

اثر مهارکننده‌های شیمیایی بر الگوی تخمیر، تولید متان و دفع هیدروژن در شرایط برون‌تنی

ناپیوسته

مرضیه قدمی کوهستانی^{۱*} - رضا ولی زاده^۲ - عباسعلی ناصریان^۳ - سید هادی ابراهیمی^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۷/۲۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۱/۲۸

چکیده

هدف از انجام این فراتحلیل بررسی اثر مهارکننده‌های شیمیایی متان در شرایط کشت ناپیوسته بر فراسنجه‌های تخمیر به‌ویژه تولید متان و هیدروژن بود. داده‌های ۹ تحقیق برون تنی منتشر شده متشکل از ۲۶ مقایسه که در آن‌ها از مهارکننده‌های شیمیایی متان ۲- برومواتان سولفونات، بروموکلرومتان و ۹ و ۱۰- آنتراکوئینون استفاده شده بود، مورد استفاده قرار گرفت. نتایج این فراتحلیل نشان داد هر سه مهارکننده شیمیایی تاثیر منفی- معنی‌داری بر تولید استات داشت ($1/48 \pm 0/255$)، اما نسبت مولی پروپیونات ($0/309 \pm 0/94$) و بوتیرات ($0/125 \pm 0/69$) را افزایش داد. با این حال، کاهش تولید استات با افزایش تولید پروپیونات و بوتیرات جبران نشد که کاهش معنی‌دار تولید کل اسیدهای چرب فرار را به دنبال داشت ($0/42 \pm 0/180$). دفع گاز هیدروژن با استفاده از مهارکننده‌های شیمیایی به طور معنی‌داری افزایش یافت ($2/31 \pm 0/540$)؛ اما این افزایش کمتر از مقدار برآورد شده بر اساس معادلات استوکیومتری رایج تولید متان در شکمبه بود. نتایج این فراتحلیل نشان داد اگر چه در تحقیقات برون‌تنی منتشر شده، مهارکننده‌های شیمیایی تاثیر قابل توجهی در کاهش تولید متان داشتند، اما به نظر می‌رسد ابقای انرژی استفاده نشده در تولید متان به صورت اسیدهای چرب فرار به صورت موفقیت‌آمیزی انجام نشده و علاوه بر تغییر الگوی تخمیر، اتلاف انرژی به شکل هیدروژن نیز رخ داده است.

واژه‌های کلیدی: فراتحلیل، مهارکننده شیمیایی، متان، هیدروژن، اسید چرب فرار

مقدمه

متان فراوان‌ترین گاز آلی و دومین گاز گلخانه‌ای مهم در اتمسفر پس از گاز دی‌اکسید کربن است (۳۴). ماندگاری این گاز در اتمسفر حدود ۱۰ سال و پتانسیل آن در گرم کردن کره زمین ۲۵ برابر دی‌اکسید کربن است. در دهه‌های اخیر، فعالیت‌های انسانی غلظت این گاز گلخانه‌ای را در اتمسفر به شدت افزایش داده (۴۲) و بررسی‌ها نشان می‌دهد فعالیت‌های کشاورزی سهم قابل ملاحظه‌ای در این افزایش داشته است (۱۱).

تخمیر در دستگاه گوارش نشخوارکنندگان بزرگترین منبع تولید متان ناشی از توسعه و فعالیت جوامع انسانی (۱۵) و در بسیاری از کشورها بزرگترین منبع تولید متان از بخش کشاورزی است (۵). دفع

متان توسط دام‌های اهلی بخشی از فرایند طبیعی هضم در دستگاه گوارش آن‌ها (۱۵) و نتیجه بیوشیمی تخمیر مواد گیاهی توسط جمعیت میکروبی شکمبه است (۴۱). حیوانات اهلی نشخوارکننده بزرگ روزانه ۲۵۰ تا ۵۰۰ لیتر متان تولید می‌کنند که معادل ۶ تا ۱۲ درصد انرژی خام جیره است (۱۷ و ۳۳).

صدمات زیست‌محیطی و اتلاف بخشی از انرژی جیره از طریق تولید گاز متان در شکمبه محققین را بر آن داشته است تا به دنبال راهکارهایی برای کاهش تولید متان در دستگاه گوارش و استفاده از اکی‌والان‌های احیاکننده به منظور تولید سایر محصولات احیا شده به جای متان در شکمبه باشند (۱۷). استفاده از مهارکننده‌های شیمیایی یکی از روش‌های کاهش تولید متان از طریق اثر مستقیم بر میکروارگانیسم‌های متانوژن است. در حال حاضر تعداد زیادی مهارکننده‌های شیمیایی متان شناسایی شده و استفاده از آن‌ها برای کاهش تولید متان در شرایط برون تنی و در مواردی درون تنی موفقیت‌آمیز بوده و منجر به کاهش معنی‌دار اتلاف انرژی به صورت

۱، ۲، ۳ و ۴- به ترتیب دانشجوی دکتری، استادان و استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

* - نویسنده مسئول: (Email: ma.ghadami@stu-mail.um.ac.ir)

شاهد و آزمایش و یا خطای استاندارد میانگین (SEM) ^۳ مورد بررسی قرار گرفت و منابع فاقد حداقل‌های مورد نیاز برای انجام فراتحلیل حذف شدند. در نهایت از ۹ تحقیق دربرگیرنده ۲۶ مقایسه تیماری با استفاده از مهارکننده‌های ۲- برومواتان سولفونات (BES) ^۴، بروموکلرومتان (BCM) ^۵ و ۹ و ۱۰- آنتراکوئینون (AQ) ^۶ برای انجام فراتحلیل استفاده شد (جدول ۱).

فراسنجه‌های مورد نظر در استخراج داده‌ها شامل تولید متان، تولید کل اسیدهای چرب فرار، نسبت مولی استات، پروپیونات و بوتیرات و تولید هیدروژن بود. پس از استخراج داده‌ها، همه مراحل فراتحلیل به شرح زیر با استفاده از بسته‌های Mad (۶) و metafor (۳۸) نرم افزار آماری R نسخه 2.15.0 انجام شد.

محاسبه اندازه اثر

با توجه به ماهیت پیوسته داده‌های به دست آمده، از تفاوت میانگین استاندارد شده ^۷ و شاخص *Hedges's g* برای محاسبه اندازه اثر استفاده شد (معادله ۱) (۳۱):

$$Hedges's\ g = \frac{M_c - M_e}{S_{pooled}} \quad (1)$$

در این معادله *g* اندازه اثر، *M_e* میانگین گروه آزمایشی ^۸، *M_c* میانگین گروه شاهد ^۹ و *S_{pooled}* انحراف معیار آمیخته ^{۱۰} دو گروه بود. در تحقیقات دارای انحراف معیار مجزا برای گروه‌های شاهد و آزمایشی، از معادله ۲ و در تحقیقات دارای SEM از معادله ۳ برای محاسبه انحراف معیار آمیخته استفاده شد (۲۰):

$$S_{pooled} = \sqrt{\frac{(n_c - 1)(s_c)^2 + (n_e - 1)(s_e)^2}{n_c + n_e - 2}} \quad (2)$$

در این معادله *n_c* تعداد واحد آزمایشی در گروه شاهد، *n_e* تعداد واحد آزمایشی در گروه آزمایشی، *s_c* انحراف معیار گروه شاهد و *s_e* انحراف معیار گروه آزمایشی بود.

$$S_{pooled} = SEM \times \sqrt{n_p} \quad (3)$$

در این معادله SEM خطای استاندارد میانگین مربوط به همه گروه‌ها و *n_p* مجموع تعداد واحد آزمایشی در گروه‌های شاهد و گروه آزمایشی مورد نظر بود.

متان شده است (۹، ۲۱، ۲۶ و ۲۹).

محققین بر این باورند که کاهش تولید متان از طریق مهار مستقیم متانوژن‌ها با افزایش تولید سایر محصولات احیا شده همراه است و تغییر مسیر انرژی مصرف نشده در تولید متان به نفع تولید محصولات دیگر از جمله پروپیونات، انرژی بیشتری برای تولید در اختیار دام قرار خواهد داد (۲۴)؛ زیرا، ۱۳/۵ تا ۱۴ و ۲۰ مول ATP به ترتیب به ازای هر مول پروپیونات و بوتیرات طی متابولیسم تولید می‌شود، در حالی که پس از متابولیسم هر مول استات تنها ۸ مول ATP تولید می‌شود (۲۵). با این حال، در تحقیقات انجام شده شواهدی از تجمع و دفع هیدروژن، اثرات نامطلوب بر تخمیر و اتلاف انرژی مصرف نشده در تولید متان به چشم می‌خورد (۲۱ و ۳۵). به همین دلیل، هنوز ابهامات زیادی در رابطه با سودمندی این ترکیبات در بهبود راندمان استفاده از انرژی خوراک وجود دارد (۲۲) و سرنوشت الکترون‌های استفاده نشده در تولید متان مبهم است.

فراتحلیل، تحلیل آماری اندازه اثرهای به دست آمده از مجموعه‌ای از مطالعات تجربی است و هدف اصلی آن دستیابی به خلاصه‌ای قابل استناد از اثر واقعی عامل مورد نظر از بدنه مطالعات تجربی است (۲۰ و ۳۹). فراتحلیل امکان دستیابی به نتیجه‌گیری‌هایی دقیق‌تر و معتبرتر را در مقایسه با آن چه از یک مطالعه به صورت انفرادی و یا مقالات مروری رایج به دست می‌آید، فراهم می‌سازد (۳۱). از این رو، به منظور درک بهتر سازوکار اثر مهارکننده‌های شیمیایی بر فرآیند تخمیر، تولید متان، هیدروژن و اسیدهای چرب فرار این فراتحلیل انجام شد.

مواد و روش‌ها

منابع فراتحلیل

منابع مورد استفاده در تهیه بانک اطلاعاتی شامل مقالات منتشر شده مربوط به بررسی اثر مهارکننده‌های شیمیایی بر تولید متان و سایر فراسنجه‌های تخمیر در شرایط برون‌تنی ناپیوسته بود. این داده‌ها با جستجو در منابع اطلاعاتی شامل Google Scholar، Science Direct و ISI Web of Knowledge و واژه‌های کلیدی مختلف از جمله متان، مهارکننده، شکمبه و نام هر یک از مهارکننده‌های شیمیایی شناخته شده با اثر مستقیم بر متانوژن‌ها جمع‌آوری شد. پس از جمع‌آوری منابع مورد نظر، همه داده‌ها (۱۴ مورد) از نظر تأمین حداقل شاخص‌های مورد نیاز برای محاسبه اندازه اثر ^۱ (ES)، شامل میانگین گروه‌های شاهد و آزمایشی، تعداد واحد آزمایشی در هر یک از گروه‌ها و شاخص پراکنش اعم از انحراف معیار ^۲ (SD) گروه‌های

3- Standard Error of Mean (SEM)
4- 2-Bromoethane sulfonate (BES)
5- Bromochloromethane (BCM)
6- 9,10-Anthraquinone
7- Standardized Mean Difference (SMD)
8- Experimental Group
9- Control Group
10- Pooled Standard Deviation (Spooled)

1- Effect Size (ES)
2- Standard Deviation (SD)

وزن‌دهی به داده‌های مطالعات مورد بررسی

تحقیقات با هدف تعیین میزان اثر هر تحقیق در نتایج نهایی بر اساس کیفیت مطالعه اعم از تعدادهای تکرار بیشتر و واریانس کوچک‌تر با استفاده از معادله ۴ وزن‌دهی شد (۲۰):

$$W_i = \frac{1}{var_i} \quad (4)$$

در این معادله var_i واریانس تحقیق و W_i وزن تحقیق مورد نظر بود.

آزمون ناهمگنی

تغییرات اندازه اثر مطالعات ناشی از تفاوت بین مطالعات با استفاده آماره Q آزمون ناهمگنی (آزمون کوکران) بررسی شد ($\alpha=0.1$). به دلیل حساسیت پایین آزمون کوکران در تشخیص ناهمگنی در فراتحلیل با تعداد کم آزمایشات نتایج ناهمگنی با استفاده از آماره I^2 نیز بررسی گردید (معادله ۵) (۱۳ و ۱۴). با توجه به دامنه صفر تا ۱۰۰ این آماره، مقادیر منفی I^2 به عنوان ناهمگنی صفر، مقادیر بین ۲۵ تا ۵۰ ناهمگنی متوسط و مقادیر بزرگ‌تر از ۵۰ ناهمگنی بالا میان مطالعات در نظر گرفته شد.

$$I^2(\%) = \frac{Q - (K-1)}{Q} \times 100 \quad (5)$$

که در معادله، Q آماره ناهمگنی کای دو (کوکران) و K تعداد آزمایشات بود.

اریبی انتشار

اریبی انتشار^۱ با استفاده از نمودار کیفی^۲ بررسی شد؛ به طوری که پراکنش یکنواخت نقاط در دو طرف محور تقارن نمودار، نشان دهنده عدم وجود انتخاب در انتشار تحقیقات توسط محققین و تمایل نقاط به چپ یا راست نشان دهنده وجود درجاتی از انتخاب در انتشار نتایج توسط محققین یا اریبی انتشار بود.

تجزیه و تحلیل آماری

در آزمون نهایی به دلیل اثبات وجود ناهمگنی در همه فراسنجه‌های مورد بررسی، از مدل با اثر تصادفی^۳ استفاده شد. پیش از استفاده از مدل، اندازه اثرهای به دست آمده از نظر وجود داده‌های پرت مورد بررسی قرار گرفت (۳۸). داده‌هایی که به عنوان داده پرت شناسایی شد از مدل حذف گردید. در صورتی که همه میانگین‌های مربوط به یک تحقیق پرت تشخیص داده شد، آن تحقیق از فراتحلیل حذف گردید.

جدول ۱- تحقیقات استفاده شده در فراتحلیل اثر مهارکننده‌های شیمیایی بر فرآیند تخمیر در شرایط بیرون تنی نایبوسته

ردیف	مطالعه	نوع سوبسترا	مقدار سوبسترا (میلی گرم)	حجم محیط کشت (میلی لیتر)	زمان انکوباسیون (ساعت)	نوع مهارکننده‌ها	غلظت‌های مهارکننده در آزمایش (میلی مولار)
۱	گاریسیا-نویز و همکاران، ۱۹۹۶ (۹)	یونجه و کنسرتزه با نسبت‌های ۱۰۰ به صفر، ۵۰ به ۵۰ و یا ۹۰ به ۱۰ درصد	۳۷۵	۲۰	۲۴	AQ	۱/۰ و ۱/۰ قسمت در میلیون
۲	نوت و همکاران، ۱۹۹۷ (۳۸)	علف خشک	۵۰۰	۵۰	۲۴	BES	۰/۰۱ و ۰/۰۳
۳	تاونال و همکاران، ۲۰۰۵ (۳۵)	یونجه خشک یا <i>L. pedunculatus</i>	۵۰۰	۱۶	۱۲	BES	۰/۵
۴	اکروال و همکاران، ۲۰۰۸ (۱)	یونجه خشک یا علوفه خشک ذرت	۲۰۰	۳۰	۱۲ و ۱۲، ۸، ۴	BES	۵/۰
۵	گول و همکاران، ۲۰۰۹ (۱۰)	علف خشک	۲۸۰	۴۰	۲۴	BCM	۰/۰۱ و ۰/۰۵
۶	لی و همکاران، ۲۰۰۹ (۳۱)	علوفه خشک تیموتی و کنسرتزه با نسبت‌های ۱۰۰ به صفر یا ۳۰ به ۶۰	۵۰۰	۵۰	۲۴ و ۴۸، ۲۴	BES	۵/۰ و ۱/۰
۷	ابراهیمی و همکاران، ۲۰۱۱ (۸)	مخلوط علوفه (۴۰ درصد کاه گندم، ۵ درصد شبر برسيم و ۵ درصد یولاف) و کنسرتزه با نسبت ۵۰ به ۵۰	۲۰۰	۳۰	۲۴	AQ	۴ قسمت در میلیون
۸	پلیکان و همکاران، ۲۰۱۱ (۳۹)	پوسته سویا یا دانه ذرت	۵۰۰	۶۰	۲۴	BES	۱/۷۸۵
۹	زو و همکاران، ۲۰۱۱ (۳۳)	یونجه خشک	۲۰۰	۱۰	۲۸	BES	۱۲/۰

۱- آنتراکینون
۲- برومواتان سولفونات
۳- بروموکروماتان

1- Publication Bias
2- Funnel plot
3- Random Effect Model (RE)

جدول ۲- برآورد اندازه اثر مهارکننده‌های شیمیایی بر تولید متان، هیدروژن و اسیدهای چرب فرار در شرایط برون تنی ناپیوسته و میزان ناهمگنی بین مطالعات با استفاده از مدل با اثر تصادفی

مورد	اندازه اثر ^۱	خطای استاندارد	P- value	I ²
متان	-۲/۶۳	۰/۲۹۰	<۰/۰۰۱	۶۱/۰۹
هیدروژن	+۲/۳۱	۰/۵۴۰	<۰/۰۰۱	۸۷/۵۰
کل اسیدهای چرب فرار	-۰/۴۲	۰/۱۸۴	۰/۰۲۱	۵۲/۲۶
استات	-۱/۴۸	۰/۲۵۵	<۰/۰۰۱	۶۷/۲۸
پروپیونات	+۰/۹۴	۰/۳۰۹	<۰/۰۰۱	۷۵/۸۷
بوتیرات	+۰/۶۹	۰/۱۲۵	<۰/۰۰۱	۶۲/۷۴

۱- اندازه اثر به صورت اختلاف میانگین استاندارد شده (SMD) با استفاده از معادله ۱ محاسبه گردید (با توجه به واحد مشابه در صورت و مخرج کسر این معادله، اندازه اثر به دست آمده فاقد واحد است). اندازه اثرهای مثبت نشان دهنده اثر افزایشنده و اندازه اثرهای منفی نشان دهنده اثر منفی مهارکننده بر فراسنجه مورد نظر است.

تمایل آن‌ها به سمت چپ نشان می‌دهد انتخاب در انتشار مقالات مربوط به مهارکننده‌های شیمیایی انجام شده است و برخی تحقیقات مربوط به اثر مهارکننده‌های شیمیایی احتمالاً به دلیل عدم مشاهده اثر کاهنده مهارکننده بر تولید متان، توسط محققین انتشار نیافته‌اند. مهارکننده BES می‌تواند تولید متان را تا حدود ۹۰ درصد کاهش دهد. از جمله مک‌آلیستر و نیوبولد (۲۳) گزارش کردند که با کاربرد BES می‌توان سهم متان را در انرژی خام از ۳/۹ به ۰/۶ درصد کاهش داد. اندازه اثر ۳/۱۲- BES در این فراتحلیل در مقایسه با اندازه اثر کلی ۲/۶۳- نیز تأثیر قابل ملاحظه BES را در کاهش تولید متان اثبات می‌کند ($P < 0.001$). دو مهارکننده BCM و AQ نیز به ترتیب با اندازه اثرهای ۱/۴۳- و ۲/۶۴- اثر منفی معنی‌داری بر کاهش تولید متان داشتند، با این حال اثر کاهنده آن‌ها کمتر از BES بود (شکل ۱).

اثر مهارکننده‌های شیمیایی بر تولید هیدروژن

مهار تولید متان با استفاده از BES و AQ منجر به افزایش غلظت هیدروژن و دفع آن به صورت گاز شد (شکل ۳) ($P < 0.001$). اگر چه متانوزن‌ها تنها به طور مستقیم در مراحل انتهایی تخمیر فعالیت دارند؛ اما نقش مهمی در استفاده از الکترون‌ها به صورت هیدروژن مولکولی در احیای دی‌اکسید کربن به متان بر عهده دارند (۲۳). تشکیل متان، فشار جزئی هیدروژن متابولیک تولید شده طی متابولیسم میکروبی را در شکمبه پایین نگه می‌دارد. با مهار متانوزن‌ها، تشکیل هیدروژن از ظرفیت میکروارگانیزم‌ها برای مصرف هیدروژن پیشی گرفته و هیدروژن استفاده نشده به دلیل حلالیت پایین وارد فاز گازی می‌شود (۴۰). بنابراین تجمع هیدروژن به عنوان نتیجه‌ای از مهار متانوزن‌ها به وسیله ترکیبات شیمیایی دور از انتظار نیست (۲، ۳، ۸، ۹، ۲۷، ۳۲ و ۳۷).

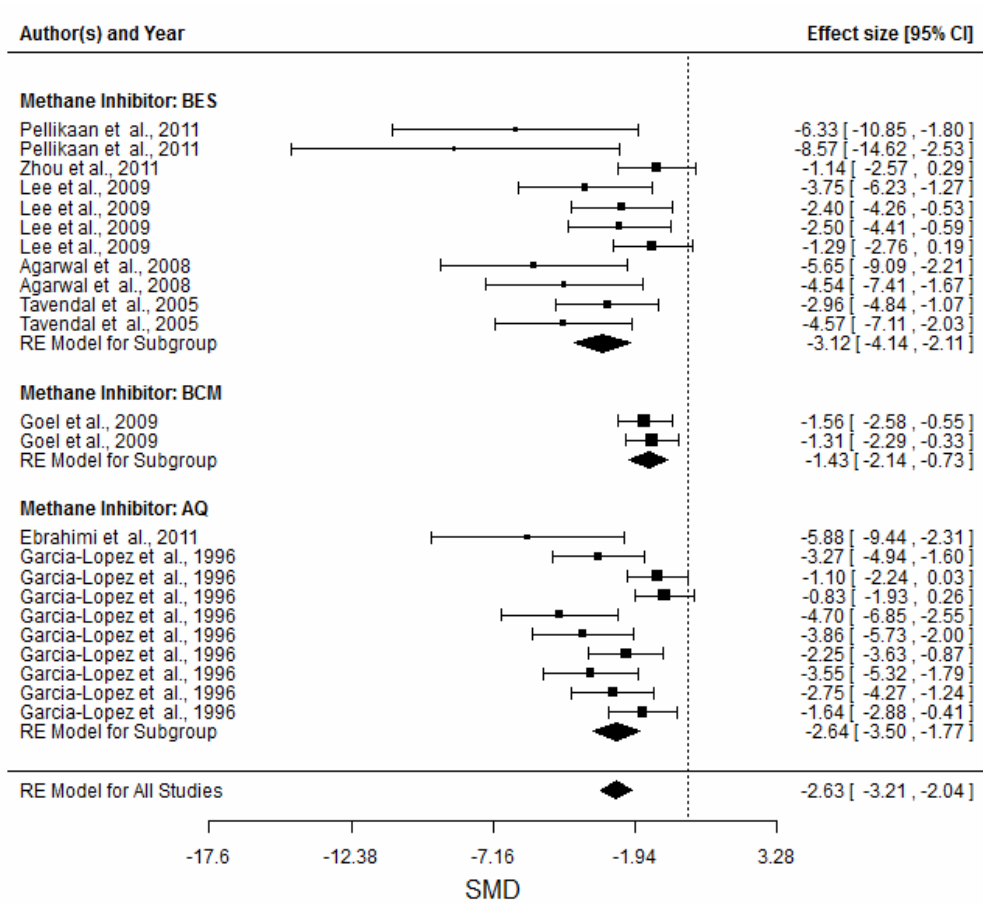
نتایج به صورت نمودار درختی^۱ و در برگیرنده اطلاعات اصلی شامل اندازه اثر، خطای استاندارد و فاصله اطمینان ۹۵ درصد کلی و همچنین اندازه اثر، خطای استاندارد و فاصله اطمینان ۹۵ درصد هر یک از مهارکننده‌ها به صورت مستقل ارائه شد. وزن مطالعات به صورت مربعی در محل میانگین اندازه اثر آن‌ها نشان داده شد و اندازه مربع مربوط به هر مطالعه نشانگر وزن تخصیص داده شده به آن تحقیق در تجزیه و تحلیل نهایی بود.

نتایج و بحث

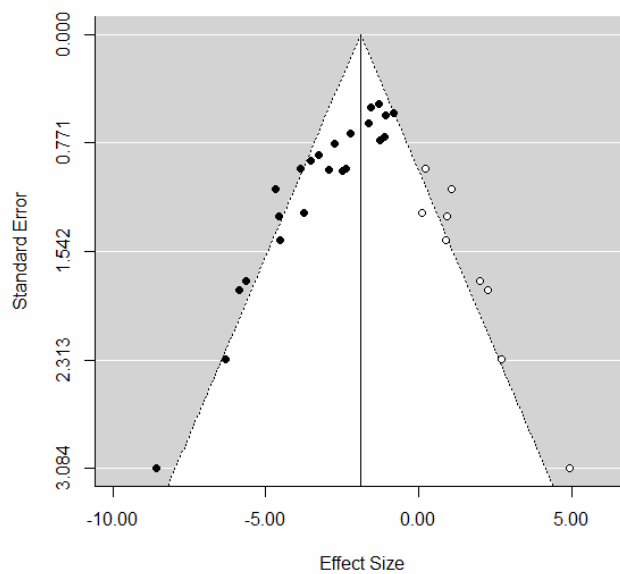
خلاصه اندازه اثر مهارکننده‌های شیمیایی بر تولید متان، هیدروژن و اسیدهای چرب فرار در شرایط برون تنی ناپیوسته و همچنین، میزان ناهمگنی در جدول ۲ نشان داده شده است. در همه فراسنجه‌های مورد بررسی اثر مهارکننده معنی‌دار بود و علاوه بر آن، درجات قابل توجهی از ناهمگنی وجود داشت (I^2 بزرگتر از ۵۰). از این رو، در همه آنالیزها از مدل با اثر تصادفی استفاده شد. این ناهمگنی می‌تواند ناشی از تفاوت‌های موجود در نحوه اجرای تحقیقات از جمله نوع و مقدار سوبسترا، طول زمان انکوباسیون و نوع مهارکننده باشد.

اثر مهارکننده‌های شیمیایی بر تولید متان

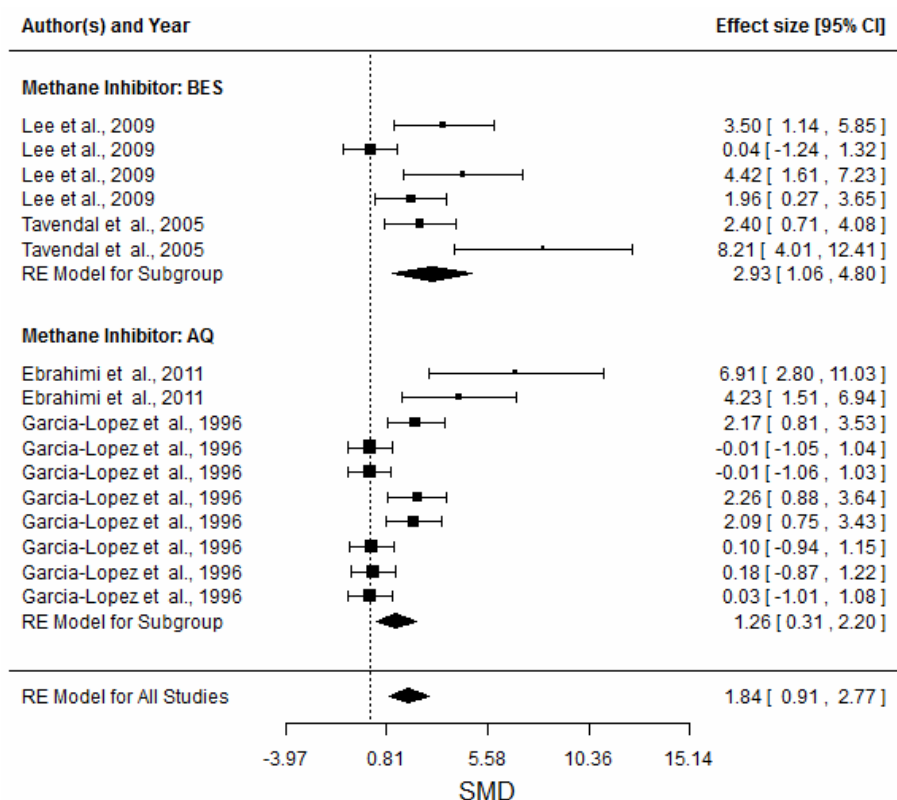
اثر مهارکننده‌های شیمیایی در برگیرنده BES، BCM و AQ در شکل ۱ و نتایج مربوط به بررسی اریبی انتشار به صورت نمودار کیفی در شکل ۲ نشان داده شده است. اگر چه میزان کاهش متان تحت تأثیر غلظت مهارکننده قرار داشت، اما همه تحقیقات مورد استفاده اثر کاهنده مهارکننده‌های شیمیایی را بر تولید متان نشان داد ($P < 0.001$). با این حال، پراکنش نقاط در نمودار کیفی حاکی از وجود اریبی در انتشار نتایج بود. پراکنش نامتقارن نقاط در نمودار و



شکل ۱- نمودار درختی اندازه اثر استفاده از مهارکننده‌های شیمیایی بر تولید متان با استفاده از مدل با اثر تصادفی (RE)



شکل ۲- نمودار کیفی اثر مهارکننده‌های شیمیایی بر تولید متان برای بررسی اریبی انتشار. خط عمودی نشان دهنده اندازه اثر کلی و دو ضلع مثلث نشان دهنده فاصله اطمینان ۹۵ درصد است. نقاط سیاه مطالعات استفاده شده در این فراتحلیل و نقاط سفید برآوردی از تعداد احتمالی مطالعات منتشر نشده است. تعداد نابرابر نقاط سیاه در دو طرف خط عمودی نشان‌دهنده اریبی انتشار است.



شکل ۳- نمودار درختی اندازه اثر مهارکننده‌های شیمیایی متانوژن‌ها بر تولید هیدروژن با استفاده از مدل با اثر تصادفی (RE)

چه مقدار گاز هیدروژن متان منجر به دفع گاز هیدروژن شده است، اما مقدار گاز هیدروژن دفع شده در اندازه‌گیری مستقیم سوپسترای احیا شده، با برآوردهای استوکیومتری همخوانی ندارد (۲۳). بر اساس محاسبات استوکیومتری، برای تولید هر مول متان، ۴ مول هیدروژن (H₂) نیاز است؛ لذا انتظار می‌رود، کاهش دفع یک مول (۱۶ گرم) متان با تجمع ۴ مول (۸ گرم) گاز هیدروژن همراه باشد (۷). در بیشتر مطالعات استفاده از مهارکننده‌های شیمیایی، به تغییر مسیر مصرف هیدروژن از تولید متان به سمت تولید پروپیونات بیشتر اشاره شده است. اما بایستی توجه داشت، تشکیل پروپیونات مسیر مصرف هیدروژن مولکولی (H₂) نیست و در واقع به عنوان یکی از مسیرهای پذیرنده الکترون می‌تواند جایگزینی برای مسیر مصرف الکترون‌ها در تولید هیدروژن مولکولی باشد (۱۶).

دلیل عدم همخوانی مقدار متان مهار شده و گاز هیدروژن دفع شده را باید در ساز و کار کنترل واکنش‌ها در شکمبه جستجو کرد. واکنش‌های شیمیایی از دو طریق کینتیکی و ترمودینامیکی کنترل می‌شوند. با کنترل کینتیکی، الگوی محصولات تشکیل شده به غلظت سوپستراها و فعالیت آنزیمی بستگی دارد و این عوامل نرخ تولید محصول را در مسیرهای رقابتی کنترل می‌کنند. اما کنترل ترمودینامیکی زمانی رخ می‌دهد که واکنش‌دهنده‌ها در مقایسه با محصولات بسیار محدود هستند. از این رو واکنش بر اساس قانون

در حالی که توانایی شکمبه در تبدیل کربوهیدرات‌های پیچیده به قندهای قابل تخمیر به حذف موثر مولکول هیدروژن وابسته است (۲۳) و اختلال در فرآیند حذف هیدروژن مانع از تجزیه بهینه ماده آلی در دستگاه گوارش نشخوارکنندگان می‌شود (۴). علاوه بر این، هیدروژن یک گاز قابل اشتعال است (۵۰ مگاژول در کیلوگرم انرژی احتراق) و دفع آن در نشخوارکنندگان منجر به اتلاف انرژی خواهد شد (۷). شواهد دفع هیدروژن به دست آمده در این فراتحلیل متناسب با کاربرد استراتژی کاهش متان با استفاده از مهارکننده‌های شیمیایی نشان می‌دهد، کمتر به مسئله تولید هیدروژن در شکمبه توجه شده است. همچنین باید توجه داشت که در سیستم‌های *in vitro* به دلیل محبوس شدن گازهای تخمیری، بخشی از هیدروژن فاز گازی، مجدد در فاز مایع حل شده و مورد استفاده میکروب‌های مصرف کننده هیدروژن قرار می‌گیرد (۴۰)، اما در سیستم‌های *in vivo* امکان حل شدن مجدد هیدروژن در فاز مایع شکمبه به دلیل شرایط متفاوت و از جمله وجود مکانیسم آروغ ضعیف‌تر است و نتیجه آن می‌تواند دفع حجم قابل توجهی گاز هیدروژن از دام باشد. لذا پیش بینی می‌شود بخشی از انرژی خوراک که به صورت متان دفع نشده به صورت هیدروژن گازی شکمبه را ترک کرده و از دسترس حیوان خارج شود (۱۹ و ۲۶).

در مطالعات انجام شده با استفاده از مهارکننده‌های شیمیایی، اگر

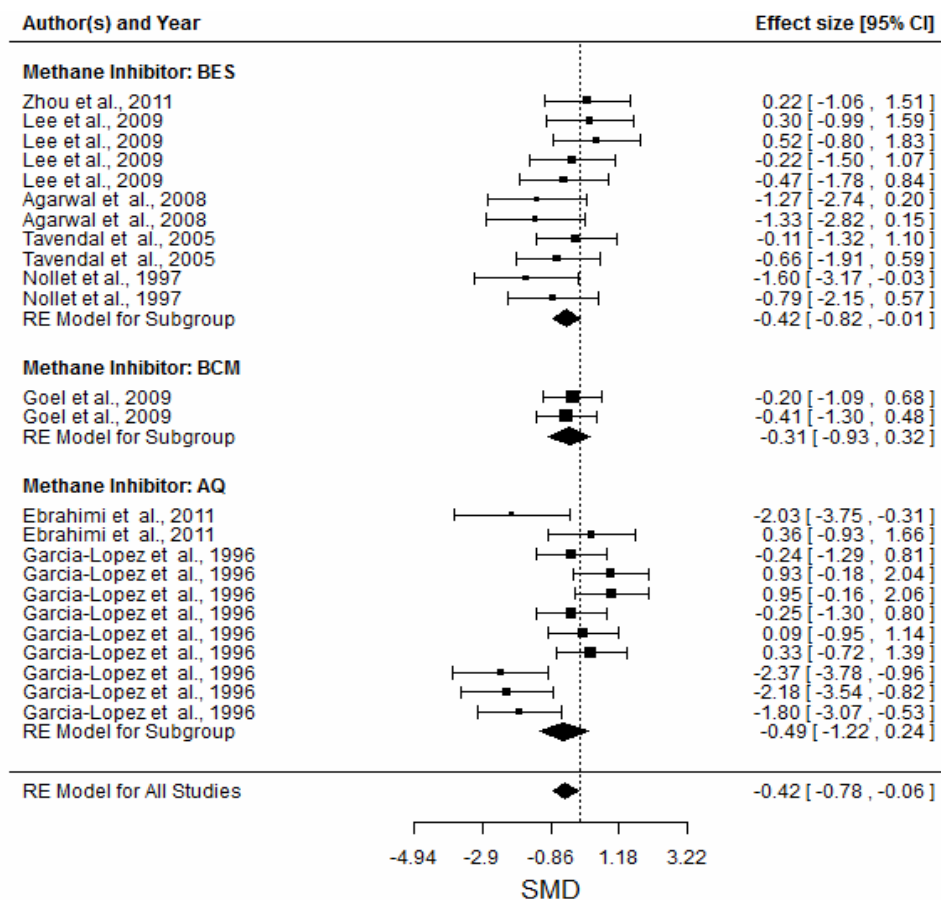
هیدروژن فاز مایع را ترک کرده و از دسترس میکروارگانیسم‌ها خارج می‌شود (۴۰).

اثر مهارکننده‌های شیمیایی بر تولید اسیدهای چرب فرار

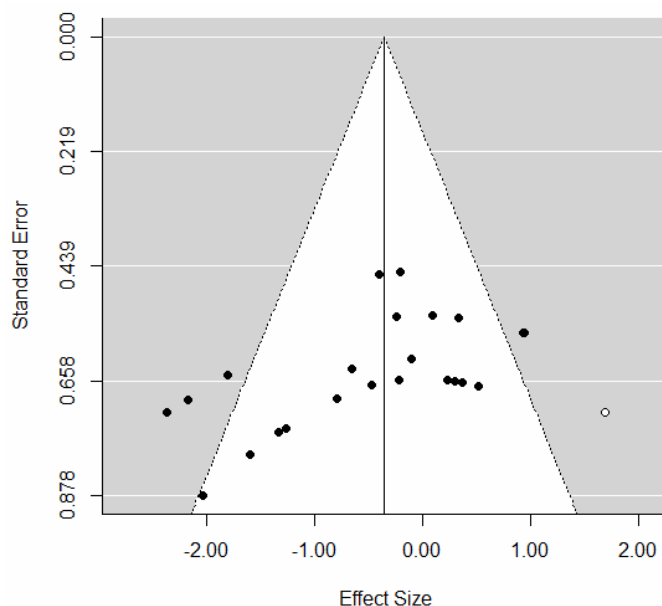
اثر مهارکننده شیمیایی بر تولید کل اسیدهای چرب فرار در شکل ۴ نشان داده شده است. اگر چه در مطالعات استفاده شده در این فراتحلیل، کاربرد مهارکننده در کاهش تولید متان موفقیت آمیز بوده است، اما اندازه اثر به دست آمده برای تولید اسیدهای چرب فرار حاکی از اثر منفی مهارکننده‌ها بر تولید کل اسیدهای چرب فرار بود ($P=0/021$). ارزیابی انتشار در رابطه با تولید اسیدهای چرب فرار در شکل ۵ نشان داده شده است. پراکنش یکنواخت نقاط در شکل ۵ نشان می‌دهد، بر خلاف تولید متان، در رابطه با نتایج تولید اسیدهای چرب فرار انتخاب صورت نگرفته است. لذا نتایج مربوط به تولید اسیدهای چرب فرار قابل تعمیم به مطالعات منتشر نشده گذشته و مطالعات آینده خواهد بود.

دوم ترمودینامیک رخ نمی‌دهد. در این شرایط ترمودینامیک مسیر واکنش‌های قابل انجام و غلظت نهایی محصولات را تعیین می‌کند (۳۶). تولید متان در شکمبه نیز از طریق همین دو روش کنترل می‌شود. این ساز و کارها شامل کنتیک رشد متانوژن‌ها است که غلظت گاز هیدروژن را تعیین می‌کند و ترمودینامیک تخمیر شکمبه، که توسط غلظت گاز هیدروژن کنترل می‌شود (۱۶).

وقتی فعالیت متانوژن‌ها در شکمبه توسط مهارکننده‌های شیمیایی مهار می‌شود، تجمع هیدروژن مولکولی طی تخمیر کربوهیدرات‌ها رخ می‌دهد. در این حالت، ترمودینامیک شکمبه کنترل واکنش‌های دخیل در تولید و مصرف هیدروژن (الکترون‌ها) را بر عهده می‌گیرد و در این شرایط، انرژی آزاد (ΔG)، مسیر جریان الکترون‌ها و در نتیجه محصولات نهایی میکروارگانیسم‌های سازش‌پذیر را تعیین می‌کند. از این دیدگاه نرخ نسبی فرآیندها به سمتی پیش خواهد رفت که تولید ATP یا بازده ترمودینامیکی را بهینه سازد و هموستازی داخل سلولی را نیز حفظ کند (۱۲). با این حال به دلیل حلالیت پایین هیدروژن در فاز مایع و محدودیت ظرفیت میکروارگانیسم‌های مصرف کننده اکسی والان‌های احیاکننده، بخشی از هیدروژن تجمع یافته به صورت گاز



شکل ۴- نمودار درختی اندازه اثر استفاده از مهارکننده‌های شیمیایی متانوژن‌ها بر تولید کل اسیدهای چرب فرار با استفاده از مدل با اثر تصادفی (RE)



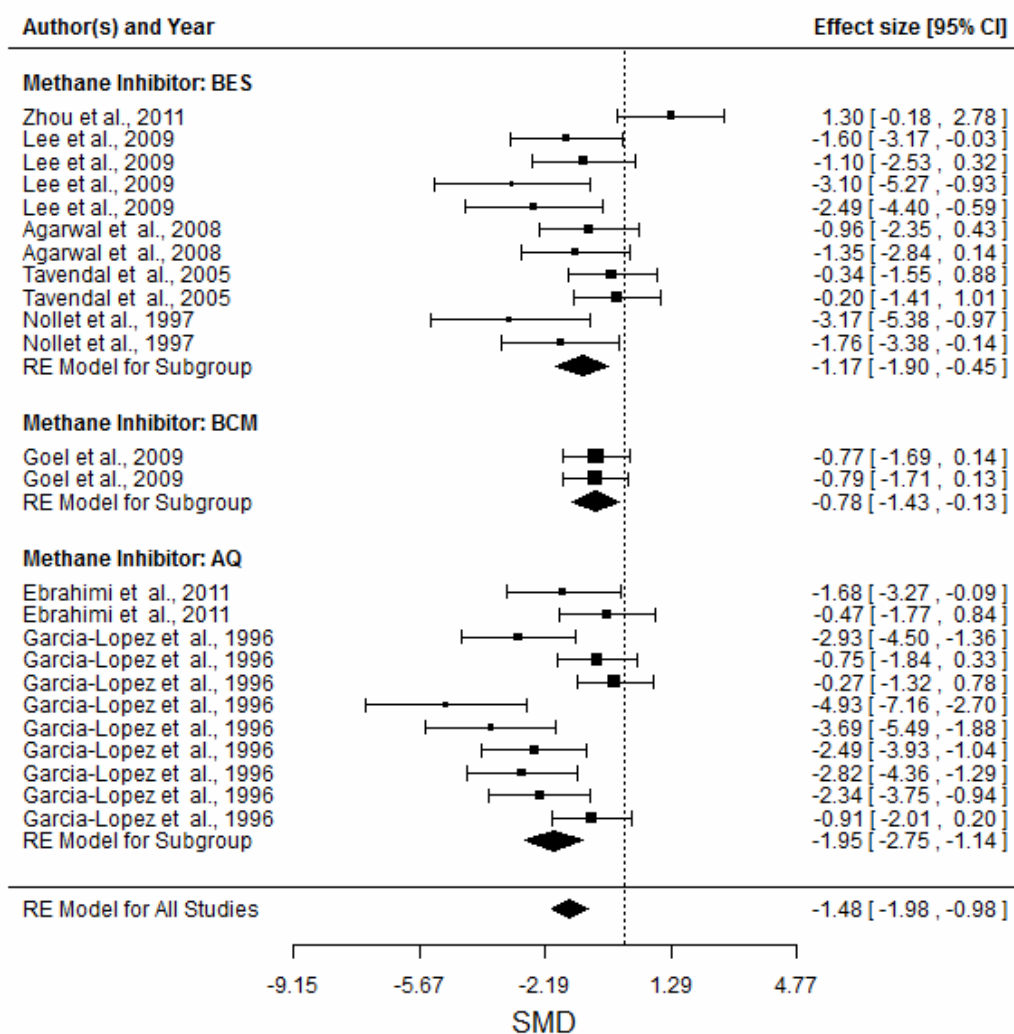
شکل ۵- نمودار کیفی اثر مهارکننده‌های شیمیایی بر تولید کل اسیدهای چرب فرار به منظور بررسی اریبی انتشار. نقاط سیاه مطالعات استفاده شده در این فراتحلیل و نقطه سفید برآورد تعداد احتمالی مطالعات منتشر نشده است. پراکنش تقریباً یکنواخت نقاط سیاه در دو طرف خط عمودی (اندازه اثر کلی) نشان دهنده عدم وجود اریبی انتشار است.

تولید آن می‌تواند انرژی دریافتی دام را از جیره کاهش دهد. با این حال، کاهش تولید اسیدهای چرب فرار با تغییر الگوی اسیدهای چرب فرار همراه بود که تصمیم‌گیری در رابطه با سودمندی این ترکیبات را دشوار می‌کند. متابولیسم هر مول استات ۸ مول ATP خالص تولید می‌کند؛ در حالی که متابولیسم هر مول پروپیونات و بوتیرات به ترتیب ۱۳/۵ تا ۱۴/۵ و ۲۰ مول ATP تولید خواهد کرد (۳۵). اندازه اثرهای به دست آمده برای استات، پروپیونات و بوتیرات نشان می‌دهد، اثر منفی مهارکننده‌ها بر تولید استات شدیدتر از اثر مثبت آن بر تولید پروپیونات و بوتیرات بوده است که نتیجه آن به صورت کاهش تولید کل اسیدهای چرب فرار ظاهر شده است. از این رو، به نظر می‌رسد افزایش دریافت انرژی از طریق افزایش پروپیونات و بوتیرات با کاهش شدید تولید استات خنثی شده است که عملاً سودمندی این ترکیبات را در تولید نهایی انرژی با تردید مواجه می‌کند.

تجمع هیدروژن به خودی خود آنزیم‌های هیدروژناز را مهار نمی‌کند. با این حال، تولید فسفروکلاستیک استات از پیرووات توسط پیرووات فردوکسین اکسیدوردوکتاز واکنشی کاملاً برگشت‌پذیر است و فشار جزئی بالای هیدروژن منجر به بازخورد منفی در مسیر اصلی تولیدکننده استات در شکمبه خواهد شد. علاوه بر این، فشار جزئی بالای هیدروژن اثر مستقیم بر آزادسازی H_2 از NADH دارد و عمل NADH اکسیدوردوکتاز در معرض اثر مهارتی محصول واکنش یعنی H_2 قرار خواهد گرفت.

علاوه بر کاهش مقدار تولید کل اسیدهای چرب، مهارکننده‌ها الگوی اسیدهای چرب فرار را تغییر داده‌اند. به طوری که استات (شکل ۶) کاهش ($P < 0.01$) و پروپیونات (شکل ۷) و بوتیرات (شکل ۸) افزایش یافته است ($P < 0.01$). کاهش نسبت استات به پروپیونات منعکس کننده تاثیر افزایش فشار جزئی هیدروژن بر مسیرهای تولید و مصرف کننده هیدروژن است. استوکیومتری تولید اسیدهای چرب فرار، مقدار تولید دی‌اکسید کربن و هیدروژن مربوط به هریک از اسیدهای چرب را تعیین می‌کند. تولید استات از هر مول گلوکز با تولید ۲ مول دی‌اکسید کربن و ۴ مول هیدروژن همراه است (۳۶) و مسیر اصلی تولیدکننده هیدروژن در شکمبه محسوب می‌شود. در غلظت بالای هیدروژن، تشکیل هیدروژن از نظر ترمودینامیکی مطلوب نیست و تغییر انرژی آزاد سوپسترا (ΔG) در مسیرهای تولیدکننده هیدروژن از سایر محصولات تخمیر نامطلوب‌تر است (۱۶). لذا افزایش فشار جزئی هیدروژن در پی مهار متانوزنها می‌تواند در تولید استات اختلال ایجاد کند.

با توجه به عدم امکان اندازه‌گیری عملکرد دام در آزمایشات برون تنی، تولید و الگوی اسیدهای چرب فرار می‌تواند مهمترین شاخص برای بررسی سودمندی مهارکننده‌های شیمیایی در بهبود راندمان استفاده از انرژی باشد. بر اساس این فراتحلیل، استفاده از مهارکننده‌های شیمیایی تولید کل اسیدهای چرب فرار را کاهش داده است (-0.42 ± 0.184). اسیدهای چرب فرار تا ۸۰ درصد از کل انرژی قابل سوخت و ساز دام را تامین می‌کند (۳۰)؛ از این رو کاهش

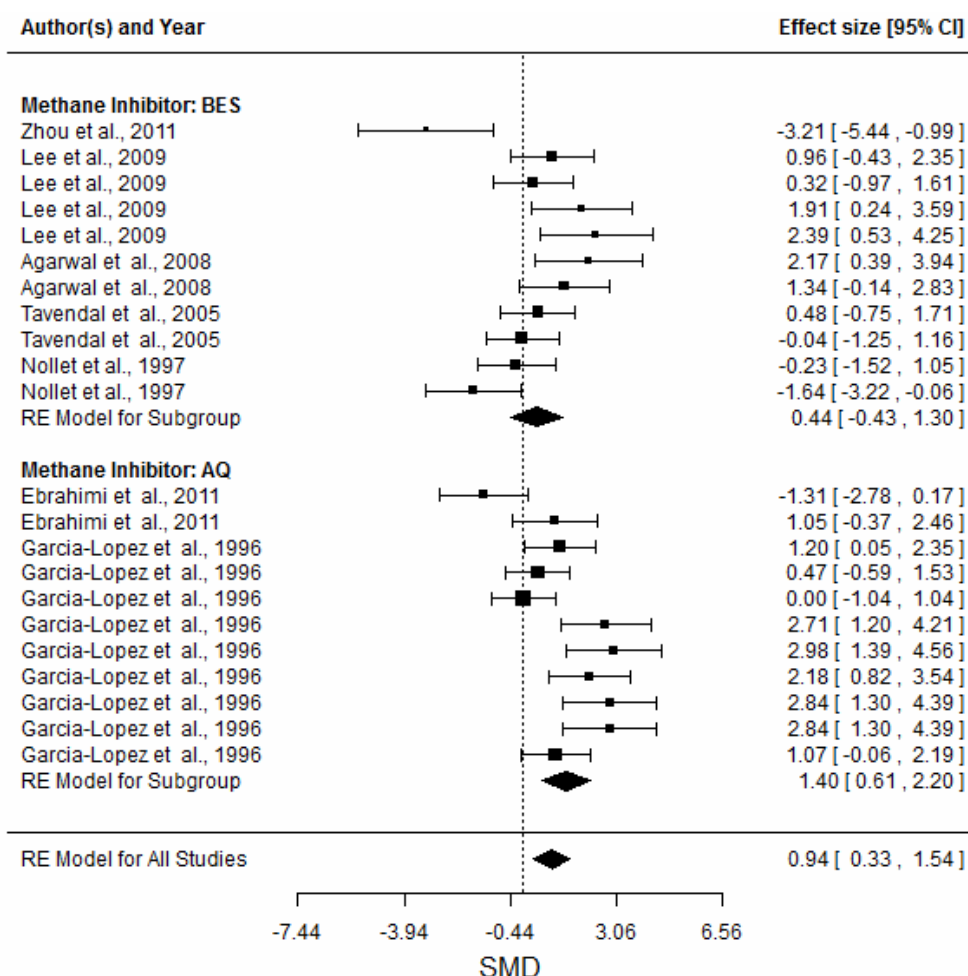


شکل ۶- نمودار درختی اندازه اثر مهارکننده های شیمیایی متانوژن‌ها بر نسبت مولی استات با استفاده از مدل با اثر تصادفی (RE)

مطالعات برون تنی کوتاه مدت (کمتر از ۷۲ ساعت) و یا اثر سمی مهارکننده‌های شیمیایی بر استوژن‌های شکمه باشد (۹).
 مطلوب بودن ترمودینامیکی با وضعیت اکسیداسیون - احیا سلول به صورت نسبت NADH به NAD و ATP به ADP تعیین می‌شود (۱۲) و میکروارگانیسم‌های که می‌توانند مسیرهای تخمیر خود را تغییر دهند، با پاسخ به تغییرات کوچک در تغییر انرژی آزاد، تکیه خود را از مسیرهایی که از نظر ترمودینامیکی کمتر مطلوب هستند به مسیرهایی که از نظر ترمودینامیکی مطلوب هستند تغییر می‌دهند (۱۶). در همین راستا تولید پروپیونات به عنوان مسیر دیگری برای استفاده از اکی والان‌های احیاکننده با مسیر تولید هیدروژن از طریق احیای یون هیدروژن رقابت می‌کند (۳۶).

از آن جا که عمل NADH اکسیدوردوکتار برگشت‌پذیر نیست، NADH تجمع می‌یابد و پیشرفت این وضعیت، تخمیر به ویژه تخمیر کربوهیدرات‌های فیبری را به دلیل فقدان NAD^+ متوقف خواهد کرد (۱۲).

اگر چه انتظار می‌رود، کاهش تولید متان رشد دیگر میکروارگانیسم‌های مصرف کننده هیدروژن و دی اکسید کربن را تسهیل کند (۲۸)، اما کاهش تولید استات و افزایش فشار جزئی هیدروژن نشان می‌دهد مهار متانوژن‌ها نتوانسته بر فعالیت باکتری‌های استوژن برای تولید استات اثر بگذارد و یا افزایش تولید استات از این مسیر به اندازه‌ای نبوده است که کاهش تولید استات را جبران کند و دلیل آن می‌تواند جمعیت کوچک باکتری‌های استوژن، عدم وجود زمان کافی برای تطابق استوژن‌ها با تجمع هیدروژن در



شکل ۷- نمودار درختی اندازه اثر مهارکننده‌های شیمیایی متانوژن‌ها بر نسبت مولی پروپیونات با استفاده از مدل با اثر تصادفی (RE)

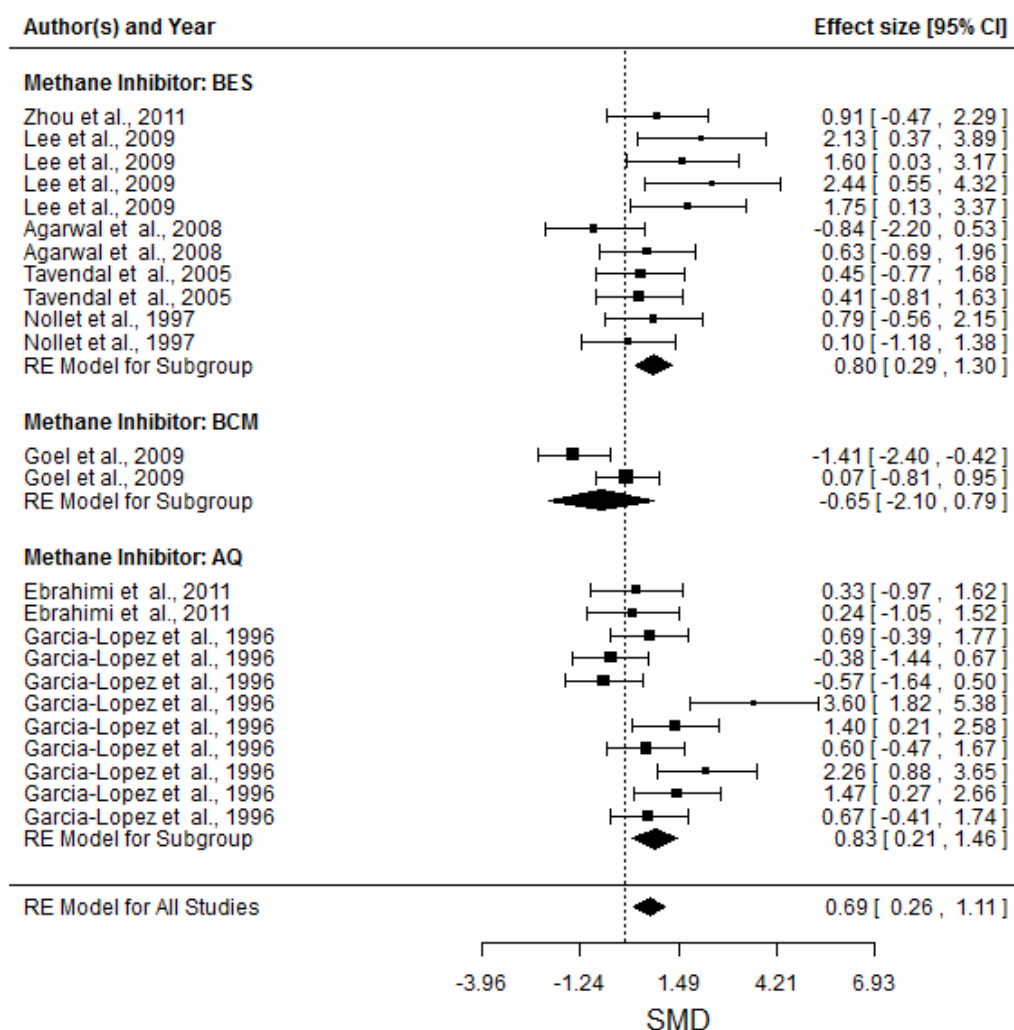
دسترس بوده است، در تبدیل استیل کوآنزیم آ به بوتیریل کوآنزیم آ و در نهایت تولید بوتیرات بیشتر مورد استفاده قرار گرفته است (۱۰). افزایش در بوتیرات بخشی می‌تواند بیانگر این حقیقت باشد که بوتیروویریو فیبروسولونس‌ها به عنوان تولید کننده اصلی بوتیرات در شکمبه فلاوین‌ها و NADH را به عنوان دهنده‌های الکترون برای واکنش‌های احیایی که در تولید بوتیرات مورد نیاز است استفاده کرده‌اند (۹ و ۲۷) که منجر به افزایش تولید بوتیرات شده است.

نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده از این فراتحلیل نشان داد کاهش تولید متان با استفاده از مهارکننده‌های شیمیایی با کاهش تولید کل اسیدهای چرب فرار و تغییر الگوی اسیدهای چرب فرار همراه بود. این تغییر الگو به صورت کاهش نسبت استات و افزایش نسبت پروپیونات و بوتیرات بود. همچنین، دفع هیدروژن به عنوان نتیجه‌ای از تجمع هیدروژن در فاز مایع رخ داده است.

وقتی از نظر ترمودینامیکی تولید هیدروژن مولکولی مطلوب نباشد، تولید پروپیونات به دلیل عدم تاثیر منفی غلظت هیدروژن مولکولی افزایش خواهد یافت (۱۶). حال وقتی از مهارکننده‌های مستقیم متانوژن‌ها استفاده می‌شود، عملاً واکنش دهنده‌های تولید متان شامل دی‌اکسید کربن و هیدروژن مولکولی مورد استفاده قرار نگرفته و تجمع می‌یابند. لذا به صورت کلی غلظت هیدروژن در محیط شکمبه افزایش می‌یابد. افزایش هیدروژن منجر به کاهش مطلوبیت ترمودینامیکی مسیرهای تولید هیدروژن مولکولی به ویژه مسیر تولید استات می‌شود و در همین راستا به دلیل عدم تاثیر مهاری افزایش غلظت هیدروژن مولکولی بر تولید پروپیونات، تولید این اسید چرب افزایش می‌یابد (۱۲). با این حال، به دلیل پیشی گرفتن تشکیل هیدروژن از ظرفیت میکروارگانیس‌ها برای مصرف هیدروژن و نیز حلالیت پایین آن، هیدروژن در فاز گازی تجمع می‌یابد (۴۰).

نتایج به دست آمده حاکی از اثر مهارکننده‌های شیمیایی بر افزایش تولید بوتیرات است ($P < 0.01$) که نشان می‌دهد بخشی از الکترون‌های استفاده نشده در تولید متان که به صورت NADH در



شکل ۸- نمودار درختی اندازه اثر مهارکننده های شیمیایی متانوژن ها بر نسبت مولی بوتیرات

مهارکننده‌های تولید متان را تامین نمی‌کند. با توجه به نتایج به دست آمده در این فراتحلیل، بررسی کمی سودمندی مهارکننده‌های شیمیایی در شرایط درون تنی، راندمان استفاده از انرژی اسیدهای چرب فرار در شرایط حضور یا عدم حضور مهارکننده‌های شیمیایی متان و همچنین راهکارهای جلوگیری از دفع هیدروژن در هنگام استفاده از مهارکننده‌های شیمیایی ضروری به نظر می‌رسد.

در شرایط درون تنی به دلیل وجود مکانیسم آروغ و عدم محبوس شدن گازهای تخمیری در شکمبه، اثرات نامطلوب مهارکننده‌های شیمیایی بر اتلاف هیدروژن و کاهش اسیدهای چرب فرار می‌تواند شدیدتر از شرایط برون تنی باشد. از این رو، استفاده نکردن از هیدروژن و کاهش تولید اسیدهای چرب فرار هدف از استفاده از

منابع

- 1- Agarwal, N., D. N. Kamra, P. N. Chatterjee, R. Kumar, and L. C. Chaudhary. 2008. *In vitro* methanogenesis, microbial profile and fermentation of green forages with buffalo rumen liquor as influenced by 2-bromoethanesulphonic acid. *Asian-Austral. J. Anim. Sci.* 21:818-823.
- 2- Anderson, A. C., G. E. Carstens, R. K. Miller, T. R. Callaway, C. L. Schultz, T. S. Edrington, R. B. Harvey, and D. J. Nisbet. 2006. Effect of oral nitroethane and 2-nitropropanol administration on methane-producing activity and volatile fatty acid production in the ovine rumen. *Bioresour. Technol.* 97:2421-2426.
- 3- Bauchop, T. 1967. Inhibition of rumen methanogenesis by methane analogues. *J. Bacteriol.* 94:171-175.

- 4- Boadi, D., C. Benchaar, J. Chiquette, and D. Massé. 2004. Mitigation strategies to reduce enteric methane emissions from dairy cows: Update review. *Can. J. Anim. Sci.* 84:319–335.
- 5- Buddle, B. M., M. Denis, G. T. Attwood, E. Altermann, P. H. Janssen, R. S. Ronimus, C. S. Pinares-Patino, S. Muetzel, and D. N. Wedlock. 2011. Strategies to reduce methane emissions from farmed ruminants grazing on pasture. *Vet. J.* 188:11–17.
- 6- Del Re A. C., and W. T. Hoyt. 2010. Meta-Analysis with Mean Differences. <http://CRAN.R-project.org/package=MAad>.
- 7- Ebrahimi, S. H. 2010. Manipulation of rumen microbial ecosystem using feed additives to mitigate methane emission and enhance nutrient utilization in cattle. Ph.D Thesis. Deemed Univesity, Karnal, India.
- 8- Ebrahimi, S. H., M. Mohini, K. K. Singhal, V. Heidarian Miri, and A. K. Tyagi. 2011. Evaluation of complementary effects of 9, 10-anthraquinone and fumaric acid on methanogenesis and ruminal fermentation *in vitro*. *Arch. Anim. Nutr.* 65:267-277.
- 9- Garcia-Lopez, P. M., L. Kung, Jr, and J. M. Odom. 1996. *In vitro* inhibition of microbial methane production by 9,10-anthraquinone. *J. Anim. Sci.* 74:2276-2284.
- 10- Goel, G., H. P. S. Makkar, and K. Becker. 2009. Inhibition of methanogens by bromo-chloromethane: Effects on microbial communities and rumen fermentation using batch and continuous fermentations. *British J. Nutr.* 101:1484–1492.
- 11- Grainger, C., and K. A. Beauchemin. 2011. Can enteric methane emissions from ruminants be lowered without lowering their production? *Anim. Feed Sci. Technol.* 166–167:308–320.
- 12- Hegarty, R. S. and R. Gerdes. 1999. Hydrogen production and transfer in the rumen. *Rec. Adv. An.* 12:37-44.
- 13- Higgins, J. P. T., and S. G. Thompson. 2002. Quantifying heterogeneity in a meta-analysis. *Stat. Med.* 21:1539–1558.
- 14- Higgins, J. P. T., S. G. Thompson, J. J. Deeks, and D. G. Altman. 2003. Measuring inconsistency in meta-analysis. *BMJ.* 327:557– 560.
- 15- Iqbal, M. F., Y. Cheng, W. Zh, and B. Zeshan. 2008. Mitigation of ruminant methane production: current strategies, constraints and future options. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24:2747–2755.
- 16- 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.
- 17- Johnson, K. A. and D. E. Johnson. 1995. Methane emissions from cattle. *J. Anim. Sci.* 73:2483-2492.
- 18- Knight, T., R. S. Ronimus, D. Dey, C. Tootill, G. Naylor, P. Evans, G. Molano, A. Smith, M. Tavendale, C. S. Pinares-Patino, and H. Clark. 2011. Chloroform decreases rumen methanogenesis and methanogen populations without altering rumen function in cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166–167:101–112.
- 19- Kung, L., K. A. Smith, A. M. Smagala, K. M. Endres, C. A. Bessett, N. K. Ranjit, and J. Yaissle. 2003. Effects of 9, 10 anthraquinone on ruminal fermentation, total-tract digestion, and blood metabolite concentrations in sheep. *J. Anim. Sci.* 81:323–328.
- 20- Lean, I. J., A. R. Rabiee, T. F. Duffield, I. R. Dohoo. 2009. Invited review: Use of meta-analysis in animal health and reproduction: Methods and applications. *J. Dairy Sci.* 92: 3545–3565.
- 21- Lee, S. Y., S. H. Yang, W. S. Lee, H. S. Kim, D. E. Shin and J. K. Ha. 2009. Effect of 2-bromoethanesulfonic acid on *in vitro* fermentation characteristics and methanogen population. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 22:42-48.
- 22- Liu, H., J. Wang, A. Wang and J. Chen. 2011. Chemical inhibitors of methanogenesis and putative applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89:1333–1340.
- 23- McAllister, T. A., and C. J. Newbold. 2008. Redirecting rumen fermentation to reduce methanogenesis. *Aust. J. Exp. Agr.* 48:7–13.
- 24- McCrabb, G. J., K. T. Berger, T. Magner, C. May, and R. A. Hunter. 1997. Inhibiting methane production in Brahman cattle by dietary supplementation with a novel compound and the effects on growth. *Aust. J. Agric. Res.* 48:323-329.
- 25- McDonald, P., R. A. Edwards, J. F. D. Greenhalgh, C. A. Morgan, L. A. Sinclair, and R. G. Wilkinson. 2011. *Animal Nutrition*. 7th ed., Prentice Hall. London.
- 26- Mitsumori, M., T. Shinkai, A. Takenaka, O. Enishi, K. Higuchi, Y. Kobayashi, I. Nonaka, N. Asanuma, S. E. Denman, and C. S. McSweeney. 2011. Responses in digestion, rumen fermentation and microbial populations to inhibition of methane formation by a halogenated methane analogue. *B. J. Nutr.* 8:1-10.
- 27- Mohammed, N., Z. A. Lila, N. Ajisaka, K. Hara, K. Mikuni, S. Kanda, and H. Itabashi. 2004. Inhibition of ruminal microbial methane production by β -cyclodextrin iodopropane malate and their combination *in vitro*. *J. Anim. Phys. Anim. Nutr.* 88:188–195.
- 28- Nollet, L., D. Demeyer and W. Verstraete. 1997. Effect of 2-bromoethanesulfonic acid and *Peptostreptococcus productus* ATCC 35244 addition on stimulation of reductive acetogenesis in the ruminal ecosystem by selective inhibition of methanogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:194-200.
- 29- Pellikaan, W. F., W. H. Hendriks, G. Uwimana, L. J. G. M. Bongers, P. M. Becker and J. W. Cone. 2011. A novel method to determine simultaneously methane production during *in vitro* gas production using fully automated

- equipment. *Anim. Feed Sci. Technol.* 168:196-205.
- 30- Resende Junior, J. C., M. N. Pereira, H. Boer, and S. Tamminga. 2006. Comparison of techniques to determine the clearance of ruminal volatile fatty acids. *J. Dairy Sci.* 89:3096–3106.
- 31- Rosenthal, R. and M. R. Dimatteo. 2001. Meta-Analysis: Recent developments in quantitative methods for literature reviews. *Annu. Rev. Psychol.* 52:59–82.
- 32- Rufener, W. H., J. R., and M. J. Wolin. 1968. Effect of CCl_4 on CH_4 and volatile acid production in continuous cultures of rumen organisms and in a sheep rumen. *Appl. Microbiol.* 16:1955-195.
- 33- Santosa, B., B. Mwenya, C. Sar, Y. Gamo, T. Kobayashi, R. Morikawa, K. Kimura, H. Mizukoshi, and J. Takahashi. 2004. Effects of supplementing galacto-oligosaccharides, *Yucca schottigera* or nisin on rumen methanogenesis, nitrogen and energy metabolism in sheep. *Livest. Prod. Sci.* 91:209–217.
- 34- Shibata, M. and F. Terada. 2010. Factors affecting methane production and mitigation in ruminants. *Anim. Sci. J.* 81:2–10.
- 35- Tavendale, M. H., L. P. Meagher, D. Pacheco, N. Walker, G. T. Attwood, and S. Sivakumaran. 2005. Methane production from in vitro rumen incubations with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa*, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124:403-419.
- 36- Ungerfeld, E. M. and R. A. khon. 2004. The role of thermodynamic in the control of ruminal fermentation. In: Sejrnsen, K., T. Hvelplund, M. O. Nielsen editor. *Ruminant Physiology*. Wageningen, the Netherlands: Wageningen Academic Publishers. p. 55–85.
- 37- Van Nevel, C. J., H. K. Henderickx, D. I. Demeyer, and J. Martin. 1969. Effect of chloral hydrate on methane and propionic acid in the rumen. *Appl. Microbiol.* 17:695-700.
- 38- Viechtbauer, W. 2010. Conducting Meta-Analyses in R with the metafor Package. *J. Stat. Softw.* 36:1-48.
- 39- Viechtbauer, W. and M. W. L. Cheung, 2010. Outlier and influence diagnostics for meta-analysis. *Res. Syn. Meth.* 1:112-125.
- 40- Wang, M., P. H. Janssen, X. Z. Sun, S. Muetzel, M. Tavendale, Z.L. Tan, and D. Pacheco. 2013. Mathematical model to describe in vitro kinetics of H_2 gas accumulation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 184:1-16.
- 41- Wright, A. G. and A. V. Klieve. 2011. Does the complexity of the rumen microbial ecology preclude methane mitigation? *Anim. Feed Sci. Technol.* 166–167:248–253.
- 42- Wuebbles, D. J., and K. Hayhoe. 2002. Atmospheric methane and global change. *Earth Sci. Rev.* 57:177–210.
- 43- Zhou, Y. Y., H. L. Mao, F. Jiang, J. K. Wang, J. X. Liu, and C. S. McSweeney. 2011. Inhibition of rumen methanogenesis by tea saponins with reference to fermentation pattern and microbial communities in Hu sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166–167:93–100.