



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och
husdjursvetenskap

Metanogenreduktion

En hållbar lösning på växthuseffekten?

Methanogen reduction:

A sustainable solution to the
greenhouse effect?

Karin Tufvesson

*Uppsala
2019*

Metanogenreduktion: En hållbar lösning på växthuseffekten?

Methanogen reduction: A sustainable solution to the greenhouse effect?

Karin Tufvesson

Handledare: *Hanna Sassner, Sveriges lantbruksuniversitet, institutionen för Husdjurens miljö och hälsa*

Examinator: *Maria Löfgren, Sveriges lantbruksuniversitet, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap*

Omfattning: 15 hp

Nivå och fördjupning: Grundnivå, G2E

Kurstitel: *Självständigt arbete i veterinärmedicin*

Kursansvarig institution: *Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap*

Kurskod: EX0862

Program/utbildning: *Veterinärprogrammet*

Utgivningsort: *Uppsala*

Utgivningsår: 2019

Elektronisk publicering: *<http://stud.epsilon.slu.se>*

Nyckelord: *Metanogener, metan, våmflora, metanreducerande strategier, djurvälstånd*

Key words: *Methanogens, methane, rumen's microflora, methane mitigation strategies, animal welfare*

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

INNEHÅLLFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Summary	2
Inledning	3
Material och metoder	3
Litteraturoversikt.....	3
Våmfermentation.....	3
Metanogener.....	4
Strategier för att minska metanutsläppet.....	5
<i>Kemiska inhibitorer</i>	6
<i>Jonoforer</i>	6
<i>Sekundära metaboliter</i>	6
<i>Fettillskott</i>	6
<i>Vaccin</i>	7
<i>För- och nackdelar med strategierna</i>	7
Metanogener – mer komplexa än bara metanbildare	8
<i>Vitamin B12</i>	8
<i>Interaktioner</i>	9
<i>Mikrofloras betydelse för djurets hälsa och välbefinnande</i>	9
<i>Evolutionsperspektiv</i>	10
Diskussion.....	10
Konsekvenser för djuret vid reducering av metanogener	11
Konsekvenser av en störd våmflora	11
Strategiernas för- och nackdelar ur ett djurvälståndsperspektiv	12
<i>Strategiernas långtidsverkan?</i>	14
Slutsats	15
Litteraturlista.....	16

SAMMANFATTNING

Allt fler blir medvetna om vikten av hållbar utveckling och klimatpåverkan. Metan, en potent växthusgas som bidrar till en ökad växthuseffekt är ofta i fokus. Inte sällan får idisslare bära den största skulden för det människoorsakade metanutsläppet. I idisslars våm finns nämligen mikroorganismer, metanogener, som bildar metan. Forskare har försökt hitta metoder för att reducera denna metanbildning, metanogenes, i djuret. De flesta studier rörande metanogener fokuserar dock endast på deras roll som metanbildare och mindre på om de kan ha andra egenskaper som kan vara av vikt för värdjurets hälsa och välbefinnande. Detta arbete fokuserar därför på att försöka utröna om metanogener har andra egenskaper som kan vara av vikt för djuret och vad tänkbara konsekvenser kan bli om man lyckas eliminera dem ur våmfloran. En del av de strategier som tagits fram för att minska metanogenesen i våmmen behandlas även ur ett djurvälståndsperspektiv.

De strategier som belyses i detta arbete är kemiska inhibitorer, jonoforer (en typ av antibiotika), sekundära metaboliter, fettillskott och vaccin. Alla påverkar våmfloran på något sätt. Antingen går de direkt på metanogenerna eller indirekt genom att hämma andra mikroorganismer som lever i symbios med dem, alternativt minska tillgängligt substrat för metanogener. Alla strategierna påverkar djuret på ett eller annat sätt och de flesta har visat sig ha stora negativa följder för djuret. Dessa måste klarläggas bättre och också helst tidigare i utformningen av strategierna. Ett större fokus bör också läggas på hur lång tid de kan tänkas ha effekt, eftersom det finns en risk att mikroorganismerna anpassar sig till det nya tillskottet och strategin därför fort tappar sin verkan.

Brist på vitamin B12 och en obalans i våmfloran är exempel på tänkbara konsekvenser för värdjuret om metanogenerna reduceras. En av metanogenernas egenskaper är nämligen att bilda vitamin B12 och om de då försvinner finns risk för vitamin B12 brist. En förändrad våmflora kan medföra försämrad födoedbrytningsförmåga och mindre näring för djuret. Det skulle även medföra ett försämrat skydd mot skadliga mikroorganismer och ökad risk för sjukdomar (såsom acidosis och trumsjuka). Våmfloran hjälper även till att detoxifiera födan, vilket innebär att en rubbning i floran kan få förgiftning som följd. I övrigt var det svårt att hitta andra egenskaper som metanogenerna har och det behövs därför mer forskning kring ämnet.

Utöver mer kunskap om metanogenerna krävs även en djupare förståelse kring det komplexa ekosystem som våmfloran utgör, såsom det samspel och interaktioner som sker mellan mikroorganismerna, men även med värdjuret. Innan man lyckats med detta är det svårt att fullt förutspå vad dessa metanreducerande strategier kan tänkas ha för konsekvenser på djurets välfärd.

SUMMARY

Sustainable development, climate impact and environmental awareness are hot topics when trying to stop climate change. Methane, which is a potent greenhouse gas, is often the focus of the environmental discussion. A big part of the anthropogenic methane emission comes from ruminants and therefore they often become the center of the debate. One approach to this problem has been to form different strategies that reduce the number of methanogens, which are the microorganisms that creates methane in the rumen. Most studies around methanogens focus almost solely on their ability to form methane. However, methanogens may have other abilities that can be important for the animal welfare. The aim of this paper is therefor to investigate what kind of other traits and tasks methanogens can have and how it would impact the host animal if they were diminished. The different methane emission strategies that aim to reduce methanogens are also viewed through an animal welfare perspective.

The methane emission strategies that are included in this study are chemical inhibitors, ionophores (a type of antibiotic), secondary metabolites, dietary lipids and a vaccine. They all affect the rumen microflora in some way. They either affect methanogens directly or indirectly by inhibit other microorganisms that have a symbiotic relationship with them or by reducing available methanogen´s substrate. All the strategies effect the animal one way or another and several of them can have quite severe effect on the animal. It is therefore important to more thoroughly investigate what kind of effect these strategies have on the animal and preferably earlier in the process. Another aspect that also should be further investigated is the long-term effect of the strategies. Microorganisms can adapt to new conditions and therefor there is a risk for the strategies to lose their effect.

Possible consequences for the host animal when reducing the number of methanogens in the rumen includes risk of B12 vitamin deficiency, because one of methanogens traits is to produce the vitamin. It could also lead to an unbalanced microbiota in the rumen, which could result in impaired digestive function and less energy available to the animal. An unbalanced microflora can lead to inferior protection and increase the risk of specific diseases, such as acidosis and rumen bloat. Apart from these, it has been difficult to find other traits methanogens have and therefore more research is needed.

It is also of importance to require deeper understanding about the complexity surrounding the rumens microbiota, such as the interaction between different microorganisms, but also with the host. Without this knowledge it is hard to fully comprehend what potential consequences the methane emission strategies can have to animal health and wellbeing.

INLEDNING

Global uppvärmning och strävan efter att hitta hållbara levnadsätt är högst aktuella forskningsområden. Inom olika typer av områden försöker man hitta mer hållbara förhållningssätt, från att bygga städer, utveckla alternativa fordonsbränslen, till att klimatanpassa jordbruket. Det finns en strävan att hitta sätt att minska mängden, alternativt minska ökningen av växthusgaser i atmosfären. Detta görs exempelvis genom att begränsa användningen av fossila bränslen, vilka avger mycket koldioxid, eller genom att begränsa skövlingen av regnskog som binder upp mycket koldioxid. Metan som också är en potent växthusgas är därför föremål för forskning inom hållbar utveckling. En fjärdedel av det antropogena (mänskligt orsakat) utsläppet av metan kan härledas till djurhållning (Moissl-Eichinger *et al.*, 2018) och då brukar idisslare räknas som de som avger mest på grund av deras förmagsjäsning (Wright & Klieve, 2011). Metanogener, som är en typ av arké, bildar metan som restprodukt vid sitt substratutnyttjande (Janssen & Kirs, 2008). De är en del av våmfloran hos idisslare och är anledningen till djurets metanutsläpp. I strävan att hitta sätt att minimera metanutsläppet från idisslare har dessa metanogener hamnat i rampljuset. Man har velat hitta sätt att minska förekomsten av dem, alternativt bli av med dem helt. Forskning har inriktats att ta fram olika strategier för att minska förekomsten av dessa arkéer och på så sätt minska idisslarnas belastning på klimatet. Dessa strategier kan dock påverka djuret på olika sätt, vilket Llonch *et al.*, (2017) visar i deras litteraturstudie och som delar av detta arbete bygger på.

Frågan är dock om metanogenerna kan ha andra biologiska funktioner, som är av vikt för värdjuret och som gör att det framkallar problem att avlägsna dem. Det vill säga kan djurets hälsa eller välbefinnande bli påverkat om metanogenerna försvinner? På vilket sätt påverkas djuret av de olika metanreducerande strategierna som ämnar att minska antalet metanogener?

MATERIAL OCH METODER

Vid sökandet av information har främst databaserna Google Scholar, Science Direct och PubMed använts. De vanligaste sökorden som jag använt var: methanogenes, methanogenesis in ruminants, methanogens properties, archaea, methane mitigation och methanogens and animal welfare. Utifrån de artiklar jag hittat har jag sedan kunnat letat mig vidare genom deras referenslistor.

Det huvudsakliga syftet med denna studie var att utröna metanogens inverkan på djurets hälsa och välbefinnande.

LITTERATURÖVERSIKT

Våmfermentation

Växtätande djur har en unik förmåga att bryta ner cellulosa med hjälp av sina mikroorganismer såsom bakterier, protozoer, svampar och arkéer. Denna nedbrytningsprocess kallas för fermentation, eftersom det är en enzymatisk nedbrytning under anaeroba förhållanden (Fenchel *et al.*, 2012). Olika växtätare gör detta på olika ställen i magtarmkanalen. Man brukar dela upp dem i förmagsjäsare, såsom kor, får och getter, och grovtarmsjäsare, såsom hästar, kaniner och gnagare m.fl. (Johnson *et al.*, 1993). Förmagsjäsare idisslar även födan för att finfördela de

mest svårnedbrytbara delarna och göra det lättare för våmmens mikroorganismer att komma åt att bryta ner fibrerna/cellulosan (Hofmann, 1989). Den mikrobiella nedbrytningen bildar flyktiga fettsyror, på engelska volatile fatty acids (VFA) som djuret sedan kan ta upp genom våmslemhinnan och utnyttja som energi. Det är främst tre olika VFA som bildas: acetat, propionat och butyrat, men i denna process bildas även mycket koldioxid och metan (Hungate, 1966), varav det sistnämnda strikt är kopplat till arkétypen metanogener.

Förutom kolhydrater bryter dessa mikroorganismer även ner proteiner och lipider (McCann *et al.*, 2017), samt bildar essentiella vitaminer och aminosyror för idisslaren (Johnson *et al.*, 1993). Hela 70% av en idisslares energikälla kommer från förmagsjäsningsen, medan människor och grisar endast kan utnyttja 10–20% av den potentiella energi som genereras av bakterier i grovtarmen (Saengkerdsud & Ricke, 2014).

Djurets relation till mikroorganismerna är symbiotisk. Som nämnts ovan utnyttjar djuret mikroorganismernas förmåga att bryta ner de beståndsdelar värdjuret själv inte kan (Henderson *et al.*, 2015). Djuret å sin sida skapar den rätta miljön för mikroorganismerna genom att låta våmmen utgöra en anaerob miljö, med neutralt pH neutralt, bland annat genom den buffrande saliven och att det ständigt finns gott om näring (Hofmann, 1989). Djuret absorberar också ständigt de VFA som mikrofloran skapar, vilket annars skulle bli giftig i för stora mängder (Hungate, 1966).

Bakterier utgör den största delen av våmfloran och diversiteten av olika arter är stor. Mer än 200 arter har än så länge blivit identifierade (McSweeney *et al.*, 2005) och alla har sin substratpreferens (Zhou *et al.*, 2015). När bakterierna senare passerar ner till tarmen utgör de även en proteinkälla för djuret (Danielsson, 2016).

Protozoer och svampar utgör hälften av den mikrobiotiska biomassan i våmmen. Numerärt är de dock mycket färre än bakterier och uppskattningsvis så står de bara för en tredjedel av nedbrytningen av födan (Hungate, 1966).

Metanogener

I detta arbete är det metanogenerna i våmmens mikroflora som är av störst intresse. De är en typ av arkéer (Janssen & Kirs, 2008), vilka utgör en av de tre domänerna inom systematiken av alla levande organismer. De övriga två är bakterier och eukaryoter. Arkéer är encelliga organismer och liknar bakterier inte bara i utseende och form, utan även i det att de saknar cytoskelett och organeller som har membran, som exempelvis cellkärna och mitokondrie (Woese *et al.*, 1990). De skiljer sig dock från bakterier i många avseenden, såsom i att de har andra typer av cellmembran och ytlager, samt att de är mer lika eukaryoter med avseende på gener för syntetisering och reparation (Lecompte *et al.*, 2002). Arkéer associeras ofta med extremmiljöer, såsom i heta källor, eller i extremt salta miljöer eftersom det var där de först upptäcktes (Sarmiento *et al.*, 2011). På senare tid har man dock upptäckt att de även finns i många andra typer av miljöer. Arkéer delas in i tre grupper, halofila arkéer (trivs främst i miljöer med hög saltkoncentration), termoacidofila (finns främst i miljöer med höga temperaturer) och metanogener (finns i strikt anaeroba miljöer) (Cavicchioli, 2011).

Metanogenerna står för bildandet av metan, vilket kallas för metanogenes. Det är det enda sättet för dem att generera energi, vilket sker i form av ATP (Sarmiento *et al.*, 2011). För att kunna bilda metan krävs enzymet metylkoenzym M-reduktas (MCR). Detta enzym är unikt och gemensamt för alla metanogener (Luton *et al.*, 2002).

I våmmen utgör metanogener endast 4% av alla mikrober (Janssen & Kirs, 2008) och de är helt beroende av andra mikroorganismer för att bryta ner de mer komplexa molekyler som växtfibrer utgör till mindre beståndsdelar (Danielsson, 2016). Metanogenerna i våmmen brukar delas in i symbiotiska eller frilevande. Det är främst protozoer som de symbiotiska metanogenerna är associerade med (Thiele *et al.*, 1988). Dessa kan antingen vara intra- eller extracellulära i/på protozon (Finlay *et al.*, 1994). Båda organismerna gynnas av denna relation och är beroende av varandra, då det möjliggör lättare åtkomst av näring för metanogenen och bortförel av biprodukt för protozon. Newbold *et al.*, (1995) uppskattade att av alla metanogener i våmmen är 9–25% associerade till protozoer och enligt Finlay *et al.*, (1994) kan upp till hela 37% av den metan som bildas i våmmen härledas till metanogener som är bundna till protozoer.

Utöver uppdelningen i symbiotiska respektive frilevande kan metanogener delas in beroende på vilket substrat de använder. Det absolut vanligaste substratet är vätgas, men även olika metylkomponenter från metanol, metylaminer, metylsulfider eller acetat kan utgöra substrat (Janssen & Kirs, 2008). Uppdelningen efter substrat försvåras dock av att en del metanogener är anpassningsbara och därmed kan använda flera olika substrat som energikälla, medan andra är strikt bundna till deras specifika substrat (Costa & Leigh, 2014).

Strategier för att minska metanutsläppet

Eftersom metan har en stark påverkan på växthuseffekten och idisslare utgör en stor källa till metanutsläpp har olika strategier föreslagits för att minska detta. Här beskrivs ett urval av de strategier som inverkar på våmfloran, och då främst metanogenerna. Dessa strategier kan antingen verka direkt på metanogenerna, eller indirekt genom att exempelvis reducera mängden protozoer som är symbiotiska med metanogener. Substanserna som påverkar metanogenesen tillförs direkt i djurets foder eller injiceras. De flesta av strategierna är fortfarande på försöksstadiet och har inte praktiskt implementerats med avsikt att minska metanbildandet.

Som motivering för att finna en bra strategi som hämmar metanogenerna citeras ofta Johnson & Johnson (1995) där resultatet visar att nötkreatur förlorar 2–12% av den potentiella födoenergin på grund av metanogenesen. Författarna förklarar energiförlusten med att det bildas olika mängd vätgas när mikrofloran bildar olika VFA; reaktionsvägen vid bildandet av acetat och butyrat genererar vätgas medan propionats reaktionsväg förbrukar det. Denna vätgas används sedan av metanogenerna som energi och metan bildas som biprodukt. Genom att acetat och butyrat bildar vätgas och propionat utnyttjar den (=konkurrerar med metanogenerna om vätgasen) (Moss *et al.*, 2000), sparas en del av energin i propionatet och blir därför mer energirikt för djuret. Johnson & Johnson (1995) drog slutsatsen att det är önskvärt att hämma metanogenesen i alla avseenden. Det skulle förbättra utnyttjandet av fodret, öka djurets produktivitet och minska på metanutsläppet, det vill säga det blir en så kallad ”win win situation”.

Kemiska inhibitorer

En välstuderad metanreducerande strategi är att tillföra kemiska metanogenesinhibitorer, såsom bromklormetan, 2-bromo-etan-sulfonat (Mitsumori *et al.*, 2012) och kloroform (Knight *et al.*, 2011). Dessa har visat sig vara bra på att reducera metanbildningen, från 25% till hela 50% minskning i in vivo studier på get, får och nötkreatur (Hristov *et al.*, 2013). På lite olika sätt hämmar de metanogenernas förmåga till metanogenes och därmed förmåga att bilda energi (Moss *et al.*, 2000).

En annan typ av kemisk inhibitor som har blivit mer aktuell på senare tid är 3-nitrooxypropanol (3NP) (Llonch *et al.*, 2017). Den har en direkt verkan på metanogenerna genom att hämma sista steget i metanogenesen och har visat på en metanminskning mellan 7-60% på lakterande kor (Haisan *et al.*, 2014).

Jonoforer

Jonoforer är ämnen som ökar genomsläppligheten hos membran, till exempel genom att bilda jonkanaler (Stillwell, 2016). Vissa av dem räknas som antibiotika eftersom de kan frikoppla bakteriernas energiorganell (Bakker, 1979). Det är dessa antibakteriella jonoforer, och då främst monensin, som blivit av intresse som en metanreducerande strategi. Monensin skiftar förhållandet av bakterier till fördel för de gramnegativa bakterierna, vilket har till följd att mer propionat bildas istället för acetat (Moss *et al.*, 2000). På så sätt får metanogenerna mindre mängd substrat i form av vätgas. Monensin minskar även födointaget hos djuret, vilket också indirekt motverkar metanogenesen eftersom det blir allmänt mindre substrat för mikroorganismerna (Johnson & Johnson, 1995).

Sekundära metaboliter

Växter kan bilda så kallade sekundära metaboliter för att skydda sig mot olika typer av angrepp. Saponiner och tanniner är två exempel av sekundära metaboliter som har testats på idisslars våmflora för att minska dess metanogenes. Saponin kan förstöra cellmembranet hos eukaryota celler genom att interagera med kolesterolet i membranet. På så sätt riktar sig saponin endast mot eukaryota celler och lämnar prokaryota celler (=bakterier och archéer) orörda (Wina *et al.*, 2005). Detta anses positivt, eftersom antalet protozoer reduceras utan att hämma den bakteriella nedbrytningen av födan. Genom att många metanogener lever i symbios med protozoer minskar saponiner metanogenesen (Moss *et al.*, 2000).

Tanniner hämmar mikrobiella enzymer och har då en direkt och indirekt inverkan på metanogenerna genom att både hämma metanogenernas enzymer och de symbiotiska protozoernas enzymer (Patra & Saxena, 2010).

Fettillskott

Fettillskott i foder har visat sig kunna reducera metanbildningen genom en rad mekanismer. Långa fettkedjor metaboliseras inte i våmmen utan senare i tarmarna, vilket medför att metanogenerna får minskad substratmängd (Martin *et al.*, 2010). Det har även en direkt toxisk inverkan på våmmens mikroorganismer, däribland metanogener, protozoer och en del bakterier (Maia *et al.*, 2007). Genom att hämma våmmens mikroflora minskar fibernedbrytningen i

våmmen och mindre metan bildas. Dessutom kan fettillskott medföra att mer propionat bildas och mindre vätgas blir därför tillgängligt för metanogenerna (Johnson & Johnson, 1995). Alternativt konkurrerar fettets själv med metanogenerna om vätgasen (Martin *et al.*, 2010). Mängden fett man tillför korrelerar med minskningen av metanutsläpp (Beauchemin *et al.*, 2008).

Vaccin

En annan strategi som föreslagits är vaccination riktad mot metanogener. Sekretionen av antikroppar behöver vara via saliven, eftersom våmmens slemhinna inte är permeabel för antikroppar (Wedlock *et al.*, 2013). Antikropparna måste även vara konstruerade för att antingen inhibera metanogenernas aktivitet eller stoppa dem från att föröka sig (Attwood *et al.*, 2011). De största utmaningarna för ett vaccin av denna typ är att ha en tillräcklig bredd, för att slå mot många olika typer av metanogener och att sekretionen av antikroppar i saliven är av tillräcklig hög koncentration för att ha någon inverkan på metanogenesen (Wedlock *et al.*, 2013). Forskning pågår inom detta område men än så länge är den på grundnivå. Effekterna har ännu inte studerats på djurnivå i tillräcklig omfattning för att kunna dra slutsatser om hur djuret påverkas.

För- och nackdelar med strategierna

Llonch *et al.*, (2017) har gjort en litteraturstudie över olika strategiers påverkan på djurets välfärd. De tar fram för- och nackdelar för djuret för varje strategi. Sammanställning av resultatet ses i tabell 1 nedan, med viss modifiering. Sekundära metaboliter och vaccineringen tas inte upp av Llonch *et al.*, (2017). Informationen rörande de strategierna har sammanställts dels från antagandet att ett förbättrat foderutnyttjande även skulle inbegripa dessa strategier eftersom de också är hämmande för metanogenesen. Dels från Wina *et al.*, (2005) (saponiner) och Goel & Makkar, (2012) (tanniner) studier rörande de aktuella sekundära metaboliterna.

Tabell 1. För- och nackdelar med metanogenreducerande strategier för djuret

Strategi	Fördelar	Nackdelar
Kemiska inhibitorer	Förbättrar foderutnyttjandet (Johnson & Johnson, 1995)	Toxiska (Patra, 2012)
Jonoforer	Förbättrar foderutnyttjandet (Johnson & Johnson, 1995) Minskar risken för acidosis, trumsjuka (McGuffey <i>et al.</i> , 2001) och lungemfysem (Honeyfield <i>et al.</i> , 1985)	Toxiskt (Potter <i>et al.</i> , 1984)
Sekundära metaboliter	Förbättrar foderutnyttjandet (Johnson & Johnson, 1995)	Toxiskt Saponiner (Wina <i>et al.</i> , 2005) Tanniner (Goel & Makkar, 2012)
Fettillskott	Förbättrar foderutnyttjandet (Johnson & Johnson, 1995) Minskar risken för negativ energibalans (Grummer & Carroll, 1991)	Ökad risk för fetma (Grummer, 1993) Minskad fibernedbrytande förmåga (Jenkins & Jenny, 1989)
Vaccin	Förbättrar foderutnyttjandet (Johnson & Johnson, 1995)	Saknar data

Metanogener – mer komplexa än bara metanbildare

De flesta studier som gjorts på metanogener i våmfloran fokuserar nästan uteslutande på deras metanbildande förmåga. Det är dock inte den enda egenskap som utmärker dem. De kan även bilda vitamin B12 (Roth *et al.*, 1996), interagera med andra mikroorganismer (Moissl-Eichinger *et al.*, 2018), men också utgöra en del av den viktiga mikrofloran (Zeineldin *et al.*, 2018). Detta är av intresse i detta arbete då det kan påverka djurets hälsa och välbefinnande. Hälsa betyder här om djuret är sjukt eller friskt, medan välbefinnande syftar på djurets psykiska upplevelse, det vill säga om det mår bra eller dåligt. För att ha en bra djurvälstånd krävs både att djuret har en bra hälsa och gott välbefinnande.

Vitamin B12

Vitamin B12 är essentiellt för både idisslare och människor, men det är endast bakterier och arkéer som kan syntetisera det. Vitamin B12 är involverat i processer rörande bildandet av neurotransmittorer, fosfolipider, DNA och RNA, men även i reaktioner som kataboliserar kolesterol, fettsyror och flera aminosyror (Gille & Schmid, 2015). Människan är beroende av att få i sig det genom animaliska produkter, eftersom bakterierna som skapar vitamin B12 finns för långt bak i vårt tarmsystem, där ingen absorption kan ske (Nohr *et al.*, 2011). Idisslare däremot kan ta vara på det vitamin B12 som bildas av våmfloran (Gille & Schmid, 2015). Det finns flera källor som hänvisar bildandet av vitamin B12 endast till bakterier, men Roth *et al.*,

(1996) beskriver att även metanogener bildar vitamin B12, eftersom det utgör ett coenzym i metanogenesen.

Interaktioner

En del arter av arkéer har dubbla lager av membran, likt gramnegativa bakterier, men med en annan sammansättning (Küper *et al.*, 2010). Det spekuleras i om denna typ av uppbyggnad hjälper arkéer interagera med andra mikroorganismer (Moissl-Eichinger *et al.*, 2018). På membranet finns även en rad adhesionsstrukturer som både kan hjälpa arkéer binda fast till omgivningen (både till levande organismer och icke-levande material) och möjliggöra kommunikation samt utbyte med omgivningen (Moissl-Eichinger *et al.*, 2018). Författaren är noga med att poängtera att mer forskning behövs, men att det spekuleras om de adhesionsliknande proteinerna som finns hos vissa metanogener eventuellt innebär en interaktion med värdjuret. Det är dock oklart vad denna interaktion innebär för både metanogenerna och värdjuret.

Symbiotiska interaktioner uppstår när metanogener stimulerar andra mikroorganismer att tillhandahålla mer vätgas (Samuel & Gordon, 2006), men samtidigt öka bakteriernas egna förmåga att ta vara på nitratkällor och producera ATP (Samuel *et al.*, 2007).

Mikrofloras betydelse för djurets hälsa och välbefinnande

För att fastställa möjliga konsekvenser av ett bortfall av metanogener måste det ses i ett större perspektiv än att bara titta på dem enskilt. På grund av att de utgör en hörnsten i mikrofloran måste man även betrakta mikrofloras värde för djuret. Våmmens ekosystem av mikroorganismer är essentiellt för våmmens normala funktion. Det är ett komplext system med en mängd olika interaktioner där mycket än så länge är höljt i dunkel.

Värdjurets relation till dess mikroflora sträcker sig längre än bara som en källa för nutritionell nedbrytning. Den har även en skyddande och immunomodulerande effekt på djuret (Zeineldin *et al.*, 2018). Den skyddande effekten utgörs av en interaktion mellan mikrofloran och våmmens epitelceller. Detta utgör en barriär och hindrar stora molekyler att ta sig igenom slemhinnan. (Latham *et al.*, 1971). Den normala mikrofloran utgör även ett försvar för infektioner, vilket följaktligen förbättrar djurets chanser att hålla sig frisk och därmed även dess välfärd (Mackie & White, 1990). Mikrofloras immunomodulerande roll innebär att den hjälper till att utveckla och forma ett normalt immunförsvar hos djuret (Peterson *et al.*, 2007).

Mikroorganismerna är även involverade i detoxifiering av gifter som kan finnas i födan (Hammond, 1995; Gregg *et al.*, 1998). De har en inverkan på läkningsprocesser och kan skynda på postoperativ återhämtning (Kinross *et al.*, 2011). En normal och fungerande mikroflora är essentiell för djurets hälsa och att en rubbning i detta komplexa ekosystem kan leda till sjukdom för djuret (Zeineldin *et al.*, 2018).

Man har sett ett samband mellan stora störningar i mikrofloran och vanligt förekommande sjukdomstillstånd hos idisslare såsom acidosis och trumsjuka (Khafipour *et al.*, 2016). Acidosis kan uppstå då det blir en obalans i floran och epitelcellernas absorptionsförmåga minskar. VFA börjar då ansamlas och pH-värdet sjunker (Petri *et al.*, 2013). För djuret kan detta innebära att

de får skador på våmmens slemhinna (Steele *et al.*, 2011), nedsatt fodernedbrytningsförmåga, fång (Cook *et al.*, 2004) och minskat foderintag (Kleen *et al.*, 2003). Trumsjuka är ett tillstånd där den gas som bildas i våmmen inte kan rapas ut och som leder till att våmmen spänns ut och i värsta fall kan trycka på viktiga blodkärl eller diafragman, vilket kan leda till att djuret dör (Sjaastad *et al.*, 2016). Trumsjuka kan kopplas till våmmens fermentationshastighet och mängden gas som bildas (Bartley & Bassette, 1961). Man har lyckats identifiera att idisslare som lider av trumsjuka har fler bakterier av en viss typ medan färre av en annan jämfört med friska individer (Pitta *et al.*, 2016). Detta indikerar att trumsjuka kan uppkomma på grund av en överväxt av en viss mikrobiell grupp som då rubbar balansen och våmmens normala process.

Det finns dock en studie som visar att det går att föda upp lamm till vuxen ålder utan att ha några metanogener i floran (Fonty *et al.*, 2007). Studien gick ut på att en grupp av lamm fick en "transplanterad" mikroflora som var fullt fungerande men saknade metanogener. Till följd av detta fick dessa lamm istället en ökad mängd acetogenetiska bakterier som utnyttjade den vätgas som metanogenerna i normala fall hade tagit hand om. De metanogenfria lammen hade dock en sämre tillväxt än kontrollgruppen och författarna poängterade att ju mer komplex mikrofloran är desto mer VFA produceras och därmed mer energi för djuret.

Evolutionsperspektiv

Djurs magtarmsystem och deras mikrober har med stor sannolikhet genomgått samevolution (Saengkerdsud & Ricke, 2014). Det innebär att organen utvecklats för att vara gynnsamma för dess flora och samtidigt har mikroorganismerna formats för att frodas i den specifika miljön. Olika djurarter har olika sammansatt mikroflora. Metanogener från idisslare blir inhiberade av galla, medan metanogener från icke-idisslare inte blir det, eftersom de har gener som kodar för proteiner som skyddar dem (Miller & Lin, 2002). Samtidigt påpekar Hackstein *et al.*, (1999) att metanogenerna i magtarmkanalen var nödvändiga för den evolutionära utvecklingen av förmags- och grovtarmsjäsningsen, och varför dessa magtarmsystem är olika utformade trots att djurslagen har liknande födopreferens.

Om man jämför våmfloran mellan individer visar det sig att den inte är identisk, utan det finns en stor variation i vilka mikroorganismer som koloniserar den och i vilka mängder. Ras, ålder, individuella skillnader, vilken typ av föda djuret äter, med mera, påverkar mikrobiotans sammansättning (Agarwal *et al.*, 2015). Henderson *et al.*, (2015) gjorde en jämförelse av våmfloran hos olika idisslare från skilda geografiska områden och kom fram till att sammansättningen av bakterier och metanogener var relativt konstant världen över. Däremot fanns det större individuella skillnad i vilka protozoer som ingick i våmfloran.

DISKUSSION

En minskning av den antropogena miljöpåverkan är av yttersta vikt för att förhindra klimatförändringar med naturkatastrofer som följd. En väg att gå är att minska metanavgivningen från idisslare. Detta bör dock inte göras på bekostnad av djurens välfärd och man bör därför ta mer hänsyn till vad detta kan ha för konsekvenser för djurets liv och hälsa. Enligt min mening borde man först klargöra metanogens alla funktioner och interaktioner i våmmen innan man bestämmer sig för att inhibera eller ta bort dessa från våmfloran. På så sätt

skulle man lättare kunna förutspå möjliga konsekvenser för värdjuret. I detta arbete försöker jag belysa detta utifrån den forskning som finns om metanogener. Jag väger även för- och nackdelar för djuret vid olika metanreducerade strategier.

Konsekvenser för djuret vid reduktion av metanogener

Det är oklart vilka andra funktioner metanogenerna faktiskt har i våmmen. Majoriteten av alla studier som gjorts på metanogenerna fokuserar på deras metanogenes. Troligen bildar de, tillsammans med bakterier, vitamin B12 i våmmen. Följaktligen kan man fråga sig vad konsekvenserna blir för bildandet av vitamin B12 om metanogenerna försvinner. Kommer bakterierna kunna kompensera för metanogenernas produktionsbortfall och därmed undvika att djuret får B12-brist, eller kommer B12-brist infinna sig? Detta är en fråga som man skulle kunna undersöka på liknande sätt som på de metanogen-fria lamm som Fonty *et al.*, (2007) använde sig av. Om då detta uppkommer som ett problem, skulle en möjlig lösning i så fall vara att ge djuret B12-tillskott? Det är många frågor man inte än har svaret på, men det är av yttersta vikt att undersöka för att säkerställa en bra djurvelfärd.

Metanogenernas förmåga att interagera med andra mikroorganismer och möjligen även med värdjuret väcker frågor som: Vad har dessa interaktioner för betydelse för djuret? Vad blir konsekvenserna om de försvinner när metanogenerna försvinner? Metanogenernas positiva effekt genom att de kan påverka ämnesomsättningen hos andra mikroorganismer, såsom bakterier, kan innebära ett bättre foderutnyttjande för djuret eftersom mer VFA bildas. Om metanogenerna försvinner skulle en möjlig följd bli sämre tillväxt, produktion och ökad risk för negativ energibalans.

De protozoer som lever i symbios med metanogenerna skulle bli påverkade och förmodligen minska i antal vid en reduktion av metanogenerna. Detta skulle innebära en försämrad fibernedbrytning. I motsats till detta får djuret tillgång till mer protein när antalet protozoer reduceras. Detta på grund av att protozoers största proteinkälla är våmbakterier (Jouany, 1996) och därmed når mindre mängd mikrobiellt protein tunntarmen om det finns många protozoer (Moss *et al.*, 2000). Det finns alltså för- och nackdelar även med en påverkan på protozoerna. Andra mikroorganismer kan vara beroende av protozoerna i sin tur, vilket skulle leda till en dominoeffekt. Tas metanogenerna bort blir följden att protozoerna blir färre, som i sin tur medför att bakterier och svampar påverkas negativt, vilket slutar i att hela våmfloran kommer ur balans.

Konsekvenser av en störd våmflora

Som beskrivits ovan så är en balanserad våmflora viktigt för djurets hälsa och välbefinnande. Som Zeineldin *et al.*, (2018) påpekar kan en obalans i våmfloran leda till lidande och sjukdom. Opportunistiska bakterier kan tas som exempel. De är i normala fall harmlösa, men om de normala förutsättningarna ändras, som till exempel en störd våmflora, tar de chansen, förökar sig och skapar sjukdom. Mikrofloran har även en skyddande och immunomodulerande effekt (Zeineldin *et al.*, 2018). Dels för att förebygga en överväxt av patogena eller opportunistiska mikroorganismer (Mackie & White, 1990), men också för att djuret ska få ett normalt utvecklat immunförsvar (Bäckhed *et al.*, 2004; Peterson *et al.*, 2007). Om man reducerar antalet

metanogener ändrar man på balansen i mikrobiotan, vilket kan ha till följd att djuret inte får ett normalt utvecklat immunförsvar och därmed löper en risk att utveckla autoimmuna sjukdomar. Det minskade skyddet skulle innebära att djuret blir immunosupprimerat och lättare drabbas av infektioner. Som Hammond, (1995) och Gregg *et al.*, (1998) visar kan metanogener även vara en del av detoxifieringen av giftiga ämnen som kan finnas i födan. Som en konsekvens av detta måste högre krav ställas på fodersäkerheten så att djuret inte blir sjukt av något som den tidigare kunde avgifta själv. Detta betonar än en gång hur viktigt det är för djurvälståndet att klarlägga möjliga konsekvenser av att ändra florans så att man inte utsätter djuret för onödigt lidande. Det blir också viktigt att fånga upp tidiga tecken på att något är fel, eftersom djur och människor inte kommunicerar på samma sätt och vilket försvårar vår förståelse av deras upplevelse.

Henderson *et al.*, (2015) studie visade att mikrofloras sammansättning var relativt konstant världen över i avseende på bakterier och metanogener. Denna konservering av metanogensammansättning i florans kan tolkas som att de har en essentiell roll för detta ekosystem. Om sammansättningen inte hade haft lika stor betydelse hade det förmodligen varit en större variation. Upphovsmannen till evolutionsteorin, Charles Darwin, citeras ofta som att den bäst anpassade individen överlever. Om man då drar paralleller till mikrofloran kan detta tolkas som att sammansättningen av bakterier och metanogener är den mest gynnsamma och innebär bäst anpassning eftersom den är så konstant världen över. Dessutom förklarar Hackstein *et al.*, (1999) att djurets magtarmsystem har genomgått en samevolution med deras mikrober och specifikt att metanogenerna spelat en nödvändig roll vid denna evolution. Om då metanogenerna har varit så viktiga evolutionärt, vad är det som säger att de inte fortfarande är viktiga för djuret?

Strategiernas för- och nackdelar ur ett djurvälståndsperspektiv

Oavsett om metanogenerna är viktiga eller ej för värdjuret finns det redan strategier för att minska metanogenernas antal. Likt det mesta här i världen har även dessa för- och nackdelar för djurets välfärd. Llonch *et al.*, (2017) har gjort en sammanställning över dessa, där bland annat jonoforer, fettillskott och kemiska inhibitorer togs upp. De sekundära metaboliterna och vaccinet studerades dock inte.

Som positiv effekt på djuret nämns att energieffektiviteten förbättras generellt för alla anti-metanogena metoder eftersom det blir en mindre energiförlust vid minskat metanutsläpp (Moraes *et al.*, 2014). Denna slutsats kom även Johnson & Johnson, (1995) fram till. Deras artikel är välciterad (över 2000 gånger i skrivande stund enligt Google Scholar) och förmodligen är det många som använder deras argument för att hitta metanreducerande strategier och ibland blundar för vilka negativa effekter en hämning av metanogenerna kan medföra. Det är även oklart vad i metanogenesen som faktiskt orsakar energiförlusten. I min tolkning av försöken bär inte metanogenerna den egentliga skulden till energiförlusten. Det är snarare så att djuret hade kunnat få ut mer energi från fodret om det bildats mer propionat istället för acetat och detta hade då även varit gynnsamt i frågan att reducera metanutsläppet. Det bör därför vara felaktigt att säga att metanogenerna tar en del av den energi som hade kunnat gå till värdjuret, eftersom metanogenerna inte kan påverka vilken VFA som bildas.

Positiva effekter av jonoforen monensin för djuret, som tas upp av Llonch *et al.*, (2017), är att det kan öka djurets foderutnyttjande förmåga och även minska risken för acidosis, trumsjuka och lungemfysem, genom att hämma olika mikroorganismer som bidrar till dessa sjukdomar. Samtidigt är det just subklinisk acidosis och trumsjuka som Zeineldin *et al.*, (2018) tar upp som möjliga sjukdomar vid en obalans i våmmens mikrobiota. Man bör därför vara försiktig att laborera med våmmens mikroflora innan man är säker på vilka konsekvenser det kan få för djuret.

Jonoforen monensins negativa effekter är att det kan vara toxiskt för djuret; leda till anorexi, diarré, depression, ökad andningsfrekvens, ataxi (okoordinerade rörelsemönster) och till och med vara dödligt (Llonch *et al.*, 2017). Det bör dock nämnas att dessa allvarliga följder baseras på en betydligt högre dos av monensin än den som föreslås för att få metanreducering. Utöver toxisk inverkan på djuret bör man också nämna att monensin är ett antibiotikum och vid användning av det bidrar man till antibiotikaresistensen. Av den anledningen är det förbjudet att använda monensin i EU som ett tillväxtfrämjande medel. Det kan verka motsägelsefullt att monensin både kan vara tillväxtfrämjande (på grund av dess förmåga att öka djurets foderutnyttjande) och samtidigt leda till minskat foderintag. Sammantaget överväger ändå de negativa aspekterna enligt mig, då stor osäkerhet råder om doseffekter och biverkningar.

En positiv effekt vid användningen av fettillskott som metanogeneshämmare är att det minskar risken för negativ energibalans. Detta har störst inverkan på högpresterande djur, det vill säga dräktiga eller lakterande djur, eftersom det är de som lättast hamnar i detta tillstånd (Grummer & Carroll, 1991). Det skulle även kunna minska risken för ketos (när kroppen börjar bryta ner fettreserver och använda ketonkroppar som energikälla) och lipidosis (fettlever) om man ger extra fett i fodret direkt efter kalvning (Grummer, 1993). Man bör dock väga detta mot risken för fetma, vilket tas upp som en av nackdelarna för fettillskott (Llonch *et al.*, 2017). De djur som inte är högpresterande är inte i samma behov av den extra energi som fett utgör och löper därför högre risk för fetma och alla negativa följder det bär med sig. Därför blir det en ständig balansgång i hur mycket fett som bör tillföras för att hålla energinivåerna på en optimal nivå. Detta skulle kunna resultera i att strategin tappar sin metanogenreducerande förmåga då inte tillräckligt hög fettmängd kan ges med hänseende till djurets välfärd.

En ytterligare aspekt som kan diskuteras är hur bra det är att tillföra idisslare ett näringsämne som fett, som de i normala fall inte får i sig i stora mängder. Evolutionärt har de utvecklats för att bryta ner endast små mängder fett och då kan man tänka sig att deras magtarmsystem inte kan hantera fett på bästa sätt. Vad som också talar för detta är att fettillskott har visats ha en antimikrobiell effekt som kan leda till en rubbning i våmfloran och nedsatt fibernedbrytningsförmåga som följd (Llonch *et al.*, 2017). Våmfloran är alltså inte utformad för att klara av att hantera stora mängder fett.

Både de kemiska inhibitorerna bromklormetan, kloroform och 2-bromo-etan-sulfonat och de sekundära metaboliterna saponiner och tanniner har visat sig kunna vara toxiska för djuret. Enligt Llonch *et al.*, (2017) kan de tre kemiska inhibitorerna vara lever- och njurtoxiska och dessutom leda till döden vid långtidsanvändning. Detta gäller både det "behandlade" djuret, men även de människor som äter djuret. Dessutom är de potentiella växthusgaser i sig själv,

vilket också försummar hela syftet med att använda dem. Kemiska inhibitorn 3NP har man däremot inte funnit vara lika toxiskt som övriga, även om det påpekas att mer studier behövs för att vara fullt säker (Zhang *et al.*, 2018). Saponinerna (Wina *et al.*, 2005) och tanninernas (Goel & Makkar, 2012) toxicitet beror dock på vilken växt och deras kemiska struktur. Vissa saponiner kan orsaka tarminflammation, men även fotosensibilitet, vilket i sin tur kan leda till lever och njurskador. I värsta fall kan dessa skador vara dödliga (Wina *et al.*, 2005).

När det kommer till framtagandet av ett vaccin är det fortfarande på grundforskningsnivå (Attwood *et al.*, 2011), så det är oklart vilka konsekvenser det kan ha på djuret. Det är dock troligt att det även för vaccinet skulle hävdas att det kan förbättra djurets foderutnyttjande förmåga bara med motiveringen att det hämmar metanogenesen. Enligt min mening så är det mer troligt att det går i motsatt riktning, det vill säga att fodernedbryningsförmågan minskar, eftersom en del av komplexiteten i våmfloran försvinner.

Strategiernas långtidsverkan?

En aspekt som bör beaktas vid utvärdering av dessa strategier är hur lång tid de faktiskt har effekt. Det krävs fler studier som tittar på långtidseffekten, både med avseende på djurvälstånd och hur bestående deras metanreducerande förmåga är. Patra & Saxena (2009) påpekar att mikrofloran kan anpassa sig till saponin (sekundär metabolit) och Danielsson (2016) påtalar risken med att vaccin kan tappa sin effekt på grund av mikrobiell anpassning. Även monensin tappar sin effekt efter en tid på grund av att mikrofloran anpassar sig (Guan *et al.*, 2006). Troligen löper alla strategier som verkar antimikrobiellt denna risk och skulle därmed kunna innebära att de tappar sin metanminskande effekt och funktion.

Metanogener har visat sig kunna ta emot och ge bort gensegment och då inte enbart inom arkédomänen utan även med bakterier (Saengkerdsut & Rieke, 2014). Detta tyder på en snabb anpassningsförmåga. Även metanogenernas förmåga att vara substratflexibla tyder på en bra anpassningsförmåga. Vissa strategier har som mål att skifta VFA proportionen från acetat till propionat för att minska substratmängden för metanogenerna. Om då tillgänglig vätgas minskar finns stor risk att metanogenerna hittar andra substrat de kan använda som energikälla och därmed kringgår strategin.

Genom att utveckla anti-metanogena strategier ökar man även det ”evolutionära trycket” på metanogenerna. Man kan likna det med bakteriers utveckling av antibiotikaresistens. Bakterier som har utvecklat en förmåga att överleva antibiotikan kan sprida egenskapen vidare och snart hjälper inte antibiotikan längre, eller i detta fall den anti-metanogena strategin. Följaktligen bör det även beaktas om denna tänkbara anpassning av mikrofloran har någon påverkan på djurets välfärd. Om metanogenerna börjar utnyttja ett annat substrat kanske mängden energi som blir tillgängligt för värdjuret förändras.

Avslutningsvis kan man fråga sig om man bör fortsätta lägga resurser på dessa strategier som i många fall utgör en fara för djuret och dessutom kanske inte har så långtidsvarande resultat. Det finns andra strategier som inte riktar sig mot våmfloran utan snarare beläggningsgraden på gården, hur effektiva djuren är på att producera, med mera. En annan lösning är att dra ner på

antalet idisslare globalt, men så klart har även dessa lösningar många för- och nackdelar och det finns därför ingen lätt lösning på metanutsläpp-problemet.

Slutsats

Trots att det finns mycket forskning om metanogener är deras andra egenskaper, utöver metanbildande förmåga, utforskat. Viss forskning tyder på att metanogenerna kan spela en större roll utöver metanbildare för djuret, såsom deras förmåga att bilda vitamin B12. Metanogenerna ingår även i ett väldigt komplext ekosystem, som förövrigt är essentiell för värdjuret, där det finns mängder av samspel och interaktioner som fortfarande är bortom vår kunskap. Av denna anledning blir det svårt att förutsäga konsekvenser på värdjurets hälsa och välbefinnande, vilket borde vara av största vikt vid utformningen av metanreducerande strategier.

Min slutsats är att av de strategier som forskats på i dagsläget är det få, om någon, som inte påverkar djuret negativt på något sätt. Innan en strategi ska implementeras i konventionellt bruk bör alla konsekvenser för värdjuret nogt kartläggas. Ingen av strategierna har kommit så långt i utvecklingen att det är redo för marknaden, men jag anser att en djupare djurvälståndsperspektiv borde komma in tidigare i utvärderingen. Man bör även lägga större tyngd och fokus på mikroorganismers förmåga till anpassning vid utformningen av dessa strategier, då risken är stor att de kan anpassa sig till dessa nya tillsatser och att strategin därmed tappar sin förmåga efter kort tid.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Agarwal, N., Kamra, D.N. & Chaudhary, L.C. (2015). Rumen Microbial Ecosystem of Domesticated Ruminants. I: Puniya, A.K., Singh, R., & Kamra, D.N. (red) *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution*. New Delhi: Springer India, ss. 17–30.
- Attwood, G.T., Altermann, E., Kelly, W.J., Leahy, S.C., Zhang, L. & Morrison, M. (2011). Exploring rumen methanogen genomes to identify targets for methane mitigation strategies. *Animal Feed Science and Technology*, vol. 166–167, ss. 65–75.
- Bakker, E.P. (1979). Ionophore Antibiotics. I: Hahn, F.E. (red) *Mechanism of Action of Antibacterial Agents*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, ss. 67–97.
- Bartley, E.E. & Bassette, R. (1961). Bloat in Cattle. III. Composition of Foam in Legume Bloat1. *Journal of Dairy Science*, vol. 44 (7), ss. 1365–1366.
- Beauchemin, K.A., Kreuzer, M., O'Mara, F. & McAllister, T.A. (2008). Nutritional management for enteric methane abatement: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, vol. 48 (2), ss. 21–27.
- Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L.V., Koh, G.Y., Nagy, A., Semenkovich, C.F. & Gordon, J.I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 101 (44), ss. 15718–15723.
- Cavicchioli, R. (2011). Archaea — timeline of the third domain. *Nature Reviews Microbiology*, vol. 9 (1), ss. 51–61.
- Cook, N.B., Nordlund, K.V. & Oetzel, G.R. (2004). Environmental Influences on Claw Horn Lesions Associated with Laminitis and Subacute Ruminant Acidosis in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, vol. 87, ss. E36–E46 (Electronic Supplement).
- Costa, K.C. & Leigh, J.A. (2014). Metabolic versatility in methanogens. *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 29, ss. 70–75 (Cell and Pathway Engineering).
- Danielsson, R. (2016) *Methane production in dairy cows*. Diss. Uppsala: Sveriges lantbruksuniversitet.
- Fenchel, T., King, G.M. & Blackburn, T.H. (2012). Bacterial Metabolism. I: Fenchel, T., King, G.M., & Blackburn, T.H. (red) *Bacterial Biogeochemistry*. 3. uppl. Boston: Academic Press, ss. 1–34.
- Finlay, B.J., Esteban, G., Clarke, K.J., Williams, A.G., Embley, T.M. & Hirt, R.P. (1994). Some rumen ciliates have endosymbiotic methanogens. *FEMS Microbiology Letters*, vol. 117 (2), ss. 157–161.
- Fonty, G., Joblin, K., Chavarot, M., Roux, R., Naylor, G. & Michallon, F. (2007). Establishment and Development of Ruminant Hydrogenotrophs in Methanogen-Free Lambs. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 73 (20), ss. 6391–6403.
- Full Text PDF. Available from: https://pub.epsilon.slu.se/13308/1/danielsson_r_160427.pdf. [Accessed 2019-02-03].
- Gille, D. & Schmid, A. (2015). Vitamin B12 in meat and dairy products. *Nutrition Reviews*, vol. 73 (2), ss. 106–115.
- Goel, G. & Makkar, H.P.S. (2012). Methane mitigation from ruminants using tannins and saponins. *Tropical Animal Health and Production*, vol. 44 (4), ss. 729–739.
- Gregg, K., Hamdorf, B., Henderson, K., Kopecny, J. & Wong, C. (1998). Genetically Modified Ruminant Bacteria Protect Sheep from Fluoroacetate Poisoning. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 64 (9), ss. 3496–3498.
- Grummer, R.R. (1993). Etiology of Lipid-Related Metabolic Disorders in Periparturient Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, vol. 76 (12), ss. 3882–3896.
- Grummer, R.R. & Carroll, D.J. (1991). Effects of dietary fat on metabolic disorders and reproductive performance of dairy cattle. *Journal of Animal Science*, vol. 69 (9), ss. 3838–3852.

- Guan, H., Wittenberg, K.M., Ominski, K.H. & Krause, D.O. (2006). Efficacy of ionophores in cattle diets for mitigation of enteric methane. *Journal of Animal Science*, vol. 84 (7), ss. 1896–1906.
- Hackstein, J.H.P., van Hoek, A.H.A.M., Sprenger, W.W. & Rosenberg, J. (1999). Symbiotic Associations Between Methanogenic Archaea, Protists and Metazoa: Evolutionary Implications. I: Seckbach, J. (red) *Enigmatic Microorganisms and Life in Extreme Environments*. Dordrecht: Springer Netherlands, ss. 599–611.
- Haisan, J., Sun, Y., Guan, L.L., Beauchemin, K.A., Iwaasa, A., Duval, S., Barreda, D.R. & Oba, M. (2014). The effects of feeding 3-nitrooxypropanol on methane emissions and productivity of Holstein cows in mid lactation. *Journal of Dairy Science*, vol. 97 (5), ss. 3110–3119.
- Hammond, A.C. (1995). Leucaena toxicosis and its control in ruminants. *Journal of Animal Science*, vol. 73 (5), ss. 1487–1492.
- Henderson, G., Cox, F., Ganesh, S., Jonker, A., Young, W., Global Rumen Census Collaborators, Abecia, L., Angarita, E., Aravena, P., Nora Arenas, G., Ariza, C., Attwood, G.T., Mauricio Avila, J., Avila-Stagno, J., Bannink, A., Barahona, R., Batistotti, M., Bertelsen, M.F., Brown-Kav, A., Carvajal, A.M., Cersosimo, L., Vieira Chaves, A., Church, J., Clipson, N., Cobos-Peralta, M.A., Cookson, A.L., Cravero, S., Cristobal Carballo, O., Crosley, K., Cruz, G., Cerón Cucchi, M., de la Barra, R., De Menezes, A.B., Detmann, E., Dieho, K., Dijkstra, J., dos Reis, W.L.S., Dugan, M.E.R., Hadi Ebrahimi, S., Eythórsdóttir, E., Nde Fon, F., Fraga, M., Franco, F., Friedeman, C., Fukuma, N., Gagić, D., Gangnat, I., Javier Grilli, D., Guan, L.L., Heidarian Miri, V., Hernandez-Sanabria, E., Gomez, A.X.I., Isah, O.A., Ishaq, S., Jami, E., Jelincic, J., Kantanen, J., Kelly, W.J., Kim, S.-H., Klieve, A., Kobayashi, Y., Koike, S., Kopecny, J., Nygaard Kristensen, T., Julie Krizsan, S., LaChance, H., Lachman, M., Lamberson, W.R., Lambie, S., Lassen, J., Leahy, S.C., Lee, S.-S., Leiber, F., Lewis, E., Lin, B., Lira, R., Lund, P., Macipe, E., Mamuad, L.L., Cuquetto Mantovani, H., Marcoppido, G.A., Márquez, C., Martin, C., Martinez, G., Eugenia Martinez, M., Lucía Mayorga, O., McAllister, T.A., McSweeney, C., Mestre, L., Minnee, E., Mitsumori, M., Mizrahi, I., Molina, I., Muenger, A., Muñoz, C., Murovec, B., Newbold, J., Nsereko, V., O'Donovan, M., Okunade, S., O'Neill, B., Ospina, S., Ouwerkerk, D., Parra, D., Pereira, L.G.R., Pinares-Patiño, C., Pope, P.B., Poulsen, M., Rodehutschord, M., Rodriguez, T., Saito, K., Sales, F., Sauer, C., Shingfield, K., Shoji, N., Simunek, J., Stojanović-Radić, Z., Stres, B., Sun, X., Swartz, J., Liang Tan, Z., Tapio, I., Taxis, T.M., Tomkins, N., Ungerfeld, E., Valizadeh, R., van Adrichem, P., Van Hamme, J., Van Hoven, W., Waghorn, G., John Wallace, R., Wang, M., Waters, S.M., Keogh, K., Witzig, M., Wright, A.-D.G., Yamano, H., Yan, T., Yáñez-Ruiz, D.R., Yeoman, C.J., Zambrano, R., Zeitz, J., Zhou, M., Wei Zhou, H., Xia Zou, C., Zunino, P. & Janssen, P.H. (2015). Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. *Scientific Reports*, vol. 5, s. 14567.
- Hofmann, R.R. (1989). Evolutionary steps of ecophysiological adaptation and diversification of ruminants: a comparative view of their digestive system. *Oecologia*, vol. 78 (4), ss. 443–457.
- Honeyfield, D.C., Carlson, J.R., Nocerini, M.R. & Breeze, R.G. (1985). Duration of Inhibition of 3-Methylindole Production by Monensin. *Journal of Animal Science*, vol. 60 (1), ss. 226–231.
- Hristov, A.N., Oh, J., Firkins, J.L., Dijkstra, J., Kebreab, E., Waghorn, G., Makkar, H.P.S., Adesogan, A.T., Yang, W., Lee, C., Gerber, P.J., Henderson, B. & Tricarico, J.M. (2013). SPECIAL TOPICS — Mitigation of methane and nitrous oxide emissions

- from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. *Journal of Animal Science*, vol. 91 (11), ss. 5045–5069.
- Hungate, R. E. (1966). *The Rumen and its Microbes*. Academic Press New York och London.
- Janssen, P.H. & Kirs, M. (2008). Structure of the Archaeal Community of the Rumen. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 74 (12), ss. 3619–3625.
- Jenkins, T.C. & Jenny, B.F. (1989). Effect of Hydrogenated Fat on Feed Intake, Nutrient Digestion, and Lactation Performance of Dairy Cows¹. *Journal of Dairy Science*, vol. 72 (9), ss. 2316–2324.
- Johnson, D.E., Hill, T.M., Ward, G.M., Johnson, K.A., Branine, M.E., Carmean, B.R. & Lodman, D.W. (1993). Ruminants and Other Animals. I: Khalil, M.A.K. (red), 1993. ss. 199–229. Springer Berlin Heidelberg.
- Johnson, K.A. & Johnson, D.E. (1995). Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science*, vol. 73 (8), ss. 2483–2492.
- Jouany, J.-P. (1996). Effect of Rumen Protozoa on Nitrogen Utilization by Ruminants. *The Journal of Nutrition*, vol. 126 (4), ss. 1335S–1346S.
- Khafipour, E., Li, S., Tun, H.M., Derakhshani, H., Moossavi, S. & Plaizier, J.C. (2016). Effects of grain feeding on microbiota in the digestive tract of cattle. *Animal Frontiers*, vol. 6 (2), ss. 13–19.
- Kinross, J.M., Alkhamisi, N., Barton, R.H., Silk, D.B., Yap, I.K.S., Darzi, A.W., Holmes, E. & Nicholson, J.K. (2011). Global Metabolic Phenotyping in an Experimental Laparotomy Model of Surgical Trauma. *Journal of Proteome Research*, vol. 10 (1), ss. 277–287.
- Kleen, J.L., Hooijer, G.A., Rehage, J. & Noordhuizen, J.P.T.M. (2003). Subacute Ruminant Acidosis (SARA): a Review. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, vol. 50 (8), ss. 406–414.
- Knight, T., Ronimus, R.S., Dey, D., Tootill, C., Naylor, G., Evans, P., Molano, G., Smith, A., Tavendale, M., Pinares-Patiño, C.S. & Clark, H. (2011). Chloroform decreases rumen methanogenesis and methanogen populations without altering rumen function in cattle. *Animal Feed Science and Technology*, vol. 166–167, ss. 101–112 (Special Issue: Greenhouse Gases in Animal Agriculture - Finding a Balance between Food and Emissions).
- Küper, U., Meyer, C., Müller, V., Rachel, R. & Huber, H. (2010). Energized outer membrane and spatial separation of metabolic processes in the hyperthermophilic Archaeon *Ignicoccus hospitalis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 107 (7), ss. 3152–3156.
- Latham, M.J., Sharpe, M.E. & Sutton, J.D. (1971). The Microbial Flora of the Rumen of Cows Fed Hay and High Cereal Rations and its Relationship to the Rumen Fermentation. *Journal of Applied Bacteriology*, vol. 34 (2), ss. 425–434.
- Lecompte, O., Ripp, R., Thierry, J.-C., Moras, D. & Poch, O. (2002). Comparative analysis of ribosomal proteins in complete genomes: an example of reductive evolution at the domain scale. *Nucleic Acids Research*, vol. 30 (24), ss. 5382–5390.
- Llonch, P., Haskell, M.J., Dewhurst, R.J. & Turner, S.P. (2017). Current available strategies to mitigate greenhouse gas emissions in livestock systems: an animal welfare perspective. *animal*, vol. 11 (2), ss. 274–284.
- Luton, P.E., Wayne, J.M., Sharp, R.J. & Riley, P.W. (2002). The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiology*, vol. 148 (11), ss. 3521–3530.
- Mackie, R.I. & White, B.A. (1990). Recent Advances in Rumen Microbial Ecology and Metabolism: Potential Impact on Nutrient Output. *Journal of Dairy Science*, vol. 73 (10), ss. 2971–2995.

- Maia, M.R.G., Chaudhary, L.C., Figueres, L. & Wallace, R.J. (2007). Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. 91 (4), ss. 303–314.
- Martin, C., Morgavi, D.P. & Doreau, M. (2010). Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *animal*, vol. 4 (3), ss. 351–365.
- McCann, J.C., Elolimy, A.A. & Loor, J.J. (2017). Rumen Microbiome, Probiotics, and Fermentation Additives. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, vol. 33 (3), ss. 539–553 (Digestive Disorders of the Forestomach).
- McGuffey, R.K., Richardson, L.F. & Wilkinson, J.I.D. (2001). Ionophores for Dairy Cattle: Current Status and Future Outlook. *Journal of Dairy Science*, vol. 84, ss. E194–E203.
- McSweeney, C.S., Denman, S.E. & Mackie, R.I. (2005). Rumen bacteria. I: Makkar, H.P.S. & McSweeney, C.S. (red) *Methods in Gut Microbial Ecology for Ruminants*. Dordrecht: Springer Netherlands, ss. 23–37.
- Miller, T.L. & Lin, C. (2002). Description of *Methanobrevibacter gottschalkii* sp. nov., *Methanobrevibacter thaueri* sp. nov., *Methanobrevibacter woesei* sp. nov. and *Methanobrevibacter wolunii* sp. nov.. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 52 (3), ss. 819–822.
- Mitsumori, M., Shinkai, T., Takenaka, A., Enishi, O., Higuchi, K., Kobayashi, Y., Nonaka, I., Asanuma, N., Denman, S.E. & McSweeney, C.S. (2012). Responses in digestion, rumen fermentation and microbial populations to inhibition of methane formation by a halogenated methane analogue. *British Journal of Nutrition*, vol. 108 (3), ss. 482–491.
- Moissl-Eichinger, C., Pausan, M., Taffner, J., Berg, G., Bang, C. & Schmitz, R.A. (2018). Archaea Are Interactive Components of Complex Microbiomes. *Trends in Microbiology*, vol. 26 (1), ss. 70–85.
- Moraes, L.E., Strathe, A.B., Fadel, J.G., Casper, D.P. & Kebreab, E. (2014). Prediction of enteric methane emissions from cattle. *Global Change Biology*, vol. 20 (7), ss. 2140–2148.
- Moss, A.R., Jouany, J.-P. & Newbold, J. (2000). Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Annales de Zootechnie*, vol. 49 (3), ss. 231–253.
- Newbold, C.J., Lassalas, B. & Jouany, J.P. (1995). The importance of methanogens associated with ciliate protozoa in ruminal methane production in vitro. *Letters in Applied Microbiology*, vol. 21 (4), ss. 230–234.
- Nohr, D., Biesalski, H.K. & Back, E.I. (2011). Vitamins | Vitamin B12. I: Fuquay, J.W. (red) *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)*. San Diego: Academic Press, ss. 675–677.
- Patra, A.K. (2012). Enteric methane mitigation technologies for ruminant livestock: a synthesis of current research and future directions. *Environmental Monitoring and Assessment*, vol. 184 (4), ss. 1929–1952.
- Patra, A.K. & Saxena, J. (2009). The effect and mode of action of saponins on the microbial populations and fermentation in the rumen and ruminant production. *Nutrition Research Reviews*, vol. 22 (02), s. 204.
- Patra, A.K. & Saxena, J. (2010). A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry*, vol. 71 (11), ss. 1198–1222.
- Peterson, D.A., McNulty, N.P., Guruge, J.L. & Gordon, J.I. (2007). IgA Response to Symbiotic Bacteria as a Mediator of Gut Homeostasis. *Cell Host & Microbe*, vol. 2 (5), ss. 328–339.
- Petri, R.M., Schwaiger, T., Penner, G.B., Beauchemin, K.A., Forster, R.J., McKinnon, J.J. & McAllister, T.A. (2013). Changes in the Rumen Epimural Bacterial Diversity of Beef Cattle as Affected by Diet and Induced Ruminal Acidosis. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 79 (12), ss. 3744–3755.

- Pitta, D.W., Pinchak, W.E., Indugu, N., Vecchiarelli, B., Sinha, R. & Fulford, J.D. (2016). Metagenomic Analysis of the Rumen Microbiome of Steers with Wheat-Induced Frothy Bloat. *Frontiers in Microbiology*, vol. 7. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00689>. [2019-03-15]
- Potter, E.L., VanDuyn, R.L. & Cooley, C.O. (1984). Monensin Toxicity in Cattle. *Journal of Animal Science*, vol. 58 (6), ss. 1499–1511.
- Roth, J., Lawrence, J. & Bobik, T. (1996). COBALAMIN (COENZYME B₁₂): Synthesis and Biological Significance. *Annual Review of Microbiology*, vol. 50 (1), ss. 137–181.
- Saengkerdsud, S. & Ricke, S.C. (2014). Ecology and characteristics of methanogenic archaea in animals and humans. *Critical Reviews in Microbiology*, vol. 40 (2), ss. 97–116.
- Samuel, B.S. & Gordon, J.I. (2006). A humanized gnotobiotic mouse model of host–archaeal–bacterial mutualism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 103 (26), ss. 10011–10016.
- Samuel, B.S., Hansen, E.E., Manchester, J.K., Coutinho, P.M., Henrissat, B., Fulton, R., Latreille, P., Kim, K., Wilson, R.K. & Gordon, J.I. (2007). Genomic and metabolic adaptations of *Methanobrevibacter smithii* to the human gut. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 104 (25), ss. 10643–10648.
- Sarmiento, F.B., Leigh, J.A. & Whitman, W.B. (2011). Genetic Systems for Hydrogenotrophic Methanogens. I: Rosenzweig, A.C. & Ragsdale, S.W. (red) *Methods in Enzymology*. Academic Press, ss. 43–73.
- Sjaastad, O. V., Hove, K. & Sand, O. (2016). *Physiology of Domestic Animals*. 3. uppl. Oslo: Scandinavian Veterinary Press.
- Steele, M.A., Croom, J., Kahler, M., AlZahal, O., Hook, S.E., Plaizier, K. & McBride, B.W. (2011). Bovine rumen epithelium undergoes rapid structural adaptations during grain-induced subacute ruminal acidosis. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, vol. 300 (6), ss. R1515–R1523.
- Stillwell, W. (2016). Membrane Transport. I: Stillwell, W. (red) *An Introduction to Biological Membranes*. 2 uppl. London: Elsevier, ss. 423–451.
- Thiele, J.H., Chartrain, M. & Zeikus, J.G. (1988). Control of Interspecies Electron Flow during Anaerobic Digestion: Role of Floc Formation in Syntrophic Methanogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 54 (1), ss. 10–19.
- Wedlock, D.N., Janssen, P.H., Leahy, S.C., Shu, D. & Buddle, B.M. (2013). Progress in the development of vaccines against rumen methanogens. *Animal*, vol. 7 (s2), ss. 244–252.
- Wina, E., Muetzel, S. & Becker, K. (2005). The Impact of Saponins or Saponin-Containing Plant Materials on Ruminant Production: A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53 (21), ss. 8093–8105.
- Woese, C.R., Kandler, O. & Wheelis, M.L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 87 (12), ss. 4576–4579.
- Wright, A.-D.G. & Klieve, A.V. (2011). Does the complexity of the rumen microbial ecology preclude methane mitigation? *Animal Feed Science and Technology*, vol. 166–167, ss. 248–253 (Special Issue: Greenhouse Gases in Animal Agriculture - Finding a Balance between Food and Emissions).
- Zeineldin, M., Barakat, R., Elolimy, A., Salem, A.Z.M., Elghandour, M.M.Y. & Monroy, J.C. (2018). Synergetic action between the rumen microbiota and bovine health. *Microbial Pathogenesis*, vol. 124, ss. 106–115.
- Zhang, Z.-W., Cao, Z.-J., Wang, Y.-L., Wang, Y.-J., Yang, H.-J. & Li, S.-L. (2018). Nitrocompounds as potential methanogenic inhibitors in ruminant animals: A review. *Animal Feed Science and Technology*, vol. 236, ss. 107–114.

Zhou, M., Chen, Y. & Guan, L.L. (2015). Rumen Bacteria. I: Puniya, A.K., Singh, R., & Kamra, D.N. (red) *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution*. New Delhi: Springer India, ss. 79–95.