

Adam Cieślak, Andrzej Potkański, Małgorzata Szumacher-Strabel, Marcin Jajor,
Dariusz Dębiński, Agnieszka Nowakowska
Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu
Katedra Żywienia Zwierząt i Gospodarki Paszowej

Wpływ dodatku oleju lnianego i rzepakowego do paszy na koncentrację metanu i inne wskaźniki żwacza *in vitro*

Effect of linseed and rapeseed oils on methane concentration and other rumen parameters *in vitro*

Słowa kluczowe: oleje roślinne, *in vitro*, metan, wskaźniki żwacza, bakterie, pierwotniaki

Jednym ze sposobów ograniczenia metanogenezy jest dodatek tłuszczu do dawki dla zwierząt przeżuwających. Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu rodzaju zastosowanego oleju (rzepakowy, lniany) oraz jego ilości na rozmiar emisji metanu oraz na wybrane wskaźniki biochemiczne płynu żwacza. Doświadczenie zostało przeprowadzone w warunkach *in vitro* (metoda *batch culture*) z wykorzystaniem dawek z przewagą paszy objętościowej (60%) z dodatkiem 4 i 6% oleju w suchej masie dawki. W przeprowadzonym doświadczeniu dodatek 4 i 6% oleju rzepakowego ograniczył produkcję metanu odpowiednio o 4,80 i 6,62%, a oleju lnianego o 5,55 i 7,41%. Wyniki przeprowadzonego doświadczenia potwierdziły hipotezę, że dodatek olejów roślinnych może ograniczyć emisję metanu przy braku negatywnego wpływu na podstawowe wskaźniki biochemiczne żwacza i strawność suchej masy *in vitro*.

Key words: vegetable oils, *in vitro*, methane, rumen parameters, bacteria, protozoa

One of possible methods to decrease methane production is fat addition to ruminant diets. The objective of this study was to determine the influence of applied oils (rapeseed, linseed) on methane production and on some biochemical parameters in rumen fluid. The experiment was based on *in vitro* study (*batch culture*) with diets composed of forage feed (60%) containing 4 and 6% of oil in dry matter. In this experiment addition of 4 and 6% of rapeseed oil reduced methane production by 4.80 and 6.62% whereas linseed oil by 5.55 and 7.41%. The obtained results confirmed a hypothesis that oil supplementation to diets can decrease methane production without causing negative effects on fermentation patterns and *in vitro* dry matter digestibility.

Wstęp

Zwierzęta gospodarskie emitują do atmosfery rocznie około 80 milionów ton metanu, z czego od 95 do 97% pochodzi od zwierząt przeżuwających (Johnson i Ward 1996). Ograniczenie produkcji metanu powstającego w procesie fermentacji

zwaczowej i jelitowej zwierząt przeżuwających nie tylko może zmniejszyć zanieczyszczenie atmosfery, ale również ograniczyć możliwe straty energii związane z tym procesem. Stosowane metody zmierzające do obniżenia skali emisji metanu preferują technologie wpływające na zmiany jakościowe i ilościowe w populacji mikroorganizmów żwacza. Prowadzi to do lepszego wykorzystania wolnych atomów wodoru, tym samym powodując wymierne korzyści dla zwierzęcia oraz mniejsze szkody dla środowiska (Johnson i Johnson 1995, Soliva i in. 2004). W obszernym przeglądzie literatury dotyczącym metod ograniczenia emisji metanu u zwierząt przeżuwających, Giger-Reverdin i in. (2003) proponują dokładniejsze przeanalizowanie wpływu nienasyconych kwasów tłuszczowych, pochodzących między innymi z olejów roślinnych, na proces metanogenezy. Zastosowanie olejów roślinnych stanowi alternatywę dla stosowanych preparatów i związków chemicznych obniżających emisję metanu, zakazanych w ostatnim czasie w Unii Europejskiej (Demeter i Fievez 2000, Fievez i in. 2003). Należy mieć również na uwadze, że tłuszcz może nie tylko zmniejszać ilość produkowanego metanu, ale przede wszystkim podwyższać wartość energetyczną dawki paszowej. Jeden gram tłuszczu odpowiada średnio 38 kJ (9 kcal) energii brutto, co w porównaniu z innymi składnikami pokarmowymi stanowi dwukrotnie wyższą wartość energetyczną (Garnsworthy 1997). Niekiedy jednak zwiększona ilość tłuszczu może mieć negatywny wpływ na procesy zachodzące w żwaczu, między innymi wpływać na obniżenie strawności (Garnsworthy 1997). Stąd wypływa konieczność optymalnego udziału tłuszczu w dawce dla przeżuwaczy, który z jednej strony ograniczałby emisję metanu, a z drugiej nie wpływałby negatywnie na procesy trawienia.

Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu rodzaju zastosowanego oleju oraz jego ilości na rozmiar emisji metanu przy jednoczesnej analizie zmian wskaźników biochemicznych w płynie żwacza.

Material i metody

Doświadczenie zostało przeprowadzone w warunkach *in vitro*, przy użyciu systemu zamkniętego *batch culture*. W doświadczeniu wykorzystano płyn żwacza pochodzący od maciorek rasy Merynos Polski. Płyn żwacza rozcieńczono buforem w stosunku 2 : 3 według metodyki opisanej i zmodyfikowanej przez Szumacher-Strabel i in. (2004). Do doświadczenia wykorzystano dawkę składającą się z siana łąkowego i paszy treściwej (60 : 40). Wartość pokarmowa dziennej dawki podstawowej wynosiła średnio: 0,83 JPM, 89 g BTJN i 83 g BTJE. Do dawki dodano olej rzepakowy (zawierający 56% kwasu oleinowego) lub olej lniany (zawierający 60% oleju linolowego) w ilości 0, 4 i 6% suchej masy dawki. Każdy wariant został przeprowadzony w 6 powtórzeniach. Bezpośrednio po trwającej 48 godzin inkubacji określono pH płynu żwaczowego (pH-metr CP-104), poziom metanu

(GC, Hewlett Packard) oraz azot amonowy (metoda Neslera). W płynie żwacza po inkubacji ustalono również liczebność pierwotniaków i bakterii przy użyciu mikroskopu świetlnego (komora Bürkera oraz Thoma). Przeanalizowano także zawartość lotnych kwasów tłuszczowych (LKT) (Tangerman i Nagengast 1996) oraz określono strawność suchej masy po inkubacji (Martin i Jenkins 2002). Uzyskane wyniki zostały poddane weryfikacji statystycznej przy wykorzystaniu procedur general linear model (GLM). Istotność różnic pomiędzy średnimi zweryfikowano używając testu Tukeya (SAS 1996).

Wyniki i dyskusja

Zarówno w grupach z dodatkiem oleju rzepakowego, jak i lnianego wystąpiło statystycznie istotne ($P < 0,05$) obniżenie poziomu ilości emitowanego metanu (tab. 1 i 2). Spadek emisji metanu nie został potwierdzony statystycznie jedynie w przypadku dawki z dodatkiem 4% oleju rzepakowego. Dodatek oleju rzepakowego ograniczył w sposób istotny ($P < 0,05$) liczbę pierwotniaków w płynie żwacza po inkubacji. Ilość pierwotniaków była najniższa w grupie z dodatkiem 6% omawianego oleju. Natomiast dodatek oleju lnianego nie obniżył liczby pierwotniaków. W dawkach z dodatkiem 4 i 6 % oleju rzepakowego stwierdzono statystycznie istotny spadek poziomu kwasu izowalerianowego. Zarówno dodatek oleju rzepakowego, jak i lnianego, nie miał wpływu na poziom podstawowych wskaźników biochemicznych, liczebność bakterii oraz strawność suchej masy w płynie żwacza po inkubacji (tab. 1 i 2).

Standardowa dawka stosowana w żywieniu zwierząt przeżuwających, podobnie jak w prezentowanej pracy, składa się w większości z pasz objętościowych, bogatych we włókno surowe, główne źródło metanu w żwaczu. Według Pilarczyka (1997) z 1 kg włókna surowego powstaje 79 g metanu, podczas gdy z 1 kg skrobi, głównego składnika pasz treściwych, tylko 10 g metanu. Zwiększenie udziału pasz treściwych w dawce kosztem pasz objętościowych nie ma uzasadnienia, ani fizjologicznego, ani ekonomicznego, gdyż może prowadzić do występowania chorób metabolicznych. Alternatywą w takiej sytuacji jest dodatek tłuszczu, który zwiększa pobranie energii, przy jednoczesnym utrzymaniu ilości pobranego włókna, umożliwiając zmniejszenie ilości skarmianej skrobi. Normy żywienia zwierząt przeżuwających w wielu krajach zalecają dodatek tłuszczu w ilości 2 do 8% suchej masy dawki w zależności od jego formy i rodzaju. Według Palmquista (1984) zastąpienie skrobi tłuszczem może stabilizować procesy żwaczowe, a zgodnie z wcześniej opisanymi hipotezami, 1 kg tłuszczu może zmniejszać produkcję metanu o 212 g (Pilarczyk 1997).

Tabela 1

Wskaźniki biochemiczne w płynie żwacza po inkubacji paszy z dodatkiem 0, 4 lub 6% oleju rzepakowego — *Fermentation pattern of rumen fluid after in vitro incubation of feed stuff with 0, 4 or 6% rapeseed oils additives*

Wskaźnik <i>Item</i>	Kontrola — <i>Control</i>		4%		6%	
	średnia <i>mean</i>	SD	średnia <i>mean</i>	SD	średnia <i>mean</i>	SD
pH	6,96	0,12	6,81	0,09	7,00	0,05
Poziom amoniaku — <i>Ammonia</i> [mmol/l]	11,37	1,92	11,11	2,63	10,50	3,15
Lotne kwasy tłuszczowe, % sumy — <i>Volatile fatty acids, % of total</i>						
octowy — <i>acetate</i> (A)	55,60	0,73	54,82	0,56	55,17	0,43
propionowy — <i>propionate</i> (P)	19,76	0,06	20,02	0,04	20,00	0,10
izomasłowy — <i>isobutyrate</i>	3,52	0,47	3,71	0,58	2,95	0,33
masłowy — <i>butyrate</i>	9,59	0,22	9,12	0,01	9,12	0,09
izowalerianowy — <i>isovalerate</i>	5,62 ^a	0,17	5,02 ^b	0,27	5,29 ^b	0,10
walerianowy — <i>valerate</i>	1,20	0,08	1,42	0,12	1,26	0,03
A/P	2,81	0,13	2,74	0,05	2,76	0,01
Liczebność mikroorganizmów w płynie żwacza — <i>Rumen fluid microbial counts</i>						
bakterie — <i>bacteria</i> [10^8 ml ⁻¹]	10,45	0,88	11,06	3,01	11,67	2,10
pierwotniaki — <i>protozoa</i> [10^4 ml ⁻¹]	8,50 ^a	4,22	7,62 ^b	6,30	6,77 ^c	7,15
Strawność suchej masy <i>IVDMD</i> * [%]	52,67	0,32	51,93	0,42	51,90	0,49
Metan — <i>Methane</i> [mM]	6,04 ^a	0,10	5,75 ^a	0,05	5,69 ^b	0,07

W przeprowadzonym doświadczeniu dodatek 4 i 6% oleju rzepakowego ograniczył produkcję metanu odpowiednio o 4,80 i 6,62%, a oleju lnianego o 5,55 i 7,41%. Zmniejszenie emisji metanu w grupie z dodatkiem 6% oleju rzepakowego i grupach z dodatkiem oleju lnianego jest niższe w porównaniu z danymi cytowanymi w literaturze. W podobnych doświadczeniach przeprowadzonych *in vitro* wzbogacenie dawki zawierającej duże ilości pasz objętościowych, nasionami lub olejem rzepakowym, zmniejszyło emisję metanu o około 20–26% (Machmüller i in. 1998, Wettstein i in. 2000). Natomiast w innym doświadczeniu przeprowadzonym *in vivo*, dodatek 6,9 oraz 13,8% mieszanki nasion rzepaku i bawełny do dawki składającej się w połowie z paszy objętościowej nie spowodował obniżenia procesu metanogenezy (Johnson i in. 2002). Autorzy ci przedstawiają trzy różne hipotezy tłumaczące powstałą sytuację:

- zbyt niska ilość tłuszczu w dawce (4 i 5,6%),
- ograniczenie procesu biouwodorowania w żwaczu tłuszczu pochodzącego z nasion,
- możliwość wystąpienia interakcji pomiędzy tłuszczem a związkami mineralnymi.

Tabela 2

Wskaźniki biochemiczne w płynie żwacza po inkubacji paszy z dodatkiem 0, 4 lub 6% oleju lnianego — *Fermentation pattern of rumen fluid after in vitro incubation of feed stuff with 0, 4 or 6% linseed oils additives*

Wskaźnik <i>Item</i>	Kontrola — <i>Control</i>		4%		6%	
	średnia <i>mean</i>	SD	średnia <i>mean</i>	SD	średnia <i>mean</i>	SD
pH	7,03	0,24	6,98	0,19	7,00	0,15
Poziom amoniaku — <i>Ammonia</i> [mmol/l]	9,91	2,22	10,09	1,52	10,60	1,56
Lotne kwasy tłuszczowe, % sumy — <i>Volatile fatty acids, % of total</i>						
octowy — <i>acetate</i> (A)	56,20	0,43	55,48	0,95	55,30	1,13
propionowy — <i>propionate</i> (P)	19,63	0,45	19,82	0,15	19,97	0,52
izomasłowy — <i>isobutyrate</i>	1,12	0,12	1,61	0,48	1,64	0,43
masłowy — <i>butyrate</i>	10,01	0,62	10,22	0,74	10,12	0,36
izowalerianowy — <i>isovalerate</i>	4,13	0,10	4,01	0,12	4,19	0,11
walerianowy — <i>valerate</i>	2,00	0,08	2,52	0,15	2,33	0,33
A/P	2,86	0,10	2,80	0,08	2,77	0,09
Liczebność mikroorganizmów w płynie żwacza — <i>Rumen fluid microbial counts</i>						
bakterie — <i>bacteria</i> [10^8 ml ⁻¹]	12,62	0,99	11,96	4,01	12,03	3,13
pierwotniaki — <i>protozoa</i> [10^4 ml ⁻¹]	9,66	3,72	8,99	5,45	9,07	2,85
Strawność suchej masy <i>IVDMD</i> * [%]	50,72	0,82	50,03	0,94	49,81	0,69
Metan — <i>Methane</i> [mM]	5,94 ^a	0,30	5,61 ^b	0,12	5,50 ^b	0,25

Jednym wytłumaczeniem niskiego rozmiaru metanogenezy w niniejszej pracy może być hipoteza, że wystąpiła interakcja pomiędzy olejami a związkami mineralnymi. Ilość dodanych związków mineralnych w omawianej pracy wynosiła około 2% suchej masy dawki. Potwierdzeniem tej teorii jest brak negatywnego wpływu zastosowanych olejów na liczebność bakterii. Podobne rezultaty uzyskali Dohme i in. (2000) oraz Cieślak (2004). Według Hendersona (1973) kwasy tłuszczowe mogą toksycznie oddziaływać na mikroorganizmy żwacza, szczególnie na liczebność bakterii celulolitycznych (Kowalczyk i in. 1997, Ivan i in. 2001). Dodatek olejów roślinnych może również negatywnie oddziaływać na populację pierwotniaków w żwaczu (McAllister i in. 1996). Pierwotniaki są jedną z głównych grup mikroorganizmów biorących udział w procesie metanogenezy (Hegarty 1999, Machmüller i Kreuzer 1999), co potwierdza statystycznie istotny spadek ($P < 0,05$) ich liczebności przy jednoczesnym obniżeniu się emisji metanu w grupach z dodatkiem oleju rzepakowego. W niniejszej pracy nie stwierdzono jednoznacznie wpływu badanych olejów na strawność suchej masy. Należy również podkreślić, że nie zanotowano negatywnego wpływu badanych tłuszczów na podstawowe wskaźniki biochemiczne w płynie żwacza po inkubacji. Podobnie Ueda i in. (2003)

oraz Hristov i in. (2005) nie stwierdzili w swoich badaniach wpływu dodanego tłuszczu na poziom podstawowych parametrów żwacza. Jedynym metabolitem, którego koncentracja obniżyła się w grupach z dodatkiem oleju rzepakowego był kwas izowalerianowy.

Stosując dodatek olejów pochodzących z rzepaku lub lnu, które są uprawiane w Polsce, uzupełniamy nie tylko ewentualne niedobory energii w dawce przeznaczonej dla zwierząt przeżuwiających, ale jednocześnie możemy w istotny sposób ograniczyć niepożądany wpływ produkcji zwierzęcej na środowisko.

Podsumowanie

1. Dodatek olejów roślinnych: rzepakowego lub lnianego do dawki z przewagą pasz objętościowych istotnie obniżył ilość produkowanego metanu w warunkach *in vitro*.
2. Oleje roślinne (rzepakowy i lniany), w których składzie przeważają jedno- i wielonienasycone kwasy tłuszczowe, przy stosowaniu w ilościach 4 i 6% nie wpłynęły negatywnie na wskaźniki biochemiczne w płynie żwacza i strawność suchej masy w badaniach *in vitro*.

Literatura

- Cieślak A. 2004. Poziom produkcji metanu oraz stopień biouwodorowania nienasyconych kwasów tłuszczowych u owiec otrzymujących dodatki różnych rodzajów olejów roślinnych. Rozprawa doktorska, AR w Poznaniu.
- Demeyer D., Fievez V. 2000. Ruminants at environment: la methanogenese. *Ann. Zootech.*, 49: 95-112.
- Dohme F., Machmüller A., Wasserfallen A., Kreuzer M. 2000. Comparative efficiency of various fats rich in medium-chain fatty acids to suppress ruminal methanogenesis as measured with Rusitec. *Can. J. Anim. Sci.*, 80: 473-482.
- Fievez V., Dohme F., Danneels M., Raes K., Demeyer D. 2003. Fish oil as potent rumen methane inhibitors and associated effects on rumen fermentation *in vitro* and *in vivo*. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 104: 41-58.
- Garnsworthy P.C. 1997. Recent advances in animal nutrition. Nottingham University Press., 87-104.
- Giger-Revardin S., Morand-Fehr P., Tran G. 2003. Literature survey of the influence of dietary fat composition on methane production in dairy cattle. *Live. Prd. Sci.*, 81: 73-79.
- Hegarty R.S. 1999. Reducing rumen methane emission through elimination of rumen protozoa. *Aust. J. Agric. Res.*, 50: 1321-1327.
- Henderson C. 1973. The effects of fatty acids on pure cultures of rumen bacteria. *J. Agric. Sci.*, 81: 107-112.
- Hristov A.N., Kennington L.R., McGuire M.A., Hunt C.W. 2005. Effects of diets containing linoleic acid or oleic acid-rich oils on ruminal fermentation and nutrient digestibility, and performance

- and fatty acid composition of adipose and muscle tissues of finishing cattle. *J. Anim. Sci.*, 83: 1312-1321.
- Ivan M., Mir P.S., Koeing K.M., Rode L.M., Neill L., Entz T., Mir Z. 2001. Effects of dietary sunflower seed oil on rumen protozoa population and tissue concentration of conjugated linoleic acid in sheep. *Small Rumin. Res.*, 41: 215-227.
- Johnson D.E., Ward G.M. 1996. Estimates of animal methane emissions. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. *Environmental Monitoring and Assessment*, 42: 133-141.
- Johnson K.A., Johnson D.E. 1995. Methane emissions from cattle. *J. Anim. Sci.*, 73: 2483-2492.
- Johnson K.A., Kincaid R.L., Westberg H.H., Gaskins C.T., Lamb B.K., Cronrath J.D. 2002. The effect of oilseeds in diets of lactating cows on milk production and methane emissions. *J. Dairy Sci.*, 85: 1509-1515.
- Kowalczyk J., Ørskov E.R., Robinson J.J., Stewart C.S. 1977. Effects of fat supplementation on voluntary food intake and rumen metabolism in sheep. *Brit. J. Nutr.*, 37: 251-257.
- Machmüller A., Kreuzer M. 1999. Methane suppression by coconut oil associated effects on nutrient and energy balance in sheep. *Can. J. Anim. Sci.*, 79: 65-72.
- Machmüller A., Ossowski D.A., Wanner M., Kreuzer M. 1998. Potential of various fatty feeds to reduce methane release from rumen fermentation in vitro (Rusitec). *Anim. Feed Sci. Tech.*, 71: 117-130.
- Martin S.A., Jenkins T.C. 2002. Factors affecting conjugated linoleic acid and trans-C_{18:1} fatty acids production by mixed ruminal bacteria. *J. Anim. Sci.*, 80: 3347-3352.
- McAllister T.A., Okine E.K., Mathinson G.W., Cheng K.J. 1996. Dietary environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. *Can. J. Anim. Sci.*, 76: 231-243.
- Palmquist D.L. 1984. Use of fats in diets for lactating dairy cows. In: Wiseman (Editor). *Fats in animal nutrition*. Butterworths., London (UK), 357-381.
- Pilarczyk A. 1997. Wydalanie metanu przez zwierzęta gospodarskie. *Mat. Konf. Żywieniowe metody ograniczenia wydalania do środowiska azotu, fosforu i innych pierwiastków przez zwierzęta gospodarskie*, 17-18. listopada Balice, 9-19.
- SAS[®], 1996. *SAS/STAT Users Guide (Release 6,12)*. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Soliva C.R., Meile L., Cieślak A., Kreuzer M., Machmüller A. 2004. Long-term Rusitec study on the interactions of dietary lauric and miristic acid supplementation in suppressing ruminal methanogenesis. *Br. J. Nutr.*, 92: 689-700.
- Szumacher-Strabel M., Martin S.A., Potkański A., Cieślak A., Kowalczyk J. 2004. Changes fermentation processes as the effect of vegetable oil supplementation in in vitro studies. *J. Anim. Feed Sci.*, 13: 215-218.
- Tangerman A., Nagengast F.M. 1996. A gas chromatographic analysis of fecal short-chain fatty acids, using the direct injection method. *Annal. Biochem.*, 236: 1-8.
- Ueda K., Ferlay A., Chabrot J., Loor J., Chilliard Y., Doreau M. 2003. Effect of linseed oil supplementation on ruminal digestion in dairy cows fed diets with different forage: concentrate rations. *J. Dairy Sci.*, 86: 3999-4007.
- Wettstein H.R., Machmüller A., Kreuzer M. 2000. Effects of raw and modified canola lecithin compared to canola oil, canola seed and soy lecithin on ruminal fermentation measured with rumen simulation technique. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 85: 153-169.