แนวทางปัจจุบันสำหรับการลดการผลิตแก๊สเมทเธนจากสัตว์เคี้ยวเอื้อง

The current approaches for reducing methane production from ruminants

อนุสรณ์ เชิดทอง[1*]

Anusorn Cherdthong

บทนำ

แก๊สเมทเธน (CH_4) ถือเป็น 1 ใน 3 ชนิดของแก๊สเรือนกระจก (green house gas; GHG) ที่ก่อให้เกิดสภาวะโลกร้อน (global warming) โดยอีกสองชนิด ได้แก่ แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) และไนตรัสออกไซด์ (N_2O) การเพิ่มขึ้นของแก๊สเหล่านี้ในชั้นบรรยากาศ จึงส่งผลทำให้นักวิจัยได้พยายามศึกษาค้นคว้าวิจัยถึงแหล่งที่มา และพยายามหาแนวทางในการแก้ไขสถานการณ์ดังกล่าว เมื่อทำการเปรียบเทียบตั้งแต่ปี ค.ศ. 1750-ปัจจุบัน พบว่าในชั้นบรรยากาศ CH_4 มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นถึง 153% โดยจากการรายงานของ IPCC (2007) พบว่า แก๊สชนิดนี้จะเป็นตัวแปรทำให้เกิดสภาวะโลกร้อนมากกว่า CO_2 ถึง 21%

เป็นที่ทราบแน่ชัดแล้วว่า การทำปศุสัตว์ ถือเป็นอีกตัวการหนึ่งในการทำให้เกิดสภาวะเรือนกระจก ซึ่งจากการรายงานของ Steinfield et al. (2006) ในหนังสือ Livestock's long shadow ของ FAO พบว่า 18% ของแก๊สเรือนกระจกมาจากการผลิตสัตว์ อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันยังเป็นข้อถกเถียงและโต้แย้งกันทางด้านวิชาการอยู่เมื่อ Goodland and Anhang (2009) ได้ทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีการที่แตกต่างกัน และพบว่า การทำปศุสัตว์จะทำให้เกิดการผลิตแก๊สเรือนกระจกมากถึง 51% ของแก๊สที่ผลิตจากระบบทั้งหมด นอกจากนี้เมื่อทำการการเปรียบเทียบระหว่างชนิดของสัตว์พบว่า สัตว์เคี้ยวเอื้อง เช่น โคเนื้อ โคนม กระบือ แพะ แกะ และอูฐ เป็นต้น ถือว่าเป็นกลุ่มหลักที่มีการผลิตแก๊สเรือนกระจกในกระเพาะรูเมนและปลดปล่อยออกสู่ชั้นบรรยากาศมากกว่าสัตว์กลุ่มอื่น

กระบวนการหมักอาหารในกระเพาะรูเมนนั้นถือเป็นแหล่งที่ผลิต CH_4 มากที่สุด ซึ่งกระบวนการผลิตแก๊สจะมีขั้นตอนที่สลับซับซ้อนมากโดยการทำงานของจุลินทรีย์ Archaea กลุ่ม methanogens และอยู่ในไฟลัม *Euryarcheota* (Patra, 2011) ในระหว่างที่มีกระบวนการหมักเกิดขึ้น จุลินทรีย์จะเปลี่ยนอินทรียวัตถุจากอาหารเพื่อให้ได้เป็นแหล่งพลังงานสำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์จุลินทรีย์เอง รวมทั้งจะได้มาซึ่งผลผลิตสุดท้ายของกระบวนการหมัก ได้แก่ กรดไขมันที่ระเหยได้ง่าย (volatile fatty acids; VFAs), CO_2 และแก๊สไฮโดรเจน (H_2) เป็นต้น โดยจุลินทรีย์กลุ่ม methanogens สามารถใช้ผลผลิตสุดท้ายที่เกิดจากกระบวนการหมักบางตัว ร่วมกับการใช้ H_2 เพื่อนำไปใช้ในการผลิตเป็น CH_4 และมีการปลดปล่อยออกสู่ชั้นบรรยากาศ โดยผ่านกระบวนการเรอออกทางปากต่อไป Steinfield et al. (2006) ได้รายงานว่า CH_4 ที่ถูกปลดปล่อยจากฟาร์มเลี้ยงสัตว์ทั่วโลก

[1] ศูนย์วิจัยและพัฒนาทรัพยากรอาหารสัตว์เขตร้อน, ภาควิชาสัตวศาสตร์, คณะเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น 40002

Tropical Feed Resources Research and Development Center (TROFREC), Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

* Corresponding author: anusornc@kku.ac.th

คิดเป็น 1 ใน 4 ของ CH_4 ที่ปลดปล่อยทั้งหมด นั่นคือมีค่าประมาณ 80-90 เมทตริกตัน/ปี ของ CH_4 ทั้งหมดที่มีประมาณ 350 เมทตริกตัน/ปี นอกจาก CH_4 จะมีผลก่อให้เกิดสภาวะโลกร้อนแล้ว ในตัวสัตว์เคี้ยวเอื้องเอง พบว่าการปลดปล่อยแก๊สชนิดนี้จะทำให้สูญเสียพลังงานจากอาหารที่ได้รับสูงถึง 12% ปัจจุบัน จึงได้มีนักวิจัยด้านอาหารสัตว์เป็นจำนวนมากได้ให้ความสนใจในการหากลยุทธ์ในการลดการผลิต CH_4 จากสัตว์เคี้ยวเอื้อง อย่างไรก็ตาม ในด้านการวิเคราะห์หรืออธิบายแนวทางความเป็นไปได้ต่างๆ ในการลด CH_4 นั้น ยังถือว่ามีความจำเป็นและเป็นความท้าทายต่อนักวิจัยสมัยใหม่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้ได้จริงในด้านการผลิตปศุสัตว์เพื่อการลดการผลิต CH_4 ดังนั้น บทความนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่ออธิบายถึงกลยุทธ์ต่างๆ ในปัจจุบันที่ได้มีการนำมาใช้เพื่อศึกษาการลดการผลผลิต CH_4 ในสัตว์เคี้ยวเอื้อง ตลอดจนมุมมองในการศึกษาวิจัยในอนาคต

การผลิต CH_4 ในกระเพาะรูเมนสัตว์เคี้ยวเอื้อง

การสังเคราะห์ CH_4 จะเกี่ยวข้องกับกระบวนการรีดิวซ์ equivalent disposal (H_2) ร่วมกับ CO_2 ที่เกิดจากกระบวนการหมักของอาหารที่สัตว์ได้รับในกระเพาะรูเมน ซึ่งมีขั้นตอนแสดงดัง Figure 1

ปฏิกิริยาเคมีในการสังเคราะห์ CH_4 สามารถจำแนกได้ดังนี้

1. เกิดปฏิกิริยาเคมีระหว่างเมทเธนโนฟูเรน (MF), CO_2 และ $_2$ โดยความช่วยเหลือของ F420 ทำให้เกิดสารฟอร์มิลเมทเธนโนฟูแรน (FMF) และน้ำ

2. เกิดปฏิกิริยาเคมีการย้ายหมู่ฟอร์มิล จาก FMF ไปให้สารเตทตร้าไฮโดรเมทเธาน็อฟทีรีน (THMPT) ซึ่งกลายเป็นสารฟอร์มิลเตทตร้าไฮโดรเมทเธนน็อฟทีรีน (FTHMPT)

3.-5. ปฏิกิริยาการรีดิวซ์สาร FTHMPT โดย H_2 และมี F420 ทำให้มีการเคลื่อนย้ายตำแหน่งของคาร์บอนหนึ่งอะตอมในโครงสร้างของ THMPT จึงเปลี่ยนเป็นสารเมททีนิลเตทตร้าไฮโดรเมทเธนน็อฟทีรีน (MTHMP) จากนั้นจึงเปลี่ยนเป็นสารเมททิลเลนนิลเตทตร้าไฮโดรเมทเธนน็อฟทีรีน (MET- MTHMP) ตามลำดับ

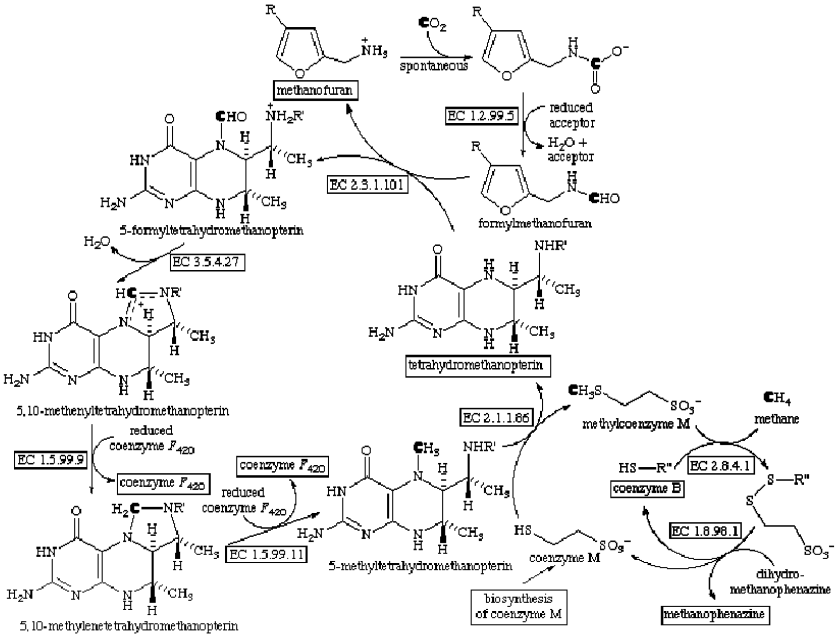


Figure 1 Methanogenesis by rumen bacteria.

Sources: Ferry (1995).

6. ปฏิกิริยาเคมีการย้ายหมู่เมททิลกรุ๊ป จากสาร MET- MTHMP ไปให้โคเอนไซม์เอ็ม แล้วจึงเปลี่ยนเป็นสาร เมททิลโคเอ็ม (Methyl CoM; Met CoM)

7. การรีดิวซ์ Met CoM ที่มี F420 ไปเป็น CH_4 และโคเอนไซม์เอ็ม โดยมีพลังงาน ATP เกิดขึ้นด้วย

แบคทีเรียที่สามารถผลิตแก๊สเมทเธน

แบคทีเรียที่ผลิต CH_4 สามารถจำแนกได้เป็น 12 genera อย่างไรก็ตาม มีเพียงบางชนิดที่พบในรูเมน ซึ่งจะเป็นแกรมบวก นอกจากนี้ ยังจัดเป็น facultative autotroph bacteria กล่าวคือ สามารถผลิต CH_4 ได้จากปฏิกิริยาได้ระหว่าง CO_2 หรือจากเมทธานอลกับ H_2 หรือจากอะซิเตตกับฟอร์เมท เป็นต้น แบคทีเรียที่สามารถผลิต CH_4 ได้ส่วนมากจะสร้าง ATP จากการส่งผ่านอิเล็กตรอนไปตามสารตัวพาอิเล็กตรอนที่เรียงกันอย่างเป็นระบบที่เยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งก่อให้เกิดแรงขับเคลื่อนโปรตอน และเกิดการรีดิวซ์เมททิลโคเอนไซม์เอ็ม ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิต CH_4 แสดงให้เห็นว่าการส่งผ่านอิเล็กตรอนมีความเชื่อมโยงกับการผลิต CH_4 (Ferry, 1995)

นอกจากนี้ โปรโตซัวยังมีอิทธิพลต่อการสังเคราะห์ CH_4 ในกระเพาะรูเมน เนื่องจากส่วนหนึ่งของแบคทีเรียที่สังเคราะห์ CH_4 จะเกาะอยู่กับผนังของโปรโตซัวนั่นเอง สำหรับกลยุทธ์ต่างๆ ในการนำใช้เพื่อลด CH_4 กลไกในการลด CH_4 ความเป็นไปได้ในการนำใช้ประโยชน์ และได้แสดงไว้ใน **Table 1**

Table 1 Methane abatement strategies, mechanism of abatement, considerations for use and reducing efficiency of CH_4.

CH_4 abatement strategies	Mechanism of abatement	Considerations for use	Reducing efficiency of CH_4
• Feed managerment -Roughage:Concentrate ratio, Increased hemicellulose/starch, Reducing cell wall	Indreased rate of passed; increased C_3:C_2 ratio, reduced rumen pH	Shift methanogensis to hind gut or manure, risk of subacute ruminal acidosis	7-90%
• Plant Compounds -Condensed tannins, Saponins, Essential oils, Organosulfur compound	Antimicrobial activity; reduced H availability	Optimum dosage unknown; more *in vivo* research needed; long-term studies needed; may affect digestibility; residues unknown	10-96%
• Organic Acids -Fumarate, Malate, Nitroethane, Nitrate, Thiamine, Bromochlo-romethane	H sink, greater proportion propionate versus acetate -Thiamine: inhibits pyruvate oxidative decarboxylation - Bromochloromethane inhibits cobamide-dependent methyl in CH_4 production.	Varies with diet; more *in vivo* research needed; long-term studies needed; may affect digestibility	3-75%
• Ionophore -Monensin or Rumensin	Inhibits protozoa and gram-positive bacteria; lack of substrate for methanogenesis	Adaptation of microbiota may occur; varies with diet and animal; banned in the EU	4-76%
• Immunisation and biological control - Methanogen vaccine, Methanotrophs, Probiotic, Bacteriophages, Bacteriocins	Host immune response to methanogens	Vaccine targets; diet and host geographical location differences	7-50%
• Defaunation -Chemical, Feed additives	Removes associated methanogens; less H for methanogenesis	Adaptation of microbiota may occur; varies with diet; maintenance of defaunated animals	20-60%
• Lipids -Fatty acids, Oils, Seed oils, Taloow	Inhibition of methanogens and protozoa; greater proportion propionate versus acetate; biohydrogenation	Effect on palatability, intake, performance, and milk components; varies with diet and ruminant species; long-term studies needed	10-90%
• Genetic selection	Genetic selection of animals for decreasing methane emissions	Varies with diet and ruminant species; long-term studies needed	-

กลยุทธ์ด้านการจัดการอาหารสัตว์

สัดส่วนอาหารหยาบต่ออาหารข้นและชนิดของอาหาร: ในอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง ที่มีการทดแทนแหล่งอาหารคาร์โบไฮเดรตที่เป็นโครงสร้าง (เซลลูโลสและ เฮไมเซลลูโลส) ด้วยแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่ไม่เป็นโครงสร้าง (แป้งและน้ำตาล) หรือ การให้ระดับอาหารข้นที่เพิ่มขึ้นแก่สัตว์เคี้ยวเอื้อง จะส่งผลต่อการกินได้ที่เพิ่มขึ้น เพิ่มอัตรากระบวนการหมักในกระเพาะรูเมนและเร่งการหมุนเวียนการย่อยอาหาร (Martin et al., 2011) ซึ่งปัจจัยเหล่านี้จะมีผลอย่างมาก ต่อการปรับเปลี่ยนนิเวศน์วิทยาในกระเพาะรูเมน เปลี่ยนแปลงค่า pH และเกิดการเปลี่ยนแปลงของประชากรจุลินทรีย์ ที่จะช่วยในการหมักอาหารพลังงาน ให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น จากอิทธิพลดังกล่าวจะส่งผลต่อการลดการสังเคราะห์ CH_4 ต่อหน่วยของอาหารที่ย่อยได้ (Martin et al., 2011; Patra, 2011) ทั้งนี้ Doreau et al. (2011) ได้ให้เหตุผลว่าเนื่องจากมีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับแหล่งของ H_2 ที่ใช้ในการผลผลิต CH_4 ในกระเพาะรูเมนลดลง ซึ่งการลดลงของ H_2 นี้เป็นผลมาจากการนำ H_2 ไปใช้ประโยชน์ในการเพิ่มผลผลิตเป็นโพรพิโอเนต (propionate; C_3) หรือที่เรียกว่า hydrogen sink ในขณะเดียวกัน การให้อาหารที่มีสัดส่วนเยื่อใยสูงจะส่งผลต่อการเพิ่มการผลผลิตอะซิเตต (acetate; C_2), บิวทิเรต (butyrate; C_4) และ CH_4 นอกจากนี้ Morgavi et al. (2010) ได้รายงานว่า อาหารที่มีสัดส่วนแป้งสูงจะส่งผลต่อการลดลงของประชากรโปรโตซัว ซึ่งจะมีความสัมพันธ์กันต่อการลดลงของ CH_4 ได้เช่นเดียวกัน การผลิต CH_4 จะมีความสัมพันธ์ในทางตรงกันข้ามกับสัดส่วนของอาหารข้น ในสัตว์ที่ได้รับอาหารข้นที่ระดับ 30-40% เมื่อเกิดการปลดปล่อย CH_4 จะเกิดการสูญเสียพลังงานรวม 6-7% แต่เมื่อสัตว์ได้รับอาหารข้นที่ระดับ 80-90% จะเกิดการสูญเสียพลังงานรวมเพียง 2-3% สอดคล้องกับการรายงานของ Benchaar et al. (2001) ได้ศึกษาเพื่อเปรียบเทียบการใช้แหล่งของอาหารต่อการผลผลิตแก๊ส และพบว่ามีหลายกลยุทธ์ที่สามารถใช้เป็นแนวทางในการลดการผลิต CH_4 ได้ เช่น การเพิ่มสัดส่วนอาหารข้น (ลดได้ 40%), การทดแทนอาหารเยื่อใยด้วยแป้ง (ลดได้ 22%), การใช้แป้งที่ย่อยสลายในกระเพาะรูเมนได้น้อย (ลดได้ 7%), การเพิ่มปริมาณพืชอาหารสัตว์ที่ย่อยสลายได้ดี (ลดได้ 15%), การทดแทนหญ้าด้วยถั่วพืชอาหารสัตว์ (ลดได้ 28%) และการทดแทนหญ้าแห้งด้วยหญ้าหมัก (ลด CH_4 ได้ 20%)

การจัดการด้านโภชนะของพืชอาหารสัตว์แบบปล่อยแทะเล็ม: การลดการปลดปล่อย CH_4 จากสัตว์เคี้ยวเอื้องที่มีการเลี้ยงด้วยระบบการปล่อยแปลงถือว่าเป็นเรื่องที่มีความ ท้าทายเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากยังไม่มีวิธีที่จะวัดการกินได้ในตัวสัตว์ ทั้งนี้ในสัตว์เคี้ยวเอื้อง การกินได้ของวัตถุแห้ง ถือเป็นปัจจัยหลักที่ใช้ในการบ่งบอกปริมาณการผลิต CH_4 ได้ (กรัม CH_4 / วัน) อย่างไรก็ตาม ผลผลิต CH_4 ต่อหน่วยของการกินได้ (กรัม CH_4/ กก.ปริมาณการกินได้วัตถุแห้ง) จะมีค่าลดลงเมื่อการกินได้เพิ่มขึ้น โดยทั่วไปแล้วในพืชอาหารสัตว์ในทุ่งหญ้า ที่มีองค์ประกอบน้ำตาลที่ละลายได้สูงจะส่งผลต่อการผลิต CH_4 ที่ต่ำกว่าในพืชอาหารสัตว์ที่มีเยื่อใยสูง ดังนั้นการเพิ่มองค์ประกอบของน้ำตาลที่สลายได้ในพืชอาหารสัตว์ จึงถือเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะลดการปลดปล่อย CH_4 จากสัตว์ได้ องค์ประกอบน้ำตาลที่สูงในหญ้าอาหารสัตว์สามารถที่จะปรับปรุงประสิทธิภาพการใช้ไนโตรเจนของสัตว์เคี้ยวเอื้องได้อย่างไรก็ตาม การศึกษาวิจัยด้านการปลดปล่อย CH_4 ในระบบการแบบปล่อยแปลงยังมีข้อมูลน้อยอยู่ ดังนั้นแนวทาง ในการปรับปรุงคุณภาพขององค์ประกอบทางเคมีของพืชอาหารสัตว์จึงเป็นแนวทางเดียวในปัจจุบันที่สามารถทำได้

พืชตะกูลถั่ว สารประกอบในพืช: แซปโพนินและแทนนินส์

พืชตะกูลถั่ว (Legumes): ชนิดของพืชตระกูลถั่วจะมีอิทธิพลต่อการปลดปล่อย CH_4 ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากในพืชตระกูลถั่วมีคอนเดนส์แทนนินส์ (condensed tannins;CT) มีองค์ประกอบเยื่อใยต่ำ มีการย่อยได้สูง และมีอัตราการไหลผ่านออกจากกระเพาะรูเมนที่รวดเร็วกว่า (Beauchemin et al., 2008) Benchaar et al. (2001) ได้ทำการทดแทนหญ้าแห้ง timothy ด้วย Lucerne พบว่าสามารถลดการปลดปล่อย

CH_4 ได้ 21% ในขณะที่การทดแทน หญ้าปกติด้วยหญ้าผสมกับ Lucerne ในอัตรา 30:70 สามารถลดการปลดปล่อน CH_4 ในโคเนื้อได้ถึง 10% ทั้งนี้เป็นผลเนื่องมาจาก สัตว์ในกลุ่มที่รับ Lucerne จะมีปริมาณการกินได้ การย่อยได้ และอัตราการไหลผ่านของอนุภาคอาหารออกจากกระเพาะรูเมน ที่สูงกว่านั่นเอง มากไปกว่านั้น กระบวนการแปรรูปของถั่วพืชอาหารสัตว์ก็มีผลต่อการผลิต CH_4 เช่นเดียวกัน โดย Beauchemin et al. (2008) รายงานว่าการสังเคราะห์ CH_4 จะลดลงเมื่อสัตว์ได้รับถั่วพืชอาหารสัตว์ที่มีการอัดเม็ดเมื่อเปรียบเทียบกับการทำแห้ง รวมทั้งการบดและอัดเม็ด จะมีผลต่อการลดลงมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการสับ

คอนเดนส์ แทนนินส์ (Condensed Tannins: CT): ปัจจุบันนักวิจัยได้ให้ความสนใจเป็นอย่างมากในการศึกษาโดยการใช้สารประกอบที่ได้จากพืช เพื่อใช้ในการลดการปลดปล่อย CH_4 ซึ่งสารประกอบจากพืชที่มีการศึกษาวิจัยได้แก่ CT โดยจะพบได้ในพืชตระกูลถั่วในเขตร้อน ซึ่งสารประกอบดังกล่าวมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตจุลินทรีย์กลุ่มที่สังเคราะห์ CH_4 โดยจะมีทั้งผลยังยั้งโดยตรงต่อ methanogens หรือมีผลทางอ้อมต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของโปรโต ทั้งนี้เนื่องจาก CT มีน้ำหนักโมเลกุลที่ต่ำ และมีสายพันธะของ H มาก ดังนั้นจึงสามารถแทรกซึมเข้าสู่เซลล์ของจุลินทรีย์ และเข้ายับยั้งการทำงานเอนไซม์ในเซลล์ การวิจัยในสัตว์ทดลองโดยใช้พืชโดยตรงหรือสารสกัด CT จากพืช เช่น *Lotus corniculatus, Lotus pedunculatus* และ *Acacia mearnsiir* พบว่าสามารถลดการผลิต CH_4 ในแกะหรือแพะมากกว่า 30% โดยไม่มีผลกระทบต่อการย่อยได้ ส่วนการเสริม CT จาก *Terminalia chebula* โดยการสกัดด้วยเมทานอล ในการศึกษาแบบ *in vitro* พบว่าลดการผลิต CH_4 มากถึง 90% และในแกะที่ได้รับการเสริม 10 กรัม/กก.ปริมาณการกินได้วัตถุแห้ง สามารถลดได้เช่นเดียวกัน (Patra et al., 2011) ในขณะที่ Pellikaan et al. (2011) พบว่า การผลิต CH_4 จะลดลงมากที่สุดเมื่อมีการเสริม CT จาก Valonea และ Myrabolan ดังนั้น จากข้อมูลเบื้องต้นสามารถสรุปได้ว่า ระดับของ CT ที่เหมาะสมต่อการลด CH_4 ในการศึกษาแบบ *in vitro* อยู่ในช่วง 10-20 กรัม/กก.ปริมาณการกินได้วัตถุแห้ง

แซพโพนินส์ (Saponins: SP): SP เป็นสารกลุ่ม glycosides เป็นสารประกอบที่พบในพืชหลายชนิดและมีผลโดยตรงต่อจุลินทรีย์ที่สังเคราะห์ CH_4 เช่นเดียวกันกับ CT นอกจากนี้ยังสามารถลดการย่อยสลายโปรตีน และเพิ่มการสังเคราะห์จุลินทรีย์โปรตีน ในขณะเดียวกันยังสามารถลด H_2 ที่จะใช้ในการสังเคราะห์ CH_4 ได้ด้วย อย่างไรก็ตามกลไกการทำงานของ SP ส่วนมากจะเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญเติบโตของโปรโตซัว การเสริมปลือกมังคุดซึ่งมี SP เป็นองค์ประกอบในปริมาณสูง พบว่า สามารถลดประชากรของโปรโตซัวได้เช่นเดียวกัน (Poungchompu et al., 2009; Kongmun et al., 2010; Pilajun and Wanapat, 2011) จากการศึกษาแบบ *in vitro* ของ Poungchompu et al. (2009) ที่ได้ทำการเสริม SP ที่สกัดด้วย เอทานอลจากเมล็ดของ Soapnut (*S. mukorossi*) พบว่าสามารถที่จะลดการผลิต CH_4 ตลอดจนยับยั้งจำนวนเซลล์ของโปรโตซัว นอกจากนี้ การเสริม SP ที่ได้จาก *Sapindus saponaria* สามารถลด CH_4 ได้ถึง 20% ในการศึกษาแบบ *in vitro* หรือในแกะ โดยไม่มีผลต่อจำนวนของ methanogen มากกว่านั้น Agarwal et al. (2006) ได้รายงานว่า การผลิต CH_4 จะลดลง 96%, 39.4% และ 20% เมื่อมีการใช้ เอทานอล น้ำ และเมทานอล ในการสกัด SP จากเมล็ดของ *Sapindus murkossi* ตามลำดับเมื่อมีเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามเมื่อมีการเสริม SP ที่สกัดจากฝักของ *Acacia concinna* จะไม่มีผลต่อการผลิต CH_4 ในสัตว์ที่ได้รับสัดส่วนอาหารหยาบต่ออาหารข้น ที่ระดับ 1:1 แต่จะมีผลต่อการลดลงจำนวนของโปรโตซัว นอกจากนี้ผลการยับยั้งของ SP ต่อจุลินทรีย์ที่ผลิต CH_4 ยังขึ้นกับองค์ประกอบและระดับของ SP ในอาหาร เช่น SP ของ *Sapindus rarak* fruits สามารถลด methanogen RNA เมื่อใช้ SP ในระดับที่สูงสุด (4 มก./มล.) แต่เมื่อใช้ระดับต่ำลงมา จะไม่มีผลต่อจำนวนจุลินทรีย์

น้ำมันหอมระเหยและกรดไขมัน (Essential oils and fatty acids): น้ำมันหอมระเหยมีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของจุลินทรีย์ โดยจะมีลักษณะเป็นการยับยั้งแบบจำเพาะเจาะจงต่อกลุ่มจุลินทรีย์ ทั้งนี้สัดส่วนของ ไฮโดรคาร์บอนส์, ออกซิเจน (O) และซัลเฟต (S) ที่อยู่ในโครงสร้างทางเคมีของน้ำมันจะเป็นตัวสำคัญต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ เช่น ไฮโดรคาร์บอนส์ (p-cymene, terpinene และ R(+)-limonene) มีผลต่อการยับยั้งที่แตกต่างกันและไม่รุนแรงมากนัก ในขณะที่กลุ่ม O (เช่น phenols) และ S (sulphides) จะมีผลต่อจุลินทรีย์เป็นอย่างมาก สำหรับกลไกการยับยั้งคือ จะส่งผลต่อการยับยั้งการขนส่งสารเข้า-ออกเซลล์ และจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ นอกจากนี้น้ำมันหอมระเหยจะทำหน้าที่เฉพาะเจาะจงต่อแบคทีเรียแกรมบวกเท่านั้น ส่วนแกรมลบจะคงทนมากกว่า ทั้งนี้เป็นผลเนื่องมาจากแกรมลบจะมีผนังเซลล์ส่วน outer membrane ที่หนากว่า ตลอดจนมีกลไกในการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดีกว่าแกรมบวก สำหรับน้ำมันที่สกัดได้จากพืชนั้น ส่วนมากจะมีองค์ประกอบของกรดไขมันสายกลางจนถึงสายยาว โดยจากการเสริมน้ำมันถั่วเหลืองในโคเนื้อเพศผู้สามารถลดการผลิต CH_4 ได้ 39.4% (ลิตร/วัน) การศึกษาโดยใช้น้ำมันเมล็ดทานตะวันได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก ซึ่งสามารถลดจุลินทรีย์ที่สังเคราะห์ CH_4 ได้ 11.5-22.0% (Jordan et al., 2006) ส่วนการเสริมน้ำมันจาก Linseed oil ที่ระดับ 5% ของอาหารในโครีดนมพบว่าสามารถลดปริมาณ CH_4 ต่อวันได้ 55.8% รวมทั้งลด methanogens 13-73% ทั้งนี้ขึ้นกับระดับและชนิดของอาหารที่เสริม Pilajun and Wanapat (2011) พบว่าการเสริมน้ำมันมะพร้าวที่ระดับ 5% ของอาหารข้น สามารถลดจำนวนประชากรของโปรโตซัว จาก 4.7×10^5 เหลือ 3.0×10^5 เซลล์/มล. เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยได้ผลที่สอดคล้องกันกับ Kongmun et al. (2010) ที่ศึกษาแบบ *in vitro* พบว่าการเสริมน้ำมันมะพร้าวที่ระดับ 8 มก. สามารถลดประชากรโปรโตซัวและไม่มีผลต่อประชากรจุลินทรีย์กลุ่มที่ย่อยสลายเยื่อใย การเสริมกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว เช่น linoleic acid (C18:2 จากถั่วเหลือง หรือเมล็ดทานตะวัน) และ linolenic acid (C18:3 จาก linseed) พบว่าสามารถลดการผลิต CH_4 ได้ 52% เมื่อเสริม linseed oil 5.8% (Martin et al., 2011) ในขณะที่จะลดลง 37% เมื่อใช้น้ำมันถั่วเหลือง 6% (Jordan et al., 2006) ดังนั้น จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่าการเสริมน้ำมันหอมระเหยและกรดไขมันเพื่อให้มีประสิทธิภาพในการลด CH_4ควรอยู่ที่ระดับ 5 และ 6% ตามลำดับ

การใช้สารประกอบ Organosulfur และสารประกอบอื่น ๆ ในน้ำมันจากพืช: การใช้สารประกอบ Organosulfur ตัวอย่างเช่น น้ำมันจากกระเทียม ซึ่งมีสารประกอบหลัก คือ diallyl sulfide, diallyl disulfide, allyl mercaptan, และ allicin จากงานวิจัยของ Busquet et al. (2005) ได้สังเกตว่าน้ำมันกระเทียมและ diallyl disulfide (300 มก./ลิตร ของของเหลวในกระเพาะรูเมน) สามารถลดการผลิต CH_4 ได้มากถึง 74% และ 69% ตามลำดับ โดยนักวิจัยกลุ่มนี้ได้แนะนำว่า สารทั้งสองชนิด จะมีผลในการยับยั้งการผลิต CH_4 โดยการยับยั้งโดยตรงต่อกลุ่มจุลินทรีย์ที่สังเคราะห์จากงานวิจัยในแพะ พบว่า ในแพะที่ได้รับอาหารหลักเป็นฟางข้าวฟางและอาหารข้น (1:1) ที่มีการเสริม *Allium sativum* ที่ระดับ 10 กรัม/กก.ปริมาณการกินได้วัตถุแห้ง พบว่าสามารถลดการผลิต CH_4 ต่อหน่วยของการย่อยได้อินทรียวัตถุและเพิ่มการย่อยได้ของเยื่อใย (Patra et al., 2011) นอกจากนี้การเสริมกระเทียมผงที่ระดับ 4 กรัม ใน *in vitro* และ 100 กรัม ในกระบือ สามารถลดประชากรโปรโตซัวและลดการผลิต CH_4 ได้ 10-20% (Kongmun et al., 2010) นอกจากนี้การเสริมน้ำมัน Eucalyptus ก็สามารถยับยั้งการผลิต CH_4 ได้เช่นเดียวกัน โดยการเสริมที่ระดับ 1.66 มล./ลิตร สามารถลด CH_4 58%, เสริมที่ 2 มล./ลิตร ลดได้ 90.3% และเสริมที่ระดับ 0.33 กรัม ของสารประกอบน้ำมัน cyclodextrin-eucalyptusoil สามารถลด CH_4 ได้ 70% (Tatsuoka et al., 2008) สำหรับ eucalyptus มีองค์ประกอบหลายชนิดเช่น terpinenol, a-pinene,

p-cymene, aromadendrene และ a-phellandrene เป็นต้น โดย p-cymene สามารถลด CH_4 ได้ 29% เมื่อเสริมที่ระดับ 20 มก./ลิตร อย่างไรก็ตามการเสริม a-cyclodextrin cineole จะไม่มีผลต่อการผลิต CH_4 เมื่อมีการเสริมที่ระดับ 0.33 กรัม/ลิตร ในอาหารข้น (Tatsuoka et al., 2008) ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากระดับการใช้ต่ำเกินไป ดังนั้น จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่า กระเทียมผงที่ระดับ 4-10 กรัม ในการศึกษาแบบ *in vitro* และ 100 กรัมในการศึกษาแบบ *in vivo* ขณะที่การเสริมน้ำมัน Eucalyptus ควรเสริมที่ระดับ 2 มล./ลิตร

การใช้สารอินทรีย์ (Organic acids)

การใช้ Malate และ Fumarate เพื่อเป็น propionate enhancers: สารประกอบอินทรีย์ เช่น malate และ fumarate ได้ถูกนำมาใช้เพื่อเสริมในอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง โดยสารอินทรีย์เหล่านี้จะมีคุณสมบัติในการดึงใช้ H_2 เพื่อเพื่อนำไปผลิตปน C_3 ในกระเพาะรูเมนต่อไป จากงานวิจัยในโคเพศเมียที่ได้รับการเสริมกรด malic ที่ระดับ 3.75% และ 7.5% ของวัตถุแห้ง พบว่าสามารถลดการผลิต CH_4 ได้ 3% และ 9% กรัม/กก. ปริมาณการกินได้วัตถุแห้ง ตามลำดับ (Foley et al., 2009) ส่วน fumarate และ acrylate ได้มีการนำมาใช้ในการศึกษาแบบ *in vitro* ซึ่งให้ส่งผลต่อการลดลงของ CH_4 อย่างไรก็ตาม การศึกษาแบบ *in vivo* พบว่าข้อมูลที่ได้ยังมีความผันแปรอยู่ เช่น จากงานวิจัยของ Beauchemin et al. (2008) พบว่าการเสริมสารอินทรีย์เหล่านี้ไม่มีผลทางบวกในโคเพศเมีย ในขณะที่การเสริมในโคเพศผู้สามารถลดการผลิต CH_4 ได้ถึง 16% (Foley et al., 2009) นอกจากนี้การเสริม encapsulated fumarate ในแพะขุนที่ระดับ 10% สามารถลดการผลิต CH_4 ได้ 75% และไม่มีผลต่อทางลบต่อการเจริญเติบโต (McCourt et al., 2007) อย่างไรก็ตาม การศึกษาในอนาคต ควรที่จะศึกษาถึงการเสริมสารอินทรีย์เหล่านี้ ในระดับที่สูงขึ้น โดยอาจทำการเสริมร่วมกับระดับอาหารข้นที่สูง หรือเลือกชนิดและแหล่งอาหารหยาบที่เหมาะสมมาใช้ร่วมกับการเสริม ตลอดจนศึกษาถึงการเสริมร่วมกับสัดส่วนของ rumen degradable protein: metabolizable energy (RUP: ME) เป็นต้น ทั้งนี้เพื่อ เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการเปลี่ยน C_2 เป็น C_3 ให้มากขึ้น และส่งผลต่อการใช้ประโยชน์ของ H-sink ได้

การใช้ Nitroethane, Nitrate และกำมะถันเพื่อเป็นตัวให้และตัวรับอิเล็กตรอน: การผลิต CH_4 จะลดลงได้โดยการเพิ่มแข่งขันการใช้ประโยชน์ H_2 ของจุลินทรีย์อีกกลุ่มหนึ่งที่ไม่ใช่กลุ่ม methanogens ซึ่งมีแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนบางชนิดที่สามารถเปลี่ยน nitrate เป็น nitrite และเปลี่ยน nitrite เป็น NH_3 และจะต้องใช้ H_2 หรือ/และ formate เพื่อนำมาใช้เป็นตัวให้อิเล็กตรอน ดังนั้น การสังเคราะห์ CH_4 อาจจะลดลงเมื่อมีการเสริม nitrate หรือ กำมะถัน (Sar et al., 2005) นอกจากนี้ สารประกอบ nitro เช่น nitroethane หรือ nitrate เป็นสารประกอบที่เป็นพิษต่อ methanogens บางชนิด และสามารถยับยั้งการสังเคราะห์ CH_4 ในกระเพาะรูเมนได้ (Sar et al., 2005) อย่างไรก็ตาม เพื่อให้การลด CH_4 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ได้มีการแนะนำไว้ว่า การเสริมสารประกอบ nitro ควรจะมีการเสริมร่วมกับสารประกอบอื่นๆ หรือ prebiotic ทั้งนี้เพื่อเป็นการเพิ่มศักยภาพในการทำลายจุลินทรีย์ที่สังเคราะห์ CH_4 ตลอดจนเพื่อให้เกิดการเปลี่ยนสารประกอบ nitrate เป็น NH_3 และนำไปใช้ประโยชน์ในกระเพาะรูเมนต่อไปได้ (Sar et al., 2005) จากงานวิจัยพบว่าการเสริมสารประกอบ nitroethane สามารถลด CH_4 ได้มากกว่า 90% ใน *in vitro* และมากกว่า 43% ใน *in vivo* โดย nitroethane จะมีผลในการยับยั้งการออกซิเดชั่นของ formate และ H ซึ่งจะเป็นการลดสารตั้งต้นที่จะนำไปใช้ในการสังเคราะห์ CH_4 สำหรับ nitroethane นั้นเป็นปัจจัยที่สำคัญในการกระตุ้นให้เกิดการใช้ประโยชน์ของอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายของแบคทีเรีย *Dentitrobacterium detoxificans* ที่อาศัยในกระเพาะรูเมน การศึกษาในโคเพศผู้ตอนที่ได้รับ nitroethane ที่ระดับ 80 หรือ 160 มก. ของน้ำหนักตัว จะส่งผลต่อการเพิ่มการย่อยสลาย

nitroethane ได้เช่นกัน Brown et al. (2011) ได้ทำการศึกษาโดยการเสริม nitroethane ที่ระดับ 0, 30, 60 และ 120 มก. /กก. น้ำหนักตัวต่อวัน ในโคนมเพศผู้ พบว่า การปลดปล่อย CH_4 จะมีค่าลดลงแบบเส้นตรงตามระดับที่เพิ่มขึ้นของการเสริม nitroethane นอกจากนี้เมื่อมีการเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการเสริมพบว่าที่ระดับ 60 และ 120 มก. /กก. น้ำหนักตัว สามารถลดการปลดปล่อย CH_4 ได้ 9-22% และลดการผลิต CH_4 ในกระเพาะรูเมนได้ 24-26% ในปัจจุบัน *D. detoxificans* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก และไม่ใช้ออกซิเจน ถือเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่สามารถใช้สารประกอบ nitroethane ได้ จากงานวิจัยพบว่า การเสริม 3-nitro-1-propanol สามารถเพิ่มแบคทีเรียกลุ่ม *D. detoxificans* มากถึง 10^8 เซลล์/มล. ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถเก็บพลังงานไว้ใช้สำหรับการเจริญเติบโตได้ โดยการเปลี่ยนไปใช้พลังงานที่ได้จากการสลาย H และ formate แทน อันจะส่งผลต่อการลดลงของสารตั้งต้นที่จะนำไปใช้ในการผลิต CH_4 ต่อไป ดังนั้นจากข้อมูลเบื้องต้นสามารถสรุปได้ว่า การเสริม nitroethane ควรอยู่ที่ระดับ 60-120 มก. /กก. น้ำหนักตัว

การใช้ Thiamine: การผลิต CH_4 ในกระเพาะรูเมนนอกจากจะเป็นการสูญเสียพลังงานจากอาหารที่สัตว์ได้รับเข้าไปแล้ว ยังส่งผลต่อการเกิดสภาวะโลกร้อนขึ้นดังที่กล่าวมาเบื้องต้นแล้ว กระบวนการที่สำคัญอีกอย่างหนึ่ง คือ pyruvate oxidative decarboxylation ซึ่งเป็นกระบวนการแรกของการผลิต C_2 และ C_4 รวมทั้งมีการปลดปล่อย CO_2, H_2 และ formate ซึ่งผลพลอยได้เหล่านี้สามารถนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเป็น CH_4 ได้ (Ungerfeld et al., 2009) การยับยั้งกระบวนการ pyruvate oxidative decarboxylation จะส่งผลต่อการเพิ่มการผลิต C_3 และลดการสังเคราะห์ CH_4 ได้อีกทางหนึ่ง สำหรับ thiamine diphosphate คือเป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ pyruvate oxidative decarboxylation (Voet and Voet, 1995) ดังนั้น ในกรณีที่กระเพาะรูเมนไม่มี thiamine อาจจะส่งผลต่อการยับยั้งในกระบวนการ pyruvate oxidative decarboxylation และทำให้อัตราการผลิต CH_4 ลดลง ได้ สารประกอบ flavanoids และ dihydroxyphenolic สามารถย่อยสลาย thiamine ได้ (Ungerfeld et al., 2009) นอกจากนี้ จากการศึกษาแบบ *in vitro* พบว่าในอาหารที่มีกำมะถันสูง ก็จะสามารถลดความเข้มข้นของ thiamine ได้เช่นกัน (Alves de Oliveira et al., 1997) ตลอดทั้งลดอัตราการไหลผ่านไปยังส่วนของลำไส้เล็ก เมื่อมีการศึกษาในตัวสัตว์ทดลอง ดังนั้นการเสริมสารประกอบดังกล่าวข้างต้น จึงถือเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะลดอัตราการปลดปล่อย CH_4 ลงได้

การใช้ Bromochloromethane: สารประกอบ Bromochloromethane (BCM) ได้มีการนำเข้ามาใช้ในการศึกษาเพื่อลดการผลิต CH_4 ซึ่งจากงานวิจัยพบว่า BCM จะมีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่สังเคราะห์ CH_4 โดยได้สันนิฐานว่าสารชนิดนี้จะทำหน้าที่ในการลดปริมาณของวิตามิน B_{12} และจะส่งผลต่อการยับยั้งในการเคลื่อนย้ายหมู่ cobamide-dependent methyl ในระหว่างกระบวนการเคราะห์ CH_4 ในจุลินทรีย์ ในโคหรือแกะที่ได้รับสารประกอบ BCM จะส่งผลต่อการลดลงของ CH_4 ที่ผลิตขึ้นรวมทั้งเพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหาร จากการศึกษาเมื่อไม่นานมานี้โดย Goel et al. (2009) ได้รายงานว่า ในกระบวนการหมักแบบระบบปิด ที่ให้อาหารหยาบเป็นหลัก และหมักร่วมกับสารผสมจากของเหลวในกระเพาะรูเมน จากนั้นมีการเสริม BCM ที่ระดับ 5 และ 10 มิลลิโมล ซึ่งผลการทดลองพบว่าการผลิต CH_4 ลดลง 89-94% เมื่อเปรียบเทียบกันในหน่วยของการย่อยได้จริงของอาหาร นอกจากนี้เมื่อใช้เทคนิค qPCR เพื่อศึกษาประชากรของจุลินทรีย์พบว่า สามารถยับยั้งและลด methanogens ได้ในขณะเดียวกันประชากร *Fibrobacter succinogenes* และ ประชากร เชื้อราเพิ่มขึ้น 68% และ 30% ตามลำดับ สำหรับการศึกษากระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง ที่ให้อาหารหยาบเป็นหลักและมีการเสริม BCM ที่ระดับ 5 มิลลิโมล พบว่าการผลิต CH_4 (ลดลง 85-90%) และประชากร methanogens ลดลง ในขณะที่ประชากรเชื้อราเพิ่มขึ้นแต่ไม่มีผลประชากรแบคทีเรียรวม และ *F. succinogenes* (Goel et al., 2009) ดังนั้นการเสริม

BCM จึงเป็นอีกลู่ทางหนึ่งในการพัฒนาด้านอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องต่อการผลิตสัตว์เพื่อลดการปลดปล่อย CH_4 ออกสู่ ชั้นบรรยากาศต่อไป ดังนั้น สารประกอบ Bromochloromethane (BCM) ควรเสริมที่ระดับ 5-10 มิลลิโมล เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการลดลงของ CH_4 ได้ดีที่สุด

การควบคุมด้วยเทคโนโลยีชีวภาพ

การใช้ไอโอโนฟอร์ (Ionophore): ไอโอโนฟอร์ตัวอย่างเช่น monensin เป็น antibiotic ที่ผลิตจาก *Streptomyces cinnamonensis* และมีการวางขายในระบบตลาดเริ่มแรกในตอนเหนือของประเทศอเมริกา ปกติจะใช้เสริมในอาหารสัตว์เพื่อเพิ่มสมรรถภาพในการให้ผลผลิตเนื้อและน้ำนมในสัตว์เคี้ยวเอื้อง นอกจากนี้ยังสามารถลดการผลิต CH_4 ได้อีกทางหนึ่ง การทำงานของ monensin นั้น จะมีผลโดยตรงต่อการยับยั้งการนำสารเข้า-ออกเซลล์ของจุลินทรีย์ และจะมีผลต่อจุลินทรีย์ที่เป็นแกรมบวกเท่านั้น จากงานวิจัยใน *in vitro* พบว่า CH_4 ลดลง 76% ในขณะที่ใน *in vivo* ลดการผลิต CH_4 ได้ 18% อย่างไรก็ตาม ไอโอโนฟอร์จะไม่มีผลต่อปริมาณและความหลากหลายของ methanogens (Hook et al., 2011) แต่จะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียแกรมลบ นั่นคือจะส่งผลต่อการเปลี่ยน C_2 เป็น C_3 มากขึ้น ดังนั้น H_2 ที่จะนำไปผลิตเป็น CH_4 จึงลดลงและส่งผลต่อการลดลงของปริมาณ CH_4 ตามมา การเสริม monensin ในอาหารในระดับที่ต่ำกว่า 20 มก./กก. อาหาร พบว่าจะไม่มีผลต่อการผลิต CH_4 (Beauchemin et al., 2008) อย่างไรก็ตาม เมื่อมีการเพิ่มปริมาณการเสริม ที่ระดับ 24-35 มก./กก. อาหาร พบว่าสามารถลด CH_4 ได้ถึง 4-10% ในทางตรงกันข้าม การเสริมเป็นระยะเวลานานพบว่าจะไม่ส่งผลต่อการลด CH_4 ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจาก จุลินทรีย์สามารถปรับตัวและต้านทานต่อไอโอโนฟอร์ ได้ในระดับหนึ่งแล้ว ดังนั้น การใช้ไอโอโนฟอร์ เพื่อให้ได้ผลดี ควรจะใช้ในระยะเวลาสั้นๆ ซึ่งจะสามารถช่วยในการใช้ประโยชน์อาหารในสัตว์เคี้ยวเอื้องได้ดีขึ้น นอกจากนี้ การใช้ ไอโอโนฟอร์บางประเทศในยุโรป ได้มีการกำหนดระดับที่ยอมรับให้ใช้หรือบางประเทศประกาศห้ามใช้ไปแล้ว ดังนั้นเพื่อให้มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการลดการผลิต CH_4 ควรเสริม monensin ระดับ 24-35 มก./กก. อาหาร

การ Oxidation ของ CH_4 ในกระเพาะรูเมน โดย Methanotrophs: แนวทางในการลด CH_4 ในกระเพาะรูเมนสามารถปฏิบัติได้อีกทางหนึ่งคือ การ oxidation ของ CH_4 เพื่อให้ได้ CO_2 และ H_2 โดยกระบวนการนี้เกิดขึ้นได้โดยอาศัยแบคทีเรียกลุ่ม oxidizing bacteria (methanotrophs) ในกระเพาะ รูเมน ซึ่ง Methanotrophs (Proteobacteria) สามารถแยกเชื้อได้มาจากทั้งในสภาพแวดล้อมโดยทั่วไป หรือแยกมาจากในกระเพาะรูเมน อย่างไรก็ตาม ยังมีการศึกษาวิจัยไม่มากนักถึงลักษณะทางกายภาพของจุลินทรีย์กลุ่มดังกล่าว ตลอดจนบทบาทหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับ CH_4 ในกระเพาะรูเมน ซึ่งบางงานวิจัยใน *in vitro* ที่ใช้ศึกษาบทบาทหน้าที่ของจุลินทรีย์กลุ่ม methanotrophs ในสารผสมของเหลวในกระเพาะรูเมนนั้น พบว่าการ oxidation ของ CH_4 เพื่อให้เกิด CO_2 ยังมีปริมาณที่น้อยอยู่ (0.2-0.5% ของ CH_4 ที่ผลิตทั้งหมด) ดังนั้นในอนาคตจึงควรที่จะมีการศึกษามากขึ้นถึงกลไกการทำงาน และการลด CH_4 ของ methanotrophs ในกระเพาะรูเมน เพื่อให้ได้มาซึ่งความรู้ใหม่ และสามารถปฏิบัติได้จริงในสัตว์เคี้ยวเอื้องต่อไป

การสร้างภูมิคุ้มกันและการควบคุมด้านชีวภาพ: ในกรณีที่ต้องการยับยั้ง methanogens โดยไม่ให้เกิดผลกระทบต่อจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ชนิดอื่นนั้น จำเป็นที่จะต้องมีเป้าหมายที่จำเพาะเจาะจงต่อ methanogens โดยทีมนักวิจัยจากประเทศออสเตรเลียได้ค้นพบเป็นกลุ่มแรกว่าการทำวัคซีนเพื่อยับยั้ง methanogens สามารถลดการผลิต CH_4 ได้โดย Wright et al. (2004) ทำการสร้างภูมิคุ้มกันในแกะโดยใช้วัคซีนที่ได้มาจากการผสมระหว่างเชื้อ methanogens จำนวน 3 ชนิด พบว่าสามารถลดการผลิต CH_4 ได้ถึง 7.7% (กรัม/กก. ปริมาณการกินได้วัตถุแห้ง) นอกจากนี้ Cook et al. (2008) ได้ทำการเตรียมแอนติ้บอดี้ IgY ในไก่ไข่เพื่อใช้ยับยั้ง methanogens ใน *in vitro* จาก

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การผลิต CH_4 มีค่าลดลงในชั่วโมงที่ 12 หลังจากที่มีการบ่ม แต่เมื่อผ่านไป 24 ชั่วโมง จะไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ CH_4 ซึ่ง Cook et al. (2008) ได้ตั้งข้อสังเกตว่าแอนตี้บอดี้ที่ได้อาจจะมีผลต่อ methanogens เพียงระยะเวลา 12 ชั่วโมงแรกเท่านั้น ทั้งนี้อาจเป็นเพราะแอนตี้บอดี้ถูกย่อยสลายโดย methanogens หรือ methanogens มีความหลากหลายมาก จึงทำให้แอนตี้บอดี้ไม่สามารถยับยั้ง methanogens นอกจากนี้การที่ methanogens มีความหลากหลายและหลุดรอดจากการทำลายได้นั้น อาจเนื่องมาจากอิทธิพลของอาหาร วัคซีนที่เตรียมแตกต่างเวลากัน มีการทดสอบในภูมิประเทศที่แตกต่างกัน และลักษณะสภาพแวดล้อมที่แตกต่าง ดังนั้น ความท้าทายที่จะเกิดขึ้นกับนักวิจัยคือหากลยุทธ์ในการผลิตวัคซีน เพื่อให้เหมาะสมกับสภาพพื้นที่ที่นักวิจัยศึกษาอยู่ เพื่อให้มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการยับยั้ง methanogens ต่อไป นอกจากนี้ Leahy et al. (2010) ซึ่งได้ทำการจำแนกยีนเป้าหมายไว้หลายชนิดที่สามารถยับยั้งการผลิต CH_4 จาก *M. ruminantium* โดยการสร้าง chemogenomic ซึ่งเป็นวัคซีนป้องกัน จากผลการทดลองพบว่า ในแกะที่ได้รับวัคซีนที่สังเคราะห์นั้น สามารถที่จะต่อต้านยีนเป้าหมายบางชนิดได้ในขณะที่การให้แกะได้รับวัคซีนที่เตรียมจากชิ้นส่วนของ *M. ruminantium* พบว่าสามารถที่จะยับยั้งการเจริญเติบโตของ *M. ruminantium* และลดการผลิต CH_4 ได้เช่นกัน

การใช้ Probiotic: Probiotics ถูกนำมาใช้ในอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง เพื่อเพิ่มสมรรถนะการผลิต กระบวนการหมักในกระเพาะรูเมน และด้านสุขภาพ รวมทั้งช่วยลดการปลดปล่อย CH_4 (Martin et al., 2010) โดย probiotic ที่นิยมนำมาใช้ได้แก่ ยีสต์ ชนิด *S. cerevisiae* และ *Aspergillus oryzae* ซึ่งจากงานวิจัยพบว่าเชื้อยีสต์ทั้งสองชนิดสามารถลดการผลิต CH_4 ในกระเพาะรูเมนได้ อย่างไรก็ตามส่วนมากจะเป็นงานวิจัยแบบ *in vitro* เช่น จากงานวิจัยของ Lynch and Martin (2002) ที่รายงานว่า การผลิต CH_4 ลดลง 20% หลังจากกระบวนการหมักผ่านไป 48 ชั่วโมง ในการศึกษาแบบ *in vitro* ที่ใช้อัลฟัลฟาและยีสต์เชื้อเป็น นอกจากนี้การเสริม *Trichosporon sericeum* ในระดับ 4 กรัม/วัน ส่งผลต่อการลด CH_4 ได้ 10% ในแกะที่ได้รับอาหารหยาบเป็นหลัก ทั้งนี้ อาจจะเป็นผลมาจากเชื้อยีสต์สามารถกระตุ้นให้เกิด acetogens อย่างสมบูรณ์ (หรือลดการสังเคราะห์ C_2) หรือมีการดึง H_2 มาใช้ ดังนั้น การผลิต CH_4 จึงลดลง อย่างไรก็ตามในบางงานวิจัยที่มีการเสริม *A. oryzae* และ *S. cerevisiae* จะส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของ CH_4 ในขณะที่การเสริม *S. cerevisiae* ในสัตว์จะไม่มีผลการปริมาณการผลิต CH_4 (Hegarty et al., 2007; Martin et al., 2010) สำหรับข้อโต้แย้งต่อผลผลิต CH_4 ข้างต้นนี้อาจเป็นผลมาจาก ความแตกต่างด้านสายพันธุ์ของยีสต์ ชนิดของอาหารที่ใช้ สถาพแวดล้อมของแต่ละพื้นที่ และระดับที่ใช้เสริมอาจจะต่ำเกินไป ตลอดจนอิทธิพลร่วมของแต่ละปัจจัย ดังนั้นการจัดการปัจจัยเบื้องต้นให้มีความเหมาะสม สำหรับใช้ในการลด CH_4 ควรให้ความสำคัญ ตลอดจนควรที่จะมีการศึกษามากขึ้นก่อนที่จะแนะนำเพื่อเป็นแนวทางปฏิบัติในการลด CH_4 ต่อไป ดังนั้นการเสริม probiotic ควรเสริมที่ระดับ 4-10 กรัม/วัน เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการลดลงของ CH_4 ได้ดีที่สุด อย่างไรก็ตามควรพิจารณาถึงปัจจัยที่เกี่ยวข้องข้างต้นอย่างรอบครอบ

การกำจัดโปรโตซัว: แบคทีเรียกลุ่ม methanogens สามารถยึดเกาะบนผิวและบริเวณขนของโปรโตซัว เมื่อคิดเป็นสัดส่วนแล้วพบว่ามีปริมาณมากถึง 37% ของโปรโตซัวทั้งหมดในกระเพาะรูเมน ดังนั้น การกำจัดโปรโตซัวจึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะสามารถลดการผลิต CH_4 และปรับปรุงกระบวนการย่อยสลาย Morgavi et al. (2010) แสดงให้เห็นว่าในแกะที่ได้มีกำจัดโปรโตซัวเป็นระยะเวลา 2 ปี สามารถลดการผลิต CH_4 ลงได้ 20% อย่างไรก็ตามบางงานวิจัย การกำจัดโปรโตซัวก็ไม่ส่งผลต่อการลดลงของ CH_4 โดยสาเหตุนั้นยังไม่สามารถทราบแน่ชัด มีหลายวิธีการที่ได้นำมาใช้เพื่อกำจัดโปรโตซัวจากกระเพาะรูเมน แต่ยังไม่มีวิธีใดวิธีหนึ่ง ที่นำมาปฏิบัติอย่างโดยทั่วกัน ทั้งนี้เป็นผลอันเนื่องมาจาก ผลกระทบ

ที่อาจเกิดขึ้นแก่จุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนกลุ่มอื่น รวมทั้งผลต่อตัวสัตว์เอง สำหรับตัวอย่างกลยุทธ์ที่ได้นำมาใช้ ซึ่งได้มีการอธิบายไว้ก่อนหน้านี้แล้ว เช่น การใช้สารประกอบจากพืช การทำวัคซีนสำหรับต่อต้านโปรโตซัว การใช้พืชน้ำมัน และ ไอโอโนฟอร์ ฯลฯ อย่างไรก็ตามเทคโนโลยีด้านการกำจัดโปรโตซัวในกระเพาะรูเมนควรที่จะมีการศึกษาอย่างต่อเนื่อง เพื่อที่จะได้มาซึ่งแนวทางที่สามารถนำปฏิบัติและได้ผลอย่างดีที่สุด

การใช้ Bacteriophages: Bacteriophages สามารถพบได้ทั่วไปในระบบนิเวศน์วิทยา และมีโครงสร้างแบบง่ายๆ และสามารถแยกหรือรวมกันได้ตลอดเวลา นั่นจึงเป็นสาเหตุทำให้ bacteriophages สามารถเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของเซลล์เจ้าบ้านได้หลายแบบ สำหรับ bacteriophages คือไวรัสที่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อทั้งแบคทีเรียและ methanogens จากนั้นจะมีการทำให้เซลล์เจ้าบ้านเกิดการสลายตัวระหว่างระยะที่มีการแบ่งเซลล์ ในกระเพาะรูเมนนั้น bacteriophages พบได้ถึง 10^9 เซลล์/มล. อย่างไรก็ตามปัจจุบันยังไม่สามารถจำแนก bacteriophages จากของเหลวในกระเพาะรูเมนได้ การที่ bacteriophages มีผลต่อการยับยั้งทั้ง methanogens และที่ไม่ใช่ methanogens ดังนั้นการจำแนก bacteriophages ที่ยับยั้ง methanogens เพียงอย่างเดียวจึงเป็นอีกกลยุทธ์หนึ่งที่ท้าทายนักวิจัยในปัจจุบันเป็นอย่างยิ่งเพื่อที่จะศึกษาค้นคว้าในอนาคต

การใช้ Bacteriocins: Bacteriocins เป็นโปรตีนหรือเปปไตด์ที่สร้างจากแบคทีเรีย ซึ่งมีหน้าที่ในต่อสู้เพื่อความอยู่รอดกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ในระบบนิเวศน์เดียวกัน ตัวอย่างเช่น bovicin HC5 ซึ่งเป็น bacteriocin ที่ผลิตจากแบคทีเรียชนิด Streptococcus ในกระเพาะรูเมน และมีรายงานว่าสามารถลดการผลิต CH_4 ได้ มากถึง 50% ในการศึกษาแบบ *in vitro* (Lee et al., 2002) นอกจากนี้ nisin ซึ่งเป็น bacteriocin ที่ผลิตจากแบคทีเรียชนิด Lactobacillus lactis subsp. lactis จากงานวิจัยแบบ *in vitro* พบว่าสามารถลดการผลิต CH_4 ได้เช่นเดียวกัน สำหรับการใช้ nisin ร่วมกับ nitrate เพื่อใช้เป็นตัวรับอิเล็กตรอน (ดังที่กล่าวมาเบื้องต้น) จะส่งผลต่อการลดลงของการผลิต CH_4 ในแกะ (Sar et al., 2005) ดังนั้นการใช้ bacteriocin จึงอาจเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่สามารถใช้เพื่อลดการผลิต CH_4

การคัดเลือกลักษณะพันธุกรรมเพื่อการลดการปลดปล่อย CH_4: ในปัจจุบัน ได้มีการศึกษาการผลิต CH_4 จากสัตว์ต่างชนิดกัน แต่มีการเลี้ยงภายใต้สภาวะการให้อาหารชนิดเดียวกัน เช่น Pinares-Patiño et al. (2003) ได้ทำการจำแนกสัตว์ชนิดออกเป็นสองกลุ่ม ตามสัดส่วนการปลดปล่อย CH_4 สูง และต่ำ และได้ตั้งข้อสังเกตว่าแม้ว่าสัตว์จะได้รับอาหารชนิดเดียวกันตลอดระยะเวลา 5 เดือน แต่อัตราการผลิต CH_4 จะมีความแตกต่าง ทั้งนี้อาจจะเกิดจากความผันแปรระหว่างจำนวน methanogen ในกระเพาะรูเมนของสัตว์ นอกจากนั้นอาจจะเป็นไปได้ว่าสัตว์มีพันธุกรรมที่แตกต่างกัน ในด้านของการผลิต CH_4 ดังนั้นจากประเด็นนี้จึงอาจจะสามารถใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกสายพันธุ์สัตว์ที่มีการผลิต CH_4 ในปริมาณต่ำ การปรับปรุงพันธุ์ ถือเป็นแนวทางในการเพิ่มสมรรถภาพการผลิต ลดความเสี่ยงในการเกิดโรค และมีศักยภาพในการลดการผลิต CH_4 จากปศุสัตว์ได้ การปรับปรุงพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับการลดการผลิต CH_4 สามารถทำได้โดยการเพิ่มสัดส่วนอาหารพลังงานเพื่อใช้สำหรับการเจริญเติบโตในขณะที่ลดความต้องการเพื่อการยังชีพลง จากการศึกษาที่ผ่านมา แสดงให้เห็นว่าสัตว์เคี้ยวเอื้องที่มีอาหารเหลือจากการกินได้น้อย (low residual feed intake; RFI, เกิดจากการกินอาหารที่แตกต่างกันจริง และคาดว่าสัตว์มีความต้องการอาหารสำหรับดำรงชีพและการเจริญเติบโต) จะมีการปลดปล่อย CH_4 น้อยกว่าสัตว์ที่มี RFI สูง (Hegarty et al., 2007) ดังนั้นจากผลการวิจัยที่ได้ จึงเป็นข้อมูลสนับสนุนในการคัดเลือกพันธุ์ที่มีลักษณะพิเศษดังกล่าว จากงานวิจัยของ Hegarty et al. (2007) ได้รายงานว่า การปลดปล่อย CH_4 จะต่ำในพ่อพันธุ์ Angus ที่ได้มีการคัดเลือกโดยอาศัยข้อมูลจาก RFI ต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับลุ่มที่มี RFI สูง ทั้งนี้ ในโคกลุ่มที่ RFI และ CH_4 ต่ำ อาจเป็นผลมาจากจำนวนประชากร

methanogen ต่ำกว่าในโคกลุ่ม RFI สูง ทั้งนี้ Hegarty et al. (2007) แนะนำว่าเมื่อมีการคัดเลือกสัตว์ในกลุ่ม RFI ต่ำ และมีความสามารถในการลดการผลิต CH_4 ได้สูง จะเหมาะสมกับอาหารที่มีการย่อยสลายที่ต่ำ ดังนั้น จากกลยุทธ์นี้จะเป็นประโยชน์มากสำหรับกลุ่มประเทศที่อยู่ในเขตร้อน ซึ่งเป็นเขตที่มีการให้อาหารคุณภาพต่ำแก่สัตว์เคี้ยวเอื้อง

สรุปและข้อเสนอแนะ

ปัจจุบัน นักวิจัยได้เสนอแนวทางในการลดการผลิต CH_4 ไว้หลากหลายแนวทาง เช่น การปรับปรุงด้านอาหาร การใช้สารอินทรีย์ หรือการควบคุมโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ อย่างไรก็ตาม ในแง่ของการนำไปปฏิบัติใช้จริงแล้วได้ผลนั้นยังมีความเป็นไปได้น้อยอยู่ ดังนั้น ในอนาคต การศึกษาเชิงลึกเพื่อให้ได้มาซึ่งข้อมูลที่มากขึ้น และสามารถนำไปปฏิบัติให้เกิดผลจริงต่อการผลิตสัตว์เคี้ยวเอื้อง ยังคงเป็นสิ่งที่ท้าทายสำหรับนักวิจัยต่อไป ตลอดจนการกระตุ้นให้ประเทศผู้ผลิตปศุสัตว์ ได้เล็งเห็นความสำคัญต่อผลกระทบที่จะเกิดขึ้นต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะอากาศของโลก เมื่อมีการปลดปล่อย CH_4 ในปริมาณมากขึ้น

คำขอบคุณ

บทความนี้ได้รับการสนับสนุนจาก ศูนย์วิจัยและพัฒนาทรัพยากรอาหารสัตว์เขตร้อน (TROFREC) ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

Agarwal, N., D. N. Kamra, L. C. Chaudhary, and A. K. Patra. 2006. Effect of *Sapindus mukorossi* extracts on in vitro methanogenesis and fermentation characteristics in buffalo rumen liquor. J. Appl. Anim. Res. 30: 1-4.

Alves de Oliveira, L., C. Jean-Blain, S. Komisarczuk-Bony, A. Durix, and C. Durier. 1997. Microbial thiamine metabolism in the rumen simulating fermenter (Rusitec): the effect of acidogenic conditions, a high sulfur level and added thiamine. Brit.J.Nutr. 78:599-613.

Beauchemin, K. A., M. Kreuzer, F. O'Mara, and T. A. McAllister. 2008. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. Aust. J. Exp. Agri. 48:21-27.

Benchaar, C., C. Pomar, and J. Chiquette. 2001. Evaluation of diet strategies to reduce methane production in ruminants: A modelling approach. Can. J. Anim. Sci. 81:563-574.

Brown, E.G., R.C. Anderson, G. E. Carstens, H. Gutierrez-Banuelos, J. L. McReynolds, L. J. Slay, T.R. Callaway, and D. J. Nisbet. 2011. Effects of oral nitroethane administration on enteric methane emissions and ruminal fermentation in cattle. Anim. Feed Sci. Technol. 166:275-281.

Busquet, M., S. Calsamiglia, A. Ferret, M.D. Carro, and C. Kamel. 2005. Effect of garlic oil and four of its compounds on rumen microbial fermentation. J. Dairy Sci. 88:4393-4404.

Cook, S.R., P.K. Maiti, A.V. Chaves, D. Benchaar, K.A. Beauchemin, and T.A. McAllister. 2008. Avian (IgY) anti-methanogen antibodies for reducing ruminal methane production: in vitro assessment of their effects. Aust. J. Exp. Agri. 48:260-264.

Doreau, M., H. M. G. van der Werf, D. Micol, H. Dubroeucq, J. Agabriel, Y. Rochette, and C. Martin. 2011. Enteric methane production and greenhouse gases balance of diets differing in concentrate in the fattening phase of a beef production system. J. Anim. Sci. 89:2518-2528.

Ferry, J.G. 1995. Methonagenesis: Ecolygy, physiology, biochemistry & genetics. The Quarterly Review of Biology. 70:80-89.

Foley, P. A., D. A. Kenny, J. J. Callan, T. M. Boland, and F. P. O'Mara. 2009. Effect of DL-malic acid supplementation on feed intake, methane emission, and rumen fermentation in beef cattle. J. Anim. Sci. 87:1048-1057.

Goel, G., H. P. S. Makkar, and K. Becker. 2009. Inhibition of methanogens by bromochloromethane: effects on microbial communities and rumen fermentation using batch and continuous fermentations. Br. J. Nutr. 101:1484-1492.

Goodland, R., and J. Anhang. 2009. Livestock and climate change. World Watch. 6:10-19.

Hegarty, R. S., J. P. Goopy, R. M. Herd, and B. McCorkell. 2007. Cattle selected for lower residual feed intake have reduced daily methane production. J. Anim. Sci. *85*:1479-1486.

Hook, S. E., M.A. Steele, K. S. Northwood, A.D. G. Wright, and B. W. McBride. 2011. Impact of high-concentrate feeding and low ruminal pH on methanogens and protozoa in the rumen of dairy cows. Microb. Ecol. DOI: 10.1007/s00248-011-9881-0.

International Panel on Climate Change (IPCC). 2007. Climate change 2007: The physical science basis, Oxford Press, Cambridge.

Jordan, E., D. K. Lovett, F. J. Monahan, J. Callan, B. Flynn, and F. P. O'Mara. 2006. Effect of refined coconut oil or copra meal on methane output and on intake and performance of beef Heifers. J. Anim. Sci. 84:162-170.

Kongmun, P., M. Wanapat, P. Pakdee, and C. Navanukraw. 2010. Effect of coconut oil and garlic powder on in vitro fermentation using gas production technique. Livest. Sci. 127:38-44.

Leahy, S.C., W.J. Kelly, E.H. Altermann, R.S. Ronimus, C. Yeoman, D.M. Pacheco, D. Li, Z. Kong, S. McTavish, C. Sang, S.C. Lambie, P.H. Janssen, D. Dey, and G.T.Attwood. 2010. The genome sequence of the rumen methanogen *Methanobrevibacter ruminantium* reveals new possibilities for controlling ruminant methane emissions. PLOS One 5, e8926.

Lee, S. S., J. T. Hsu, H. C. Mantovani, and J. B. Russell. 2002. The effect of bovicin HC5, a bacteriocin from *Streptococcus bovis* BC5, on ruminal methane production *in vitro*. FEMS Microbiol.Lett. 217:51-55.

Lynch, H. A., and S.A. Martin. 2002. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* culture and *Saccharomyces cerevisiae* live cells on in vitro mixed ruminal microorganism fermentation. J. Dairy Sci. 85:2603-2608.

Martin, C., D. P. Morgavi, and M. Doreau. 2010. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. Anim. 4:351-365.

McCourt, A. R., T. Yan, and C. S. Mayne. 2007. Effect of forage time on methane production from dairy cows. Proc. Br. Soc. Anim. Sci. BSAS, Penicuik, UK. 48 p.

Morgavi, D. P., E. Forano, C. Martin, and C. J. Newbold. 2010. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. Anim. 4:1024-1036.

Patra, A. K. 2011. Enteric methane mitigation technologies for ruminant livestock: a synthesis of current research and future directions. Environ. Monit. Assess. DOI:10.1007/s10661-011-2090-y.

Pellikaan, W.F., E. Stringano, J. Leenaars, D.J.G.M. Bongers, S. van L. Schuppen, J. Plant, and I. Mueller-Harvey. 2011. Evaluating effects of tannins on extent and rate of in vitro gas and CH_4 production using an automated pressure evaluation system (APES). Anim. Feed Sci. Technol. 166:377- 390.

Pilajun, R., and M. Wanapat. 2011. Effect of coconut oil and mangosteen peel supplementation on ruminal fermentation, microbial population, and microbial protein synthesis in swamp buffaloes. Livest. Sci. DOI:10.1016/j.livsci.2011.05.013.

Pinares-Patiño, C. S., M. J. Ulyatt, K. R. Lassey, T. N. Barry, and C. W. Holmes. 2003. Persistence of differences between sheep in methane emission under generous grazing conditions. J. Agri. Sci. 140: 227-233.

Poungchompu, O., M. Wanapat, C. Wachirapakorn, S. Wanapat, and A. Cherdthong. 2009. Manipulation of ruminal fermentation and methane production by dietary saponins and tannins from mangosteen peel and soapberry fruit. Arch. Anim. Nutr. 5: 389-400.

Sar, C., B. Mwenya, B. Santoso, K. Takaura, R. Morikawa, N. Isogai, Y. Asakura, Y.Toride, and J.Takahashi. 2005. Effect of Escherichia coli wild type or its derivative with high nitrite reductase activity on *in vitro* ruminal methanogenesis and nitrate/nitrite reduction. J. Anim. Sci. 83: 644-652.

Steinfeld, H., P. Gerber, T. Wassenaar, V. Castel, M. Rosales, and C. de Haan. 2006. Livestock's role in climate change and air pollution. P.79-123. In: Livestock's long shadow: environmental issues and options (eds. Steinfeld, H., P. Gerber, T. Wassenaar, V. Castel, M. Rosales, and C. de Haan), Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.

Tatsuoka, N., H. Koji, K. Mikuni, H. Kozo, K. Zashimoto, and H. Itabashi. 2008. Effects of the essential oil cyclodextrin complexes on ruminal methane production *in vitro*. Anim. Sci. J. 79:68-75.

Ungerfeld, E.M., S.R. Rust and R. Burnett. 2009. The effects of thiamine inhibition on ruminal fermentation: a preliminary study. Folia Microbiol. 54:521-526.

Voet, D., and J.G. Voet. 1995. Biochemistry, 2nd ed. John Wiley & Sons, New York.

Wright, A. D. G., P. Kennedy, and C. J. O'Neill. 2004. Reducing methane emissions in sheep by immunization against rumen methanogens. Vaccine. 22:3976-3985.