsou striktně anaerobní mikroorganismy s fermentativním metabolismem. Jsou to podlouhlé či kulaté orgány, se selektivně propustnou dvojitou membránou. Neobsahují krystaly a enzymy citrátového cyklu. Vytváří energii oxidací pyruvátu. Tím produkují odpadní produkty H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> a CH<sub>4</sub> (Martin et al. 2010). H<sub>2</sub> je substrátem pro metanogenní Archea k redukci oxidu uhličitého na CH<sub>4</sub>.

### 3.1.1.3 Houby

Druhou hlavní kategorií eukaryotických mikroorganismů v bachoru jsou anaerobní houby. Vyskytuje se zde snad 20 různých druhů (Yang et al. 2016). Anaerobní houby tvoří 0 – 8 % bachorové mikrobiální biomasy. Buněčná stěna hub je charakteristická přítomností chitinu.

Bachorové houby se řadí k nižším houbám. Pro ně je charakteristická morfoloická různorodost. Méně kvalitní a strukturální výživa neumožní dokončení generačního cyklu hub. Houby se v bachoru rozmnožují nepohlavně za pomoci uvolňovaných spor (Valente et al. 2016). Jsou-li zvířata krmena potravou bohatou na vlákninu, trvá vývojový cyklus zoospor asi 24 hodin.

Houby mají pozitivní vliv na degradaci vláknitých krmiv. Zástupci hub kolonizují rostlinné tkáně tím, že výběžky pronikají do rostlinných pletiv. Do pletiv vypouštějí celulázy, které jsou v přírodě nejúčinnější. Jedinečnou vlastností hub je schopnost kolonizovat i zdřevnatělé části rostlinných pletiv (Valente et al. 2016). Jejich hlavní funkcí je rozklad rostlinné vlákniny. Jsou to jediné celulólytické druhy, které fyzikálně i enzymaticky rozkládají vlákninu (Yang et al. 2016). Houby, stejně jako prvoci mají hydrogenosomy a jsou významnými producenty vodíku.

#### 3.1.1.4 Archaea

Archaea se na Zemi objevily asi před 3,5 miliardami lety (Ueno et al. 2006). Z bachoru byly kultivací izolovány *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanomicrobium mobile*, *Methanosarcina mazei*, *Methanosarcina barkeri* a *Methanobacterium formicicum* (Mitsumori et al. 2002). Metanogenní archea jsou jediné organismy, které produkují CH<sub>4</sub>. Archea patří mezi prokaryota. Dříve sice byla řazena mezi bakterie, ale protože mají mnoho unikátních vlastností, vytvořila se jim samostatná doména (Woese et al. 1990; Caetano-Anollés & Kim 2014). Bylo popsáno celkem 120 druhů řazených do 33 rodů (Cersosimo a Wright 2015). V bachoru se počet metanogenů pohybuje mezi 10<sup>7</sup> - 10<sup>9</sup> na gram bachorového obsahu, pokud jsou zvířata krmena koncentrovanými krmivy. Pokud jsou zvířata krmena pouze pastvou, pak je počet metanogenů v bachoru 10<sup>9</sup> - 10<sup>10</sup> (Attwood et al. 2011). Pro snazší přístup k metabolickému H<sub>2</sub> vytváří metanogeny symbiotický vztah mezi protozoi. Protoza produkují značné množství H<sub>2</sub> v hydrogenozomech (Finlay et al. 1994; Embley et al. 2003). Dá se předpokládat, že 9 - 25 % metanogenů je spojeno s protozoi. Až 37 % CH<sub>4</sub> z bachoru je tvořeno symbiózou metanogenů s protozoy (Belanche et al. 2014).

Unikátní způsob produkce CH<sub>4</sub> zahrnuje tři koenzymy. Koenzym F420 (spoluúčast na přenosu elektronů), koenzym M (spoluúčast na přenosu metylové skupiny) a koenzym B (spoluúčast na konečné produkci CH<sub>4</sub>) (Kumar et al. 2016). Množství CH<sub>4</sub> pocházejícího z bachoru je ovlivněno typem diety, přítomností a zastoupením bakterií, protozoi a metanogenů. Metanogenní archea se mohou vyskytovat v bachorové tekutině, na částech krmiva, na bachorovém epitelu či na protozoích (Patra & Yu 2014). Počet metanogenů je závislý na obsahu vlákniny v krmné dávce. Vliv na produkci CH<sub>4</sub> mají také protozoa řádu Entodiniomorpha (*Entodinium longinucleatum*, *Eudiplodinium maggii*, *Entodinium bursa*) (Patra & Yu 2014).

Odhaduje se, že produkce mravenčanu tvoří přibližně 15 - 20 % celkové produkce CH<sub>4</sub> v bachoru (Asanuma et al. 2002). Prekurzory pro produkci CH<sub>4</sub> jsou přeměňovány na CH<sub>4</sub> metanogeny (Archea). Biochemické studie kultivovaných metanogenů ukázaly, že *M. ruminantium* a *M. mobile* využívají H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> a mravenčan k produkci CH<sub>4</sub>. Naproti tomu *M. mazei* syntetizuje CH<sub>4</sub> z acetátu, methanolu a methylaminů. *M. barkeri* využívá k syntéze metanu H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, acetát, methanol a methylaminy (Anderson et al. 2010). Navíc vzhledem k tomu, že metanogeny obsahují fluorescenční sloučeninu F420 (koenzym 420), bylo přímé

pozorování fluorescenční mikroskopie možné, což odhaluje interakci mezi bachorovými nálevníky a metanogeny, které se přichycují k povrchu buněk nálevníků a přijímají z nich H<sub>2</sub> (Ricard et al. 2006). Pro detekci metanogenů z bachoru bez kultivace byly vyvinuty techniky založené na polymerázové řetězové reakci (PCR). V bachoru byla zjištěna široká škála nekultivovaných metanogenů. Nicméně biochemické vlastnosti těchto metanogenů v bachoru nebyly dosud známy.

### 3.1.1.5 Bakteriofágy

Bakteriofágy neboli fágy, jsou viry, které napadají bakteriální buňky. Jsou menší než bakterie. Jejich počet je asi 10x větší, než bakterií. Z 20 – 50 % způsobují smrt bakterií, zvyšují množství organických látek v prostředí. Bakteriofágy ovlivňují populaci bachoru (Pickering et al. 2015).

## 3.2 Metan

Celosvětově je produkce skleníkových plynů hodně probíraným tématem vzhledem k jejich vlivu na globální oteplování a jiné klimatické změny. Emise skleníkových plynů také způsobují negativní ekologické a socioekonomické vlivy (IPCC 2007). Mezi přední skleníkové plyny patří CO<sub>2</sub>, oxid dusný (N<sub>2</sub>O) a CH<sub>4</sub>. Všechny tyto plyny přispívají ke globálnímu oteplování absorbcí infračerveného záření (Hook et al. 2010). Právě CH<sub>4</sub> je druhým nejvýznamnějším skleníkovým plynem. Zůstává v atmosféře velmi dlouhou dobu (9-15 let) a zachycuje teplo v atmosféře až 21krát účinněji než CO<sub>2</sub> (FAO 2006).

Metan (CH<sub>4</sub>) je vedlejší produkt mikrobiální fermentace krmiv v bachoru, v menším množství je také tvořen v dalších úsecích trávicí soustavy (Murray et al. 1976). Z celkové produkce CH<sub>4</sub> přežvýkavců je v bachoru tvořeno asi 89 % (Hook et al. 2010). Podle McAllistera et al. (1996) vyprodukuje skot denně 150 - 420 litrů CH<sub>4</sub>. Ovce pak produkuje 25-55 litrů. Produkce CH<sub>4</sub> skotu znamená ztrátu 2-15 % přijaté energie v závislosti na typu krmiva, úrovni příjmu a složení krmiva (Johnson & Johnson 1995).

Podíl bachorových emisí CH<sub>4</sub> u přežvýkavců byl odhadnut na 17 % celosvětových emisí skleníkových plynů. Na živočišnou výrobu pak připadá přibližně 47 % celosvětové produkce skleníkových plynů (FAO 2008). CH<sub>4</sub> se stává konečným produktem redukce organických sloučenin.

V posledních 50 letech klesá produkce CH<sub>4</sub> z rozvojových zemích (Pickering et al. 2015). Snižování emisí je dosaženo zvyšováním produktivity. Ta je dána geneticky, výměnou mléčného skotu za masný a změnou krmné dávky (Van Hoek et al. 2006). Dříve se používala převážně píce. Pro zlepšení stravitelnosti píce v bachoru se ukázaly jako účinné různé úpravy fyzikálním zpracováním, například mletí a peletování, a chemické zpracování látkami, jako je amoniak a hydroxid sodný (Finlay et al. 1994). Dnes je dávka založená na vyšším zastoupení jadrných krmiv (Capper et al. 2009). Obilná zrna, obsahující více zásobních sacharidů než pícniny, jsou snadno stravitelná bachorovými mikroorganismy (Mitsumori et al. 2002). Avšak moderní zemědělské postupy nejsou tak šetrné k životnímu prostředí jako dřívější postupy (Capper et al. 2011). Například v Irsku a na Novém Zélandu tvoří pastevní zemědělství

významnou část ekonomiky. Tyto země mají větší předpoklad ke snižování produkce CH<sub>4</sub> (Pickering et al. 2015).

### 3.2.1 Produkce metanu v bachoru

Pro odstranění H<sub>2</sub> v bachoru je využito redukce CO<sub>2</sub>. Snížení parciálního tlaku H<sub>2</sub> je podstatné pro udržení kontinuální fermentace. Nejčastější metabolickou tvorbou CH<sub>4</sub> v bachoru je hydrogenotrofní reakce. Další reakce jsou metylootrofní a acetotrofní. Ty mají v bachoru menší význam (Liu a Whitman 2008; Hill et al. 2016).

Snížit produkci CH<sub>4</sub> by mělo nejen ekologické výhody, ale i ekonomické. Energie, kterou skot potřebuje k přeměně na CH<sub>4</sub>, by mohla být využita při tvorbě masa a mléka (FAO 2008).

### 3.3 Mastné kyseliny

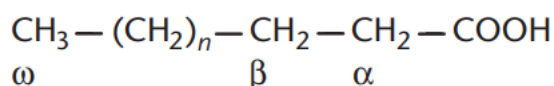
Mastné kyseliny jsou stavební jednotky mnoha lipidů v rostlinách, zvířatech i mikroorganismech (Rogers 2020). Jsou biologicky aktivní, ovlivňují metabolismus buněk a tkání a zajišťují funkci a odpověď na hormonální signály. Mají také vliv na transkripční faktor (Calder 2015). To je protein, který určuje míru transkripce genetické informace z DNA do mRNA (Huber et al. 2017). Vysoký podíl mastných kyselin obsahuje loj, sádlo, maso a mléčné výrobky. Dále kokosový, bavlníkový a palmový olej (Sobley a Cymet 2016). Živočišný tuk obsahuje větší množství mastných kyselin než rostlinné oleje (Okrouhlá et al. 2018). Mastné kyseliny jsou estery glycerolu se třemi karboxylovými kyselinami s dlouhým uhlíkatým řetězcem (McMurry 2004). K esterifikaci alkoholu dochází v membránách tuků a lipidů. Zbylé mastné kyseliny zůstanou neesterifikované a jsou pak volné. Volné mastné kyseliny se nacházejí například v krvi a většinou se váží na bílkoviny (Koolman a Röhm 2012).

Mastné kyseliny jsou špatně rozpustné ve vodě v kyselé formě, naopak jsou relativně hydrofilní ve formě draselných nebo sodíkových solí. Skutečnou rozpustnost ve vodě, zejména kyselin s delším řetězcem, je obtížné určit, neboť je výrazně ovlivněna pH a také proto, že mastné kyseliny mají tendenci se přidružovat a to vede ke tvorbě monovrstev nebo micel (Rustan & Drevon 2005).







Mastné kyseliny se snadno extrahují nepolárními rozpouštědly z roztoků nebo suspenzí snížením pH na nenabitou karboxylovou skupinu. Vliv struktury mastné kyseliny na její bod tání je takový, že rozvětvené řetězce a dvojně vazby cis sniží bod tání ve srovnání s ekvivalentními nasycenými řetězci. Kromě toho bod tání mastné kyseliny závisí na tom, zda je řetězec rovnoměrný nebo lichý. Ten má totiž vyšší bod tání. Nasycené mastné kyseliny jsou velmi stabilní, zatímco nenasyčené kyseliny jsou náchylné k oxidaci. Čím více dvojných vazeb, tím je větší citlivost. S nenasyčenými mastnými kyselinami by se tak mělo manipulovat v atmosféře inertního plynu a držet se dál od oxidantů a sloučenin způsobujících tvorbu volných radikálů (Rustan & Drevon 2005).

Mastná kyselina se skládá z řetězce se sudým počtem uhlíků, s atomy H<sub>2</sub> po celé délce řetězce, s atomem H<sub>2</sub> na jednom konci řetězce a s karboxylovou skupinou (-COOH) na opačném konci řetězce (Obrázek č. 1) (Rustan & Drevon 2005). Atom uhlíku vedle karboxylové skupiny se nazývá  $\alpha$  uhlík a následující je  $\beta$  uhlík. Písmeno n se často používá místo řeckého  $\omega$  k označení polohy dvojně vazby nejbližší k metylovému konci. Systematická nomenklatura pro

mastné kyseliny může udávat polohu dvojných vazeb s ohledem na karboxylovou skupinu ( $\Delta$ ) (Obrázek č. 2). Mastné kyseliny mohou být karboxylové kyseliny, které mají minimálně 3 uhlíkové atomy. U živočichů a vyšších rostlin se vyskytují mastné kyseliny s dlouhým řetězcem. To je 16 - 18 uhlíků (Koolman a Röhm 2012). Mastné kyseliny se rozdělují na základě délky řetězce a stupně nasycení. Délka řetězce může být od 2 do 40 atomů uhlíku. Přírodně se vyskytující mastné kyseliny jsou karboxylové s nerozvětveným uhlovodíkovým řetězcem. Takový řetězec má od 3 do 24 uhlíků. Jelikož se při jejich biosyntéze využívají dvouuhlíkaté stavební prvky, mají většinou sudý počet atomů.



Obrázek č. 1 Mastná kyselina (Rustan & Drevon 2005)

$\omega$ -characteristics	Methyl end	Carboxyl end	Saturation	$\Delta$ -characteristics
Stearic 18:0		COOH	Saturate	18:0
Oleic 18:1, $\omega$ -9		COOH	Monoene	18:1 $\Delta$ 9
Linoleic 18:2, $\omega$ -6		COOH	Polyene	18:2 $\Delta$ 9,12
$\alpha$ -Linolenic 18:3, $\omega$ -3		COOH	Polyene	18:3 $\Delta$ 9,12,15
EPA 20:5, $\omega$ -3		COOH	Polyene	20:5 $\Delta$ 5,8,11,14,17
DHA 22:6, $\omega$ -3		COOH	Polyene	22:6 $\Delta$ 4,7,10,13,16,19

Obrázek č. 2 Struktura různých MK (Rustan & Drevon 2005)

Mastné kyseliny představují 30 – 35 % celkového počtu energetického příjmu v mnoha průmyslových zemích. Nejdůležitějšími zdroji mastných kyselin jsou rostlinné oleje, mléčné výrobky, masné výrobky, ryby nebo rybí oleje. Nejčastější nasycenou mastnou kyselinou rostlin, zvířat a živočichů je kyselina palmitová (16:0). Kyselina stearová (18:0) je hlavní mastnou kyselinou u zvířat a některých hub. Kyselina myristová (14:0) se vyskytuje velmi často (Moss et al. 1995). Nasycené kyseliny s kratším řetězcem s 8 – 10 atomy uhlíku se nacházejí v mléce a v kokosových triacylglycerolech. Kyselina olejová (18:1 omega-9) je nejčastější monoenovou mastnou kyselinou u rostlin a živočichů. Vyskytuje se také v mikroorganismech. Kyselina palmitová (16:1 omega-7) se také hojně vyskytuje u zvířat, rostlin a mikroorganismů a je hlavní složkou v některých semenných olejích. Kyselina linolová (18:2 omega-6) je hlavní mastnou kyselinou v rostlinných lipidech. U zvířat se získává především z dietních rostlinných olejů. Kyselina arachidonová (20:4 omega-6) je hlavní složkou membránových fosfolipidů v celé živočišné říši. V krmivu se však vyskytuje jen velmi málo, kyselina linolenová (18:3 omega-3) se vyskytuje ve vyšších rostlinách (sójový olej a řepkové oleje) a řasách (Moss et al. 1995). Kyselina eikosapentaenová (EPA; 20:5 omega-3) a kyseliny dokosaheptaenová (DHA; 22:6 omega-3) jsou hlavní mastné kyseliny z mořských řas, tučných ryb a rybího oleje (Rustan & Drevon 2005).



V roce 2004 McMurry identifikoval více než 100 různých mastných kyselin. Těch velmi rozšířených je 40. Některé obsahují jednu či více izolovaných dvojných vazeb. Podle toho je pak dělíme na nasycené a nenasycené. Mastné kyseliny bez dvojných vazeb jsou nasycené (SFA). Ostatní mastné kyseliny s dvojnými vazbami, či trojnými jsou nenasycené. Nenasycené mastné kyseliny s jednou dvojnou vazbou jsou MUFA. Pokud má nenasycená mastná kyselina v řetězci více dvojných vazeb, pak je PUFA. Nenasycené mastné kyseliny jsou reaktivnější (Rogers 2020). Komplex nenasycených mastných kyselin se nazývá vitamín F (Koolman a Röhms 2012). Tyto kyseliny si organismus nedokáže sám syntetizovat. Proto musí být přidávány do krmné dávky. Mají také úlohu metabolických substrátů a hrají zásadní roli coby imunomodulátory (Liu 2015). Mastné kyseliny se v přírodě běžně vyskytují v kombinaci s glycerolem ve formě triacylglycerolů (Rogers 2020). Jelikož se různé mastné kyseliny chovají v metabolismu různě, můžeme je také dělit podle délky řetězce (Tabulka č. 1) (Koolman a Röhms 2012):

Tabulka č. 1 Skupiny mastných kyselin

Název	Popis	Délka řetězce
<b>SCFA</b>	S krátkým řetězcem	C3 – C6
<b>MCFA</b>	Se středně dlouhým řetězcem	C8 – C10
<b>LCFA</b>	S dlouhým řetězcem	C12 – C18
<b>VLCFA</b>	S velmi dlouhým řetězcem	> C18

Rozdíly mezi středním a dlouhým řetězcem ovlivňuje velikost molekul a rozpustnost ve vodě. To může vést k rozdílu při trávení, vstřebávání a transportu ve tkáních a orgánech. Tyto dva typy mastných kyselin procházejí organismem rozdílnými metabolickými cestami (Baltič et al. 2017). Kromě rozdělování mastných kyselin na základě délky jejich řetězce, je můžeme dělit i podle chemické klasifikace (Tabulka č. 2).

Tabulka č. 2 Dělení podle chemické klasifikace

Název	Popis
<b>SFA</b>	Nasycené mastné kyseliny
<b>MUFA</b>	Mononenasycené mastné kyseliny
<b>PUFA</b>	Polynenasycené mastné kyseliny

### 3.3.1 Nasycené mastné kyseliny

Má-li mastná kyselina řetězec s méně, než šesti atomy uhlíku, tedy s krátkým řetězcem, pak se jedná o nasycenou mastnou kyselinu. Ta neobsahuje v řetězci žádnou dvojnou vazbu. Řetězce mohou zahrnovat acetát, propionát a butyrát. Řetězce mají stabilní molekulu. Díky tomu se těžko rozkládá a poskytuje tak více energie, než sacharidy či bílkoviny. Je pravděpodobné, že se bude v těle držet v podobě cholesterolu (Sobley & Cymet 2016; Liu 2015).

Mastné kyseliny se střední délkou řetězce regulují metabolismus enterocytů a hepatocytů. Dalé také stimulují lipogenezi a glukoneogenezi, na druhou stranu inhibují glykolýzu. Zasahují také do katabolismu a anabolismu buněk (Papamandjaris et al. 1998), čímž do jisté míry ovlivňují zdraví lidí a zvířat (Calder 2015).

Nasyčené mastné kyseliny se „plní“ H<sub>2</sub>. Většinu nasyčených mastných kyselin tvoří rovné uhlovodíkové řetězce se sudým počtem atomů uhlíku. Nejběžnější mastné kyseliny obsahují 12 – 22 atomů uhlíku (Rustan & Drevon 2005).

**Kyselina kaprylová (C<sub>8</sub>)** je bezbarvá olejová kapalina s mírným zápachem. Coby přírodní zdroj se vyskytuje pouze ve specifických rostlinných olejích a mléčných výrobcích. Je vysoce obsažena v kokosovém oleji (6 – 10 %) a v palmojádrovém oleji (2 – 5 %). Mléko je jediným živočišným zdrojem kyseliny kaprylové. Kravské mléko obsahuje tuto kyselinu až z 1 – 2 %. Kozí mléko ze 3 % a králičí mléko z 15 – 18 % (Lemarié et al. 2018; Jackman et al. 2020).

Ajisaka et al. (2002) zkoumali účinky mastných kyselin v kombinaci s cyklodextrinem na produkci metanu. Výsledkem bylo 20 % snížení produkce metanu.

**Kyselina kaprinová (C<sub>10</sub>)** se projevuje mírným zápachem (Beare-Rogers et al. 2007). Nejvyšší obsah kyseliny kaprinové se nachází v kokosovém oleji (5 – 10 %) a v palmojádrovém oleji (3 – 5 %) (Lemarié et al. 2016).

Ajisaka et al. (2002) zkoumali účinky mastných kyselin v kombinaci s cyklodextrinem na produkci metanu. Výsledkem bylo 60 % snížení produkce metanu. Lemarié et al. (2016) odhalil působení kyseliny kaprilové jak na inhibici metanu, tak na inhibici biohydrogenace.

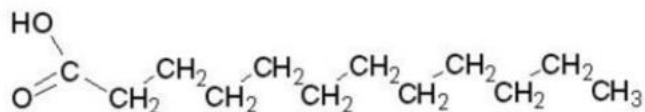
**Kyselina laurová (C<sub>12</sub>)** vzhledem připomíná bílý prášek. Zápachem mírně připomíná bobkový olej. Je to relativně levná mastná kyselina (National Center for Biotechnology Information 2021). Vysoké množství kyseliny laurové (Obrázek č. 3) vykazuje palmový olej (44 – 51 %) (Lemarié et al. 2016) a kokosový olej (39 – 54 %). Dále se nachází v oleji z jader datlí (Besbes et al. 2004).

Lidské mléko obsahuje 6,2 % kyseliny laurové z celkového tuku. Je to hlavní antibakteriální a antivirová složka mateřského mléka (Lieberman et al. 2006). Kravské mléko obsahuje 2,9 % kyseliny laurové. Kozí mléko obsahuje 3,1 % laurové kyseliny (Beare-Rogers et al. 2007).

Kyselina laurová (Obrázek č. 3) je inhibiční pro gram-pozitivní bacherové bakterie včetně celulolytických ruminokoků (Kobayashi 2010). Snížená produkce laktátu *Streptococcus bovis* v přítomnosti kyseliny laurové může vysvětlovat preventivní léčebné účinky kyseliny laurové na bacherovou laktátovou acidózu. Tyto údaje naznačují, že kyselina laurová nemusí měnit velikost specifické bakteriální populace, ale může modulovat metabolickou aktivitu při jejím dlouhodobém podávání. Množství jiných druhů bacherových bakterií se totiž po zkrmování kyseliny laurové nezměnilo (Kobayashi 2010). Laurová kyselina se může použít k léčbě Acne vulgaris, jako náhražka antibiotik. Kyselina působí antimikrobiálně na *Propionibacterium acnes*, které rozvíjí záněty v kůži (Nakatsuji et al. 2009).

Ajisaka et al. (2002) zkoumali účinky mastných kyselin v kombinaci s cyklodextrinem na produkci metanu. Výsledkem bylo 20 % snížení produkce metanu. Machmüller et al. (2006) kombinovali kyselinu laurovou s vápníkem. Výsledkem byla produkce metanu pouze ze 76 % oproti počátku. Patra & Yu (2014) zkoumali použití kyseliny laurové v dietách na produkci

metanu. Závěrem studie bylo, že tuky s vysokou koncentrací kyseliny laurové by měly být brány v potaz při zmírňování produkce CH<sub>4</sub>.



Obrázek č. 3 Kyselina laurová (Besbes et al. 2004)

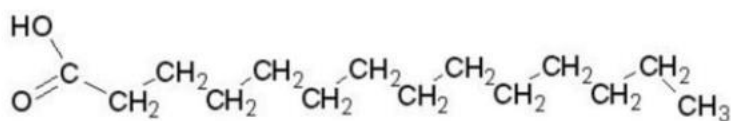
**Kyselina myristová** (C<sub>14</sub>) je bílá krystalická látka. Je to 14-ti uhlíková nasycená kyselina. Je součástí lidských buněčných membrán, ale v menších koncentracích, než kyselina palmitová a stearová (Stillwell 2016). Na základě počtu uhlíků jí řadíme mezi kyseliny s dlouhým řetězcem. Pojmenování získala podle latinského *Myristica fragrans* (muškátový oříšek), ze kterého byla izolována. Kromě muškátového oříšku se v přírodě vyskytuje v palmojadrovém a kokosovém oleji, v mléčném tuku a tím pádem i v másle (Beare-Rogers et al. 2007). Kravské mléko obsahuje 8 – 14 % kyseliny.

Antibakteriální účinky kyseliny myristové (Obrázek č. 4) vůči bakterii *Listeria monocytogenes* zkoumali Chen et al. (2019). Tato bakterie způsobuje infekci trávicího ústrojí. Kyselina myristová má na bakterii inhibiční účinek a způsobuje smrt buněk. Přítomnost kyseliny myristové vede ke změně permeability a integrity buněčné stěny bakterií. Kyselina myristová se dokáže navázat na buněčnou DNA a změnit její strukturu. Tímto způsobem také dokáže ničit buňky. Na základě těchto poznatků se dá využít antibakteriálních účinků kyseliny myristové v potravinářském průmyslu na konzervaci potravin (Chen et al. 2019).

Machmüller et al. (2006) kombinovali kyselinu myristovou s vápníkem. Výsledkem bylo snížení produkce metanu o 47 %. Vliv kyseliny myristové zkoumali také Machmüller et al. (2006). Výsledkem studie bylo snížení energetických ztrát CH<sub>4</sub> o více než 50 %.

Dijkstra et al. (2005) zkoumali přidavek doplňkových látek (kyseliny laurová a myristová) na produkci CH<sub>4</sub> v bachoru a bachorovou fermentaci. Zařazení doplňkových látek snížilo denní produkci CH<sub>4</sub> o 10 %.

Suplementací kyselinou myristovou se dosáhlo snížení produkce CH<sub>4</sub> u dojníc.



Obrázek č. 4 Kyselina myristová (Beare-Rogers et al. 2007)

Kyseliny kaprylová, kaprinová a laurová jsou považovány za užitečné antibiotické náhražky. Vykazují totiž silnou antibakteriální aktivitu vůči gram-pozitivním bakteriím (Hanczakowska et al. 2016). Navíc také prokazují antikokcidiální vlastnosti (Baltič et al. 2017).

Nejrozšířenějšími mastnými kyselinami jsou kyselina palmitová a stearová. Obě se vyskytují v lipidech většiny organismů. U zvířat tvoří kyselina palmitová 30 % tělesného tuku. Velmi bohatý na kyselinu palmitovou je palmový olej. Kyselinu stearovou je také možno najít v některých rostlinných olejích. Především však tvoří vysoký podíl lipidů, které se nacházejí v loji přežvýkavců (Rogers 2020).

### 3.3.2 Nenasycené mastné kyseliny

Nenasycené mastné kyseliny jsou takové, které obsahují jednu nebo více izolovaných dvojných vazeb. Mastné kyseliny s jednou dvojnou vazbou jsou MUFA neboli monoenoové mastné kyseliny. Mastné kyseliny s více dvojnými vazbami jsou PUFA neboli polyenoové mastné kyseliny. Předními zástupci nenasycených mastných kyselin jsou kyselina linolová a olejová (Koolman a Röhm 2012).

**Mononenasycené** (MUFA) mastné kyseliny jsou vlastně molekuly tuku, které mají jeden nenasycený nebo dvojně vázaný uhlík, který se může vyskytovat v různých polohách. Nejběžnější mononenasycené mastné kyseliny mají délku řetězce 16 – 22 a dvojná vazba končí s konfigurací cis. To znamená, že atomy ve  $H_2$  jsou na obou stranách dvojně vazby orientovány stejným směrem (Rustan & Drevon 2005). Nejběžněji využívané mononenasycené mastné kyseliny ve výživě jsou kyselina olejová a kyselina palmitoolejová (Schwinshackl a Hoffmann 2014).

Transizomery mohou být vyráběny během průmyslového zpracování nenasycených olejů a v trávicím traktu přežvýkavců. Přítomnost dvojně vazby způsobuje omezení mobility acylového řetězce v daném bodě. Cis mastné kyseliny mají nižší bod tání než trans mastné, nebo jejich nasycené protějšky (Rustan & Drevon 2005). Tato struktura dá molekule speciální vlastnosti a způsobí, že interaguje jinak než ostatní tuky v těle. Mononenasycené mastné kyseliny jsou méně náchylné na oxidaci. Proto je také méně pravděpodobné, že uvolní volné radikály, které by mohly poškodit buňky a způsobit zánět (Jenkins et al. 2020).

Díky mononenasyceným mastným kyselinám je možnost flexibility při skládání krmných dávek. Lze je totiž použít jako nahrazení nasycených mastných kyselin či sacharidů. V průměru poskytují mononenasycené mastné kyseliny přibližně 15 % energie. Nicméně diety s vysokým obsahem mononenasycených mastných kyselin běžně poskytují 20 – 22 % energie (Eugéne et al. 2008).

**Polynenasycené** (PUFA) mastné kyseliny mají dvě a více nenasycených dvojných vazeb. V polynenasycených mastných kyselinách lze najít první dvojnou vazbu mezi třetím a čtvrtým atomem uhlíku z  $\omega$  uhlíku. Jedná se o tzv. mastné kyseliny omega-3. Je-li první dvojná vazba mezi šestým a sedmým atomem uhlíku, pak se nazývají mastné kyseliny omega-6. Dvojně vazby jsou od sebe odděleny methylenovou skupinou (Rustan & Drevon 2005). PUFA, které jsou produkovány pouze rostlinami a fytoplanktonem, jsou nezbytné pro všechny vyšší organismy, včetně savců a ryb. Omega-3 a omega-6 mastné kyseliny nelze vzájemně zaměňovat, obě jsou základními živinami. PUFA jsou v těle dále metabolizovány přidáním atomů uhlíku a desaturací (extrakcí  $H_2$ ). Savci mají desaturázy, které jsou schopny odstranit  $H_2$  pouze z atomů uhlíku mezi existující dvojnou vazbou a karboxylovou skupinou. Beta oxidace mastných kyselin může probíhat buď v mitochondriích, nebo peroxisomech (Rustan & Drevon 2005).

Aluko (2011) ve své studii zmiňuje, že kyseliny linolová a  $\alpha$ -linolenová chrání před zánětlivými chorobami. Kyselina linolenová má ale vyšší zdravotní přínosy.

### 3.3.3 Antimikrobiální účinky

Mastné kyseliny se středně dlouhým i s dlouhým řetězcem, ať už v nasycené nebo nenasyčené podobě, mohou potencionálně navázat na přenašeče elektron-transportního řetězce. Studie za pomoci elektronové mikroskopie naznačují, že dochází k rozrušení buněčných membrán (Poláková et al. 2010). Navázáním na přenašeče dojde k rozpořívování, nebo úplnému přemístění mimo membránu buňky. Ve vyšších koncentracích způsobují povrchově aktivní látky poškození cytoplazmatických membrán. To by mohlo vést ke smrti buněk. Inhibice růstu mikroorganismů je způsobena změnou buněčné permeability. Antimikrobiální efekt zajišťují mastné kyseliny inkorporací do buněčných membrán (Rustan & Drevon 2005). To způsobuje neuspořádanost lipidů a vede ke zvýšení membránové fluidity. Dvojvrstva membrán je primárním cílem účinku masných kyselin. S tím i spojené zpomalení produkce ATP. Potenciální energie se uvolňuje ve formě tepla a není využita na tvorbu ATP. Díky tomu postrádá bakterie energii pro svůj metabolismus (Desbois & Smith 2010).

Mastné kyseliny dokáží inhibovat růst bakterií, virů, protozů a hub. Působí hlavně na gram-pozitivní bakterie s výjimkou nepatrného množství gram-negativních bakterií. Délka řetězce masných kyselin rozhoduje o účinku na daný patogen. Mastné kyseliny s delším řetězcem reagují více s gram-pozitivními bakteriemi. Kdežto mastné kyseliny s krátkým řetězcem inhibují s gram-negativními bakteriemi. V tomto případě musí být ale mastné kyseliny ve vyšších koncentracích. Stereochemie masných kyselin ovlivňuje antimikrobiální působení (McGaw et al. 2002).

Estery masných kyselin jsou připravovány chemickou syntézou. Méně náročným způsobem je enzymatická příprava. Tímto způsobem se dají získat čisté produkty. Katalýza enzymů probíhá za mírného tlaku a teploty (Mensink et al. 2003). Enzymová syntéza umožňuje mimo jiné použití méně toxických, či dokonce netoxických rozpouštědel. Využití derivátů masných kyselin je výhodné, protože se při jejich použití uplatňují jejich antimikrobiální vlastnosti.

## 3.4 Lipidy

Lipidy, patřící mezi organické molekuly, jsou nerozpustné, nebo jen omezeně rozpustné ve vodě. Z buněk a tkání se dají izolovat extrakcí organickými rozpouštědly (petrolether, hexan, diethylether). Mezi nejznámější lipidy patří tuky a oleje (McMurry 2004). Tuky mají hlavní část chemické struktury uhlovodíkové řetězce. Primárním typem uhlovodíků jsou mastné kyseliny a steroidy (Kerr et al. 2016). Lipidy tvoří v tukové tkáni zdroj energie (Reece 2011). Lipidy indukují resorpci rozpustných vitamínů a zpomalují průchod potravy trávicím traktem. Tím umožňují lepší natrávení potravy (Baltič et al. 2017).

### 3.4.1 Metabolismus lipidů

Lipidy jsou v sušině zastoupeny 2 – 3 %. Působením mikrobiálních enzymů je umožněno štěpit triacylglyceroly, fosfolipidy a estery. Výsledkem fermentace galaktózy a glycerolu jsou TMK. Fermentací glycerolu vzniká kyselina propionová. Fermentací galaktózy vzniká kyselina

octová, máselná a propionová (Hanczakowska et al. 2016). Nenasycené mastné kyseliny podléhají částečné i úplné hydrogenaci. Tím jsou redukovány dvojně vazby. Nakonec dojde k transformaci nenasycených mastných kyselin na nasycené (Baltič et al. 2017).

Rané studie metabolismu lipidů v bachoru se zabývaly především osudem mastných kyselin v organismu při jejich průchodu bachorem. Existují dvě důležité mikrobiální transformace. Lipolýza způsobuje uvolňování mastných kyselin z esterifikovaných rostlinných lipidů, po kterém následuje biohydrogenace (Jenkins et al. 2020). Ta snižuje počet dvojných vazeb. Nenasycené mastné kyseliny mají krátký poločas rozpadu v bachorovém obsahu, protože jsou rychle hydrogenovány mikroby. Biohydrogenace funguje jako zásobárna vodíku. Pouze 1 – 2 % vodíku se uvolňuje. Studie Jenkins et al. (2020) sledovala kontrolu antimikrobiálních účinků mastných kyselin, aby bylo možné přežvýkavcům podávat tuk bez narušení bachorové fermentace. Dále studovali mikrobiální biohydrogenaci.

### 3.5 Dusičnany

Dusičnany a některé nitrosloučeniny s krátkým řetězcem a nitro-oxy sloučeniny se zkoumají jako doplňkové látky s cílem snížit ekonomické a environmentální náklady spojené s emisemi  $\text{CH}_4$ , které produkují přežvýkavci. Dusičnany jsou termodynamicky výhodnějším akceptorem elektronů než  $\text{CO}_2$ . Je tak upřednostněna jeho redukce před metanogenezí. Dusitan je primárně redukován na amoniak, ačkoli v něm mohou vzniknout i malá množství oxidu dusného. Nitrosloučeniny s krátkým řetězcem působí jako přímé inhibitory metanogenních bakterií. Některé z těchto sloučenin mohou konzumovat elektrony na úkor metanogeneze a jsou inhibitory některých patogenních původců v potravě (Latham et al. 2016).

Mikrobiální a nutriční důsledky zpracování dusičnanů do potravy přežvýkavců obvykle vedou ke zvýšené produkci acetátu. Na rozdíl od většiny jiných doplňků omezujících produkci  $\text{CH}_4$ , dusičnany snižují nebo nemají žádný vliv na produkci propionátů. Typ přidané dusičnanové soli ovlivňuje rychlost produkce dusičnanů, rychlost akumulace dusitanů a účinnost redukce  $\text{CH}_4$ . Přičemž sodná a draselná sůl jsou účinnější, než soli dusičnanu vápenatého (Latham et al. 2016). Důsledky přidávání nitrosloučenin do krmiva přežvýkavců jsou variabilnější a v některých případech mohou zvýšit produkci propionátu. Meziproduktem dusičnanu jsou dusitany a ty jsou toxické. Proto vznikají obavy při použití dusičnanů pro přežvýkavce. Prostřednictvím methemoglobinemie by mohlo dojít k otravě zvířat. Některé z přirozeně se vyskytujících nitrosloučenin, jako je 3-nitro-1-propionát a 3-nitro-1-propanol, také způsobují otravu. Toxicitě dusitanů by se dalo zabránit postupným navykáním zvířat vyšším koncentracím dusičnanů a dusitanů, které by se mohly případně použít i s nitrosloučeninami (Latham et al. 2016). Vhodné dávky nitrosloučenin a dusičnanu, jednotlivě nebo v kombinaci s probiotickými bakteriemi zajišťují zmírnění rizika toxicity.

Nitrátové a jiné oxidované nitrosloučeniny jsou vědecky zkoumány kvůli své toxicitě a schopnosti snižovat emise  $\text{CH}_4$  v bachoru přežvýkavců. Obecně se má za to, že nejúčinnější na tlumení  $\text{CH}_4$  v bachoru jsou alternativní mechanismy pro udržování nízkých parciálních tlaků dihydrogenu v bachoru. Jako alternativní elektronové akceptátory pro anaerobní dýchání v bachoru je k dispozici celá řada sustrátů pro akceptaci elektronů, včetně nenasycených mastných kyselin, dusičnanů, sulfátů nebo fumarátu (Leng 2014). Doplňkové dusičnany by za

určitých podmínek mohly sloužit a možná i nahradit neproteinové zdroje dusíku, jako je močovina. Tím by podpořily mikrobiální syntézu bílkovin v bachoru (Sophea a Preston 2011; Li et al. 2012; Silivong et al. 2012; Thanh et al. 2012). Teoreticky by spotřeba čtyř elektronů s redukcí dusičnanu na oxid dusný a potenciální spotřeba dalšího elektronu pro redukcí oxidu dusného na didusík ( $N_2$ ) mohly sloužit jako metabolická cesta pro likvidaci elektronů k redukcí dusičnanů. Z energetického hlediska je však redukce dusitanů na amoniak termodynamicky atraktivnější, než redukce dusitanů na oxid dusný a tudíž převládajícím redukčním produktem v bachoru na amoniak. Práce Andersona et al. (2005) odhalily, že podobně jako dusičnany a dusitany, mohou přirozeně se vyskytující nitrosloučeniny 3-nitro-1-propionát a 3-nitro-1-propanol, průmyslově vyráběný nitroethan sloužit jako akceptátory elektronů v mikrobiálních bachorových populacích.

Kromě toho, že nitrosloučeniny slouží jako alternativní elektronové akceptátory, také přímo inhibují metanogenezi přežvýkavců (Gutierrez-Bañuelos et al. 2008). Spotřeba elektronů, alespoň při redukcí přirozeně se vyskytujících nitrosloučenin a nitroetanu, probíhá pomaleji, než přímý inhibiční mechanismus. Vyžaduje *in situ* obohacování kompetentních nitroredukujících bakterií, které jsou běžně přítomny v nízkých počtech. Biologické procesy podílející se na přímé chemické inhibici produkce  $CH_4$  nitrosloučeninami s krátkým řetězcem nejsou přesně definovány. Spekulovalo se, že by k tomu mohlo dojít prostřednictvím inhibice reakcí na přenos elektronů, jako je nitroethanolem způsobená inhibice přenosu elektronů mezi ferredoxinem a hydrogenázou (Anderson et al. 2008). Řada sloučenin s krátkým řetězcem byla testována *in vitro*, i když se v současnosti ukázalo, že většina (ne-li všechny) účinně potlačuje produkci bachorového  $CH_4$ . Pouze u několika bylo zjištěno, že jsou vhodnými elektronovými akcelerátory pro podporu růstu nitroredukujících bakterií (Prakash 2014). Nitrooxysloučeniny, které disponují atomem kyslíku, se nejen strukturálně liší od nitrosloučenin s krátkým řetězcem, ale pravděpodobně i způsobem působení. V poslední době bylo publikováno několik recenzí literatury o toxikologických aspektech a potenciálu pro snížení  $CH_4$  při krmení přežvýkavců dusičnany, včetně vynikajících děl Leeho a Beauchemina (2014) a Lenga (2008).

### 3.5.1 Metabolismus dusičnanů a dusitanů

K mikrobiální redukcí dusičnanů může dojít disimilačním a asimilačním procesem. Příslušné geny, jejich regulace a energie se podstatně liší. Asimilační redukční dráha dusičnanů spotřebovává energii na redukcí dusičnanů na amoniak jako zdroj dusíku pro mikrobiální syntézu proteinů (Moreno-Vivián et al. 1999). Disimilační redukce dusičnanů je naopak proces výroby energie, který je distribuován obligátními a fakultativními anaerobními bakteriemi (Thauer et al. 1977). V bachoru dochází k redukcí disimilačního dusičnanu především dvoustupňovou cestou, kdy se dusičnan nejprve redukuje na dusitany, které se mohou hromadit jako intermedity, než se nakonec zredukují na amoniak. Enzymy podílející se na redukcí disimilačního dusičnanu zahrnují membránovou vazbu a periplasmické nitrátové reductázy (Thauer et al. 1977; Moreno-Vivián et al. 1999). Disimilační nitritredukce se objevuje na vnější cytoplazmatické membráně a v závislosti na organismu spotřebovává elektrony oxidací redukovaných nosičů elektronů, jako je NADH a FADH. Některé bakterie mohou postrádat kompletní funkční transportní řetězec elektronů, přesto jsou schopny redukovat dusičnany na

dusitany a někdy na amoniak prostřednictvím redukčních reakcí s neúplným řetězcem nebo jinými nosiči elektronů, aniž by generovaly ATP.

Denitrifikace je další cestou pro snížení disimilačního dusičnanu, navzdory důkazům o přítomnosti denitrifikačních genů v bachorovém eubakteriálním a archeálním metagenomu (Zumft a Kroneck 2007; Brulc et al. 2009). Nemá se za to, že by tento proces znatelně přispíval ke snížení množství dusičnanů u přežvýkavců (Jones 1972; Leng 2008). V metagenomické studii Brulc et al. (2009) dospěli k závěru, že činnosti spojené s denitrifikací a fixací dusíku jsou v bachoru pravděpodobně bezvýznamné. Geneticky to však představuje 7 % genů podílejících se na metabolismu dusíku a i když to zjevně není dominantní, nelze zcela vyloučit jejich přínos.

Akumulaci bachorového oxidu dusného v reakci na doplnění dusičnanů zkoumalo jen minimum studií. Koncentrace oxidu dusného rovnající se 0,3 % množství přidaných dusičnanů nebo dusitanů byly měřeny v *in vitro* bachorových inkubacích doplněných o dusičnany nebo dusitany (de Raphélis-Soissan et al. 2014). Nicméně Petersen et al. (2015) zjistili, že emise oxidu dusného představují až 3,4 % přidaného dusičnanu. Potenciálními bakteriálními denitrifikery jsou *Pseudomonas aeruginosa* a některé druhy *Propionibacterium* a *Nitrosomonas*. Tyto bakterie by bez přidaného dusičnanu mohly být považovány za přechodné nebo minoritní kolonizátory bachoru (Mitsumori et al. 2002).

### 3.5.2 Metabolismus nitrosloučenin

Na rozdíl od metabolismu dusičnanů a dusitanů se o mechanismech metabolismu nitrosloučenin přežvýkavými mikroby ví méně. V bachoru se přirozeně vyskytuje kyselina, která se vstřebává méně rychle, ale metabolizuje se rychleji než nitroalkohol. To vysvětluje proč je jedna kyselina pro přežvýkavce méně toxická než druhá. V současné době je bachorová bakterie *Denitrobacterium detoxificans* jediným známým anaerobem, který vykazuje znatelnou nitroalkalovou redukční aktivitu (Anderson et al. 2005). Tato bakterie šetří energii pro růst výhradně prostřednictvím anaerobního dýchání, oxidace  $H_2$ , mravenčanu nebo laktátu při redukcí dusičnanu na amoniak (Anderson et al. 2006). Předpokládá se, že redukce nitroalkanů na jejich aminy spotřebuje šest molekul elektronů na mol aminoskupiny a je založena na stechiometrii pro redukcí nitroetanolu na etanolamin (Anderson et al. 2008). Všechny nitrosloučeniny byly testovány a bylo zjištěno, že jsou účinnými inhibitory metanogeneze u přežvýkavců (Anderson et al. 2003, 2008, 2010).

Na základě testů Andersona et al. (2005) a Zhang et al. (2014) se přišlo na to, že redukce dusičnanů může být energeticky příznivější než redukce nitrosloučenin. Samozřejmě ale nelze vyloučit příspěvek i jiných mechanismů, jako je přítomnost aktivnějších dusičnan redukujících enzymů.

Nitrolakany mají dva rozdílné mechanismy účinků. Primárně přímá inhibice metanogeneze a sekundárně jako elektronový akceptátor. Nejsou neslučitelné, protože proces, který potlačuje metanogenezi, může podporovat přeměrování elektronů. Tím i usnadní redukcí nitroalkanů (Gutierrez-Bañuelos et al. 2008).



### 3.5.3 Faktory ovlivňující metabolismus dusičnanů a nitrosloučenin

Mezi jednotlivými zvířaty existují značné rozdíly, pokud jde o jejich reakci na přidávání dusičnanů. Část této reakce je způsobena bacherovým ekosystémem. Největší vliv mají endogenní mikrobiální populace a jejich enzymatická kapacita. Existuje však mnoho dalších faktorů, které ovlivňují rychlost redukce dusičnanů, dusitanů a nitrosloučenin. Zprvu dostupnost a množství substrátů dodávajících elektrony použité pro redukční nitrátové reakce včetně sacharidů, etanolu, manitolu, glycinu, malátu, citronanu, laktátu, sukcionátu, pyruvátu a mravenčanu (Lewis 1950, 1951; Jones 1972). Doplnění nebo poskytnutí krmiva bohaté na tyto dárce elektronů může potenciálně zvýšit redukci dusičnanů na amoniak. Tím také zajistí pokles  $\text{CH}_4$  a sníží pravděpodobnost otravy dusičnany, protože zvíře bude vystaveno menšímu množství toxickému meziprojektu dusitanu. Dusitan přeměňuje hemoglobin na methemoglobin (Takahashi et al. 1998). Byly navrženy doplňky s vysokým obsahem škrobu a obilných zrn, které zmírňují nitrátovou toxicitu podporou metabolismu mikroorganismu přežvýkavců (Hibberd et al. 1994) a tím tvorby a dostupnosti substrátů pro metabolismus dusičnanů a dusitanů (Lewis 1950, 1951; Allison & Reddy 1984).

Ukázalo se, že krmivo s vysokým obsahem škrobu dobře snižuje pH bacheru. To by mohlo vytvořit inhibiční prostředí metabolismu dusičnanů a dusitanů. Enzymatická analýza ukazuje, že dusičnanové a dusitanové reductázy pracují nejlépe při pH 5,6 (Lewis 1951). Redukce dusičnanů a dusitanů v rámci smíšených populací mikrobů u přežvýkavců byla rychlejší při neutrálním pH, nebo nižším než 6 (Iwamoto et al. 2001).

Existuje geneticky modifikovaný kmen *E. coli*, který byl vyvinut se zvýšeným využitím dusitanů, u něhož byla prokázána účinnost *in vitro* a *in vivo* (Sar et al. 2005, 2006). Lze předpokládat, že zvířata adaptovaná na dusičnany mají zvýšenou koncentraci NADH reductázy. Rychlost redukce dusičnanů je zřejmě ovlivněna dostupností a koncentracemi síry. Redukce síranu na siřičitany a následně na sulfid je méně energeticky příznivá než u dusičnanů. Kromě toho síra stimuluje růst sulfid redukujících bakterií. Přidání síry by proto hypoteticky mělo zvýšit snížené množství dusičnanů a dusitanů a rychlost reakce (Leng 2008). Experimentálně se ukázalo, že Lcystein, který je bohatý na síru, ve spojení s dusičnanem potlačuje tvorbu methemoglobinu (Takahashi et al. 1998).

### 3.5.4 Mikrobiální reakce na dusičnany

Mikrobiální metabolismus dusičnanů a dusitanů v bacheru je paradoxem v tom, že umožňuje detoxikaci, ale vede také k tvorbě toxických látek. Vzhledem k tomu, že jsou tyto mikroby symbionti hostitele přežvýkavců, je pochopitelná jejich reakce z hlediska exprese genů a struktury společenství. Ve chvíli, kdy vystavíme nepřizpůsobené mikrobiální populace vysokému příjmu dusičnanů v potravě, dojde k rychlé indukci redukční aktivity dusičnanů. Během 4 hodin po první expozici naroste aktivita až 14-krát. Indukce metabolismu dusičnanů a dusitanů je za pomoci bakterií v bacheru, jako jsou *Selenomonas ruminantium*, clostridium, Peptostreptococcus a Propionibacterium (Alaboudi 1984; Iwamoto et al. 2002). Podíl propionibakterií na redukci dusičnanů je atypický, jelikož většina propionibakterií produkujících dusičnany jsou denitrifikátory produkující oxid dusný jako konečný produkt (Anderson et al. 2010). *Wolinella succinogenes* lze považovat za specialistu na to, že je

nefermentační a vykazuje vysoce aktivní dusičnanovou a dusitanovou redukční aktivitu. *Veillonella parvula* využívající dusičnany rovněž přispívá k metabolismu dusičnanů a dusitanů u přežvýkavců. Nicméně výskyt těchto populací se zdá být závislý na koncentracích dusičnanů (Asanuma et al. 2002; Iwamoto et al. 2002). Existuje řada dalších bakterií redukujících dusičnany, jako jsou například *Desulfovinrio*, *Enterobacteriaceae*, které mohou obývat bachor i v malém množství. Některé bakterie jako *Escherichia coli* a *Salmonella enterica serovars* jsou živočišné a potravinářské patogeny. Proto by jejich obohacení v důsledku krmení dusičnany bylo nežádoucí. Důkazy o obohacování bakteriálních populací snižujících dusičnany pocházejí ze studií Alaboudiho a Jonese (1985). Ti u koz prokázali trojnásobné zvýšení rychlosti metabolismu dusičnanů a dusitanů.

Lin et al. (2013a) pozorovali nárůst populací nitrátových reduktorů druhu *Campylobacter*, který byl obohacen o tekuté i pevné frakce obsahu bachoru přežvýkavců. *Mannheimia succiniciproducens* byl obohacen pouze o tekutou frakci z bachoru. Podle Chen et al. (2019) by měly být sinice a *Campylobacter* důležité patogeny snižující dusičnany. *M. succiniciproducens* může být použito pro obohacení v bachoru, protože má schopnost fixovat CO<sub>2</sub> prostřednictvím karboxylace fosfoenolpyruvátu (Lee et al. 2006).

Marais et al. (1988) za použití kultivačních technik *in vitro* uvedli, že akumulace dusitanů v důsledku redukce přidaného dusičnanu snižovala bachorovou celulólytickou aktivitu. Jiné studie také zaznamenaly toxické účinky dusitanů, vznikajících jako meziprodukt během redukce dusičnanů na mikrobiální populace včetně metanogenů (Iwamoto et al. 2002; Asanuma et al. 2015). Inhibice celulólytických organismů může vysvětlovat pokles příjmu sušiny, který je někdy pozorován u zvířat, která dostávají potravu doplněnou o dusičnany (Newbold et al. 2014; Lee et al. 2015a,b). Zdá se, že metanogeny jsou zvláště citlivé na toxické účinky dusitanů (Iwamoto et al. 2002).

### 3.6 Snižování produkce metanu

Vzhledem k tomu, že je CH<sub>4</sub> konečným produktem bachorové fermentace, zahrnují strategie pro snížení emisí CH<sub>4</sub> z bachoru změnu průběhu bachorové fermentace. H<sub>2</sub> a mravenčan jsou v bachoru využívány hlavně pro metanogenezi, proto se většina strategií na snížení produkce CH<sub>4</sub> zaměřuje právě na H<sub>2</sub> a mravenčan. Jakákoli metoda potlačení produkce CH<sub>4</sub> v bachoru musí být doprovázena metodou přeměny vzniklého nahromaděného H<sub>2</sub> na jiné produkty fermentace. V opačném případě je nahromaděný H<sub>2</sub> odpadní produkt bachorové fermentace, který může potlačit trávení v bachoru (Mitsumori & Sun 2008). Kromě toho by měly být pečlivě vyhodnoceny pokusy o snížení emisí CH<sub>4</sub>, aby se předešlo poruchám bachorové fermentace (Russell & Wallace 1997). Modifikace fermentace bachoru by mohla zásadně ovlivnit produkci CH<sub>4</sub> (Kobayashi 2010).

Je dobře známo, že produkce CH<sub>4</sub> je ovlivněna kvalitou a množstvím krmiv. V tomto ohledu se produkce CH<sub>4</sub> často vyjadřuje pomocí rovnic odvozených z experimentálních pozorování. De Raphélis-Soissan et al. (2014) prokázali, že produkce CH<sub>4</sub> u ovcí a skotu souvisí jak se stravitelností energie v dietě, tak s množstvím krmiva. Leng (2008) prokázal, že produkci CH<sub>4</sub> lze zohlednit pouze v desítkách procent příjmu sušiny.

- Strava založená na píceinách:

Přežvýkavci, kteří jsou krmeni na bázi pícnin, což je většina přežvýkavců na světě, se potýkají s problémy spojenými s nekvalitními krmivy. Leng (2008) shrnul některé přístupy k řešení problémů z hlediska redukce CH<sub>4</sub> z batoru a zdůraznil, že produkce přežvýkavců krmených nekvalitními krmivy je omezena nízkou nabídkou obilovin z mikrobiálního ekosystému a prakticky absencí bílkovin z dietního bypassu. Při produkci CH<sub>4</sub> z přežvýkavců krmených nekvalitními krmivy závisí produkce CH<sub>4</sub> v poměru k produkci CH<sub>4</sub> na dvou faktorech: účinnost fermentativního trávení v batoru; účinnost přeměny krmiva na produkt (Leng 2014).

Zatímco produkce CH<sub>4</sub> není ovlivněna typem sacharidů při nízkém příjmu stejně jako při vyšším příjmu (Mitsumori et al. 2002), může typ píce v dietách s vysokým příjmem ovlivnit emise CH<sub>4</sub>. Například zkrmování vysoce kvalitní vojtešky a siláže z kukuřice může snížit produkci CH<sub>4</sub> o 10 až 20 % (Leng 2008). Byly zaznamenány sezónní rozdíly v produkci CH<sub>4</sub> na pastvinách (Leng 2014). Sezónní změny v kvalitě pastvy tedy mohou mít vliv na emise CH<sub>4</sub>. Očekává se, že změna kvality píce by mohla snížit produkci CH<sub>4</sub> v rozmezí 20 – 40 % (Leng 2008).

- Obilná strava:

Obilná zrna, která obsahují mnohem více zásobních sacharidů, než pícniny, jsou snadno stravitelná batorovými mikroorganismy, jako jsou bakterie produkující škrob. Vyšší podíl koncentrátů v krmivu snižuje emise CH<sub>4</sub> (Mitsumori et al. 2002). Škrob v obilných zrnech je snadno zkrmován mikroorganismy batoru. Je známo, že v důsledku fermentace škrobu se snižuje poměr acetátů k propionátům v batoru (Russell 1998). Zatímco některé bakterie trávicí škrob produkují značné množství propionátu, mnoho bakterií trávicích vlákninu produkuje velké množství sukcinátu, který se nakonec přemění na propionát (Leng 2014). Pokud je v potravě velké množství koncentrátů, vzniká 23 % propionátu z pyruvátu prostřednictvím akryl CoA (akrylátová cesta), zatímco v potravě založené na pícninách vzniká 92 % propionátu z pyruvátu prostřednictvím sukcinátu (Asanuma et al. 2002). Lze tedy předpokládat, že některé bakterie trávicí škrob produkují laktát, který je nakonec přeměněn na propionát bakteriemi využívající laktát, jako je *Megasphaera elsdenii*, která může produkovat propionát pomocí akrylové cesty (Leng 2008). Jedna z hlavních bakterií, trávicích škrob, *Streptococcus bovis*, uvolňuje do batoru velké množství laktátu (Asanuma et al. 2002).

Byly provedeny různé pokusy o snížení emisí CH<sub>4</sub>, zejména prostřednictvím manipulace s batorovou mikrobiotou a to za použití chemických látek, antibiotik a přírodních produktů jako jsou oleje, mastné kyseliny a rostlinné extrakty (Chen et al. 2019). Novějším přístupem je vývoj vakcín proti metanogenním bakteriím. Zatímco ionoforová antibiotika byla široce používána díky své účinnosti a přijatelné ceně, použití alternativních přírodních materiálů se stává atraktivnějším kvůli zdravotním obavám, týkajícím se antibiotik (Kobayashi 2010). Důležitou vlastností přírodních materiálů, které představují možný alternativní inhibitor CH<sub>4</sub> je, že takový materiál nesnižuje příjem krmiva ani jeho stravitelnost, ale zvyšuje obsah propionátu, který je hlavní alternativou k CH<sub>4</sub>, jež pohlcuje H<sub>2</sub>. Existují tři způsoby snížení produkce CH<sub>4</sub>. Přímá inhibice metanogeneze, snížení produkce H<sub>2</sub> a nalezení alternativního využití H<sub>2</sub> (Patra & Yu 2014). U silic je možno použít všechny tři metody. Především vyšší koncentrace silic jsou schopny inhibovat metanogeny (Bodas et al. 2012). Produkce H<sub>2</sub> v batoru se dá snížit inhibicí protozoí a některých skupin gram-pozitivních bakterií. Tyto bakterie v batoru zajišťují produkci kyseliny máselné a octové. Naopak gram-negativní

bakterie produkují kyselinu propionovou (Stewart 1998). Produkce kyseliny propionové je alternativou k produkci H<sub>2</sub>. Zvýšená produkce kyseliny propionové je spojena se sníženou produkcí CH<sub>4</sub> (Janssen 2010).

Doplnění o chemická aditiva může snížit populaci Archei a bakterií, což vede ke snížení emisí bachorového CH<sub>4</sub> (Zhang et al. 2014). Takové zásahy však mohou snížit stravitelnost a ovlivnit živočišné produkty (Patra & Yu 2014). Proto je důležité prozkoumat přírodní a biotechnologické intervence ke zmírnění problému s CH<sub>4</sub> s pokud možno minimálními vedlejšími účinky.

Podle Jelínka et al. (2003) by měl být výzkum ve snižování produkce CH<sub>4</sub> zaměřen na tyto oblasti:

- Redukce tvorby plynu v trávicím traktu a výkalech ovlivněním výskytu metabolických poruch – předpokladem je snížení emisí o 15 %
- Snížení tvorby plynů v trávicím traktu a výkalech likvidací saprofytické mikrobiální flóry aplikací xenobiotik – předpokládá se snížení emisí o 10 %
- Redukce tvorby plynů v trávicím traktu důsledkem mikroklimatických změn – předpoklad snížení emisí o 5 %
- Omezení emise CH<sub>4</sub> u větraných stájí použitím biofiltru – předpokládané snížení emisí o 20 – 40 %
- Omezení emisí CH<sub>4</sub> ze skládek chlévského hnoje ošetřením enzymovými přípravky – předpoklad snížení emisí o 35 – 50 %.

V minulých letech bylo zkoumáno velké množství metod, které by mohly snížit produkci enterického CH<sub>4</sub> u zvířat. Metody jsou následující:

- Genetická selekce zvířat s nízkou produkcí CH<sub>4</sub> (Pickering et al. 2015)
- Použití biotechnologií (imunizace vakcínami proti metanogenům; pasivní imunizace protilátek; použití probiotik; defaunace)
- Změna krmné dávky (množství, druh, stáří, obsah lipidů jak u objemných tak jadrných krmiv)
- Použití doplňkových látek (organické kyseliny, sekundární metabolity rostlin) (Martin et al. 2010).

Jednou z variant snižování produkce CH<sub>4</sub> se ukazuje použití doplňkových látek do krmiv. Ty by měly ovlivnit mikroflóru v trávicím traktu zvířat, aniž by ovlivnily zdraví.

### **3.6.1 Použití mastných kyselin**

Snížení produkce CH<sub>4</sub> je závislé na formě, ve které jsou mastné kyseliny podávány a na dalších složkách krmiva. Mastné kyseliny mohou být zvířeti dávkovány ve formě lněného oleje, nativních či extrudovaných semen. Je potřeba najít optimální dávku použití mastných kyselin (Martin et al. 2010).

Nenasycené mastné kyseliny s dlouhým řetězcem obvykle nahrazují aktivitu fibrolytických bakterií v bachoru (Jenkins et al. 2020). Metabolismus kyseliny stearové (C<sub>18</sub>)

byl rozsáhle zkoumán z důvodu zvyšování koncentrací bioaktivních lipidů v mléce. Předpokládá se teoretický potenciál C<sub>18</sub> na zlepšení dlouhodobého lidského zdraví (FAO 2008). O nasycených kyselinách se středně dlouhým řetězcem je známo, že modifikují bacherovou fermentaci (Czerkawski 1966). O takové kyseliny roste velký zájem, neboť svým účinkem ovlivňují emise skleníkových plynů z živočišné výroby přežvýkavců (Machmüller et al. 2006).

Při teplotě 39 °C jsou kyselina laurová (C<sub>12</sub>) a kyselina myristová (C<sub>14</sub>) antimetanogenní v bacherové tekutině přežvýkavců (Dohme et al. 2001). Aby účinky mastných kyselin na inhibici metanogeneze byly správné, je potřeba znát faktory ovlivňující účinnost snižování CH<sub>4</sub> (Zeitz et al. 2013).

U kyseliny laurové a myristové byl sledován synergický efekt v tekutině bacheru (Hohenheim test). Jsou-li samostatně použity, tlumí metanogenezi v nejvyšší míře kyselina laurová, případně kombinace s kyselinou myristovou. U ovcí byl k defaunaci bacheru použit kokosový tuk (Machmüller et al. 2006). Bylo provedeno celkem 12 pokusů, v nichž se rovnalo použití s kokosovým tukem a s mastnými kyselinami s dlouhým řetězcem. Z těchto pokusů vyplynul závěr, že přídavek 3 % mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem (C<sub>12</sub> a C<sub>14</sub>) do krmiva, snižuje tvorbu CH<sub>4</sub> *in vivo* až o 50 % (Machmüller 2006).

Kyselina laurová a myristová vykazují antiprotozoální vlastnosti ve spojení s řadou účinků na tvorbu fermentačních produktů a produkci CH<sub>4</sub> v bacheru (Hristov et al. 2015). Je známo, že potlačení produkce CH<sub>4</sub> pomocí kyseliny laurové, kyseliny myristové a kokosovým olejem (coby zdrojem MCFA), zprostředkovává snížení počtu protozoí a inhibují metanogeny (Dohme et al. 2001). Doplnění potravy o MCFA tak může být prakticky proveditelnou metodou ve snižování emise enterického CH<sub>4</sub> z přežvýkavců, a tím i dopadu činnosti živočišné výroby na životní prostředí.

Snížení koncentrace amoniaku v reakci na kyselinu laurovou, nebo kokosového oleje může odrážet sníženou proteolýzu a deaminaci nebo účinnou přeměnu bacherového amoniaku na mikrobiální bílkovinu. To vede k celkovému zlepšení účinnosti využití dusíku v krmivu. Močovina je primárním zdrojem amoniaku emitovaného z hnoje skotu (Hristov et al. 2015).

Je známo, že rostlinné oleje bohaté na mastné kyseliny se středně dlouhým řetězcem inhibují bacherovou metanogenezi. Obzvláště účinný je kokosový olej (Dohme et al. 2001). Účinek, který potlačuje CH<sub>4</sub>, je zřejmě zprostředkován změnou metabolické aktivity a/nebo složením bacherové metanogenní populace (Machmüller et al. 2006). Hlavní složkou kokosového oleje je kyselina laurová, která je účinnější při redukci CH<sub>4</sub> *in vitro*. Narozdíl od jiných mastných kyselin, včetně kyseliny palmitové, stearové, a linolové (Dohme et al. 2001). Podobné snížení CH<sub>4</sub> bylo pozorováno ve vsádkových kulturách, ve kterých byl přímo porovnáván kokosový olej a kyselina laurová. Tyto pokusy ukázaly, že kyselina laurová inhibuje metanogenezi ve větší míře (Kobayashi 2010). Zahnutí kyseliny laurové nebo kokosového oleje do potravy dojníc může zvýšit obsah kyseliny laurové a kyseliny myristové v mléčném tuku (Dohme 2001). Studie Hristova et al. (2015) zkoumala vliv přídavku laurové kyseliny a kokosového oleje do krmné dávky skotu. Sledoval se účinek produkce CH<sub>4</sub> a stravitelnost živin.

### 3.6.2 Použití lipidů

Bylo prokázáno, že tuky, bohaté na mastné kyseliny střední délky potlačují tvorbu CH<sub>4</sub> *in vivo* (Machmüller et al. 2006). Přidání tuků do krmné dávky je jedno z velmi efektivních řešení ke snížení produkce CH<sub>4</sub> u přežvýkavců (Johnson & Johnson 1995). Účinnost této metody je závislá na faktorech, jako je typ lipidů, zdroj, profil mastných kyselin, forma v jaké jsou podávány a typ krmné dávky. Na základě studie od Eugéne et al. (2008) se uvádí pokles produkce CH<sub>4</sub> o 2,2 % na jedno přidané procento lipidů v krmné dávce. Beauchemin et al. (2008) ve své studii uvedl snížení produkce CH<sub>4</sub> dokonce o 5,6 % u skotu a ovcí. Průměrně se uvádí snížení produkce CH<sub>4</sub> o 3,8 % (Martin et al. 2010).

Suplementace tuků v potravě byla zkoumána v rámci výživy přežvýkavců na zmírnění produkce CH<sub>4</sub> po desetiletí (Czerkawski 1966). Obecně platí, že čisté zdroje (MCFA), včetně kyseliny laurové a kyseliny myristové a jejich kombinací, vykazovaly silnější účinky na zmírnění produkce CH<sub>4</sub>. Na rozdíl od nasycených mastných kyselin s dlouhým řetězcem. Bylo to způsobeno jejich většími inhibičními účinky na metanogeny (Machmüller et al. 2006). Jako zdroje bohaté na MCFA byly také zkoumány kokosový olej, olej krabok a olej z palmových jader. Tyto oleje se volily z toho důvodu, že mají vliv na produkci CH<sub>4</sub>, stravitelnost krmiva, bakteriální populace, kvašení u přežvýkavců, produkci mléka a krevní parametry. Bohužel jejich výsledky nejsou vždy přesvědčivé (Machmüller 2006).

Látky lněných semen zasahují do exprese genu, který produkuje CH<sub>4</sub> v bacheru dojníc. Je potřeba zaměřit se na mechanismus účinku látek jak ze strany tvorby CH<sub>4</sub>, tak ze strany genové exprese metanogenů (Li et al. 2012). Také bylo prokázáno, že česnekový olej (Bosquet et al. 2004) a japonský křenový olej (Ajisaka et al. 2002) snižují emise CH<sub>4</sub>.

Přidávání tuků do krmiva má ale i nežádoucí účinky. Například může negativně ovlivnit příjem krmiva, trávení sacharidů, obsah bílkovin a tuků v mléce či ovlivnit organoleptické vlastnosti mléka (Doreau a Chilliard 1997). Použití tuků v krmné dávce je tak ovlivněno množstvím, které by se nemělo překročit, aby nedošlo k negativnímu ovlivnění fermentace. Přídavek tuků by neměl přesáhnout 3 - 4 % a celkový obsah sušiny nesmí překročit 6 % (Beauchemin et al. 2009). Studie od Woodward et al. (2006) porovnávala krátkodobý a dlouhodobý účinek přidávání tuků do krmné dávky dojníc. Dvoutýdenní přidávání tuků snižovalo produkci CH<sub>4</sub> bez negativních vlivů. 14 ti týdenní podávání tuků mělo proměnlivé a přechodné výsledky. Dá se to přisuzovat adaptaci mikroorganismů (Woodward et al. 2006).

### 3.6.3 Použití dusičnanů

Přídavek dusičnanů u přežvýkavců měl za následek sníženou produkci CH<sub>4</sub> a propionátu. Někdy zvyšoval produkci těkavých mastných kyselin (Shi et al. 2012; Patra & Yu 2014). Účinky krmení dusičnany jsou závislé na koncentraci dusičnanů a jejich dostupnosti v bacheru. To je ovlivněno nejen množstvím krmiva, ale také typem či zdrojem krmených dusičnanů, které mohou ovlivnit dostupnost nitrátového iontu. Například u zapouzdřených nitrátových doplňků, používaných ve studiích Lee et al. (2015a, b) by se dalo očekávat, že budou uvolňovat dusičnany pomaleji, než solné formy dusičnanů.

Vápník má nízkou rozpustnost při pH vyšším než 5,5. Vzhledem k tomu, že pH v bacheru zřídka kdy klesá pod 5,5, je pravděpodobné, že významná část dusičnanu vápenatého je

nerozpustná. Tudíž není k dispozici dosažení plného účinku dusičnanu. Kromě toho mají samotné kationty (K, Na a Ca) důležitou roli v bachoru, včetně motility, osmolality a pH a je o nich známo, že ovlivňují příjem sušiny (Latham et al. 2016).

Bylo by prozíravé vypracovat normy pro krmení dusičnanovou solí s uvedením druhu soli, stáří zvířete, stavu přizpůsobení a předchozí expozice. I malé zvýšení oxidu dusného v důsledku snížení dusičnanů by mohlo mít na globální oteplování velký vliv. Například emise oxidu dusného z ovcí byly vyšší při krmení dusičnanem (de Raphélis-Soissan et al. 2014).

### 3.6.4 Použití doplňkových látek

Do krmiv byly přidávány různé sloučeniny s cílem snížení emisí CH<sub>4</sub> z bachoru. Tyto sloučeniny lze rozdělit na základě působení na produkci CH<sub>4</sub>. Halogenované analogy CH<sub>4</sub> (např. bromchlormetan) mohou inhibovat metanogenezi reakcí s koenzymem B (kobalaminem). Který funguje v posledním kroku metanogenní dráhy (Mitsumori & Sun 2008). Ačkoli je bromchlormetan příliš těžký na to, aby se používal jako krmná přísada, komplex BCM-a-cyklodextrin by mohl prodloužit dobu účinnosti bromchlormetanu v bachoru (Kobayashi et al. 2010). Strukturní analog koenzymu M je silný inhibitor metyl-CoM reduktázy. Je znám jako chemická látka, která by mohla inhibovat produkci CH<sub>4</sub> v bachoru (Mitsumori et al. 2002). Vzhledem k tomu, že bromchlormetan je druh halogenové sloučeniny, která poškozuje ozonovou vrstvu, měla by být aplikace této sloučeniny pečlivě regulována.

Mevastatin a lavastatin jsou inhibitory 3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzymu A (HMG-CoA) reduktázy. Mohou inhibovat růst a produkci metanobrevibaktorů izolovaných z bachoru (Kobayashi et al. 2010). Inhibitory reduktázy by měly potenciál specificky inhibovat bachorové metanogeny, aniž by inhibovaly ostatní bachorové bakterie (Hristov et al. 2015).

Inhibitory, které jsou pro metanogeny přímo toxické, jsou účinným nástrojem, jak metanogenům zabránit v produkci CH<sub>4</sub>. Nicméně v důsledku působení těchto inhibitorů lze očekávat, že se v bachoru bude hromadit H<sub>2</sub>, který by mohl potlačit aktivitu bachorové fermentace (Hristov et al. 2015).

Pro snížení emisí CH<sub>4</sub> přežvýkavců, zejména mléčného skotu, bylo navrženo mnoho strategií krmení zvířat (Knapp et al. 2014). Pro přijetí strategií je zapotřebí účinných metod snižování emisí CH<sub>4</sub> s méně negativními vlivy na bachorové kvašení (Patra & Yu 2014).

### 3.6.5 Použití antimikrobiálních činidel

Předpokládá se, že antimikrobiální činidla, jako jsou antibiotika a bakteriociny, jsou schopna modifikovat bachorovou fermentaci. Antibiotika včetně ionoforů a neionoforů byla intenzivně studována za účelem zlepšení účinnosti krmiva a zdraví zvířat.

**Ionofory**, jako je monensin a lasalocid, jsou známy jako jedny z nejúčinnějších modifikátorů bachoru. Po celém světě jsou hojně využívány jako krmná aditiva pro přežvýkavce. Nejenže snižují emise CH<sub>4</sub>, ale také mění různé aspekty fermentace. Ionofory jsou obecně účinné proti gram-pozitivním bakteriím, ale vykazují malou nebo žádnou aktivitu proti gram-negativním bakteriím a metanogenům v bachoru (Atwood et al. 2011). Ionofory jsou citlivé entodiniomofy v bachoru (Patra & Yu 2014). Předpokládá se, že ionofory jsou schopny

modifikovat bacherovou fermentaci na základě jejich antimikrobiálního spektra, které bylo zkoumáno pomocí kultivovatelných kmenů. Přestože značný počet bacherových bakterií je nekultivovatelný, antimikrobiální spektrum lze odvodit ze skutečnosti, že producenti H<sub>2</sub>, formátu, butyrátu, laktátu a amoniaku jsou odolní vůči ionoforům (Asanuma et al. 2015). Proto by antimikrobiální spektrum bacherových bakterií vůči ionoforům vedlo k následujícím změnám v bacherové fermentaci:

- Zvýšení produkce propionátu a jeho snížení produkce CH<sub>4</sub>
- Zlepšení metabolismu dusíku v bacheru
- Snížení produkce laktátu

Na druhou stranu je známo, že dlouhodobá aplikace monensinu volům ztratila aktivitu potlačující CH<sub>4</sub> a bacherové bakterie si snadno vyvinuly rezistenci vůči ionoforům (Newbold et al. 2014). Protože se o ionofory silně zajímalo několik výzkumníků, byla publikována řada přehledových prací (Russel 2002). Jeden peptidový ionofor, aibellin, byl schopen zvýšit produkci propionátu v bacheru, aniž by významně ovlivnil produkci celkových TMK (Baltič et al. 2017).

**Bakteriociny** jsou přirozeně se vyskytující antibakteriální látky, které mohou být využity jako modifikátory bacherové fermentace. Bakteriociny mohou být také užitečné pro prevenci metabolických poruch, jako laktátová acidóza a nadýmání. Bovicin produkovaný *Streptococcus bovis* byl popsán jako možné činidlo snižující obsah metanu v bacheru (Lee et al. 2006). Doplnění smíšené kultury bacherových bakterií bovicinem inhibovalo produkci metanu až o 53 %. Je známo, že bakteriociny jsou stejně účinné jako monensin a jsou aktivní i při nízkém pH (Kobayashi 2010).



## 4 Metodika

Veškeré pokusy se zvířaty byly prováděny v souladu s českou legislativou (zákon č. 246/1992 Sb., o ochraně zvířat proti týrání) a platnými evropskými směrnicemi a předpisy (směrnice 2010/63/EU, o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely). Testované krávy byly ustájeny na pokusné farmě Výzkumného ústavu živočišné výroby (Praha-Netluky, Česká republika).

### 4.1 Design experimentu

Pro zjištění nejúčinnější kombinace dusičnanů a MCFA při potlačování produkce CH<sub>4</sub> v bacheru byl proveden *in vitro* vsádkový inkubační pokus.

Účinky byly hodnoceny pomocí standardní 24hodinové vsádkové inkubace. Standardní 24hodinová vsádková inkubace byla použita k hodnocení účinků dusičnanu sodného (5 mM, tj. 3,65 mM dusičnanu) buď samotného nebo v kombinaci s jednou ze čtyř MCFA (C<sub>8:0</sub>, C<sub>10:0</sub>, C<sub>12:0</sub>, C<sub>14:0</sub>; 500 mg/l) nebo jejich binární kombinace (250 mg/l + 250 mg/l) na bacherovou fermentaci.

Během dvou týdnů byly provedeny tři série. V každé sérii byly přiřazeny čtyři láhve ke kontrole (bez dusičnanů a bez MCFA), aby se získala robustní průměrná hodnota (López et al. 2010). Déle byly použity tři láhve dusičnanů, slepý pokus (bez substrátu) a dvě láhve pro každou z deseti úprav (dusičnan + MCFA). Průměrné hodnoty lahví pro příslušná ošetření v každé sérii byly použity pro experimentální opakování.

### 4.2 Zvířata a diety

Vzorky obsahu bacheru byly odebírány ručně bacherovou kanylou (vnitřní průměr 10 cm) z různých míst bacheru 3 hodiny po ranním nakrmení. Experimentálně byly vybrány dvě krávy holštýnského plemene na počátku laktace (tělesná hmotnost 584 ± 20 kg; denní produkce 32 ± 2 kg mléka na den). Krávy byly krmeny celkovou krmnou směsí sestávající se z kukuřičné siláže (337 g/kg), luštěnino-obilné siláže (58 g/kg), vojtěškové siláže (53 g/kg), kukuřičné siláže s vysokou vlhkostí (50 g/kg), pivovarského zrna (37 g/kg), pšeničné slámy (18 g/kg), tekutého doplňku (směs 50:50 melasa:glycerol, 83 g/kg) a koncentrované směsi (364 g/kg). Krmivo bylo podáváno dvakrát denně (04:00 a 16:00) *ad libitum*. S krávami bylo zacházeno v přísném souladu s českou legislativou (zákon č. 246/1992 Sb., o ochraně zvířat proti týrání) a evropskými směrnicemi a předpisy (směrnice 2010/63/EU, o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely).

Odebrané vzorky byly ihned převezeny do laboratoře v termoskách. Interval mezi odběrem a dalším zpracováním vzorku byl 20 - 30 min. V laboratoři byl obsah bacheru za průběžného proplachování CO<sub>2</sub> scezen přes nerezové síto (250 μm; Retsch, Haan, Německo), aby se získala bacherová tekutina. Bacherová tekutina dvou testovaných krav byla smíchána ve stejném poměru.

Experimentální substrát použitý ve dvou pokusech *in vitro* se skládal (v přepočtu na krmnou dávku) z: kukuřičné siláže (300 g/kg), vojtěškové siláže (300 g/kg) a ječmene (400 g/kg). Sušená krmiva byla rozemleta tak, aby prošla 1 mm sítím. Chemické složení na kg substrátu (na bázi krmné dávky) bylo následující: organická hmota 951 g/kg, hrubý protein 154

g/kg, éterový extrakt 25 g/kg, škrob 306 g/kg, neutrálně detergentní vláknina (NDF) 354 g/kg a acidodetergentní vláknina (ADF) 193 g/kg.

### 4.3 In vitro inkubace

Inkubace *in vitro* probíhaly po dobu 24 hodin ve 120-ml lahvích se sérem. Sušený mletý substrát (200 mg) byl den před inkubací navážen do sterilních lahví na sérum, proplachovaných CO<sub>2</sub>. Kultivační tekutina (20 ml) byla dávkována do každé lahve se sérem pomocí dávkovače na víčka lahví (Calibrex 530 salutae, Socorex, Švýcarsko) pod proudem CO<sub>2</sub>. Kultura byla připravena smícháním složené bachorové tekutiny s médiem (1:3, v/v) připraveným podle Menke et al. (1979). Výsledná směs byla před zahájením plnění lahví okamžitě zplynována CO<sub>2</sub> při teplotě 39 °C po dobu 10 minut. Dusičnan sodný a MCFA byly do lahví dodávány přidáním 200 µl filtrem sterilizované destilované vody, resp. zásobního roztoku ethanol, aby bylo dosaženo požadované koncentrace ve 20 ml kultivační tekutiny. Do kontrolních a slepých lahví bylo přidáno ekvivalentní množství vody a ethanolu, aby se kompenzoval případný vliv rozpouštědel na fermentaci. Počáteční plynou fází v horním prostoru lahve byl při všech inkubacích pouze CO<sub>2</sub>. Všechny lahve se sérem byly uzavřeny a umístěny do vodní lázně s kontrolovanou teplotou (SW 22, Julabo, Německo) při 39 °C a frekvenci třepání 90 otáček za minutu po dobu 24 hodin.

### 4.4 Odběr vzorků a chemická analýza

Celkový objem produkovaného plynu byl odhadnut z tlaku plynu v horním prostoru lahve pomocí rovnice Boylova zákona (Romero-Peréz et al. 2018). Tlak v plynu v horním prostoru byl měřen pomocí manometru (Traceable, Fisher Scientific, Pittsburgh, USA) po 24 h inkubace. Poté byl odebrán vzorek plynu v horním prostoru vytěsněním do zkumavky (5 ml) předem naplněné destilovanou vodou zavedením jehly o průměru 23 přes zátku láhve. Koncentrace CH<sub>4</sub> v horním prostoru lahve plynu byla měřena plynovou chromatografií (Joch et al. 2019).

Koncentrace jednotlivých TMK v kulturách byly analyzovány plynovou chromatografií (Joch et al. 2019). Koncentrace TMK byly vypočteny jako rozdíl mezi koncentracemi ve vzorku tekutiny po 24 hodinách inkubace s počátečními koncentracemi. Proto byly uváděny jako čistá produkce TMK. Koncentrace amoniaku-N v kulturách byly stanoveny indofenolovou metodou (Weatherburn 1967). Zdánlivý úbytek sušiny byl stanoven gravimetricky rozdílem mezi hmotností inkubovaného substrátu a hmotností sušiny fermentačního zbytku normalizovaného k hmotnosti zbytku ve slepém pokusu (Joch et al. 2019).

### 4.5 Statistická analýza

Hlavní účinek ošetření byl analyzován pomocí PROC MIXED programu SAS (SAS Enterprise Guide 6.1, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) podle randomizovaného kompletního blokového uspořádání. Blokovacím faktorem byla série (n = 3). Před statistickou analýzou byly

zprůměrovány technické replikátory (paralelní lahve s každým ošetřením) pro každou sérii. Model byl následující:  $Y_{ij} = \mu + T_i + R_j + e_{ij}$ .

Kde  $Y_{ij}$  je závislá proměnná,  $\mu$  je celkový průměr,  $T_i$  je fixní efekt ošetření ( $i = 12$  úrovní; kontrola, dusičnan sodný a 10 kombinací dusičnanu sodného s MCFA),  $R_j$  je náhodný efekt série ( $j = 1, 2$  a  $3$ ) a  $e_{ij}$  je reziduální chyba. Průměry ošetření byly porovnány s kontrolou pomocí Dunnettovy úpravy a rozdíly mezi jednotlivými ošetřeními a kontrolou byly prohlášeny za významné při  $P < 0,05$ .

## 5 Výsledky

V tabulce č. 3 můžete vidět vliv MCFA a dusičnanů na produkci plynu a CH<sub>4</sub> *in vitro*, zjevný účinek sušiny (aDMd), koncentraci amoniaku-N a pH.

Vysvětlivky: † je celková produkce plynů; ‡ zdánlivý úbytek sušiny; § inkubovaná sušina; ¶ čistá produkce TMK; \* znamená, že se průměrné hodnoty v rámci sloupce významně liší (P < 0,05) od odpovídající kontroly (0 mg/l); SEM je standardní chyba průměru.

### 5.1 Vliv na produkci metanu

Tabulka č. 3 Vliv na CH<sub>4</sub>

Treatment Concentration (mg/L)	TGP <sup>†</sup> (mL/g DMi <sup>§</sup> )	Methane				aDMd <sup>‡</sup> (g/g)	Net NH <sub>3</sub> -N (mg/10 0 mL)	pH
		(mL/g DMi)	(% TGP)	(mL/g aDMd)	(mol/mol nVFA <sup>¶</sup> )			
Control	298.7	36.5	12.22	57.6	0.2125	0.6345	13.1	5.90
Nitrate	289.3*	30.2*	10.42*	48.1*	0.1746	0.6313	20.7*	6.06*
C8	286.6*	27.7*	9.64*	42.4*	0.1599*	0.6539	20.9*	6.06*
C10	263.8*	21.9*	8.29*	34.6*	0.1498*	0.6372	24.7*	6.27*
C12	282.8*	27.9*	9.84*	43.7*	0.1592*	0.6405	21.0*	6.13*
C14	291.7	30.7*	10.51*	51.9*	0.1727	0.5923*	21.3*	6.08*
C8/C10	277.9*	25.7*	9.23*	39.3*	0.1825	0.6569	24.0*	6.18*
C8/C12	284.0*	26.9*	9.48*	41.2*	0.1678*	0.6565	20.9*	6.13*
C8/C14	288.8*	29.1*	10.06*	45.6*	0.1637*	0.6402	22.4*	6.05*
C10/C12	271.0*	24.0*	8.88*	38.4*	0.1478*	0.6315	22.7*	6.20*
C10/C14	278.8*	26.1*	9.36*	41.0*	0.1511*	0.6383	21.2*	6.15*
C12/C14	283.1*	27.9*	9.85*	45.2*	0.1548*	0.6184	21.9*	6.09*
SEM	2.53	0.6507	0.1632	1.218	0.00484	0.00517	0.9318	0.0204
P-value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.0098	0.0021	<0.001	<0.001

Z Tabulky č. 3 můžete vidět, že použití dusičnanu mělo významný vliv na celkovou produkci plynů, také na produkci metanu, koncentraci amoniaku i pH. Na účinek sušiny neměly dusičnany významný vliv oproti kontrole. Použití C<sub>8</sub> mělo také statisticky významný vliv na celkovou produkci plynů, produkci metanu, koncentraci amoniaku a pH. Na účinek sušiny neměla C<sub>8</sub> statistický vliv oproti kontrole. C<sub>10</sub> měla rovněž statistický vliv na produkci plynů, produkci metanu, koncentraci amoniaku a pH. Opět se neprokázal statisticky významný vliv na účinek sušiny. Použití C<sub>12</sub> mělo statistický vliv oproti kontrole na celkovou produkci plynů, produkci metanu, koncentraci amoniaku a pH. C<sub>12</sub> neměla významný vliv oproti kontrole na

účinek sušiny. C<sub>14</sub> neměla významný vliv na celkovou produkci plynů. Měla však statistický vliv na produkci metanu, zjevný účinek sušiny, koncentraci amoniaku i pH oproti kontrole.

Kombinace C<sub>8</sub> a C<sub>10</sub> měla významný vliv na celkovou produkci plynů, produkci metanu, koncentraci amoniaku a pH. Neměla však statisticky významný vliv na zjevný účinek sušiny oproti kontrole. Kombinace C<sub>8</sub> a C<sub>12</sub> měla statisticky významný vliv na celkovou produkci plynů, produkci metanu, koncentraci amoniaku a pH. Oproti kontrole však neměla vliv na zjevný účinek sušiny. Kombinace C<sub>8</sub> a C<sub>14</sub> měla významný vliv oproti kontrole na celkovou produkci plynů, produkci metanu, koncentraci amoniaku i pH. Tato kombinace neměla vliv na zjevný účinek sušiny oproti kontrole.

Kombinace C<sub>10</sub> a C<sub>12</sub> měla významný vliv na celkovou produkci plynů, produkci metanu, koncentraci amoniaku a pH. Neměla ale vliv na zjevný účinek sušiny. Kombinace C<sub>10</sub> a C<sub>14</sub> měla totožné výsledky s předchozí kombinací. Tedy že byl statistický vliv na produkci plynů, produkci metanu, koncentraci amoniaku a pH. Nebyl pozorován významný vliv oproti kontrole u zjevného účinku sušiny. Kombinace C<sub>12</sub> a C<sub>14</sub> měla opět statistický vliv na produkci plynů, produkci metanu, koncentraci amoniaku a pH. Ani tato kombinace však neměla významný vliv na zjevný účinek sušiny.

## 5.2 Vliv na produkci TMK

V tabulce č. 4 jsou znázorněny účinky MCFA a dusičnanů na produkci a podíl TMK *in vitro*.

Vysvětlivky: † je čistá produkce TMK; ‡ je poměr acetát:propionát; \* znamená, že se průměrné hodnoty v rámci sloupce významně liší ( $P < 0,05$ ) od odpovídající kontroly (0 mg/l); SEM je standardní chyba průměru.

Tabulka č. 4 Vliv na TMK

Treatment Concentration (mg/L)	nVFA <sup>†</sup> (mmol/L)	Molar proportion of VFA (mol/100 mol)						A:P <sup>‡</sup>
		Acetate	Propionate	Butyrate	iso-butyrate	Valerate	iso-valerate	
Control	67.4	60.5	20.7	10.9	0.8	4.9	2.2	3.0
Nitrate	67.9	62.9	20.0	9.5*	0.9	4.5	2.2	3.2
C8	68.1	61.1	21.6	10.3	0.9	4.0*	2.1	2.9
C10	57.8	54.9*	20.1	14.4*	1.3	6.7*	2.6*	2.8
C12	68.5	61.2	20.3	10.0	1.3	5.1	2.2	3.1
C14	71.1	62.1	20.3	9.5*	1.1	4.7	2.3	3.1
C8/C10	60.0	60.1	20.0	12.0	0.4	5.2	2.3	3.1
C8/C12	65.4	60.1	21.4	10.6	0.7	4.9	2.2	2.8
C8/C14	70.1	60.5	21.5	9.9	1.7	4.3	2.2	2.8
C10/C12	64.0	57.3	21.8	11.6	1.2	5.8*	2.3	2.7
C10/C14	67.9	59.4	21.4	10.5	1.5	4.9	2.1	2.8
C12/C14	70.9	60.7	21.3	9.5*	1.5	4.9	2.1	2.8
SEM	1.6500	0.3964	0.3285	0.3081	0.1095	0.1918	0.08379	0.0529
P-value	0.0306	<0.001	0.0669	<0.001	0.1975	<0.001	0.0132	0.0653

Z Tabulky č. 4 můžeme vyčíst, že použití dusičnanů nemá vliv na čistou produkci TMK, acetát, propionát, iso-butyrát, valerát, iso-valerát, ani na poměr acetátu a propionátu. Má ale významný vliv na butyrát oproti kontrole. Použití C<sub>8</sub> nemá vliv na čistou produkci TMK, acetát, propionát, butyrát, iso-butyrát, iso-valerát, ani na poměr acetát a propionát. Nicméně má významný vliv na valerát oproti kontrole. C<sub>10</sub> nemá vliv na čistou produkci TMK. Má ale statistický vliv na acetát, butyrát, valerát a iso-valerát. Opět ale nemá významný vliv na poměr acetátu a propionátu, iso-butyrátu a propionátu oproti kontrole. Použití C<sub>12</sub> nemá v této souvislosti statisticky významný vliv oproti kontrole na žádný ze sledovaných znaků. C<sub>14</sub> má významný vliv oproti kontrole na butyrát.

Kombinace C<sub>8</sub> a C<sub>10</sub> nezaznamenala významný vliv ani kombinace C<sub>8</sub> a C<sub>12</sub>. Stejného výsledku došla i kombinace C<sub>8</sub> a C<sub>14</sub>.

Kombinace C<sub>10</sub> a C<sub>12</sub> měla statistický vliv pouze na butyrát. Kombinace C<sub>10</sub> a C<sub>14</sub> také nezaznamenala významné vlivy oproti kontrole. Nakonec kombinace C<sub>12</sub> a C<sub>14</sub> měla významný vliv na butyrát oproti kontrole.

## 6 Diskuze

Diplomová práce se zabývá antimikrobiálními účinky mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem (MCFA) na zvýšení efektivity bachorové fermentace. Předpokládalo se, že vybrané MCFA a jejich kombinace sníží *in vitro* produkci metanu bez negativního vlivu na jiné parametry bachorové fermentace. Výsledky studie ukazují, použití mastných kyselin v kombinaci s dusičnany snižuje produkci metanu *in vitro*. Konkrétně všechny mastné kyseliny a jejich kombinace mají vliv na produkci metanu. A také C<sub>8</sub>, C<sub>10</sub>, C<sub>14</sub>, C<sub>10</sub>/C<sub>12</sub> a C<sub>12</sub>/C<sub>14</sub> mají vliv na jednotlivé těkavé mastné kyseliny. Nejvíce TMK ovlivňovala C<sub>10</sub>.

### 6.1 Mastné kyseliny

V zájmu rozšíření škály možností potlačení metanogeneze a populace prvoků pomocí MCFA byly zjišťovány účinky různých zdrojů tuků s vysokým obsahem MCFA. Zkoumal se vliv olejů obohacených o C<sub>12</sub>. V kokosovém oleji převažují C<sub>12</sub> a C<sub>14</sub>. Dohme et al. (2000) zjistil, že potlačují produkci metanu. Na tomto základě stavěl teorii, že MCFA přímo inhibují metanogenní archea. Soliva et al. (2003) testoval produkci C<sub>12</sub> a C<sub>14</sub> a jejich kombinace. Výsledkem byla snížená produkce metanu a počet bachorových metanogenů. Samostatné použití C<sub>14</sub> nevykazovalo potlačení bachorové metanogeneze. Ve směsi s C<sub>12</sub> už byl rozdíl znatelný. Citlivost mikrobů vůči určitým MCFA je určena strukturou jejich buněčné stěny. Prvoci a gram-pozitivní archea jsou inhibována dříve, než gram-negativní mikroby (Dohme et al. 2000; Machmüller et al. 2006). Po inhibici některých bachorových mikrobů se zvýšil obsah vodíku. De Raphélis-Soissan (2014) uvažuje využití vodíku na tvorbu propionátu, butyrátu, valerátu a metanu. Nicméně v bachoru existují i další akceptory vodíku. Hristov et al. (2015) a Soliva et al. (2003) uvádějí, že kombinace C<sub>12</sub> a C<sub>14</sub> vykazuje silné účinky v produkci metanu v bachoru. To potvrzuje i naše studie, která prokázala významné rozdíly oproti kontrolnímu vzorku. C<sub>12</sub> a C<sub>14</sub> snižují počty protozoí v bachoru a inhibují produkci metanogenů.

Studie Soliva et al. (2003) testovala účinky kombinací C<sub>12</sub> a C<sub>14</sub>. Ukázalo se, že přídavek samostatné C<sub>12</sub> neměl výrazný vliv na snížení metanogeneze, což mohlo být způsobeno krátkou inkubační dobou. Naopak zmínění autoři prokázali, že přídavek C<sub>14</sub> potlačuje tvorbu metanu o 12 % ve srovnání s kontrolní dietou bez tohoto přídatku. Pokud se C<sub>14</sub> přidala v podílu 5 % do krmné dávky, měla za následek potlačení metanu u ovcí až o 58 % při krmení po dobu 22 dní (Machmüller et al. 2006). Podle Dohme et al. (2000) se použití C<sub>14</sub> zdá být méně účinné oproti C<sub>12</sub>, která zaručuje maximální potlačení metanu. Zdá se tedy mnohem slibnější pro použití ve výživě zvířat.

Studie Soliva et al. (2003) dospěla k výsledku inhibice celkového počtu archeí o 78 % díky použití C<sub>12</sub>. Podání C<sub>14</sub> snížilo počty archeí o 31 %. Newbold et al. (2014) prokázali citlivost prvoků na C<sub>12</sub> a C<sub>14</sub>. Jak bylo zjištěno studií Pickering et al. (2015), metan je závislý na pH. Nicméně pH v bachoru závisí na několika procesech (intenzita fermentačních procesů, podíl škrobu v potravě, salivace, příjem vody, absorpce TMK).

Machmüller et al. (2006) zkoumal vliv minerálních látek na supresi metanu za použití C<sub>12</sub>. Údaje naznačují, že hladina vápníku v potravě může modifikovat účinek MCFA na bachorovou metanogenezi. Průměrné denní uvolňování metanu se snížilo o 76 % s přídatkem C<sub>12</sub>.



Metan potlačující účinky MCFA byly zkoumány *in vitro* za použití krmiva s vysokým obsahem strukturních sacharidů a krmiva s nízkým obsahem strukturních sacharidů. Nejlepší účinek na potlačení metanu měly MCFA v dietě s nízkým obsahem strukturních sacharidů (Machmüller 2006). V rámci projektů Machmüller et al. (2006) byl účinek MCFA na metan podmíněn obsahem vlákniny a vápníku v dietě. V souvislosti s tímto faktem, bylo zjištěno snížení množství metanu na polovinu za použití 2,7 % MCFA v krmné dávce. Soliva et al. (2003) a Machmüller et al. (2006) prokázali, že C<sub>14</sub> je slibnou komponentou pro potlačení emisí metanu. Po dobu 5 let přidávali C<sub>14</sub> do krmiva a mělo to za následek snížení emisí metanu o 58 %. C<sub>14</sub> však byla méně účinná v dietách s vysokým podílem pícnin. Je proto potřeba zohlednit tuto skutečnost při sestavování krmných dávek.

Podle Dohme et al. (2001) může použití C<sub>12</sub> a C<sub>14</sub> v krmné dávce výrazně ovlivnit produkci metanu. Machüller et al. (2002) a Hristov et al. (2015) uvádějí účinky C<sub>12</sub> na produkci amoniaku. I tato informace je v souladu s výsledky naší studie. Podle studie Zeitz et al. (2013) jsou C<sub>12</sub> a C<sub>14</sub> anitmetanogenní. Obecně platí, že čisté zdroje mastných kyselin se středním řetězcem včetně C<sub>12</sub> a C<sub>14</sub> a jejich kombinace vykazují větší inhibiční účinky na produkci metanu (Patra & Yu 2014; Soliva et al. 2003; Van Zijderveld et al. 2011). Všechny námi zkoumané kyseliny (C<sub>8</sub>, C<sub>10</sub>, C<sub>12</sub>, C<sub>14</sub>) podpořily tuto teorii. Ve studii Zeitz et al. (2013) bylo zjištěno, že antimetanogenní účinek mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem klesal s rostoucí délkou řetězce. Tento klesající trend je patrný z tabulky č. 3. Podle Zeitz a kol. (2013) neměla C<sub>8</sub> žádný antimetanogenní účinek, což potvrzuje i studie (Dohme et al. 2001). V našich výsledcích bylo zjištěno, že účinky C<sub>8</sub> na produkci metanu jsou statisticky významné. Studie Dohme et al. (2000) také uvádí, že nejnižší pH bylo při použití C<sub>12</sub>. Z našich výsledků ale vyplývá, že s narůstající délkou řetězce roste i pH. Dohme et al. (2000) dále uvádí, že účinky MCFA na celkovou produkci TMK byly podobné u všech vzorků, kromě C<sub>10</sub>. To může potvrdit i naše studie, neboť C<sub>10</sub> měla ze všech MK nejnižší hodnotu. Podle Dohme et al. (2000) přidání C<sub>10</sub> do krmiva vede ke zvýšenému obsahu acetátu, valerátu a butyrátu. S tím korelují naše výsledky z tabulky č. 4.

## 6.2 Dusičnany

V poslední době bylo publikováno několik studií, které jasně hovoří o vlivu dusičnanů na snižování produkce metanu. Například Lee & Beauchemin (2014), nebo studie Leng (2008). Stejného výsledku se dobrala i naše studie. Jak je vidět z tabulky č. 3, dusičnany významně ovlivňují produkci metanu oproti kontrole.

Výzkum by se měl zaměřit na maximální snížení emisí metanu při příjmu dusičnanů. Důležité je zajistit konverzi dusičnanů na amoniak (Yang et al. 2016). Patra & Yu (2014) prokázali *in vitro*, že kombinace dusičnanů se saponiny a sírany potlačují produkci metanu. Maximální snížení emisí bylo v tomto případě téměř 46 %. Leng (2014) provedl přehled publikovaných studií a prokázal negativní vztah mezi dusičnany v dietě a emisemi metanu. Výsledkem byl fakt, že emise metanu klesají od 100 do 60 % se zvyšujícím se obsahem dusičnanů v dietě. Tato informace podporuje naše tvrzení. Z tabulky č. 3 je patrné, že přidání dusičnanů statisticky významně ovlivnilo produkci metanu. Přidání dusičnanů do krmné dávky nemělo statisticky významný vliv na propionát oproti kontrolnímu vzorku. Těchto výsledků se

dobrala i studie od Latham et al. (2016). Podle nich přídávky dusičnanů do krmné dávky nemají žádný vliv na produkci propionátu, nebo ho nepatrně navyšují.

Studie Zhou et al. (2011) potvrdila zjištění z předchozích studií (Bozic et al. 2009; Sar et al. 2005; Zhou et al. 2011), že je produkce metanu potlačena přidáním dusičnanu. Inhibice produkce metanu byla přisuzována toxicitě dusitanů pro metanogeny (Bozic et al. 2009, Sar et al. 2005). Podle Zhou et al. (2011) mělo podávání dusičnanů za následek zvýšení pH, což odpovídá i výsledkům naší studie. Naopak ale tvrdí, že dusičnany snižují koncentraci TMK. Také tvrdí, že přídavek dusičnanů do krmné dávky má ve finále vliv na zvýšení poměru acetát:propionát. Dále uvádí, že se zvýšil acetát, což koreluje s tabulkou č. 4. Zhou et al. (2011) uvádí, že při 48 mol ml<sup>-1</sup> se koncentrace propionátu snížila téměř o 76,9 %. V naší studii je pozorováno statisticky významné snížení produkce butyrátu. To dokládá i studie Zhou et al. (2011), na druhé straně studie Anderson et al. (2010) tvrdí, že přídavkem nitrosloučenin se produkce propionátu sníží.

Přídavek dusičnanů *in vitro* má podle Bozic et al. (2009) a Patra & Yu (2014) vliv na sníženou produkci metanu a propionátu, přičemž někdy zvyšoval celkovou produkci TMK. To naprosto přesně odpovídá našim výsledkům. Použití dusičnanů mělo statisticky významné rozdíly. Vliv dusičnanů na propionát neměl tak významné rozdíly, nicméně i tak je z tabulky č. 4 patrné snížení.

Zhou et al. (2011) uvádí snížení koncentrace valeranu za použití dusičnanů, což je patrné i z našich výsledků. Co se týče výsledků iso-valeratu, tak nebyl ovlivněn v žádném šetření. Naopak ohledně produkce iso-butyřátu, se naše výsledky rozcházejí. Zjevný účinek sušiny zůstal při tomto testování nezměněn.

Yang et al. (2016) v jiné studii zkoumali vliv 24 hodinového podávání dusičnanů na příjem sušiny a produkci metanu. Dusičnany snížily produkci metanu *in vivo* o 31 %, nicméně po ukončení přídávku dusičnanů se produkce metanu opět zvýšila. Přídavek dusičnanů výrazně neovlivnil bachorovou fermentaci a pH, ani produkci TMK, ale snížil produkci metanu.

Kombinace dusičnanů se saponiny, nebo sírany aditivně snížila produkci metanu. Nejnižší hodnoty metanu (45,7 % deprese) zaznamenala kombinace všech tří složek (Patra & Yu 2014). Přídavek samotného dusičnanu zajišťoval 32 % depresi. V porovnání s kontrolou se poměr acetátu k propionátu významně liší. Naše výsledky ukazují, že tam je jen nepatrný rozdíl. Byly však zjištěny snížené koncentrace propionátu a butyrátu v reakci na dusičnany (Sar et al. 2005; Patra & Yu 2014). Pouze kombinace dusičnanu se saponinem vedla ke zvýšení butyrátu a propionátu a ke snížení poměru acetát:propionát. Samotný dusičnan měl za následek významně vyšší koncentraci amoniaku. Tato informace potvrzuje výsledky naší studie.

## 7 Závěr

- Cílem této diplomové práce bylo potvrdit zadanou hypotézu: Antimikrobiální účinky mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem (MCFA) zvýší efektivitu bachorové fermentace.
- Tato práce prokázala, že mastné kyseliny se střední délkou řetězce mohou snižovat produkci CH<sub>4</sub> *in vitro*. Tím byla potvrzena hlavní hypotéza. Účinky mastných kyselin byly rozdílné v závislosti na typu a případné kombinaci mastných kyselin.
- Všechny mastné kyseliny (ať už samostatně, nebo jejich kombinace) spolu s dusičnanem sodným prokázaly potenciál při snižování produkce CH<sub>4</sub>. Největší vliv na TMK (acetát, butyrát, valerát, iso-valerát) měla C<sub>10</sub>.

## 8 Literatura

- Ajisaka N, Mohammed N, Hara K, Mikuni K, Hara K, Hashimoto H, Kumata T, Kanda S, Itabashi H. 2002. Effects of medium-chain fatty acid-cyclodextrin complexes on ruminal methane production *in vitro*. *Animal Science Journal*. **73**: 479-484.
- Alaboudi AR. 1984. Microbiological Studies of Nitrate and Nitrite Reduction in the Ovine Rumen. PhD dissertation, University of Saskatchewan, Saskatoon.
- Alaboudi AR, Jones GA. 1985. Effect of acclimation to high nitrate intakes on some rumen fermentation parameters in sheep. *Can. J. Anim. Sci.* **65**: 841-849. doi: 10.4141/cjas85-099.
- Allison MJ, Reedy CA. 1984. „Adaptations of gastrointestinal bacterie in response to changes in dietary oxolate and nitrate, „ in *Current Perspectives in Microbial Ecology*, Proc. 3rd Int. Symp. On Microbial Ecology. Eds Klug MJ and Reedy CA (Washington, DC: American Society for Microbiology), 248–256. Available online at: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US8605628>
- Aluko RE. 2011. 4.41 – Plant Derived Bioactives. Academic Press. Winnipeg.
- Anderson RC, Callaway TR, Van Kessel JAS, Jung YS, Edrington TS and Nisbet DJ. 2003. Effect of select nitrocompounds on ruminal fermentation; an initial look at their potential to reduce economic and environmental costs associated with ruminal methanogenesis. *Bioresour. Technol.* **90**, 59–63. doi: 10.1016/S0960-8524(03)00086-5
- Anderson RC, Carstens GE, Miller RK, Callaway TR, Schultz CL, Edrington TS et al. 2006. Effect of oral nitroethane and 2-nitropropanol administration on methane-producing activity and volatile fatty acid production in the ovine rumen. *Bioresour. Technol.* **97**, 2421–2426 doi: 10.1016/j.biortech.2005.10.013
- Anderson RC, Huwe JK, Smith DJ, Stanton TB, Krueger NA, Callaway TR et al. 2010. Effect of nitroethane, dimethyl-2-nitroglutarate and 2-nitro-methyl-propionate on ruminal methane production and hydrogen balance *in vitro*. *Bioresour. Technol.* **101**, 5345–5349. doi: 10.1016/j.biortech.2009.11.108
- Anderson RC, Krueger NA, Stanton TB, Callaway TR, Edrington TS, Harvey RB et al. 2008. Effects of select nitrocompounds on *in vitro* ruminal fermentation during conditions of limiting or excess added reductant. *Bioresour. Technol.* **99**, 8655–8661. doi: 10.1016/j.biortech.2008.04.064
- Anderson RC, Majak W, Rassmussen MA, Callaway TR, Beier RC, Nisbet DJ et al. 2005. Toxicity and metabolism of the conjugates of 3-nitropropanol and 3-nitropropionic acid in forages poisonous to livestock. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 2344–2350. doi: 10.1021/jf040392j

Asanuma N, Iwamoto M, Kawato M, and Hino T. 2002. Numbers of nitrate-reducing bacteria in the rumen as estimated by competitive polymerase chain reaction. *Anim. Sci. J.* 73, 199–205. doi: 10.1046/j.1344-3941.2002.00028.x

Asanuma N, Yokoyama S, and Hino T. 2015. Effects of nitrate addition to a diet on fermentation and microbial populations in the rumen of goats, with special reference to *Selenomonas ruminantium* having the ability to reduce nitrate and nitrite. *Anim. Sci. J.* 86, 378–384. doi: 10.1111/asj.12307

Attwood GT, Altermann E, Kelly WJ, Leahy SC, Zhang L, Morrison M. 2011. Exploring rumen methanogen genomes to identify targets for methane mitigation strategies. *Anim. Feed Sci. Technol. Special Issue: Greenhouse Gases in Animal Agriculture – Finding a Balance between Food and Emissions.* 166-167. 65-75.

Baltiç B, Starčević M, Dordevič J, Mrdovič B, Marković R. 2017. Importance of medium chain fatty acids in animal nutrition. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science.* 85. Available from <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/85/1/012048/meta>.

Beare-Rogers JL, Dieffenbacher A, Holm JV. 2007. *Lexicon of lipid nutrition (IUPAC Technical Report).* Pure and Applied Chemistry. 73(4): 685-744. <https://doi.org/10.1351/pac200173040685>.

Beauchemin KA, Kreuzer M, O'Mara F, McAllister TA. 2008. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. *Aust. J. Exp. Agric.* 48: 21-27.

Beauchemin KA, McAllister TA, McGinn SM. 2009. Dietary mitigation of enteric methane from cattle. *CAB Rev. Perspect. Agric. Vet. Sci. Nutr. Nat. Resour.* 4: 1-18.

Belanche A, de la Fuente G, Newbold CJ. 2014. Study of methanogen communities associated with different rumen protozoal populations. *FEMS Microbiol. Ecol.* 90: 663-677.

Besbes S, Blecker C, Deroanne C, Drira NE, Attia H. 2004. Date seeds: Chemical composition and characteristic profiles of the lipid fraction. *Food Chemistry* 84(4): 577-584. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00281-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00281-4).

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. *Anim. Feed Sci. Technol. Special Issue: Plant Bioactive Compounds in Ruminant Agriculture – Impacts and Opportunities.* 176: 78-93.

Bozic AK, Anderson RC, Carstens GE, Ricke SC, Gallaway TR, Yokoyama MT, Wang JK, Nisbet DJ. 2009. Effects of the methane-inhibitors nitrate, nitroethane, lauric acid, Lauricidin

and the Hawaiian marine algae *Chaetoceros* on ruminal fermentation *in vitro*. *Bioresour. Technol.* **100**. pp 4017-4025.

Brulc JM, Antonopoulos DA, Miller MEB, Wilson MK, Yannarell AC, Dinsdale EA., et al. 2009. Gene-centric metagenomics of the fiber-adherent bovine rumen microbiome reveals forage specific glycoside hydrolases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 1948–1953. doi: 10.1073/pnas.0806191105

Busquet M, Calsamiglia S, Ferret A, Kamel C. 2006. Plant extracts affect *in vitro* rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* **89**: 761-771.

Caetano-Anollés SG, Kim KM. 2014. The origin and evolution of the archaeal domain. *Archaea*. 2014, e915828.

Calder PC. 2015. Docosahexaenoic acid. *Annals of Nutrition and Metabolism.* **69**: 8-21. available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27842299/>.

Capper JL. 2011. The environmental impact of beef production in the United States: 1977 compared with 2007. *J. Anim. Sci.* **89**: 4249-4261.

Capper JL, Cady RA, Baumann DE. 2009. The environmental impact of dairy production: 1944 compared with 2007. *J. Anim. Sci.* **87**: 2160-2167.

Cersosimo LM, Wright ADG. 2015. Rumen Methanogens, in: Punia AK, Wingham R, Kamra DN. *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution*. Springer India. 143-150.

Chen X, Zhao X, Deng Y, Bu X, Ye H, Guo N. 2019. Antimicrobial potential of myristic acid against *Listeria monocytogenes* in milk. *Journal of Antibiotics.* **72**(5): 298-305. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01632>.

Choudhury PK, Salem AZM, Jena R, Kumar S, Singh R, Puniya AK. 2015. Rumen Microbiology: An Overview, in: Kamra DN. *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution*. Springer India. 3-16.

Czerkawski JW, Blaxter KL, Wainman FW. 1966. The effect of linseed oil and of linseed oil fatty acids incorporated in the diet on the metabolism of sheep. *British Journal of Nutrition.* **20**(3): 485-494.

Desbois AP, Smith VJ. 2010. Antibacterial free fatty acids: Activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology.* **85**(6): 1629-1642. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2355-3>.

de Raphélis-Soissan V, Li L, Godwin IR, Barnett MC, Perdok HB, and Hegarty RS. (2014). Use of nitrate and *Propionibacterium acidipropionici* to reduce methane emissions and

- increase wool growth of Merino sheep. *Anim. Prod. Sci.* 54, 1860–1866. doi: 10.1071/AN14329
- Dijkstra J, Forbes JM, France J. 2005. Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism. DOI: 10.3168/jds.2013-7499
- Dohme F, Machmüller A, Wasserfalle A, Kreuzer M. 2000. Comparative efficiency of various fats rich in mediumchain fatty acids to suppress ruminal methanogenesis as measured with Rusitec. *Can. J. Sci.* **80**: 473-482.
- Dohme F, Machmüller A, Wasserfalle A, Kreuzer M. 2001. Ruminal methanogenesis as influenced by individual fatty acids supplemented to complete ruminant diets. *Lett. Appl. Microbiol.* **32**: 47-51.
- Doreau M, Chilliard Y. 1997. Digestion and metabolism of dietary fat in farm animals. *Br. J. Nutr.* **78**: S15-S35.
- Embley TM, Van der Giezen M, Horner DS, Dyal PL, Bell S, Foster PG. 2003. Hydrogenosomes, mitochondria and early eukaryotic evolution. *IUBMB Life.* **55**: 387-395.
- Eugène M, Massé D, Chiquette J, Benchaar C. 2008. Meta-analysis on the effects of lipid supplementation on methane production in lactating dairy cows. *Can. J. Anim. Sci.* **88**: 331-337.
- FAO. 2006. Livestock's Long Shadow: Environmental Issues and Options. Report of the Food and Agriculture Organization of the United Nation.
- FAO. 2008. Fats and afatty acids in human nutrition: report of an expert consultation: 10-14 November, Geneva. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2010. FAO food and nutrition paper. 91. ISBN 978-92-5-106733-8. ISSN 0254-4725.
- Finlay BJ, Esteban G, Clarke KJ, Williams AG, Embley TM, Hirt RP. 1994. Some rumen ciliates have endosymbiotic methanogens. *FEMS Microbiol. Lett.* **117**: 157-161.
- Görtz HD. 2001. Intracellular bacteria in ciliates. *International Microbiology.* **4**: 143-150.7
- Gutierrez-Bañuelos H, Anderson RC, Carstens GE, Tedeschi LO, Pinchak WE, Cabrera-Diaz E, et al. 2008. Effects of nitroethane and monensin on ruminal fluid fermentation characteristics and nitrocompound-metabolizing bacterial populations. *J. Agric. Food Chem.* 56, 4650–4658. doi: 10.1021/jf800756c
- Hanczakowska R, Swiatkiewicz M, Natonek-Wisniewska M, Okoń K. 2016. Medium chain fatty acids (MCFA) and/or probiotic *Enterococcus faecium* as a feed supplement for piglets. *Livestock Science.* **192**: 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2016.08.002>.

- Henderson G, Cox F, Ganesh S, Jonker A, Young W, Janssen PH. 2015. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. *Sci. Rep.* **5**: 14567.
- Hibberd CA, Rehberger TG, Swartzlander J, and Parrott T. 1994. "Utilization of high nitrate forages by beef cows, dairy cows and stocker calves," in Conference Proceedings Management of High Nitrate Forages for Beef and Dairy Cattle. Available online at: [http://beefextension.com/proceedings/nitrates93/nitrates93\\_f.pdf](http://beefextension.com/proceedings/nitrates93/nitrates93_f.pdf)
- Hill J, Mc Sweeney C, Wright ADG, Bishop-Hurley G, Kalantar-Zadeh K. 2016. Measuring methane production from ruminants. *Trends Biotechnol.* **34**: 26-35.
- Hook SE, Wright ADG, McBride BW. 2010. Methanogens: methane producers of the rumen and mitigation strategies. *Archaea.* 945785.
- Hristov AN, Oh J, Giallongo F, Frederick TW, Harper MT, Weeks HL, et al. 2015. An inhibitor persistently decreased enteric methane emission from dairy cows with no negative effect on milk production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **112**, 10663–10668. doi: 10.1073/pnas.1504124112
- Huber R, Bikker R, Welz B, Christmann M, Brand K. 2017. TNF tolerance in monocytes and macrophages: Characteristics and molecular mechanism. *Journal of Immunology Research.* <https://doi.org/10.1155/2017/9570129>
- IPCC. 2007. Summary for Policymakers, in: Solomon S, Quin D, Manning M, Chen Z, Marquis M, Averyt KB, Tignor M, Miller HL. *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.* Cambridge University Press.
- Ivan M, Mir PS, Mir Z, Entz T, He ML, McAllister TA. 2004. Effects of dietary sunflower seeds on rumen protozoa and growth of lambs. *Br. J. Nutr.* **92**: 303-310.
- Iwamoto M, Asanuma N, and Hino T. 2001. Effects of protozoa on nitrate and nitrite reduction in ruminal microbiota. *Kanto J. Anim. Sci.* **51**, 9–15.
- Iwamoto M, Asanuma N, and Hino T. 2002. Ability of *Selenomonas ruminantium*, *Veillonella parvula*, and *Wolinella succinogenes* to reduce nitrate and nitrite with special reference to the suppression of ruminal methanogenesis. *Anaerobe* **8**, 209–215. doi: 10.1006/anae.2002.0428
- Jackman JA, Boyd RD, Elrod CC. 2020. Medium-chain fatty acids and monoglycerides as feed additives for pig production: towards gut health improvement and feed pathogen mitigation. *Journal of Animal Science Biotechnology.* **11**: 44. available from <https://doi.org/10.1186/s40104-020-00446-1>.



Janssen PH. 2010. Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics. Grassland Research Centre. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2010.07.002

Jelínek A, Plíva P. 2003. Emise methanu ze zemědělské činnosti. Biom.cz. 2003-08-04. <http://biom.cz/cz/odborne-clanky/emise-methanu-ze-zemedelske-cinnosti>.

Jenkins WM, Jenkins AE, Jenkins AL, Brydson C. 2020. Chapter 3 – How It Works: Mechanism of Action. Academic Press.

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.

Johnson KA, Johnson DE. 1995. Methane emissions from cattle. J. Anim. Sci. **73**: 2483-2492.

Jones, G. A. (1972). Dissimilatory metabolism of nitrate by the rumen microbiota. Can. J. Microbiol. 18, 1783–1787. doi: 10.1139/m72-279

Jouany JP, Morgavi DP. 2007. Use of „natural“ products as alternatives to antibiotic feed additives in ruminant production. Anim. Int. J. anim. Biosci. **1**: 1443-1466.

Kerr BJ, Dozier III WA, Shuron GC. 2016. Lipid digestibility and energy content of distillers' corn oil in swine and poultry. Journal of animal science. **94**: 2900-2908.

Knapp JR, Laur GL, Vadas PA, Weiss WP, Tricarico JM. 2014. Invited review: Enteric methane in dairy cattle production: Quantifying the opportunities and impact of reducing emissions. J. Dairy Sci. **97**: 3231-3261.

Kobayashi Y. 2010. Abatement of Methane Production from Ruminants: Trends in the Manipulation of Rumen fermentation. Asian-Aust. J. Anim. Sci. **23**(3): 410-416.

Koolman KH, Röhm J. 2012. Barevný atlas biochemi. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-2977-0.

Kumar A, Butt NA, Levenson AS. 2016. Natural epigenetic-modifying molecules in medical therapy. Academic Press, Mississippi.

Latham EA, Anderson RC, Pinchak WE, Nisbet DJ. 2016. Insights on Alternations to the Rumen Ecosystem by Nitrate and Nitrocompounds. Front. Microbiol. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00228>

Lee C, Araujo RC, Koenig KM, and Beauchemin KA 2015a. Effects of encapsulated nitrate on eating behavior, rumen fermentation, and blood profile of beef heifers fed restrictively or ad libitum. *J. Anim. Sci.* 93, 2405–2418. doi: 10.2527/jas.2014-8851

Lee C, Araujo RC, Koenig KM, and Beauchemin KA. 2015b. Effects of encapsulated nitrate on enteric methane production and nitrogen and energy utilization in beef heifers. *J. Anim. Sci.* 93, 2391–2404. doi: 10.2527/jas.2014-8845

Lee C, and Beauchemin KA. 2014. A review of feeding supplementary nitrate to ruminant animals: nitrate toxicity, methane emissions, and production performance. *Can. J. Anim. Sci.* 94, 557–570. doi: 10.4141/cjas-2014-069

Lee SJ, Song H. and Lee SY. 2006. Genome-based metabolic engineering of *Mannheimia succiniciproducens* for succinic acid production. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1939–1948. doi: 10.1128/AEM.72.3.1939-1948.2006

Lemarié F, Beauchamp E, Legrand P, Rioux V. 2016. Revisiting the metabolism and physiological functions of caprylic acid (C8:0) with special focus on ghrelin octanoylation. *Biochemie.* **120**: 40-48.

Lemarié F, Beauchamp E, Drouin G, Legrand P, Rioux V. 2018. Dietary caprylic acid and ghrelin O-acyltransferase activity to modulate octanoylated ghrelin functions: What is new in this nutritional field? *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids.* **135**(March): 121-127. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2018.07.009>.

Leng RA. 2008. ‘The potential of feeding nitrate to reduce enteric methane production in ruminants,’ A Report to the Department of Climate Change Commonwealth Government of Australia. Canberra, ACT.

Leng RA. 2014. Interactions between microbial consortia in biofilms: a paradigm shift in rumen microbial ecology and enteric methane mitigation. *Anim. Prod. Sci.* 54, 519–543. doi: 10.1071/AN13381

Lewis D. 1950. The reduction of nitrate by rumen bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 4, 175–180.

Lewis D. 1951. The metabolism of nitrate and nitrite in the sheep. 2. Hydrogen donors in nitrate reduction by rumen micro-organisms *in vitro*. *Biochem. J.* 49, 149–153. doi: 10.1042/bj0490149

Lieberman S, Enig MG, Preuss HG. 2006. A review of Monolaurin and Lauric Acid. *Alternative and Complementary Therapies.* 310-314.

- Lin M, Guo W, Meng QX, Stevenson DM, Weimer PJ, and Schaefer DM. 2013a. Changes in rumen bacterial community composition in steers in response to dietary nitrate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 8719–8727. doi: 10.1007/s00253-013-5143-z
- Liu H, Whitman WB. 2008. Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1125**: 171-189.
- Liu Y. 2015. Fatty acids, inflammation and intestinal health in pigs. *Journal of animal science and biotechnology.* **6**: 1-9.
- López A, Serrat J, Canero C, Graf T. 2010. Robust lane markings detection and road geometry computation. *International Journal of Automotive Technology*, **11**: 395-407.
- Machmüller A, Soliva CR, Kreuzer M. 2006. Methane-suppressing effect of myristic acid in sheep as affected by dietary calcium and forage proportion. *Br. J. Nutr.* **90**: 529-540.
- Marais JP, Therion JJ, Mackie RI, Kistner A, and Dennison C. 1988. Effect of nitrate and its reduction products on the growth and activity of the rumen microbial-population. *Br. J. Nutr.* **59**, 301–313. doi: 10.1079/BJN19880037
- Martin C, Morgavi DP, Doreau M. 2010. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal.* **4**: 351-365.
- Marvan F, Hampl A, Hložánková E, Kresan J, Massanyi L, Vernerová E. 1992. *Morfologie hospodářských zvířat*. Praha.
- McAllister TA, Cheng KJ, Okine EK, Mathison GW. 1996. Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. *Can. J. Anim. Sci.* **76**: 231-243.
- McAllister TA, Newbold CJ. 2008. Redirecting rumen fermentation to reduce methanogenesis. *Australian Journal of Experimental Agriculture.* **48** (1-2): 7-13.
- McGaw LJ, Jäger AK, Van Staden J. 2002. Antibacterial effects of fatty acids and related compounds from plants. *South African Journal of Botany.* **68**(4): 417-423.  
[https://doi.org/10.1016/S0254-6299\(15\)30367-7](https://doi.org/10.1016/S0254-6299(15)30367-7).
- McMurry J. 2004. *Organická chemie*. V Brně: VUTIUM. Překlady vysokoškolských učebnic. ISBN 978-80-214-3291-8.
- Menke KH, Raab L, Salewski A, Steingass H, Fritz D, Schneider W. 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feeding stuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor. *J Agric Sci.* **93**: 217-222.

- Mensink RP, Tock PL, Kester ADM, Katan MB. 2003. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ration of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: A meta-analysis of 60 controlled trials. *American Journal of Clinical Nutrition*. **77**(5): 1146-1155. <https://doi.org/10.1093/ajcn/77.5.1146>.
- Mitsumori M, Ajisaka N, Tajima K, Kajikawa, H, and Kurihara M. 2002. Detection of Proteobacteria from the rumen by PCR using methanotroph-specific primers. *Lett. Appl. Microbiol.* **35**, 251–255. doi: 10.1046/j.1472-765X.2002.01172.x
- Mitsumori M, Sun W. 2008. Control of Rumen Microbial Fermentation for Mitigating Methane Emissions from the Rumen. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* **21**(1): 144-154.
- Moss GP, Smith PAS, Tavernier D. 1995. Glossary of class names of organic compounds and reactive intermediates based on structure (IUPAC recommendations 1995). *Pure and Applied Chemistry*. **67**(8-9): 1307-1375. <https://doi.org/10.1351/pac199567081307>.
- Moreno-Vivián C, Cabello P, Martínez-Luque BR, Blasco R and Castillo F. 1999. Prokaryotic nitrate reduction: molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. *J. Bacteriol.* **181**, 6573–6584.
- Murray RM, Bryant AM, Leng RA. 1976. Rates of production of methane in the rumen and large intestine of sheep. *Br. J. Nutr.* **36**: 1-14.
- Nakatsuji T, Kao MC, Fang JY, Zouboulis CC, Zhang L, Gallo RL, Huang CM. 2009. Antimicrobial property of lauric acid against propionibacterium acnes: Its therapeutic potential for inflammatory acne vulgaris. *Journal of Investigative Dermatology*. **129**(10): 2480-2488. <https://doi.org/10.1038/jid.2009.93>.
- National Center for Biotechnology Information. 2021. PubChem Pathway Summary for Pathway FAOmega3And6Unsaturated. Available from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/pathway/LIPID-MAPS:FAOmega3And6Unsaturated>.
- Newbold JR, van Zijderveld SM, Hulshof RBA, Fokkink WB, Leng RA, Terencio P, et al. 2014. The effect of incremental levels of dietary nitrate on methane emissions in Holstein steers and performance in Nelore bulls. *J. Anim. Sci.* **92**, 5032–5040. doi: 10.2527/jas.2014-7677
- Okrouhlá M, Stupka R, Čítek J, Lebedová N, Zadinová K. 2018. Effect of Duration of Dietary Rapessed and Soybean Oil Feeding on Physical Characteristics, Fatty Acid Profile, and Oxidative Stability of Pig Back fat. *Animals*. **8**: 193.
- Papamandjaris AA, Macdougall DE, Jones PJH. 1998. Medium chain fatty acid metabolism and energy expenditure: Obesity treatment implications. *Life Sciences*. **62**(14): 1203-1215. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(97\)01143-0](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(97)01143-0).

- Patra AK and Yu ZT. 2014. Combinations of nitrate, saponin, and sulfate additively reduce methane production by rumen cultures *in vitro* while not adversely affecting feed digestion, fermentation or microbial communities. *Bioresour. Technol.* 155, 129–135. doi: 10.1016/j.biortech.2013.12.099
- Petersen SO, Hellwing ALF, Brask M, Højberg O, Poulsen M, Zhu Z, et al. 2015. Dietary nitrate for methane mitigation leads to nitrous oxide emissions from dairy cows. *J. Environ. Qual.* 44, 1063–1070. doi: 10.2134/jeq2015.02.0107
- Pickering NK, Oddy VH, Basarab J, Cammack K, Hayes B, Hegarty RS, Lassen J, McEwan JC, Miller S, Pinares-Patiño CS, de Haas Y. 2015. Animal board invited review: genetic possibilities to reduce enteric methane emissions from ruminants. *Animal* 9: 1431-1440.
- Poláková L, Karlová T, Šmidrkal J, Filip V. 2010. Enzymatic Synthesis of Fatty Acid Derivatives with Antimicrobial Activity and Their Use. *Chem. List.* 104: 692-696.
- Prakash D. 2014. Methyl-coenzyme M Reductase: Elucidating the Process of Activation and Study of the Effect of the Methanogenesis Inhibitor 3-Nitrooxypropanol. PhD Dissertation, Auburn University.
- Reece WO. 2011. *Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat*. Grada Publishing, Praha.
- Ricard G, McEwan NR, Dutilh BE, Jouany JP, Macheboeuf D, Mitsumori M, McIntosh FM, Michalowski T, Nagamine T, Nelson N, Newbold ChJ, Nsabimana E, Takenaka A, Thomas NA, Ushida K, Hackstein JHP, Huynen MA. 2006. Horizontal gene transfer from Bacteria to rumen Ciliates indicates adaptation to their anaerobic carbohydrates-rich environment. *BMC Genomics.* 7:22.
- Rogers K. 2020. Fatty acids. *Encyclopedia Britannica*. Available from <https://www.britannica.com/science/fatty-acid>
- Romero-Pérez A, Beauchemin KA. 2018. Estimating gas volume from headspace pressure in a batch culture system. *Canadian Journal of Animal Science.* 98(3): 593-596.
- Russell JB. 2002. *Rumen Microbiology and Its Role in Ruminant Nutrition*. James B. Russell.
- Russell JB, Wallace RJ. 1997. Energy-yielding and energy consuming reactions, in: Hobson PN, Stewart CS. *The Rumen Microbial Ecosystem*. Springer Netherlands. 246-282.
- Rustan AC, Drevon CA. 2005. *Fatty Acids: Structures and Properties*. E LS.
- Sar C, Mwenya B, Pen B, Takaura K, Morikawa R, Tsujimoto A, et al. 2005. Effect of ruminal administration of *Escherichia coli* wild type or a genetically modified strain with

enhanced high nitrite reductase activity on methane emission and nitrate toxicity in nitrate-infused sheep. *Br. J. Nutr.* 94, 691–697. doi: 10.1079/BJN20051517

Sar C, Mwenya B, Pen B, Takaura K, Morikawa R, Tsujimoto A, et al. 2006. Effect of wild type *Escherichia coli* W3110 or *Escherichia coli* nir-Ptac on methane emission and nitrate toxicity in nitrate-treated sheep. *Int. Congr. Ser.* 1293, 193–196. doi: 10.1016/j.ics.2006.03.015

Schwingshackl L, Hoffmann G. 2014. Mediterranean dietary pattern, inflammation and endothelial function: a systematic review and meta-analysis of intervention trials. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases.* 24: 929-939. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0309174018303188>.

Shi CX, Meng QX, Hou XZ, Ren LP and Zhou ZM. 2012. Response of ruminal fermentation, methane production and dry matter digestibility to microbial source and nitrate addition level in an *in vitro* incubation with rumen microbes obtained from wethers. *J. Anim. Vet. Adv.* 11, 3334–3341. doi: 10.3923/javaa.2012.3334.3341

Silivong P, Preston TR and Van Man N. 2012. Effect of supplements of potassium nitrate or urea as sources of NPN on methane production in an *in vitro* system using molasses and Paper mulberry or *Muntingia* foliages as the substrate. *Livest. Res. Rural Dev.* 17, 4–12.

Sobley C, Cymet T. 2016. „Saturated fat“. *Encyclopedia Britannica*. Available from <https://www.britannica.com/science/saturated-fat>.

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(1): 35-39.

Sopheha IV, and Preston TR. 2011. Effect of different levels of supplementary potassium nitrate replacing urea on growth rates and methane production in goats fed rice straw, mimosa foliage and water spinach. *Livest. Res. Rural Dev.* 23.

Stewart V. 1988. Nitrate respiration in relation to facultative metabolism in enterobacteria. *Microbiol. Rev.* 52, 190–232.

Stillwell W. 2016. Membrane Biogenesis. *An Introduction to Biological Membranes*. Chapter 7. 349-367. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63772-7.00016-6>.

Šurín S, Čuboňová L, Majerník AI, Šmigáň P. 2006. Amiloride resistance in the methanoarcheon *Methanothermobacter thermoautotrophicus*: characterization of membrane-associated proteins. *Folia Microbiologica.* 51: 313-316.

- Takahashi J, Ikeda M, Matsuoka S and Fujita H. 1998. Prophylactic effect of L-cysteine to acute and subclinical nitrate toxicity in sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* 74, 273–280. doi: 10.1016/S0377-8401(98)00176-X
- Thanh VD, Thu NV, and Preston TR. 2012. Effect of potassium nitrate or urea as NPN source and levels of Mangosteen peel on *in vitro* gas and methane production using molasses, *Operculina turpethum* and *Brachiaria mutica* as substrate. *Livest. Res. Rural Dev.* 24. Available online at: <http://www.lrrd.org/lrrd24/4/thanh24063.htm>
- Thauer RK, Jungermann K, and Decker K. 1977. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 41, 100–180.
- Ueno Y, Yamada K, Yoshida N, Maruyama S, Isozaki Y. 2006. Evidence from fluid inclusions for microbial methanogenesis in the early Archaean era. *Nature.* **440**:516-519.
- van Zijderveld SM, Gerrits WJJ, Apajalahti JA, Newbold JR, Dijkstra J, Leng RA, et al. 2010. Nitrate and sulfate: Effective alternative hydrogen sinks for mitigation of ruminal methane production in sheep. *J. Dairy Sci.* 93, 5856–5866. doi: 10.3168/jds.2010-3281
- Valente TNP, Da Silva Lima E, Dos Santos WBR, Cesario AES, Tavares CAJ, De Freitas MAM. 2016. Ruminal microorganism consideration and protein used in the metabolism of the ruminants: A review. *African Journal of Microbiology Research.* **10(14)**: 456-464.
- Van Hoek AHAM, van Alen TA, Vogel GD, Hackstein JHP. 2006. Contribution by the methanogenic endosymbionts of anaerobic ciliates to methane production in Dutch freshwater sediments. *Acta Protozoologica.* **45**: 215-224.
- Van Hoek AHAM, van Alen TA, Sprakel VSI, Leunissen JAM, Brigge T, Vogel GD, Hackstein JHP. 2000. Multiple acquisition of methanogenic archaeal symbionts by anaerobic ciliates. *Molecular Biology and Evolution.* **17**: 241-258.
- Van Soest PJ. 1994. *Nutritional Ecology of the Ruminant*. Cornell University Press, Ithaca, NY.
- Weatherburn MW. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal. Chem.* **39**(8): 971-974.
- Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**: 4576-4579.
- Woodward SL, Waghorn GC, Thomson NA. 2006. supplementing Dairy Cows with Oils to Improve Performance and Reduce Methane-Does It Work?, in: *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*. New Zealand Society of Animal Production. 1999. 176-181.

Yang C, Rooke JA, Cabeza I, Wallace aJ. 2016. Nitrate and Inhibition of Ruminant Methanogenesis: Microbial Ecology, Obstacles, and Opportunities for Lowering Methane Emissions from Ruminant Livestock. *Front. Microbiol.* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00132>

Zhang Y, Long RJ, Warzecha CM, Coverdale JA, Latham EA, Hume ME, et al. 2014. Characterization of bovine ruminal and equine cecal microbial populations enriched for enhanced nitro-toxin metabolizing activity. *Anaerobe* 26, 7–13. doi: 10.1016/j.anaerobe.2013.12.001

Zhou Z, Meng Q, and Yu Z. 2011. Effects of methanogenic inhibitors on methane production and abundances of methanogens and cellulolytic bacteria in *in vitro* ruminal cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 2634–2639. doi: 10.1128/AEM.02779-10

Zeitz JO, Bucher S, Zhou X, Meile L, Kreuzer M, Soiva CR. 2013. Inhibitory effects of saturated fatty acids on methane production by methanogenic Archaea. *Zurich Open Repository and Archive. University of Zurich.*

Zumft WG and Kroneck PMH. 2007. Respiratory transformation of nitrous oxide(N<sub>2</sub>O) to dinitrogen by bacteria and archaea. *Adv. Microb. Physiol.* 52, 107–227. doi: 10.1016/S0065-2911(06)52003-X



