



GLOBAL STANDARD FOR LIVESTOCK DATA

Część 20 - Rejestrowanie emisji metanu przez bydło mleczne na potrzeby oceny genetycznej

Wersja: czerwiec 2020

Oficjalna, zatwierdzona przez ICAR, jest wyłącznie wersja angielska Wytycznych dostępna [tutaj](#).

Spis treści

Spis treści.....	2
1 Wstęp	4
2 Zastrzeżenie.....	7
3 Definicje i terminologia	8
4 Zakres	9
5 Czynniki determinujące metan.....	10
5.1 Dieta i mikroflora żwacza	10
5.2 Genetyka gospodarza, fizjologia i środowisko	13
6 Metody pomiaru metanu	17
6.1 Komory oddechowe	18
6.2 Przenośne komory akumulacyjne	21
6.3 SF6	21
6.4 Pobieranie próbek oddechu podczas doju i karmienia	23
6.5 GreenFeed	23
6.6 Laserowy detektor metanu	24
7 Omówienie metod.....	25
7.1 SF6 vs. komora oddechowa.....	25
7.2 Pobieranie próbek oddechu podczas doju i karmienia (- vs komora oddechowa)	25
7.3 NDIR vs LMD	27
7.4 GreenFeed	27
7.5 Laserowy detektor metanu	28
8 Porównanie metod pomiaru metanu.....	28
8.1 Korelacje między metodami	28
8.2 Plusy i minusy urządzeń.....	32
9 Wskaźniki pośrednie.....	38
9.1 Wprowadzenie	38
9.2 Dostępne wskaźniki pośrednie	38
9.3 Łączenie wskaźników pośrednich metanu	43
9.4 Budowanie indeksu dla metanu	46
10 Dyskusja na temat wskaźników pośrednich.....	47
10.1 Łączenie pomiarów opartych na diecie z innymi wskaźnikami pośrednimi emisji metanu..	47
10.2 Żwacz	48
10.3 Pierwotniaki i inne drobnoustroje żwaczowe	49
10.4 Geny drobnoustrojów w żwaczu	50
10.5 Wskaźniki pośrednie oparte o pomiary w mleku	50
11 Wnioski.....	53
12 Scalanie i udostępnianie danych w ocenach genetycznych	54
13 Zalecenia.....	55
14 Podziękowania.....	55
15 Literatura.....	57

Summary of Changes

Date of Change	Nature of Change
March 2020	Draft from Feed & Gas WG put into standard template for ICAR Guidelines. Separate out EDGP database to become as standalone appendix.
April 2020	Edits and acknowledgements added by Feed & Gas WG.
May 2020	Approved by ICAR Board on 26 th May subject to addition of disclaimer. Disclaimer added as new chapter 2 - the fact specific device manufacturers are mentioned in these guidelines is in no way an endorsement of the devices or their accuracy by ICAR.

1 Wstęp

W okresie ostatnich dziesięcioleci wzrost produkcji mleka za pomocą zarządzania i genetyki znacznie poprawił wydajność żywienia i obniżył koszty na jednostkę produktu. Jednak systemy produkcji mleka wiążą się również z kosztami środowiskowymi (Baskaran i in., 2009), przy czym emisje metanu (CH_4) związane z fermentacją drobnoustrojów w żwaczu są ważnym czynnikiem przyczyniającym się do globalnej emisji gazów cieplarnianych (GHG), a także możliwą do uniknięcia stratą energii, która w innym przypadku mogłaby zostać przeznaczona na produkcję mleka. Sektor produkcji zwierzęcej jest odpowiedzialny za 14,5% globalnej emisji gazów cieplarnianych (Gerber i in., 2013); było mleczne odpowiada za 18,9% tych emisji, głównie w postaci emisji jelitowego CH_4 (van Middelaar i in., 2014).

Metan jest gazem cieplarnianym o potencjale globalnego ocieplenia 28 razy większym niż CO_2 (Myhre i in., 2013). Metan pochodzący od przeżuwaczy jest wytwarzany podczas fermentacji drobnoustrojowej w żwaczu i jelitach (jelitowy CH_4) oraz z rozkładu obornika. Jelitowy CH_4 przyczynia się do 80% emisji CH_4 przez przeżuwacze, a rozkład obornika stanowi 20%. Jelitowy CH_4 odpowiada za 17% globalnej emisji CH_4 i 3,3% całkowitej światowej emisji gazów cieplarnianych pochodzących z działalności człowieka (Knapp i in., 2014). Istnieje zatem duże zainteresowanie badaniami, aby znaleźć sposoby na ograniczenie emisji jelitowego CH_4 przez przeżuwacze.

Zwierzęta przeżuwające mają układ trawienny przystosowany do wydajnego trawienia materiałów roślinnych. Jak większość ssaków, przeżuwacze nie mają enzymu celulazy wymaganego do zerwania wiązań beta-glukozy w celulozie, ale żywią się różnorodnymi populacjami drobnoustrojów żwacza, które mogą trawić celulozę i inne składniki roślinne. Kiedy bakterie żwaczowe, pierwotniaki i grzyby fermentują węglowodany i białka materiałów roślinnych, wytwarzają lotne kwasy tłuszczowe, głównie octan, propionian i maślan. Diety bogate w błonnik sprzyjają syntezie octanu. Syntezie octanu i maślanu towarzyszy uwolnienie metabolicznego wodoru, który, jeśli zostanie dopuszczony do gromadzenia się w płynie żwaczowym, ma negatywny wpływ na wzrost

drobnoustrojów i strawność paszy (Janssen, 2010). Archeony żwaczowe to mikroorganizmy, które łączą metaboliczny wodór z CO₂ w celu wytworzenia CH₄ i wody. Archeony odgrywają istotną rolę w ochronie żwacza przed nadmiarem metabolicznego wodoru, a wytwarzany przez niego CH₄ jest nieuniknionym produktem fermentacji żwacza.

Zdefiniowano wiele fenotypów CH₄ (Hellwing i in., 2012); najczęściej stosowana jest produkcja CH₄ (MeP) w litrach lub gramach na dzień.

Cecha produkcji CH₄ jest silnie skorelowana z pobieraniem paszy (Basarab i in., 2013; De Haas i in., 2017), a zatem z ostateczną cechą celu hodowlanego: produkcją mleka u bydła mlecznego. Wartość ekonomiczna dziennego pobierania suchej masy i związana z nią emisja metanu u bydła mlecznego pokazała, że zwiększenie szacowanej wydajności hodowlanej o jedną jednostkę hodowlaną (tj. 1 kg bardziej efektywnie przetworzonego DMI podczas pierwszej laktacji krowy) przekłada się na całkowitą oszczędność życiową wynoszącą 3,23 kg w DMI i 0,055 kg w metanie (Richardson i in., 2019). Wydajność żywienia została zdefiniowana jako wzrost o 1 kg bardziej wydajnie stosowanej paszy u krowy w pierwszej laktacji. Wyniki te pokazują nie tylko związek między produkcją DMI i CH₄, ale także związek ekonomiczny między tymi cechami. Stwierdzono, że trwałość laktacji jest pozytywnie związana ze zwiększoną wydajnością żywienia oraz zmniejszoną produkcją i intensywnością metanu. Wydajność żywienia związana była z niższą intensywnością metanu. Wydajność żywienia i emisję metanu można poprawić, wybierając mniejsze bydlę mleczne o zwiększonej wytrzymałości laktacji. Wydajność i emisję metanu można jeszcze poprawić poprzez lepsze zarządzanie oceną kondycji i przedłużenie laktacji poza konwencjonalną długość 305 dni (Seymour, 2019). Według Ellisa i in. (2007), DMI przewidywało MeP z R² równym 0,64, a pobieranie ME (MJ / d) przewidywało MeP z R² równym 0,53 dla bydła mlecznego. Alternatywa definicje fenotypów obejmują intensywność CH₄ (MeI), która jest zdefiniowana jako litry lub gramy CH₄ na kg mleka, i wydajność CH₄ (MeY), która jest zdefiniowana jako litry lub gramy CH₄ na kg pobrania suchej masy (DMI) (Moate i in., 2016). Resztkową produkcję CH₄ (RMP) oblicza się

jako obserwowana minus przewidywana produkcja CH₄ (Herd i in., 2014, Berry i in., 2015), z przewidywanymi wartościami opartymi na czynnikach takich jak produkcja mleka, masa ciała i pobieranie paszy. W tej chwili nie jest oczywiste, którego z tych fenotypów używać; ale ważne jest monitorowanie związków między wybranym fenotypem CH₄ a innymi ważnymi cechami celu hodowlanego (np. produkcja, płodność, długowieczność), aby uniknąć niekorzystnych konsekwencji. Berry i Crowley (2012) opisują zalety i ograniczenia cech racji żywieniowych. Na przykład, ponieważ cechy wydajności żywienia są liniową kombinacją innych cech, nie zaleca się włączania ich do ogólnego indeksu „total merit”, co jest wyraźnym ograniczeniem. Do wszystkich zastosowań konieczne jest indywidualne zmierzenie emisji CH₄ każdego zwierzęcia. Niniejsze wytyczne mają na celu dokonanie właściwych wyborów w tym zakresie.

Chociaż zmiany diety i dodatki paszowe mogą być skutecznymi strategiami łagodzenia emisji CH₄ (Beauchemin i in., 2009; Martin i in., 2010; Hristov i in., 2013), ich skutki zależą od dalszego stosowania określonej diety lub dodatku i pojawiają się problemy z dostosowaniem mikrobiomów żwacza do dodatków. Społeczności bakteryjne w żwaczu są bardzo dynamiczne po zmianie diety i nie ustabilizowały się w ciągu 5 tygodni od wypasu krów (Bainbridge i in., 2016). Natomiast hodowla w celu zmniejszenia emisji CH₄ powinna doprowadzić do trwałej i skumulowanej redukcji emisji (Wall i in., 2010). Kilka badań wykazało, że emisje CH₄ przez przeżuwacze mają składnik genetyczny, a ich odziedziczalność mieści się w zakresie 0,20 - 0,30 (de Haas i in., 2011; Donoghue i in., 2013; Pinares-Patino i in., 2013, Kandel i in. ., 2014A, B; Lassen i Lovendahl, 2016; Lopez-Paredes i in. 2020). Hodowla w celu zmniejszenia emisji CH₄, sama lub w połączeniu z innymi strategiami łagodzenia, mogłaby zatem być skuteczna w zmniejszaniu wpływu hodowli bydła na środowisko, a być może także w zwiększaniu wydajności żywienia. Taki program hodowlany wymagałby, jako podstawowego punktu wyjścia, dokładnych pomiarów indywidualnych emisji CH₄ na dużą skalę.

Opracowano kilka technik pomiaru emisji CH₄ przez przeżuwacze, z różnym

stopniem dokładności (patrz przeglądy Cassandro i in., 2013 i Hammond i in., 2016A), ale rutynowe indywidualne pomiary na dużą skalę (wymagane dla selekcji genetycznej) okazały się trudne do uzyskania i kosztowne w przeprowadzaniu pomiarów (Pickering i in., 2015; Negussie i in., 2016). Dlatego identyfikacja wskaźników pośrednich (tj. wskaźników lub cech pośrednich), które są skorelowane z emisjami CH₄, ale których rejestrowanie na dużą skalę jest łatwe i stosunkowo tanie, byłoby pożądaną alternatywą. Wskaźniki pośrednie mogą być mniej dokładne, ale mogą być mierzone wielokrotnie w celu zmniejszenia przypadkowego zakłócenia i w znacznie większych populacjach.

Wytyczne te zawdzięczają wiele publikacji Garnsworthy i in. (2019). W tym artykule porównano metody pomiaru CH₄ ze szczególnym uwzględnieniem oceny genetycznej bydła mlecznego.

2 Zastrzeżenie

Fakt, że w niniejszych wytycznych wymieniono konkretnych producentów urządzeń, w żaden sposób nie stanowi poparcia przez ICAR dla tych urządzeń ani dla ich dokładności.

3 Definicje i terminologia

Tabela 1 zawiera listę ważnych definicji terminów i skrótów używanych w niniejszych wytycznych.

Tabela 1. Definicje terminów używanych w niniejszych wytycznych.

Termin	Definicja
ADF	Kwasowe włókno detergentowe (<i>Acid detergent fibre</i>)
ADL	Lignina
BCS	Ocena punktowa kondycji (<i>Body condition score</i>)
CH ₄	Metan
CV	Współczynnik wariacji (<i>Coefficient of variation</i>)
DIM	Dni doju (<i>Days in milk</i>)
DMI	Pobranie suchej masy (<i>Dry matter intake</i>)
DMPR	Dzienny wskaźnik produkcji metanu (<i>Daily methane production rate</i>)
EE	Ekstrakt eterowy (<i>Ether extract</i>)
Metan jelitowy (<i>Enteric Methane</i>)	Metan wytworzony przez przeżuwacze hodowlane podczas fermentacji drobnoustrojowej w żwaczu i jelitach
EOBC	Olejki eteryczne i ich związki bioaktywne (<i>Essential oils and their bioactive compounds</i>)
FTIR	Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (<i>Fourier-transform infrared</i>)
GE	pobór energii brutto
GHG	Gaz cieplarniany (<i>Greenhouse gas</i>)
LMD	Laserowy detektor metanu (<i>laser methane detector</i>)
ME	Energia metaboliczna (<i>Metabolizable energy</i>)
Mel	Intensywność CH ₄ (<i>intensity</i>)
MeP	Produkcja CH ₄ (litry lub gramy na dzień
MeY	Wydajność CH ₄ (<i>yield</i>)
MIR	Spektroskopia mleka w średniej podczerwieni (<i>milk mid-infrared spectroscopy</i>)
NDF	Neutralne włókno detergentowe (<i>Neutral detergent fibre</i>)
NDIR	Niedispersyjna podczerwień (<i>Nondispersive Infrared</i>)
PAC	Przenośne komory akumulacyjne (<i>Portable accumulation chambers</i>)
PAIR	Podczerwień fotoakustyczna (<i>photoacoustic infrared</i>)

Termin	Definicja
Proxy	Nie sam metan, ale substancja umożliwiająca pośredni pomiar poziomów metanu - łatwa, tania, dokładna, ilościowa
PY	Wydajność białka (<i>protein yield</i>)
RMP	Produkcja resztkowego CH ₄ (<i>Residual CH₄ production</i>)
RMPR	Wskaźnik produkcji resztkowego metanu
RMSPE	Błąd przewidywania średniej kwadratowej (<i>Root mean square prediction error</i>)
SF6	Technika gazu znakującego SF6 (<i>SF6 tracer gas technique</i>)
TMR	Mieszanka pełnoporcjowa (<i>Total mixed ration</i>)
VFA	Lotny Kwas Tłuszczowy (<i>Volatile Fatty Acid</i>)
Ym	Współczynnik konwersji metanu (<i>Methane conversion rate</i>)

Załącznik 1 do niniejszych wytycznych ([tutaj](#)) zawiera informacje o bazie danych EDGP, w tym przykłady struktury przechowywania danych.

4 Zakres

Opracowywane i stosowane są różnorodne technologie pomiaru emisji CH₄ od pojedynczych krów mlecznych w różnych warunkach środowiskowych, o czym świadczą częste przeglądy publikacji (Storm i in., 2012; Cassandro i in., 2013; Hammond i in., 2016A; de Haas i in., 2017). Pierwszym celem obecnych wytycznych jest przegląd i porównanie przydatności metod do pomiarów na dużą skalę produkcji CH₄ od pojedynczych zwierząt, które mogą być łączone z innymi bazami danych na potrzeby oceny genetycznej. Porównania obejmują ocenę dokładności, precyzji i korelacji między metodami. Łączenie zbiorów danych z różnych krajów i ośrodków badawczych może być skuteczną strategią umożliwiającą postęp genetyczny w tej trudnej do zmierzenia cechy, jeśli metody są skorelowane (de Haas i in., 2017). Ważna jest dokładność i precyzja metod. Dane z różnych źródeł muszą być odpowiednio ważone lub korygowane po połączeniu, więc dowolne metody można łączyć, jeśli są odpowiednio skorelowane z „prawdziwą” wartością. Drugim celem obecnych wytycznych jest zatem zbadanie korelacji między wynikami uzyskanymi różnymi metodami, ostatecznie prowadząc do oszacowania granic ufności dla wyboru poszczególnych zwierząt, które są emiterami wysokich lub niskich wartości

(patrz także Garnsworthy i in., 2019).

5 Czynniki determinujące metan

5.1 Dieta i mikroflora żwacza

Tabela 2 zawiera listę czynników dietetycznych lub mikrobiotycznych, które determinują produkcję CH₄.

Tabela 2. Czynniki determinujące metan związane z dietą i mikroflorą żwacza.

Czynniki	Literatura
<p>Głównymi determinantami codziennej produkcji metanu są spożycie suchej masy i skład diety: im więcej spożywanej paszy i / lub im większa zawartość błonnika w diecie, tym więcej metanu jest wytwarzane dziennie. Jednak na jednostkę DMI i na jednostkę wydajności tłuszczu + białka dieta oparta na trawie wytwarzała mniej jelitowego CH₄ na krowę niż dieta TMR .</p> <p>Podjęcia żywieniowe do łagodzenia wydzielania metanu obejmują zmniejszenie stosunku kiszonki do koncentratu w diecie, zwiększenie zawartości oleju w diecie oraz włączenie do diety modyfikatorów żwacza i inhibitorów metanu.</p>	<p>Beauchemin et al., 2009; Cottle et al., 2011; Knapp et al., 2014; O'Neill et al., 2011; Sauvant et al., 2011</p>
<p>Na wydajność metanu na kg produktu wpływa głównie wydajność mleka krowiego lub tempo wzrostu oraz czynniki na poziomie stada, takie jak płodność, zapadalność na choroby i wskaźnik reprodukcji w stadzie.</p>	<p>Garnsworthy, 2004</p>
<p>Wydzielanie metanu różni się znacznie między poszczególnymi zwierzętami. W przypadku zwierząt karmionych tą samą paszą współczynnik wariacji (CV) między zwierzętami w metanie wyniósł 8,1%.</p>	<p>Blaxter and Clapperton, 1965</p>
<p>Ilość zjedzonych strawnych składników pokarmowych, zwłaszcza frakcji węglowodanowej (skrobi, cukru, pozostałości wolnych od N), jest wiarygodna do oszacowania uwalniania CH₄ z dużą precyzją. Ponadto diety bogate w tłuszcz zmniejszały tworzenie CH₄ w żwaczu.</p>	<p>Jentsch et al., 2007</p>

Czynniki	Literatura
DMI było również najważniejszym czynnikiem determinującym, ale istniały różne linie regresji dla kiszonki z kukurydzy i suszonej trawy jako głównego składnika paszy : odpowiednio $CH_4 (g)=93+16.8 \times DMI(kg)$ and $CH_4 (g)=81+14.0 \times DMI(kg)$. Uwalnianie metanu było szczególnie zależne od spożycia surowego błonnika (CF) i ekstraktu eterowego (EE): $CH_4 (g)=63+80 \times CF (kg)+11 \times NFE (kg)+19 \times CP(kg)-195 \times EE (kg)$.	Kirchgessner et al., 1991
Metan zwiększał się liniowo wraz ze spożyciem NDF ($CH_4 (L)=59.4 \times NDF[kg]+ 64.6$) dla krów wraz z ich cielętami niezależnie od rasy .	Estermann et al., 2002
Jelitowy CH_4 można przewidzieć za pomocą równania : $CH_4 (g/d)=84+47 \times cellulose(kg/d)+32 \times starch(kg/d)+62 \times sugars (kg/d)$.	Hindrichsen et al., 2005
Im wyższy procent koncentratu, tym niższy Y_m .	Zeitz et al., 2012
Dodatki mogą czasami mieć działanie redukujące wydzielanie metanu: wyższe dawki bardziej łagodzą metan. Saponiny łagodzą metanogenezę, zmniejszając liczbę pierwotniaków, podczas gdy skondensowane garbniki działają zarówno poprzez zmniejszenie liczby pierwotniaków, jak i poprzez bezpośredni toksyczny wpływ na metanogeny.	Beauchemin et al., 2008; Jayanegara et al., 2012; Zmora et al., 2012; Cieslak et al., 2013; Guyader et al., 2014
Wykazano, że olejki eteryczne roślin są obiecującymi dodatkami paszowymi mającymi na celu ograniczenia emisji CH_4 i amoniaku, ale wyniki były niespójne.	Cobellis et al., 2016; Moate et al., 2011
Dodatek azotanów i siarczanów zmniejszył emisję metanu jelitowego, co negatywnie wpłynęło na strawność diety i produkcję mleka. Działanie soli jest addytywne .	van Zijderveld et al., 2010; van Zijderveld et al., 2011

Czynniki	Literatura
Metanogeneza w żwaczu cieląt wiąże się z rozwojem populacji pierwotniaków w żwaczu. Brak pierwotniaków w żwaczu zmniejszał zarówno produkcję CH ₄ , jak i strawność węglowodanów.	Schönhusen et al., 2003
Wdrożenie dobrego zarządzania wypasem zmniejszyło straty energii brutto jako CH ₄ o 14%.	Wims et al., 2010

5.2 Genetyka gospodarza, fizjologia i środowisko

Niski i umiarkowany odsetek zmian emisji CH₄ wśród przeżuwaczy znajduje się pod kontrolą genetyczną. Współczynniki odziedziczalności MeY i RMPR wynosiły odpowiednio $h^2 = 0,22$ i $0,19$ w populacji 1043 rosnących wołów i jałówek Angus zmierzonych w ciągu 2 dni w RC (Donoghue i in., 2016). Współczynnik odziedziczalności MeY wynosił $h^2=0.13$ w populacji 1225 podwójnie użytkowych rosnących owiec mierzonych w ciągu 2 dni w RC (Pinares-Patino i in., 2013) Tabela 3 zawiera informacje o odziedziczalności cech związanych z produkcją CH₄.

Tabela 3. Informacje o odziedziczalności cech i pomiarów związanych z metanem

Czynniki	Literatura
Lista z kilkoma h^2	Pickering et al., 2015
Lista z kilkoma h^2	MPWG White paper Dec 18
Emisje metanu od poszczególnych krów podczas doju różniły się między osobnikami o tej samej wydajności mlecznej i żywionych tą samą dietą. Zmienność między krowami w MERm jest większa niż zmienność w obrębie krów, a ranking krów pod względem emisji CH ₄ jest spójny w czasie. Różnice związane z masą ciała, wydajnością mleka, laktacją i tygodniem laktacji / dni w mleku. Monitorowana zmienność może oferować możliwości selekcji genetycznej.	Garnsworthy et al., 2011A; Garnsworthy et al., 2011B

Czynniki	Literatura
Podejście modelowania mechanistycznego: potencjał interwencji dietetycznej jako sposób znacznego ograniczenia emisji CH ₄ bez negatywnego wpływu na zaopatrzenie w energię dietetyczną .	Mills et al., 2001
Stosunek CH ₄ do CO ₂ mierzony za pomocą nieinwazyjnego przenośnego urządzenia do pobierania próbek powietrza i analizatora w oparciu o metodę wykrywania w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR) jest atutem poszczególnych krów i może być przydatny zarówno w zarządzaniu, jak i ocenach genetycznych.	Lassen et al., 2012
Oszacowana odziedziczalność CH ₄ g / dzień i CH ₄ g / kg FPCM była niższa niż typowe cechy produkcyjne, ale nadal byłaby przydatna w programach hodowlanych	Kandel et al., 2013
Korelacja genetyczna między stężeniem CH ₄ a wydajnością mleczną (MY) wynosiła - 0,67 a z wydajnością białka mlecznego (PY) wynosiła -0,46 u krów rasy Holstein .	Kandel et al., 2014A, B
Wydaje się, że na produkcję mleka i emisję CH ₄ przez krowy mleczne ma wpływ indeks wilgotności i temperatury .	Vanrobays et al., 2013A
Oszacowano odziedziczalność szacunkowych emisji metanu od 485 polskich krów mlecznych rasy holsztyńsko-fryzyjskiej w 2 komercyjnych gospodarstwach, stosując spektroskopię FTIR podczas doju w zautomatyzowanym systemie doju, stosując metodę regresji losowej. Poziom odziedziczalności zmieniał się w trakcie laktacji, zaczynając od 0,23 (SE 0,12), a następnie zwiększając się do maksymalnej wartości 0,3 (SE 0,08) przy 212 DIM, a kończąc na poziomie 0,27 ± 0,12. Średnia odziedziczalność wynosiła 0,27 ± 0,09.	Pszczola et al., 2017

Czynniki	Literatura
<p>CH₄ zmierzone za pomocą przenośnej metody wykrywania w próbkach powietrza FTIR na 3121 krowach mlecznych Holstein z 20 stad za pomocą automatycznych systemów doju.</p> <p>Odziedziczalność CH₄_MILK wynosiła 0,21 ± 0,06. Stwierdzono, że wysoki potencjał genetyczny do produkcji mleka będzie również oznaczał wysoki potencjał genetyczny do produkcji CH₄. Wyniki sugerują, że emisja CH₄ jest częściowo pod kontrolą genetyczną, że możliwe jest zmniejszenie emisji CH₄ przez bydło mleczne poprzez selekcję, a selekcja w celu uzyskania większej wydajności mleka doprowadzi do wyższej wartości genetycznej emisji CH₄ / krowy na dzień.</p>	<p>Lassen and Løvendahl, 2016</p>
<p>Produkcja CH₄ została zmierzona u 184 krów rasy holsztyńsko-fryzyjskiej w robotach udojowych, przy całkowitej liczbie 2456 obserwacji produkcji CH₄. Odziedziczalność produkcji CH₄ wynosiła od 0,12 ± 0,16 do 0,45 ± 0,11, a korelacje genetyczne z MY wahały się od 0,49 ± 0,12 do 0,54 ± 0,26. Dodatnia korelacja genetyczna między produkcją CH₄ a wydajnością mleka wskazuje, że należy zachować ostrożność przy genetycznym wyborze niższej produkcji CH₄, aby uniknąć spadku MY na poziomie zwierzęcia. Jednak badanie to pokazuje, że produkcja CH₄ jest umiarkowanie odziedziczalna i dlatego możliwy jest postęp dzięki selekcji genetycznej.</p>	<p>Breider et al., 2019</p>
<p>Stężenie CH₄ zmierzono za pomocą NDIR, a wytwarzanie CH₄ oszacowano na podstawie stężenia CH₄ i masy ciała.</p> <p>Odziedziczalność dla stężenia CH₄ wynosiła 0,11 ± 0,03, a dla produkcji CH₄ 0,12 ± 0,04. Dodatnią korelację genetyczną zaobserwowano dla MY (0,17-0,21), PY (0,22-0,31) i FY (0,27-0,29). Inne cechy typu wykazały dodatnią korelację z produkcją metanu (szerokość klatki piersiowej = 0,26, kątość = 0,19, wzrost = 0,43 i pojemność = 0,31), prawdopodobnie związane z wyższym spożyciem mleka przez te zwierzęta. Czas przeżuwania był ujemnie skorelowany z produkcją CH₄ (-0,24) i stężeniem CH₄ (-0,43). Jednak większa produkcja CH₄ i stężenie CH₄ były związane z krótszym okresem międzyciążowym..</p>	<p>Lopez-Paredes et al. (2020)</p>

Czynniki	Literatura
<p>Parametry genetyczne emisji CH₄ prognozowane z profilu kwasów tłuszczowych mleka (FA) i ich predyktorów u 1091 krów rasy Brown Swiss Swiss hodowanych w 85 gospodarstwach wykazały, że emisje jelitowego CH₄ krów mlecznych można oszacować na podstawie profilu kwasów tłuszczowych mleka. Wykazano addytywną zmienność genetyczną cech CH₄, którą można wykorzystać w programach hodowlanych.</p>	<p>Bittante and Cecchinato, 2020</p>
<p>Zarejestrowano ogółem 670 próbnych udojów dla krów Holstein Friesian w trakcie laktacji, hodowanych w 10 komercyjnych stadach mlecznych. Przewidywaną produkcję metanu (PMP) oszacowano na 15,33 ± 1,52 MJ / d u krów mlecznych z 23,53 ± 6,81 kg / d wydajnością mleka (MY) i 3,57 ± 0,68% zawartości tłuszczu (FC). Odziedziczalność MY wynosiła 0,09 z prawdopodobieństwem późniejszym dla wartości h² większych niż 0,10 z 44%. Oszacowania odziedziczalności FC i zawartości białka (PC) wyniosły odpowiednio 0,17 i 0,34, z prawdopodobieństwem późniejszym dla wartości h² większych niż 0,10 wynoszących 77% i 99%. W przypadku oceny komórek somatycznych (SCS) odziedziczalność wynosiła 0,13, a prawdopodobieństwo późniejsze dla wartości h² większych niż 0,10 wynoszących 67%. Odziedziczalność dla cechy PMP była umiarkowana do niskiej (0,12); jednak prawdopodobieństwo późniejsze dla wartości h² większych niż 0,10 wyniosło 60%. Mediany tylnych rozkładów korelacji genetycznych odpowiednio między PMP i SCS. Wydaje się, że zmniejszenie PMP jest realne dzięki strategiom selekcji bez wpływu na zdrowie wymienia i PC.</p>	<p>Cassandro et al., 2010</p>

Czynniki	Literatura
<p>Przy użyciu GWAS zbadano architekturę genetyczną produkcji CH₄ i wykrył regiony genomowe wpływające na produkcję CH₄. Wykryte regiony wyjaśniły tylko niewielką część odziedziczalnej wariacji. Potencjalne regiony QTL wpływające na produkcję CH₄ były zlokalizowane w obrębie QTL związanych z efektywnością żywienia, cechami związanymi z mlekiem, wielkością ciała i stanem zdrowia. Znalezione pięć genów kandydujących: CYP51A1 na BTA 4, PPP1R16B na BTA 13 oraz NTHL1, TSC2 i PKD1 na BTA 25. Te potencjalne geny były zaangażowane w szereg procesów metabolicznych, które prawdopodobnie są związane z produkcją CH₄. Jeden z najbardziej obiecujących genów kandydujących (PKD1) był związany z rozwojem przewodu pokarmowego. Wyniki wskazują, że produkcja CH₄ jest cechą wysoce poligeniczną.</p>	<p>Pszczola et al., 2018</p>
<p>Badanie na 1000 krowach w krajach europejskich wykazało, że mikrobiom przeżuwaczy może być kontrolowany przez zwierzę-gospodarza. 39-elementowy podzbiór rdzeniowego mikrobiomu utworzył piasty w sieciach współwystępowania łączących strukturę mikrobiomu z genetyką i fenotypem gospodarza (emisje CH₄, metabolity w żwaczu i krwi oraz wydajność produkcji mleka).</p>	<p>Wallace et al., 2019</p>

6 Metody pomiaru metanu

Na wybór metody pomiaru wpływa kilka czynników, takich jak koszt, poziom dokładności, precyzja, zakres zastosowania i skala, które różnią się w zależności od dyscypliny (Cassandro i in., 2013; Hammond i in., 2016A; Garnsworthy i in., 2019). Na przykład programy selekcji genetycznej wymagają pomiarów CH₄ na tysiącach spokrewnionych osobników w warunkach środowiskowych, w których, oczekuje się, że zwierzęta będą przebywały (Falconer i Mackay, 1996). Może to być trudne, ponieważ bydło mleczne przebywa w szerokim zakresie warunków (np. wypas vs utrzymanie w budynku).

Obecnie stosuje się wiele różnych metod pomiaru, każda z zaletami i wadami pod względem czynników wymienionych powyżej. Obecnie akceptowane i powszechnie stosowane metody pomiaru są wymienione i opisane poniżej.

Główne cechy metod pomiaru produkcji CH_4 przez poszczególne zwierzęta podsumowano w Tabeli 4. Wartości dla każdej cechy opierają się na doświadczeniu ekspertów z METHAGENE WG2, którzy zastosowali te metody. Wszystkie wartości są względne i nieco subiektywne, ponieważ wartości bezwzględne będą zależą od instalacji i wdrożenia każdej metody w różnych ośrodkach badawczych. Należy zauważyć, że metody pomiarowe można podzielić na dwie główne sekcje: metody, które mierzą stężenie i strumień CH_4 (np. komora oddechowa) oraz metody, które mierzą strumień CH_4 za pomocą urządzenia (np. GreenFeed). Wpływa to na użyteczność metod odpowiadania na pytania badawcze - patrz także zalecenia na końcu niniejszych wytycznych.

6.1 Komory oddechowe

Komory oddechowe są skalibrowane tak, aby były dokładne i precyzyjne, i są „złotym standardem”/ pewnym wzorcem w testowaniu nowych metod. Tylko komory oddechowe mierzą całkowitą emisję CH_4 przez zwierzę przez usta, nos i odbył; wszystkie inne metody ignorują emisję przez odbył i mierzą tylko CH_4 emitowany w wydychanym powietrzu. Pomiar oddechu są uzasadnione, ponieważ 99% CH_4 jest emitowane z jamy ustnej i nozdrzy, a tylko 1% z odbytu (Murray i in., 1976).

Pojedyncze zwierzę (lub czasami więcej) jest zamknięte w komorze na okres od 2 do 7 dni. Stężenie CH_4 (i innych gazów w razie potrzeby) mierzy się na wlotach i wylotach powietrza w komorze. Różnicę między stężeniami wylotowymi i wejściowymi mnoży się przez przepływ powietrza, aby wskazać strumień emisji CH_4 . W większości instalacji jeden analizator gazu służy do pomiaru stężenia na wlocie i wylocie, często dla dwóch lub większej liczby komór. Obejmuje to przełączanie analizatora między punktami pobierania próbek w ustalonych odstępach czasu, tak więc stężenia są mierzone tylko przez ułamek dnia. Jeśli częstotliwość akwizycji punktów pobierania próbek jest wysoka, umożliwia to narysowanie dobowego wzoru emisji metanu,

porównywalnego z systemem GreenFeed.

Komory oddechowe różnią się materiałami konstrukcyjnymi, rozmiarem komory, wyposażeniem do analizy gazu i szybkością przepływu powietrza, co może mieć wpływ na wyniki. Walidacja 22 komór w sześciu brytyjskich ośrodkach badawczych ujawniła niepewność wynoszącą 25,7% między obiektami, która została zmniejszona do 2,1%, gdy zastosowano współczynniki korygujące w celu przesłедzenia każdego obiektu do międzynarodowego standardu CH₄ (Gardiner i in., 2015). Głównymi źródłami niepewności były stabilność i pomiar przepływu powietrza, które są kluczowe dla pomiaru intensywności emisji CH₄. Autorzy doszli jednak do wniosku, że komory były dokładne do porównywania zwierząt mierzonych w tym samym miejscu. Jest to dodatkowe wyzwanie przy porównywaniu metod alternatywnych z komorami oddechowymi, jeśli same komory oddechowe nie zostały poddane testom porównawczym z komorami oddechowymi w innych obiektach. Należy zauważyć, że mogą wystąpić istotne błędy, jeśli nie zostaną zastosowane odpowiednie procedury kalibracji (Gardiner i in., 2015).

W przypadku oceny na dużą skalę emisji CH₄ przez pojedyncze zwierzęta, komory oddechowe stanowiły wyzwanie tylko w jednym badaniu rosnących wołów i jałówek Angus przekraczającym 1000 zwierząt i stwierdzającym, że produkcja CH₄ jest średnio odziedziczalna $h^2 = 0,27 \pm 0,07$ (Donoghue i in., 2016). Koszty instalacji i eksploatacji są wysokie, ponieważ zwykle pomiaru rob się dla jednego zwierzęcia na raz. Jeśli założymy, że czas monitorowania wynosi trzy dni na zwierzę, a komory pracują w sposób ciągły, maksymalna przepustowość wyniesie około 100 zwierząt na komorę rocznie. W praktyce przepustowość prawdopodobnie wyniesie od 30 do 50 zwierząt rocznie. Krowy są zwierzętami społecznymi, a uwięzienie w komorze może ostatecznie wpłynąć na ich zachowanie podczas karmienia, co skutkuje mniejszą konsumpcją paszy i innym sposobem żywienia w porównaniu z warunkami panującymi w gospodarstwie. Zmieniony wzorzec lub poziom żywienia nie stanowi problemu w badaniach metabolicznych oceniających karmę, ale może stanowić problem przy ocenie poszczególnych zwierząt. Ponadto zakwestionowano reprezentatywność komór oddechowych w odniesieniu do systemów wypasu (Pinares-Patino i in., 2013). Jednak obiecujące zmiany

doprowadziły do stworzenia bardziej przyjaznych dla zwierząt komór oddechowych zbudowanych z tańszych, przezroczystych materiałów. Obniżają one koszty i zmniejszają stres związany z ograniczeniem przy minimalnych zakłóceniach dokładności, precyzji i braku spadku spożycia paszy przez krowy (Hellwing i in., 2012).

W przypadku gdy metoda alternatywna może być tańsza, mniej inwazyjna, łatwiejsza do wdrożenia lub mieć szerszy zakres zastosowania, warto ocenić względną dokładność, precyzję i korelację ze wzorcem („złotym standardem”) w celu oceny względnej wartości metody alternatywnej (Barnhart i in., 2007). Wszystkie metody mierzą CH_4 z pewnym poziomem błędu, więc „prawdziwa wartość” danego osobnika nie jest znana. Jednak wraz ze wzrostem poziomu błędu pomiaru rośnie również niedokładność. Porównując dwie metody, w których jedna lub obie metody cechują się dużą niedokładnością, występuje zjawisko zwane „tłumieniem błędów” (Spearman, 1904). Zwiększony błąd pomiaru przesunął korelację między dwiema metodami w dół i zmniejsza skuteczność wykrywania znacznych różnic w dokładności (Adolph i Hardin, 2007). Lub w kategoriach regresji liniowej, gdy obserwowane CV metody alternatywnej jest wyższe niż w metodzie standardu złotego, nachylenie regresji między metodami jest zmniejszone, a punkt przecięcia jest tendencyjnie przesunięty w górę.

Tabela 4. Podsumowanie głównych cech metod pomiaru produkcji CH₄ przez poszczególne zwierzęta¹.

Metoda	Koszt dostawy ²	Koszt działania ²	Praca ²	Powtarzalność	Zmiana zachowania ³	Wydajność
Komora oddechowa	Wysoki	Wysoki	Dużo	Wysoka	Wysoka	Niska
Technika SF6	Średni	Wysoki	Dużo	Średnia	Średnia	Średnia
Pobieranie próbek oddechu podczas doju i karmienia	Niski ⁴	Niski	Mało	Średnia	Brak	Wysoka
GreenFeed	Średni	Średni	Średnio	Średnia	Średnia	Średnia
Laserowy detektor metanu	Niski	Niski	Dużo	Niska	Niska-Średnia	Średnia

6.2 Przenośne komory akumulacyjne

W Australii i Nowej Zelandii opracowano alternatywną metodę krótkoterminowego pomiaru wskaźnika produkcji metanu (MPR) owiec przy użyciu przenośnych komór akumulacyjnych (PAC) w ciągu 1 godziny bez powodowania dyskomfortu dla zwierząt. Podobnie jak RC, emisje CH₄ zarejestrowane w PAC obejmują gazy ze wzdęć oprócz usuniętego i wygasłego CH₄, ale tylko w ciągu 1 godziny. Szczegółowe porównanie metod PAC i metod komory oddechowej znajduje się w Jonker i in. (2018).

6.3 SF6

Próbki oddechu w technice SF6 analizowane są przez 24 godziny, podczas gdy inne techniki wykorzystują próbki oddechu punktowego przez kilka minut w

¹ Poglądy konsensusowe oparte na doświadczeniach członków METHAGENE WG2 (www.methagene.eu).

² Na jednostkę miary lub grupę zwierząt.

³ W porównaniu do braku zapisu metanu: niski = pomiar na miejscu; średni = pewne prowadzenie, szkolenie lub zmiana rutyny; high = ograniczenie.

⁴ Średni, jeśli używany jest analizator FTIR

ciągu dnia, więc należy wziąć pod uwagę zmienność dobową. Większość CH₄ (87-99%) jest uwalniana w trakcie odbijania (Blaxter i Joyce, 1963; Murray i in., 1976), co zapewnia wyraźny sygnał do przetwarzania próbki. Należy pamiętać, że tracheostomia stosowana przez Murray i in. (1976) może spowodować większy odsetek, ale w obu publikacjach jasne jest, że większość CH₄ jest uwalniana w trakcie odbijania.

Technika gazu znakującego SF₆ została opracowana w celu zmierzenia emisji CH₄ przez zwierzęta bez uwięzienia ich w komorach oddechowych (Johnson i in., 1994). Próbki powietrza pobierane są w pobliżu nozdrzy zwierzęcia przez rurkę przymocowaną do kantaru i połączoną z opróżnialnym kanistrem noszonym na szyi lub grzbiecie zwierzęcia. Rurkę kapilarną lub kryzę stosuje się w celu ograniczenia przepływu powietrza przez rurkę, dzięki czemu pojemnik jest wypełniony w 50–70% w ciągu około 24 godzin. Rurkę przepuszczającą zawierającą SF₆ umieszcza się w żwaczu każdego zwierzęcia. Z góry ustalona szybkość uwalniania SF₆ jest mnożona przez stosunek stężeń CH₄ do SF₆ w zbiorniku w celu obliczenia wskaźnika emisji CH₄.

Wiele ośrodków badawczych stosowało technikę SF₆ przy różnych projektach urządzeń do pobierania i zbierania próbek, rurek przenikających i analizy gazu (Berndt i in., 2014). Wiarygodne wyniki zależą od następujących standardowych protokołów, przy czym największa zmienność wynika z dokładności określania szybkości uwalniania SF₆ z rurek przenikających i kontroli częstotliwości pobierania próbek. W przypadku rurek kapilarnych częstotliwość pobierania próbek zmniejsza się wraz ze wzrostem ciśnienia w pojemniku, podczas gdy płytka kryzowa zapewnia stabilniejszą częstotliwość pobierania próbek przez 24 godziny (Deighton i in., 2014). Źródłem błędu, który nie został oceniony, jest to, że zwierzęta mogą oddziaływać i dzielić emisje CH₄, gdy próbka jednego zwierzęcia znajduje się w pobliżu głowy innego zwierzęcia. Istnieje dobra zgodność między emisjami CH₄ mierzonymi techniką SF₆ a komorami oddechowymi, chociaż wyniki techniki SF₆ są bardziej zmienne (Grainger i in., 2007; Muñoz i in., 2012).

6.4 Pobieranie próbek oddechu podczas doju i karmienia

Kilka grup badawczych opracowało metody pomiaru stężenia CH_4 w oddechu krów podczas doju i / lub karmienia. Są one często nazywane „metodami węszącymi”, ponieważ wykorzystują one urządzenia pierwotnie zaprojektowane do wykrywania niebezpiecznych wycieków gazu. Próbki powietrza pobierane są w pobliżu nozdrzy zwierzęcia przez rurkę przymocowaną do kosza na paszę i podłączoną bezpośrednio do analizatora gazu. Kosz na paszę może znajdować się w automatycznej stacji doju (Garnsworthy i in., 2012A, B; Lassen i in., 2012; Pszczola i in., 2017, 2018, 2019) lub w stacji do karmienia koncentratem (Negussie i in., 2017). Różne ośrodki badawcze wykorzystują różne analizatory gazu (podczerwień niedispersyjna (NDIR), podczerwień z transformatą Fouriera (FTIR) lub podczerwień fotoakustyczną (PAIR)) i różne interwały pobierania próbek (1, 5, 20 lub 90–120 sekund). Stężenie metanu podczas wizyty z pobieraniem próbek trwającej zwykle od 3 do 10 minut można określić jako ogólną średnią lub średnią pików erupcji/odbijania. Niektóre ośrodki używają CO_2 jako gazu znakującego i obliczają dzienną wydajność CH_4 na podstawie stosunku CH_4 do CO_2 i dziennej produkcji CO_2 przewidywanej na podstawie wydajności krowy (Madsen i in., 2010). Powtarzalność i korelacje rang były wyższe dla pików odbijania niż dla średnich stężeń i były wyższe dla pików odbijania niż dla stosunku CH_4 do CO_2 (Bell i in., 2014). Jednak wszystkie metody wykazują dobrą powtarzalność.

6.5 GreenFeed

GreenFeed (C-Lock Inc., Rapid City, Południowa Dakota, USA) to system węszący (sniffer), w którym próbki oddechu są dostarczane, gdy zwierzęta odwiedzają stację przynęty (Huhtanen i in., 2015). Systemy monitorowania emisji GreenFeed (GEM) są przeznaczone do pomiaru emisji przez zwierzęta w ich środowisku produkcyjnym. Podobnie jak w przypadku innych systemów węszących, GreenFeed pobiera próbki oddechu od poszczególnych zwierząt kilka razy (ogólnie 4 do 6 razy) dziennie przez krótkie okresy (3 do 7 minut, w których powstaje podciśnienie w celu zasysania całego oddechu zwierzęcia w celu pomiaru strumienia). Rejestrują strumienie CH_4 i dwutlenku węgla (CO_2) w krótkoterminowych okresach 3–10 minut, gdy bydło odwiedza automatyczny

podajnik wyposażony w częściowo zamkniętą osłonę, w której powietrze jest stale zasysane przez rurkę zbierającą powietrze (C-Lock, 2016; Huhtanen i in., 2015; Hammond i in., 2016A; Velazco i in., 2016). Próbki powietrza są stale (co sekundę) analizowane pod kątem stężeń CH_4 i CO_2 za pomocą niedyspersyjnych czujników podczerwieni. Strumienie gazu są ostatecznie obliczane jako iloczyn przepływu powietrza w rurze zbierającej i stężenia gazów skorygowane o stężenia tła i dostosowane do znormalizowanej temperatury, wilgotności i ciśnienia. Pozycja głowy w podajniku jest wykrywana przez czujnik podczerwieni. Strumienie gazu nie są obliczane, jeśli głowa nie jest prawidłowo ustawiona w podajniku, ponieważ nie całe powietrze w podajniku może zostać zebrane.

GreenFeed to przenośny autonomiczny system stosowany w oborach i na pastwiskach, który zawiera wentylator wyciągowy, zapewniający aktywny przepływ powietrza i wykrywanie pozycji głowy w celu reprezentatywnego pobierania próbek oddechu (Hammond i in., 2016B). Pomiar są wstępnie przetwarzane przez producenta urządzenia, a dane są dostępne w czasie rzeczywistym za pośrednictwem internetowego systemu zarządzania danymi (Hammond i in., 2015). Ponieważ GreenFeed wychwytuje dużą część emitowanego powietrza i mierzy przepływ powietrza, który można skalibrować za pomocą gazu znakującego, emisja CH_4 jest szacowana jako strumień podczas każdej wizyty. Pod warunkiem, że wizyty odbywają się w ciągu 24 godzin, emisję CH_4 można oszacować bezpośrednio jako g / dzień (Hammond i in., 2015; Huhtanen i in., 2015). Co ważniejsze, powtarzalność pomiaru CH_4 musi być wysoka, dlatego należy wziąć pod uwagę czas trwania pomiaru (Huhtanen i in., 2013; Arbre i in., 2016); ($R = 0,7$ po 17 dniach okresu pomiaru lub $R = 0,93$ po 45 dniach, Arbre i in., 2016).

6.6 Laserowy detektor metanu

Laserowy detektor CH_4 (LMD) jest bardzo czułym, ręcznym urządzeniem, które jest skierowane na nozdrza zwierzęcia i mierzy gęstość kolumny CH_4 wzdłuż długości wiązki laserowej (ppm.m). W pierwszym wdrożeniu LMD na farmie pomiary dla każdej krowy były przeprowadzane w okresach od 15 do 25 sekund między zdarzeniami odbijania i mogły wykryć CH_4 emitowane za

każdym razem, gdy zwierzę wydychało (Chagunda i in., 2009 Sorg i in., 2016 , 2017). W późniejszych badaniach na owcach i bydło mięsnym okresy monitorowania trwające od 2 do 4 minut pozwoliły autorom oddzielić cykle oddychania od zdarzeń odbijania się (Ricci i in., 2014). Zazwyczaj zwierzęta są unieruchamiane ręcznie lub w jarzmach na ogrodzeniu paszowym przez wymagany okres czasu. Operator musi stać za każdym razem w tej samej odległości (1–3 m) od każdego zwierzęcia i musi uważać, aby laser był skierowany na nozdrza zwierzęcia przez cały okres pomiaru.

7 Omówienie metod

7.1 SF6 vs. komora oddechowa

W przypadku oceny emisji CH₄ przez poszczególne zwierzęta na dużą skalę, technika SF6 jest bardziej przydatna niż komory oddechowe. Na zachowanie i pobieranie paszy przez zwierzęta może mieć wpływ noszenie aparatu oraz codzienne obchodzenie się z pojemnikami w celu wymiany kanistrów, ale technika ta jest znacznie mniej uciążliwa niż komory oddechowe, ponieważ krowy pozostają w stadzie. Koszty robocizny i finansowe związane ze zmianą pojemników każdego dnia i analizami laboratoryjnymi są wysokie. Wydajność jest ograniczona liczbą dostępnych zestawów aparatów, urządzeniami do obsługi, pracą i pojemnością laboratorium do analizy gazów. Pomiary na zwierzętach należy wykonywać przez 5 do 7 dni i zaleca się, aby liczebność grupy była mniejsza niż 15 zwierząt (Berndt i in., 2014), więc maksymalna przepustowość wynosiłaby około 750 zwierząt rocznie. Metoda ta może być lepiej dostosowana do warunków przebywania w pomieszczeniach zamkniętych ze względu na poród i potencjalne ograniczenie ruchu zwierząt z powodu noszenia aparatu.

7.2 Pobieranie próbek oddechu podczas doju i karmienia (- vs komora oddechowa)

W przypadku oceny na dużą skalę emisji CH₄ przez poszczególne zwierzęta, metody pobierania próbek oddechu mają znaczące zalety w porównaniu z innymi metodami. Metody pobierania próbek oddechu są nieinwazyjne,

ponieważ po zainstalowaniu zwierzęta nie są świadome sprzętu i znajdują się w normalnym środowisku. Zwierzęta przestrzegają normalnej rutyny, która obejmuje dój i karmienie, więc nie jest wymagane szkolenie zwierząt, obchodzenie się z urządzeniem ani zmiana diety. Sprzęt jest stosunkowo tani, chociaż dostępne są droższe analizatory gazu, a koszty eksploatacji są znikome.

Kompromis dotyczący nieinwazyjności pobierania próbek oddechu polega na tym, że na stężenie gazów w próbkach powietrza wpływa pozycja głowy krowy względem rurki do pobierania próbek (Huhtanen i in., 2015). Zastosowanie czujników położenia głowy i algorytmów filtrowania danych może usunąć efekty, gdy głowa krowy jest całkowicie wyjęta z kosza (Difford i in., 2016), a nie w obrębie kosza. W związku z tym pomiary sniffera są bardziej zmienne niż metody strumieniowe, a czynniki takie jak zmienny przepływ powietrza w oborze zwiększają błąd pomiaru (nie dokładność), zaś pozycja głowy, wysoce powtarzalny charakter, zwiększając zmienność między krowami.

Wykorzystanie CO₂ jako gazu znakującego częściowo rozwiązuje ten problem, ale ponieważ CO₂ powstaje w wyniku metabolizmu, a także fermentacji w żwaczu, należy wziąć pod uwagę zmienność emisji CO₂. Kolejnym zagadnieniem jest dobową zmienność stężeń CH₄ i CO₂ w wydychanym powietrzu, ponieważ od zwierząt pobiera się próbki w różnych porach dnia i nocy. Dobową zmienność można uwzględnić przez dopasowanie modelu pochodzącego od całej grupy zwierząt lub przez uwzględnienie czasu pomiaru w modelu statystycznym (Lassen i in., 2012).

Liczba obserwacji przypadających na analizator jest ograniczona tylko liczbą krów przypisanych do jednej automatycznej stacji doju lub stacji karmienia koncentratem i długości czasu zainstalowania sprzętu. Zazwyczaj każdy analizator rejestruje od 40 do 70 zwierząt 2 do 7 razy dziennie przez 7 do 10 dni, chociaż liczbę stacji pobierania próbek na analizator można zwiększyć za pomocą automatycznego systemu przełączania (Pszczola i in., 2017). Wydajność na analizator może wynosić od 2000 do 3000 zwierząt rocznie.

7.3 NDIR vs LMD

Obie metody są mało inwazyjne. LMD potrzebuje większego nakładu siły roboczej, podczas gdy NDIR można stosować podczas doju i karmienia. Według Rey i in. (2019), powtarzalność stężenia CH₄ była większa dla NDIR (0,42) niż dla LMD (0,23). Korelacja między metodami była umiarkowanie wysoka i dodatnia dla stężenia CH₄ (odpowiednio 0,73 i 0,74) a liczby pików (odpowiednio 0,72 i 0,72), zaś korelacja powtarzanych pomiarów i korelacja na poziomie indywidualnym były wysokie (odpowiednio 0,98 i 0,94). Między metodami zaobserwowano wysoki współczynnik indywidualnej zgodności dla stężenia CH₄ (0,83) i liczby pików (0,77). Badanie sugeruje, że pomiarów stężenia metanu uzyskanych z NDIR i LMD nie można stosować zamiennie. Jednak zastosowanie obu metod można rozważyć do celów selekcji genetycznej lub strategii łagodzenia tylko wtedy, gdy źródła niezgodności, które powodują różne zmienności między podmiotami i wewnątrz podmiotu, zostaną zidentyfikowane i skorygowane.

7.4 GreenFeed

Ograniczeniem systemu GreenFeed jest to, że zwierzęta wymagają szkolenia w zakresie korzystania z systemu, chociaż zwierzęta, które zostały przeszkolone w zakresie korzystania z systemu, chętnie z niego skorzystają ponownie (Velazco i in., 2014). Jednak niektóre zwierzęta nie będą korzystały z systemu lub będą go używać rzadko, a na częstotliwość odwiedzin ma wpływ dieta (Hammond i in., 2016B). Może to stanowić wyzwanie podczas badań przesiewowych stad komercyjnych pod kątem emisji CH₄ w ramach oceny genetycznej. Z drugiej strony zwierzęta wydają się szybko przyzwyczajać do sprzętu, a dźwięk wytwarzany przez system jest w łatwy sposób zapamiętywany przez zwierzęta (osobiste informacje dr Finocchiaro). Alternatywnie, jak praktykowano w Kanadzie, jednostka jest przenoszona do pojedynczych zwierząt na stanowisko uwiązowe wiele razy dziennie (osobiste informacje prof. C.F. Baes). Zatem działanie poszczególnych zwierząt nie jest potrzebne.

Producent zaleca od 15 do 25 zwierząt na jednostkę GreenFeed, a rejestracje

są zazwyczaj wykonywane przez 7 dni. Jeśli wszystkie zwierzęta odwiedzą tę jednostkę w odpowiedni sposób, przepustowość na jednostkę prawdopodobnie wyniesie od 750 do 1250 zwierząt rocznie. Sebek i in. (2019A, B) oraz Bannink i in. (2018) pokazali przydatność metody GreenFeed w warunkach fermowych.

7.5 Laserowy detektor metanu

LMD może być stosowany w normalnym środowisku zwierzęcia, chociaż dla zachowania spójności wymagane jest ograniczenie podczas pomiaru. Ponieważ LMD mierzy CH₄ w smudze wychodzącej z nozdrzy zwierzęcia, na wyniki mogą wpływać czynniki takie jak: odległość od zwierzęcia; kąt wskazania; orientacja głowy zwierzęcia i ruch głowy; ruch powietrza i temperatura w oborze; sąsiednie zwierzęta; i zmienność operatora (Sorg i in., 2017). Zmiana operatora może być jednym z największych czynników, ponieważ operator kontroluje odległość i kąt wskazania i jest odpowiedzialny za zapewnienie, że laser pozostaje na celu. Struktura obory i wynikające z niej warunki wentylacji oraz prędkość wiatru w miejscu pomiaru są również znacznymi źródłami zmienności zarejestrowanego CH₄.

Zakładając, że zmęczenie operatora nie ogranicza pomiarów, każdy LMD może rejestrować do 10 zwierząt na godzinę. Jeśli każde zwierzę zostanie zarejestrowane 3 razy (przez 3 kolejne dni, na przykład, jak w badaniu Mühlbach i wsp. (2018)), przepustowość prawdopodobnie wyniesie do 1000 zwierząt rocznie.

8 Porównanie metod pomiaru metanu

8.1 Korelacje między metodami

Tabela 5 pokazuje korelacje między metodą komory oddechowej jako złotym standardem do pomiaru emisji CH₄ od krów a innymi metodami. Dane pochodzą z publikacji Garnsworthy i in. (2019), tabela 2.

Tabela 5. Korelacje między metodami pomiaru Ch4. Dane pochodzą z pracy Garnsworthy i in. S(2019).

Metoda	korelacja (S.E.)	
Komora oddechowa - SF6	0.87	-0.08
Komora oddechowa -GreenFeed	0.81	-0.1
Komora oddechowa - NDIR	-0.07	0.88
Komora oddechowa - NDIR peak	0.72	-0.11
Komora oddechowa - PAIR	-0.08	0.7
SF6 - GreenFeed	0.4	-0.18
LMD - GreenFeed	0.77	-0.23
NDIR - GreenFeed	0.64	-0.18
NDIR - LMD	0.6	-0.11
FTIR - LMD	0.57	-0.25
NDIR - NDIR peaks	0.58	-0.15
FTIR - NDIR	0.97	-0.02
FTIR - NDIR	0.53	-0.17

W badaniach porównawczych metod wymagane są jednoczesne powtarzane pomiary każdej z krów dwiema lub więcej metodami w celu oceny systematycznych różnic między metodami (średnimi) i różnicami losowymi (precyzja) oraz korelacji między metodami wolnymi od błędów resztkowych. Ponadto potrzebne są odpowiednio krótkie różnice czasowe między powtarzaniem pomiarów na osobniku, aby zapewnić, że podstawowa biologia krowy nie uległa zmianie. Nie wszystkie metody mogą być rejestrowane jednocześnie, a emisja CH₄ przez krowy zmienia się zarówno w ciągu dnia, jak i w okresie laktacji. W takich przypadkach potrzebne są projekty krzyżowe lub pary powtarzanych pomiarów. Członkowie METHAGENE WG2 dostarczyli dane z badań, w których zastosowano dwie lub więcej metod pomiaru produkcji CH₄ (g/dzień) przez poszczególne krowy mleczne. Metody zastosowano do każdej krowy równocześnie lub kolejno w krótkim odstępie czasu.

Przedstawiono siedem głównych metod: komory oddechowe; SF6; GreenFeed; LMD; oraz trzy systemy pobierania próbek oddechu oparte na różnych

analizatorach gazów. Analizatory gazu zastosowały różne technologie pomiaru CH₄, którymi były NDIR (np. Guardian Plus, Edinburgh Instruments, Edynburg, Wielka Brytania), FTIR (np. Gasmeter 4030, Gasmeter Technologies Oy, Helsinki, Finlandia) lub PAIR (np. F10, Gasera Ltd, Turku, Finlandia). W uwzględnionych badaniach, NDIR i FTIR zastosowano w automatycznych stacjach udojowych, a PAIR zastosowano w stacjach karmienia koncentratem. W jednym badaniu NDIR i we wszystkich badaniach FTIR i PAIR wykorzystano CO₂ jako gazu znakującego, przy czym dzienna produkcja CO₂ była obliczana albo na podstawie wydajności mleka, żywej masy ciała i dni ciąży, albo na podstawie spożycia energii metabolizowanej. Dwa badania NDIR opierały się raczej na stężeniu CH₄ w pikach odbijania się niż na średnim stężeniu CH₄, dlatego traktowano je jako osobne metody. Dzięki rozdzieleniu badań NDIR dostępnych było w sumie 8 różnych metod dających matrycę 28 potencjalnych kombinacji dla porównań. Dane były dostępne dla 13 kombinacji metod (Garnsworthy i in., 2019).

Porównania metod przeprowadzono przy użyciu modeli dwuczynnikowych (repeatability animal models) w celu uzyskania korelacji między „wartościami rzeczywistymi”, znanymi również jako korelacje z powtarzanymi pomiarami lub korelacje poszczególnych poziomów (Bakdash i Marusich, 2017). Do obliczenia współczynnika zmienności krowy (CV,%) i całkowitego CV oraz powtarzalności zastosowano składniki wariancji, w tym zmienność między krowami i zmienność własną krowy (precyzja) oraz średnią (dokładność). Tam, gdzie dla każdej metody dostępne były pojedyncze pomiary, podano korelację Pearsona a gdzie dostępne były powtarzane pomiary na osobnika, zgłaszano korelację powtarzanych pomiarów.

Komory oddechowe były najdokładniejszą metodą, o czym świadczy mniejsza CV% między krowami i całkowita CV w porównaniu do metod alternatywnych, a komory oddechowe są z definicji najdokładniejsze. Wszystkie testowane metody wykazały wysokie korelacje z komorami oddechowymi, ale żadna z tych korelacji nie przekroczyła 0,90. Wynika to częściowo ze zwiększonej niedokładności metod alternatywnych, ponieważ nawet najdokładniejsza i najbardziej precyzyjna metoda będzie słabo porównywać się z metodą mniej precyzyjną. Korelacje te są również prawdopodobnie niedoszacowane,

ponieważ żadna z metod nie mogła być rejestrowana jednocześnie z komorami oddechowymi i musiała być rejestrowana w projektach krzyżowych. W związku z tym prawdziwa wartość dla każdej krowy mogła ulec zmianie z powodu zmian w podstawowej biologii krowy w okresie między pomiarami. **Porównania między alternatywnymi metodami miały na ogół niższe korelacje niż porównania z komorami oddechowymi, pomimo posiadania stosunkowo większej liczby zwierząt i w większości przypadków jednoczesnych lub prawie równoczesnych powtarzanych pomiarów na krowę na metodę z powodu zwiększonej zmienności i niedokładności metod alternatywnych**, co widać na przykładzie zwiększonym CV lub z powodu możliwości wychwycenia różnych aspektów emisji CH₄ przy użyciu różnych metod.

W przypadku metod z powtarzanymi pomiarami na krowę, dwie metody strumienia masowego, SF₆ i GreenFeed, miały najwyższe korelacje z powtarzanymi pomiarami ($0,87 \pm 0,08$ i $0,81 \pm 0,10$), które przewyższały metodę NDIR opartą na stężeniu za pomocą gazu znakującego CO₂. Spośród dwóch metod stężeń ocenianych w komorach oddechowych przy użyciu pojedynczych pomiarów, wartości szczytowe NDIR miały wyższą korelację ($0,89 \pm 0,07$) niż gaz wskaźnikowy CO₂ PAIR ($0,80 \pm 0,10$). Badanie Hristova i in. (2016) porównujące SF₆ i GreenFeed wykazało, pomimo dużej liczby zwierząt, niską korelację Pearsona wynoszącą 0,40, z powtarzanymi pomiarami dla każdej z metod, autorzy prawdopodobnie nie oszacowali korelacji z powtarzanymi pomiarami, która może być większa. Priorytetem jest oszacowanie korelacji między powtarzanymi pomiarami między tymi dwiema metodami przepływu masy, ponieważ wyjaśniłoby to niewytłumaczalne niezgodności między dwiema metodami, które obie ściśle korelują z metodą złotego standardu. Z wyjątkiem wyżej wymienionych badań w porównaniach miar strumienia masy niedokładność była niska w porównaniu do metod opartych na stężeniu.

Dwie z ocenianych metod „węszczenia” (sniffer), **FTIR CO₂t1** i **NDIR CO₂t1**, były skorelowane blisko jedności ($0,97$), najprawdopodobniej ze względu na wspólne równanie predykcyjne dla gazu znakującego CO₂. Niemniej jednak wszystkie korelacje pochodzące z rzeczywistych danych były dodatnie.

Sugeruje to, że połączenie zestawów danych uzyskanych różnymi metodami jest realistyczną propozycją dla badań genetycznych. **Obliczanie współczynników korekty lub wagi dla odchylenia, dokładności i precyzji poprawiłoby wartość połączonych zestawów danych.**

8.2 Plusy i minusy urządzeń

8.2.1 Codzienne pomiary emisji metanu

Ze względu na dużą zmienność dobową emisji jelitowego CH₄ w zależności od schematu żywienia (Grainger i in., 2007; Jonker i in. 2014), najwyższą dokładność dziennej wydajności produkcji CH₄ (DMPR) można uzyskać metodami obejmującymi całość dziennych emisji. Dostępne są dwie metody: **komory oddechowe (RC)** i metody **SF6**.

Alternatywne metody oparte są na krótkoterminowych pomiarach wydajności produkcji CH₄: **Przenośne komory akumulacyjne (PAC)** dla owiec oraz systemy **Monitorowania Emisji GreenFeed (GEM)** dla bydła i owiec (Hegarty, 2013).

8.2.2 DMPR z komorami oddechowymi (RC - *Respiratory Chambers*)

Należy zauważyć, że emisje CH₄ zarejestrowane w RC obejmują również gazy ze wzdęć, dodatkowo do usuniętego i wygasłego CH₄. W porównaniu z wydychanym przez pysk CH₄, CH₄ ze wzdęć jest ogólnie uważany za ograniczony.

Pobieranie paszy w RC może nie być reprezentatywne dla normalnego pobierania paszy przez zwierzęta (Bickell i in., 2014; Llonch i in., 2016; Troy i in., 2016). W konsekwencji zmierzony DMPR może być tendencyjny. Zwierzęta zwykle nie są karmione ad libitum, gdy są rejestrowane pomiary w RC. Dlatego zaleca się porównanie wpływu zwierząt lub diety na wydajność metanu (MY) obliczoną jako stosunek zaobserwowanego DMPR / DMI podczas rejestracji RC, aby uwzględnić możliwe różnice między zwierzętami w zakresie odchylenia DMI. Skutki dla zwierząt można również porównać na podstawie wskaźnika resztkowego wytwarzania metanu (RMPR), różnicy między obserwowanym DMPR a oczekiwanym DMPR uzyskanym przez regresję zaobserwowanego

DMPR na DMI zarejestrowanym podczas testu RC. Pozostałe cechy wymagają jednak dużej liczby zarejestrowanych zwierząt do przeprowadzenia prawidłowej korekty.

Współczynniki powtarzalności pomiędzy pomiarami podejmowanymi w kolejnych dniach są bardzo wysokie, $rep = 0,85$ [0,75 do 0,94] dla MeY i RMPR bydła i owiec (Grainger i in., 2007; Donoghue i in., 2016; Pinares-Patino i in., 2013). Stwierdzono, że zalecany może być 1-dniowy czas pomiaru, ponieważ będzie miał ograniczony wpływ, mniejszy niż 5%, na skuteczność doboru MeY w porównaniu z selekcją w czasie 2-dniowego pomiaru.

Gdy powtarzane pomiary emisji CH₄ u owiec są podejmowane w odstępie od kilku dni do dwóch tygodni, współczynniki powtarzalności MeY i RMPR spadają do $rep =$ średnio 0,36 [0,26 do 0,41] (Pinares-Patino i in., 2013; Robinson i in., 2014a). Co ciekawe, powtarzalność utrzymuje się na umiarkowanym poziomie, $rep = 0,27$ [0,23 do 0,53], gdy pomiary na zwierzętach wykonywano w odstępie kilku miesięcy lub nawet lat. Podobne wyniki uzyskano u bydła Angus, $rep = 0,20$, między pomiarami MeY i RMPR w odstępie ponad 60 dni (Donoghue i in., 2016).

8.2.3 Wnioski i zalecenia

Wszystkie te wyniki pokazują, że istnieje wpływ zwierząt na dzienną emisję CH₄, a różnice między zwierzętami są częściowo uwarunkowane genetycznie. Ta cecha, jak każda inna cecha fizjologiczna, podlega wielu wpływom środowiskowym i zmianom w czasie. Ranking zwierząt pod względem emisji CH₄ wymaga standaryzacji środowiska testowego. **Chociaż bardzo precyzyjny, pojedynczy pomiar zarejestrowany w RC nie jest wystarczający do scharakteryzowania zdolności emisji zwierząt.** W celu scharakteryzowania fenotypu długoterminowego **zaleca się zatem rejestrowanie kilku miar 1-dniowych w odstępie kilku tygodni zamiast jednego 2-dniowego pomiaru, utrzymując środowisko testowe na możliwie stałym poziomie.**

8.2.4 DMPR z GEM

Podczas każdej wizyty mierzy się strumienie CH₄ i CO₂, a wskaźniki emisji

przez zwierzęta uzyskuje się poprzez uśrednienie krótkoterminowych pomiarów strumienia zarejestrowanych podczas okresu testowego. W przeglądzie opublikowanych wyników (Dorich i in., 2015; Hammond i in., 2015; Velazco i in., 2016) Hammond i in. (2016A) stwierdzili, że system **GEM** zapewnia podobne wartości DMPR jak metody RC lub SF6. Podobną dokładność stwierdzili Arbre i in. (2016) dla wydajności CH₄ mierzonej za pomocą GEM w porównaniu z pomiarami **RC** i **SF6**.

Miary punktowe są bardzo zmienne, ponieważ obejmują, oprócz skutków dla zwierząt i środowiska, ważną zmienność w obrębie zwierzęcia i w ciągu dnia. Ta ostatnia jest uważana za warunek błędu. W związku z tym dokładność szacunków dotyczących zwierząt rośnie wraz ze średnią liczbą pomiarów punktowych na zwierzę. Z wyników przedstawionych przez Renanda i Maupetita (2016) przy 124 jałówkach mięsnych kontrolowanych w pomieszczeniach można wykazać, że współczynnik zmienności tego błędu (CVe) spada wykładniczo wraz z liczbą pomiarów punktowych: 13,7%, 10,8%, 7,9% i 4,9% odpowiednio z 5, 10, 25 i 100 pomiarami. Wyniki przedstawione przez Arbre i in. (2016) z 7 krowami mlecznymi w okresie laktacji, kontrolowanymi w pomieszczeniach, pokazują również, że CVe spada z 12,8% do 11,4%, 9,5% i 6,8%, gdy liczba pomiarów wzrasta z 5 do 10, 25 i 100. Z krowami mlecznymi na pastwiskach, Waghorn i in. (2016) wykazali, że współczynnik zmienności wśród 36 krów mlecznych na pastwisku wynosił połowę (6,6 i 7,5%), gdy wskaźnik produkcji CH₄ był uśredniany w ciągu 16 dni przy około 18 do 26 pomiarach na krowę, w porównaniu do średnich z 4 dni z 4 do 6 pomiarów na krowę (13,0 i 17,2%). Autorzy ci stwierdzili, że wymagane jest co najmniej 16 dni, aby podać wiarygodne szacunki.

Przy 45 do 50 pomiarach punktowych zarejestrowanych w ciągu 2 tygodni Arbre i in. (2016) oraz Renand i Maupetit (2016) uzyskali powtarzalność 0,78 i 0,73 dla szacunków DMPR odpowiednio dla 7 krów mlecznych i 124 jałówek mięsnych. Podobny współczynnik powtarzalności (0,74) uzyskali Huhtanen i in. (2015) z 25 krowami mlecznymi zarejestrowanymi w ciągu 3 tygodni, z 20 do 30 próbkami na krowę. Co ciekawe, ci ostatni autorzy zamontowali urządzenia do pomiaru stężenia gazu, przepływu powietrza i pozycji głowy w dwóch automatycznych systemach doju, które zostały użyte do pomiaru emisji CH₄ 59

krów mlecznych w dwóch okresach po 10 dni. Po przefiltrowaniu danych pod kątem dopuszczalnej pozycji głowy powtarzalność DMPR wyniosła 0,75.

Biorąc pod uwagę potrzebę uśrednienia wystarczającej liczby pomiarów punktowych i zaletę pomiaru DMPR w długim okresie, aby uwzględnić zmienność emisji w czasie, **system GEM powinien działać przez kilka tygodni**. Uśrednianie od 40 do 50 pomiarów punktowych na zwierzę powinno zapewnić dokładny pomiar DMPR zwierzęcia. Minimalny czas rejestrowania CH₄ będzie zależał od liczby pomiarów punktowych faktycznie zarejestrowanych w ciągu dnia.

System GEM opiera się na zwierzętach, które dobrowolnie odwiedzają jednostkę GEM, gdy są przyciągane granulami dozowanymi przez podajnik w kontrolowanym tempie. Częstotliwość odwiedzin wydaje się być bardzo zmienna w różnych zgłoszonych dotychczas badaniach. Podczas gdy niektóre eksperymenty wskazują na bardzo wysoką częstotliwość bytła odwiedzającego jednostki GEM (do 96%), odsetek nie odwiedzających zwierząt może być bardzo wysoki w innych badaniach (do 60%) (Dorich i in., 2015; Hammond i in. al, 2015A, 2015B; Arbre i in., 2016; Renand i Maupetit, 2016; Velazco i in., 2016; Waghorn i in., 2016). Powód, dla którego niektóre zwierzęta mogą nie odwiedzać jednostki, nie jest oczywisty. Ten problem braku lub niskiej częstotliwości odwiedzin może zagrozić dokładnemu rankingowi zwierząt na ich DMRP. Ich szkolenie jest ważnym warunkiem powodzenia oceny DMPR w systemie GEM (patrz zalecenia na stronie C-Lock). Smak granulatu wykorzystywanego do przyciągania bydła powinien być wysoki w porównaniu z dietą, którą otrzymują w korycie lub trawy, na której są wypasane.

Oprócz wpływu na precyzję, niska częstotliwość odwiedzin może mieć wpływ na dokładność, jeśli jest powiązana z niektórymi zwierzętami w określonym czasie odwiedzin. Emisje jelitowego CH₄ mają dobową zmienność z minimum pod koniec nocy, przed pierwszym karmieniem i stałym wzrostem po każdym karmieniu. Velazco i in. (2016) wykryli słaby dobowy rozkład emisji CH₄ przy użyciu systemów GEM. Renand i in. (2013) zaobserwował znaczące różnice między godzinami wizyt (CV=10%). Jeśli niektóre zwierzęta odwiedzają GEM w określonych godzinach dnia, przybliżona średnia pomiarów punktowych będzie

tendancyjna. Aby pozbyć się tego wpływu czasu na miarę DMPR, Dorich i in. (2015) oraz Hristov i in. (2016) opracowali protokół, w którym jednostki GEM były przenoszone kolejno z jednej krowy do następnej w ciągu kilku dni, aby wszystkie krowy były jednakowo mierzone w różnych godzinach dnia. Ten protokół jest możliwy tylko w przypadku bydła wiązane i oczywiście nie ma zastosowania do pomiaru dużej liczby zwierząt. Jednak w przypadku zwierząt kontrolowanych w ich środowisku produkcyjnym odchylenie generowane przez potencjalne specyficzne wzorce odwiedzin można faktycznie usunąć, jeśli godzina pomiaru jest uwzględniona w modelu liniowym przy szacowaniu efektu zwierzęcia.

Ponieważ w niektórych warunkach dobrowolne odwiedzanie systemu GEM może być czynnikiem ograniczającym, środki DMPR można zaprojektować, gdy zwierzęta piją lub jedzą, tj. kilka razy dziennie. Velazco i in. (2016) wykazali, że prototyp jednostki wodnej GEM zaprojektowany i zbudowany przez C-Lock Inc. wykazał inne wzorce odbijania w porównaniu ze zwykłą jednostką GEM. Doszli do wniosku, że dalszy rozwój wydaje się konieczny przed złożeniem wniosku. Troy i in. (2016) przetestowali system okapu CH₄ (MH) umieszczony powyżej automatycznego podajnika. System ten obejmuje wentylator wyciągowy dla każdego okapu z stale rejestrowanym przepływem powietrza. Stężenie metanu zmierzono za pomocą 4 analizatorów podczerwieni, jednego na 8 okapów. W tym układzie rejestrowano jedną wartość stężenia CH₄ co 6 minut. Przy średnio 9 do 12 zdarzeniach żywieniowych dziennie i wizytach żywieniowych trwających średnio 8 minut, odnotowano od 12 do 16 wartości stężenia CH₄ i obliczono wydajność dziennej produkcji CH₄. Pomiary rejestrowano przez 46 dni i badano ranking zwierząt w zależności od czasu trwania testu. Jednak nie podano żadnego współczynnika powtarzalności dla porównania z innymi metodami. System ten został porównany z wynikami komór oddechowych w dwóch eksperymentach z 82 i 80 wołami karmionymi różnymi kombinacjami diety i przy różnym postępowaniu. **W całym projekcie eksperymentu stwierdzono dobrą zgodność między wynikami MH i RC**, w wyniku czego obie metody wykryły podobne skutki dla efektów postępowania z dietą. Jednak nie podano żadnej korelacji między obiema metodami z próbkami postępowania dietetycznego, które są niezbędnymi informacjami potrzebnymi

do oceny zdolności tej nowej metody do przewidywania poszczególnych DMPR.

8.2.5 Wnioski i zalecenia

Dzięki tylko jednemu analizatorowi gazu dla 8 pojemników zasilających, czas zarejestrowania użytecznego stężenia CH₄ jest z pewnością zbyt krótki, aby uwzględnić kilka pików odbijania. Zainstalowanie jednego analizatora gazu na pojemnik zasilający połączy zalety czasu pomiaru podczas wizyt w systemie GEM z częstotliwością odwiedzin dozwoloną przez system MH.

8.2.6 MPR z PAC

Opóźnienie między pomiarem a ostatnim karmieniem musi być dokładnie monitorowane i brane pod uwagę przy obliczaniu wartości emisji przez zwierzę. Ponieważ rejestracja poszczególnych DMI jest trudna, bezpośredni pomiar wydajności CH₄ ($MY = MPR / DMI$) okazuje się niemożliwy. Chociaż nie jest reprezentatywna dla całodiennej wydajności, metoda ta może być zastosowana do scharakteryzowania indywidualnych poziomów emisji CH₄, jeśli zastosowane zostaną standardowe protokoły. Po raz pierwszy potwierdzono to z 40 owcami, którym robiono pomiary przez 1 godzinę w PAC, po trzech 22-godzinnych pomiarach w RC: znaleziono korelację 0,71 między dwiema miarami szybkości produkcji CH₄ w ciągu 1 lub 22 godzin (Goopy i in., 2011). 1-godzinna miara produkcji CH₄ w PAC ma umiarkowaną powtarzalność $rep = 0,50$ [0,37 do 0,60], jeśli zmierzy się ją w odstępie kilku od dni do siedmiu tygodni (Robinson i in., 2015; Goopy i in., 2016). Współczynnik odziedziczalności tego 1-godzinnego pomiaru produkcji CH₄ szacuje się na $h^2 = 0,12$ w populacji 2279 owiec (Robinson i in., 2014b) ze współczynnikiem powtarzalności $rep = 0,25$.

Wnioski i Rekomendacje

Autorzy zalecają użycie średniej z 3 pomiarów PAC w celu uzyskania dokładnych szacunków fenotypowych.

9 Wskaźniki pośrednie (*Proxies*)

9.1 Wprowadzenie

Pomiary na dużą skalę emisji jelitowego CH₄ przez krowy mleczne są potrzebne do skutecznego monitorowania strategii ograniczania śladu węglowego produkcji mleka, a także do włączenia emisji CH₄ do programów hodowlanych. Jednak pomiary w wystarczająco dużej skali są trudne i kosztowne. Wskaźniki pośrednie dla emisji CH₄ mogą stanowić alternatywę, ale każde podejście ma ograniczenia. Negussie i in. (2019) pokazali niedawno potencjał wskaźników pośrednich, które można łatwo zarejestrować w gospodarstwie. Te wskaźniki pośrednie można zebrać w większości gospodarstw i mają one realistyczną dokładność progową, którą można uzyskać bez bardziej wymyślnych informacji zastępczych. Opracowano kilka technik pomiaru emisji CH₄ od przeżuwaczy, z różnym stopniem dokładności (patrz przeglądy Cassandro i in., 2013 i Hammond i in., 2016A), ale rutynowe indywidualne pomiary na dużą skalę (wymagane dla selekcji genetycznej) okazały się trudne i kosztowne (Pickering i in., 2015; Negussie i in., 2016). Dlatego też identyfikacja wskaźników pośrednich (tj. wskaźników lub cech pośrednich), które są skorelowane z emisją CH₄, ale których rejestrowanie na dużą skalę jest łatwe i stosunkowo tanie, jest bardzo potrzebną alternatywą. Wskaźniki pośrednie mogą być mniej dokładne, ale mogą być mierzone wielokrotnie w celu zmniejszenia przypadkowych zakłóceń. (Potencjalne) wskaźniki pośrednie występują w zakresie od prostych i niedrogich pomiarów, takich jak masa ciała, przez wysokoprzepustowy MIR mleka, po bardziej wymagające pomiary, takie jak morfologia żwacza, metabolity żwacza lub profilowanie mikrobiomu.

Połączenie wskaźników pośrednich, które są łatwe do zmierzenia i tanie do zarejestrowania, może zapewnić prognozy emisji CH₄, które są wystarczająco dokładne do selekcji i zarządzania krowami o niskiej emisji CH₄.

9.2 Dostępne wskaźniki pośrednie

Zgłoszono duży wybór wskaźników pośrednich CH₄ różniących się znacznie dokładnością i możliwościami stosowania w różnych warunkach. Idealny

wskaźnik pośredni byłby wysoce fenotypowo i genetycznie skorelowany z emisjami CH₄ i mógłby być łatwo i potencjalnie wielokrotnie mierzony na dużą skalę. Konieczne jest systematyczne podsumowanie i ocena istniejącej wiedzy w celu identyfikacji solidnych i dokładnych pośrednich wskaźników CH₄ do wykorzystania w przyszłości. Tabela 6 podsumowuje wartości wskaźników pośrednich produkcji CH₄, a Tabela 7 podsumowuje wyniki z połączenia wskaźników pośrednich w celu poprawy przewidywalności wskaźników do prognozowania CH₄.

Tabela 6. Dostępne wskaźniki pośrednie metanu obejmują: (1) pobieranie paszy i zachowanie podczas karmienia, (2) funkcję żwacza, metabolity i mikrobiom, (3) produkcję i skład mleka, (4) jelito i kał oraz (5) pomiary w poziom całego zwierzęcia.

Wskaźnik	Opis / konkluzja	Literatura
(1) pobieranie paszy i zachowanie podczas karmienia		
Pobranie suchej masy	Przewidywanie DMI: MeP z R ² = 0.06-0.64, oraz przewidywanie pobrania ME: MeP z R ² = 0.53-0,55	Ellis et al. (2007); Mills et al. (2003); Negussie et al. (2019)
Pobieranie energii brutto (GE)	przewidywanie MeP z RMSPE= 3.01	Moreas et al. (2014)
Zachowanie podczas karmienia	wielkość i kierunek relacji do MeP różnią się w zależności od badania	Nkrumah et al. (2006); Jonker et al., 2014
Czas przeżuwania	Silne przeżuwanie odnosi się do większej ilości mleka, spożywa więcej koncentratu i wytwarza więcej CH ₄ , niższe RMP i MeI	Watt et al. (2015); López-Paredes et al. (2020)
Mikrobiom żwacza	Metagenom może przewidywać DMI i klasyfikować wysokie vs. niskie spożycie	Delgado et al. (2019)

Wskaźnik	Opis / konkluzja	Literatura
(2) funkcja żwacza, metabolity i mikrobiom		
związki antymetanogenne w diecie	Inhibitory enzymu reduktazy koenzymu-M: bromochorometan; chloroform; 3-nitrooksypropanol (nie zawsze)	Denman et al., 2007; Knight et al., 2011; Haisan et al., 2014; Romero-Perez et al., 2014, 2015
Związki przeciwdrobnoustrojowe w diecie	Powodują zmniejszenie zarówno liczby MeP, jak i metanogenów: azotany, kwas anakardowy (płyn z łupin orzechów nerkowca),	Iwamoto et al., 2002; Kubo et al., 1993; van Zijderveld et al., 2010; Veneman et al., 2015; Shinkai et al.,
Profil mikrobiomu żwacza	Wysokie Fibrobacteres, Quinella ovalis i Veillonellaceae oraz niskie Ruminococcaceae, Lachnospiraceae i Clostridiales wiążą się z fenotypami o niskim CH ₄ i z wysokim stężeniem pierwotniaków propionianowych	Kittelmann et al., 2014; Wallace et al., 2014; Sun et al., 2015 Guyader et al., 2014
	przewidywanie MeP z R ^s do 0,55	Ross et al. 2013a; Ross et al. (2013b)
Geny drobnoustrojów	20 (spośród 3970 zidentyfikowanych) związanych z emisjami CH ₄	Roehe et al. (2016)
Objętość żwacza (rentgenowska tomografia komputerowa) i czas retencji	Owce o niskiej MeY miały mniejsze żwacze. Szybsze przejście = mniej czasu na fermentację substratu - wyjaśniono 28% zmienności MeP	Pinares Patino et al., 2003; Goopy et al., 2014; Okine et al. (1989)
stężenie trijodotyroniny we krwi	zredukowane MeY	Barnett et al. (2012)

Wskaźnik	Opis / konkluzja	Literatura
Stosunek octanów do propionianów w płynie ze żwacza	pozytywnie powiązane z emisjami CH ₄ , ale nie potwierdzone we wszystkich badaniach, czasem odwrotna zależność	Mohammed et al., 2011; Fievez et al., 2012; Chung et al., 2011; Van Zijderveld et al., 2010
(3) produkcja i skład mleka		
podejście do modelowania	Podwojenie produkcji mleka dodaje tylko 5 kg do MeP, co znacznie zmniejsza MeY	Kirchgessner et al. (1995); Hristov et al. (2014)
zawartość tłuszczu mlecznego	kluczowa zmienna objaśniająca do przewidywania CH ₄ : umiarkowana ujemna korelacja genetyczna z przewidywaną w podczerwieni MeI: korelacje MeP = 0,08 i MeI = - 0,13	Moreas et al. (2014); Kandel et al., 2014A, B; Vanlierde et al. (2015)
	Oczekiwany jest pozytywny związek między proporcjami VFA a metanogenezą jako konsekwencja wspólnych szlaków biochemicznych; Dietetyczne nienasycone kwasy tłuszczowe są negatywnie związane z emisją CH ₄	Vlaeminck et al., 2006; Van Lingen et al., 2014
Wydajność białka mleka	Korelacja z MeI=-0.47 lub -0.09, MeP=0.53	Kandel et al. (2014); Vanlierde et al. (2015)
Laktoza	Zmienne korelacje: MeP = 0,33; MeI = -0,21; R = 0,19 dla emisji CH ₄	Miettinen and Huhtanen (1996); Dehareng et al. (2012)
Ocena komórek somatycznych	Korelacja genetyczna z przewidywaną podczerwienią MeI: R = 0,07	Kandel et al. (2014A, B)

Wskaźnik	Opis / konkluzja	Literatura
Równania prognostyczne emisji mleka FA i CH ₄ , w tym z danych MIR	R ² mieścił się w zakresie od 47 do 95%; relacje między poszczególnymi FA mleka i MeP znacznie się różniły, a korelacje między CH ₄ i FA mleka różnią się w trakcie laktacji	Chilliard et al. (2009); Delfosse et al. (2010); Castro-Montoya et al. (2011); Dijkstra et al. (2011); Kandel et al. (2013) Mohammed et al. (2011); Van Lingen et al. (2014); Williams et al. (2014); Dijkstra et al. (2016); Rico et al. (2016); Van Gastelen and Dijkstra (2016); Vanrobays et al. (2016); Bougoin et al., (2019)
(4) jelito i kał		
Strawność całego przewodu pokarmowego (potencjalnie jako czynniki wspierające w prognozowaniu emisji CH ₄ jelitowego)	Główne efekty dotyczą żywca (patrz powyżej), ale strawność energii jako czynnik wspierający spożycie GE poprawiła dokładność prognozowania CH ₄ , pomimo faktu, że nie było bezpośredniego liniowego związku między strawnością energii i MeY oraz w% spożycia GE	Yan et al., 2009c
Stosunek kwasu octowego i masłowego podzielony przez kwas propionowy	Relacja wydajności metanu dodatnia	Moss et al., 2000

Wskaźnik	Opis / konkluzja	Literatura
(5) Pomiary całego zwierzęcia		
Masa ciała i pokrój	modele prognostyczne; główny predyktor dla jelitowego MeP	Moraes et al. (2014); Holter and Young, 1992; Yan et al., 2009
Masa ciała	Związek z MeI: $r = 0,44$; związek między masą ciała a pojemnością żwacza	Antunes-Fernandes et al. (2016); Demment and Van Soest, 1985
Masa ciała	Kluczowa zmienna objaśniająca dla jelitowego MeP	No reference available
Cechy pokroju: wpływające na jelitowe MeP	wskaźniki objętości żwacza (poprzez spożycie paszy i wskaźniki pasażowania żwacza); BCS	Agnew and Yan, 2000
Stadium laktacji	Wskaźnik uzupełniający	Vanlierde et al. (2015)

Oczywiste jest, że żaden pojedynczy wskaźnik pośredni nie oferuje dobrego rozwiązania pod względem wszystkich tych atrybutów, chociaż niski koszt i wysoka przepustowość sprawiają, że MIR mleka jest dobrym kandydatem do dalszej pracy nad metodami poprawiania, ulepszania kalibracji i badania kombinacji z innymi wskaźnikami pośrednimi.

9.3 Łączenie wskaźników pośrednich metanu

Chociaż MIR mleka okazuje się obiecujący jako pojedynczy wskaźnik emisji CH_4 , zastosowanie dwóch lub więcej wskaźników pośrednich może być korzystne. Istnieją dwa potencjalne powody, dla których kombinacja wskaźników pośrednich może być odpowiednia: (i) wskaźniki pośrednie mogą opisywać niezależne źródła zmienności emisji CH_4 oraz (ii) jeden wskaźnik pośredni umożliwia korektę niedociągnięć w sposobie, w jaki drugi wskaźnik pośredni opisuje emisję CH_4 (np. uwzględnia etap laktacji, jeżeli współczynniki prognozowania emisji CH_4 zmieniają się podczas laktacji). Patrz także Negussie i in. (2019).

Tabela 7. Kombinacje wskaźników pośrednich metanu.

Kombinacje wskaźników pośrednich	Wyniki	Literatura
Mikrobiom żwacza + VFA	Połączenie proporcji VFA w żwaczu i modelowania pH +	Brask et al. 2015
Obfitość metanu w płynie z żwacza + wskaźnik pośredni, chemiczny marker		McCartney et al. (2013)
Eter lipidów kałowych (stosunek dieterów do lipidów tetraeterowych) + pH żwacza	Łączenie pomiarów VFA w żwaczu, pH i mikrobiomu powinno dać więcej informacji w przewidywaniu emisji CH ₄	McCartney et al. (2014); Ann et al., 1996
Pobieranie paszy (zależy od masy ciała, poziomu produkcji, tempa wzrostu i jakości paszy)	Główny czynnik napędzający emisje CH ₄ ; powinny być uwzględnione w modelach dla CH ₄	Moraes et al. 2014,
DMI i skład diety	Połączona baza danych, aby przewidzieć CH ₄	Niu et al., 2018; Van Lingen et al., 2019
Gama równań predykcyjnych dla produkcji CH ₄	Pobranie paszy = główny predyktor całkowitej produkcji CH ₄ (stanowił od 52 do 64%); Połączenie większej liczby czynników rzeczywiście poprawiło równanie predykcji o 15 do 35%	Ramin and Huhtanen (2013); Knapp et al., 2015; Sauvant and Nozière (2016)

Kombinacje wskaźników pośrednich	Wyniki	Literatura
Pomiary żwacza (VFA, pH, liczba pierwotniaków) + pobranie paszy (całkowite DMI, pobranie paszy i pobranie FA) + parametry produkcji (wydajność i skład mleka) + FA mleka	Sugerują, że FA mleka lepiej prognozuje emisję CH ₄ (R ² = 0,74) w porównaniu do zmiennych w żwaczu, pobrania paszy i parametrów produkcji (R ² <0,58). Suma kombinacji: R ² = 0,90	Mohammed et al. (2011)
Modelowanie	konieczne może być opracowanie określonych równań predykcji lub kompozycja diety może wymagać włączenia do równań predykcji	Mohammed et al. (2011)
Pobranie paszy + skład diety + produkcja mleka + mleko FA	Równania predykcji CH ₄ : najlepsze dopasowanie = połączenie FA mleka, pobrania paszy, składu diety i produkcji mleka (R ² = 0,84)	Rico et al. (2016); Bougoin et al. (2019)

Kombinacje wskaźników pośrednich	Wyniki	Literatura
MIR + stadium laktacji	Spektroskopia MIR (współczynnik determinacji = 0,68 i 0,79), przewidywania na różnych etapach laktacji nie były znaczące biologicznie + etap laktacji udoskonalił model: wykazując zachowanie o znaczeniu biologicznym podczas laktacji: wzrost produkcji CH ₄ po wycieleniu do około 100 DIM, następnie następuje stopniowy spadek pod koniec laktacji	Dehareng et al. (2012); Vanlierde et al. (2015)
Wydajność mleka, procent tłuszczu + cechy typu	Połączyć bazę danych, aby przewidzieć CH ₄ , używając oficjalnego systemu oceny użyteczności mlecznej i oceny pokroju.	Cassandro et al., (2010; Cassandro, 2013)

9.4 Budowanie indeksu dla metanu

W przypadku niektórych wskaźników pośrednich odziedziczalność i korelacje z wydzielanym CH₄ są znane: np. Vanrobays i in. (2016) oszacowali odziedziczalność na 0,25 dla produkcji CH₄ (g / d) oraz w przedziale 0,17 - 0,42 dla różnych klas mleka FA; korelacje fenotypowe i genetyczne między MeP a mlekiem FA wahały się odpowiednio między -0,03 a 0,16 oraz między -0,02 a 0,32 (C18: 0). Korelację genetyczną między MI a wydajnością mleka oszacowali Dehareng i in. (2012) na -0,45; Korelację genetyczną między wydajnością mleka a procentem białka oszacowano na -0,54 (Miglior i in. 2007). Dałoby to korelację genetyczną między Mel a procentem białka w przedziale [-0,5, 0,9], z bardziej prawdopodobnymi wartościami dla korelacji dodatnich. Następnie można oszacować najbardziej prawdopodobną wartość w

danym zakresie (na podstawie wcześniejszego rozkładu brakującej korelacji i łącznego prawdopodobieństwa dwóch znanych korelacji, biorąc pod uwagę wartości w tym zakresie). Takie dane mogą w przyszłości zostać wykorzystane do opracowania indeksu dla emisji CH₄.

10 Dyskusja na temat wskaźników pośrednich

Największym ograniczeniem wskaźników pośrednich jest dziś brak solidności w ich ogólnym zastosowaniu. Dlatego przyszłe wysiłki powinny być ukierunkowane na opracowanie kombinacji wskaźników pośrednich, które są solidne i można je stosować w różnych systemach produkcyjnych i w różnych środowiskach. Prezentujemy tutaj obecny stan wiedzy o wskaźnikach pośrednich i ich wartości predykcyjnej dla emisji CH₄. Wskaźniki pośrednie związane z masą ciała lub wydajnością i składem mleka są stosunkowo proste, tanie, o wysokiej wydajności i są łatwe do wdrożenia w praktyce.

W szczególności DMI i MIR mleka, a także zmienne towarzyszące, takie jak stadium laktacji, stanowią obiecującą opcję przewidywania emisji CH₄ u krów mlecznych. Nie znaleziono jednego wskaźnika pośredniego, który dokładnie przewidziałby CH₄, podczas gdy kombinacje dwóch lub więcej wskaźników pośrednich są prawdopodobnie lepszym rozwiązaniem. Łączenie wskaźników pośrednich może zwiększyć dokładność prognoz nawet o 15–35%, głównie dlatego, że różne wskaźniki pośrednie opisują niezależne źródła zmienności w CH₄, i jeden wskaźnik pośredni może poprawić niedociągnięcia innych. Jedną z możliwych strategii może być zwiększenie wydajności produkcyjnej zwierząt przy jednoczesnym zmniejszeniu emisji CH₄ na zwierzę. Można to osiągnąć poprzez zmniejszenie MeY i / lub zmniejszenie DMI, pod warunkiem, że nie nastąpi jednoczesne zmniejszenie wydajności lub zwiększenie pobrania paszy (Pickering i in., 2015).

10.1 Łączenie pomiarów opartych na diecie z innymi wskaźnikami pośrednimi emisji metanu.

Pobranie paszy wydaje się być wystarczającym predyktorem MeP: ogólnie cięższe zwierzęta mają wyższe wymagania dotyczące utrzymania, więc jedzą więcej i produkują więcej CH₄. Jednak znaczny poziom zmienności nie został

uwzględniony. Sugeruje to, że potrzebne są bardziej szczegółowe informacje na temat składu diety. Jest to również ważne, gdy chce się uwzględnić MeP w dietach o podobnym DMI, ale o różnych profilach odżywczych.

Dokładność prognoz MeP bardzo zależy od dokładności kwantyfikacji VFA wytwarzanego w żwaczu (Alemu i in., 2011). Rodzaj VFA powstającego podczas fermentacji w żwaczu zależy od rodzaju fermentowanego substratu (Bannink i in., 2011), takiego jak zawartość dietetyczna neutralnego błonnika detergentowego i skrobi. Rodzaj fermentowanego substratu wydaje się zatem użytecznym czynnikiem do przewidywania MeP (Ellis i in., 2007), wskazując, że włączenie opisu zmiany jakości diety spowodowanej czynnikami odżywczymi skutkuje poprawą dokładności prognozowania emisji CH₄ (Ellis i in., 2010; Moraes i in., 2014).

10.2 Żwacz

Gdy pobieranie paszy jest utrzymywane na stałym poziomie, wyższa pojemność żwacza powoduje niższy wskaźnik pasażowania (Demment i Van Soest, 1985), co skutkuje wyższym MeP (Moraes i in., 2014). Wskaźniki pośrednie oparte na próbkach ze żwacza są na ogół słabymi lub średnio dokładnymi predyktorami CH₄ oraz są kosztowne i trudne do rutynowego pomiaru w gospodarstwie VFA są wskaźnikiem emisji CH₄ w żwaczu. Wykorzystując dane z fermentacji żwacza uzyskane z produkcji gazu in vitro, Moss i in. (2000) podali ujemną liniową zależność między produkcją CH₄ a stosunkiem (kwas octowy + kwas masłowy) / kwas propionowy. Jednak łącząc różne źródła informacji, zarówno związane z pobieraniem paszy, jak i wpływem przyjmowania paszy na skład VFA, można uzyskać lepszy wskaźnik zastępczy z większą dokładnością. W ten sposób można zoptymalizować równanie predykcyjne dla produkcji CH₄ (wyższa dokładność).

Związek między ilością metanu w żwaczu a metanogenezą jest mniej wyraźny, gdy zmiany w emisjach jelitowego CH₄ są modulowane przez dietę lub są konsekwencją wyboru fenotypów związanych z wydajnością paszy lub MeY. Podczas gdy w niektórych raportach istniał istotny pozytywny związek (Aguinaga Casanas i in., 2015; Arndt i in., 2015; Sun i in., 2015; Wallace i in.,

2015), w wielu innych stężenie metanogenów nie było ze sobą powiązane z metanogenezą (Morgavi i in., 2012; Kittelmann i in., 2014; Shi i in., 2014; Bouchard i in., 2015). Bouchard i in. (2015) zgłosił nawet zmniejszenie ilości metanogenów bez znaczącego spadku MeP u wołów karmionych kiszonką z sainfoin. Owce wybrane ze względu na wysokie lub niskie MeY nie wykazywały różnic w ilości metanogenów, chociaż istniała silna korelacja z ekspresją genów archeonów zaangażowanych w metanogenezę (Shi i in., 2014).

Jelito grube i kał: zmienne strawności całego przewodu pokarmowego nie mogą służyć jako podstawowe czynniki predykcyjne dla jelitowego MeP u bydła lub owiec, ale mogą być wykorzystane jako czynniki wspierające w celu poprawy dokładności prognozowania produkcji CH₄.

10.3 Pierwotniaki i inne drobnoustroje żwaczowe

Pierwotniaki są producentami netto H₂, a ich brak w żwaczu wiąże się ze średnim zmniejszeniem MeP w jelitach o około 11% (Hegarty, 1999; Morgavi i in., 2010; Newbold i in., 2015). Korzystając z bazy danych zawierającej 28 eksperymentów i 91 postępowań dietetycznych, Guyader i in. (2014) wykazali znaczny spadek o 8,14 g CH₄ / kg DMI na każde zmniejszenie jednostki logarytmicznej w obfitości pierwotniaków w żwaczu. Około 21% eksperymentów w tym zbiorze danych zgłosiło zmiany CH₄ niezwiązane z liczebnością pierwotniaków, podkreślając wieloczynnikową naturę metanogenezy.

Roehe i in. (2016) zauważyli, że ranking grup ojców pod względem emisji CH₄ mierzonych w komorach oddechowych był taki sam jak w rankingu pod względem stosunku archeonów do bakterii, co stanowi kolejny dowód na to, że kontrola liczebności archeonów przez żywiciela przyczynia się do zmienności genetycznej emisji CH₄ - przynajmniej w niektóre okoliczności. Wykazano, że archeony metanogeniczne na szerokim obszarze geograficznym są wysoce zachowane na całym świecie (Henderson i in., 2015). Ta uniwersalność i ograniczona różnorodność mogą umożliwić ograniczenie emisji CH₄ poprzez opracowanie strategii ukierunkowanych na kilka dominujących metanogenów. Jednak jednym wyraźnym ograniczeniem prognoz metagenomicznych

w porównaniu do prognoz genomowych było to, że mikrobiom gospodarza jest zmienny - to znaczy, że może się zmieniać w odpowiedzi na dietę lub inne czynniki środowiskowe w czasie, podczas gdy DNA gospodarza pozostaje stałe.

10.4 Geny drobnoustrojów w żwaczu

Obejmowały one geny zaangażowane w pierwszy i ostatni etap metanogenezy: podjednostkę B dehydrogenazy formylometanofuranu (fmdB) i podjednostkę alfa reduktazy metylo-M (mcrA), które były 170 razy bardziej obfite u bydła emitującego wysoki CH₄. Podczas gdy metagenomika zorientowana na gen nie jest tania ani wysokoprzepustowa, wyniki te wskazują na potencjalne przyszłe podejścia wskaźników pośrednich z wykorzystaniem tanich chipów genowych.

Różnica w aktywności ekspresji genów w porównaniu z liczebnością była również zgłaszana przez innych (Popova i in., 2011). Istnieją jednak badania, w których nie stwierdzono związku z ekspresją genów (Aguinaga Casanas i in., 2015). Istnieją pewne różnice metodologiczne i eksperymentalne, które mogą wyjaśnić niektóre z widocznych sprzeczności, takie jak rodzaj celu genu i startery stosowane do amplifikacji kwasu nukleinowego. Efekty są najwyraźniej widoczne, gdy różnica w MeP między grupami zwierząt jest duża (np. Wallace i wsp. (2015) zastosowali zabiegi, które wygenerowały 1,9-krotną różnicę emisji CH₄).

10.5 Wskaźniki pośrednie oparte o pomiary w mleku

Sama wydajność mleka nie zapewnia dobrego prognozowania MeP przez krowy mleczne. Yan i in. (2010) wskazali, że CH₄ jako procent spożycia GE lub produkcji energii mlecznej był negatywnie związany z produkcją mleka. Mniej jasne jest, czy MeY można przewidzieć na podstawie wydajności mleka podczas dokonywania porównań między badaniami.

Spektroskopia MIR mleka jest stosunkowo niedrogą, szybką i już rutynowo stosowaną technologią w systemach oceny użytkowości mlecznej, służącą do przewidywania zawartości tłuszczu, białka, laktozy i mocznika w mleku zwierząt mlecznych w celu wspomaganie decyzji kierownictwa gospodarstwa i hodowli.

Można ją wykorzystać jako obiecującą strategię wykorzystania powiązania między emisją jelitowego CH₄ przez przeżuwacze a trawieniem drobnoustrojów w żwaczu poprzez ocenę sygnatury trawienia w składzie mleka. Dane MIR mleka można uzyskać za pośrednictwem regularnych systemów oceny użyteczności mlecznej, a także na poziomie stada, poprzez analizę stosowaną w systemach płatności za mleko. Różne fenotypy mleka można uzyskać za pomocą spektrometrii MIR - w tym szczegółowy skład mleka (np. FA, jak donosi Soyeurt i in., 2011), właściwości technologiczne mleka i stan fizjologiczny krowy (De Marchi i in., 2014; Gengler i in. , 2016). Kilka z tych nowych cech (tj. skład FA) zidentyfikowano jako potencjalne wskaźniki emisji CH₄. Dlatego stosowanie MIR do przewidywania MeP (Dehareng i in. 2012; Vanlierde i in. 2013, 2015; Van Gastelen i Dijkstra, 2016) jest również logicznym rozszerzeniem jego zastosowania do oceny ilościowej głównych składników mleka (tj. tłuszczu, białka, kazeiny, laktoza i mocznik) i drobnych składników (np. FA). Dehareng i in. (2012) ocenili wykonalność przewidywania indywidualnej MeP od krów mlecznych za pomocą widm MIR mleka. Wstępne wyniki sugerują, że takie podejście może być przydatne do przewidywania MeP w skali gospodarstwa lub regionu, a także do identyfikacji krów emitujących małe ilości CH₄. Według Van Gastelen i Dijkstry (2016) spektroskopia MIR ma tę wadę, że ma umiarkowaną moc predykcyjną dla emisji CH₄, zarówno bezpośrednią, jak i pośrednią (tj. poprzez mleko FA), i że nie ma możliwości przewidzenia ważnego FA mleka dla przewidywania CH₄. Doszli do wniosku, że przewidywanie MeP na podstawie samego MIR może nie być wystarczające. Można jednak poprawić dokładność prognozowania poprzez połączenie MIR z niektórymi cechami zwierząt, takimi jak stadium laktacji (Vanlierde i in., 2015). Zaletą tego ostatniego rozwiązania jest to, że tego typu prognozowanie można przeprowadzić na bardzo dużą skalę w rutynowym systemie oceny użyteczności mlecznej (Vanlierde i in., 2015).

10.6 Wskaźniki pośrednie: przyszły rozwój i perspektywy

Obecnie istnieje ograniczona zgoda co do tego, który fenotyp zastosować do obniżenia śladu węglowego produkcji mleka poprzez selekcję genetyczną. Może to być MeP, MeI lub MeY. Bezpośrednim celem byłaby produkcja CH₄;

związek z produkcją mleka i / lub spożyciem paszy można uwzględnić, włączając je do indeksu lub programu ostatecznej selekcji. Można jednak argumentować, że bardziej efektywnym / dokładnym byłoby bezpośrednio wykorzystanie CH_4 z korekcją na produkcję mleka lub pobranie paszy (np. intensywność lub wydajność CH_4) jako celu hodowlanego.

Analiza wskaźników pośrednich pod względem ich atrybutów pokazuje, że wskaźniki pośrednie oparte na próbkach ze żwacza lub związane ze źródłami żwacza są słabymi lub średnio dokładnymi predyktorami CH_4 . Ponadto te wskaźniki pośrednie są zbyt kosztowne i trudne do rutynowego wdrożenia w gospodarstwie. Z drugiej strony, przybliżenia związane z BW, wydajnością i składem mleka (np. FA mleka) są umiarkowanymi do bardzo dokładnych predyktorami CH_4 oraz stosunkowo proste, tanie i łatwiejsze do wdrożenia w praktyce (Cassandro i in., 2010; Cassandro, 2013). W szczególności MIR mleka i prognoza CH_4 na podstawie MIR mleka wraz z innymi zmiennymi towarzyszącymi, takimi jak stadium laktacji, jest obiecującą alternatywą: jest dokładna, tańsza i łatwa do wdrożenia w rutynowej analizie mleka bez dodatkowych kosztów.

Dlatego w przyszłości postępy w technologii podczerwieni, fotoakustycznej i pokrewnych przekroczą granice, szczególnie w zakresie rozwoju szybkich i przenośnych technologii. Takie zmiany doprowadzą do lepszych i obiecujących wskaźników pośrednich dla CH_4 , które umożliwią znaczną przepustowość fenotypów CH_4 u krów mlecznych.

Antunes-Fernandes i in. (2016) przedstawili już zastosowanie metabolomiki w mleku, aby lepiej zrozumieć szlaki biologiczne zaangażowane w produkcję CH_4 u bydła mlecznego. Techniki zastosowane w tym badaniu nie są odpowiednie do pomiarów na dużą skalę, ale szybki rozwój omiki może zaoferować testy i metodologie na próbkach krwi, moczu lub mleka, które zapewnią dodatkowe narzędzie do opracowania nowych / dodatkowych wskaźników emisji CH_4 u bydła mlecznego.

11 Wnioski

Pomiar emisji CH₄ u dużej liczby krów jest wyzwaniem. Wysokie koszty i niska przepustowość RC ograniczają ich zastosowanie do badań naukowych mierzących emisje CH₄ na niewielkiej liczbie pojedynczych zwierząt. Komory oddechowe pozostają metodą złotego standardu, ale porównywanie metod alternatywnych z RC jest trudne, ponieważ jednoczesne pomiary w odniesieniu do krowy nie są możliwe. Metody takie jak SF₆ i GreenFeed wymagają niższych nakładów inwestycyjnych i kosztów bieżących niż RC, a także mają wyższą przepustowość i potencjał do wykorzystania w sytuacjach ekstensywnych i pastwiskowych, ale koszty są wciąż zbyt wysokie w przypadku rejestrowania dużej liczby zwierząt. Metody oparte na stężeniu są mniej precyzyjne i dokładne niż metody strumieniowe, ale nadają się do pomiaru na dużą skalę, co jest warunkiem oceny genetycznej. Konieczny jest dalszy rozwój w celu zwiększenia dokładności i precyzji metod koncentracji. W kilku przeglądach metod pomiaru CH₄ dokonano ocen jakościowych na podstawie indywidualnych badań porównawczych, bez rozszerzania zakresu na oceny genetyczne i rozważania korelacji między powtarzanimi pomiarami między metodami, jako przybliżeń korelacji genetycznych. Wyniki potwierdzają, że istnieje wystarczająca korelacja między metodami, aby wszystkie mogły zostać połączone w międzynarodowych badaniach genetycznych, i zapewniają bardzo potrzebne ramy do porównywania korelacji genetycznych między metodami, gdyby zostały one udostępnione. Wskaźniki pośrednie mogą zostać wykorzystane jako predyktory produkcji i emisji CH₄. Chociaż wskaźniki pośrednie są mniej dokładne niż bezpośrednie pomiary CH₄, mogą być łatwiejsze, tańsze i charakteryzują się dużą przepustowością, a zatem mogą być najlepszą metodą w praktycznych sytuacjach, zwłaszcza wskaźniki związane z pomiarami w mleku. Dlatego te wskaźniki pośrednie na poziomie populacji mogą dostarczyć użytecznych informacji na temat doskonalenia genetycznego, które można wykorzystać do zmniejszenia emisji na trzy sposoby: (1) intensyfikacja produkcji zwierzęcej; (2) poprawa wydajności systemu i (3) bezpośrednia redukcja emisji gazów cieplarnianych poprzez hodowlę dla zwierząt o ograniczonej prognozie, które emitują wysokie lub niskie poziomy gazów cieplarnianych.

12 Scalanie i udostępnianie danych w ocenach genetycznych

Parametry genetyczne dla CH₄ przy użyciu zestawu danych obejmującego wiele krajów

Na początku 2016 r. podjęto próbę przeprowadzenia oceny między krajami emisji CH₄ przez bydło mleczne Holstein. Prace oparto na danych z NL, DK, AUS, UK i IR. W sumie dostępnych było 12820 tygodniowych zapisów emisji CH₄ od 2857 krów. Chociaż w różnych krajach do pomiaru emisji CH₄ stosowano różne urządzenia, badania miały na celu zdefiniowanie podobnych fenotypów wydzielania CH₄ w każdym kraju. Analizowane cechy CH₄, które są dostępne w każdym kraju, to (1) produkcja CH₄ w g/d oraz (2) intensywność CH₄ w g / d na kg mleka z korekcją białka tłuszczowego (FPCM). Oprócz tych cech CH₄, stężenie CH₄ (w ppm) było dostępne w Danii, Holandii i Wielkiej Brytanii, a stosunek między CH₄ a stężeniem CO₂ był dostępny w Danii i Holandii.

Przeprowadzono analizy dwuczynnikowe w celu oszacowania korelacji genetycznych między krajami, stosując model mieszany liniowy dla wszystkich cech zwierząt. Zarówno GRM, jak i analizy jedno- i dwuczynnikowe zostały powtórzone. W przypadku wszystkich zapisów tygodniowych standaryzacja cechy w pełnym zbiorze danych zwiększyła odziedziczalność produkcji CH₄ z 0,03 do 0,06. Odziedziczalność dla intensywności CH₄ była nieco wyższa. Najwyższą odziedziczalność z pełnym zestawem danych szacuje się dla znormalizowanego stężenia CH₄ (0,19). Korelacje oszacowane między cechami CH₄ oszacowanymi zarówno z rodowodem, jak i GRM były w tym samym kierunku i podobnej wielkości. Korelacje genetyczne pokazują, że wraz ze wzrostem produkcji CH₄ wzrasta również stężenie CH₄ i stosunek między CH₄ a CO₂.

Podejście to jest nowatorskie i nie podjęto żadnej innej próby dokonania analizy genetycznej cech CH₄ w różnych krajach. Analiza może zostać powtórzona w przyszłych badaniach, w których, miejmy nadzieję, będzie dostępnych więcej danych, i można będzie włożyć więcej wysiłku w poprawę zarówno stałej, jak i

losowej części modelu.

13 Zalecenia

Najważniejsze pytanie: jakiej metody użyć, jeśli chcesz zmierzyć CH₄?
Odpowiedź może brzmieć: zależy to od tego, co lubisz robić. W Tabeli 8 podsumowujemy niektóre warunki i projekty eksperymentalne oraz przedstawiamy zalecenia.

Tabela 8. Zalecenia dotyczące pomiaru metanu w różnych warunkach i projektach eksperymentalnych.

Warunki eksperymentu i projekt	Zalecenia dotyczące metody pomiaru metanu
Konieczność pomiaru bezwzględnych wartości metanu - liczba zwierząt i lokalizacja nie są ważne	Komora oddechowa ; SF6; GreenFeed
Konieczność uszeregowania zwierząt od niskiej do wysokiej emisji metanu	metoda "węszenia"
Konieczność pomiaru metanu w gospodarstwie	metoda "węszenia"; GreenFeed; PAC
Potrzebne są pomiary niskobudżetowe	Wskaźniki pośrednie / pomiar wskaźników pośrednich
Wymagana duża liczba zwierząt	metoda "węszenia"; pomiar wskaźników pośrednich ; LMD

14 Podziękowania

Niniejszy dokument jest wynikiem pracy Grupy Roboczej ICAR ds. Pasz i Gazu oraz jej grupy łączącej przemysł i badania. Grupy Roboczej ICAR ds. Pasz i Gazu w momencie publikacji w kolejności alfabetycznej:

- Christine Baes, Department of Animal Biosciences, University of Guelph, Canada and Institute of Genetics, Vetsuisse Faculty, University of Bern, Switzerland
- Yvette de Haas, Animal Breeding and Genomics, Wageningen Livestock Research

- Raffaella Finocchiaro, ANAFI, Italy
- Phil Garnsworthy, School of Biosciences, University of Nottingham, United Kingdom
- Birgit Gredler-Grandl, Animal Breeding and Genomics, Wageningen Livestock Research
- Nina Krattenmacher, Institute of Animal Breeding and Husbandry, Christian-Albrechts-University, Germany
- Jan Lassen, Viking Genetics, Denmark
- Jennie Pryce, Centre for AgriBioscience, AgriBio, Agriculture Victoria Research and School of Applied Systems Biology, La Trobe University, Australia
- Roel Veerkamp, Animal Breeding and Genomics, Wageningen Livestock Research (chairperson)

Praca Marinus te Pas (Animal Breeding and Genomics, Wageningen Livestock Research) przy opracowywaniu wersji roboczych jest bardzo doceniana. Treść wytycznych częściowo opiera się na wynikach sieci ekspertów o międzynarodowej renomie w ramach działania METHAGENE COST FA1320.

15 Literatura

- 1) Adolph, S.C., and Hardin, J.S. 2007. Estimating phenotypic correlations: Correcting for bias due to intraindividual variability. *Funct. Ecol.* 21:178-184. doi:10.1111/j.1365-2435.2006.01209.x.
- 2) Agnew, R.E. and Yan, T. 2000. The impact of recent research on energy feeding systems for dairy cattle. *Livest. Prod. Sci.* 66:197-215.
- 3) Aguinaga Casanas, M.A., , N., Krattenmacher, N., Thalle,r G., Metges, C.C., and Kuhla, B. 2015. Methyl-coenzyme M reductase A as an indicator to estimate methane production from dairy cows. *J. Dairy Sci.* 98:4074-4083.
- 4) Alemu, A.W., Dijkstra, J., Bannink, A., France, J., and Kebreab, E. 2011. Rumen stoichiometric models and their contribution and challenges in predicting enteric methane production. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166-167:761-778.
- 5) Van Kessel, J.A.S., and Russell, J.B. 1996. The effect of pH on ruminal methanogenesis. *FEMS Microbiol. Ecology.* 20:205-210.
- 6) Antunes-Fernandes, E.C., van Gastelen, S., Dijkstra, J., Hettinga K.A., and Vervoort, J. 2016. Milk metabolome relates enteric methane emission to milk synthesis, and energy metabolism pathways. *J. Dairy. Sci.* 99:6251-6262.
- 7) Arbre, M., Rochette, Y., Guyader, J., Lascoux, C., Gómez, L.M., Eugène, M., Morgavi, D.P., Renand, G., Doreau, M. and Martin, C. 2016. Repeatability of enteric methane determinations from cattle using either the SF6 tracer technique or the GreenFeed system. *Anim. Prod. Sci.* 56:238-243.
- 8) Arndt, C., Powell, J.M., Aguerre, M.J., Crump, P.M., and Wattiaux, M.A. 2015. Feed conversion efficiency in dairy cows: Repeatability, variation in digestion and metabolism of energy and nitrogen, and ruminal methanogens. *J. Dairy Sci.* 98:3938-3950.
- 9) Bakdash, J.Z., and Marusich, L.R. 2017. Repeated measures correlation. *Front. Psychol.* 8:1-13. doi:10.3389/fpsyg.2017.00456.

- 10) Bainbridge, M.L., Saldinger, L.K., Barlow, J.W., Alvez, J.P., Roman, J. Kraft, J. 2016. 1609 Rumen bacterial communities continue to shift five weeks after switching diets from conserved forage to pasture. *J. Anim. Sci.* 94, suppl_5:783, <https://doi.org/10.2527/jam2016-1609> (abstr.)
- 11) Bannink, A., van Schijndel, M.W., and Dijkstra, J. 2011. A model of enteric fermentation in dairy cows to estimate methane emission for the Dutch National Inventory Report using the IPCC Tier 3 approach. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166-167:603-618.
- 12) Bannink, A., Spek, J.W., Dijkstra, J., and Sebek, L.B. 2018. A Tier 3 Method for Enteric Methane in Dairy Cows Applied for Fecal N Digestibility in the Ammonia Inventory. In: *Front. Sust. Food Syst.* 2:66.
- 13) Barnhart, H.X., Kosinski, A.S., and Haber, M.J. 2007. Assessing Individual Agreement. *J. Biopharm. Stat.* 17:697-719.
doi:10.1080/10543400701329489.
- 14) Barnett, M.C., Goopy, J.P., McFarlane, J.R., Godwin, I.R., Nolan, J.V., and Hegarty, R.S.
(2012). Triiodothyronine influences digesta kinetics and methane yield in sheep. *Anim. Prod. Sci.* 52:572-577.
- 15) Basarab, J., Beauchemin, K., Baron, V., Ominski, K., Guan, L., Miller, S., and Crowley, J. 2013. Reducing GHG emissions through genetic improvement for feed efficiency: Effects on economically important traits and enteric methane production. *Animal*, 7(S2):303-315.
doi:10.1017/S1751731113000888
- 16) Baskaran, R., Cullen, R., and Colombo, S. 2009. Estimating values of environmental impacts of dairy farming in New Zealand, *New Zealand J. Agric. Res.* 52: 377-389, DOI: 10.1080/00288230909510520.
- 17) Beauchemin, K.A., Kreuzer, M., O'Mara, F., and McAllister, T.A. 2008. Nutritional management for enteric methane abatement: A review. *Aust. J. Exp. Agric.* 48:21-27.
- 18) Beauchemin, K.A., McAllister, T.A., and McGinn, S.M. 2009. Dietary mitigation of enteric methane from cattle. *CAB Rev.: Perspect. Agric., Vet. Sci., Nutr. Nat. Res.* 4:1-18.

- 19) Bell, M.J., Saunders, N., Wilcox, R.H., Homer, E.M., Goodman, J.R., Craighan, J., Garnsworthy, P.C. 2014 Methane emissions among individual dairy cows during milking quantified by eructation peaks or ratio with carbon dioxide. *J. Dairy Sci.* 97:6536-6546.
- 20) Berndt, A., Boland, T.M., Deighton, M.H., Gere, J.I., Grainger, C., Hegarty, R.S., Iwaasa, A.D., Koolaard, J.P., Lassey, K.R., Luo D., Martin, R.J., Martin, C., Moate, P.J., Molano, G., Pinares- Patino, C., Ribaux, B.E., Swainson, N.M., Waghorn, G.C., and Williams, S.R.O. 2014. Guidelines for use of sulphur hexafluoride (SF6) tracer technique to measure enteric methane emissions from ruminants. Pages 166. M. G. Lambert, ed. New Zealand Agricultural Greenhouse Gas Research Centre, New Zealand.
- 21) Cottle, D.J., Nolan, J.V., and Wiedemann, S.G. 2011. Ruminant enteric methane mitigation: A review. *Anim. Prod. Sci.* 51:491-514. doi:10.1071/AN10163.
- 22) Berry, D.P., and Crowley, J.J. 2012. Residual intake and body weight gain: A new measure of efficiency in growing cattle, *J. Anim. Sci.* 90:109-115, <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4245>
- 23) Berry, D.P., Lassen, J., and de Haas, Y. 2015. Residual feed intake and breeding approaches for enteric methane mitigation In: *Livestock production and climate change*. P.K. Malik, R. Bhatta, J. Takahashi, R.A. Kohn, and C.S. Prasad, ed. CABI, Oxfordshire, UK. . Pages 273-291
- 24) Bickell, S.L., Revell, D.K., Toovey, A.F., and Vercoe, P. E. 2014. Feed intake of sheep when allowed ad libitum access to feed in methane respiration chambers. *J. Anim. Sci.* 92:2259-2264.
- 25) Bittante, G., and Cecchinato, A. 2020. Heritability estimates of enteric methane emissions predicted from fatty acid profiles, and their relationships with milk composition, cheese-yield and body size and condition, *It. J. An. Sci.* 19:114-126, DOI: 10.1080/1828051X.2019.1698979
- 26) Blaxter, K.L., and Joyce, J.P. 1963. The accuracy and ease with which measurements of respiratory metabolism can be made with tracheostomized sheep. *Br. J. Nutr.* 17:523-537.

- 27) Blaxter, K.L., and Clapperton, J.L. 1965. Prediction of the amount of methane produced by ruminants. *Br. J. Nutr.* 19:511-522.
- 28) Bouchard, K., Wittenberg, K.M., Legesse, G., Krause, D.O., Khafipour, E., Buckley, K.E., and Ominski, K.H. 2015. Comparison of feed intake, body weight gain, enteric methane emission and relative abundance of rumen microbes in steers fed sainfoin and lucerne silages under western Canadian conditions. *Grass a Forage Sci.* 70:116-129.
- 29) Bougouin, A., Appuhamy, J.A.D.R.N., Ferlay, A., Kebreab, E., Martin, C., Moate, P.J., Benchaar, C., Lund, P., and Eugène, M. 2019. Individual milk fatty acids are potential predictors of enteric methane emissions from dairy cows fed a wide range of diets: Approach by meta-analysis. *J. Dairy Sci.* 102:10616-10631. DOI: <http://doi.org/10.3168/jds.2018-15940>
- 30) Brask, M., Weisbjerg, M.R., Hellwing, A.L.F., Bannink, A., and Lund, P. 2015. Methane production and diurnal variation measured in dairy cows and predicted from fermentation pattern and nutrient or carbon flow *Animal.* 9:1795-1806. DOI: <http://dx.doi.org/10.1017/S1751731115001184>
- 31) Breider, I.S., Wall, E., Garnsworthy, P.C. 2019. Short communication: Heritability of methane production and genetic correlations with milk yield and body weight in Holstein-Friesian dairy cows, *J. Dairy Sci.* 102: 7277-7281.
- 32) Cassandro, M., Cecchinato, A., Battagin, M., Penasa, M., 2010. Genetic parameters of predicted methane production in Holstein Friesian cows In: *Proc. 9th World Congr. on Genetics Applied to Livestock Production*, Leipzig, Germany. . Page 181
- 33) Cassandro, M. 2013. Comparing local and cosmopolitan cattle breeds on added values for milk and cheese production and their predicted methane emissions. *Animal Genetic Resources/Ressources genetiques animales/Recursos genéticos animales*, available on CJO2013. doi:10.1017/S2078 63361200077X.
- 34) Cassandro, M., Mele, M., Stefanon, B.. 2013. Genetic aspects of enteric methane emission in livestock ruminants. *Italian J. Anim. Sci.* 12:e73:

450-458.

- 35) Castro Montoya, J., Bhagwat, A.M., Peiren, N., De Campeneere, S., De Baets, B., and Fievez, V. 2011. Relationships between odd- and branched-chain fatty acid profiles in milk and calculated enteric methane proportion for lactating dairy cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166:596-602.
- 36) Chilliard Y., Ferlay, A., Mansbridge, R.M., and Doreau, M. 2000. Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, trans and conjugated fatty acids. *Annal. Zootech.* 49:181-205.
- 37) Chagunda, M.G.G., Ross, D., and Robert, s D J. 2009. On the use of a laser methane detector in dairy cows. *Comput. Electron. Agric.* 68:157-160.
- 38) Chilliard Y., Martin ,C., Rouel, J., and Doreau, M. 2009. Milk fatty acids in dairy cows fed whole crude linseed, extruded linseed, or linseed oil, and their relationship with methane output. *J. Dairy Sci.* 92:5199-5211.
- 39) Chung, Y.-H., Walker, N.D., McGinn, S.M., and Beauchemin, K.A. 2011. Differing effects of 2 active dried yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) strains on ruminal acidosis and methane production in nonlactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94:2431-2439.
- 40) Cieslak, A., Szumacher-Strabel, M., Stochmal, A., nad Oleszek, W. 2013. Plant components with specific activities against rumen methanogens. *Animal*, 7(s2):253-265.
- 41) C-Lock, 2016. <https://www.c-lockinc.com/>
- 42) Cobellis, G., Trabalza-Marinucci, M. and Yu, Z. 2016. Critical evaluation of essential oils as rumen modifiers in ruminant nutrition: A review. *Sci. Total Environ.* 545: 556-568.
- 43) Cottle, D.J., Nolan, J.V., and Wiedemann, S.G. 2011. Ruminant enteric methane mitigation: a review. *Anim. Prod. Sci.* 51:491-514.
- 44) de Haas, Y., Windig, J.J., Calus, M.P.L., Dijkstra, J., de Haan, M., Bannink, A., and Veerkamp, R F. 2011. Genetic parameters for predicted methane production and potential for reducing enteric emissions through genomic selection. *J. Dairy Sci.* 94:6122-6134.
- 45) de Haas, Y., Pszczola, M., Soyeurt, H., Wall, E., and Lassen, J. 2017.

- Invited review: Phenotypes to genetically reduce greenhouse gas emissions in dairying. *J. Dairy Sci.* 100:855-870.
- 46) De Marchi, M., Toffanin, V., Cassandro, M., and Penasa, M. 2014. Invited review: Mid-infrared spectroscopy as phenotyping tool for milk traits. *J. Dairy Sci.* 97:1171-1186. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-6799>.
- 47) Dehareng, F., Delfosse, C., Froidmont, E., Soyeurt, H., Martin, C., Gengler, N., Vanlierde, A., and Dardenne, P. 2012. Potential use of milk mid-infrared spectra to predict individual methane emission of dairy cows. *Animal* 6:1694-701.
- 48) Deighton, M.H., Williams, S.R.O., Hannah, M.C., Eckard, R.J., Boland, T.M., Wales, W.J., and Moate, P.J. 2014. A modified sulphur hexafluoride tracer technique enables accurate determination of enteric methane emissions from ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* 197:4763.
- 49) Delfosse, O., Froidmont, E., Fernandez Pierna, J. A., Martin, C., and Dehareng, F. 2010. Estimation of methane emissions by dairy cows on the basis of milk composition. In: *Greenhouse Gases and Animal Agriculture Conference. 2010; GGAA2010: 4. Greenhouse Gases and Animal Agriculture Conference, Banff, CAN, 2010-10-03-2010-10-08*, 60-61.
- 50) Delgado, B., Bach A., Guasch I., González C, Elcoso G., Pryce J.E., Gonzalez-Recio O. (2019). Whole rumen metagenome sequencing allows classifying and predicting feed efficiency and intake levels in cattle. *Scientific Reports* 9: 11. doi:10.1038/s41598-018-36673-w
- 51) Demment, M.W., and Van Soest, P.J. 1985. A nutritional explanation for body-size patterns of ruminant and nonruminant herbivores. *Am. Nat.* 125:641-672.
- 52) Denman, S.E., Tomkins, N.W., and McSweeney, C.S. 2007. Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane. *FEMS Microbiol. Ecol.* 62:313-322.
- 53) Difford, G.F., Lassen, J., and Lovendahl, P. 2016. Interchangeability between methane measurements in dairy cows assessed by comparing precision and agreement of two noninvasive infrared methods. *Comput.*

Electron. Agric. 124:220-226. doi:10.1016/j.compag.2016.04.010.

- 54) Dijkstra, J., van Zijderveld, S.M., Apajalahti, J.A., Bannink, A., Gerrits, W.J.J., Newbold, J.R., Perdok, H.B., and Berends, H. 2011. Relationships between methane production and milk fatty acid profiles in dairy cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166-167:590-595.
- 55) Dijkstra, J., van Gastelen, S., Antunes-Fernandes, E.C., Warner, D., Hatew, B., Klopper, G., Podesta, S.C., van Lingen, H.J., Hettlinga, K.A., and Bannink, A. 2016. Relationships between milk fatty acid profiles and enteric methane production in dairy cattle fed grass- or grass silage-based diets. *Anim. Prod. Sci.* 56:54-58.
- 56) Donoghue, K.A., Herd, R.M., Bird, S.H., Arthur, P.F., and Hegarty, R.F. 2013. Preliminary genetic parameters for methane production in Australian beef cattle. In: *Proceedings of the Association for the Advancement of Animal Breeding and Genetics*, 20-23 October 2013, Napier, New Zealand, pp. 290-293.
- 57) Donoghue, K.A., Bird-Gardiner, T., Arthur, P.F., Herd, R.M., and Hegarty, R.F. 2016. Genetic and phenotypic variance and covariance components for methane emission and postweaning traits in Angus cattle. *J. Anim. Sci.* 94:438-445. doi:10.2527/jas2015-0065.
- 58) Dorich, C.D., Varner, R.K., Pereira, A.B.D., Martineau, R., Soder, K.J., and Brito, A.F. 2015. Use of a portable, automated, open-circuit gas quantification system and the sulfur hexafluoride tracer technique for measuring enteric methane emissions in Holstein cows fed ad libitum or restricted. *J. Dairy Sci.* 98:2676-2681.
- 59) Ellis, J.L., Kebreab, E., Odongo, N.E., McBride, B.W., Okine, E.K., and France, J. 2007. Prediction of methane production from dairy and beef cattle. *J. Dairy Sci.* 90:3456-3466.
- 60) Ellis, J.L., Bannink, A., France, J., Kebreab, E., and Dijkstra, J. 2010. Evaluation of enteric methane prediction equations for dairy cows used in whole farm models. *Glob. Change Biol.* 16:3246-3256.
- 61) Estermann, B.L., Sutter, F., Schlegel, P.O., Erdin, D., Wettstein, H.R.,

- and Kreuzer, M. 2002. Effect of calf age and dam breed on intake, energy expenditure, and excretion of nitrogen, phosphorus, and methane of beef cows with calves. *J. Anim. Sci.* 80:ii24-ii34.
- 62) Falconer, D., and Mackay, T. 1996. Introduction to quantitative genetics (4th edn). ISBN-i3: 978-0582243026; ISBN-i0: 0582243025
- 63) Fievez V., Colman E., Castro-Montoya, J.M., Stefanov, I., and Vlaeminck, B. 2012. Milk odd- and branched-chain fatty acids as biomarkers of rumen function - An update. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 172:51-65.
- 64) Gardiner, T.D., Coleman, M.D., Innocenti, F., Tompkins, J., Connor, A., Garnsworthy, P.C., Moorby, J.M., Reynolds, C.K., Waterhouse, A., and Wills, D. 2015. Determination of the absolute accuracy of UK chamber facilities used in measuring methane emissions from livestock. *Measurement* 66: 272-279.
- 65) Garnsworthy, P.C. 2004. The environmental impact of fertility in dairy cows: a modelling approach to predict methane and ammonia emissions. *Anim. Feed Sci. Technol.* 112:211-223.
- 66) Garnsworthy, P.C., Craigmiles, J., Hernandez-Medrano, J.H. and Saunders, H. 2012A. On-farm methane measurements during milking correlate with total methane production by individual dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95:3166-3180.
- 67) Garnsworthy, P.C., Craigmiles, J., Hernandez-Medrano, J.H., and Saunders, H. 2012B. Variation among individual dairy cows in methane measurements made on farm during milking. *J. Dairy Sci.* 95:3181-3189.
- 68) Garnsworthy, P.C. Difford, G.F. Bell, M.J. Bayat, A.R. Huhtanen, P. Kuhla, B. Lassen, J. Peiren, N. Pszczola, M; Sorg, D. Visker, M.H., and Yan, T. 2019 Comparison of Methods to Measure Methane for Use in Genetic Evaluation of Dairy Cattle. *Animals* 9:837, 12p.
- 69) Gengler, N., Soyeurt, H., Dehareng, F., Bastin, C., Colinet, F., Hammami, H., Vanrobays, M.-L., Lainé, A., Vanderick, S., Grelet, C., Vanlierde, A., Froidmont, E., and Dardenne, P. 2016. Capitalizing on fine milk composition for breeding and management of dairy cows. *J. Dairy Sci.*

99:4071-4079.

- 70) Gerber, P.J., Steinfeld, H., Henderson, B., Mottet, A., Opio, C., Dijkman, J., Falcucci, A., and Tempio, G. 2013. Tackling climate change through livestock - A global assessment of emissions and mitigation opportunities. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome.
- 71) Goopy, J.P., Woodgate, R., Donaldson, A., Robinson, D.L., and Hegarty, R.S. 2011. Validation of a short term methane measurement using portable static chambers to estimate methane production in sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166-167:19-226.
- 72) Goopy, J.P., Donaldson, A., Hegarty, R., Vercoe, P.E., Haynes, F., Barnett, M., and Oddy, V.H. 2014. Low-methane yield sheep have smaller rumens and shorter rumen retention time. *Br. J. Nutr.* 111:578-585.
- 73) Goopy, J.P., Robinson, D.L., Woodgate, R.T., Donaldson, A.J., Oddy, V.H., Vercoe, P. E., and Hegarty, R.S. 2016. Estimates of repeatability and heritability of methane production in sheep using portable accumulation chambers. *Anim. Prod. Sci.* 56:116-122.
- 74) Grainger, C., Clarke, T., McGinn, S.M., Auldist, M.J., Beauchemin, K.A., Hannah, M.C., Waghorn, G.C., Clark, H., and Eckard, R J. 2007. Methane emissions from dairy cows measured using the sulfur hexafluoride (SF₆) tracer and chamber techniques. *J. Dairy Sci.* 90:2755-2766.
- 75) Guyader, J., Eugène, M., Nozière, P., Morgavi, D.P., Doreau, M., and Martin, C. 2014. Influence of rumen protozoa on methane emission in ruminants: a meta-analysis approach. *Animal* 8:1816-1825.
- 76) Haisan, J., Sun, Y., Guan, L.L., Beauchemin, K.A., Iwaasa, A., Duval, S., Barreda, D.R., and Oba, M. 2014. The effects of feeding 3-nitrooxypropanol on methane emissions and productivity of Holstein cows in mid lactation. *J. Dairy Sci.* 97:3110-3119.
- 77) Hammond, K.J., Humphries, D.J., Crompton, L.A., Green, C., and Reynolds, C.K. 2015. Methane emissions from cattle: Estimates from short-term measurements using a GreenFeed system compared with measurements obtained using respiration chambers or sulphur

- hexafluoride tracer. *Anim. Feed Sci. Technol.* 203:41-52.
doi:10.1016/j.anifeedsci.2015.02.008.
- 78) Hammond, K.J., Crompton, L.A., Bannink, A., Dijkstra, J., Yáñez-Ruiz, D.R., O’Kiely, P., Kebreab, E., Eugène, M.A., Yu, Z., Shingfield, K.J., Schwarm, A., Hristov, A.N., and Reynolds, C.K. 2016A. Review of current in vivo measurement techniques for quantifying enteric methane emission from ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* 219:13-30.
doi:10.1016/j.anifeedsci.2016.05.018.
- 79) Hammond, K.J., Jones, A.K., Humphries, D.J., Crompton, L.A., and Reynolds, C.K. 2016B. Effects of diet forage source and neutral detergent fiber content on milk production of dairy cattle and methane emissions determined using GreenFeed and respiration chamber techniques. *J. Dairy Sci.* 99:7904-7917. doi:10.3168/jds.2015-10759.
- 80) Hegarty, R.S. 1999. Reducing rumen methane emissions through elimination of rumen protozoa. *Aust. J. Agric. Res.* 50:1321-1327.
- 81) Hegarty, R.S. 2013. Applicability of short term emission measurements for on-farm quantification of enteric methane. *Animal* 7, s2:401-408.
- 82) Hellwing, A.L.F., Lund, P., Weisbjerg, M.R., Brask, M., and Hvelplund, T. 2012. Technical note: test of a low-cost and animal-friendly system for measuring methane emissions from dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95:6077-85.
doi:10.3168/jds.2012-5505.
- 83) Henderson, G., Cox, F., Ganesh, S., Jonker, A., Young, W., Global Rumen Census Collaborators, and Janssen, P.H. 2015. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. *Sci. Rep.* 5:14567.
doi:10.1038/srep14567
- 84) Herd, R.M., Arthur, P.F., Bird, S.H., Donoghue, K.A., and Hegarty, R.S. 2014. Genetic variation for methane traits in beef cattle. In: *Proc. 10th World Conference on Genetic Applied to Livestock Production (WCGALP), 17-22 August, 2014. Vancouver, Canada.*
- 85) Hindrichsen, I.K., Wettstein, H.R., Machmüller, A., Jörg, B., and Kreuzer, M. 2005. Effect of the carbohydrate composition of feed concentrates on methane emission from dairy cows and their slurry. *Environ. Monit.*

Assess., 107:329-350.

- 86) Holter J.B., and Young, A.J. 1992. Methane production in dry and lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 75:2165-2175.
- 87) Hristov, A.N., Oh, J., Firkins, J.L., Dijkstra, J., Kebreab, E., Waghorn, G., Makkar, H.P.S., Adesogan, A.T., Yan, g W., Lee, C., Gerber, P.J., Henderson, B., and Tricarico, J.M. 2013. Special topics - Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. *J. Anim. Sci.* 91:5045-5069.
- 88) Hristov, A.N., Johnson, K.A., and Kebreab, E, 2014. Livestock methane emissions in the United States. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111:E1320; doi:10.1073/pnas.1401046111
- 89) Hristov, A.N., O,h J., Giallongo, F., Frederick, T., Harper, M.T., Weeks, H., Branco, F., Price, W.J., Moate, P.J., Deighto,n M.H., Williams, S.R.O., Kindermann, M., and Duval, S. 2016. Short communication: Comparison of the GreenFeed system with the sulfur hexafluoride tracer technique for measuring enteric methane emissions from dairy cows. *J. Dairy Sci.* 5461-5465. doi:10.3168/jds.2016-10897.
- 90) Huhtanen, P., Cabezas-Garcia, E.H., Utsumi, S., and Zimmerman, S. 2015. Comparison of methods to determine methane emissions from dairy cows in farm conditions. *J. Dairy Sci.* 98:3394-3409. doi:10.3168/jds.2014-9118.
- 91) Iwamoto, M., Asanuma, N., and Hin,o T. 2002. Ability of *Selenomonas ruminantium*, *Veillonella parvula*, and *Wolinella succinogenes* to reduce nitrate and nitrite with special reference to the suppression of ruminal methanogenesis. *Anaerobe.* 8:209-215.
- 92) Janssen, P.H. 2010. Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics. *Anim. Feed Sci. Technol.* 160:1-22. doi:10.1016/j.anifeedsci.2010.07.002.
- 93) Jayanegara, A., Leiber, F., and Kreuzer, M. 2012. Meta - analysis of the

- relationship between dietary tannin level and methane formation in ruminants from in vivo and in vitro experiments. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 96:365-375.
- 94) Jentsch, W., Schweigel, M., Weissbach, F., Scholze, H., Pitroff, W., and Derno, M. 2007. Methane production in cattle calculated by the nutrient composition of the diet. *Arch. Anim. Nutr.* 61:10-19.
- 95) Johnson, K., Huyler, M., Westberg, H., Lamb, B., and Zimmerman, P. 1994. Measurement of methane emissions from ruminant livestock using a sulfur hexafluoride tracer technique. *Environ. Sci. Technol.* 28:359-362.
- 96) Jonker, A., Molano, G., Antwi, C., Waghorn, G.. 2014. Feeding lucerne silage to beef cattle at three allowances and four feeding frequencies affects circadian patterns of methane emissions, but not emissions per unit of intake. *Anim. Prod. Sci.* 54:1350-1353.
- 97) Jonker, A., Hickey, S.M., Rowe, S.J., Janssen, P.H., Shackell, G., Elmes, S., Bain, W.E., Wing, J., Greer, G.J., Bryson, B., MacLean, S., Dodds, K.G., Pinares-Patino, C.S., Young, E.A., Knowler, K., Pickering, N.K., and McEwan, J.C. 2018. Genetic parameters of methane emissions determined using portable accumulation chambers in lambs and ewes grazing pasture and genetic correlations with emissions determined in respiration chambers. *J. Anim. Sci.* 96:30313042. doi: 10.1093/jas/sky187.
- 98) Kandel, P.B., Vanrobays, M.L., Vanlierde, A., Dehareng, F., Froidmont, E., Dardenne, P., Lewis, E., Buckley, F., Deighton, M.H., McParland, S. and Gengler, N., 2013. Genetic parameters for methane emissions predicted from milk mid-infrared spectra in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95(E-i):p.388.
- 99) Kandel, P.B., Vanderick, S., Vanrobays, M.L., Vanlierde, A., Dehareng, F., Froidmont, E., Soyeurt, H., and Gengler, N. 2014A. Consequences of selection for environmental impact traits in dairy cows. Page 19. (http://orbi.ulg.ac.be/bitstream/2268/164402/164401/NSABS162014_poster_Purna_abstract.pdf) In: Proc. 19th National symposium on applied biological sciences, Gembloux, Belgium.
- 100) Kandel, P.B., Vanderick, S., Vanrobays, M.L., Vanlierde, A., Dehareng, F., Froidmont, E., Soyeurt, H., and Gengler, N. 2014B. Consequences of

- selection for environmental impact traits in dairy cows. In: 10th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production (WCGALP), 17-22 August, 2014. Vancouver, Canada.
- 101) Kirchgessner, M., Windisch, W., Müller, H. L., and Kreuzer, M. 1991. Release of methane and of carbon dioxide by dairy cattle. *Agri Biol. Res.* 44:91-102.
- 102) Kirchgessner M., Windisch, W., and Muller, H.L. 1995. Nutritional factors for the quantification of methane production. In: *Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction. Proceedings 8th International Symposium on Ruminant Physiology* (eds W. Von Engelhardt, S. Leonhard-Marek, G. Breves and D. Giesecke). *Reproduction Proceedings 8th International Symposium on Ruminant Physiology.* Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, Germany. pp. 333-348.
- 103) Kittelmann, S., Pinares-Patino, C.S., Seedorf, H., Kirk, M.R., Ganesh, S., McEwan, J.C., and Janssen, P.H. 2014. Two different bacterial community types are linked with the low-methane emission trait in sheep. *PLoS One* 9[^]103171.
- 104) Knapp, J.R., Laur, G.L., Vadas, P.A., Weiss, W.P., and Tricarico, J.M. 2014. Invited review: Enteric methane in dairy cattle production: Quantifying the opportunities and impact of reducing emissions. *J. Dairy Sci.* 97:3231-3261.
- 105) Knapp J.R., Laur, G.L., Vadas, P.A., Weiss, , and Tricarico, J.M. 2015. Invited review: Enteric methane in dairy cattle production: Quantifying the opportunities and impact of reducing emissions. *J. Dairy Sci.* 97:3231-3261.
- 106) Knight, T., Ronimus, R.S., Dey, D., Tootill, C., Naylor, G., Evans, P., Molano, G., Smith, A., Tavendale, M., Pinares-Patino, C.S., and Clark, H. 2011. Chloroform decreases rumen methanogenesis and methanogen populations without altering rumen function in cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166-167:101-112.
- 107) Kubo, I., Muroi, H., Himejima, M., Yamagiwa, Y., Mera, H., Tokushima, K., Ohta, S., and Kamikawa, T. 1993. Structure-antibacterial activity relationships of anacardic acids. *J. Agric. Food Chem.* 41:1016-1019.

- 108) Lassen, J., Lovendahl, P., and Madsen, J. 2012. Accuracy of noninvasive breath methane measurements using Fourier transform infrared methods on individual cows. *J. Dairy Sci.* 95:890-898.
- 109) Lassen, J., and Lovendahl, P. 2016. Heritability estimates for enteric methane emissions from Holstein cattle measured using noninvasive methods. *J. Dairy Sci.* 99:1959-1967.
- 110) Llonch, P., Somarriba, M., Duthie, C-A, Haskell, M.J., Rooke, J.A., Troy, S., Roehe, R., and Turner, S.P. 2016 Association of temperament and acute stress responsiveness with productivity, feed efficiency, and methane emissions in beef cattle: an observational study. *Front. Vet. Sci.* 3: 43.
- 111) Lopez-Paredes, J., Goiri, I., Atxaerandio, R., Garcia-Rodriguez, A., Ugarte, E., Jimenez- Montero, J.A., Alenda, R and Gonzalez-Recio, O. 2020. Mitigation of greenhouse gases in dairy cattle via genetic selection (i): Genetic parameters of direct methane using non-invasive methods and its proxies. *J. Dairy Sci.* 103.
- 112) Madsen, J., Bjerg, B.S., Hvelplund, T., Weisbjerg, M.R., and Lund, P. 2010. Methane and carbon dioxide ratio in excreted air for quantification of the methane production from ruminants. *Livest. Sci.* 129:223-227.
- 113) Martin C., Morgavi, D.P., and Doreau, M. 2010. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal* 4:351-365.
- 114) McCartney, C.A., Bull, I.D., Waters, S.M., and Dewhurst, R.J. 2013. Technical note: Comparison of biomarker and molecular biological methods for estimating methanogen abundance. *J. Anim. Sci.* 91:5724-5728.
- 115) McCartney, C.A., Dewhurst, R.J. and Bull, I.D. 2014. Changes in the ratio of tetraether to diether lipids in cattle feces in response to altered dietary ratio of grass silage and concentrates. *J. Anim. Sci.* 92:4095-4098.
- 116) Miettinen, H., and Huhtanen, P. 1996. Effects of the ration of ruminal propionate to butyrate on milk yield and blood metabolites in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 79:851-861.

- 117) Miglior, F., Sewalem, A., Jamrozik, J., Bohmanova, J., Lefebvre, D.M., Moore, R.K. 2007. Genetic analysis of milk urea nitrogen and lactose and their relationships with other production traits in Canadian Holstein cattle. *J. Dairy Sci.* 90:2468-2479.
- 118) Mills, J.A.N., Dijkstra, J., Bannink, A., Cammell, S.B., Kebreab, E., and France, J. 2001. A mechanistic model of whole-tract digestion and methanogenesis in the lactating dairy cow: model development, evaluation, and application. *J. Anim. Sci.* 79:1584-1597.
- 119) Mills, J.A.N., Kebreab, E., Yates, C.M., Crompton, L.A., Cammell, S.B., Dhanoa, M.S., Agnew, R.E., and France, J. 2003. Alternative approaches to predicting methane emissions from dairy cows. *J. Anim. Sci.* 81:3141-3150.
- 120) Moate, P.J., Williams, S.R.O., Grainger, C., Hannah, M.C., Ponnampalam, E.N., and Eckard, R.J. 2011. Influence of cold-pressed canola, brewers grains and hominy meal as dietary supplements suitable for reducing enteric methane emissions from lactating dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166:254-264. DOI 10.1016/Zj.anifeedsci.2011.04.069.
- 121) Moate, P.J., Deighton, M.H., Williams, S.R.O., Pryce, J.E., Hayes, B.J., Jacobs, J.L., Eckard, R.J., Hannah, M.C. and Wales, W.J., 2016. Reducing the carbon footprint of Australian milk production by mitigation of enteric methane emissions. *Anim. Prod. Sci.* 56:1017-1034.
- 122) Mohammed, R., McGinn, S.M., and Beauchemin, K.A. 2011. Prediction of enteric methane output from milk fatty acid concentrations and rumen fermentation parameters in dairy cows fed sunflower, flax, or canola seeds. *J. Dairy Sci.* 94:6057-6068.
- 123) Moraes, L.E., Strathe, A.B., Fadel, J.G., Casper, D.P., and Kebreab, E. 2014. Prediction of enteric methane emissions from cattle. *Glob. Change Biol.* 20:2140-2148.
- 124) Morgavi, D.P., Forano, E., Martin, C., and Newbold, C.J. 2010. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal* 4:1024-1036.
- 125) Morgavi, D.P., Martin, C., Jouany, J.P., and Ranilla, M.J. 2012. Rumen protozoa and methanogenesis: not a simple cause-effect relationship. *Br. J. Nutr.* 107:388-397. 10.1017/S0007114511002935.

- 126) Moss A.R., Jouany, J.P., and Newbold, J. 2000. Methane production by ruminants: Its contribution to global warming. *Annal. Zootech.* 49:231-253.
- 127) MPWG White paper Dec 18.
<http://www.asggn.org/publications.listing,95,mpwg-white-paper.html>.
Pickering, N.K., de Haas, Y., Basarab, J., Cammack, K., Hayes, B., Hegarty, R.S., Lassen, J., McEwan, J.C., Miller, S., Pinares-Patino, C.S., Shackell, G., Vercoe, P. and Oddy, V.H. 2013.
- 128) Mühlbach, S., Sorg, D., Rosner, F., Kecman, J., and Swalve, H.H. 2018. Genetic analyses for CH₄ concentrations in the breath of dairy cows measured on-farm with the Laser Methane Detector. In: *Proceedings of the World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, Abstract No. 186, 11-16th February, Auckland, New Zealand.
- 129) Muñoz, C., Yan, T., Wills, D.A., Murray, S., and Gordon, A.W. 2012. Comparison of the sulfur hexafluoride tracer and respiration chamber techniques for estimating methane emissions and correction for rectum methane output from dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95:3139-3148.
- 130) Murray, R.M., Bryant, A.M., and Leng, R.A.. 1976. Rates of production of methane in the rumen and large intestine of sheep. *Br. J. Nutr.* 36:1-14.
- 131) Myhre, G., Shindell, D., Bréon, F., Collins, W., Fuglestedt, J., Huang, J., Koch, D., Lamarque, J., Lee, D., Mendoza, B., and Nakajima, T. 2013. *Anthropogenic and Natural Radiative Forcing*. T.F. Stocker, D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex, and P.M. Midgley, ed. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- 132) Negussie E., Lehtinen, J., Mantysaari, P., Liinamo, A-E., Mantysaari, E., and Lidauer, M.
2016. Non-invasive individual methane measurements in dairy cows using photoacoustic infrared spectroscopy technique. 6th Greenhouse Gases Animal Agriculture Conference (GGAA2016) 14-18 February 2016. Melbourne, Australia. Abstract. p62.
- 133) Negussie, E., Lehtinen, J., Mantysaari, P., Bayat, A.R., Liinamo, A.E., Mantysaari, E.A., and Lidauer, M.H. 2017. Non-invasive individual

methane measurement in dairy cows. *Animal* 11:890-899.

- 134) Negussie, E., González Recio, O., de Haas, Y., Gengler N., Soyeurt, H., Peiren, N., Pszczola, M., Garnsworthy, P., Battagin, M., Bayat, A., Lassen, J., Yan, T., Boland, T., Kuhla, B., Strabel, T., Schwarm, A., Vanlierde, A., and Biscarini, F. 2019. Machine learning ensemble algorithms in predictive analytics of dairy cattle methane emission using imputed versus non-imputed datasets. 7th GGAA - Greenhouse Gas and Animal Agriculture Conference held from August 4th to 8th, Iguassu Falls/Brazil. Oral communication, Book of Abstracts Page 40.
<http://www.ggaa2019.org/sites/default/files/proceedings-ggaa2019.pdf>
- 135) Newbold, C.J., de la Fuente, G., Belanche, A., Ramos-Morales, E., and McEwan, N. 2015. The role of ciliate protozoa in the rumen. *Front. Microbiol.* 6:1313. doi: 10.3389/fmicb.2015.01313
- 136) Niu, M., Kebreab, E., Hristov, A. N., Oh, J., Arndt, C., Bannink, A., Bayat, A. R., Brito, A. F., Boland, T., Casper, D., Crompton, L. A., Dijkstra, J., Eugène, M. A., Garnsworthy, P. C., Haque, M. N., Hellwing, A.L.F., Huhtanen, P., Kreuzer, M., Kuhla, B., Lund, P., Madsen, J., Martin, C., McClelland, S. C., Mcgee, M., Moate, P. J., Muetzel, S., Muñoz, C., O'Kiely, P., Peiren, N., Reynolds, C. K., Schwarm, A., Shingfield, K. J., Storlien, T. M., Weisbjerg, M. R., Yáñez-Ruiz, D. R., and Yu, Z. 2018. Prediction of enteric methane production, yield, and intensity in dairy cattle using an intercontinental database. *Glob. Change Biol.* 2018;1-22, DOI: 10.1111/gcb.14094.
- 137) Nkrumah, J.D., Okine, E.K., Mathison, G.W., Schmid, K., Li, C., Basarab, J.A., Price, M.A., Wang, Z., and Moore, S.S. 2006. Relationships of feedlot feed efficiency, performance, and feeding behavior with metabolic rate, methane production, and energy partitioning in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 84:145-153.
- 138) Okine, E. , Mathison, G.W., and Hardin, R.T. 1989. Effects of changes in frequency of reticular contractions on fluid and particulate passage rates in cattle. *J. Anim. Sci.* 67:3388-3396.
- 139) O'Neill, B.F., Deighton, M.H., O'Loughlin, B.M., Mulligan, F.J., Boland, T.M., O'Donovan, M., and Lewis, E. 2011. Effects of a perennial ryegrass

- diet or total mixed ration diet offered to spring-calving Holstein-Friesian dairy cows on methane emissions, dry matter intake, and milk production. *J. Dairy Sci.* 94:1941 - 1951
- 140) Pickering, N.K., Oddy, V.H., Basarab, J.A., Cammack, K., Hayes, B J., Hegarty, R.S., McEwan, J.C., Miller, S., Pinares, C., and de Haas, Y. 2015. Invited review: Genetic possibilities to reduce enteric methane emissions from ruminants. *Animal* 9:1431-1440.
- 141) Pinares-Patiño, C.S., Ulyatt, M.J., Lassey, K.R., Barry, T.N., and Holmes, C.W. 2003. Rumen function and digestion parameters associated with differences between sheep in methane emissions when fed chaffed lucerne hay. *J. Agric. Sci.* 140:205-214.
- 142) Pinares-Patino C.S., Hickey, S.M., Young, E.A., Dodds, K.G., MacLean, S., Molano, G., Sandoval, E., Kjestrup, H., Harland, R., Pickering, N.K., and McEwan, J.C. 2013. Heritability estimates of methane emissions from sheep. *Animal* 7: 316-321.
- 143) Popova, M., Martin, C., Eugène, M., Mialon, M.M., Doreau, M., and Morgavi, D.P. 2011. Effect of fibre- and starch-rich finishing diets on methanogenic Archaea diversity and activity in the rumen of feedlot bulls. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166-167:113-121.
- 144) Pszczola, M., Rzewuska, K., Mucha, S., and Strabel, T. 2017. Heritability of methane emissions from dairy cows over a lactation measured on commercial farms. *J. Anim. Sci.* 95:4813-4819. doi: 10.2527/zjas2017.1842.
- 145) Pszczola, M., Strabel, T., Mucha, S., and Sell-Kubiak, E. 2018. Genome-wide association identifies methane production level relation to genetic control of digestive tract development in dairy cows. *Scientific Rep.* 8 (1), 15164 <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33327-9>
- 146) Pszczola, M., Calus, M.P.L., Strabel, T. 2019. Genetic correlations between methane and milk production, conformation, and functional traits. *J. Dairy Sci.* 102:5342-5346.
- 147) Lassen, J., and Lovendahl, P. 2016. Heritability estimates for enteric methane emissions from Holstein cattle measured using noninvasive

- methods, *J. Dairy Sci.* 99: 1959-1967.
- 148) Ramin, M. and Huhtanen, P.. 2013. Development of equations for predicting methane emissions from ruminants. *J. Dairy Sci.* 96:2476-2493.
- 149) Renand, G., Ricard, E., Maupetit, D., Thouly, J.C. 2013. Variability among individual young beef bulls and heifers in methane emissions. In: Book of abstracts of EAAP 64th annual meeting, Nantes, France. p. 195. (Wageningen Academic Publishers: Wageningen)
- 150) Renand, G., and Maupetit, D. 2016. Assessing individual differences in enteric methane emission among beef heifers using the GreenFeed Emission Monitoring system: effect of the length of testing period on precision. *Anim. Prod. Sci.* 56:218-223.
- 151) Rey, J., Atxaerandio, R., Ruiz, R, Ugarte, E., Gonzalez-Recio, O., Garcia-Rodriguez, A., and Goiri, I. 2019. Comparison Between Non-Invasive Methane Measurement Techniques in Cattle. *Animals* 9(8): 563. <https://doi.org/10.3390/ani9080563>
- 152) Ricci, P., Chagunda, M.G.G., Rooke, J., Houdijk, J.G.M., Duthie, C-A., Hyslop, J., Roehe, R., and Waterhouse, A. 2014. Evaluation of the laser methane detector to estimate methane emissions from ewes and steers. *J. Anim. Sci.* 92:5239-5250.
- 153) Richardson, C., Baes, C., Amer, P., Quinton, C., Martin, P., Osborne, V., Pryce, J.E., and Miglior, F. 2020. Determining the economic value of daily dry matter intake and associated methane emissions in dairy cattle. *Animal* 14:171-179. doi:10.1017/S175173111900154X
- 154) Rico D.E., Chouinard, P.Y., Hassanat, F., Benchaar, C., and Gervais, R. 2016. Prediction of enteric methane emissions from Holstein dairy cows fed various forage sources. *Animal* 10:203-211. doi:10.1017/S1751731115001949
- 155) Robinson, D.L., Goopy, J.P., Hegarty, R.S., Oddy, V.H., Thompson, A.N., Toovey, A.F., Macleay, C.A., Briegal, J.R., Woodgate, R.T., Donaldson, A.J. and Vercoe, P.E. 2014. Genetic and environmental variation in methane emissions of sheep at pasture. *J. Anim. Sci.* 92:43494363.

- 156) Robinson, D.L., Goopy, J.P., Donaldson, A.J., Woodgate, R.T., Oddy, V.H., and Hegarty, R.S. 2014. Sire and liveweight affect feed intake and methane emissions of sheep confined in respiration chambers. *Anima*, 8:1935-1944.
- 157) Robinson, D.L., Goopy, J.P., Hegarty, R.S., and Oddy, V.H. 2015. Comparison of repeated measurements of methane production in sheep over 5 years and a range of measurement protocols. *J. Anim. Sci.* 93:4637-4650.
- 158) Roehe R., Dewhurst, R.J., Duthie, C-A., Rooke, J.A., McKain, N., Ross, D.W., Hyslop, J.J., Waterhouse, A., Freeman, T.C., Watson, M., and Wallace, R.J. 2016. Bovine Host Genetic Variation Influences Rumen Microbial Methane Production with Best Selection Criterion for Low Methane Emitting and Efficiently Feed Converting Hosts Based on Metagenomic Gene Abundance. *PLoS Genet* 12(2): ei005846. doi:i0.i37i/journal.pgen.i005846.
- 159) Romero-Perez, A., Okine, E.K., McGinn, S.M., Guan, L.L., Oba, M., Duval, S.M., Kinderman, n M., and Beauchemin, K.A. 20i4. The potential of 3-nitrooxypropanol to lower enteric methane emissions from beef cattle. *J. Anim. Sci.* 92:4682-4693.
- 160) Romero-Perez, A., Okine, E.K., McGinn, S.M., Guan, L.L., Oba, M., Duval, S M., Kindermann, M., and Beauchemin, K.A. 20i5. Sustained reduction in methane production from long-term addition of 3-nitrooxypropanol to a beef cattle diet. *J. Anim. Sci.* 93:i780-i79i.
- 161) Ross, E. M., P.J . Moate, L.C. Marett, B.G. Cocks and B.J. Hayes. 20i3a. Investigating the effect of two methane-mitigating diets on the rumen microbiome using massively parallel sequencing. *J. Dairy Sci.* 96:6030-6046.
- 162) Ross, E. M., Moate, P. J., Marett, L.C., Cocks, B.G., and Hayes, B.J. 20i3b. Metagenomic Predictions: From Microbiome to Complex Health and Environmental Phenotypes in Humans and Cattle. *PLoS One* DOI: i0.i37i/journal.pone.0073056.
- 163) Sauvant, D., Giger-Reverdin, S., Serment, A., and Broudiscou, L. 20ii. Influences des régimeset de leur fermentation dans le rumen sur la

- production de méthane par les ruminants. *INRA Prod. Anim.* 24:433-446.
- 164) Sauvart, D., and Nozière, P. 2016. Quantification of the main digestive processes in ruminants: the equations involved in the renewed energy and protein feed evaluation systems. *Animal* 10:755-770.
<https://doi.org/10.1017/S175773915002670>.
- 165) Schönhusen, U., Zitnan, R., Kuhla, S., Jentsch, W., Derno, M., and Voigt, J. 2003. Effects of protozoa on methane production in rumen and hindgut of calves around time of weaning. *Arch. Anim. Nutr.* 57:279-295.
- 166) Sebek, L.B. 2019A. Project 1: Enterisch methaan: emissievariatie in de Nederlandse melkveestapel. i p. Wageningen : Wageningen University & Research.
- 167) Sebek, L.B. 2019B. Project 2: Enterisch methaan: emissievariatie rassen en beweidingssystemen. i p. Wageningen : Wageningen University & Research.
- 168) Seymour, D.J. 2019. Feed Efficiency Dynamics in Relation to Lactation and Methane Emissions in Dairy Cattle. PhD thesis, The University of Guelph, Canada.
- 169) Shi W., Moon, C.D., Leahy, S.C., Kang, D., Froula, J., Kittelmann, S., Fan, C., Deutsch, S., Gagic, D., Seedorf, H., Kelly, W.J., Atua, R., Sang, C., Soni, P., Li, D., Pinares-Patino, C.S., McEwan, J.C., Janssen, P.H., Chen, F., Visel, A., Wang, Z., Attwood, G.T., and Rubin, E.M. 2014. Methane yield phenotypes linked to differential gene expression in the sheep rumen microbiome. *Genome Res.* [Doi:10.1101/gr.168245.113](https://doi.org/10.1101/gr.168245.113).
- 170) Shinkai, T., Enishi, O., Mitsumori, M., Higuchi, K., Kobayashi, Y., Takenaka, A., Nagashima, K., and Mochizuki, M. 2012. Mitigation of methane production from cattle by feeding cashew nut shell liquid. *J. Dairy Sci.* 95:5308-5316.
- 171) Sorg, D., Mühlbach, S., Rosner, F., Kuhla, B., Derno, M., Meese, S., Schwarm, A., Kreuzer, M., and Swalve, H. 2016. The agreement between two next-generation laser methane detectors and respiration chamber facilities in recording methane concentrations in the spent air produced by dairy cows. *Comp. Electr. Agric.* 133:262-272.

- 172) Sorg, D., Difford, G.F., Mühlbach, S., Kuhla, B., Swalve, H.H., Lassen, J., Strabel, T., and Pszczola, M. 2017. Comparison of a laser methane detector with the GreenFeed and two breath analysers for on-farm measurements of methane emissions from dairy cows. *Comp. Elec. Agric.* 153:285-294.
- 173) Sorg, D., Mühlbach, S., Rosner, F., Kuhla, B., Derno, M., Meese, S., Schwarm, A., Kreuzer, M. and Swalve, H. 2017. The agreement between two next-generation laser methane detectors and respiration chamber facilities in recording methane concentrations in the spent air produced by dairy cows. *Comp. Elec. Agric.* 153:262-272.
- 174) Soyeurt H., Dehareng, F., Gengler, N., McParland, S., Wall, E., Berry, D.P., Coffey, M., and Dardenne, P. 2011. Mid-infrared prediction of bovine milk fatty acids across multiple breeds, production systems and countries. *J. Dairy Sci.* 94:1657-1667.
- 175) Spearman, C. 1904. The Proof and Measurement of Association between Two Things. *Am. J. Psychol.* 15:72-101.
- 176) Storm, I.M., Hellwing, A.L.F., Nielsen, N.I., and Madsen, J. 2012. Methods for measuring and estimating methane emission from ruminants. *Animals* 2:160-183.
- 177) Sun, X., Henderson, G., Cox, F., Molan, G., Harrison, S.J., Luo, D., Janssen, P.H., and Pacheco, D. 2015. Lambs Fed Fresh Winter Forage Rape (*Brassica napus* L.) Emit Less Methane than Those Fed Perennial Ryegrass (*Lolium perenne* L.), and Possible Mechanisms behind the Difference. *PLoS One* 10(3):e0119697: DOI: 10.1371/journal.pone.0119697
- 178) Troy, S.M., Duthie, C.A., Ross, D.W., Hyslop, J.J., Roehe, R., Waterhouse, A., and Rooke, J.A. 2016. A comparison of methane emissions from beef cattle measured using methane hoods with those measured using respiration chambers. *Anim. Feed Sci. Technol.* 211:227-240.
- 179) Van Gastelen, S., and Dijkstra, J.. 2016. Prediction of methane emission from lactating dairy cows using milk fatty acids and mid-

- infrared spectroscopy. *J. Sci. Food Agric.* 96:3963-3968. DOI: 10.1002/jsfa.7718.
- 180) Van Lingen H.J., Crompton, L.A., Hendriks, W.H., Reynolds, C.K., Dijkstra, J. 2014. Metaanalysis of relationships between enteric methane yield and milk fatty acid profile in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 97:7115-7132.
- 181) Van Lingen, H.J., Niu, M., Kebreab, E., Valadares Filho, S.C., Rooke, J.A., Duthie, C.A., Schwarm, A., Kreuzer, M., Hynd, P.I., Caetano, M., and Eugène, M. 2019. Prediction of enteric methane production, yield and intensity of beef cattle using an intercontinental database. *Agric. Ecosyst. Environ.* 283:106575.
- 182) Van Middelaar, C.E., Dijkstra, J., Berentsen, P.B.M., and De Boer, I.J.M. 2014. Cost- effectiveness of feeding strategies to reduce greenhouse gas emissions from dairy farming. *J. Dairy Sci.* 97:2427-2439.
- 183) Van Zijderveld, S.M., Gerrits, W.J.J., Apajalahti, J.A., Newbold, J.R., Dijkstra, J., Leng, R A., and Perdok, H.B. 2010. Nitrate and sulfate: effective alternative hydrogen sinks for mitigation of ruminal methane production in sheep. *J. Dairy Sci.* 93:5856-5866.
- 184) Van Zijderveld, S.M., Gerrits, W.J.J., Dijkstra, J., Newbold, J.R., Hulshof, R.B.A., and Perdok, H.B. 2011. Persistency of methane mitigation by dietary nitrate supplementation in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94:4028-4038.
- 185) Vanlierde, A., Dehareng, F., Froidmont, E., Dardenne, P., Kandel, P.B., Gengler, N., Deighton, M.H., buckley, F., Lewis, E., McParland, S., Berry, D.P., and Soyeurt, H. 2013. Prediction of the individual enteric methane emission of dairy cows from milk-mid-infrared spectra. *Advances in Animal Biosciences. 5th Greenhouse Gases Animal Agriculture Conference (GGAA2013) 2326 June 2014. Dublin, Ireland.* p 433.
- 186) Vanlierde, A., Vanrobays, M.L., Dehareng, F., Froidmont, E., Soyeurt, H., McParland, S., Lewis, E., Deighton, M.H., Grandl, F., Kreuzer, M., Grendler, B., Dardenne, P., and Gengler, N. 2015. Hot topic: Innovative lactation-stage-dependent prediction of methane emissions from milk mid-infrared spectra. *J. Dairy Sci.* 98:5740-5747.

- 187) Vanrobays, M.-L., Gengler, N., Kandel, P.B., Soyeurt, H., and Hammami, H. 2013A. Genetic effects of heat stress on milk yield and MIR predicted methane emissions of Holstein cows. 64th Annual meeting of the European Federation of Animal Science, p498
- 188) Vanrobays, M.-L., Kandel, P.B., Soyeurt, H., Vanlierde, A., Dehareng, F., Froidmont, E., Dardenne, P., and Gengler, N. 2013B. Herd-test-day variability of methane emissions predicted from milk MIR spectra in Holstein cows. 64th Annual meeting of the European Federation of Animal Science, p344
- 189) Vanrobays, M.-L., Bastin, C., Vandenplas, J., Hammami, H., Soyeurt, H., Vanlierde, A., Dehareng, F., Froidmont, E., and Gengler, N. 2016. Changes throughout lactation in phenotypic and genetic correlations between methane emissions and milk fatty acid contents predicted from milk mid-infrared spectra. *J. Dairy Sci.* 99:1-14.
<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-10646>
- 190) Velazco, J.I., Cottle, D.J., and Hegarty, R.S. 2014. Methane emissions and feeding behaviour of feedlot cattle supplemented with nitrate or urea. *Anim. Prod. Sci.* 54:1737-1740. doi:10.1071/AN14345.
- 191) Velazco, J. I., Hegarty, R., Cottle, D., and Li, L. 2016. Quantifying daily methane production of beef cattle from multiple short-term measures using the GreenFeed system.
<https://rune.une.edu.au/web/handle/1959.11/23580>.
- 192) Veneman, J.B., Muetzel, S., Hart, K.J., Faulkner, C.L., Moorby, J.M., Perdok, H.B., and Newbold, C.J. 2015. Does Dietary Mitigation of Enteric Methane Production Affect Rumen Function and Animal Productivity in Dairy Cows? *PLoS ONE* 10(10): e0140282. doi: 10.1371/journal.pone.0140282
- 193) Vlaeminck, B., Fievez, V., Cabrita, A.R.J., Fonseca, A.J.M., and Dewhurst, R.J. 2006. Factors affecting odd- and branched-chain fatty acids in milk: A review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 131:389-417.
- 194) Waghorn, G.C., Jonker, A., and Macdonald, K A. (2016). Measuring methane from grazing dairy cows using GreenFeed. *Anim. Prod. Sci.* 56:252-257.

- 195) Wall, E., Simm, G., and Moran, D. 2010. Developing breeding schemes to assist mitigation of greenhouse gas emissions. *Animal* 4:366-376.
- 196) Wallace, R. ., Rooke, J A., Duthie, C.-A., Hyslop, J.J., Ross, D.W., McKain, N., de Souza, S.M., Snelling, T.J., Waterhouse, A., and Roehe, R. 2014. Archaeal abundance in post-mortem ruminal digesta may help predict methane emissions from beef cattle. *Sci. Rep.* 4:5892.
- 197) Wallace, R., Rooke, J., McKain, N., Duthie, C.-A., Hyslop, J., Ross, D., Waterhouse, A., Watson, M., and Roehe, R. 2015. The rumen microbial metagenome associated with high methane production in cattle. *BMC Genomics.* 16:839.
- 198) Wallace, R.J., Sasson, G., Garnsworthy, P.C., Tapio, I., Gregson, E., Bani, P., Huhtanen, P., Bayat, A.R., Strozzi, F., Biscarini, F., Snelling, T.J., Saunders, N., Potterton, S.L., Craigon, J., Minuti, A., Trevisi, E., Callegari, M.L., Cappelli, F.P., Cabezas-Garcia, E.H., Vilkki, J., Pinares-Patino, C., Fliiegerov, K.O., Mrazek, J., Sechovcova, H., Kope, J., Bonin, A., Boyer, F., Taberlet, P., Kokou, F., Halperin, E., Williams, J.L., Shingfield, K.J., and Mizrahi, I. 2019. A heritable subset of the core rumen microbiome dictates dairy cow productivity and emissions. *Sci. Adv.* 5:(7):eaav8391. doi 10.1126/sciadv.aav8391.
- 199) Wang, C., Liu, Q., Zhang, Y.L., Pei, C.X., Zhang, S.L., Wang, Y.X., Yang, W.Z., Bai, Y.S., Shi, Z.G., and Liu, X.N. 2015. Effects of isobutyrate supplementation on ruminal microflora, rumen enzyme activities and methane emissions in Simmental steers. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl).* 99:123-131.
- 200) Watt, L.J., Clark, C.E.F., Krebs, G.L., Petzel, C.E., Nielsen, S., and Utsumi, S.A. 2015. Differential rumination, intake, and enteric methane production of dairy cows in a pasture- based automatic milking system. *J. Dairy Sci.* 98:7248-7263.
- 201) Williams, S.R.O., Williams, B., Moate, P.J., Deighton, M.H., Hannah, M.C., and Wales, W.J. 2014. Methane emissions of dairy cows cannot be predicted by the concentrations of C8:0 and total C18 fatty acids in milk. *Anim. Prod. Sci.* 54:1757-1761. <http://dx.doi.org/10.1071/AN14292>.
- 202) Wims, C.M., Deighton, M.H., Lewis, E., O'Loughlin, B., Delaby, L.,

- Boland, T.M., and O'Donovan, M. 2010. Effect of pregrazing herbage mass on methane production, dry matter intake, and milk production of grazing dairy cows during the mid-season period. *J. Dairy Sci.* 93:4976 – 4985
- 203) Yan, T., Porter, M.G., and Mayne, S.C. 2009. Prediction of methane emission from beef cattle using data measured in indirect open-circuit respiration calorimeters. *Animal* 3:1455-1462.
- 204) Yan, T., Mayne, C.S., Gordon, F.G., Porter, M.G., Agnew, R.E., Patterson, D.C., Ferris, C.P., and Kilpatrick, D.J. 2010. Mitigation of enteric methane emissions through improving efficiency of energy utilization and productivity in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93:2630-2638. doi: 10.3168/jds.2009-2929.
- 205) Zeitz, J.O., Soliva, C.R., and Kreuzer, M. 2012. Swiss diet types for cattle: how accurately are they reflected by the Intergovernmental Panel on Climate Change default values? *J. Int. Environ. Sci.* 9(sup1):199-216.
- 206) Zmora, P., Cieslak, A., Pers-Kamczyc, E., Nowak, A., Szczechowiak, J. and Szumacher-Strabel, M. 2012. Effect of *Mentha piperita* L. on in vitro rumen methanogenesis and fermentation, *Acta Agr. Scan. Section A — Anim. Sci.* 62:46-52, DOI: 10.1080/09064702.2012.703228.