

Використання SF₆-слідової технології для визначення продукції метану в передшлунках жуйних тварин

Процеси травлення в шлунково-кишковому тракті домашніх тварин забезпечували в 2000 році до 24% всієї антропогенної емісії метану, що є результатом значного світового поголів'я домашньої худоби [Scheehle E., 2000; Moss 1993]. За оцінками спеціалістів USEPA до 2010 р. валовий вклад цього сектору вже зросте з 86 до 154 млн.т CH₄/рік [Scheehle E., 2000]. З огляду на характерні фізіологічні особливості травлення кормів і загальної чисельності всього поголів'я чільне місце в списку антропогенних емітентів метану займають жуйні тварини (до 97%), де домінує велика рогата худоба (74%). З іншої сторони, – така продукція метану означає постійні втрати енергії корму і зокрема – в передшлунках (3-12% BE).

Емісія метану в атмосферу домашніми жуйними є не лише одним з трьох найбільших антропогенних його джерел [Cicerone & Oremland 1988; Johnson & Johnson 1995], але й представляє собою важливий шлях втрат енергії і вуглецю, що позначається на зниженні продуктивності тварин і недоотриманні виробниками відповідної продукції тваринництва [Johnson & Johnson 1995; Martinez, et al., 1995; D.Johnson, G.Ward et al., 1997].

Для розробки відповідних стратегій зниження продукції метану в передшлунках жуйних тварин необхідно мати високоефективну технологію аналізу поточної ситуації і вивчення впливу цілого ряду різних факторів у виробничих умовах. Продукцію метану можна визначати проведенням реальних вимірів його концентрації в зразках і розрахунковим методом, на основі специфічних балансових рівнянь.

Розрахунковий метод. Включає три основні підходи: інкубація *in vitro* [Merry et al., 1987], розрахунок продукції метану на основі молярного співвідношення ЛЖК рубця [Wolin 1960; Czerkawski 1986] та оцінки споживаного корму на базі – (1) перетравності валової енергії (BE) та частки корму для підтримки життєдіяльності [Blaxter & Clapperton 1965] і (2) вмісту різних типів вуглеводів у раціоні [Moe & Tytrel, 1979]. Всі ці методи є досить загальними, оскільки не враховують багато інших факторів, тому не можуть давати точних оцінок і подальших прогнозів в реальних виробничих умовах.

Експериментальні дослідження. Детекцію метану проводять за допомогою інфрачервоної спектроскопії, газової хроматографії, мас-спектроскопії та лазерного аналізу. Інфрачервоний аналіз дозволяє проводити виміри метану в межах від 0 до 500 ppm¹, хоч більшість існуючих аналізаторів цього типу мають або занижену, або граничну межу детекції газу; визначення концентрації метану ведеться в суцільному потоці газу. Для виміру метану останнім часом широко використовують також газову хроматографію з термопровідником чи детекторами іонізації у полум'ї, що в цілому характеризується високим ступенем точності. В обох випадках кількісний аналіз метану реалізується через порівняння піків спалаху полум'я зразків зі стандартними відомими концентраціями. Мас-спектрометрія також може використовуватись для аналізу концентрацій метану в зразках. Це обладнання звичайно дозволяє проводити одночасно аналіз кількох різних газів у зразку, високоточне, переважно – стаціонарними. Однак, мас-спектрометрія є дорогим методом, ціна аналізів якого часто просто перевищує відповідні результати отримані іншими адекватними методами. Виміри концентрації метану при допомозі лазера прирівнюються за класом точності і вартістю одиничних аналізів до мас-спектрометричного методу і навряд

¹ ppm – мільйонна частка

чи може розглядатись з позиції доступності та придатності проведення таких аналізів у польових умовах [Johnson & Johnson 1995].

Закриті системи. Перший респіраційний апарат закритого типу був побудований Regnault і Reiset (Франція) у 1849 р. В 1885 році за цим же принципом вперше в історії Zuntz і Gerpert створили обладнання для вивчення газообміну у ВРХ та коней [Vlaxter 1967]. Створені проф. Zuntz у 1905-1914 рр. респіраційні камери хоч і були досить громіздкими (внутрішній об'єм – до 80 м³), але забезпечували точність вимірів до 0,2%! Дійсно, респіраційні камери, бокси, що розраховані лише на голову тварини, спеціальні маски і вентильовані капюшони застосовувались досить ефективно для проведення більшості попередніх фундаментальних досліджень в стаціонарних умовах. Але їх відмежованість від реальних виробничих умов (обмеженість фізіологічних функцій організму, потреба в тренуваних тваринах, штучний мікроклімат, постійні стреси, похибки внаслідок часто не цілодобового відбору зразків) та складність самої апаратури (великі витрати на проведення одиничного експерименту) – часто ставлять під сумнів можливість безпосередньої екстраполяції результатів подібних аналізів на різні виробничі умови.

Відкриті системи. Трасерові технології (ізотопні чи неізотопні) теж можуть з успіхом використовуватись для точного моніторингу продукції метану в передшлунках тварин. Ізотопні методи передбачають використання ізотопів [³H-] чи [¹⁴C-] на тваринах з фістулою рубця, відкриваючи при цьому можливість визначати характер виробництва газу в різних частинах передшлунків. Проте, ці виміри є дуже складаними, вимагають контрольованих умов, порушують внутрішній гомеостаз і не враховують виділення метану з кишковими газами [Johnson & Johnson 1995]. Найбільш придатними на сьогодні є неізотопні методи вимірів продукції метану, що передбачають введення у рубець в якості мітки інертного газу (наприклад, шестифториста сірка (SF₆)) з подальшим аналізом зразків суміші газів. Цей метод є відносно дешевим, точним і не вимагає якихось спеціальних лабораторних умов, що в цілому робить його придатним для використання у різних виробничих умовах [Johnson & Johnson 1995; Johnson, Westberg et al., 2000].

SF₆–слідова технологія визначення продукції метану в передшлунках тварин.

Суть методу полягає у порівнянні концентрації шуканого газу (метану) і супутнього газу-мітки (SF₆) у зразках, за умови, що швидкість емісії останнього – відома. Для ефективного використання газ-мітка має характеризуватись: (1) постійною і прогнозованою швидкістю дифузії із випускної капсули; (2) хімічною інертністю (не вступати в реакції в рубці); (3) простотою аналізу його вмісту в мікрокількостях; (4) не токсичністю. Шестифториста сірка найбільш повно відповідає цим умовам, оскільки є газом без кольору і запаху, що використовується при пульмонологічних дослідженнях і визначається на рівні 1 ppt². Не відмічено впливу SF₆ на мікрофлору рубця, показники рубцевого бродіння (концентрацію і співвідношення ЛЖК) і власне продукцію метану. Для перевірки стабільності і прогнозованості дифузії SF₆ із випускної капсули, її швидкість вимірюється гравіметрично протягом кількох місяців, витримуючи самі капсули при цьому у водяній бані при 39⁰C, – до постійних рівнів дифузії. Далі капсула з відомим рівнем дифузії SF₆ поміщується в рубець тварини. Зразки рубцевих газів відбираються в районі носового дзеркала і ротової порожнини тварини у спеціально вакуумовані ємності (зроблені у вигляді хомутів) через капіляр. Після закінчення взяття зразків (P=0,5 атм) в цю ємність додають чистий азот для підняття тиску дещо вище 1 атм і проводять газову хроматографію зразків з використанням детекторів іонізації у полум'ї та електронного захвату. Приймаючи, що ступінь розрідження у зразках SF₆ є пропорційним метану, і відому швидкість дифузії/емісії SF₆ (Q_{SF6}) – продукція/емісія CH₄ (Q_{CH4}) розраховується за співвідношенням: Q_{CH4} = Q_{SF6} x [CH₄]/[SF₆]. Слід відзначити, що частина метану, утвореного в задніх відділах кишкового, всмоктується в кров і видихається в подальшому через легені, то ж ця технологія дозволяє контролювати в більшості і цю частину його продукції. Проте, світова література майже не містить

² ppt – тисячна частка

конкретної інформація щодо тієї частки метану, яка не всмоктується в кров і виділяється через задню кишку в атмосферу. Вперше SF₆ -трасеровий метод було апробовано в США у порівнянні результатів його 55 аналізів з 25 респіраційними вимірами – не було відзначено достовірної різниці (P<0.1). Так, нова технологія дала середній результат на рівні 11,53±0,41 л/год, а респіраційна – 12,36±0,33 л/год [Johnson K. Westberg et al., 1998].

Даний метод дозволяє вимірювати емісію метану, що продукується в передній частині кишкового тракту (зокрема – передшлунках) тварин у польових і виробничих умовах (відкритих чи закритих), а також конкретних природних ділянок – боліт, водойм, звалищ і т.п. Більш того, – він є відносно універсальним, оскільки дозволяє проводити виміри як індивідуальної, так і групової продукції метану тваринами в різних умовах. Ця технологія апробована нами за підтримки американських колег з університету штату Вашингтон (США), які надали нам дану методику, відповідні прилади та аналітичне обладнання для її повноцінної реалізації в Україні в рамках міжнародної екологічної програми по зменшенню викидів метану, як важливого парникового газу [Johnson & Johnson, 1995], що фінансувалась USEPA і Winrock International. Перші експериментальні дослідження по вивченню емісії метану у великої рогатої худоби за вищезгаданим методом в Україні були проведені в Харківській області, на базі фізіологічного двору інституту тваринництва УААН. Тут у попередні роки були проведені масштабні дослідження метаногенезу у жуйних з використанням респіраційних камер відкритого типу і накопичено методичний досвід та великий експериментальний матеріал по вивченню газообміну у великої рогатої худоби.

ДОСЛІД ПЕРШИЙ

Матеріали і методи

Після поетапної обробки методичних положень і створення належної технічної бази проведено експеримент по комплексній апробації методики вимірів емісії метану із застосуванням спеціальних капсул з шестифтористою сіркою (SF₆), що вводились в рубець тварин. Швидкість дифузії SF₆ із капсул, поміщених в термостат при t=39⁰C, визначали зважуванням протягом 45 днів. Паралельно готували тварин, зброю, вакуумовані ємності.

Для проведення експерименту були відібрані 4 сухостійних корів живою масою 420-450 кг. Раціон піддослідних тварин складався з 15 кг зеленої маси кукурудзи, 1.5 кг люцернового сіна і 1.0 кг комбікорму. Спочатку облікового періоду всім тваринам були введені в рубець капсули, а через 15 днів протягом 2-х суміжних діб проводились виміри концентрації SF₆ і CH₄ у відібраних із вакуумованих ємностей зразках.

Результати і обговорення

В таблиці 1 наведено результати вимірів емісії метану у глибокотільних сухостійних корів.

Таблиця 1. Показники вимірів емісії метану у піддослідних корів

Інвентарний № тварини	№ капсули	Емісія SF ₆		Концентрація у видихасомому повітрі, ppm		Кількість метану, л/год
		нг / хв	мг / добу	SF ₆	CH ₄	
3981	ZD	1065,0	1,534	0,2797	28,6	9,15
4369	ZB	1202,4	1,731	0,2215	25,1	11,45
4128	ZE	1084,2	1,561	0,2546	35,8	12,81
4231	ZC	1010,9	1,456	0,5360	55,4	8,78

В середньому рівень емісії метану у піддослідних тварин складав 10,5±1,11 л/год з коливаннями від 8,78 до 12,11 л. Ці цифри знаходяться в межах величин, котрі були отримані в раніше проведених респіраційних дослідях на стаціонарному обладнанні. Тож за умови типових для України рівнів годівлі тільних сухостійних корів, емісія метану в

середньому складала 10 л/год, що слід враховувати при визначенні валової емісії метану великою рогатою худобою з врахуванням частки тварин, які перебувають у цьому фізіологічному стані, в загальній структурі стада.

ДОСЛІД ДРУГИЙ

Завданням другого дослідження було: 1) оцінити вплив згодовування цеоліту в складі звичайних раціонів на інтенсивність утворення метану у корів та 2) одночасно апробувати методику визначення емісії метану за допомогою газу-мітки (SF₆) груповим методом в закритому (ізолюваному) приміщенні при максимальному дотриманні існуючої технології утримання тварин.

Матеріали і методи

Дослідження проводились на 12 тільних сухостійних коровах української червоно-рябої породи (голштинізований тип), що перебували на 8-9 місяці тільності, методом періодів. Утримання тварин було прив'язним, в ізолюваному відділі фізіологічного двору інституту тваринництва УААН.

В підготовчий період тривалістю 15 діб основний раціон піддослідних тварин був типовим для даної зони і складався із 13 кг кукурудзяного силосу, 3 кг люцернового сіна, 2 кг пшеничної соломи, 1,5 кг комбікорму і мінеральної добавки (30 г).

В дослідний період тривалістю також 15 діб набір кормів лишався незмінним. У зв'язку зі збільшенням маси тварин кількість кукурудзяного силосу збільшено до 14,5 кг і, крім цього, всі корови отримували по 250 г цеоліту, який згодовувався у суміші з комбікормом (таблиця 2).

Таблиця 2. Середньодобове споживання кормів піддослідними коровами (в середньому/1 голову, кг) і основні показники поживності раціонів.

Корми і показники поживності	Періоди	
	Підготовчий (15 діб)	Дослідний (15 діб)
Силос кукурудзяний	13,0	14,5
Люцернове сіно	3,0	3,0
Солома пшенична	2,0	2,0
Комбікорм	1,5	1,5
Мінеральна добавка, г	30	30
Цеоліт, г	—	250
<i>В раціоні містилось:</i>		
Сухої речовини (СР), г	8969	9344
Органічної речовини (ОР):		
г	8269	8612
% до сухої речовини	92,2	89,6
Сирого жиру:		
г	253	268
% до сухої речовини	2,8	2,79
Сирого протеїну:		
г	1045	1082
% до сухої речовини	11,6	11,3
Сирої клітковини:		
г	2533	2645
% до сухої речовини	28,2	27,5
Без азотистих екстрактивних речовин:		
г	4439	4617
% до сухої речовини	49,5	48,0
Енергетична поживність раціонів, МДж	85,1	89,1

Кальцію:		
г	94,0	96,1
% до сухої речовини	1,05	0,83
Фосфору:		
г	23,6	24,2
% до сухої речовини	0,26	0,26

Тож споживання сухої речовини (СР) піддослідними коровами в середньому складало близько 9,0-9,4 кг в перерахунку на 1 голову/добу. Енергетична поживність раціонів дорівнювала 86-89 МДж обмінної енергії, що відповідає реальному рівню годівлі корів в більшості господарств лісостепової зони України.

Облік емісії метану проводився через кожні 15 діб після початку підготовчого і дослідного періодів з 12-годинними інтервалами протягом 2-х суміжних діб. При цьому застосовувався груповий варіант SF₆-слідової методики. Для цього в ізольоване приміщення фізіологічного двору, де утримувались піддослідні тварини, в період обліку емісії метану випускали газ-мітку (SF₆) із балона і з 3-х точок приміщення відбирали зразки повітря у вакуумовані ємності. Рівномірність взяття зразків протягом доби забезпечувалась металічними капілярами такої довжини, що під час взяття зразків повітря (12 год) тиск в ємності знижувався наполовину. Для забезпечення рівномірності розподілу SF₆ в приміщенні поруч з випускним балоном встановлювали вентилятор.

Результати і обговорення

Результати вивчення емісії метану у піддослідних корів наведено у таблиці 3.

Таблиця 3. Характеристика показників емісії метану у піддослідних корів

Показник	Періоди		
	Підготовчий	Дослідний	
		абсолютні показники	у % до підготовчого
<i>Виділено метану:</i>			
– Літрів на 1 голову/добу, М±m	210,0±14,3	190,9±12,6	90,9
– Літрів на 1 кг сухої речовини, М	23,41	19,97	85,3
– Літрів на 1 кг сирової клітковини, М	13,00	72,55	87,4
<i>Енергія метану:</i>			
– МДж, М±m	8,30±0,25	7,55±0,32	91,0
– МДж на 1 кг органічної речовини, М	1,00	0,88	87,5
Втрати валової енергії за рахунок утворення метану, %	5,20	4,73	

Аналізуючи ці дані, слід підкреслити наступне.

По-перше, в нашому досліді втрати валової енергії за рахунок метаноутворення склали 4,73-5,20%, а це дещо менше очікуваних при даній концентрації обмінної енергії в сухій речовині згодовуваних раціонів. Це спостерігається також при співставленні отриманих нами результатів з теоретично розрахованими. Так, наприклад, розрахунок емісії метану за рівнянням запропонованому D.E.Johnson, G.M.Ward (1996) визначає величину 252,7 л/голову/добу, а за рівнянням Shibata Masaki et al. (1992) – 269,1 л. Зазначенні відмінності беззаперечно можуть бути пов'язані з тим, що згадані рівняння авторами були отримані для лактуючих високопродуктивних корів і відповідно – для більш високого рівня годівлі.

По-друге, під впливом згодовування цеоліту (250 г/корову/добу) відбулось помітне (хоча й не достовірне – P>0,05) зниження емісії метану, а також зниження втрат валової енергії корму. Це зниження метаноутворення видно як за абсолютними добовими показниками, так і особливо в перерахунку на одиницю сухої, органічної речовини та клітковини. Отже згодовування цеоліту в кількості 250 г/голову/добу сприяє зниженню інтенсивності

метаноутворення у тільних сухостійних корів, що може визначатись його інгібуючим впливом безпосередньо на метаногенез чи на загальний характер бродіння в рубці;

Висновки

1. Запропоновану методику виміру емісії метану за допомогою SF₆-мітки і використання спеціальних рубцевих капсул можна розглядати як абсолютно прийнятну для проведення експериментальних досліджень як з позиції визначення рівня метаногенезу у дорослої ВРХ, так і для вивчення процесів живлення у жуйних тварин з врахуванням втрат енергії за рахунок діяльності метаноутворюючих бактерій;
2. Особливістю апробованої методики є можливість і прийнятність її використання для експериментального обґрунтування особливостей метаногенезу у ВРХ при оцінці емісії метану в різних умовах годівлі, утримання тварин, випробування кормових добавок і врахування техногенного забруднення середовища. Методика може використовуватись при необхідності проведення тривалих досліджень щодо динаміки метаногенезу, в тому числі і в умовах пасовищного утримання, хоч в даному разі – вона використана на мало чисельному поголів'ї;
3. Використання методики групового виміру емісії метану за допомогою SF₆-мітки дозволяє проводити дослідження з проблеми метаногенезу у жуйних на більш чисельному поголів'ї, що дозволяє вивчити як вікові особливості метаноутворення, так і вплив на цей процес різних факторів годівлі і утримання тварин при максимальному дотриманні усталеної технології виробництва продукції.

- Blaxter, K.L. and Clapperton J.L. 1965. Prediction of the amount of methane produced by ruminants. *Br. J. Nutr.* 19: 511.
- Blaxter, K.L. 1967. The energy metabolism in ruminants. Hutchinson Scientific & Technical, London, P. 53-61.
- Cicerone, R.J. and Oremland R.S. 1988. Biogeochemical aspects of atmospheric methane. *Global Biogeochem. Cycles*, 2, 299-327.
- Czerkawski, J.W. 1986. An introduction to rumen studies. *Pergamon Press*, New York.
- Johnson, K.A. and Johnson D.E. 1995. Methane emissions from cattle. *J. Anim. Sci.* 73: 2483-2492.
- Johnson, D.E. and Ward G.M. 1996. Estimates of animal methane emissions. *Environmental Monitoring & Assessment*, Kluwer Academic Publishers, 42: 133-141.
- Johnson, D.E., Ward G.M. and Bernal G. 1997. Biotechnology mitigating the environmental effects of dairying: greenhouse gas mitigation. *In: Production & biotechnology* (ed. Welch *et al.*), Cab International, 32, 497-511.
- Johnson, D.E., Westberg H.H., Lamb B.K. and Kincaid R.L. 2000. An overview of the SF₆ technique for measuring methane emissions from cattle. *Proceedings of the Second International Conference on Methane Emissions Mitigation*, Novosibirsk, Russian Federation, C.103-108.
- Martinez, A., Bogdanov G.O., Johnson D.E. and Rust J. 1995. Reducing methane emissions from ruminant livestock: Ukraine prefeasibility study, Final Report to US EPA, Winrock International, Morrilton, Arkansas, 70 pp.
- Merry, J., Smith R.M. and McAllan A.B. 1987. Studies of rumen function in an *in vitro* continuous culture system. *Arch. Anim. Nutr.* 6: 475.
- Moe, P.W. and Tyrrell H.F. 1979. Methane production in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 62: 1583.
- Moss, A.R. 1993. Methane: global warming and production by animals. ADAS Drayton Research Centre, *Chalcombe Publications*, Kingston, UK. 105 pp.
- Scheehle, E. 2000. The importance of methane inventories: US and international emissions and projections. *Proceedings of the Second International Conference on Methane Emissions Mitigation*, Novosibirsk, Russian Federation, C.45-50.

- Shibata Masaki, Tirada Fuminori, Iwasaki Kozno, Kurhara Mitsunori, Nishida Takihiro – Methanoproduction in utters sheep and goats consuming diets of various hay concentrate rations. *Anim. Sci. Technology (Japan)*, 1992, 63, No 12, 1221-1227.
- Westberg, H.H., Johnson K.A., Cossalman M.W. and Michal J.J. 1998. A SF₆ tracer technique: methane measurement from ruminants. Washington State University, Pullman, Washington, Rev.2, 37.
- Wolin, M.J. 1960. A theoretical rumen fermentation balance. *J. Dairy Sci.* 40: 1452.