

# NUTRITIVNE STRATEGIJE ZA SMANJENJE EMISIJE METANA U PREŽIVAČA

---

**Rendić, Dominik**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2022**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:872159>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-07**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -  
Repository of PHD, master's thesis](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
VETERINARSKI FAKULTET

Dominik Rendić

Nutritivne strategije za smanjenje emisije metana u  
preživača

Diplomski rad

Zagreb, 2022.

Zavod za prehranu i dijetetiku životinja  
Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Predstojnica: doc. dr. sc. Diana Brozić

Mentor: izv. prof. dr. sc. Hrvoje Valpotić

Članovi povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. prof. dr. sc. Tomislav Mašek
2. doc. dr. sc. Diana Brozić
3. izv. prof. dr. sc. Hrvoje Valpotić
4. prof. dr. sc. Željko Mikulec, zamjena

*Zahvaljujem se mentoru, profesoru Hrvoju Valpotiću na pomoći tijekom pisanja rada, koju je pružao svojim stručnim savjetima i susretljivošću.*

*Zahvaljujem se svojim kolegicama i kolegama na prijateljstvu, ohrabrujućim riječima i lijepim uspomenama koje sam doživio tijekom vremena provedenog na fakultetu.*

*Zahvala prijateljima, Igoru Puškariću i Vladimiru Skoku koji su skratili ponekad duge dane na fakultetu i olakšali polaganje kolokvija i ispita.*

*Zahvale mojoj djevojci Elizabeti Glotz na pruženoj podršci i znanju u trenucima kada sam ih najviše trebao, bez tebe bi bilo neusporedivo teže.*

*Posebne zahvale mojoj obitelji, roditeljima Lidiji i Željku, sestri Nikolini, braći Filipu i Mariju, koji su tijekom cijelog razdoblja školovanja bili moj oslonac i bezuvjetna podrška u psihološkom, financijskom ili bilo kojem drugom potrebnom obliku.*

*Svi doprinosite da ostvarim ono čemu težim i vjerujem da ću uz vašu podršku, a svoj trud i zalaganje nastaviti u smjeru rasta i izgradnje u bolju osobu, a onda i boljeg doktora veterinarske medicine.*

## POPIS PRILOGA

Jednadžba 1. Stvaranje metana i vode iz ugljikova dioksida i vodika.....	9
Slika 1. Anatomski prikaz probavnog sustava goveda.....	2
Slika 2. Usporedba veličine bakterija i protozoa.....	8
Slika 3. Shematski prikaz redukcije vodika mikrobiotom buraga.....	10
Slika 4. Shematski prikaz učinka staklenika.....	12
Slika 5. Kalcijev amonijev nitrat (CAN).....	18
Slika 6. Kemijska formula bromoforma.....	20
Slika 7. <i>Asparagopsis taxiformis</i> .....	21
Slika 8. Shematski prikaz respiracijske komore.....	22
Slika 9. <i>Moringa oleifera</i> .....	24
Tablica 1. Brojnost i uloga važnijih klasa mikroorganizama buraga.....	5

## POPIS KRATICA

DMI – dry matter intake, količina konzumirane hrane po danu, bez vlage

g/L – gram po litri

GWP – Global warming potential

L – litra

mmol/L – milimol po litri, koncentracija tvari u litri tekućine

NMK – niže masne kiseline

NAD<sup>+</sup> - nikotinamid adenin dinukleotid, oksidirani oblik koenzima

NADH - nikotinamid adenin dinukleotid, reducirani oblik koenzima

pH – *potentia hydrogenii*, negativni logaritam ravnoteže koncentracije vodikovih iona (H<sup>+</sup>)

ST – suha tvar

TMR – total mixed ration, ukupni mješoviti obrok

UH – ugljikohidrati

% - postotni udio

°C – Celzijev stupanj

# SADRŽAJ

1. Uvod.....	1
2. Probavni sustav preživača.....	2
2.1. Anatomija i fiziologija probavnog sustava.....	2
2.2. Mikropopulacija buraga.....	5
2.3. Sinteza metana u buragu (metanogeneza).....	9
3. Utjecaj preživača na ekološki sustav.....	11
4. Strategije hranidbe s ciljem smanjenja emisije metana.....	14
4.1. Hranidba kvalitetnim krmivom.....	14
4.2. Hranidba uz dodatak dijetetskih sastojaka.....	15
4.3. „Precizna“ hranidba.....	16
4.4. Inhibitori metanogeneze.....	16
4.5. Dodatak zaštićenih aminokiselina.....	18
4.6. Dodatak aditiva/ specifičnih dijelova biljaka.....	19
5. Crvena alga ( <i>Asparagopsis taxiformis</i> ).....	20
6. Moringa ( <i>Moringa oleifera</i> ).....	24
7. Zaključak.....	25
8. Literatura.....	26
9. Životopis.....	30

10. Sažetak.....	31
11. Summary.....	32



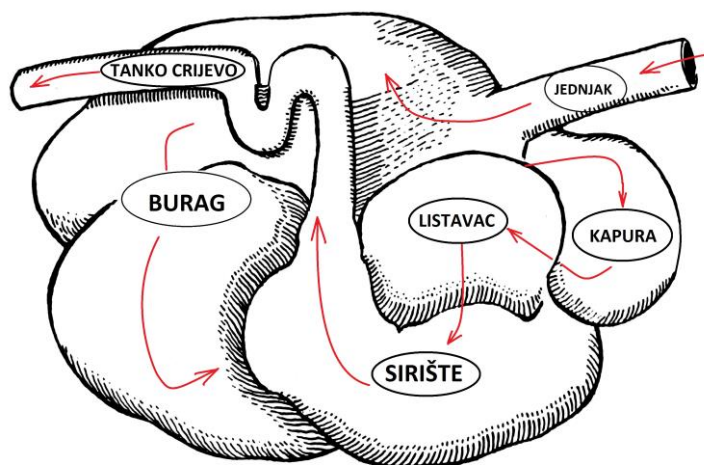
## 1. UVOD

Svjetsko stanovništvo u neprestanom je porastu i nezaustavljivo se približava broju od 8 milijardi ljudi. U skladu s navedenom činjenicom, rastu i potrebe za hranom, odnosno proizvodima životinjskog podrijetla koji služe za ljudsku ishranu (mlijeko, meso). Preživači čine jedinstveni izvor hrane i sve je značajnija intenzivna proizvodnja određenih vrsta preživača. Preživači su sisavci koji čine podred *Ruminantia*, a pripadaju redu *Artiodactyla* (parnoprstasi). U ovome radu naglasak će biti na govedima, ovcama i kozama, vrstama koje se intenzivno uzgajaju radi proizvodnje mesa, mlijeka, ali i vune. Preživači koriste hranu koja nije pogodna za ljudsku ishranu i pretvaraju je u proizvode koje ljudi konzumiraju (VAN ZIJDERVELD, 2011). U procesu probave hrane, u predželucima i crijevima preživača, dolazi do stvaranja velike količine plinova. Primjerice, visokomliječna krava tijekom 24 sata proizvede između 2000 i 4000 L plina procesom fermentacije u retikulumenu, a proizvedeni plin oslobađa se u okolinu putem podrigivanja (eruktacije). Smjesu plinova u buragu čine ugljikov dioksid (CO<sub>2</sub>), metan (CH<sub>4</sub>) i manja količina sumporovodika (H<sub>2</sub>S), vodika (H<sub>2</sub>), dušika (N<sub>2</sub>) i kisika (O<sub>2</sub>) (SJAASTAD i sur., 2010). Zbog navedenih podataka o količini proizvedenih plinova tijekom 24 sata, sve intenzivnije proizvodnje preživača i saznanja o štetnom utjecaju metana kao stakleničkog plina, potrebno je pronaći rješenje koje bi usporilo, a u dobroj vjeri i smanjilo akumulaciju metana u atmosferi i time umanjilo ekološki utjecaj preživača. Proces nastanka metana u predželucima preživača (metanogeneza) potpuno je poznat, stoga je moguće na njega utjecati, prvenstveno promjenama sastava hrane, odnosno dodavanjem određenih tvari koje mogu proces metanogeneze direktno inhibirati, smanjiti proizvodnju vodika tijekom procesa fermentacije ili omogućiti alternativne metaboličke puteve za stvoreni vodik koji je neophodan supstrat u stvaranju metana. Cilj ovoga rada je napraviti uvid u dosadašnja istraživanja i saznanja o pojedinim tvarima testiranim u laboratorijskim (*in vitro*) uvjetima, odnosno dodanim u hranu živim životinjama (*in vivo*) i njihovom utjecaju na proizvodnju metana, ali i proizvodnost životinja. Također, cilj je donijeti zaključak o mogućim rješenjima u vidu nutritivnih strategija na razini svijeta kako se proizvodnja, tj. broj životinja ne bi smanjivao, a stvaranje metana u predželucima smanjilo bez negativnog utjecaja na zdravlje životinja.

## 2. PROBAVNI SUSTAV PREŽIVAČA

### 2.1. Anatomija i fiziologija probavnog sustava

Preživači su životinje koje imaju specifičnu građu probavnog sustava, poglavito želuca. Naime, građom, ali i funkcijom njihov želudac je složen (Slika 1.). Goveda, ovce i koze pripadaju fermentatorima prednjega crijeva (fermentacija se odvija oralnije od pravoga želuca – sirišta). Probava se odvija velikim dijelom u predželucima (*proventriculus*) a u njih ubrajamo odjeljke (redom od jednjaka do sirišta): burag (*rumen*), kapura ili mrežac (*reticulum*) i knjižavac ili listavac (*omasum*). Pravi želudac (*ventriculus*) je sirište (*abomasum*). Predželuci su građeni od mnogoslojnog pločastog orožnjalog epitela i služe kao fermentacijske komore, u kojima se odvija razgradnja složenih ugljikohidrata (celuloze) pomoću mikroorganizama u odsutstvu kisika (KÖNIG I LIEBICH, 2005). U tom procesu nastaju kratkolančane masne kiseline (NMK) koje količinski čine najzastupljeniji produkt. Najznačajnije niže masne kiseline su octena, propionska i maslačna kiselina (SJAASTAD i sur., 2010). Sirište je pravi želudac i u njemu se nalaze žlijezde koje proizvode probavne enzime, građom odgovara jednostavnom želucu u ostalih vrsta životinja. U predželucima se nalazi izuzetno velika količina mikroorganizama koji svojim djelovanjem u anaerobnim uvjetima razgrađuju organsku materiju, taj proces naziva se fermentacija. Fermentacija iziskuje mnogo vremena i čini specifikum životinjskoga svijeta. Mikroorganizmi buraga i metabolizam u predželucima bit će opisani u daljnjim poglavljima.



**Slika 1. Anatomski prikaz probavnog sustava goveda**

(Izvor: [https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcShQod\\_ftAIigKP2LUH-WDpWal3pRQy620BK2AEcTExcZxKw4yE80LQljsGSIPrH\\_IERn4&usqp=CAU](https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcShQod_ftAIigKP2LUH-WDpWal3pRQy620BK2AEcTExcZxKw4yE80LQljsGSIPrH_IERn4&usqp=CAU))

## **BURAG (*rumen*)**

Burag je prvi od preželudaca i u njega se nastavlja progutani sadržaj iz usta, odnosno jednjaka, bolus (čini ga zbijena masa hrane i izlučena slina). Kod najedene životinje, burag se pruža lijevom stranom abdomena, od dijafragme (kranijalno) do ulaska u zdjeljicu šupljinu (kaudalno). Na vanjskoj strani ima podužne i poprečne žljebove koji burag dijele na vreće, gornju i donju (dorzalnu i ventralnu). Na prednjem dijelu buraga se nalazi prednja vreća (*atrium*) i na nju se nastavlja kapura, s kojom komunicira širokim otvorom, a anatomski ih odjeljuje buražno-kapurni nabor (*plica ruminoreticularis*). Unutarnju stijenku buraga čine podebljana stijenke buraga koje se nazivaju buragove grede (*pilae ruminis*) i odgovaraju vanjskim žljebovima (*sulci ruminis*). Pile služe za uspješnije raslojavanje sadržaja buraga i ublažavaju pomicanje sadržaja prilikom naglih pokreta životinje (SJAASTAD i sur., 2010). Sluznica buraga građena je od mnogoslojnog pločastog epitela koji se vidi kao bradavičaste tvorbe (*papillae ruminis*). Papile nisu uvijek i u svih životinja jednake veličine, njihovu veličinu definira način, odnosno sastav hrane koju životinja unosi, a funkcija im je povećanje resorptivne površine. Resorpciju pospješuje i obilni subepitelni pletež krvnih žila.

## **KAPURA (*reticulum*)**

Kapura ili mrežac je predželudac koji se nalazi u bliskom anatomsom odnosu sa ošitom, ali i perikardom. Zbog topografije, ali i zakona fizike, kapura je predilekcijsko mjesto zaustavljanja stranoga tijela i posljedične patologije (peritonitis, perikarditis itd.). Kapura ima izdašnu komunikaciju sa buragom, pa sadržaj lako prelazi iz jednoga u drugi predželudac, a pojedini autori ih zbog toga smatraju jednim odjeljkom. Kapura je većinom građena od mišićnih stanica i zbog toga su vrlo snažne njezine kontrakcije, koje imaju nezamjenjivu ulogu u procesu preživljanja. Unutarnja sluznica građena je od isprepletenih grebena (*cristae reticuli*) formirajući oblike (*cellulae reticuli*) koji nalikuju pčelinjem saću (SJAASTAD i sur., 2010). U goveda kapura može zaprimiti i do 20 litara sadržaja.

## **KNJIŽAVAC (*omasum*)**

Još se naziva i listavac, smješten je na desnoj strani prednjeg dijela buraga, u intratorakalnom dijelu abdomena. Na prijelazu iz kapure u knjižavac nalazi se kružni mišić (sfinkter) koji kontrolira prolazak sadržaja iz komore u komoru, a sfinkter se otvara samo u vrijeme kontrakcije kapure. Unutrašnjost knjižavca, kao što i sam naziv sugerira, bogat je listovima (*laminae omasi*) koji mu značajno povećavaju resorptivnu površinu, a na njima se nalaze i sitne papile. Listovi dijele šupljinu knjižavca u manje prostore, odvojke (*recessus omasi*), u kojima se može naći dospjeli sadržaj (KÖNIG I LIEBICH, 2005). Knjižavac u velikoj mjeri čine mišićne stanice, koje su zaslužne za dvofaznu kontrakciju, prva faza kontrakcije dovodi do utiskivanja sadržaja u odvojke knjižavca, tamo se odvija resorpcija vode, a drugom fazom, otprema se sadržaj koji je sušeg sastava, u sirište. Knjižavac je zbog svoje fiziologije *locus minoris resistentiae* za nastanak začepa, ukoliko se životinja pogrešno hrani.

## **SIRIŠTE (*abomasum*)**

Kao što je i ranije navedeno, odgovara jednostavnom želucu u drugih vrsta domaćih sisavaca. Osnovni dijelovi su mu *fundus*, *corpus* i *pylorus*, a također razlikujemo mali i veliki zavoj sirišta (*curvatura minor et major*). Sluznica je žljezdana, odnosno građena od fundusnih i pilorusnih žlijezda (*glandulae gastricae propriae et pyloricae*). Mišićnicu sirišta čine dva sloja, vanjski podužni (*stratum longitudinale*) i unutarnji kružni (*stratum circulare*). Topografski smještaj sirišta nije konstantan i ovisi o više čimbenika, kao što su punjenost probavnog sustava, aktivnost probavnog sustava, graviditet i dob životinje. Postoji određeni prostor u kojemu se fiziološki nalazi, ukoliko dođe do izlaska iz primjerenog anatomskeg područja, može doći do patologije koja se naziva dislokacija sirišta, a koja zahtjeva veterinarsku intervenciju.

## 2.2. Mikropopulacija buraga

Ovo poglavlje najbolje je započeti činjenicom da hranidbom krava, zapravo hranimo mikroorganizme koji se nalaze u buragu i kapuri. No, kao i sve vrste sisavaca, preživajući se rađaju sa sterilnim probavnim sustavom (bez prisutstva mikroorganizama), stoga se mikropopulacija unosi iz vanjske sredine, odnosno okoline novorođene životinje. Većina mikroorganizama unosi se sisanjem, točnije sa kože i sisa majke, ali do prijenosa dolazi i kada majka liže podmladak. Ovakav način formiranja mikroflore stavlja dodatni naglasak na važnost bliskog odnosa majke i mladunčeta, pogotovo kada govorimo o kolonizaciji protozoarnom faunom (SJAASTAD i sur., 2010). Naseljavanje buraga kreće u prvim danima, pa čak i satima života mladunčeta, ali uspostava mikroflore istovrsne odrasloj životinji događa se tek sa nekoliko mjeseci starosti, kada gruba hrana počinje dominirati u hranidbi teladi, janjadi i jaradi. Glavne klase mikroorganizama su bakterije, protozoe i gljivice (Tablica 1.). Navedena mikropopulacija živi, hrani se i razmnožava u složenom konkurentskom međuodnosu i čini jedan od najvećih prirodnih ekosustava. Najbrojnije su bakterije, sa udjelom od 50 do 90%, ali kada govorimo o ukupnoj masi bakterija (g/L sadržaja) u buragu, ona je podjednaka masi protozoa, koje su veće od bakterija (SJAASTAD i sur., 2010). Kada je sastav hrane i način hranidbe životinje ujednačen, podjednak je omjer pojedinih frakcija mikroorganizama. Ukoliko dođe do naglih promjena hranidbe dolazi do velikih izmjena mikroflore na štetu, odnosno korist određene frakcije, što ovisi o sastavu hrane, ali i uvjetima u buragu, gdje značajnu ulogu ima pH, pa je preporuka promjene hranidbe uvoditi postepeno, kroz dulji vremenski period (2 tjedna).

**Tablica 1. Brojnost i uloga važnijih klasa mikroorganizama buraga**

Mikroorganizam	Brojnost	Djelovanje u buragu
Bakterija	$10^{10}$ stanica/mL	Fermentacija, razmnožavanje
Protozoa	$10^5$ - $10^6$ stanica/mL	Fermentacija, razgradnja UH, bakterija i ostalih čestica, razmnožavanje
Archaea	$10^7$ - $10^9$ stanica/mL	Metabolizam vodika
Gljivice	$10^3$ - $10^5$ zoospora/mL	Izvor celulolitičkih enzima, razgradnja vlakana
Bakteriofagi	$10^8$ - $10^9$ stanica/mL	Razgradnja bakterija

(Izvor: LEAN i sur.,2014.)

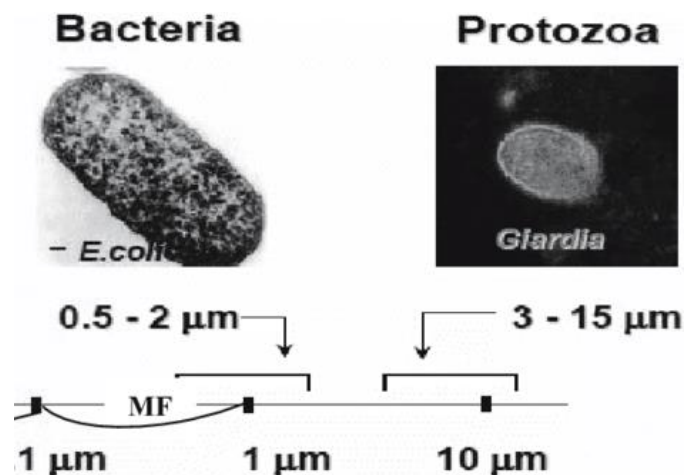
Mikroorganizmi se nalaze posvuda u buragu i kapuri, ali najviše ih ima u tekućoj fazi buragova sadržaja, priljubljeni su uz čestice hrane, kao i na površini epitela. Ovakav način smještanja važan je kako bi bakterije mogle metabolizirati hranu, ali i kako bi se mogle dovoljno dugo zadržati, tj. duže od njihovog životnog vijeka, a kako bi se mogla održati stabilna brojnost mikroflora u predželucima. Svaki od tipova mikroorganizama zauzima svoju nišu u ovome staništu i smatra se da je na određen način prilagođen, odnosno ima vrsno specifičnu prednost u odnosu na druge prisutne mikroorganizme. Osim konkurentskog odnosa, postoje i mikroorganizmi koji su u odnosu koji se naziva komenzalizam. Primjer komenzalizma, u kojemu jedan sudionik odnosa ima korist, a da pri tome drugi nema štetu, čini odnos između fakultativnih anaeroba i obligatnih anaeroba. Naime, kisik je prisutan u određenoj mjeri u sadržaju buraga i njega iskorištavaju fakultativni anaerobi, na taj način omogućuju obligatnim anaerobima (mikroorganizmima koji mogu živjeti i rasti samo u uvjetima bez kisika) sredinu koja je optimalna za njihov način življenja. Cijeli ekosustav retikulorumena hrani se, raste i razmnožava iskorištavanjem hrane koju životinja konzumira. Preživač ima koristi od mikroorganizama nakon njihovog ugibanja u predželucima ili sirištu, a probava i resorpcija hranjivih tvari podrijetlom od mikropopulacije odvija se u tankome crijevu. Kao što je već ranije spomenuto, mikroorganizmi razgrađuju makronutrijente (razgranate polimere poput celuloze i hemiceluloze) do brojnih završnih produkata. Produkti koji nastaju su NMK (octena, propionska i maslačna), laktat, sukcinat, ugljikov dioksid, vodik i metan. Potrebni uvjeti za fiziološko razgrađivanje hrane u buragu su optimalan pH, koji iznosi od 6,0 do 6,8, koncentracija amonijaka, odnosno amonijevog kationa ( $\text{NH}_4^+$ ) od oko 5 mmol/L i prisutnost određene količine kisika (SJAASTAD i sur., 2010). Amonijak je vrlo važan izvor dušika koji je neophodan u sintezi bjelančevina u buragu i navedena koncentracija čini fiziološki minimum za održavanje fermentacije i mikrobne populacije uopće. Prisutnost kisika omogućuje razgradnju do završnih produkata, ugljikovog dioksida i vode. U nastavku ovoga poglavlja, navest ću klasifikaciju bakterija buraga, opisati djelovanje protozoa i gljivica u ekosustavu retikulorumena.

## **KLASIFIKACIJA BAKTERIJA RETIKULORUMENA**

Postoje različite podjele bakterija buraga, od toga kakve su njihove potrebe za kisikom, kako se bojuju prema Grammu, kakve su veličine i sl. Najkorisnija je ona podjela, koja govori koje hranjive tvari metaboliziraju, ali i koje produkte metabolizma stvaraju. Takva podjela pojednostavljena je i obično se prikazuje shematski zbog toga što pojedine bakterije razlažu točno određene hranjive tvari, dok druge mogu metabolizirati više hranjivih tvari. Bakterije dijelimo u primarne i sekundarne, primarne su one koje razgrađuju hranjive tvari koje se nalaze u hrani, primjerice ugljikohidrate, sekundarne su bakterije one koje koriste proizvode primarnih bakterija. Primarne bakterije koje razgrađuju ugljikohidrate dijele se na amilolitičke i celulolitičke, dok bakterije koje razgrađuju bjelančevine iz hrane nazivamo proteolitičkim. Bakterije specijalizirane za stvaranje metana su metanogene bakterije. Amilolitičke bakterije razgrađuju škrob i topive UH u hrani i stvaraju NMK te time snižavaju pH sadržaja buraga (one same dobro podnose nizak pH). Celulolitičke bakterije sadrže širok obim enzima kojima razgrađuju stijenku biljnih stanica koja je građena od kompleksnih struktura povezanih  $\beta$ -glikozidnom vezom (celuloza, kemiceluloza, fruktozani i pektin), svojim djelovanjem stvaraju monosaharide koji kasnije prelaze u NMK (SJAASTAD i sur., 2010). Celulolitičke bakterije osjetljive su na nizak pH i učinkovitost im značajno pada kada se pH sadržaja spusti ispod pH 6. Proteolitičke bakterije razgrađuju bjelančevine iz hrane do peptida i aminokiselina, a nastale aminokiseline služe za sintezu proteina mikroorganizama ili se pretvaraju u organske kiseline i amonijak u procesu deaminacije. Metanogene bakterije su one koje koriste vodik i ugljikov dioksid nastao razgradnjom i stvaraju plin metan, koji zauzima 30-40% ukupnog plina proizvedenog u buragu.

## **PROTOZOE BURAGA**

Protozoe ili praživotinje su eukariotski organizmi koji su građeni od samo 1 stanice koja vrši sve funkcije. Žive u odsutstvu kisika (obligatni anaerobi) i veći su od bakterija, aktivno se kreću pomoću cilija i zbog toga ih zovemo cilijatima. Razlika u veličini prikazana je Slikom 2., na primjeru bakterije *Eschericia coli* i protozoe *Giardiae duodenalis*.



**Slika 2. Usporedba veličine bakterija i protozoa**

(Izvor: BODZEK i sur., 2019.)

Cilijati u buragu proizvode NMK, laktat, ugljikov dioksid i vodik od čestica hrane, ali i od bakterija koje mogu probavljati (SJAASTAD i sur., 2010). Populacija protozoa skladišti u svojoj citoplazmi glukozu u obliku glikogena i na svojstveni način puferira buražni sadržaj u slučaju obilne hranidbe lakoprobavljivim UH, usporavajući tvorbu NMK od škroba i posljedičnu acidozu buraga. Značajno je reći i to, da se uloga protozoa u metabolizmu još uvijek istražuje, pa tek predstoji uvidjeti njihovu važnost, ali i „štetnost“ s obzirom da stvaraju velike količine vodika koji je ključni supstrat u metanogenezi.

## GLJIVICE

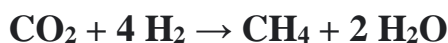
Gljivice, iako malobrojne (uspoređujući sa ostalim klasama mikroorganizama), itekako su značajne za probavu u retikulumenu. Naime, njihova je najznačajnija uloga da razgrađuju, tj. cijepaju vlakna lignina (neugljikohidratni polifenolni polimer) u anaerobnim i aerobnim uvjetima. Od iznimne je važnosti da se gljivice zadrže na česticama hrane koje u buragu prebivaju duže nego li je životni vijek gljivica, a sve kako bi se razmnožile i održale svoju brojnost u prostoru predželudaca.



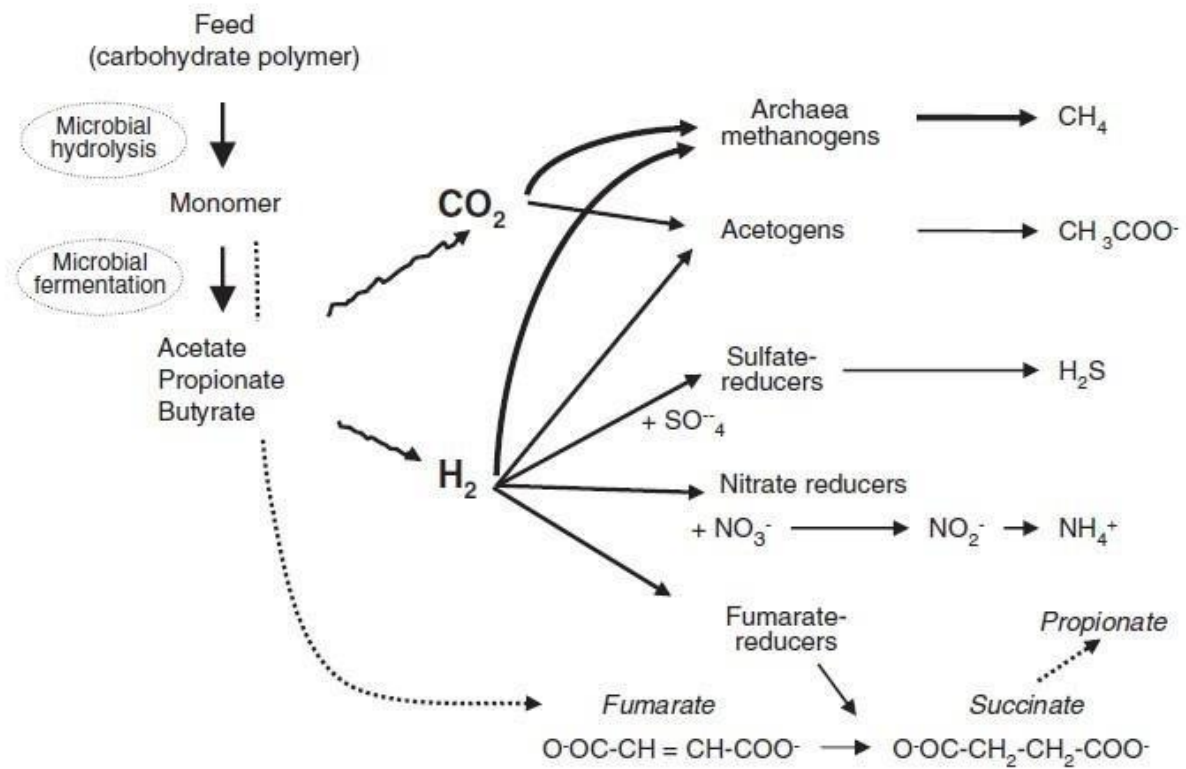
### 2.3. Sinteza metana u buragu (metanogeneza)

Procesi metaboliziranja makronutrijenata u buragu (fermentacija) složeni su i čine okosnicu fiziologije probavnog sustava. Proces je to kojim se preživaču omogućuje iskorištavanje energije iz hrane, a time i proizvodnja mesa, mlijeka i potomaka. Ovo poglavlje, sukladno temi rada, bit će posvećeno procesu stvaranja metana, dok se metabolizam ugljikohidrata, bjelančevina, masti ili toksina u probavnom sustavu preživača ovdje neće detaljno opisivati, što ne umanjuje njihovu važnost. Kako bi fermentacijski proces u retikulumenu tekao fiziološki, vrlo je važan koenzim nikotinamid adenin dinukleotid ( $\text{NAD}^+$ ) koji se prilikom stvaranja piruvata i laktata od glukoze i drugih monosaharida reducira u NADH (prima na sebe  $\text{H}^+$  i dva elektrona negativnog naboja).  $\text{NAD}^+$  i NADH čine redoks-par, odnosno dva stanja iste molekule (koezima). Koenzim  $\text{NAD}^+$  od iznimne je važnosti za metaboličke procese i potrebno je da se iz stanja NADH (neutralnog) oksidira u  $\text{NAD}^+$ . Kada se kaže oksidirati, podrazumijeva se da je u jednadžbu uključen i kisik, što u većini slučajeva i jest, ali u uvjetima buraga u kojima je vrlo malo kisika to nije moguće. Do oksidacije NADH dolazi drugim putevima, odnosno redukcijom ugljikova dioksida s vodikom (Jednadžba 1.).

#### Jednadžba 1. Stvaranje metana i vode iz ugljikova dioksida i vodika



Gore navedena reakcija omogućuje smanjenje koncentracije vodika u sadržaju buraga, što uvelike olakšava obnovu  $\text{NAD}^+$ , a posljedično i odvijanje fermentacije. Plin metan u sebi sadrži veliku količinu energije koju preživač ne može iskoristiti. Najbolje govori podatak da se gubici energije metanom procjenjuju na približno 7% ukupno proizvedene energije putem fermentacije (SJAASTAD i sur., 2010), što čini još jedan u nizu razloga zbog kojega se istražuje način kojim bi se smanjila sinteza metana. Slika 3. prikazuje metaboličke puteve ugljikovog dioksida i vodika.



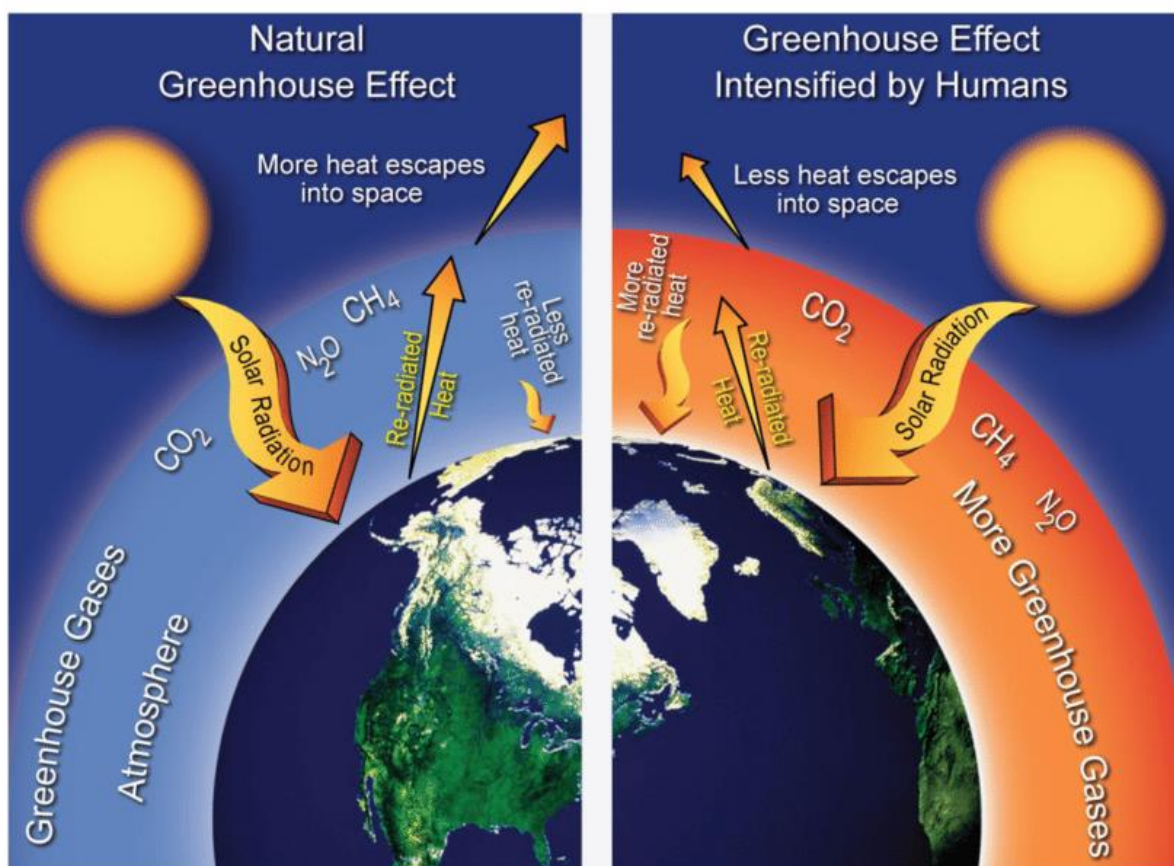
**Slika 3. Shematski prikaz redukcije vodika mikrobiotom buraga**

(Izvor: ZOUPANIDOU, 2019.)

### 3. UTJECAJ PREŽIVAČA NA EKOLOŠKI SUSTAV

Nove spoznaje o emisiji stakleničkih plinova, u prvome redu metana, ali i samim povećanjem utjecaja stočarskog sektora koji uzgaja preživače, rasvijetlile su značaj i cjelokupnu sliku intenzivnog uzgoja preživača u odnosu na ekološki sustav cijele Zemlje. Metan, ugljikov dioksid i didušikov oksid upijaju dugovalne zrake koje se odbijaju od Zemljine površine, te se zbog toga nazivaju stakleničkim plinovima i njihov utjecaj pojednostavljeno prikazuje Slika 4., a koji će detaljnije biti opisan u daljnjem tekstu. Staklenički učinak prirodan je proces u Zemljinoj atmosferi i kao takav omogućuje nam uvjete za život (na Zemlji bi bilo prehladno da ne postoji efekt staklenika). No, antropogenim utjecajem (povećanjem industrije i intenzivne proizvodnje), dolazi do povećane emisije stakleničkih plinova i intenziviranja učinka staklenika. Sunce radijacijom zagrijava Zemljinu površinu i atmosferu, dio sunčevog zračenja se odbija (reflektira) i odašilje natrag u atmosferu, odnosno u svemir. Toplina se tijekom reflektiranja u svemir apsorbira česticama stakleničkih plinova koje se nalaze u Zemljinoj atmosferi, bez mogućnosti da prodre u dublje predjele svemira. Pojava da se sunčevo zračenje prema Zemlji propušta prema površini, ali se ne može otpustiti u svemir, događa se zbog razlika u valnim duljinama zraka i u termodinamici se naziva selektivno zračenje plinova (MEL'MAN, 1979). Toplina koja se nalazi vezana uz čestice plinova radijacijom se vraća ponovno na Zemlju i doprinosi formiranju temperature na površini. Iz svega navedenoga, povećanjem količine stakleničkih plinova u Zemljinoj atmosferi, povećava se količina zadržane topline, a posljedično se i Zemlja više zagrijava. Kako bismo si približili jačinu utjecaja pojedinih stakleničkih plinova, osmišljeni su pojmovi relativni staklenički potencijal (GWP) i ekvivalentni CO<sub>2</sub> (CO<sub>2ekv</sub>). GWP je vrijednost koja govori koliko jedna molekula određenog spoja (plina) može apsorbirati topline u odnosu na referentni plin, ali i o godinama provedenim u atmosferi. Referentni plin je ugljikov dioksid i njegov relativni staklenički potencijal je 1. Metan ima relativni staklenički potencijal 28 (IPCC, 2014), što zapravo govori da 1 kilogram plina metana ima isti učinak kao i 28 kilograma ugljikovog dioksida (jednako topline mogu apsorbirati).

## Human Influence on the Greenhouse Effect



**Slika 4. Shematski prikaz učinka staklenika**

(Izvor: GELEADRI i sur., 2020.)

Sumporheksafluorid (SF<sub>6</sub>) je sintetički plin, nastaje u industriji i sadržava ga električna oprema, u smjesi plinova u atmosferi ima ga iznimno malo. Važno ga je spomenuti jer ima relativni staklenički potencijal 23 900, što ga čini najpotentnijim poznatim stakleničkim plinom. Metan u atmosferi ima životini vijek od 12 do 17 godina, a CO<sub>2</sub> 50 do 200. GWP se prati i uspoređuje kroz određen period godina, 100 ili 20. Ako promatramo GWP kroz 100 godina, metan tada ima relativni staklenički potencijal od 28 do 36. No, zbog vremena provedenog u atmosferi (12-17 godina), promatrajući apsorpciju kroz period od 20 godina, GWP metana iznosi 84-87 (VALLERO, 2019). Koristeći širi vremenski prozor (100 godina), dolazi do povećane akumulacije ugljikova dioksida kojemu je vrijeme zadržavanja do 200 godina i time smanjujemo potencijal plinova koji se kraće zadržavaju u atmosferi, a uspoređuju se u odnosu na apsorpciju CO<sub>2</sub> (VALLERO, 2019). Pojam „ekvivalencija CO<sub>2</sub>“ proizlazi iz pojma relativni staklenički potencijal i količine stvorenih stakleničkih plinova (u milionima metričkih tona), a

zapravo govori koliko je CO<sub>2</sub> potrebno da bi imao jednak relativni staklenički potencijal sa određenom smjesom stakleničkih plinova. Ovaj pojam osmišljen je radi lakšeg prikazivanja emisija ostalih stakleničkih plinova i definira se kroz određeni vremenski period, najčešće 100 godina (VALLERO, 2019).

## **4. STRATEGIJE HRANIDBE S CILJEM SMANJENJA EMISIJE METANA**

Kada govorimo o hranidbi preživača, postoje osnovne smjernice i preporuke programa hranidbe životinja, kako bi im se zadovoljile osnovne potrebe i osigurala sloboda od gladi, ali i omogućila proizvodnja primjerena vrsti, pasmini, spolu i dobi životinje. No, važno je istaknuti da se iste životinjske vrste uzgajaju u različitim dijelovima svijeta, gdje su osim klimatskih uvjeta, različite i dostupne vrste hrane, a moguće i zakonske regulative unutar određene države koje ograničavaju stočare u vidu hranidbe. Osmišljene su strategije kojima bi se mogla smanjiti proizvodnja metana u preživača, a one uključuju: hranidbu kvalitetnim krmivom (4.1.), dodavanje dijetetskih sastojaka u hranu (4.2.), „preciznu“ hranidbu (4.3.), dodatke prehrani koji inhibiraju metanogenezu (4.4.), dodatak zaštićenih aminokiselina (4.5.), dodatak aditiva i/ili specifičnih dijelova biljke (4.6.) kako navode Yáñez-Ruiz i suradnici (2017).

Ovo poglavlje bit će posvećeno gore navedenim strategijama, sa naglaskom na sastojke hrane koji se dodaju u smjesu preživačima s ciljem smanjenja emisije metana, a također će objasniti općeniti utjecaj opisanih sastojaka na ukupno zdravlje životinja, proizvodnju mesa, mlijeka i podmlatka.

### **4.1. Hranidba kvalitetnim krmivom**

Strategija hranidbe kvalitetnim krmivom nije nastala kao rješenje za problem akumulacije metana, već predstavlja općenitu smjernicu u hranidbi životinja. Hranidbom životinja kvalitetnom, visoko probavljivom hranom, omogućit ćemo pravilnu funkciju probavnog sustava, odnosno mikropopulacije buraga, koja će životinji osigurati energiju neophodnu za održavanje homeostaze i proizvodnju. Krmivo ima utjecaj na proizvodnju metana u probavi preživača, a kao najvažnija karakteristika navodi se probavljivost. Stočna hrana visoke probavljivosti povećava količinu konzumirane hrane i produktivnost životinje, što dovodi do smanjenja produkcije metana po jedinici konzumirane hrane (BLAXTER i CLAPPERTON, 1965). Krmiva predstavljaju sastojke obroka preživača koji su u pravilu varijabilnog sastava jer ovisi o više čimbenika. Sastav makronutrijenata, kao i mikronutrijenata ovisi o vrsti biljke, razvojnoj fazi biljke, vremenu žetve, načinu skladištenja itd. Navedeni čimbenici definiraju omjer strukturnih (teže probavljivih) i fermentirajućih ugljikohidrata (lako probavljivih) u krmivu, pa je važno ovu činjenicu imati na umu tijekom proizvodnje stočne hrane (HRISTOV i sur., 2013).

## 4.2. Hranidba uz dodatak dijetetskih sastojaka

Hranidba uz dodatak dijetetskih sastojaka čini strategiju pomoću koje se povećava probavljivost, odnosno resorpcija hranjivih sastojaka iz hrane, a time i osigurava veća količina energije za proizvodnju. Nedostatak strategije je taj što se koriste sastojci hrane primjenjivi u ljudskoj prehrani, ali i nejednolika dostupnost takve vrste hrane u Svijetu. Dijetetski sastojci koji su predmet istraživanja s ciljem smanjenja stakleničkih plinova (metana) su masti (jestivi lipidi i nusprodukti industrija sa visokim sadržajem ulja). Dodatak ulja, odnosno masti u hranu za preživače, rezultira smanjenjem emisije metana, točnije smanjenje od 3,5 % na dodatak 10 g ulja/kg ST hrane, kako navode Moate i suradnici (2011). Dodatkom ulja sjemenki pamuka preko fistule izravno u burag mliječnih krava, došlo je do smanjenja emisije metana za 14% (g/kg unesene suhe tvari) u odnosu na kontrolnu skupinu (WILLIAMS i sur., 2020). Dodatak masnih kiselina srednjeg lanca (C<sub>8</sub>:C<sub>14</sub>) podrijetlom od kokosovog ili palminog ulja najuspješnije smanjuje stvaranje metana (HAQUE, 2018). Martin i suradnici (2010) smatraju da masti na četiri načina smanjuju proizvodnju metana, a to su: 1) smanjenje fermentacije u buragu zbog smanjene količine fermentirajućih tvari (UH), 2) smanjenje broja i aktivnosti metanogenih organizama u buragu, 3) toksični učinak na celulolitičke bakterije i protozoe i 4) biohidrogenacija nezasićenih masnih kiselina koja se izravno „natječe“ sa metanogenezom za vodik stvoren probavom. Uz sve navedeno, dodatak lipida u hranu može negativno utjecati na unos hrane, prvenstveno ugljikohidrata, a posljedično i smanjenu proizvodnost životinja (HRISTOV i sur., 2013). Maksimalna količina lipida u hrani iznosi 70 g/kg ST hrane (ROOKE i sur., 2016).

Nusprodukti destilacije žitarica i industrije biogoriva predstavljaju izvor hrane sa visokim sadržajem masnih kiselina i cjenovno su vrlo prihvatljive kao izvor jestivih lipida u hrani za preživače, a također imaju utjecaj na smanjenje produkcije metana u preživača.



### **4.3. „Precizna“ hranidba**

Ova sintagma podrazumijeva način hranidbe životinja u skladu s njihovim točnim potrebama, sa ciljem izbjegavanja nedostatnog, odnosno pretjeranog hranjenja životinja. Točnim određivanjem potreba životinje za makro i mikronutrijentima, u skladu s njenom dobi, spolom i stadijem proizvodnje, uspješno se postižu maksimalne vrijednosti proizvodnje, a emisija stakleničkih plinova i gubitak hrane svode se na najmanje moguće vrijednosti (izuzevši vrijednosti uz dodatak antimetanolgenskih tvari). Strategija „precizne“ hranidbe postiže uravnotežen i optimalan rad mikropopulacije buraga i omogućuje efikasnu i obilnu sintezu proteina (HRISTOV i sur., 2013). Brojna su istraživanja koja govore u korist individualnog načina hranidbe životinja, a jedno od njih je i ono koje su proveli Garg i suradnici (2013). U navedenom istraživanju, mliječne krave hranjene uravnoteženim obrocima povećale su unos proteina i energije (71% krava), a sukladno tome povećale su se mliječnost (2-14%) i mliječna mast (0,2-15%). Za postizanje praktične vrijednosti „precizne“ hranidbe, potrebna je vjerodostojna i točna analiza sastojaka hrane, pa je od ključne važnosti standardizacija analitičkih postupaka. Napretkom tehnologije, stvoren je sustav koji lako i jeftino određuje kvalitetu i sastav krmiva, uljarica i zrna, a naziva se NIRS (near-infrared reflectance spectroscopy) (HRISTOV i sur., 2013). Sustav NIRS stočarima omogućuje provedbu ove strategije u praktičnom dijelu.

### **4.4. Inhibitori metanogeneze**

Strategija je ovo dodatka kemijskih spojeva (prirodnih ili sintetski proizvedenih) koji imaju učinak na stvaranje metana u probavnom sustavu, odnosno upliću se u određenoj fazi u proces sinteze metana i na taj način smanjuju njegovu proizvodnju u retikulumenu. Spojevi koji će biti navedeni u daljnjem tekstu dokazano su učinkoviti. No, zbog njihovog specifičnog djelovanja, relativno nedavnog otkrivanja ili toksičnosti, zahtijevaju daljnje eksperimentiranje i istraživanje stručnjaka prije moguće šire upotrebe istih. Spoj specifično sintetiziran s ciljem smanjenja emisije metana u preživača je 3-nitro oxypropanol (3NOP). 3NOP je strukturni analog metil-koenzima M, a on je inhibitor metil-koenzim M reduktaze, koja čini završni korak u sintezi metana od strane Archaea (DUIN i sur., 2016). Optimalna doza za pojedinu vrstu životinja još se istražuje, a zasada je to 1 g dnevno u tovni životinja i 2 g dnevno za mliječna goveda, odnosno u prosjeku 106 mg/kg ST (ROOKE i sur., 2016). Način aplikacije sredstva može biti u premiksi ili putem bolusa sa produljenim vremenom otpuštanja. Preporučena doza



od 60 mg/kg ST, smatra se, dovodi do smanjenja produkcije metana za 30%. 3-nitrooxypropanol je spoj čije se djelovanje na organizam još proučava. Postoji saznanje da se odmah nakon aplikacije spoja rapidno smanjuje produkcija metana (brza resorpcija u buragu), što upućuje na to da bi spoj mogao biti još učinkovitiji konstantnom aplikacijom u niskim dozama (HRISTOV i sur., 2013). U ovaca, 3NOP donio je smanjenje od 24% (stvaranje CH<sub>4</sub> po jedinici unesene ST) (MARTINEZ-FERNANDEZ i sur., 2013).

Nitrat je po kemijskom sastavu sol dušične kiseline i nije klasični inhibitor metanogeneze, već primatelj elektrona. Nitrat se pod utjecajem mikroorganizama buraga konstantno reducira u nitrite, a konačno u amonijak. Proces redukcije nitrata u amonijak zahtijeva vodik kao supstrat, pa tako prisutnost nitrata u buragu smanjuje količinu vodika raspoloživu za metanogenezu i na taj način smanjuje stvaranje metana. Korištenjem nitrita u prehrani životinja, potrebno je smanjiti količinu proteina iz drugih sastojaka hrane, kako bi se izbjegao nepotrebn gubitak dušika putem ekskremenata. Strategija koja uključuje upotrebu nitrita u prehrani životinja zahtijeva period prilagodbe na dodani sastojak zbog svoje toksičnosti ukoliko se konzumira u velikoj količini od strane neprilagođenih životinja. Period prilagodbe podrazumijeva postepeno povećanje doze dodanog sastojka u ukupnu količinu ponuđene hrane. Akutni simptomi trovanja nitritima su anoksija i posljedična smrt zbog methemoglobinemije, a kronično se pojavljuje smanjena mliječnost, povećana primljivost infekcijama i patološki rast. Nitriti se dodaju u hranu za životinje u obliku kalcijevog amonijevog nitrata (Slika 5.), koji se najčešće dodaje u TMR ili u peletiranu hranu (ROOKE i sur., 2016). Doza koju su koristili Rooke i suradnici (2016) iznosila je 21 g nitrita/ kg ST hrane, a navedena količina postigla je smanjenje emisije od 21%. Dodatak nitrata kao strategija u smanjenju emisije metana neprestano se propitkuje i istražuje. Dosadašnja istraživanja upućuju na to, da je šira primjena nitrata u hrani za životinje vrlo teško provediva, prvenstveno zbog toksičnosti, odnosno ugroze zdravlja životinja, te se ova tvar nalazi u regulacijama EU o dodacima u hrani za životinje. Potencijal nitrata kao primatelja elektrona nedvojbjen je i zaslužuje interes i daljnje istraživanje s ciljem unaprjeđenja načina aplikacije nitrata i posljedičnog smanjenja opasnosti za zdravlje životinja (PEGORARO i ARAUJO, 2012). U skupinu tvari koje se ponašaju kao primatelji elektrona ubrajaju se i sulfati, fumarati i nitroetan. Brojna su istraživanja provedena kako bi se ispitaio njihov učinak na spomenute parametre, a zaključak je da su ili slabije učinkoviti (fumarat) ili sa zdravstvenog stajališta opasniji (sulfati) u odnosu na opisane nitrate.



**Slika 5. Kalcijev amonijev nitrat (CAN)**

(izvor: <http://hr.guangyuanfertilizer.com/nitrogen-fertilizer/calcium-ammonium-nitrate/>)

#### **4.5. Dodatak zaštićenih aminokiselina**

Zaštićene aminokiseline su one koje mikroorganizmi buraga ne mogu koristiti za svoj rast i razmnožavanje te, one bivaju resorbirane u anatomski najoralnijem dijelu tankoga crijeva, duodenumu. Smanjenjem udjela sirovih bjelančevina u hranidbi preživača i dodatkom, od razgradnje u buragu, zaštićenih aminokiselina, dobivaju se obećavajući rezultati. Naime, provedena istraživanja pokazuju jednaku kvalitetu mlijeka u mliječnih Holstein-Friesian goveda hranjenih dodatkom zaštićenih aminokiselina, a značajno smanjenje količine izlučenog dušika putem mokraće i fecesa, kao i smanjenje emisije metana (SHIRMOHAMMADI i sur., 2022). Strategija niske doze sirovog proteina u hrani sa dodatkom zaštićenih aminokiselina predstavlja vrlo spretno rješenje u borbi sa stakleničkim plinovima, a bez gubitka na kvaliteti životinjskih proizvoda. Osim prednosti koje donosi u smislu smanjenja emisije, donosi i uštedu u smislu smanjenja gubitka energije i dušika u obliku ekskremenata i izlučenih plinova.

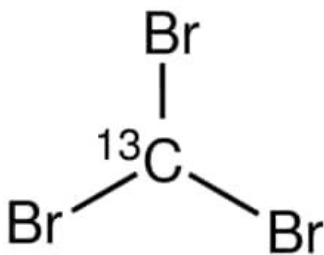
#### **4.6. Dodatak aditiva/specifičnih dijelova biljaka**

Strategija dodatka specifičnih dijelova biljke u hranu za životinje čini široko, a time i još uvijek nedovoljno istraženo područje. Brojni su sekundarni metaboliti biljaka istraženi, no većina njih nije se pokazala djelotvornima u ovome području. Tvari koje nisu donijele značajne promjene u produkciji metana u preživača su primjerice esencijalna ulja, saponini (ROOKE i sur., 2016), smrekina smola i ekstrakt češnjaka i citrusa (BAYAT i sur., 2022). Pa ipak, kondenzirani tanini ostvarili su zadovoljavajuće rezultate u smanjenju emisije metana. Kondenzirani tanini su polimeri koji nastaju kondenzacijom flavana. Flavan je sastavni dio određenih vrsta biljaka i dokazano je da posjeduje protuupalni i vazoprotektivni učinak (VOVK i GLAVNIK, 2015). Smatra se da je tanin nastao kao sredstvo zaštite biljaka od bilježdera, jer ima negativan utjecaj na metabolizam proteina, što čini glavni problem i ograničenje prema široj primjeni tanina u prehrani preživača. Tanin sudjeluje u brojnim metaboličkim procesima, a također „suprimira aktivnost metanogenih mikroorganizama u buragu i na taj način smanjuje emisiju metana“ (WOODWARD i sur., 2001). Iako smanjuje metabolizam proteina, dodatak tanina u hrani do 2% ST ne utječe na kvantitetu i kvalitetu proizvedenog mlijeka (JAYANEGARA i sur., 2012). Vidljiv je vrlo značajan učinak tanina na smanjenje emisije amonijaka putem stajnjaka (AGUERRE i sur., 2011). Haque (2018) zaključuje da hranidba taninom bogatim biljkama, kao što su lotus, lucerna, slatkovina ili cikorija, ostvaruje smanjenje emisije metana do 55%. Hranidba uz dodatak tanina ima svoje pozitivne i negativne karakteristike koje su ranije navedene. Predan i stručan rad znanstvenika uskoro bi mogao dovesti do konsenzusa o pravilnoj primjeni tanina u hrani koja će maksimizirati pozitivne, a svesti na najmanju mjeru neželjene učinke ove tvari na metabolizam.

## 5. CRVENA ALGA (*Asparagopsis taxiformis*)

Ovo poglavlje odvojeno je od ostatka strategija hranidbe s ciljem smanjenja emisije metana, kako bi se stavio naglasak na vrijednost i značaj alge *Asparagopsis taxiformis* koja će detaljno biti opisana u daljnjem tekstu.

*Asparagopsis taxiformis* (Slika 7.), ranijeg naziva *A. sanfordiana*, vrsta je crvenih algi i nastanjuje topla tropska mora, prvi je put pronađena u moru koje okružuje otok Rodos koji pripada Egejskim otocima i nalazi se u Grčkoj. U provedenom istraživanju (KINLEY i sur., 2020) ubrane su alge u stadiju gametofita, nakon toga su uskladištene i smrznute na  $-15^{\circ}\text{C}$ , osušene do konstantne težine (95% suhe tvari), kako bi zadržale bromoform (Slika 6.), koji je biološki aktivna tvar (antimetanogen).



**Slika 6. Kemijska formula bromoforma**

(izvor: <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/aldrich/488275>)

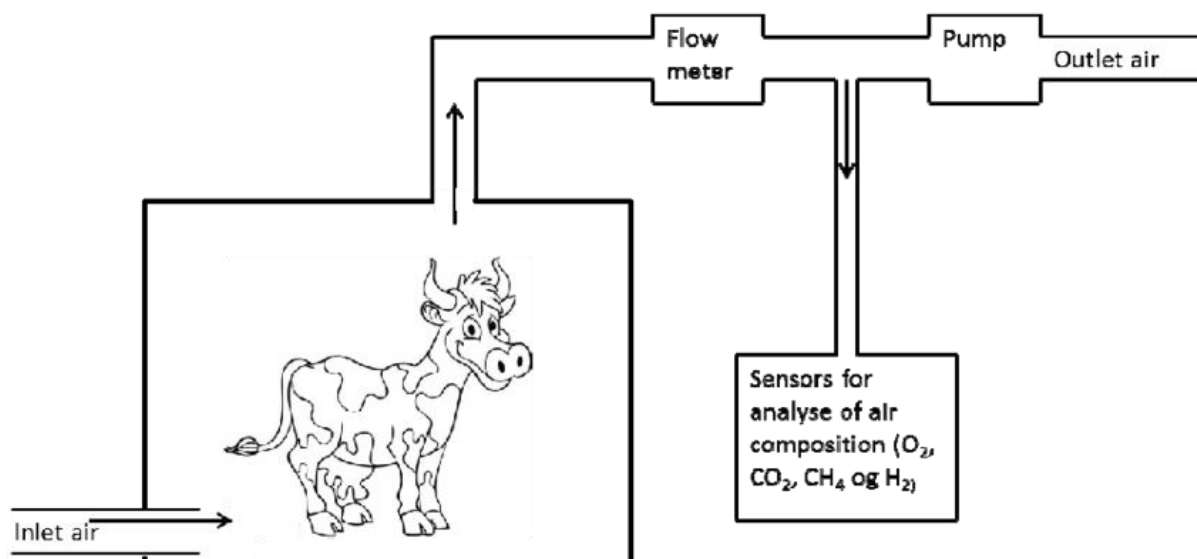
Koncentracija bromoforma u algama bila je 6.55 mg/g. *Asparagopsis* je dodan u TMR (ukupni mješoviti obrok). Istraživanje se provodilo na 20 volova Brahman – Angus pasmine, prosječne težine 477 kg. Životinje su se kroz 45 dana prilagođavale na smjesu hrane koja se koristila kroz istraživanje, bez dodatka alge *Asparagopsis taxiformis*. Nakon 45 dana prilagodbe, u hranu se postepeno uvodila crvena alga do željenih koncentracija, kroz 30 dana, a pri tome je trajala i prilagodba životinja na respiracijske komore (prostore u kojima su mjerene količine izlučenih plinova (Slika 8.)). Idućih 60 dana životinje su promatrane i bilježene su razine proizvedenih plinova, količina uzete hrane, konverzija hrane i dnevni porast tjelesne težine, te količina proizvedenih nižih masnih kiselina u buragu. Po završetku istraživanja, životinje su zaklane i provedena je senzorička pretraga mesa, kao i procjena kvalitete mesa za jelo, a mjerene su razine bromoforma u tkivu predmetnih životinja.



**Slika 7. *Asparagopsis taxiformis***

(Izvor: TSIAMIS i sur., 2007.)

Provedena je analiza učinka dodatka *Asparagopsis* alge u hrani za preživače, a razlikovale su se kontrolna (bez dodatka crvene alge), „niska“ (0,05%), „srednja“ (0,1%) i „visoka“ (0,20%) skupina, ovisno o koncentraciji *Asparagopsis taxiformis* u organskoj tvari hrane. Rezultati istraživanja za plinove metan i vodik dobiveni su pomoću kružne respiracijske komore (Slika 8.) u kojoj su se životinje nalazile i putem kojih su se bilježile količine proizvedenih plinova. Količine proizvedenog plina metana ( $\text{CH}_4$ ), uspoređujući sa kontrolnom skupinom, u skupini s niskom koncentracijom crvenih algi (0,05%) primjetno su manje, dok su u skupini sa srednjom (0,10%) i visokom (0,20%) koncentracijom one značajno manje. U skupini s 0,05% smanjenje količine metana je 9%, u „srednjoj“ (0,10%) smanjenje je 38%, dok je u skupini sa 0,20% smanjenje čak 98%. Dodatak crvenih algi povećao je proizvodnju vodika ( $\text{H}_2$ ) u „srednjoj“ i „visokoj“ skupini, dok je u skupini sa 0,05% količina vodika ista kao u kontrolnoj skupini. U srednjoj skupini količina vodika povećala se u odnosu na kontrolnu skupinu za 380%, a u skupini sa 0,20% narasla je za 1700% (povećanje 17x).



**Slika 8. Shematski prikaz respiracijske komore**

(Izvor: NETO i sur., 2010.)

Prosječan dnevni prirast tijekom cijelog vremena istraživanja (period prilagodbe i 90 dana tretmana) u „srednjoj“ skupini veći je za 26%, a u „visokoj“ skupini za 22% u odnosu na kontrolnu skupinu (čiji je prosječni dnevni prirast jednak kao u niskoj skupini). Ako promatramo samo vrijeme u kojem je dodavana crvena alga u hranu (90 dana), onda je prosječni dnevni prirast veći za 51% u „srednjoj“, odnosno 42% u „visokoj“ u odnosu na kontrolnu, u „niskoj“ skupini nije bilo značajnog odudaranja od kontrole. Unos hrane najznačajnije se razlikovao između „niske“ i „srednje“ skupine. Ukupne niže masne kiseline se nisu razlikovale među ispitivanim skupinama, ali je acetat ( $C_2H_3O_2$ ) bio snižen u odnosu na kontrolnu skupinu, 4% u „niskoj“, 14% u „srednjoj“ i 20% u „visokoj“ skupini, dok se propionat ( $C_3H_5O_2$ ) za toliko povećao. Omjer acetata i propionata (A:P) se snizio, po skupinama od „niske“ prema „visokoj“ za 14%, 29% i 35%, što se smatra povoljnim zbog glukoneogenetske naravi propionata i uspješnije iskoristivosti energije. Kvaliteta mesa nije se razlikovala među skupinama i dodatak *Asparagopsis taxiformis* u hranu nije utjecao na sočnost, konzistenciju, okus i senzorička svojstva mesa. U tkivima (bubrezi, mast i mišići) i fecesu nisu pronađene rezidue bromoforma.

Učinak *Asparagopsis taxiformis* kao dodatka hrani, dokazan je opisanim eksperimentalnim radom (KINLEY i sur., 2020). Uspješne rezultate postigli su i Roque i suradnici (2021) u svome istraživanju na tovnom govedima. Dodatak od 0,50% *Asparagopsis taxiformis* alge u organskoj tvari hrane izazvao je smanjenje metana za 80% ( $P < 0.01$ ),

povećanje emisije vodika za 590% ( $H_2/DMI$ ) ( $P < 0.01$ ) i ugljikovog dioksida za 13,7% ( $CO_2/DMI$ ) ( $P = 0.03$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu.

Razmišljajući o budućim koracima u istraživanju ove alge, potrebno je proučiti sadržaj bromoforma u pojedinim fazama rasta biljke, kao i način skladištenja, odnosno obrade biljke, kako bi bromoform, kao aktivna tvar, bio u maksimalnoj mogućoj koncentraciji, odnosno kako bi ostao očuvan i inhibirao metanogenezu u retikulumenu. Visoka koncentracija bromoforma u crvenoj algi omogućuje da se postotni udio crvenih algi u ukupnoj hrani minimizira, a da njegova učinkovitost bude optimalna i polučiti željeni učinak. Dodatkom crvene alge dolazi do akumulacije vodika koji je u životinja iz kontrolne skupine služio kao supstrat u sintezi metana (jednadžba 1.). U ispitivanim skupinama vodik se gomilao i „tražio drugi put“ kako bi se izlučio i smanjio parcijalni tlak vodika u buragu. Životinje kojima se gomilao vodik u buragu, odnosno u kojih je inhibirana metanogeneza, a vodik usmjeren prema stvaranju nižih masnih kiselina, mikrobne biomase u buragu i/ili stvaranju acetat, smatraju se produktivnijima od onih u kojih to nije slučaj. (UNGERFELD, 2015). Znanstvenici smatraju da ovakvo preusmjeravanje i odvratanje od metanogeneze smanjuje gubitke energije putem izlučenog metana, a utjecaj životinja na okoliš značajno ublažuje (UNGERFELD, 2015). *Asparagopsis taxiformis* nije jedina vrsta crvenih algi koja se istražuje i uspješno smanjuje emisiju metana dodatkom u hranu. Izazov za budućnost je ustanoviti najuspješniju formulaciju koju će životinje konzumirati (tablete/smjesa/ekstrakt ulja), ali i osmisliti načine opskrbe na širokom području, odnosno uspostaviti trgovinski lanac koji će uspješno funkcionirati, kako bi biljke (bromoform) tijekom putovanja ostale biološki aktivne.



## 6. MORINGA (*Moringa oleifera*)

Moringa ili drvo života (Slika 9.), kako ju još nazivaju, drvo je koje izvorno potječe iz podnožja planine Himalaje, a danas raste u tropskim i subtropskim područjima Svijeta. Lišće i grančice Moringe izuzetno su nutritivno bogate proteinima, mineralima i vitaminima, a imaju i protuupalna, antioksidativna i antimikrobna svojstva (DONG i sur., 2019). Zbog svega navedenoga, razuman je korak ispitivanje utjecaja konzumacije Moringe na zdravlje i proizvodnost životinja. Istraživanje koje su proveli Dong i suradnici (2019), uključivalo je 64 mliječna goveda Holstein pasmine, raspoređene u četiri skupine. Četiri skupine razlikovale su se po udjelu Moringe u organskoj tvari hrane: 1) kontrola (bazalna hrana bez Moringe), 2) skupina sa dodatkom 3% (M3), 3) 6% (M6) i 4) 9% *M. oleifera* (M9). Istraživanje je trajalo 77 dana, od toga 14 dana adaptacije na bazalnu hranu, jednaku svim skupinama i 63 dana hranidbe po skupinama. Rezultati su vrlo zadovoljavajući i nagoviještaju smanjenje emisije metana u životinja hranjenih dodatkom *M. oleifera*. Od ostalih rezultata ističe se povećanje mliječne masti (M6 skupina). Također, donesen je zaključak da metaboliti Moringe utječu na odnose metanogenih mikroorganizama, tj. povećava brojnost mikroorganizama iz koljena *Methanosphaera*, a smanjuje brojnost *Methanobrevibacter ruminantium* i *Protozoa* (SOLIVA i sur., 2005). *Moringa oleifera* u hrani za preživače donosi povoljne rezultate i znanstvenike vodi prema proučavanju promjena mikroflore i posljedičnom utjecaju na metaboličke procese u probavnom sustavu.



**Slika 9. *Moringa oleifera***

(izvor: <https://www.indiamart.com/proddetail/moringa-oleifera-leaves-10452962612.html>)



## 7. ZAKLJUČAK

„Stočarski opskrbni lanac čini 44% antropogene emisije metana“ (Abbott i sur., 2020). Navedeni podatak iznenadio me, ali i osvijestio zašto se provode tolika brojna istraživanja na ovu ili slične teme. Ljudska vrsta u neprestanom porastu zahtijeva sve veće količine hrane i sve intenzivniji uzgoj stoke. Donedavni obim i način uzgoja nisu izazivali toliki utjecaj na globalnu ekologiju ili je utjecaj postojao, ali nije bilo interesa za dublje analize i zaključke. U 22. stoljeća ubrzano se događaju ekološke promjene tolikih razmjera da pogađaju gotovo svako biće koje živi na planeti Zemlji. Učinak staklenika, predvođen stakleničkim plinovima iz dana u dan raste i doprinosi neželjenim događajima. Postajemo svjesni da problemi koji nas zahvaćaju neće biti riješeni sami od sebe, već se moramo značajno potruditi očuvati planet na kojemu živimo.

U ovome radu opisane su brojne strategije hranidbe kojima je cilj smanjiti utjecaj stočarstva na okoliš, odnosno smanjiti emisiju metana i ostalih stakleničkih plinova u atmosferu od strane probavnog sustava preživača. Strategije uključuju promjene u sastavu hrane kakva se uobičajeno koristi, obradu stočne hrane na način da bude bolje probavljiva, dodavanje novootkrivenih tvari/biljaka ili aditiva u hranu, individualizacija hranidbe sa preciznim određivanjem potreba pojedine životinje itd. Pojedine strategije uspješnije su od drugih, ali sigurno je to da ulijeva nadu širina mogućih rješenja, kao i vrlo izgledni sinergistički učinak koji se postiže kombinacijom strategija, a bez nepovoljnog učinka na zdravlje i proizvodnost životinja. Istražujući literaturu prilikom pisanja ovoga rada, posebno su me se dojmila istraživanja o učinku alge *Asparagopsis taxiformis* u hrani za preživače. Ona je potrebna u vrlo malome postotnom udjelu u hrani, a donosi velike promjene u pozitivnome smislu (smanjenje emisije 98% u dodatku od 0,2% organske tvari hrane), a bez negativnih i neželjenih učinaka na životinju. Smatram ju perspektivnim rješenjem ovog vrlo bitnog problema. Moje je mišljenje da na strategijama hranidbe preživača treba i dalje vrijedno raditi, ne samo s ciljem smanjenja emisije metana, već i zbog ekonomičnijeg načina uzgoja životinja uz minimalne gubitke energije. Vjerujem da bliska budućnost donosi rješenje ovog problema na Svjetskoj razini i da će se trud i zalaganje svih uključenih na kraju isplatiti.

## 8. LITERATURA

ABBOTT, D. W., I. M. AASEN, K.A. BEAUCHEMIN, F. GRONDAHL, R. GRUNINGER, M. HAYES, X. XING (2020.): Seaweed and seaweed bioactives for mitigation of enteric methane: Challenges and opportunities. *Animals*, 10 (12), 2432.

AGUERRE, M. J., M. A. WATTIAUX, J. M. POWELL, G. A. BRODERICK, C. ARNDT (2011.): Effect of forage-to-concentrate ratio in dairy cow diets on emission of methane, carbon dioxide, and ammonia, lactation performance, and manure excretion. *Journal of dairy science*, 94(6), 3081-3093.

BAYAT, A. R., J. VILKKI, A. RAZZAGHI, H. LESKINEN, H. KETTUNEN, R. KHURANA, T. BRAND, S. AHVENJARVI (2021.): Evaluating the effects of high-oil rapeseed cake or natural additives on methane emissions and performance of dairy cows, *Journal of Dairy Science*, Vol. 105, 2.

BLAXTER K. L., J. L. CLAPPERTON (1965.): Prediction of the amount of methane produced by ruminants. *British Journal of Nutrition*, 19, 511-522.

DONG L., T. ZHANG, Q. DIAO (2019.): Effect of Dietary Supplementation of *Moringa Oleifera* on the Production Performance and Fecal Methanogenic Community of Lactating Dairy Cows. *Animals (Basel)*. 22; 9(5): 262.

DUIN E.C., T. WAGNER, S. SHIMA, D. PRAKASH, B. CRONIN, D.R. YANEZ-RUIZ, D. DUVAL, R. RUMBELI, R.T. STEMMLER, R.K. THAUER, M. KINDERMANN (2016.): Mode of action uncovered for the specific reduction of methane emissions from ruminants by the small molecule 3-nitrooxypropanol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113, 6172- 6177.

GARG, M. R., P. L. SHERASIA, B. M. BHANDERI, B. T. PHONDBA, S. K. SHELKE, H. P. S. MAKKAR (2013.): Effect of feeding balanced rations on animal productivity, feed conversion efficiency, feed nitrogen use efficiency, rumen microbial protein supply, parasitic load, immunity and enteric methane emission to milch animals under field conditions. *Anim. Feed Sci. Technol.* 179: 24–35.

GERBER, P. J., H.STEINFELD, B. HENDERSON, A. MOTTET, C. OPIO, J. DIJKMAN, A. FALCUCCI, G. TEMPIO (2013.): Tackling climate change through livestock – A global assessment of emissions and mitigation opportunities. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome.

HAQUE, M. N. (2018.): Dietary manipulation: a sustainable way to mitigate methane emissions from ruminants. *Journal of animal science and technology*, 60(1), 1-10.

HRISTOV, A. N., J. OH, J. L. FIRKINS, J. DIJKSTRA, E. KEBREAB, G. WAGHORN, H. P. S. MAKKAR, A. T. ADESOGAN, W. YANG, C. LEE, P. J. GERBER, B. HENDERSON, J. M. TRICARICO (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, 5045–5069.

JAYANEGARA, A., F. LEIBER, M. KREUZER (2012.): Meta-analysis of the relationship between dietary tannin level and methane formation in ruminants from in vivo and in vitro experiments. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* 96: 365–375.

KINLEY, R. D., G. MARTINEZ-FERNANDEZ, M. K. MATTHEWS, R. DE NYS, M. MAGNUSSON, N. W. TOMKINS (2020.): Mitigating the carbon footprint and improving productivity of ruminant livestock agriculture using a red seaweed. *Journal of Cleaner production*, 259, 120836.

KÖNIG H. E. i H. G. LIEBICH (2005.): *Anatomie der Haussäugetiere*, Schattauer GmbH, Stuttgart – New York.

MARTINEZ - FERNANDEZ, G., A. ARCO, L. ABECIA, G. CANTALAPIEDRA - HIJAR, E. MOLINA - ALCAIDE, A. I. MARTIN - GARCIA, M. KINDERMANN, S. DUVAL, D. R. YANEZ-RUIZ (2013.): The addition of ethyl-3-nitrooxy propionate and 3-nitrooxypropanol in the diet of sheep sustainably reduces methane emissions and the effect persists over a month. *Adv. Anim. Biosci.* 4 (part 2): 368.

MEL'MAN, M. M. (1979.): Heat-transfer radiation in a selective gas flow impinging on a heating surface. *Journal of Engineering Physics* 36, 306–310.

MOATE, P. J., S. R. O. WILLIAMS, C. GRAINGER, M. C. HANNAH, E. N. PONNAMPALAM, R. J. ECKARD (2011.): Influence of cold-pressed canola, brewers grains and hominy meal as dietary supplements suitable for reducing enteric methane emissions from lactating dairy cows. *Animal Feed Science and Technology* 166-167, 254–264.

PEGORARO, A. H. i R. C. ARAJUO (2012.): Use of encapsulated nitrates and sulfates to reduce methane emission derived from ruminal fermentation. Patent No.: WO2012159186A1.

ROOKE, J. A., G. A. MILLER, J. F. FLOCKHART, M. M. MCDOWELL, M. MACLEOD (2016.): Nutritional strategies to reduce enteric methane emissions. Scotland's Rural College (SRUC). [https://www.climatechange.org.uk/media/2033/nutritional\\_strategies\\_to\\_reduce\\_enteric\\_methane\\_emissions.pdf](https://www.climatechange.org.uk/media/2033/nutritional_strategies_to_reduce_enteric_methane_emissions.pdf)

ROQUE B. M., M. VENEGAS, R. D. KINLEY, R. DE NYS, T. L. DUARTE, X. YANG, E. KEBREAB (2021.): Red seaweed (*Asparagopsis taxiformis*) supplementation reduces enteric methane by over 80 percent in beef steers. PLoS ONE 16 (3): e0247820.

SHIRMOHAMMADI, S., A. TAGHIZADEH, A. HOSSEINKHANI, H. JANMOHAMMADI, R. PIRMOHAMMADI, H. VALIZADEH (2022.): Effect of amino acid supplementation and choline chloride for low protein diet on nitrogen efficiency and methane emission of dairy cows, Ciências Agrárias 43, 159-178.

SJAASTAD Ø. V., O. SAND, K. HOVE (2010.): Physiology of Domestic Animals, 2nd edition, (J. Fowler. Ed.) Oslo: Scandinavian Veterinary Press. 804 pp.

SOLIVA, C. R., M. KREUZER, N. FOIDL, G. FOIDL, A. MACHNULLER, H. D. HESS (2005.): Feeding value of whole and extracted *Moringa oleifera* leaves for ruminants and their effects on ruminal fermentation in vitro. Anim. Feed Sci. Technol., 118, 47–62.

UNGERFELD, E. M. (2015.): Shifts in metabolic hydrogen sinks in the methanogenesis - inhibited ruminal fermentation: a meta - analysis. Front. Microbiol. 6, 37.

VOVK I., G. VESNA (2015.): Analysis of Dietary Supplements: In „Instrumental Thin - Layer Chromatography“.(C. F. Poole, Ed.) Elsevier. 589 – 635.

WILLIAMS S. R. O., M. C. HANNAH, R. J. ECKARD, W. J. WALES, P. J. MOATE (2020.): Supplementing the diet of dairy cows with fat or tannin reduces methane yield, and additively when fed in combination, *Animal*, Vol. 14, Supplement 3. 464 – 472.

WOODWARD, S. L., G. C. WAGHORN, M. J. ULYATT, K. R. LASSEY (2001.): Early indications that feeding Lotus will reduce methane emissions from ruminants. *Proceedings New Zealand Soc. Anim. Prod.* 61: 23–26.

YANEZ - RUIZ, D. R., D. MORGAVI, T. MISSELBROOK, M. MELLE, S. DREIJERE, O. AES, M. SEKOWSKI (2017.): EIP-AGRI Focus Group Reducing livestock emissions from Cattle farming. [https://ec.europa.eu/eip/agriculture/sites/default/files/eipagri\\_fg\\_livestock\\_emissions\\_final\\_report\\_2017\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/eip/agriculture/sites/default/files/eipagri_fg_livestock_emissions_final_report_2017_en.pdf).

VALLERO, D. A. (2019.): Air Pollution Dispersion Models: In “Air Pollution Calculations - Quantifying Pollutant Formation, Transport, Transformation, Fate and Risks”. (Vallero, D. A. Ed.). Elsevier. 429 – 448.

VAN ZIJDERVELD, S. (2011.): Dietary strategies to reduce methane emissions from ruminants, PhD thesis, Wageningen University, Wageningen, Netherlands.

## **9. ŽIVOTOPIS**

Rođen sam 13.5.1997. godine u Zagrebu. Osnovnu školu Vladimira Nazora u Daruvaru završio sam 2012. godine, kada se upisujem u gimnaziju Daruvar koju završavam 2016. godine. Upisao sam se na Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu u akademskoj godini 2016./2017.

## 10. SAŽETAK

Dominik Rendić

### NUTRITIVNE STRATEGIJE ZA SMANJENJE EMISIJE METANA U PREŽIVAČA

Intenzivno stočarstvo uvelike doprinosi akumulaciji metana (CH<sub>4</sub>), ali i ostalih stakleničkih plinova u Zemljinj atmosferi. Metan se proizvodi iz ugljikovog dioksida i vodika u predželucima preživača pod utjecajem metanogenih *Archaea* u procesu koji nazivamo metanogeneza. Metanogeneza se može direktno inhibirati, postoji opcija smanjenja proizvodnje vodika tijekom procesa fermentacije ili se mogu omogućiti alternativni metabolički putevi za stvoreni vodik koji je neophodan supstrat u stvaranju metana. Preživači u okoliš otpuštaju metan putem podrigivanja (eruktacije). S ciljem smanjenja produkcije i emisije metana, osmišljene su brojne strategije hranidbe. U radu su opisane strategije: hranidba kvalitetnim krmivom, dodavanje dijetetskih sastojaka u hranu, „precizna“ hranidba, dodaci prehrani koji inhibiraju metanogenezu, dodatak aditiva i/ili specifičnih dijelova biljke i dodatak zaštićenih aminokiselina. Također, detaljnije su opisana istraživanja utjecaja alge *Asparagopsis taxiformis* i drveta *Moringa oleifera* u poglavljima 5. i 6. Sve opisane strategije polučile su učinak određenog stupnja djelotvornosti u smanjenju emisije metana. Daljnjim istraživanjima očekuje se donijeti prijedlog primjenjiv i dostupan na globalnoj razini, sa maksimalnim smanjenjem emisije metana i bez negativnog utjecaja na zdravlje i proizvodnost preživača.

Ključne riječi: metan, preživači, strategije, *Asparagopsis taxiformis*

## 11. SUMMARY

Dominik Rendić

### NUTRITIONAL STRATEGIES FOR REDUCING METHANE EMISSIONS IN RUMINANTS

Intensive livestock greatly contributes to the accumulation of methane (CH<sub>4</sub>), but also other greenhouse gases in the Earth's atmosphere. Methane is produced from carbon dioxide and hydrogen in the rumen of ruminants under the influence of methanogenic Archaea in a process called methanogenesis. Methanogenesis can be directly inhibited, there is the option of reducing hydrogen production during the process of fermentation or creating alternative metabolic pathways for the generated hydrogen that is necessary substrate in methane formation. Ruminants release methane into the environment through belching (eructation). With the aim of reducing methane production and emissions, numerous feeding strategies have been planned. Strategies that are described in this graduation work are: feeding with quality feed, adding dietary ingredients to food, "precise" feeding, dietary supplements that inhibit methanogenesis, addition of additives and/or specific parts of the plant, and addition of protected amino acids. Also, research on the impact of the algae *Asparagopsis taxiformis* and the *Moringa oleifera* tree are described in more details in chapters 5 and 6. All described strategies achieved a certain degree of effectiveness in reducing methane emissions. Further research is expected to bring a proposal applicable and available on a global level, with a maximum reduction of methane emissions and without negative impacts on the health and productivity of ruminants.

Key words: methane, ruminants, strategies, *Asparagopsis taxiformis*