

## Ernæringsbasert metanproduksjon hos sau



Foto: Marte Colin

**Marte Nilsen**

**Bio-3950 Master of Science in Biology**

**Mai 2013**



## **FORORD**

Mastergradsprosjektet «*Ernæringsbasert metanproduksjon hos sau*» er en del av prosjektet «*Ny kunnskap om metan utslipp fra rein og økt kompetanse lokalt i nordområdene*», som er ledet av Prof. Monica A. Sundset. Prosjektet er finansiert av Reindriftens Utviklingsfond, Universitetet i Tromsø og Norges Veterinærhøgskole i Tromsø. Det er også tilknyttet det Internasjonale Polarårprosjektet IPY EALAT: *Reindrift i et klima i endring*, som er koordinert av Samisk Høgskole og Internasjonalt Reindriftssenter i Kautokeino i samarbeid med en rekke nasjonale og internasjonale aktører.

Jeg vil gjerne takke masterstudent Kia Krarup Hansen, Universitetet i Tromsø, for et godt samarbeid og vennskap gjennom prosjektet. Jeg må også takke mine medstudenter, spesielt Lorenzo Ragazzi for god hjelp under deler av eksperimentene, og Lone Gustavsen for et lynkurs Excel. Jeg vil også takke Marte Colin for lån av forsidebilde, tatt i Unstad, Lofoten. Ellers vil jeg takke røkterstaben og de andre ansatte ved avdeling for Arktisk og Marin Biologi.

Til sist vil jeg takke mine veiledere for all hjelp i forhold til rettleiding og motivasjon, Prof. Monica A. Sundset (UiT), Prof. Svein D. Mathiesen (Norsk Veterinærskole, Tromsø og Internasjonalt Reindriftssenter) og Prof. Lars P. Folkow (UiT).

Marte Nilsen, Tromsø, mai 2013

## Innhold

SAMMENDRAG .....	5
2. INNLEDNING .....	6
2.1. Metan som drivhusgass .....	6
2.1. Metanogener og metanogenesen .....	6
2.3. Interaksjoner mellom metanogener og andre mikroorganismer .....	11
2.4. Fordøyelse fysiologi hos drøvtyggere .....	11
2.5. Sekundære fenoliske metabolitter .....	13
2.6. Hensikt og hypoteser .....	14
3. MATERIAL OG METODER .....	14
3.1. Forsøksdyr .....	14
3.2. Forsøksoppsett og forsøksdesign .....	14
3.3. Beregning av CH <sub>4</sub> .....	18
3.4. Beregning av tørrstoffinntak .....	20
3.5. Statistikk .....	21
4. RESULTATER .....	22
4.1. Kroppsvekt og tørrstoffinntak .....	22
4.2. Metanutslipp .....	23
4.3. Oksygen .....	25
5. DISKUSJON .....	25
5.1. Mindre utslipp av metan fra sauer som spiser en lavdiett .....	25
5.2. Kjemisk sammensetning av diett kan påvirke metanproduksjon .....	27
5.3. Sekundære fenoliske metabolitter .....	26
5.4. Interaksjoner med andre mikroorganismer .....	28
5.5. Utslipp av metan fra sau sammenlignet med reinsdyr .....	30
5.6. Utslipp av metan fra sau sammenlignet med andre drøvtyggere .....	31
7. KONKLUSJON .....	32
REFERANSER .....	33

## SAMMENDRAG

Drøvtyggere er plantespisere og avhengig av symbiotisk mikrobiell fordøyelse i vom og baktarm for å kunne utnytte cellulose, hemicellulose og lignin som finnes i plantecelleveggen til plantene. I drøvtyggervomma finnes ulike bakterier, ciliater, anaerob sopp og metanogene arker i høye konsentrasjoner. Metanogene produserer metan ved at de bruker hydrogen til å redusere karbondioksid (Sirohi *et al*, 2010). Metanutslippet representerer både et energitap for dyret, og det bidrar til global oppvarming. Sauer (*Ovis aries*) har en relativt stor vom, de spiser større mengder fiber, har en langsommere mikrobiell fermentering, maten oppholder seg lengre i vomma og de tygger mer drøv sammenlignet med andre drøvtyggere som er anatomisk og fysiologisk tilpasset en diett med mindre fiber (Hofman, 1989). Ulik passasjetid gjennom fordøyelsessystemet, og forskjeller i mikrofloraen i vom og baktarm hos ulike drøvtyggere kan kanskje resultere i ulike utslipp av metan. Fenoliske antibeitestoffer som tanniner i dietten er tidligere vist å hemme metanproduksjonen hos drøvtyggere (Tavendale *et al*, 2005; Liu *et al*, 2011; Tan *et al*, 2011). Hypotesen i dette studiet er at sau slipper ut mer metan på en gressbasert pelletsdiett enn på en lavdiett, fordi lav inneholder fenoliske lavsyrer som kan ha en effekt lik den tanninene har på metanproduksjonen. Resultatene fra dette studiet skulle også sammenlignes med nylig utførte studier på reinsdyr (*Rangifer tarndus tarandus*) (Hansen, 2012). Hypotesen var at sau som er tilpasset en gress- og grovfôrdiett ville produsere mer metan enn reinsdyr som er en intermediærdøvtygger. Metanproduksjon hos sau ble i dette prosjektet målt ved hjelp av et respirasjonskammer for å se ulikheter i produksjon utført under spesifikke betingelser. Målingene ble gjort gjennom 23 timer, to ganger per dyr på to ulike dietter, en gressbasert pelletsdiett (Reinfôr fra Felleskjøpet, Norge), og en lavdiett (hovedsakelig *Cladonia stellaris*). Den gressbaserte pelletsdietten inneholdt høye konsentrasjoner av protein og vannløselige karbohydrater. Mens lavdietten inneholdt både mindre proteiner og vannløselige karbohydrater, men høye konsentrasjoner av hemicellulose som hos lav inkluderer spesielle lavsukker ulik de man finner i glandulære planter. Sauene (n=2) som spiste pellets (0,43 kg tørrstoffinntak (TSI) i forsøk) hadde et gjennomsnittlig (SD) utslipp på 16,7 (± 3,03) g CH<sub>4</sub> / kg TSI/ dag, mens sauene (n=2) som spiste lavdietten (0,2375 kg) hadde et gjennomsnittlig (SD) utslipp på 9,6 (± 3,01) g CH<sub>4</sub> / kg TSI/ dag. Det lave metanutslippet på lavdietten kan skyldes de fenoliske forbindelsene i lavdietten eller det lave inntaket på denne dietten. Antall forsøksdyr er lite i dette studiet, men de målinger som er gjort indikerer at sau hadde et lavere utslipp av metan sammenlignet med reinsdyr. Sauene fikk tildelt lik mengde fôr, men spiste bare halvparten da de fikk lav. Det er derfor vanskelig å trekke en sikker konklusjon i forhold til hypotesen om at sauen som grovfôrspiser produserer mer metan enn intermediærdøvtyggere.

## 2. INNLEDNING

### 2.1. Metan som drivhusgass

De siste årene har det vært stor interesse for drivhusgasser, og hvordan disse bidrar til global oppvarming og klimaendringer (Moss *et al*, 2000). Metan er en slik drivhusgass, og kan påvirke klimaet indirekte gjennom en oksidasjonsprosess i atmosfæren som produserer en annen drivhusgass, karbondioksid, som fører til klimaendringer og global oppvarming (Johnson & Johnson, 1995).

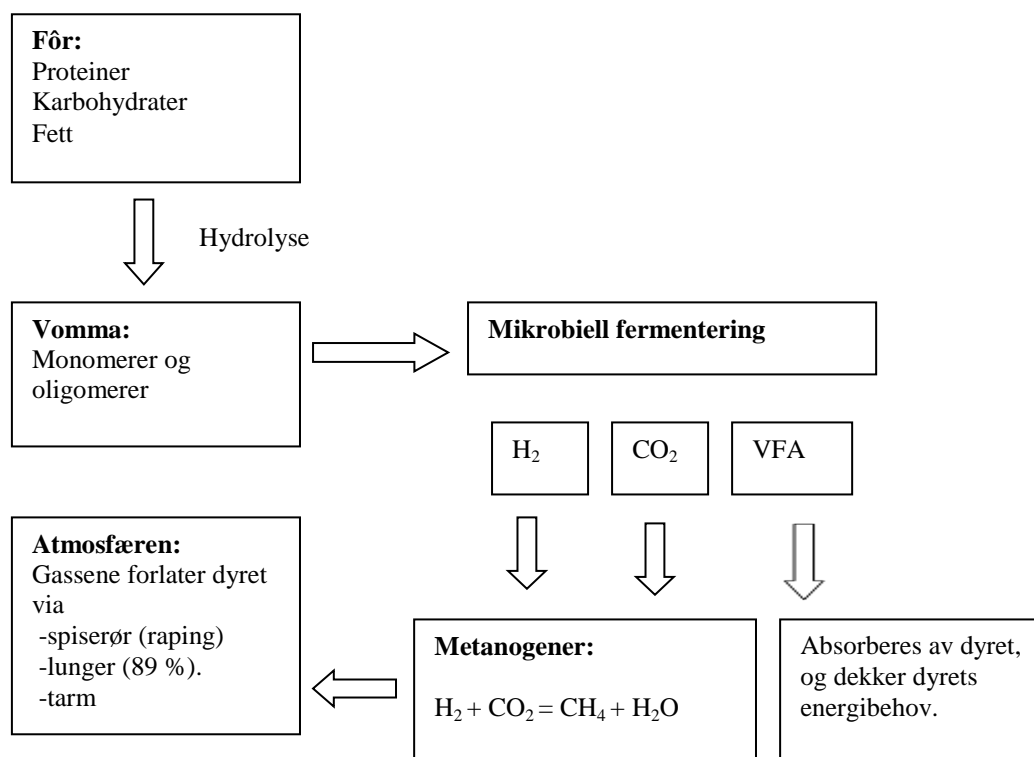
Tidligere målinger har vist at konsentrasjonen av metan som ligger lagret i polarisen, har vært stabil lenge. Nå har konsentrasjonen økt, og det forventes at metan vil bidra til global oppvarming med 15-17 % de neste 50 årene (IPCC, 1992). Hele 20-30 % av atmosfærisk metan kommer fra fossile kilder, som gassutvinning og distribusjonen av denne, gruvedrift, samt frigjørelse fra våtmarksområder, der karbon har vært lagret gjennom flere hundre år. Men mesteparten av atmosfærisk karbon er fra kilder som brenning av biomasse, hav og innsjøer, risproduksjon, kloakk og søppeldeponier og enterisk fermentering (Johnson & Johnson, 1995). Husdyrproduksjon er en av hovedkildene til metan, siden denne gassen har 21 ganger større drivhuseffekt enn karbondioksid (UNFCCC, 2006). Tamme drøvtyggere står for 15-33 % av det totale utslippet av metan i verden (IPCC, 2001). I New Zealand er 50 % av utslippene fra landbruk basert på drøvtyggere. Mens i Norge er det bare 3-4 % av utslippene som skyldes drøvtyggere som ku og sau (NIR 2003; Selmer-Olsen, 2009).

### 2.1. Metanogener og metanogenesen

Metanogener er en gruppe mikroorganismer som etablerer seg i vomma raskt etter fødsel hos drøvtyggere (Fonty *et al*, 1987; Morvan *et al*, 1994). I nyfødte drøvtyggere som drikker melk er vomma liten i forhold til løpemage, men utvikler seg etter hvert som dyret går over til fast føde (Oh, *et al*, 1972; Chuch *et al*, 1976). De utgjør bare 0,5-3,0 % av mikrobepopulasjonen i en ferdig utviklet vom hos blant annet hos sau (Jansen & Kris, 2008; Lin *et al*, 1997; Yanagita *et al*, 2000). Bakterier, anaerob sopp og encellede ciliater / protozoa er andre mikroorganismer som finnes i vomma. Metanogenene er arker. Arkene representerer et av de «three domains of life» («tre-domene-systemet») som ble lagt fram av Carl Woese ved University of Illinois i 1990, med domenene Archaea, Bacteria og Eukaryota som toppgrupperinger (Woese *et al*, 1990). Arkene (Archaea) er mikroskopiske, encellede, prokaryote organismer som ligner bakteriene av utseende, men som skiller seg fra disse ved at

de blant annet har ulike biokjemiske komponenter i cellevegg og membraner, og ulik form og størrelse på ribosomene. Metanogenene i drøvtyggervomma tilhører *Euryarchaea*, men i de siste årene har det også blitt funnet metanogener som tilhører *Thaumarchaeota* (Bronchier-Armanet *et al*, 2008; Woese *et al*, 1990). Distribusjonen av metanogenene varierer, noen lever i vomvæska, andre finnes forbundet til vomveggen i epithelium (Pei *et al*, 2010; Shin *et al*, 2004). De kan også leve i et symbiotisk forhold til protozoa hvor de lever inne i cella eller festet til overflaten på protozoaen (Finlay *et al*, 1994; Ohene-Adjei *et al*, 2007; Regensbogenova *et al*, 2004; Tokura *et al*, 1999; Wolin *et al*, 1997). Studier har vist at ved å fjerne de cilate protozoer fra vomma, kan man redusere metanogeneogenesen med 30-45 % (Ushida *et al*, 1996).

I vomma, der den mikrobielle fordøyelsen hovedsakelig pågår vil plantematerialet og væskene blandes sammen, pH er 5,6- 6,7, og temperaturen er ca. 39 °C. Her blir polysakkarider aller først brutt ned til monomerer og oligomerer av bakterier, anaerob sopp og protozoa. Men produktene fra den mikrobielle fermenteringen er energirike flyktige fettsyrer (VFA) (eddiksyre, propionsyre og smørsyre) og gasser som ammonium, hydrogen, karbondioksid og metan. De energirike flyktige fettsyrene blir absorbert over vomveggen og tatt opp i dyrets blod, og tilfører dyret energi og næring. Siden for høye konsentrasjoner av hydrogenioner (lav pH) i vomma virker hemmende på den mikrobielle nedbrytningen av plantefiber, er det viktig å redusere konsentrasjonen av H<sub>2</sub> vomma (Wolin 1997; McAllister & Newbold, 2008). Dette er en viktig rolle som metanogenene kan fylle. De bruker hydrogen (H<sub>2</sub>) som energi for å redusere karbondioksid (CO<sub>2</sub>) til metan (CH<sub>4</sub>) og vann (Hungate, 1970). Figur 1 viser en enkel skjematisk framstilling av den mikrobielle fordøyelsen i ei drøvtyggervom.



**Figur 1.** Mikrobiell fermentering i vomma hos en sau, der endeproduktene hovedsakelig er energirike flyktige fettsyrer (VFAs), CO<sub>2</sub> og H<sub>2</sub>. Metanogenene i vomma bruker H<sub>2</sub> til å redusere CO<sub>2</sub> til CH<sub>4</sub>. Gassene forlater dyret via spiserøret gjennom raping, og hele 89 % blir absorbert inn i blodet, og deretter føres ut gjennom lungene (Murray *et al*, 1976). Det er en liten andel av metan som slippes ut som tarmgass.

Selv om hydrogen er det substratet som benyttes hyppigst av metanogenene for å danne metan, kan de også nyttegjøre seg andre substrater. Metanogenene deles inn i grupper etter hvilke substrater de anvender (Garcia *et al*, 2000) som skissert i Tabell 1. Hydrogenotrofiske metanogener oksiderer hydrogen og reduserer karbondioksid for å danne metan. De kan også dra nytte av maursyre og noen alkoholer. Denne gruppen bidrar mest med energi til vertedyret gjennom metanogenesen. *Methanobreivibacter* spp. er et godt eksempel på denne type metanogener. Metylotrofer er en annen gruppe som bruker metylamin og/ eller metylkomponenter i metanogenesen, og genererer ikke like mye energi til vertedyret som den forrige gruppen. Eksempler på disse er *Methanosphaera* spp. og *Methanomicrococcus* spp. Den gruppen som gir lavest energiutbytte gjennom dannelse av metan via acetat, er acetotrofiske metanogener, eksempelvis *Methanosarcina* spp. Men disse forekommer sjeldent i vomma, det er størst konsentrasjon av de hydrogenotrofiske metanogenene i vomma (Hungate, 1970). Noen av disse metanogenene er også generalister, de kan både anvende hydrogen, eddiksyre og metylgrupper, dette gjelder f. eks *Methanosarcina* spp. (Liu & Whitman, 2008).



**Tabell 1.** Ulike grupper av metanogener basert på hvilket substrat de anvender for å danne metan. Mengde energien de generer til vertsdyret er gitt i forhold til rekkefølgen av gruppene, slik at gruppe 1 bidrar med mest energi og gruppe 3 med minst energi til dyret.

Type metanogener	Substrat	Eksempel
<b>1. Hydrogenotrofiske metanogener</b>	H <sub>2</sub> Maursyre	<i>Methanobrevibacter</i> spp.
<b>2. Metylotrofiske Metanogener</b>	Metylaminer Metylkomponenter	<i>Methanosphaera</i> spp. <i>Methanomicrococcus</i> spp.
<b>3. Acetotrofiske metanogener</b>	Eddiksyre	<i>Methanosarcina</i> spp

En mye brukt metode for å kartlegge hvilke type metanogener som finnes i vomma hos drøvtyggere er å anvende 16S rRNA gen bibliotek. Gjennom analyser fra 14 studier ble det funnet flere slekter som viste seg å være lik hos mange drøvtyggere, deriblant *Methanobrevibacter* (61,6 %), *Methanomicrobium* (14,9 %) og en ikke isolerte / dyrkede arker kalt Rumen Cluster C/ RCC (15,8 %) (Jansen & Kris, 2008). Et senere studium utført på arker i vomma på sau (*Ovis aries*), ku (*Bos taurus*) og hjort (*Cervus elaphus*) gav liknende resultater når det gjaldt sammensetningen av metanogener i vom (Jeyanathan *et al*, 2011). Sundset *et al* (2009a, 2009b) viste også at det er de samme metanogenene som finnes i vomma hos reinsdyr, både norsk rein (*Rangifer tarandus tarandus*) og Svalbard rein (*Rangifer tarandus platyrhynchus*). Disse studiene indikerer at sammensetningen av metanogener i vomma varierer lite mellom ulike drøvtyggere. Tabell 2 viser en enkel oversikt over meteanogengruppen som er blitt funnet så langt i vomma til sau, ku og reinsdyr i ulike deler av verden, og på ulike dietter. Studiene tyder på at diversiteten og sammensetningen av metanogener er svært lik hos ulike drøvtyggere, men at antallet varierer (Tabell 2).

**Tabell 2.** Diversitet og tetthet av metanogener i vomma til to grovfôrspisere: sau (*Ovis aries*), ku (*Bos taurus*), en konsentratsелеktor, hjort (*Cervus elaphus*) og to intermediærdrøvtyggere: reinsdyr (*Rangifer tarandus tarandus*) og Svalbardrein (*Rangifer tarandus platyrhynchus*) ulike dietter og naturlig beite.

Drøvtygger (diett)	Metanogengrupper	Antall metanogener
<b>Sau</b> (grovfôr, gress, havre, høy, pellets, silofôr)	<i>Methanobrevibacter gotschalkii</i> <i>Methanobrevibacter ruminantium</i> <i>Metahanosphaera</i> spp. <i>Methanomicrobium</i> spp. <i>Methanomicrococcus</i> spp. RCC	
<b>Ku</b> (gress, havre, høy, korn, silofôr, høy, surfôr)	<i>Methanobrevibacter gotschalkii</i> <i>Methanobrevibacter ruminantium</i> <i>Metahanosphaera</i> spp. <i>Methanomicrobium</i> spp. <i>Methanomicrococcus</i> spp. RCC <i>Methanobacterium</i> spp.	<b>1.3 x 10<sup>9</sup></b> (Denman <i>et al</i> , 2007) <b>9.8 x 10<sup>8</sup></b> (Evans <i>et al</i> , 2009) <b>2.9 x 10<sup>8</sup></b> (Hook <i>et al</i> , 2009)
<b>Hjort</b> (silofôr, gress,	<i>Methanobrevibacter gotschalkii</i> <i>Methanobrevibacter ruminantium</i> <i>Metahanosphaera</i> spp.	
<b>Norsk rein</b> (Sommerbeite)	<i>Methanobrevibacter gotschalkii</i> <i>Methanobrevibacter ruminantium</i> <i>Methanosphaera</i> spp. <i>Methanomicrobium</i> spp. <i>Methanomicrococcus</i> spp. RCC	<b>4.0 x 10<sup>8</sup></b> (Sunset <i>et al</i> , 2009a)
<b>Svalbardrein</b> (høst og vinterbeite )	<i>Methanobrevibacter gotschalkii</i> <i>Methanobrevibacter ruminantium</i> <i>Methanosphaera</i> spp. <i>Methanomicrobium</i> spp. <i>Methanomicrococcus</i> spp. RCC	<b>3.0 x 10<sup>10</sup></b> på høsten(Sunset <i>et al</i> , 2009a) <b>5.0 x 10<sup>7</sup></b> på vinteren (Sunset <i>et al</i> , 2009a)

Data på diversitet fra Hook *et al*, 2009, Jeyanathan *et al*, 2011, Pei *et al*, 2008, Pei *et al*, 2010, Shin *et al*, 2004, Skillman *et al*, 2006, Sunset *et al*, 2009a, Sundset *et al*, 2009b, Tajima *et al*, 2001b, Williams *et al*, 2009, Whitford *et al*, 2001, Wright *et al*, 2004b, Wright *et al*, 2006, Wright *et al*, 2007, Wright *et al*, 2008, Yanagita *et al*, 2000, Zhou *et al*, 2009

### **2.3. Interaksjoner mellom metanogener og andre mikroorganismer**

Protozoene produserer hydrogen gjennom sin fermentering, dette substratet benyttes deretter av metanogenene. Det symbiotiske forholdet til metanogenene er en fordel for protozoene, siden for mye hydrogen i vomma hemmer metabolismen til protozoene (Sharp *et al*, 1998).

Det er ulike arter av metanogener som lever i symbiose med protozoer, men studier har vist at *Methanobacteriaceae* er den mest fremtredende (Tokura *et al*, 1997) I noen tilfeller er også *Methanomicrobium* spp. og arker fra «Rumen cluster C / RCC» fremtredende (Ohene-Adjei *et al*, 2007; Regensbogenova *et al*, 2004).

Interaksjonene mellom anaerob sopp og metanogener ligner litt på interaksjonen mellom protozoer og metanogener. Anaerob sopp produserer hydrogen, og metanogenene trenger dette i metanogenesen. Slik kan den anaerobe soppen fortsette sin metabolisme. Resultatet av denne symbiosen er økt cellulose nedbrytning (Mountfort *et al*, 1982).

Det finnes også interaksjoner mellom bakterier og metanogener. Bakteriene kan både produsere og anvende hydrogen (Wolin *et al*, 1997). Men det har vist seg at metanogenene vinner kampen om H<sub>2</sub>, metanogenesen er den mest foretrukne prosessen for å eliminere H<sub>2</sub> (Chaban *et al*, 2006). En annen prosess, acetogenese, konkurrerer med metanogenesen, men sistnevnte har vist seg å avlevere mer energi, og dermed blir denne metanogeneogenesen favorisert (Fonty *et al*, 2007; Le Van *et al*, 1998). Likevel er eddiksyre et næringsemne for dyret, noe metan ikke er (Joblin, 1999).

Metanogenenes oppgave er som nevnt å redusere hydrogenkonsentrasjonen i vomma, slik at metabolismen til en rekke mikroorganismer ikke blir hemmet. Metanproduksjonen kan bli påvirket fra flere hold. Interaksjoner mellom metanogener og andre mikroorganismer i vomma er en viktig faktor, kanskje spesielt forholdet med protozoene. I tillegg tyder det også på at antallet metanogener i vomma har en direkte sammenheng med mengde metan som produseres (Denman *et al*, 2007). På den måten kan kanskje også type drøvtygger påvirke metanproduksjonen (Sundset *et al*, 2009a, 2009b; Mathiesen *et al*, 2000). Diett og dyrets fordøyelsesstrategi er andre faktorer som kan virke inn på metanogenenes produksjon av metan.

### **2.4. Fordøyelse fysiologi hos drøvtyggere**

Anatomien av gastro-intestinaltrakten til drøvtyggere har tilpasset seg dietten til de ulike drøvtyggerene gjennom evolusjonen. En tilpasning både gjennom plantecelleveggstrukturen og den fysiske strukturen av plantene, og (Hofman & Stewart, 1972) har delt drøvtyggere inn

i grupper. Inndelingen baserer seg på ulike strategier i forhold til anatomi og funksjonen av fordøyelsessystemet. Den gruppen av drøvtyggere som gjennom evolusjonen er tilpasset utnyttelse av en diett med høyt innhold av cellulose, hemicellulose og lignin (plantefiber) kalles «gress- og grovfôrspisere» og utgjør omlag 25 % av drøvtygger-artene. De har stor vom, og bladmage og lange tarmer, men små distale fermenteringskammer. Ku og sau inngår i denne gruppen drøvtyggere. Omlag 40 % av drøvtyggerartene (eksempelvis elg) har et fordøyelsessystem som er tilpasset en plantediett rik på plantecellekomponenter, og dårlig tilpasset fiberfordøyelse. Denne gruppen selektive drøvtyggere kalles «konsentratsselektorer». Disse dyrene har relativt liten vom og bladmage, korte tarmer, men store distale fermenteringskammer. Mellom gruppene «gress- og grovfôrspisere» og «konsentratsselektorer» finner vi gruppen «intermediærdrøvtyggere».

«Intermediærdrøvtyggere» selekterer plantene de spiser, men har en blandet diett, og de unngår mat som inneholder for mye fiber. De kan sies å være opportunistiske, i og med at de spiser det som er tilgjengelig av mat som følge av sesongmessige endringer (Hofman, 1989). Reinsdyr er et godt eksempel på en «intermediær drøvtygger»

Sauer er som sagt «gress- og grovfôrspisere», men de er selektive når det gjelder beiteplanter og beitehabitat (Cheeke, 1999). På sommeren er sauene ute på beite, og da spiser de hovedsakelig gress. På vinteren blir de som regel fôret silo (Cheeke, 1999). Tidligere har også lav blitt gitt som hjelpefôr (Presthegge, 1944). Siden dietten deres hovedsakelig består av plantefiber, har en langsom mikrobiell fermentering, der maten oppholder seg lengre i vomma (lang passasjetid), og de tygger mer drøv sammenlignet med andre drøvtyggere (Hofman, 1989). Anatomiske og fysiologiske studier har også vist at drøvtyggere som spiser primært gress med høyt innhold av fiber (cellulose, hemicellulose og lignin) har relativt små spyttkjertler (0,05-0,07 % av kroppsvekta) sammenlignet med drøvtyggere som er «konsentratsselektorer» (f. eks elg), som selekterer på plantecelleinnhold (0,18-0,22 % av kroppsvekten) (Hofman *et al*, 2008). Årsaken til at «gress- og grovfôrspisere» som sauen, har mindre spyttkjertler kan være at de ikke er like avhengig av at spyttet må inneholde proteiner som bryter ned maten, eller fenoliske forbindelser som planter produserer for å beskytte seg mot giftige antibiotikastoffer i plantene. Sauer tygger maten sidelengs for å dele opp maten før de svelger den (Hofman, 1986).

## 2.5. Sekundære fenoliske metabolitter

Lav dekker omlag 8 % av landoverflaten, særlige i alpine og nordlige områder (Nash, 1996). Lav er en symbiotisk organisme mellom en sopp (myobiont) som er avhengig av en annen komponent (fotobiont), som kan drive fotosyntese, og sørger for næring til organismen. Dette er ofte en grønnalge eller en cyanobakterie (Cocchietto *et al*, 2002). Laven produserer og akkumulerer en rekke sekundære fenoliske plantemetabolitter, også kalt lavsyrer, eksempelvis usninsyre (Ingolfssdottir, 2002). Metabolittene er pigmenter som absorberer UVB-stråler, og dermed beskytter planten mot å bli ødelagt av UVB-strålene fra sola. Usninsyre beskytter i tillegg laven mot beite (Cocchietto *et al*, 2002). Dette ble allerede rapportert så langt tilbake som til 1800-tallet, da Backman (1890) og Zukal (1895) publiserte data om forekomsten av sekundære metabolitter i lav som et kjemisk forsvar mot beitende dyr. Beskyttelse mot beiting er viktig for laven som vokser langsommere enn de fleste vaskulære plantene. Usninsyre er også giftig for insekter (Emmerich *et al*, 1993; Cetin *et al*, 2008), snegler (Hesbacher *et al*, 1995) og pattedyr, inkludert mennesker (Dailey *et al*, 2008).

Likevel er det noen drøvtyggere som spiser lav, deriblant reinsdyr (Klein, 1982; Aagnes & Mathiesen, 1994), moskus (*Ovibos moschatus*) (Ihl & Klein, 2001) og moskushjort (*Moschus moschiferus*) (Green, 1987). Disse drøvtyggerne har tilpasset seg en diett med høye konsentrasjoner av usninsyre, og er trolig i stand til å bruke denne fenolforbindelsen som energikilde (Sundset *et al*, 2008). En rekke lavarter inneholder også høye konsentrasjoner av lettfordøyelige karbohydrater, som gir en høy produksjon av VFA (Thomas *et al*, 1984), dermed mye energi til vertsdyret.

De sekundære fenoliske metabolittene er anti-mikrobielle / antibiotiske stoffer som hemmer veksten og metabolismen til bakterier, protoza og anaerob sopp i vomma (Dorman & Deans, 2000; Burt 2004). Effekten av disse er avhengig av pH i vomma og diett (Patra & Saxena, 2009b). Påvirkningene de sekundære fenoliske metabolittene har på vomma er avhengig av plantetype og den kjemiske sammensetningen av planten (Benchaer *et al*, 2008)

Tanniner er en gruppe fenoliske forbindelser, og det er et relativt høyt innhold av tanniner i frukt, busker, belgfrukter og korn (Patra *et al*, 2010). Tanniner har også vist seg å ha en negativ effekt på metanogesen i vomma, og kan redusere metanutslippene fra dyret (Patra *et al*, 2010). Tidligere studier på geit har vist at 50 % av tanninene allerede var forsvunnet før dyret hadde svelget maten, noe som indikerer at det finnes tanninnedbrytende proteiner i spyttet som kan ha vært involvert (Provenza *et al*, 1984).

## **2.6. Hensikt og hypoteser**

Formålet med dette prosjektet var å måle utslipp av metan fra sau på to ulike dietter, en gressbasert pelletert diett og en lavdiett. Dette gjøres fordi utslippet fra dyret kan variere i forhold til hva fôret inneholder, både av næring og sekundære fenoliske forbindelser. Samtidig var det et ønske om å undersøke om sauen, med sin fôringstrategi og grovfôrspiseranatomi slipper ut mer metan sammenlignet med andre drøvtyggere. Dataene fra dette prosjektet skulle drøftes mot nylig gjennomførte forsøk på reinsdyr under samme betingelser. Hensikten med prosjektet var å teste to hypoteser: (1) Sau slipper ut mer metan på en gressbasert pelletsdiett enn på lavdiett, da lav inneholder fenoliske forbindelser som man tror hemmer metanproduksjonen og (2) Sau, som er tilpasset en gress- og grovfôr diett produserer mer metan enn reinsdyr som er en intermediærspiser når de spiser samme type fôr.

## **3. MATERIAL OG METODER**

### **3.1. Forsøksdyr**

Forsøket ble utført i juni-2012 og oktober-2012, ved Arktisk Biologi bygget, Institutt for Arktisk og Marin biologi, Universitetet i Tromsø, Norge. Forsøkene var godkjent av Forsøksdyrutvalget (godkjenningsnr 4003). Fem søyer (*Ovis aries*) ble tatt inn til forsøksdyreanlegget for Avdeling for Arktisk Biologi 20. februar. 2012, fra en gård i Tønsvik, utenfor Tromsø (Arnulf Jensen). Siden noen av sauene hadde litt hoste, og det hadde vært tidligere tilfeller av lungebetennelse og hoste på gården i Tønsvik, fikk alle sauene et bredspektret antibiotikum som profylakse (Terramycin). I tillegg fikk alle sauene Valbazen for forebygging av løpe- tarm- og lungeorm, bendelorm og leverikter. Dyrene var ett år gamle, og veide da 35- 45 kg. De fikk tildelt silo *ad libitum* da de kom til forsøksdyreanlegget, samme diett som før ankomst. Etter hvert gikk de over på en gressbasert pelletsdiett (reinfôr fra Felleskjøpet), og deretter på en lavdiett (hovedsakelig *Cladonia stellaris*).

### **3.2. Forsøksoppsett og forsøksdesign**

I dette studiet ble det brukt respirometri for å måle produksjonen av metan fra sau. Denne metoden er en velbrukt metode og gir nøyaktige resultater. I tillegg gir den individuelle metanmålinger. Fordelene med et respirasjonskammer er at man nøyaktige mål per individ, og

man får metanutslipp både fra vomma- og baktarmsfermentering. På en annen side krever denne metoden mye tid i form av trening av dyrene, som også kan føre til at antall dyr som kan brukes i eksperimentet reduseres (Johnson & Johnson, 1995).

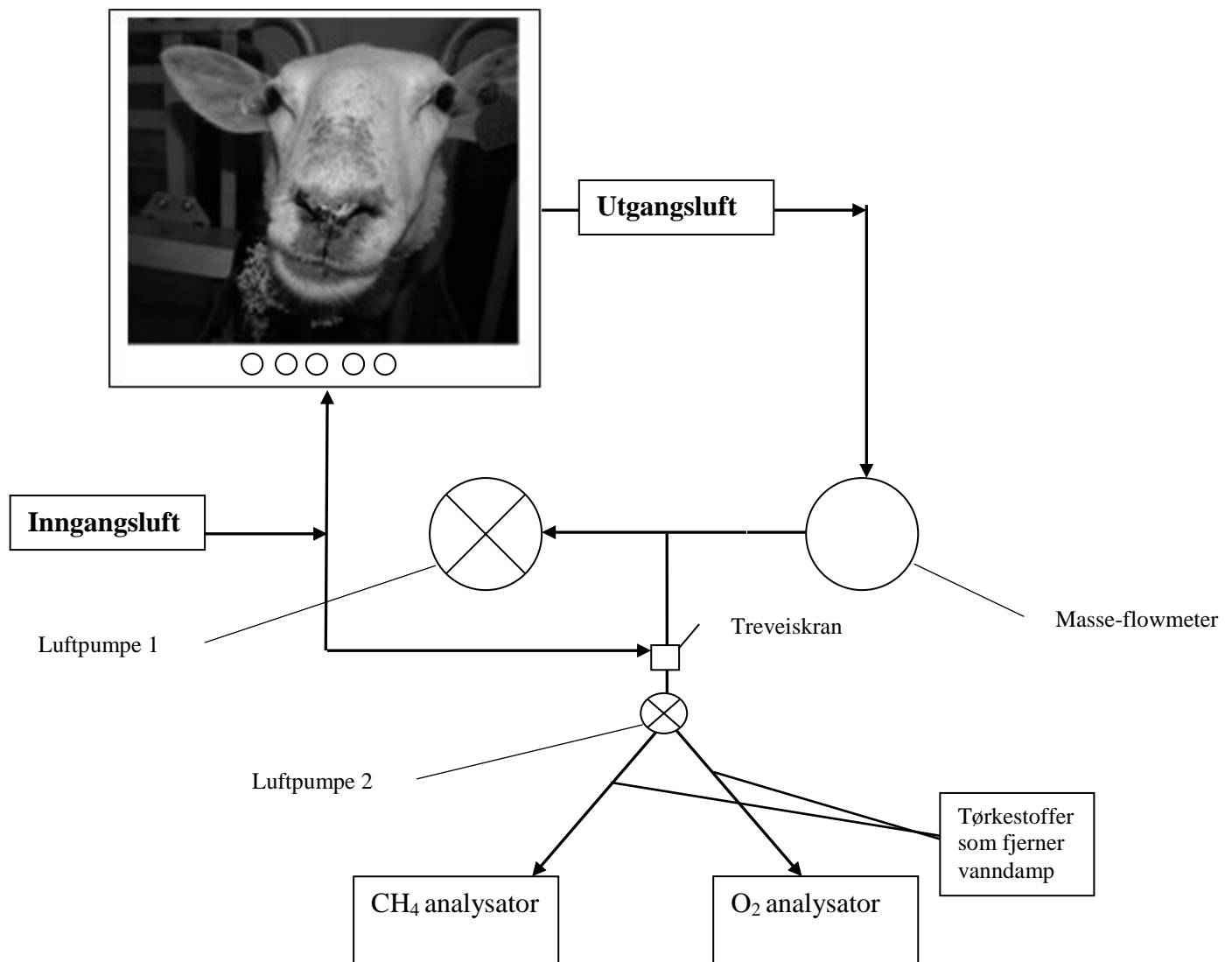
Ved bruk av respirasjonskammer kan man måle et dyrs omsetning av en gass, i dettet tilfellet metanproduksjon. Ved å registrere gasskonsentrasjonen i luften som går inn i kammeret, og gasskonsentrasjonen i luften som dras ut av respirasjonskammeret, i tillegg til mengden luft som passerer gjennom kammeret, kan mengden metan som dyret produserer beregnes.

Figur 2 viser et enkelt forsøksoppsett. Oppsettet for forsøket inkluderte en aluminiumsboks på 1.3 m<sup>3</sup> (med et vindu i den ene enden), som var respirasjonskammeret, der dyret ble plassert. Boksen stod i et klimakammer, slik at temperaturen kunne holdes innenfor dyrets termonøytrale sone. Sauene hadde under sommerforsøkene en pelstykkel på > 5 cm og ~ 10 cm under høstforsøkene, noe som tilsier en lavere kritisk temperatur på < 0 °C (Alexander, 1974). Forsøkene ble derfor gjennomført ved en temperatur på 4,4- 5,5 °C for å sikre termonøytrale betingelser. Et kamera ble plassert foran vinduet på boksen, slik at dyret kunne observeres under forsøket. Luften fra dyret ble dratt ut (utgangsluften) ved hjelp av en pumpe (støvsuger, Electrolux, Oxygen z5520, 1500W-440W suction, Super Silence) (luftpumpe 1 på figur 2), som ga en luftstrøm på 120-140 l/min som ble målt ved hjelp av et masse-flowmeter (type G-40, Elster A/G Mainz, Stuttgart, Tyskland). Luften ble trukket inn gjennom små hull i boksens nedkant (inngangsluften). Luften i kammeret ble godt sirkulert ved hjelp av en vifte, som var plassert slik at luften som dyret pustet ut, ikke forsvant ut gjennom hullene. Konsentrasjonen av oksygen og metan fra både inngangs- og utgangsluften ble registrert henholdsvis av en oksygenanalysator (3-SA Oxygen analyser Applied Electrochemistry Inc., Sunnyvale, CA, USA) og en metananalysator (Binos-100 Methane analyser, Rosemount, Tyskland). Gassanalytorene mottok luften via en pumpe (Thomas Industries inc., Powerair division., Sheboygan Wisc. USA) (luftpumpe 2 på fig.2). I tillegg ble også vanndamp fjernet fra luften før denne nådde gassanalytorene, ved hjelp av tørkestoffer (Kalsiumklorid, Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland).

En gang hver time under hele forsøket ble konsentrasjonen av oksygen og metan i *inngangsluften* målt (10 min), bortsett fra timen etter fôring. Da vi ville registrere metanproduksjon i forbindelse med fôrinntak, i tillegg til å skaffe differansen mellom metankonsentrasjonen i inn- og utgangsluften gjennom hele eksperimentet. Konsentrasjonen av oksygen ble målt for å kontrollere at dyret hadde tilstrekkelig ventilasjon under forsøket (minimum 20,5 % O<sub>2</sub>). Metananalysatoren ble kalibrert i forkant av hver forsøksdag ved å

bruke en AGA 99,99 % ren nitrogengass som null-verdi, og en 997 mol-ppm 0,0997 % CH<sub>4</sub> i nitrogen som referanseverdi. Oksygenanalysatoren ble kalibrert opp mot omgivelse-luften (20,97 % O<sub>2</sub>) og 99,99 % N<sub>2</sub> (0 % O<sub>2</sub>). Tørkestoffene ble skiftet ut annen hver dag. Ellers var det et termo- og hygrometer (Vasala HMI 32) som registrerte temperaturen og den relative fuktigheten i utgangsluften, slik at luftstrømmen kunne korrigeres i henhold til STPD. Alle registreringer ble lagret på en pc gjennom programmet Chart5 powerlab (Powerlab, ADInstruments). Metanmålingene på hvert dyr ble utført i 23 timer, og den 24. timen ble ekstrapolert slik at det var tid til å forberede og starte opp et nytt forsøk neste dag. Forsøket ble utført ved at dyret ble plassert i boksen en time før registreringene begynte, slik at man kunne forsikre seg at dyret forholdt seg rolig, samtidig som at utstyret fungerte som det skulle. I tillegg var det viktig at kammeret ble satt på en time før sauen kom inn i kammeret, slik at korrekt forsøkstemperatur ble oppnådd.





**Figur 2.** Forsøksoppsett i forenklet form. Luften dras ut av kammeret ved hjelp av luftpumpe 1 og 2, og registrert av gassanalyserer for CH<sub>4</sub> og O<sub>2</sub>. Ved hjelp av en treveiskran kan det bestemmes om utgangsluften blir målt, eller inngangsluften. Masse-flowmeteret registrerer luftstrømmen.

Metanmålingene ble utført på to ulike dietter, en gressbasert pelletsdiett og en lavdiett. Den gressbaserte pelletsdietten inneholdt 23,3 % havre, 18,9 % timotei, 16 % havrekli og 11,2 % bygg (Felleskjøpet, Norge). Lavdietten var en miks av lavarter, men hovedsakelig *Cladonia stellaris*, laven kom fra Østerdalen i Sør-Norge. Der var det viktig at dyrene fikk det gjeldende fôret i minst 3 uker før forsøket skulle gjennomføres. Studier har vist at hos noen drøvtyggere trenger mikroorganismene i vomma og baktarmen tid til å tilpasse seg det nye fôret (Storeheier 2003, Aagnes Utsi, 1998). Lav er som nevnt ikke et veldig mye brukt fôr til sau, så naturligvis tok det litt tid å venne de enkelte sauene til lavdietten.

Siden fôrmengde er en av faktorene som påvirker metanproduksjon (Murray *et al*, 1999) ga vi dem en bestemt mengde (ca. 0,440 kg i tørrstoff). I uken før forsøket fikk sauene samme mengde fôr som de skulle ha under forsøket, i motsetning til *ad libitum* som de ellers fikk. Hvert dyr gjennomgikk forsøket to ganger på hver diett, av hensyn til at det kunne være variasjoner i metanproduksjonen fra dag til dag.

I forkant av eksperimentet ble hver søye tilvendt forsøksoppsettet over en lengre periode, det var viktig at dyrene var trygge og rolige i forsøkssituasjonen. På denne måten kunne vi forsikre oss om å få de mest representative resultatene. Derfor var det essensielt å legge ned mye tid i trening av alle dyrene i oppstarten av forsøksrundene. De måtte bli komfortable med å være alene, ha noe begrenset plass, samt lydene av klimakammeret. Treningen inkluderte i første omgang å ha dyrene hver for seg, og plassere de i kassen når klimakammeret var avslått, og deretter når kammeret var påslått. Intensiteten av treningen økte jo nærmere vi kom første forsøksdag, der dyrene ble plassert i kassen flere ganger i uken ca. en måned før. Av de fem søyene som ble hentet inn til forsøket deltok kun to i selve forsøket. En av søyene ble tatt ut av gruppen fordi den ikke klarte å venne seg til forsøkssituasjonen og var urolig inne i respirasjonskammeret under treningsperioden før forsøket. To av søyene døde uventet etter en periode med fôring av den gressbaserte pelletsdietten. Begge disse dyrene ble obdusert ved Veterinærinstituttet i Tromsø. Obduksjonen viste at søyene var kobberforgiftet, og den ene søyen hadde i tillegg bakteriell lungebetennelse. Kronisk kobberforgiftning er et velkjent problem hos sau i Norge, fortrinnsvis hos voksne dyr på innlandsbeitet og man antar at årsaken kan være lave nivåer av molybden, som fungerer som antagonist ved opptak av kobber (Sivertsen, 2008) Det ble antatt at kobberforgiftningen av de to søyene i dette forsøket skyldtes det gressbaserte fôret som ble brukt (Reinfôr fra Felleskjøpet), da sau tåler mindre kobber enn rein. De to gjenstående søyene tilpasset seg forsøkssituasjonene godt og var friske. Fôret deres ble tilsatt Na-molybdat (100 mg) og Na-sulfat (1 g) preventivt etter avtale med veterinær for å forebygge forgiftning. De to forsøksdyrene spiste normalt og viste ingen tegn til sykdom under forsøket. De ble begge slaktet i etterkant av eksperimentet og det ble heller ikke gjort unormale funn ved obduksjon i samråd med veterinær.

### **3.3. Beregning av CH<sub>4</sub>**

Forskjellene i metankonsentrasjonen per time ble bestemt ved å registrere utgangsluften i 50 minutter, og i inngangsluften i 10 minutter før og etter registreringen av gasskonsentrasjonen i utgangsluften. Sampling av luft fra de to kildene ble gjort ved å bruke en treveiskran (Se

figur 2). Det tok noen minutter før dødvolumet i samlingssystemet var skiftet ut, og derfor ble ikke hele datasettet brukt i beregningene, bare de siste 5 minuttene av inngangsluften og de siste 45 minuttene av utgangsluften. For de tidsperioder hvor representative målinger ikke kunne gjøres, ble verdiene ekstrapolert. Temperaturen på luften ble også registrert ( $T_{\text{gass}}(^{\circ}\text{C})$ ) Metaninnholdet i utgangsluften minus metaninnholdet i inngangsluften gir metanproduksjonen i % fra dyret ( $\Delta \text{CH}_4 \%$ ) (figur 3). Metanproduksjonen per time ( $V_{\text{CH}_4}$  (l/time)) ble korrigert for STPD på følgende vis:

$$V_{\text{CH}_4} = \Delta \text{CH}_4 \% * 0.01 * 60 \text{ min/ time} * \text{Luftstrøm}_{\text{STPD}}$$

$\text{Luftstrøm}_{\text{STPD}}$  (l/min) er luftstrømmen målt ved masse-flowmeteret minus vanddampinnholdet i gassen, gitt ved standard temperatur, T (273,15 K) og trykk, P (760 mmHg). Dette ble beregnet ved hjelp av Magnus ligningen (for eksempel Kotsoyiannis, 2012):

$$\text{Luftstrøm}_{\text{STPD}} = \text{Luftstrøm} - (\text{Luftstrøm} * ((\text{RH}/100)^{4,581} * (10^{(7,5 * T_{\text{gass}}) / (238 + T_{\text{gass}})})) / P)$$

For å beregne metanproduksjonen i gram per time ble denne beregningen utført:

$$\text{CH}_4 \text{ (g/time)} = (P * V_{\text{CH}_4} * M) / (R * T)$$

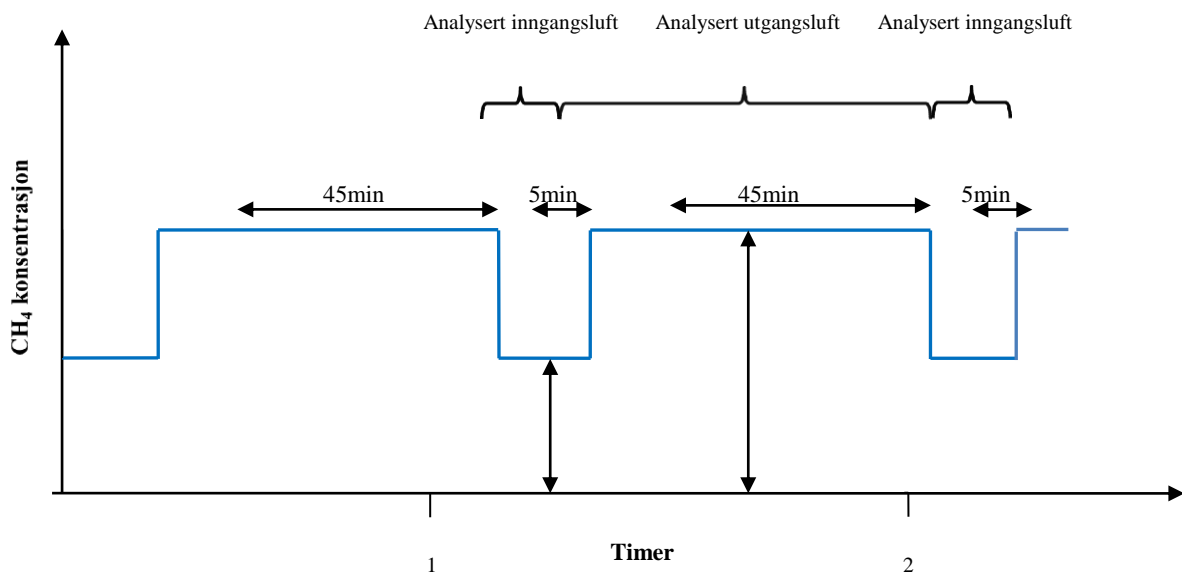
Hvor P og T er standard trykk (760mmHg) og temperatur (273,15 K), M er molvekten til metan (13,0189) og R er gasskonstanten 62,36 mmHg K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>.

Siden hvert dyr bare ble målt i 23 timer, ble den 24. timen ekstrapolert. Dette ble gjort ved å beregne gjennomsnittet av den 1.timen og den 23.timen. Den 1. timen ble valgt siden den hadde et stabilt metaninnhold, siden dyret ikke hadde spist. Den totale produksjonen av metan per dag ble beregnet ut fra gjennomsnitt fra de 23 timene og den ekstrapolerte 24.timen.

For å kunne se hvor mye energi som gikk tapt som metan, og kunne sammenligne de to diettene ble brutto energiinntak, tapt som metan (BEI i %) kalkulert. Dette ble kalkulert ved å multiplisere den daglige metanproduksjonen ( $V_{\text{CH}_4, \text{TOT}}$ ) med energiinnholdet i metan ( $EC_{\text{CH}_4}$ ) som var 39,45 kJ/L (Brouwer 1965; Suzuki *et al.*, 2007):

$$\text{CH}_4 \text{ i \% av BEI} = ((V_{\text{CH}_4, \text{TOT}} * \text{EC}_{\text{CH}_4}) / \text{BEI}) * 100$$

der BEI er produktet av energitettheten i fôret (Kalorier kJ/ g DM, i Tabell 3) og tørrstoffinntaket fra hver dag (g/ dag).



**Figur 2.** Skjematisk framstilling av registreringen av metankonsentrasjon produsert fra sau, utført ved hjelp av et respirasjonskammer. Metananalysatoren registrerte metankonsentrasjonen i inngangsluften i 10 minutter og 50 minutter i utgangsluften. Det tar noen minutter før dødsvolumet er ute av systemet, så i beregninger i metankonsentrasjoner ble gjort ved å bruke de siste 5 minuttene og de siste 45 minuttene av henholdsvis inngangsluften og utgangsluften.

### 3.4. Beregning av tørrstoffinntak

For hver forsøksdag ble det tatt ut og fryst ned en fôrprøve, i tillegg til fôrprøve fra restfôr hvis det var tilfelle. Disse prøvene ble benyttet til å estimere fôrinntak i tørrstoffvekt. Hver prøve ble tørket i tørkeskap ved 100 °C. Før tørking av selve prøvene måtte silica gel tørkes i 1 døgn, deretter ble den gelen plassert i en beholder. Nødvendigheten av silicagelen er å skape et tørt miljø. Glassbeholdere som fôrprøvene ble plassert i ble merket og deretter tørket i skapet i 1 døgn. Etterpå avkjøltes de i beholderen med silicagel, for så å bli veid. Prøvene måtte tines før de ble veid (våttvekt), og plassert i glassbeholderne. Tørking av prøvene

foregikk over noen dager, til de ble fullstendig tørre (tørrvekt). For å vite når de var helt tørre, måtte de veies helt til de veide det samme som dagen før. Utrekning av tørrstoff ble utført ved følgende formel: Tørrstoff (TS)= Tørrvekt (TV)/ Våtvekt(VV)\*100.

Fôrprøver ble også pakket inn og sendt til Eurofins Food & Agro Testing Norway AS (Trondheim) for å sjekke næringsinnholdet i fôret som dyrene fikk (Hansen, 2012). I Tabell 3 ser vi næringsinnhold i pellets fra Felleskjøpet og lav som hovedsakelig bestod av *Cladonia stellaris*. I den gressbaserte pelletsdietten er det et høyt innhold av proteiner, fett, aske, lignin og vannløselige karbohydrater, i motsetning til den miksede lavdietten som har et høyt innhold av hemicellulose.

**Tabell 3.** Kjemisk analyse av reinfôr fra Felleskjøpet (gjennomsnitt  $\pm$  SD) (data fra Hansen 2012)

	Reinfôr (n=2)	Lav(n=3)
Kalorier kJ/ g DM	18.5 $\pm$ 0.05	17.4 $\pm$ 0.85
Tørrstoff (%)	88.9 $\pm$ 0.10	38.2 $\pm$ 1.86
(% av tørrstoff)		
Protein	12.7 $\pm$ 0.10	< 2.6
Fett	4.7 $\pm$ 0.16	1.7 $\pm$ 0.16
Aske	7.8 $\pm$ 0.10	< 2.6
Vannløselige karbohydrater	5.9 $\pm$ 0.05	0.1 $\pm$ 0.06
Lignin	7.2 $\pm$ 0.15	2.0 $\pm$ 0.10
Cellulose	5.2 $\pm$ 0.16	1.4 $\pm$ 0.35
Hemicellulose	32.9 $\pm$ 0.22	78.7 $\pm$ 1.08

### 3.5. Statistikk

Når man undersøker datasettene bruker vi en t-test, som er den vanligste måten å sammenligne kvantitative data for to grupper på. En parett t-test gir mer pålitelige testresultater enn en uparett t-test, og derfor ble en parett t-test benyttet i dette studiet. På denne måten kan vi finne ut om det er signifikante forskjeller mellom diettene og testing av hypotesen. Hver sau er sitt eget par med pelletsdatasettene og lavdatasettene. For å kunne ta denne testen i bruk må differansene er tilnærmet normalfordelt. Hypotesetesten baserer seg på den t-fordelte testobservatoren

$$T = \text{gjennomsnittlig } D / (S_D / \sqrt{n}),$$

der  $D$  er differansen mellom de parete verdiene, og  $S_D^2$  er variansen og  $n$  er antall prøver, altså antall dyr. Hypotesen ( $H_0$ ) i dette studiet er at sau produserer mer metan eller lik mengde metan når de spiser en lavdiett sammenlignet med en gressbasert pelletsdiett. Ved å bruke et signifikantnivå  $\alpha = 0,05$  vil  $H_0$  bli forkastet hvis  $T > t_\alpha$  ( $t_\alpha$  finnes i tabellen for t-fordeling, D.5 i Løvås, 2004). Hvis P-verdien er mindre enn 0,05 ( $H_0 = \mu_1 \leq \mu_2$ ) vil  $H_0$  bli avvist, i motsetning til hvis T-verdien er over 0,05, da vil  $H_0$  ikke bli avvist

## 4. RESULTATER

### 4.1. Kroppsvekt og tørrstoffinntak

Hvert dyr ble veid både før og etter forsøkene, og ut i fra disse veiingene ble det regnet en gjennomsnittsverdi per individ, som vist i Tabell 3. Gjennomsnittsverkten for begge dyrene var 51,3 kg under forsøkene på en gressbasert pelletsdiett. Når dyrene gikk på lavdietten, var gjennomsnittsverkten 45 kg. I tillegg ble også tørrstoffinntak beregnet for dyrene, både for pellets og lav. Under forsøkene med pellets, fikk hvert dyr ca. 0,43 kg i tørrstoff. I forsøket der dyrene fikk tildelt lavdietten, var ikke tørrstoffinntaket like høyt, og inntaket varierte mellom individene. Gjennomsnittsinntaket for dyrene var 0,2375 kg, som vist i Tabell 4.

**Tabell 4.** Kroppsvekt (KV) og tørrstoffinntak (TSI) under forsøk på en gressbasert pelletsdiett og lavdiett.

Pellets				Lav		
Sau	Dato	KV (kg)	TSI (kg)	Dato	KV (kg)	TSI (kg)
55	11.06.12	44,3	0,434	4.10.12	40,0	0,169
	13.06.12	42,5	0,438	10.10.12	39,4	0,189
11	12.06.12	59,9	0,435	3.10.12	51,0	0,274
	18.06.12	58,3	0,435	9.10.12	49,4	0,318
<b>Gjennomsnitt ± SD</b>		<b>51,3 ± 7,9</b>	<b>0,435 ± 0,00</b>		<b>44,95 ± 5,28</b>	<b>0,239 ± 0,05</b>

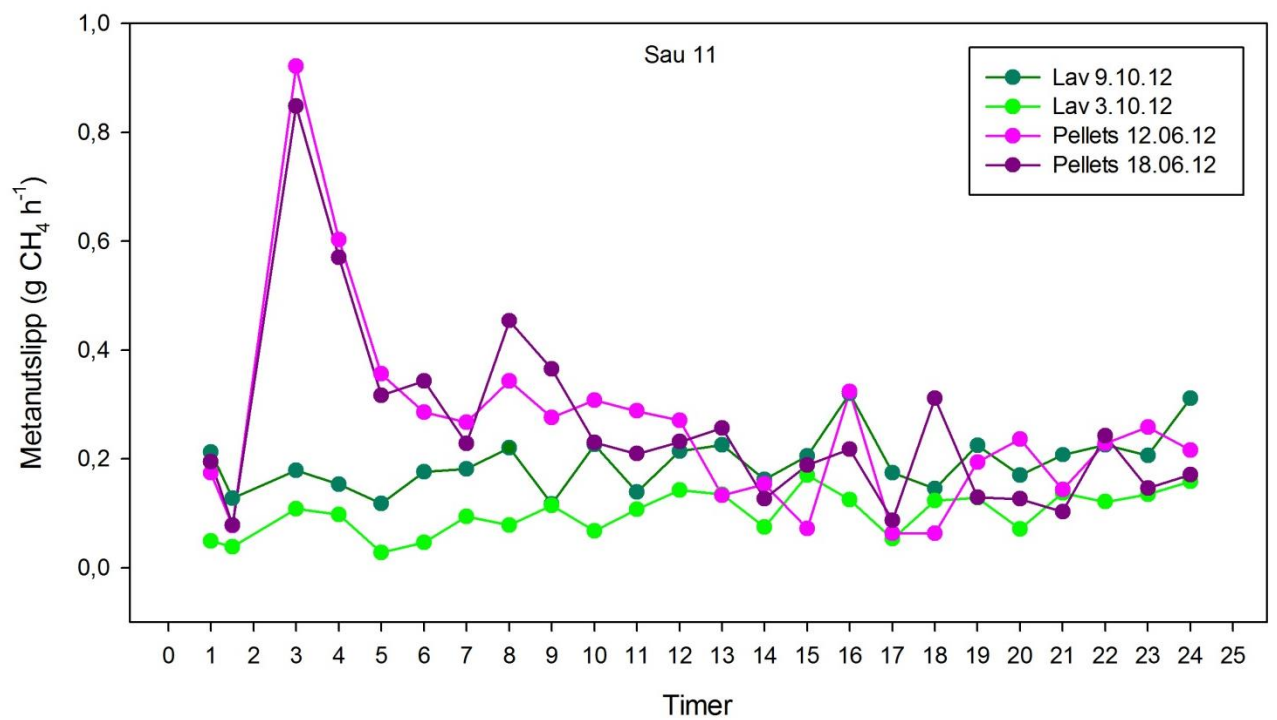
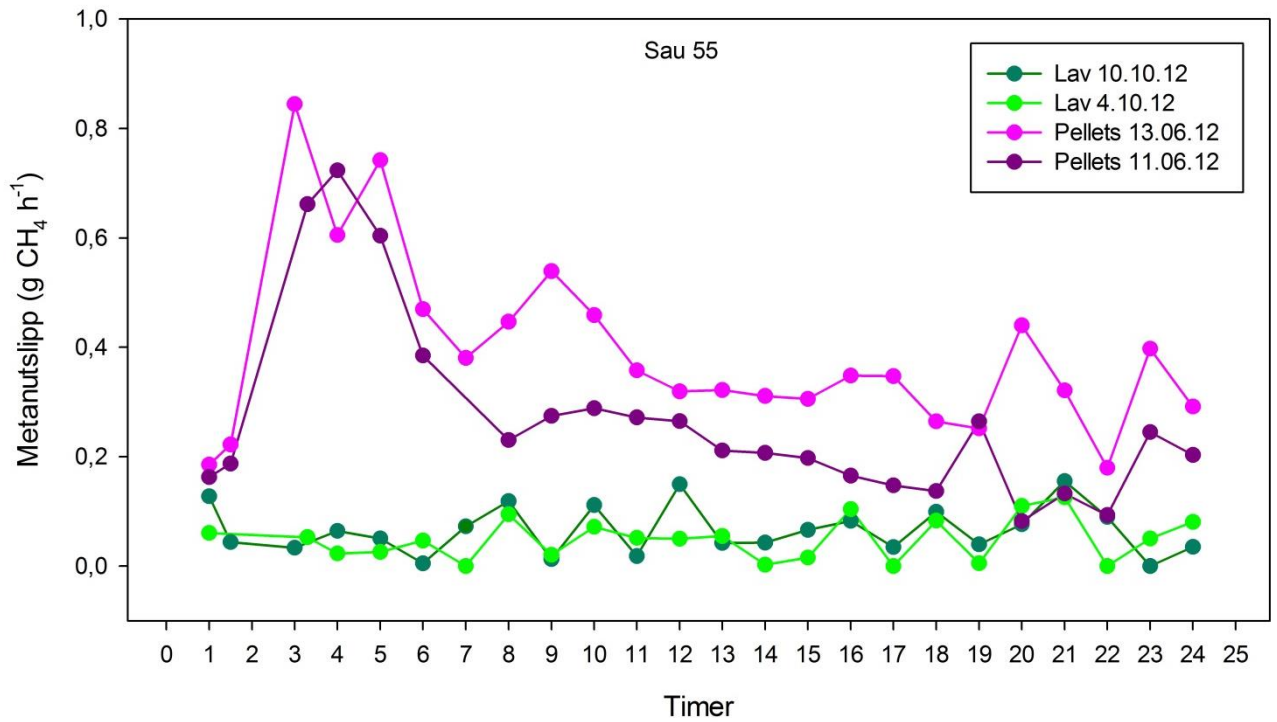
## 4.2. Metanutslipp

Det gjennomsnittlige metanutslippet fra sauene der de fikk en gressbasert pelletsdiett var  $16,7 \pm 3,03$  g CH<sub>4</sub>/ kg tørrstoffinntak (TSI)/ dag, mens utslippet var  $9,6 \pm 3,01$  g CH<sub>4</sub>/ kg tørrstoffinntak (TSI)/ dag når de gikk på en lavdiett (Tabell 5). På grunn av at  $T = 3,06 > t_{\alpha} = 12,706$ , vil  $H_0$  forkastes ved et signifikansnivå på 0,05, der frihetsgraden er  $n - 1$ . P-verdien er liten (0,0001), noe som forsterker forkastelsen av  $H_0$ , ved bruk av et signifikantnivå på 0,05. Vi ser samme trenden for CH<sub>4</sub> i % av BEI (P=0,001). Ved hjelp av en parett-test tyder det på at forskjellene i metanproduksjon var signifikante.

**Tabell 5.** Metanutslipp per sau (CH<sub>4</sub> g/dag; CH<sub>4</sub> i % av brutto energiinntak (BEI), både fra forsøk med en gressbasert pelletsdiett og en lavdiett.

Pellets					Lav			
Sau	Dato	CH <sub>4</sub> (g)	CH <sub>4</sub> g/ kg TSI/ dag	CH <sub>4</sub> (%) av BEI	Dato	CH <sub>4</sub> (g)	CH <sub>4</sub> g/ kg TSI/ dag	CH <sub>4</sub> (%) av BEI
55	11.06.12	6,42	14,8	4,49	4.10.12	1,16	7,1	2,61
	13.06.12	9,56	22,1	6,50	10.10.12	1,61	8,5	4,33
11	12.06.12	6,53	14,8	4,55	03.10.12	2,31	8,4	1,56
	18.06.12	6,58	15,2	4,51	09.10.12	4,67	14,18	2,72
<b>Gjennomsnitt ± SD</b>		<b>7,3 ± 1,35</b>	<b>16,7 ± 3,03</b>	<b>5,0 ± 0,86</b>		<b>2,4 ± 1,4</b>	<b>9,6 ± 3,01</b>	<b>2,8 ± 1,0</b>

Når man ser på utslippet av metan per time fra sau (n=2) ser man at etter de fikk tildelt fôr 2 timer inn i forsøket, øker metanutslippet fra dyret ved en gressbasert pelletsdiett. Under forsøkene på en lavdiett så man ingen umiddelbar økning i metanproduksjonen rett etter tildelt fôr. Årsaken er sannsynligvis at dyrene ikke spiste fortløpende all fôret de fikk tildelt. Se Figur 3 for metanproduksjon gjennom døgnet. Videre ser man også at utslippet av metan er lavere ved lavdiett enn ved en gressbasert pelletsdiett.



**Figur 2.** Metanutslipp per time fra sau gjennom en 23 timers periode målt via et respirasjonskammer. Utslippet ble målt på to ulike dietter, gressbasert pelletsdiett og en lavdiett (fôr i tørrvekt). Den 24. timen er ekstrapolert.



### 4.3. Oksygen

Registreringen av oksygen ble utført på samme måte som ved metan (Figur 2). Det ble observert at dyret inni kassen var godt ventilert til en hver tid, altså godt over minimum verdien på 20,5 %.

## 5. DISKUSJON

### 5.1. Mindre utslipp av metan fra sauer som spiser en lavdiett

Dette studiet indikerer at metanproduksjonen hos sau på en lavdiett er lavere enn når de spiser en gressbasert pelletsdiett (Tabell 4). Sauene som spiste en gressbasert pelletsdiett produserte  $16,7 \pm 3,03$  g CH<sub>4</sub>/ kg TSI/ dag, mens utslippet var lavt, bare  $9,6 \pm 3,01$  g CH<sub>4</sub>/ kg TSI/ dag når de spiste lavdietten (Tabell 5). I dag er det ikke vanlig å bruke lav som fôr til sauer, men tradisjonelt har lav blitt gitt som et supplement om vinteren til sau, og allerede i 1908 ble det gjort fôringsforsøk med lav til sau ved Landbrukshøyskolen på Ås (Presthegge, 1944). Studiet viste at sauer som var tilvendt det å spise lav, hadde godt næringsutbytte av å spise 1 kg lav målt i tørrstoff. De dyrene som ikke var tilvendt lavdietten på forhånd fikk et dårlig næringsutbytte, og lavarten som inneholder mest lavsyrer, falt heller ikke i smak hos sauene (Presthegge, 1944). To av lavartene som ble brukt i Presthegges (1944) forsøk er reinlaven, *Cladonia alperstris* og gullaven, *Cetraria nivalis* og ved senere studier har det vist seg at disse artene inneholder høye konsentrasjoner usninsyre (Laakso & Gustafsson, 1952; Rundel 1978). Usninsyre en fenolisk forbindelse som beskytter laven mot beite og UV-stråler, og kan påvirker fôrinntaket i flere drøvtyggere (Cocchietto *et al*, 2002). Disse lavartene er heller ikke fordøyelig for herbivorer som ikke har tilpasset seg de sekundære fenoliske forbindelsene i laven Laven er heller ikke lett fordøyelig for herbivorer som ikke har tilpasset de sekundære fenoliske forbindelser i lav (Presthegge 1954; Nordfelt *et al*, 1961; Jenks & Leslie 1988; Sundset *et al*, 2010).

Det finnes mange ulike fenoliske forbindelsene som produseres av de ulike lavartene. De kan påvirke mikrobene, fermenteringen og metanogenesen i vomma, men også dyrets fôropptak er stor (Benchaer *et al*, 2008). Mikrobiell detoksifisering av disse forbindelsene er ofte nødvendig for at dyrene skal kunne spise disse lavartene. Men i moskus (*Obvios moschatus*) viste detoksifiseringene seg å være like energikrevende som det drøvtyggeren sparer i form av redusert metanutslipp (White & Lawler, 2002).

De ulike faktorene som kan påvirke metanogenesen produksjon av metan vil diskuteres nærmere

### **5.3. Sekundære fenoliske metabolitter**

Det er identifisert over 200 000 sekundære fenolsike forbindelser i planter (Hartman, 2007)

Tanniner er fenoliske forbindelser som kan påvirke metanogensen, enten ved å virke hemmede på veksten av metanogenene og protozoene, eller virke inn på fermenteringen og fordøyelsen av næring i vomma, og, som kan påvirke metanogenesen (Tavendal et al, 2005; Patra & Saxena, 2009b) I motsetning til andre studier som har vist at tanniner hadde ingen effekt på metanogenesen (Beauchemin *et al*, 2007). Patra & Saxena (2009b) har funnet ut tanninene hemmer veksten av cellulolytiske bakterier og anaerob sopp, som påvirker fiberfordøyelsen. Tanniner finnes både naturlig og i syntetisk form. Det er mye tanniner i belgfrukter, korn, noen typer gress og busker. Kompakte tanniner danner komplekser med proteiner i vomma og beskytter dem fra mikrobiell nedbrytning der. Dette sørger for en mer effektiv fordøyelse av aminosyrer i løpemagen og tynntarmen (Min *et al*, 2003) Sau som fikk kompakte tanniner økte opptaket av nitrogen fra urinen, som også bidrar til proteinmetabolismen (Carulla *et al*, 2005). Så tanniner kan brukes en tilsetning til fôrtyper som inneholder mye proteiner, slik at ikke proteinene fermenteres i vomma, men føres videre til tarmen hvor en enzymatisk fordøyelse av proteiner foregår (McDonald *et al*, 2002). Detoksifisering av fenoliske forbindelser koster energi (Illius & Jessop, 1995), og drøvtyggere taper allerede 3- 9 % energi i form av metan (Blaxter & Clapperton, 1965). Vil det lønne seg for dyret å bruke energi på å detoksifisere fenoliske forbindelser i forhold til energien som går tapt i form av metan? White og Lawler (2002) viste at hos moskus er innsparingen ved reduksjonen i metanutslipp som følge av tanniner i vedaktige beiteplanter lavt sammenlignet med det det koster å detoksifisere disse antibeitestoffene, med bare 2- 3,2 % av bruttoenergiinntak (BEI). Hos sau og ku som fikk høy av god kvalitet, var produksjonen av metan 6-9 % BEI (Blaxter & Clapperton, 1965; Johnson & Ward, 1996; Woodward *et al*, 2001), og kan reduseres med så mye som 24 % ved å spise planter med et høyt innhold av kompakte tanniner (Woodward, et al, 2001). I dette studiet var metanproduksjonen 5 % av BEI på en gressbasert pelletsdiett og 2,8 % på en lavdiett, antakelig kan det lønne seg for sauen å detoksifisere sekundære forbindelser som tanniner ved å se på disse tallene.

Usninsyre er en annen fenolisk forbindelse, som lav produserer og akkumulerer. Usninsyren antibiotisk og hemmer veksten av bakterier og anaerob sopp som ikke er resistente mot denne,

og vekst av anaerob sopp (Vartia, 1949,1973; Asashina & Shibata, 1971; Brown & Mikkola, 1974). Som nevnt i innledningen beskytter usninsyren laven mot UV-stråler og beskyttelse mot herbivorer (Cocchietto *et al*, 2002; Dailey *et al*, 2008). Videre drøfting av usninsyre, se kap. 5.5.

## **5.2. Kjemisk sammensetning av diett kan påvirke metanproduksjon**

Den kjemiske næringssammensetningen i de ulike diettene kan også ha virket inn på metanproduksjonen, blant annet mengde, type karbohydrat og innhold av fordøyelige proteiner (Johnson & Johnson, 1995; Ferris *et al*, 1999). Dannelse av energirike flyktige fettsyrer bestemmer hvor mye hydrogen som metanogenene kan bruke i metanogenesen. Eddiksyre og smørsyre produserer karbondioksid og hydrogen, og på denne måten sørger de for at metan kan dannes. Fermentering av ulike karbohydrater gir ulike endeprodukter som påvirker metanogenesen. Fermentering av plantecelleveggen med mye fiber gir høyere eddiksyreproduksjon, og dette fører til høyere pH og mer metanproduksjon. Dermed større tap av energi i form av metan for vertsdyret (Moe & Tyrell, 1979; Beaver *et al*, 1989). Hvis det er vannløselige karbohydrater som fermenteres er sluttproduktet propionsyre. Propionsyre senker pH-verdien i vomma, som resulterer med en hemmet effekt på metanogenesen (Moss *et al*, 2000). Hvis man ser på det kjemiske innholdet i det pelleterte reinfôret (Tabell 1), ser man at det inneholder mer vannløselige karbohydrater enn lav (henholdsvis 5,9 % av tørrstoff og 0,1 % av tørrstoff), så dette kan ikke være en av årsakene til at sau produserer mer metan på en gressbasert pelletsdiett. Men et høyere inntak av karbohydrater i uansett form som blir fermentert, både fiber og stivelse, tyder på en redusert produksjon av metan (Johnson & Johnson, 1995). Dette samsvarer jo med resultatene fra dette studiet, da lavdietten inneholdt mer karbohydrater totalt sett enn den gressbaserte pelletsdietten (Tabell 1).

Den gressbaserte pelletsdietten inneholder ikke høye konsentrasjoner av hemicellulose som er vanskelig å fordøye, sammenlignet med lav som inneholder mye hemicellulose (Henholdsvis 32 % av tørrstoff og 78 % tørrstoff). Tidligere studier har vist at når fordøyeligheten av plantematerialet øker, øker også metanproduksjonen i vomma (Blaxter & Clapperton, 1965; Van Soest, 1994)

Det var også forskjell i proteininnholdet i de to ulike diettene, den gressbaserte pelletsdietten inneholdt 12,7 % av tørrstoff, og lavdietten inneholdt <2,6 % av tørrstoff (Tabell 3).

Mikroorganismene i vomma er avhengig av nitrogen for å danne proteiner. Det lave proteininnholdet i lavdietten kan derfor føre til en redusert mikrobiell vekst og en redusert

fermentering, som resulterer i en lav metanproduksjon i vomma. Den gressbaserte pelletsdietten inneholdt mer proteiner, som kan ha en sammenheng med høy mikrobevekst i vomma, som resulterer i en høyere fermenteringsrate og dermed mer produksjon av metan.

En annen faktor som kan påvirke metanproduksjonen er fôrbehandling. Sliping og pelletering av fôr kan føre til en reduksjon i produksjonen av metan (Blaxter, 1989). Men dette er ikke tydelig når inntaket av fôr er begrenset. Pelletering av fôret vil gi en økt passasje hastighet av fôret gjennom vomma og sannsynligvis føre til et redusert metanutslipp (Okine, 1989). I dette forsøket fikk dyrene en begrenset mengde pellets og lav, så derfor spiller kanskje ikke den nevnte faktoren en særlig viktig rolle, men det lave inntaket av fôr og fravær av strå kan ha påvirket vommiljøet ugunstig slik at metanproduksjonen er blitt lavere enn den ville vært under andre betingelser.

Som nevnt tidligere er sauen en grovfôrspiser og har små spyttkjertler i forhold til andre typer drøvtyggere, og dette kan være fordi de ikke er like avhengig av enzymer som skilles ut med spyttet, som bryter proteiner og sekundære fenoliske metabolitter i maten, før alt videreføres ned i vomma (Hofman, 1986). Kanskje dette kan være en av årsakene til at sau slipper ut mindre metan på en lavdiett. Innholdet av de fenoliske forbindelsene gjør at sauen ikke får fordøyd all maten.

#### **5.4. Interaksjoner med andre mikroorganismer**

Metanogener lever som nevnt i symbiose med protozoene, særlig ciliatene. Det kan være hele  $10^4$  metanogener per ciliat i vomma, hvor de ciliate protozoene utgjør en stor andel, opptil 50 % av den totale mikrobielle biomassen (William & Coleman, 1991). De fleste ciliater lever altså i symbiose med noen metanogener, enten eksternt eller internt (Finlay *et al.*, 1994; Tokura *et al.*, 1999). Tokura *et al.* (1997) viste at antall metanogener som lever på overflaten til ciliatene øker etter at vertedyret har spist. Dette forklarer kanskje at produksjonen av metan økte betraktelig rett etter dyrene hadde spist. En økning i produksjonen av metan er noe som ble observert etter inntak av den gressbaserte pelletsdietten i dette forsøket, men ikke når dyrene fikk lav (Figur 3). Ciliatene produserer flere substrater som er fordelaktig for metanogener, og dermed bidrar ciliatene til metanogenesen. En ciliat kan produsere 5nmol hydrogen per dag (Tokura *et al.*, 1997), og dette gir en dagsproduksjon på om lag 50 L

hydrogen i vomma hos en sau (Ushida *et al*, 1996), i tillegg produserer en ciliat 100 nmol av maursyre som gir en maursyreproduksjon på 50 mol per dag hos sau.

Ciliater kan deles inn i to grupper, som begge tilhører underklassen *Trichomatia*. «Holotrich» ciliater og entodinomorfe ciliater. Gruppene varier i egenskaper og metabolisme (Williams & Coleman, 1997). De fleste entodinomorfe ciliater kan fordøye alle plantematerialer av hovedpolysakkaridene, som cellulose, hemicellulose, pectin og stivelse (Williams *et al*, 1984; Williams & Coleman, 1988). De primære endeproduktene fra denne fermenteringen er eddiksyre, smørsyre og karbondioksid. Melkesyre og propionsyre kan også bli produsert.

«Holotrich» ciliatene kan fordøye ikkestrukturelle karbohydrater som stivelse og vannløselige karbohydrater, og endeproduktene som eddiksyre, hydrogen, karbondioksid og smørsyre. I tillegg har disse ciliatene enzymene som er nødvendig for å bryte ned begrensede mengder av hemicellulose og pectin, og i tillegg produseres det også maursyre og propionsyre (Williams *et al*, 1984; Williams & Coleman, 1988). Dette er jo en fordel, for disse ciliatene kan benytte seg av stort sett hele planten, noe som igjen vil virke inn på metanproduksjonen.

Metanogenene bruker hydrogen som protozoene har produsert, for å danne metan. Protozoene bidrar også til flere fordeler for metanogenene. De undertrykker oksygen gjennom hydrogenosomer, eller de kan fungere som et slags oppbevaringssted for metanogener som vokser langsomt (Williams & Coleman, 1997).

Dette studiet indikerer at sau slipper ut mindre metan på en lavdiett enn på en gressbasert pelletsdiett. Årsaken til dette kan jo ha med type ciliater som dominerer i sauens vom, i tillegg til tettheten av ciliater. Ut fra næringstabellen (Tabell 3) ser man at innholdet i den gressbaserte pelletsdietten inneholder mer av de fleste næringstoffene enn lav, bortsett fra hemicellulose. Dette kan tyde på at sauen kanskje har et høyere antall av «holotrich» ciliatene, som kan fermentere de fleste plantematerialene, og dermed en økt fermentering. Noe som fører til en høyere produksjon av metan.

## 5.5. Utslipp av metan fra sau sammenlignet med reinsdyr

Dette studiet indikerer at sau produserer mindre metan enn reinsdyr på begge dietter. Sau produserte  $16,7 \pm 3,03$  g CH<sub>4</sub>/ kg TSI/ dag og  $9,6 \pm 3,03$  g CH<sub>4</sub>/ kg TSI/ dag på henholdsvis en gressbasert pelletsdiett og lavdiett, og reinsdyr produserte  $22,6 \pm 2,52$  g CH<sub>4</sub>/ kg TSI/ dag på en gressbasert pelletsdiett og  $14,6 \pm 3,03$  g CH<sub>4</sub>/ kg TSI/ dag på en lavdiett (Tabell 6). Disse resultatene var ikke forventet, siden det er en rekke forskjeller mellom sau og reinsdyr, både anatomisk, fysiologisk, diettmessig, som tyder på det motsatte. Likevel er det de samme gruppene av metanogener i vomma hos de fleste drøvtyggere (Jansen & Kris, 2008; Sundset *et al*, 2009a, 2009b).

**Tabell 6.** Viser metanproduksjonen mellom sau og reinsdyr (data fra Hansen, 2012 og dette studiet) ved en gressbasert pelletsdiett og en lavdiett, målingene er utgjort under identiske betingelser.

Dyr	Gressbasert pelletsdiett		Lavdiett	
	CH <sub>4</sub> g/ kg TSI/ dag	CH <sub>4</sub> (%) av BEI	CH <sub>4</sub> g/ kg TSI /dag	CH <sub>4</sub> (%) av BEI
Reinsdyr	$25,6 \pm 2,52$	$7,6 \pm 0,7$	$14,6 \pm 3,03$	$5,1 \pm 0,9$
Sau	$16,7 \pm 3,03$	$5,0 \pm 0,86$	$9,6 \pm 3,01$	$2,8 \pm 1,0$

Anatomisk og fysiologisk sett har sauene som nevnt en stor vom og en langsom passasjetid sammenlignet med reinsdyr (Hofman, 1989). De ulike drøvtyggerne har jo evolvert seg i forhold til hva de beiter på, og dermed har anatomi og fysiologien tilpasset seg deretter.

Basert på diettmessige tilpasninger er det også store forskjeller mellom sau og reinsdyr. Reinsdyr er tilpasset en diett der lav inngår som en viktig komponent i vinterdietten, og de ser derfor ut til å tåle inntak av store mengder usninsyre (Sundset *et al*, 2010). Dette skyldes trolig mikroorganismer i reinens vom som er i stand til å detoksifisere den sekundære metabolitten, slik at de ikke hemmer fordøyelsen og forgifter dyret. Studier ved Institutt for Arktisk og Marin Biologi har vist at usninsyren nedbrytes i vomma, og blir ikke tatt opp av reinsdyret (Sunset *et al*, 2008). Dette innebærer at dyrene kan dra nytte av næringen og energien i laven (Palo 1993). Sau som ikke er tilpasset lav / usninsyre kan imidlertid ta skade ved for høyt inntak dosering med usninsyre (Dailey *et al*, 2008). Dailey *et al*. (2008) utførte en studie på sau, der sauene fikk veldig høye doser av usninsyre, 485- 647 mg/kg/ dag i 7 dager. Under forøket viste sauene tegn på smerte i abdomen, stivhet i bakbena, i tillegg til at

de ble anorekiske. Utfallet ble letalt. Det ble tatt ulike tester, og histologisk så det ut til at usninsyren verst rammet skjelettmusklene. Skjelettmusklene endret seg, myocytene svulmet opp grunnet cytoplasmisk eosinofili. I tillegg oppstod det hyperkontraksjoner og lesjoner, som også gir muskelskade. Dette tyder på at høye konsentrasjoner av usninsyre er giftig for sau og gir muskelskader, og er i verste fall dødelig. Det må nevnes at det ikke er mulig at en sau kan få i seg slike store mengder på en naturlig måte (Dailey et al, 2008). Sauene i dette forsøket fikk tilvenne seg lavdietten over tid, og de spiste en begrenset mengde lav per dag, maks inntak var 0,239 g tørrstoff. Tidligere studier har vist at denne typen lavblanding inneholder om lag 9 mg usninsyre / g tørrstoff (Sundset *et al*, 2010) slik at inntaket av usninsyre hos sauene i dette forsøket var bare 2 mg / kg tørrstoffinntak / dag, altså langt under den toksiske belastningen som ble gjort i studiet beskrevet av Dailey *et al*. (2008).

## **5.6. Utslipp av metan fra sau sammenlignet med andre drøvtyggere**

Studier har varierte metanutslipp fra forskjellige drøvtyggere (Tabell 7). Årsakene for dette kan være flere. Drøvtyggere kan deles inn i ulike grupper i forhold til hvordan deres fordøyelse og anatomi har utviklet seg med hensyn til hva de spiser (Hofman & Stewart, 1972). Både inntak og hvilken kjemisk nærings sammensetning fôret har kan ha en effekt på metanutslippet, i tillegg til den mikrobielle fermenteringen (Moe & Tyrell, 1979; Beever *et al*, 1989; Blaxter & Clapperton, 1965). Nå ser det ikke ut til at type metanogener varierer i vomma hos ulike drøvtyggere, men konsentrasjonen av disse er variert, som henger sammen med metanutslipp (Denman *et al*, 2007 ) (Tabell 2).

Det kan være vanskelig å sammenligne metanutslipp fra ulike drøvtyggere, ikke bare fordi det er ulike arter og størrelser, men også fordi målemetoden og forsøksbetingelsene er forskjellige. Grov- og gressfôrspisere ser ut til å produsere litt mer metan enn de andre drøvtyggerene. Det ser også ut til at dietter med høyt innhold av fenoliske forbindelser i dietten (lav og belgfrukt) kan ha en hemmende effekt på metanogesen.

**Tabell 7.** Viser metanutslipp fra ulike drøvtyggere, delt inn i grov- og gressfôrspisere og intermediærdrøvtyggere. Metanutslipp er regnet i CH<sub>4</sub> g / kg tørrstoffinntak. Studiene er utført ved hjelp av et respirometri (R) SF<sub>6</sub> markør teknikken på ulike dietter.

Dyr	TSI (kg) og diett	CH <sub>4</sub> (g/ kg TSI/ dag)
<u>Grov- og gressfôrspisere</u>		
Melkekyr <sup>1</sup>	13, 8 Raigras	23.3 (R) og 23.9 (SF <sub>6</sub> )
Biffkyr <sup>2</sup>	7,4 surfôr (bygg) og korn	22.5
Sau <sup>3</sup>	0,453 gressbasert pellets	16.7
	0,239 lav	9,6
Sau <sup>4</sup>	0,765 surfôr (alfalfa) og raigras	18,2 (R) og 21.0 (SF <sub>6</sub> )
<u>Intermediærdrøvtyggere</u>		
Reinsdyr <sup>5</sup>	0,434 gressbasert pellets	25,6
	0,447 lav	14,6
Geit <sup>6</sup>	0,67 fingergress og svingel	15,8
	1,11 belgfrukter med tanniner	6,6

<sup>1</sup>Grainger *et al.*, 2007, <sup>2</sup>McGinn *et al.*, 2004, <sup>3</sup>Dette studiet, <sup>4</sup>Pinares-Patiño *et al.*, 2011, Hansen ,2012, <sup>6</sup>Puchala *et al.*, 2005

## 7. KONKLUSJON

Studiene indikerer at sau på en lavdiett slipper ut mindre metan enn på en gressbasert diett, noe som muligens kan skyldes høyt innhold av sekundære fenoliske forbindelser og et lavt innhold av proteiner i lav, samt type og mengde ciliater i vomma hos sauene. Det er vanskelig å trekke konklusjoner etter dette eksperimentet, da antall forsøksdyr var lavt og de spiste bare halvparten av den tildelte fôrmengden på lavdietten. Det er av de samme grunnene vanskelig å trekke en sikker konklusjon i forhold til at sauene som er en grovfôrspiser, produserer mer metan enn en intermediær drøvtygger, som reinsdyr. Studiet tydet imidlertid på at sau



produserte mindre metan enn reinsdyr, både på en gressbasert pelletsdiett og en lavdiett. Videre studier må gjøres for å forstå dette bedre.

## 8. REFERANSER

- Aagnes TH, Mathiesen SD (1994)** Food and snow intake, body mass and rumen function in reindeer fed lichen and subsequently starved for 4 days. *Rangifer* 14:33-37
- Aagnes Utsi (1998)** Digestive strategies in reindeer in winter (*Rangifer taranadus tarandus*). Ph.d. thesis Universitetet i Tromsø, Tromsø, Norge
- Alexander G (1974)** Heat loss from sheep, In *Heat Loss from Animals and Man: Assessment and Control*, JL Monteith, Mount LE, eds, 173-203
- Backman E (1890)** Uber nicht kristallisierte flechebenfarbstoffe, ein beitrug zur chemie und anatomic der flechten. *Jahrb. Wiss. Bot* 21:1-61
- Beever DE, Cammell SB, Sutton JD, Spooner MC, Haines MJ, Harland JI (1989)** The effect of concentrate type on energy utilization in lactating cows. *Proc 11th Symp on Energy metabolism EAAP Publication No.* 43:33
- Benchaar C, Calsamiglia S, Chaves AV, Fraser GR, Colombatto D, McAllister TA, Beauchemin KA (2008)** A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Anim Feed Sch Technol* 145:209-228
- Beauchemin KA, McGinn, Martinez TF, McAllister TA (2007)** Use of condensed tannin extract quebracho trees to reduce methane emissions from cattle. *J Anim Sci* 85(8):1990-1996
- Bjerke JW, Lerfall K, Elvebakk A (2002)** Effects of ultraviolet radiation and PAR on the content of usnic and divarctic acids in two arctic-alpine lichens. *Photochem Photobiol Sci* 1:678-685
- Blaxter KL (1989)** *Energy Metabolism in Animals and Man*. Cambridge University Press.
- Blaxter KL, Clapperton JL (1965)** Prediction of the amount of methane produced by ruminants. *Br J Nutr* 19:511-522
- Bronchier-Armanet C, Boussau B, Gribaldo S, Forterre P (2008)** Mesophilic *Crenarchaeaota*: proposal for a third archaeal phylum, the *Thaumarchaeota*. *Nat Rev Microbiol* 6:245-252

- Brouwer E (1965)** Report of Sub-committee on Constants and Factors. In Energy Metabolism. European association for animal production. 11:44-443
- Brown RT, Mikkola P (1974)** The influence of fructose lichens upon the mycorrhizae and seedling growth of forest trees. *Acta Forest Fenn* 141:1-22
- Burt S (2004)** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- a review. *Int J Food Microbiol* 94:223-253
- Carulla JE, Kreutz M, Machmüller A, Hess HD (2005)** Supplementation of Acacia Mearnsii tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-feed sheep. *Aust J Agric Res* 56:961-970
- Cetin H, Tufan-Cetin O, Turk AO, Tay T, Candan M, Yanikoglu A, Sumbul H (2008)** Insecticidal activity of major lichen compounds (-) and (+) usnic acid, against the larvae of house mosquito, *Culex pipiens* L. *Parasitol Res* 102:1277-1279.
- Chaban B, Ng SYM, Jarrell KF (2006)** Archaeal habitats- from the extreme to the ordinary. *Can J Microbiol* 52:73-116
- Cheeke PR (1999)** Applied Animal Nutrition, Feeds and Feeding, Second edition, Prentice-Hall, Inc
- Chocchietto M, Skert N., Nimis PL, Sava G (2002)** A review on usnic acid, an interesting natural compound. *Naturwissenschaften* 89:137-146
- Dailey RN, Montgomery L, Ingram JT, Siemion R, Vasques M, Raisbeck MF (2008)** Toxicity of the Lichen Secondary Metabolite (+)-Usnic Acid in Domesticated Sheep. *Vet Pathol* 45:19-25
- Denman SE, Tomkins NW, McSweeney CS (2007)** Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane. *FEMS Microbiol Ecol* 62:313-322
- Dorman HJD, Deans SG (2000)** Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol* 88:308-316
- Emmerich R, Giez I, Lange OL, Proksch P (1993)** Toxicity and antifeedant activity of lichen compounds against the polyphagous herbivorous insect *Spodoptera littoralis*. *Phytochemistry* 33:1389-1394
- Evans PN, Hinds, LA, Sly LI, MCSweeney CS; Morrison M, Wright AD (2009)** Community of composition and diversity of methanogens in the foregut of the Tammar wallaby (*Macropus eugenii*). *Appl Environ Microbiol* 75: 2598-2602

- Ferris CP, Gordon FJ, Patterson DC, Porter MG, Yan T (1999)** The effect of genetic merit and concentrate proportion in the diet on nutrient utilization by lactating dairy cows. *J Agric Sci* 132:483-490
- Finlay BJ, Esteban G, Clarke KJ, Williams AG, Embley TM, Hirt RP (1994)** Some rumen ciliates have endosymbiotic methanogens. *FEMS Microbiol Lett* 117:157-161.
- Fonty G, Gouet P, Jouany JP, Senaud J (1987)** Establishment of the microflora and anaerobic fungi in the rumen of lambs. *J Gen Microbiol* 133: 1835-1843.
- Fonty G, Joblin K, Chavarot M, Roux R, Naylor G, Michallon F (2007)** Establishment and development of ruminal hydrogenotrophs in methanogen-free lambs. *Appl Environ Microbiol* 73:6391-6403
- Garcia JL, Patel BKC, Ollivier B (2000)** Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. *Anaerobe* 6:205-226
- Graninger C, Clarke T, Auldlist MJ, Beauchemin KA, McGinn SM, Waghorn GC, Eckard JR (2009)** Mitigation of greenhouse emissions from Dairy cows measured Using a the Sulfur Hexfluoride (SF<sub>6</sub>) Tracer and Chamber Techniques. *J Dairy Sci* 90:2755-2766
- Green MJB (1987)** Diet composition and quality in Himalayan musk deer based on fecal analysis. *J Wildlife Manag* 51:880-892
- Hansen KK (2012)** Methane emissions from reindeer. Do reindeer fed lichens emit less methane than reindeer on a pelleted feed diet? Masteroppgave, Universitetet i Tromsø, Tromsø, Norge
- Hartman T (2007)** From wasteproducts to ecochemicals: fifty years of reseach of plant secondary metabolism. *Phytochem* 68:2831-2846
- Hesbacher S, Baur B, Baur A, Proksch P (1995)** Sequestration of lichen compounds by three speices of terrestrial snail. *J Chem Ecol* 21:233-246
- Hofman RR (1989)** Evolutionary steps of ecophysiological adaption and dieversification of ruminants: a comparative view of their digestive system. *Oecologia* 78:443-457
- Hofman S, Stewart DRM (1972)** Grazer or browser: A classification based on the stomach structure and feeding habits of East African ruminants. *Mammalia* 36:226-240
- Hofman RR, Streich JS, Fickel J, Hummel J, Clauss M (2008)** Convergent Evolution in Feeding Types: Salivary Gland Mass Differences in Wild Ruminants speicies. *Journal of Morphology* 269:240-:257
- Hook SE, Northwood KS, Wright ADG, McBride BW (2009)** Long-term monensin supplementation does not significantly affect the quantity or diversity of methanogens in the rumen of the lactating dairy cow. *Appl Environ Microbiol* 75:374-380

- Hungate RE, Smith W, Bauchop T, Yu I, Rabinowitz JC (1970)** Formate as an intermediate in the bovine rumen fermentation. *J Bacteriol* 102:389-397
- Ihl C, Klein DR (2001)** Habitat and diet selection by muskoxen and reindeer in western Alaska. *J Wildlife Manag* 65:964-972
- Ingolfsson K (2009)** Molecules of interest: usnic acid. *Phytochemistry* 61:729-736
- IPCC (2001)** Technical summary. In: *Climate Change 2001: The Scientific Basis*. Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, 21-83
- IPCC (1992)**. Intergovernmental Panel on Climate Change. *Climate Change 1992*. The supplementary report to the IPCC Scientific Assessment. Cambridge University Press
- Janssen PH, Kris M (2008)** Structure of the archaeal community of the rumen. *Appl Environ Microbiol* 74:3619-3625
- Jenks JA, Leslie DM (1988)** Effect of lichen and in vitro methodology on digestibility of winter deer diets in Maine, *Can Field Nat* 102:216-220
- Jeyanathan J, Kirs M, Ronimus RS, Hoskin SO, Janssen PH (2011)** Methanogen community structure in the rumens of farmed sheep, cattle and red deer fed different diets. *FEMS Microbiol Ecol* 1-16
- Joblin KN (1999)** Ruminal acetogens and their potential to lower ruminant methane emissions. *Aust J Agric Res* 50:1307-1313
- Johnson DE, Ward GM (1996)** Estimates of animal methane emissions. *Environ Monit Assess* 42:532-546
- Johnson KA, Johnson DE (1995)** Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science* 73:2483-2492
- Klein DR (1982)** Fire, lichens and caribou. *J Range Manag* 35:390-395.
- Koutsoyiannis D (2012)** Clausius-Clapeyron equation and saturation vapour pressure: simple theory reconciled with practice. *European Journal of Physics* 33 2:295-305
- Laakso PV, Gustavson M (1952)** The colorimetric determination of usnic acid in the lichen *Cladonia stellaris*. *Suomen Kemistilehti* 25:7-10
- Le Van TD, Robinson JA, Ralph J, Greening RC, Smolenski WJ, Leedle JA, Schaefer DM (1998)** Assessment of reductive acetogenesis with indigenous ruminal bacterium populations and *Acetivibrio ruminis* *Appl Environ Microbiol* 64:3429-3436

- Lin C, Raskin L, Stahl DA (1997)** Microbial community structure in gastrointestinal tracts of domestic animals: Comparative analyses using rRNA-targeted oligonucleotide probes. *FEMS Microbiol Ecol* 22: 281-294
- Liu H, Vaddela V, Zhou D (2011)** Effects of chestnut tannins and coconut oil on growth performance, methane emissions, ruminal fermentation and microbial populations in sheep. *J Dairy Sci* 94:6069-6077
- Liu Y, Whitman WB (2008)** Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic archaea. *Ann NY Acad Sci.* 1125:171-189
- Løvås GG (2004)** Statistikk for universiteter og høyskoler. 2 utgave. Universitetsforlaget, Oslo
- Mathiesen SD, Haga ØE, Kaino T, Tyler NJC (2000)** Diet composition, rumen papillation and maintenance of carcass mass in female Norwegian reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*) in winter. *J Zool Lond* 251:129-138
- McAllister TA, Newbold CJ (2008)** Redirecting rumen fermentation to reduce methanogenesis. *Aust J Exp Agric* 48:7-17
- McDonald PE, Edwards RA, Greenhalgh JFD, Morgan CA, Sinclair LA, Wilkinson RG (2002)** Animal nutrition. 7eds, Glasgow
- McGinn SM, Beachemin KA, Coates T, Colombatto D (2004)** Methane emissions from beef cattle: Effect of monensin, sunfloweroil, enzymes, yeast and fumaric acid. *J Anim Sci* 11:3346-3356
- Min BR, Barry TN, Attwood GT, McNabb WC (2003)** The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. *Anim Feed Sci Technol* 106:3-19
- Moe PW, Tyrell HF (1979)** Methane production in dairy cows. *J Dairy Sci* 66:1042
- Morvan B, Dore J, Rieu-Lesme F, Foucat L, Fonty G, Gouet P (1994)** Establishment of hydrogen-utilizing bacteria in the rumen of the newborn lamb. *FEMS Microbiol Lett* 117: 249-256
- Moss AR, Jouany J-P, Newbold CJ (2000)** Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Ann Zootechnol* 49:231-235
- Mountfort DO, Asher RA, Bauchop T (1982)** Fermentation of cellulose to methane and carbon dioxide by a rumen anaerobic fungus in a triculture with *Methanobrevibacter* sp. Strain RA1 and *Methanosarcina barkeri*. *Appl Environ Microbiol* 44:128-134
- Murray RM, Bryant AM, Leng RA (1976)** Rates of production of methane in the rumen and large intestine in sheep. *Brit J Nutr* 36:1-14

- Murray PJ, Moss A, Lockyer DR, Jarvis SC (1999)** A comparison of systems for measuring methane emissions from sheep. *J Agric Sci Camb* 133:439-444
- Nash TH III (1996)** Photosynthesis, respiration, productivity and growth. In: Nash TH III (ed) *Lichen biology*
- NIR (National Inventory Report)** Department of Industry (2003). Greenhouse gas emissions in Norway 1990-2001. ISBN 82-7655-219
- Nordfelt S, Cagell W, Nordkvist M (1961)** Smältbarhetsforsk med renar. Öjebyn 1957-1960. Statens Husdjursförsök Särtryck och föhandsmeddelande 151
- Ohene-Adjei S, Teather RM, Ivan M, Forster RJ (2007)** Postinoculation protozoan establishment and association patterns of methanogenic archaea with plant extract supplementation. *Microb Ecol* 56:234-242
- Okine EK, Mathison GW, Hardin RT (1989)** Effects of changes in frequency of reticular contractions on fluid and particulate passage rates in cattle. *J Anim Sci* 67:3388
- Palo RT, Lundberg P (1992)** Efficacy of digestibility inhibitors in plants and pattern of food selection by browsers. *Proceeding Ongules/ Ungulates* 91:147-149
- Patra AK, Saxena J (2009b)** Dietary phytochemicals as rumen modifiers: as a review of the effects on microbial populations. *Anton.van Leeuwen* 96:363-375
- Patra AK, Saxena J (2010)** A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry* 71:1198-1222
- Pei CX, Mao S, Zhu W (2008)** Molecular diversity of rumen Archaea from Jinnan cattle (in Chinese). *Weng Sheng Wu Xue Bao* 48:8-14
- Pei CX, Mao SY, Cheng YF, Zhu WY (2010)** Diversity, abundance and novel 16S rRNA gene sequences of methanogens in rumen liquid, solid and epithelium fractions of Jinnan cattle. *Animal* 4:1-10
- Pinares-Patiño CS, Lassey KR, Martin RJ, Molano G, Fernandez M, MacLean S, Sandoval E, Luo D, Clark H (2011)** Assessment of the sulphur hexafluoride (SF<sub>6</sub>) tracer technique using respiration chambers estimation of methane emissions from sheep. *Anim Feed Sci Tech* 166-167:201-209
- Presthegge K (1944)** Nye forsøk med lav som for. Særtrykk av "Norsk Landbruk" 10. nr. 35-36:208-212
- Presthegge K (1954)** Experiments with lichens for ruminants and swine. *Beretr Norg Lanbr Høisk Føringforsøk*. NO 76:1-87

- Provenza FD, Malechek JC (1984)** Diet selection by domestic goats in relation to the blackbrush twig chemistry. *J Appl Ecol* 21:831-841
- Puchala R, Min BR, Goetsch AI, Sahlu T (2005)** The effect of a condensed tannin-containing forage on methane emission by goats. *J Anim Sci* 83:182-186
- Regensbogenova M, McEwan NR, Javorsky P, Kisidayova S, Michalowski T, Newbold CJ, Hackstein JH, Pristas P (2004)** A re-appraisal of the diversity of the methanogens associated with the rumen ciliates. *FEMS Microbiol Lett* 238:307-313
- Rundel PW (1978)** The ecological role of secondary lichen substances. *Biochem Syst Ecol* 6:157-170
- Selmer-Olsen I (2009)** Klimagasser og kjøttproduksjon på storfe. [www.grovfornett.no](http://www.grovfornett.no)
- Sharp R, Ziemer CJ, Stern MD, Stahl DA (1998)** Taxon-specific associations between protozoal and methanogen populations in the rumen and a model rumen system. *FEMS Microbiol Ecol* 26:71-78
- Shin EC, Choi BR, Lim WJ, Hong SY, An CL, Cho KM, Kim YK, An JM, Kang JM, Lee SS, Kim H, Yun HD (2004)** Phylogenetic analysis of archaea in three fractions of cow rumen based on the 16 rDNA sequence. *Anaerobe* 10:313-319
- Simmons P, Carol Ekarius (2001)** *Storey's Guide to Raising Sheep*. North Adams, MA: Storey Publishing LLC. ISBN 978-1-58017-262-2
- Sirohi SK, Pandey N, Singh B, Pungia AK (2010)** Rumen Methanogens: a review. *Indian J Microbiol* 50:253-262
- Sivertsen T (2008) Stor forskjell i opptak av kobber, [www.fag.nsg.no](http://www.fag.nsg.no)
- Skillman LC, Evans PN, Strompl C, Joblin KN (2006)** 16S rDNA directed PCR primers and detection of methanogens in the bovine rumen. *Lett Appl Microbiol* 42:222-228
- Storeheier PV (2003)** Food intake and forage utilization in reindeer during winter. Ph.d thesis. Universitetet i Tromsø, Tromsø, Norge
- Sundset MA, Barboza PS, Green TK, Folkow L, Blix AS, Mathiesen SD (2010)** Microbial degradation of usnic acid in the reindeer rumen. *Die Naturwissenschaften* 97:237-278
- Sunset MA, Edwards JE, Cheng YF, Senosiain RS, Fraile MN, Northwood KS, Praesteng KE, Glad T, Mathiesen SD, Wright AD (2009a)** Molecular diversity of rumen microbiome of Norwegian reindeer on natural summer pasture. *Microb Ecol* 57:335-348
- Sunset MA, Edwards JE, Cheng YF, Senosiain RS, Fraile MN, Northwood KS, Praesteng KE, Glad T, Mathiesen SD, Wright AD (2009b)** Rumen microbial diversity in Svalbard reindeer, with particular emphasis on methanogenic archaea. *FEMS Microb Ecol*

70:553-562

- Sundset MA, Kohn A, Mathiesen SD, Præsteng KE (2008)** *Usneabacteria rangiferia*, a novel usnic-acid resistant bacterium isolated from the reindeer rumen. *Die Naturwissenschaften* 95:741-749
- Suzuki T, McCrabb GJ, Nishida T, Indramanee S, Kurihara M (2007)** Construction and operation of ventilated hood-type respiration calorimeters for *in vivo* measurement of methane production and energy partition in ruminants. In Makkar HPS, Vercoe PE (eds.). *Measuring Methane Production from Ruminants*, IAEA 8:125-135
- Tan HT, Siew CC, Abdullah N, Liang JB, Huang XD, Ho YW (2011)** Effects of tannins from *Leucaena* on methane production, rumen fermentation and populations of methanogens and protozoa *in vitro*. *Anim Feed Sci Technol* 169:185-193
- Tajima K, Nagamine T, Matsui H, Nakamura M, Aminov RI (2001b)** Phylogenetic analysis of archaeal 16S rRNA libraries from the rumen suggests the existence of a novel group of archaea not associated with known methanogens. *FEMS Microbiol Lett* 200:67-72
- Tavendale MH, Meagher LP, Pacheco D, Walker N, Attwood GT, Sivakumaran S (2005)** Methane production from *in vitro* rumen incubations with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa*, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. *Anim Feed Technol* 123-124, 403-419
- Thomas DC, Kroeger P, Herviux D (1984)** *In vitro* digestibilities of plants utilized by barren-ground caribou. *Arcic* 37:31-26
- Tokura M, Ushida K, Miyazaki K, Kojima Y (1997)** Methanogens associated with rumen ciliates. *FEMS Microbiol Ecol* 22:137-143
- Tokura M, Chagan I, Ushida K, Kojima Y (1999)** Phylogenetic study of methanogens associated with rumen ciliates. *Curr Microbiol* 39:123-128.
- UNFCCC (2006)** Greenhouse Gas Inventory Data. Available at: [unfccc.int/2860.php](http://unfccc.int/2860.php).
- Ushida K, Tokura M, Itabashi H, Takenaka A (1996)** Ciliate protozoa and ruminal methanogenesis. In: Onodera R, Itabashi H, Ushida K, Yano H, Sasaki Y (eds) *Rumen microbes and digestive physiology in ruminants*. Japan Scientific Society Press/ Karger, Tokyo 209-220
- Van Soest PJ (1992)** *Nutritional Ecology of the Ruminant*. Cornell University Press, Ithaca, NY
- Vartia KO (1949)** Antibiotics in lichens. *Ann Med Exp Biol Fenn* 27:46-54
- Vartia KO (1973)** Antibiotics in lichens. In: Ahmadjian, ME Hale (eds) *The lichens*, Academic Press 547-561



- White RG, Bunnell FL, Gaare E, Skogland T, Hubert B (1981)** Ungulates on arctic ranges. In Bliss, LC Heal, OW Moore, JJ (eds), *Tundra ecosystems: a Comparative Analysis*, Cambridge University Press 25:397-483
- White RG, Lawler JP (2002)** Can methane suppression during digestion of woody and leafy browse compensate for energy costs of detoxification of plant secondary compounds? A test with muckoxen fed willows and birch. *Comp Biochem and Phys Part A* 133:849-859
- Withford MF, Teather RM, Forsters RJ (2001)** Phylogenetic analysis of methanogens from the bovine rumen. *BMC Microbiol* 1:5
- Williams AG, Coleman GS (1997)** The Rumen Protozoa. In *The Rumen microbial ecosystem* (Hobson PN, Stewart CS, eds), pp 73-139. Chapman & Hall, London
- Williams YJ, Popovski S, Rea SM, Skillman LC, Toovey AF, Northwood KS, Wright AD (2009)** A vaccine against rumen methanogens can alter the composition of archaeal populations. *Appl Environ Microbiol* 75:1860-1866
- Woodward SL, Waghorn GC, Ulyatt M, Lassey KR (2001)** Early indications that Lotus will reduce methane emissions from ruminants. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal production* 61:23-26
- Woese C, Kandler O, Wheelis M (1990)** Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 (12):4576-9.
- Wolin MJ, Miller TL, Stewart CS (1997)** Microbe-microbe interactions. In *The rumen microbial ecosystem* (Hobson PN, Stewart CS, eds) pp 10-72. Chapman & Hall, London
- Wright AD, Williams AJ, Winder B, Christophersen CT, Rodgers SL, Smith KD (2004b)** Molecular diversity of rumen methanogens from sheep in Western Australia. *Appl Environ Microbiol* 70:1263-1270
- Wright AD, Toovey AF, Pimm CL (2006)** Molecular identification of methanogenic archaea from sheep in Queensland, Australia reveal more uncultured novel archaea. *Anaerobe* 12:134-139
- Wright AD, Auckland CH, Lynn DH (2007)** Molecular diversity of methanogens in feedlot cattle from Ontario and Prince Edward Island, Canada. *Appl Environ Microbiol* 73:4206-4210
- Wright AD, Ma X, Obispo NE (2008)** Methanobrevibacter phylotypes are the dominant methanogens in sheep from Venezuela. *Microb Ecol* 56:390-394
- Yanagita K, Kamagata Y, Kawaharasaki M, Suzuki T, Nakamura Y, Minato H (2000)** Phylogenetic analysis of methanogens in sheep rumen ecosystem and detection of

*Methanomicrobium mobile* by fluorescence *in situ* hybridization. Biosci Biotechnol  
Biochem 64:1737-1742

**Zhou M, Hernandez-Sanabria E, Guan LL (2009)** Assessment of microbial ecology of  
ruminal methanogens in cattle with different feed efficiency. Appl Environ Microbiol  
75:6524-6533

**Zukal H (1895)** Morphologische und biologische untersuchungen uber die flechten. Sber K  
Böhm Ges Wiss Math-Nat Kl 104:1303-1395