



## Doctoral Thesis

# **Ruminal methanogens and their methanogenic activity response to mixtures of dietary lauric and myristic acid and coherences with other rumen microbes**

**Author(s):**

Soliva, Carla Riccarda

**Publication Date:**

2003

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004637773> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH Nr. 15311

**Ruminal methanogens and their methanogenic activity: response  
to mixtures of dietary lauric and myristic acid and coherences  
with other rumen microbes**

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of  
Doctor of Natural Sciences

presented by

**Carla Riccarda Soliva**

Dipl.-Ing. Agr. ETH

Born 19 April 1973

Citizen of Sedrun GR

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. M. Kreuzer

PD Dr. A. Machmüller

PD Dr. L. Meile

Zurich 2003

## 1 Summary

Within the scope of the present thesis the effects of non-esterified lauric acid ( $C_{12}$ ) and myristic acid ( $C_{14}$ ) on ruminal methanogenesis and methanogens were investigated to explain the known high efficiency of these two medium-chain fatty acids (MCFA) in suppressing ruminal methane emission. For this purpose the interactions of rumen methanogens with the hydrogen producing ciliate protozoa and bacteria were evaluated as were coherences among size, composition and methanogenic activity of the rumen methanogens. Special emphasis was placed on the relationship between methane formation and methanogen counts. The fluorescence in situ hybridization (FISH) technique using 16S rRNA oligonucleotide probes was applied for the quantification of the methanogens. Besides total Archaea, the counts of the four methanogenic orders *Methanococcales*, *Methanosarcinales*, *Methanomicrobiales*, and *Methanobacteriales*, inhabiting the rumen, were determined for this own.

The first study consisted of two short-term *in vitro* experiments carried out with the Hohenheim gas test (HGT) apparatus. The incubations were conducted in 10 ml bovine rumen fluid and 20 ml buffer solution and lasted for 24 h at 39°C. No feed but  $H_2$  and  $CO_2$  (4:1) was added as substrate for the methanogens. In the first experiment the dose-dependent effects of  $C_{12}$  and  $C_{14}$ , supplied alone, on rumen methanogenesis and methanogens were tested. A methane-suppressing effect of more than 80% was achieved with 30 mg  $C_{12}$ , whereas the supply of  $C_{14}$  had no effect. Total Archaea counts were decreased as a response to  $C_{12}$  as well as  $C_{14}$  to about the same degree of up to 90%. This clearly indicated that  $C_{12}$  and  $C_{14}$  act differently concerning methane-suppression. The composition of the methanogenic population was not altered by the fatty acid supply. The second experiment dealt with the effect of several  $C_{12}/C_{14}$  mixtures. An additional supply of  $C_{14}$  was clearly shown to synergistically promote the methane- and methanogen-suppressing effect of  $C_{12}$ .

In the second *in vitro* study, carried out similarly to the first study with the HGT system, the most effective combination of  $C_{12}$  and  $C_{14}$  in suppressing ruminal methane emission and methanogen counts was determined. It was observed that both methane emission and methanogen counts were decreased with increasing proportions of  $C_{12}$  in the  $C_{12}/C_{14}$  mixture. With a  $C_{12}/C_{14}$  proportion of 2:1 the maximum methane-suppressing effect of 96% was achieved. Higher proportions of  $C_{12}$  did not result in further enhancement of the methane-suppressing effect even when supplied alone. Therefore a possible synergetic effect of  $C_{12}/C_{14}$  mixtures was masked by almost complete inhibition of methane emission already with the mixtures. Nevertheless, a clear supporting effect of  $C_{14}$  in suppressing methane emission by

C<sub>12</sub> was obvious, since C<sub>14</sub> supplied alone had no effect, similar to the first study. However C<sub>14</sub> again suppressed total Archaea counts by 31% indicating a change in the metabolic activity of the remaining methanogens due to C<sub>14</sub>. The methanogenic order *Methanococcales* was suppressed to a higher degree than the other methanogenic orders, leading to a changed composition of the methanogenic population.

In the third *in vitro* study the interactions of C<sub>12</sub> and C<sub>14</sub> in suppressing ruminal methanogenesis and methanogens were investigated with the Rumen Simulation Technique (Rusitec) in the presence of feed. A basal diet (hay-to-concentrate ratio, 1:1.5) was supplied with either none or seven different C<sub>12</sub>/C<sub>14</sub> mixtures and incubated for 15 (n=4) and 25 days (n=2) at a temperature of 39°C. Methane emission was depressed by all fatty acids containing at least 40% of C<sub>12</sub>, and persisted over the complete incubation period. The highest depression occurred with a C<sub>12</sub>/C<sub>14</sub> ratio of 4:1 and amounted to 70% compared to the unsupplemented control. Methanogenic counts were decreased by all fatty acid mixtures also effective in methane suppression, with the highest decrease of 60% found with the 4:1 treatment. The composition of the methanogenic population was altered since the *Methanococcales* were increased, especially at the cost of the *Methanobacteriales*. Initially, methane suppression was associated with reduced fiber degradation, which was, however, reversed after 10 days of incubation. This suggests that the fiber degrading ruminal microbes adapted to the fatty acids after some time while the methanogens showed no corresponding adaptation.

The results of all *in vitro* studies illustrate the advantage of using mixtures of C<sub>12</sub> and C<sub>14</sub> in suppressing ruminal methane emission and methanogen counts in practical animal nutrition, since it was demonstrated that part of the less palatable C<sub>12</sub> could be replaced by C<sub>14</sub> with similar or even higher efficacy in methane-suppression compared to C<sub>12</sub> alone.

In the fourth part of the thesis the results of the four *in vitro* experiments carried out within the scope of the present thesis were compared and discussed with three further experiments (two *in vivo* and one additional *in vitro* experiment). These experiments all dealt with the suppression of ruminal methane emission and methanogen counts in order to develop suitable dietary strategies concerning this effect. These results were used to evaluate how consistent methane suppression by dietary means is related to the corresponding changes found in counts of methanogens and ciliate protozoa, the latter being one of the major groups of rumen microbes involved in methanogenesis. The two *in vivo* experiments were carried out with sheep. The first experiment investigated effects of coconut oil and defaunation treatment, i.e. elimination of the rumen protozoa, while in the second experiment the basal diet type differed in its hay-to-concentrate ratios (1:1.5 and 1:0.5) and was offered with and without C<sub>14</sub>

to the animals. The third study, carried out with the Rusitec system, investigated the effects of a supply of saponin-containing fruits from the tropical tree *Sapindus saponaria* on a forage-based diet in faunated and defaunated bovine rumen fluid. *In vivo*, coconut oil decreased methane emission (14%) and ciliate protozoa (66%), whereas methanogen counts were not affected. C<sub>14</sub> suppressed methane emission, methanogen and protozoa concentrations *in vivo* up to 58%, 24% and 50%, respectively, whereas the extent of the respective decrease was diet-dependent. In the short-term *in vitro* studies, lasting for 24 h, however, in contrary to C<sub>12</sub>, increasing amounts of C<sub>14</sub> did not decrease methane formation whereas both fatty acids diminished methanogen counts by up to 90%. In combination, C<sub>12</sub> and C<sub>14</sub> acted in a synergetic manner, which was confirmed in the long-term *in vitro* study lasting for 20 days. The saponin-rich fruits decreased methane emission and ciliate protozoa by 14% and 54%, respectively, but did not affect methanogen counts *in vitro*. Defaunation did not inhibit methane emission and even increased methanogen concentrations *in vivo* up to 75%, although ciliate protozoa were massively reduced by 92%. *In vitro*, however, with a different basal diet, defaunation treatment decreased methane emission by 40% at unchanged methanogenic counts.

Based on these results it can be concluded that in rumen fluid neither decreased ciliate protozoa nor methanogen counts are reliable indicators for reduced methane formation. Furthermore, decreased methane formation does not necessarily indicate reduced methanogen and ciliate protozoa counts. In the presented experiments methane suppression was caused both by direct effects, which include changes in the metabolic activity of the methanogens, and by indirect effects of the dietary agents by affecting substrate (hydrogen) supply. Further studies are necessary to determine the mode of action of C<sub>12</sub> and C<sub>14</sub> on the methanogens and this susceptibility in activity and number have also to be demonstrated in *in vivo* trials.

## 2 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung nicht veresterter Laurin- ( $C_{12}$ ) und Myristinsäure ( $C_{14}$ ) auf die Methanogenen und die Methanbildung im Pansen untersucht, um die bekanntlich hohe methanhemmende Wirkung dieser beiden mittellangkettig gesättigten Fettsäuren (MCFA) zu erklären. Dazu wurden die Wechselwirkungen zwischen den Methanogenen und den Wasserstoff liefernden Protozoen und Bakterien des Pansens untersucht. Weiterhin wurden die Zusammenhänge zwischen Grösse und Zusammensetzung der methanogenen Population und deren methanbildenden Aktivität untersucht. Besondere Beachtung fand dabei die Relation zwischen Methanbildung und Anzahl an Methanogenen. Die Quantifizierung der Methanogenen wurde mit Hilfe der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) durchgeführt, wozu verschiedene 16S rRNA-Oligonukleotidsonden verwendet wurden. Neben der gesamten Anzahl an Methanogenen wurden die vier methanogenen Ordnungen, welche im Pansen vorkommen, einzeln bestimmt. Dies sind die Ordnungen *Methanococcales*, *Methanosarcinales*, *Methanomicrobiales* und *Methanobacteriales*.

Die erste Studie, welche mit dem Hohenheimer Futterwerttestgerät (HFT) durchgeführt wurde, bestand aus zwei Kurzzeit-*in-vitro*-Versuchen. Inkubiert wurde jeweils 10 ml Pansensaft der Kuh und 20 ml Pufferlösung über einen Zeitraum von 24 h bei 39°C. Es wurden keine Futtermittel aber  $H_2$  und  $CO_2$  (4:1) zugefügt, als Substrat für die Methanogenen. Mit dem ersten Versuch wurde die Dosis-Wirkungs-Beziehung von  $C_{12}$  wie auch  $C_{14}$  auf die Methanogen im Pansensaft und die Methanbildung ermittelt. Dabei wurde durch eine Zugabe von 30 mg  $C_{12}$  eine Methanhemmung von über 80% erreicht, während  $C_{14}$  keine Wirkung zeigte. Die Anzahl an Methanogenen wurde sowohl durch  $C_{12}$  wie auch  $C_{14}$  in gleichem Masse um bis zu 90% gesenkt. Dies zeigt deutlich die Unterschiede dieser beiden Fettsäuren bezüglich ihrer methanhemmenden Wirkung auf. Die Zusammensetzung der methanogenen Population wurde weder durch  $C_{12}$  noch  $C_{14}$  verändert. Im zweiten Versuch wurde die Wirkung einer Zugabe von  $C_{12}/C_{14}$ -Mischungen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass  $C_{14}$ , zugelegt zu  $C_{12}$ , die methansenkende und die Methanogenen hemmende Wirkung von  $C_{12}$  in synergistischer Weise förderte.

In der zweiten *in vitro* Studie wurde mit Hilfe des HFT-Systems die Mischung an  $C_{12}$  und  $C_{14}$  bestimmt, welche die Methanbildung und die Methanogenen am wirksamsten beeinträchtigte. Es konnte beobachtet werden, dass mit steigendem Anteil an  $C_{12}$  in der Mischung sowohl die Methanbildung wie auch die Anzahl an Methanogenen stärker reduziert

wurde. Die maximale Methanhemmung von 96% wurde mit einem C<sub>12</sub>/C<sub>14</sub>-Verhältnis von 2:1 erreicht. Höhere Mischungsanteile an C<sub>12</sub> konnten diese Wirkung nicht verstärken, nicht einmal C<sub>12</sub> alleine. Da die Methanbildung bereits durch die Fettsäuremischungen beinahe komplett gehemmt wurde, konnte ein eventueller synergistischer Effekt nicht erkannt werden. Ein unterstützender Effekt von C<sub>14</sub> bezüglich der methanhemmenden Wirkung von C<sub>12</sub> war jedoch deutlich erkennbar, da die alleinige Zugabe von C<sub>14</sub> wie in der ersten Studie keinen Effekt zeigte. Die Methanogenen hingegen wurden auch in diesem Versuch durch die Zugabe von C<sub>14</sub> um 31% gesenkt, was ein Hinweis für eine veränderte metabolische Aktivität der verbliebenen Methanogenen ist. Zusätzlich konnte eine Verschiebung in der Zusammensetzung der methanogenen Population beobachtet werden, da die methanogene Ordnung *Methanococcales* stärker gehemmt wurde, als die anderen drei Ordnungen.

In der dritten *in vitro* Studie wurden mit Hilfe des Pansensimulationssystems Rusitec (Rumen simulation technique) die Interaktionen von C<sub>12</sub> und C<sub>14</sub> bei der Hemmung der Methanogenen und des Methans in Gegenwart von Futtermitteln untersucht. Dazu wurde einer Grundration (Heu:Kraftfutter, 1:1.5) sieben verschiedene C<sub>12</sub>/C<sub>14</sub>-Mischungen zugesetzt, wobei die Grundration ohne Fettsäuresupplementierung als Kontrolle diente. Inkubiert wurde über eine Versuchsdauer von 15 (n=4) resp. 25 Tage (n=2) bei einer Temperatur von 39°C. Die Methanfreisetzung wurde durch die C<sub>12</sub>/C<sub>14</sub>-Mischungen, welche einen Mindestanteil von 40% C<sub>12</sub> aufwiesen, persistent über die gesamte Versuchsdauer gesenkt. Die stärkste Hemmung erfolgte mit einer Mischung von C<sub>12</sub> zu C<sub>14</sub> von 4:1 und betrug 70% gegenüber der unsupplementierten Kontrolle. Die Fettsäuremischungen, welche die Methanbildung hemmten, führten auch zu einer Verminderung der Methanogenen, wobei eine maximale Hemmung von 60% erzielt wurde. Eine auf Kosten der *Methanobacteriales* erhöhte Anzahl an *Methanococcales* führte zu einer veränderten Populationszusammensetzung. In den jeweils ersten Inkubationstagen war die Methanhemmung mit einer verminderten Faserverdaulichkeit gekoppelt, welche jedoch ab dem 10. Tag nicht mehr auftrat. Dies lässt auf eine Adaptation der faserabbauenden Pansenmikroben an die Fettsäuren schließen, was bei den Methanogenen offensichtlich nicht der Fall war.

Der Vorteil einer Zufuhr an C<sub>12</sub>/C<sub>14</sub>-Mischungen mit dem Ziel einer Hemmung der Methanbildung und der Methanogenen im Pansen konnte mit diesen drei *in vitro* Studien gezeigt werden. Einen weiteren Vorteil bringen Fettsäuremischungen in der praktischen Nutztierfütterung, da C<sub>12</sub>, welches bei den Tieren schlechte Akzeptanz findet, teilweise durch C<sub>14</sub> ersetzt werden kann, ohne den methanhemmenden Effekt zu verlieren, sondern eher noch zu erhöhen.

Im vierten Teil der vorliegenden Dissertation wurden die Ergebnisse dieser vier *in vitro*-Versuche mit den Ergebnissen von drei weiteren Versuchen (zwei *in vivo*- und ein zusätzlicher *in vitro*-Versuch) verglichen und diskutiert. Jeder dieser Versuche hatte zum Ziel, die Methanbildung und die Anzahl an Methanogenen im Pansen mittels geeigneter Fütterungsstrategien zu hemmen. Ein Vergleich dieser Ergebnisse sollte aufzeigen, wie konsistent die Methanhemmung ist, verglichen mit den jeweiligen Veränderungen in der Anzahl an Methanogenen und Protozoen. Letztere stellen ebenfalls eine Gruppe an Pansermikroben dar, welche stark an der Methanogenese beteiligt sind. Für die *in vivo*-Versuche wurden Schafe verwendet. Im ersten Versuch wurde die Wirkung von Kokosfett und Defaunierung, d.h. Eliminierung aller Protozoen im Pansen, im zweiten Versuch der Effekt von C<sub>14</sub> untersucht, wobei C<sub>14</sub> zu zwei unterschiedlichen Heu:Kraftfutter Basisrationen (1:1.5 und 1:0.5) zugelegt wurde. Der dritte Versuch (mit Rusitec) untersuchte die Wirkung saponinhaltiger Früchte des tropischen Futterbaumes *Sapindus saponaria* in einer Raufuttermischung mit fauniertem und mit defauniertem Pansensaft. Kokosfett führte *in vivo* zu einer Hemmung von Methan (14%) und Protozoen (66%), hatte jedoch keine Wirkung auf die Konzentration an Methanogenen. C<sub>14</sub> senkte *in vivo* die Methanbildung und die Konzentration an Methanogenen und Protozoen um bis zu 58%, 24% respektive 50%, wobei das Ausmass der Hemmung von der jeweiligen Basisration abhing. Im Kurzzeit-*in-vitro*-Versuch über 24 h hingegen zeigte C<sub>14</sub> im Gegensatz zu C<sub>12</sub> keine methanhemmende Wirkung, senkte aber die Anzahl an Methanogenen in gleichem Masse wie C<sub>12</sub>, um bis zu 90%. Eine kombinierte Zufuhr von C<sub>12</sub> und C<sub>14</sub> wirkte sowohl auf Methan wie auch die Methanogenen in synergistischer Weise. Dies konnte im Langzeit-*in-vitro*-Versuch über 20 Tage bestätigt werden. Die saponinhaltigen Früchte verminderten *in vitro* sowohl die Methanbildung wie auch die Anzahl an Protozoen um 14% respektive 54%, hemmten jedoch nicht die Anzahl an Methanogenen. Die Defaunierung *in vivo* führte zu keiner Hemmung der Methanbildung, sondern erhöhte sogar die Methanogenenkonzentration um 75%, obwohl die Konzentration an Protozoen um 92% vermindert wurde. *In vitro*, mit einer anderen Grundration, hemmte die Defaunierung die Methanbildung um 40%, bei unveränderter Anzahl Methanogenen.

Diese Ergebnisse führen zu folgenden Schlussfolgerungen: Weder eine gesenkte Anzahl an Protozoen noch an Methanogenen im Pansensaft sind zuverlässige Indikatoren für eine verminderte Methanbildung. Umgekehrt bedeutet eine gehemmte Methanbildung nicht zwingend eine verminderte Anzahl an Methanogenen und Protozoen. Mit den aufgeführten Versuchen konnte gezeigt werden, dass eine gehemmte Methanbildung nicht nur auf direkten Effekten, wie einer Veränderung der metabolischen Aktivität der Methanogenen, sondern



auch auf indirekten Effekten der Futterzusätze basiert, wie die Limitierung der Substratverfügbarkeit (Wasserstoff). Weitere Untersuchungen sind notwendig, um genau aufzuzeigen, welcherart die Wirkungsweise von C<sub>12</sub> und C<sub>14</sub> auf die Methanogenen ist. Die Effekte der Fettsäuren auf die Anzahl an Methanogenen und deren methanogene Aktivität müssen ebenfalls noch in *in vivo* Untersuchungen belegt werden.