



反刍动物瘤胃甲烷减排的微生物调控路径

陈亮, 唐祎凡, 陈鸿翼, 刘建新, 孙会增*

浙江大学动物科学学院奶业科学研究所, 杭州 310058

* 联系人, E-mail: huizeng@zju.edu.cn

收稿日期: 2024-06-14; 接受日期: 2024-07-24; 网络版发表日期: 2024-12-10

国家重点研发计划政府间国际科技创新合作项目(批准号: 2023YFE0123100)资助

摘要 人类活动造成的温室气体大量排放是引起全球气候变暖的重要原因, 甲烷作为大气中第二大温室气体, 其排放严重影响人类健康、生态系统和粮食安全, 低碳减排是全世界的共同目标. 反刍动物能够产生大约全球17%的甲烷, 其中90%以上来自瘤胃. 反刍动物瘤胃甲烷产生是微生物直接作用的结果, 甲烷减排方法得到了广泛研究, 但现阶段对甲烷减排措施的具体机理认知还不甚明了, 限制了有效精准措施的开发. 因此本文从反刍动物瘤胃微生物和甲烷生成机理的角度出发, 分别总结现有针对瘤胃不同微生物群的甲烷减排机理和对应方法, 包括通过减少产甲烷菌丰度或抑制产甲烷通路作用于产甲烷菌, 通过作用于瘤胃细菌和真菌以减少氢的产生或竞争氢利用, 以及通过去原虫以间接影响产甲烷菌等. 同时本文提出反刍动物甲烷减排的三个未来发展方向, 包括噬菌体疗法、甲烷厌氧氧化和瘤胃微生物组早期调控, 以期对未来反刍动物甲烷减排措施的有效设计和综合应用提供参考.

关键词 甲烷减排, 瘤胃微生物, 反刍动物

气候变化的红色警报正在响起, 随着人类活动排放的温室气体持续增加, 全球气候变暖成为毋庸置疑的事实, 干旱、洪水、热浪等极端天气事件频现, 海平面上升、生态系统破坏、粮食安全受到威胁等严重影响人类未来的生存和发展^[1-3]. 2023年11月20日, 联合国环境规划署发布的《2023年排放差距报告》指出, 目前世界减排未果, 所有国家都必须紧急加快整体经济的低碳转型以达到《巴黎协定》中的2℃或1.5℃温控目标^[1], 而甲烷排放的增长被认为是现今实现该目标的最大阻碍者^[4]. 甲烷作为仅次于二氧化碳的第二大温室气体, 尽管其大气寿命仅为9~12年^[5], 但甲烷在20年尺度下的全球变暖潜能值是CO₂的82.5倍^[5]. 同

时甲烷是对流层臭氧形成的前体物质^[6], 而对流层臭氧作为一种危险的空气污染物, 可导致人类因呼吸道疾病过早死亡, 并严重威胁生态系统和粮食安全^[4]. 随着地球大气中甲烷含量的迅速增加^[4,5], 需要有针对性地制定并实施甲烷减排策略.

大气中的甲烷来源于自然和人类活动, 后者主要包括化石燃料开采与利用、反刍动物与水稻种植等农业生产、废弃物处理等^[4,5], 其中反刍动物养殖是甲烷排放的重要来源. 以最常见的牛羊为例, 一头牛每年可排放甲烷39~154 kg, 一头羊每年排放甲烷3.9~15.2 kg^[3]. 据联合国粮农组织统计, 2022年世界牛和水牛存栏量超17亿头, 绵羊和山羊超24亿头, 这些数量庞大的牛

引用格式: 陈亮, 唐祎凡, 陈鸿翼, 等. 反刍动物瘤胃甲烷减排的微生物调控路径. 中国科学: 生命科学, 2025, 55: 529-543

Chen L, Tang Y F, Chen H Y, et al. Microbial regulatory pathways of methane emission reduction in the rumen of ruminants (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2025, 55: 529-543, doi: [10.1360/SSV-2024-0024](https://doi.org/10.1360/SSV-2024-0024)

羊和其他反刍动物排放的甲烷可达1.15亿吨/年^[4], 约占全球甲烷排放总量的17%^[7]。同时由于全球人口的增长和人们生活水平的提高, 反刍动物数量的持续增长将推动其甲烷排放量以约600万吨/年的速率增加^[4]。反刍动物因产甲烷而损失的能量可占其饲料总能的5%~15%^[8], 这些甲烷中约有94%是在瘤胃中产生^[9], 而瘤胃中的产甲烷菌和其他微生物直接或间接参与到瘤胃的甲烷生成中。因此, 通过瘤胃微生物研究减少反刍动物甲烷排放的措施和相关机理, 不仅有利于反刍动物饲料效率的提高, 更是控制畜牧业温室气体排放中的重要环节。

1 反刍动物瘤胃微生物与甲烷排放

反刍动物瘤胃含有数量丰富的微生物, 以生物量从大到小排序, 瘤胃中含有 10^{10} ~ 10^{11} CFU/mL细菌、 10^4 ~ 10^6 CFU/mL原生动物、 10^3 ~ 10^6 CFU/mL真菌、 10^7 ~ 10^{10} CFU/mL产甲烷菌和 10^8 ~ 10^9 CFU/mL噬菌体^[10], 所有微生物之间存在各种生态相互作用, 共同构成了瘤胃复杂的微生态系统^[11]。在这数量庞大的瘤胃微生物中, 产甲烷菌和其他微生物直接或间接地参与到瘤胃产生甲烷中。

反刍动物排放的甲烷少量在肠道和粪便中产生, 而大部分则是由瘤胃内的产甲烷菌产生。产甲烷菌是严格厌氧菌, 是一类能够将无机或有机化合物厌氧发酵转化成甲烷的古细菌。在分类学上, 产甲烷菌属于古菌域, 广域古菌界, 宽广古生菌门, 现通常将其分类为4纲, 7目, 分别是甲烷杆菌目(Methanobacteriales)、甲烷球菌目(Methanococcales)、甲烷八叠球菌目(Methanosarcinales)、甲烷微菌目(Methanomicrobiales)、甲烷火菌目(Methanopyrales)、甲烷胞菌目(Methanocellales)和甲烷马赛球菌目(Methanomassiliicoccales), 且不断有新类型的产甲烷菌被发现^[12], 其中已经体外纯培养的产甲烷菌将近百种^[13]。在瘤胃古菌群中, 产甲烷菌主要为上述提到的前4目和甲烷马赛球菌目^[14,15], 其中甲烷杆菌目的甲烷短杆菌属(*Methanobrevibacter*)约占瘤胃古菌群落的70%^[16]。

根据产甲烷所利用的前体物质的不同, 瘤胃产甲烷菌可分为氢营养型、甲基营养型和乙酸营养型(图1)。氢营养型产甲烷菌主要包括甲烷杆菌目、甲烷球菌目和甲烷微菌目^[17], 是瘤胃产生甲烷的主要途径。

该路径以 CO_2 和 H_2 为底物, 共有7步反应产生甲烷, 即为沃尔夫循环(Wolfe cycle)。 CO_2 先与甲烷呋喃(methanofuran, MFR)结合形成甲酰基, 随后脱去MFR和四氢甲基蝶呤(H_4MPT)结合并先后被还原为甲炔基、亚甲基和甲基, 然后甲基基团转移到辅酶M(HS-CoM), 生成甲基辅酶M($\text{CH}_3\text{-S-CoM}$), 最后甲基辅酶M在甲基辅酶M还原酶(methyl-coenzyme M reductase, MCR)的催化下形成甲烷^[18]。甲基营养型以甲醇、甲基胺和甲基硫化物为底物, 可分为两种途径产生甲烷: 一是甲基转化途径, 在瘤胃中, 甲烷八叠球菌属和甲烷球形菌属是主要的以此途径产生甲烷的产甲烷菌^[17]。在这一甲烷生成过程中, 甲基化合物发生歧化反应, 一部分甲基基团转移至辅酶M生成甲基辅酶M, 然后经MCR催化还原为甲烷, 同时另一部分甲基化合物氧化产生 CO_2 和还原当量^[19]。二是甲基化合物- H_2 还原途径, 甲烷马赛球菌利用 H_2 还原甲基化合物的甲基产生甲烷^[20], 具体为利用 H_2 还原产甲烷的最后一步反应以及还原该反应中产生的异二硫化物复合体得到还原态的辅酶M和辅酶B, 用于进行下一循环反应^[12]。同属于甲烷八叠球菌目的甲烷八叠球菌属和甲烷鬃毛菌属是瘤胃中主要的乙酸营养型产甲烷菌, 乙酸盐消耗一个ATP和辅酶A形成乙酰辅酶A, 随后甲基在酶的催化下分别与四氢甲基萨尔奇纳蝶呤(H_4SPT)和 H_4MPT 结合并脱去, 此时甲基转移至辅酶M, 形成甲基辅酶M, 再经MCR催化形成甲烷^[19,21]。

瘤胃细菌对反刍动物的生存至关重要, 与非反刍动物不同的是, 挥发性脂肪酸(volatile fatty acid, VFA)是反刍动物机体的主要能量来源, 而瘤胃中在DNA和蛋白质水平上丰度最高的厚壁菌门和拟杆菌门, 及其内部的众多核心属, 具有水解纤维素、半纤维素、果胶、淀粉等碳水化合物, 产生VFA的能力^[16]。当产生的VFA为乙酸和丁酸时, 大量的 CO_2 和 H_2 生成^[22]。如果没有产甲烷菌对 H_2 进行消耗, 反应产物的迅速积累会严重抑制碳水化合物的降解, 进而影响到反刍动物的能量利用。除产甲烷菌外, 丙酸形成菌、同型产乙酸菌、硝酸盐/亚硝酸盐还原菌、硫酸盐还原菌等也可以消耗氢^[23]。

原虫包括鞭毛虫和纤毛虫, 鞭毛虫多存在于新生反刍动物瘤胃中, 而成年反刍动物瘤胃中的原虫基本为纤毛虫^[24], 可达瘤胃微生物生物量的一半左右。根据形态学差异, 纤毛虫可分为全毛虫和内毛虫两类。

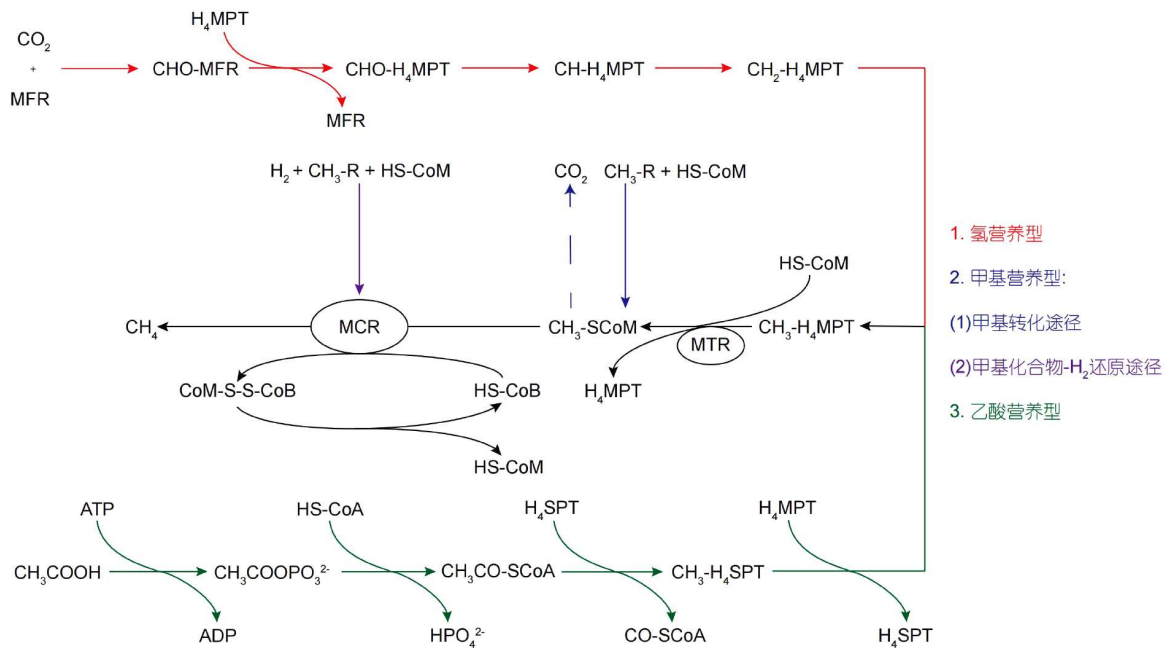


图1 瘤胃产甲烷菌的产甲烷途径. MFR: 甲烷呋喃; H₄MPT: 四氢甲基蝶呤; H₄SPT: 四氢八叠蝶呤; HS-CoM: 辅酶M; HS-CoA: 辅酶A; HS-CoB: 辅酶B; CoM-S-S-CoB: 异二硫化物复合体; MCR: 甲基辅酶M还原酶; MTR: 甲基转移酶

Figure 1 Methanogenic pathways in rumen methanogens. MFR: methanofuran; H₄MPT: tetrahydromethanopterin; H₄SPT: tetrahydrosarcinapterin; HS-CoM: coenzyme M; HS-CoA: coenzyme A; HS-CoB: coenzyme B; CoM-S-S-CoB: heterodisulfide of CoM and CoB; MCR: methyl-CoM reductase; MTR: methyltransferase

原虫和产甲烷菌之间存在着密切的共生关系,一方面,原虫可以将纤维素降解生成VFA, CO₂和H₂,为产甲烷菌提供产生甲烷的底物;另一方面,原虫在代谢过程中消耗氧气,保护产甲烷菌等厌氧微生物以免其氧中毒^[19,23].产甲烷菌通常以内共生和外共生的方式(以内共生为主)结合在纤毛虫上,并以此发生种间氢传递^[25].不同的原虫群落组成对产甲烷菌有一定影响,全毛虫对产甲烷菌有着更有利的影响,因为全毛虫拥有更活跃的氢化酶体,且在存在过量碳水化合物时可以快速合成糖原,从而产生更多氢气^[23].

瘤胃真菌约占微生物生物量的8%~12%,大多数为厌氧菌,通过分泌活性高的纤维素酶、半纤维素酶等在纤维降解中发挥作用,其降解植物纤维的贡献可以超过瘤胃细菌群体^[26],并且瘤胃真菌同样拥有氢化酶体,其代谢过程中会产生大量的CO₂、H₂、甲酸盐和乙酸盐^[27],提供给产甲烷菌必要的产甲烷底物.

噬菌体对维持瘤胃微生物之间的动态平衡和瘤胃饲料降解有着重要的作用.瘤胃噬菌体裂解宿主过程中产生的不被动物吸收的蛋白质、核酸和细胞碎片可以被其他微生物用作氮和能量来源,形成瘤胃内循环,

并且产生动物可以消化吸收的物质^[28].同时该过程伴随着微生物酶的释放,包括参与碳水化合物降解的酶,从而提高饲料利用效率^[29].最新研究表明,瘤胃噬菌体携带的辅助代谢基因(auxiliary metabolic gene, AMG)编码涉及多种代谢过程的酶,包括核苷酸、碳水化合物、维生素和氮代谢,促进宿主对营养物质的获取,进而影响反刍动物营养吸收与代谢^[30].通过噬菌体调控瘤胃产甲烷菌,被认为是反刍动物甲烷减排的一种未来发展方向.

关于反刍动物甲烷减排的措施已有很多报道^[19,31],但现阶段对与产甲烷过程有关的微生物及甲烷减排措施的具体机理认知还不甚明了,因此在下文做出总结,从瘤胃微生物的角度出发,整理现有的众多甲烷减排措施的机理(图2)和未来的研究思路.

2 直接作用于产甲烷菌的甲烷减排措施及机理

反刍动物甲烷由产甲烷菌产生,因此作用于产甲烷菌是瘤胃甲烷减排最直接的方式.目前总体上共有

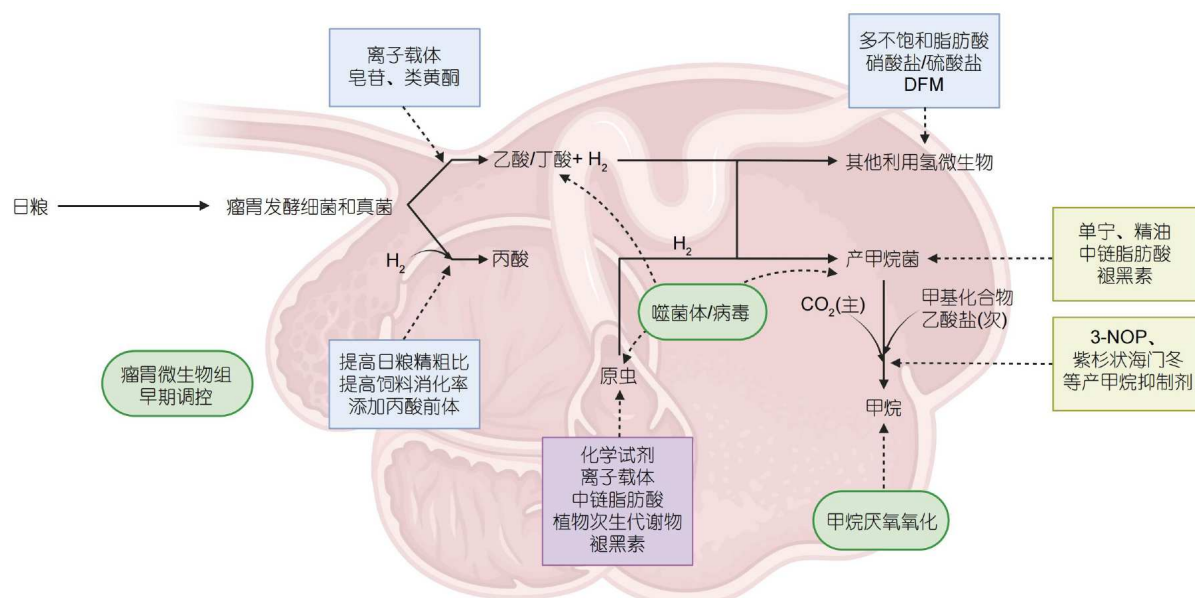


图2 瘤胃甲烷生成过程和基于不同机理的甲烷减排措施

Figure 2 Rumen methanogenesis and methane emission reduction methods based on different mechanisms

两种模式, 分别是减少产甲烷菌丰度或抑制其活性, 以及阻碍或阻断产甲烷通路(图2黄色方框部分)。

2.1 减少产甲烷菌丰度或抑制其活性

单宁是一种天然的多酚类化合物, 可以分为缩合单宁(condensed tannin, CT)和水解单宁(hydrolysable tannin, HT), 其中缩合单宁可以直接减少产甲烷菌的丰度, 其可能的理论依据是CT通过结合细胞表面的黏附素或部分细胞包膜, 破坏产甲烷菌-原虫的结合体系, 从而减少种间氢转移和抑制产甲烷菌的生长^[32]. HT水解产物为没食子酸或鞣花酸, 其中没食子酸可以和产甲烷菌的表面蛋白结合形成酚羟基化合物, 直接抑制产甲烷菌^[33]. 植物精油是植物中提取得到的挥发性强的芳香性物质总称, Patra和Yu^[34]发现, 丁香油、桉叶油、大蒜油、牛至油和薄荷油等五种精油降低了产甲烷菌的丰度, 这种对产甲烷菌的直接作用可能是由精油中含有的具有抗菌活性的某些萜类化合物、酚类化合物或其他化学成分造成的^[32]. 中链脂肪酸如月桂酸(C12:0)直接抑制瘤胃产甲烷菌的数量和代谢活性, 改变产甲烷菌的组成^[35]. Fu等人^[36]发现, 褪黑素显著降低了大部分优势瘤胃产甲烷菌的丰度, 在体外和体内实验中甲烷生成量都显著减少。

2.2 阻碍或阻断产甲烷通路

瘤胃中产甲烷菌产甲烷的四种途径最后一步反应是都相同的, 即甲基辅酶M($\text{CH}_3\text{-S-CoM}$)和HS-辅酶B(HS-CoM)经MCR催化还原为甲烷和 CoM-S-S-CoB . MCR是一种镍酶, 由 $(\alpha\beta\gamma)_2$ 6个亚基和辅酶F₄₃₀组成, 其中F₄₃₀是MCR活性中心的必要组成部分, 具有金属中心镍(Ni), 只有当Ni为+1价(Ni(I))时, F₄₃₀才具有活性, MCR可以催化甲基辅酶M还原^[37]. 而Ni(I)的氧化还原电势极低(小于-600 mV), 极易被氧化为Ni(II)从而失去催化活性^[38]. 3-硝基酯-1-丙醇(3-nitrooxypropanol, 3-NOP)是甲基辅酶M类似物, 其化学式为 $\text{HO}(\text{CH}_2)_3\text{ONO}_2$, 其中的硝基酯基团可以选择性地和MCR结合, 并将Ni(I)氧化为Ni(II)使MCR失活, 从而高效抑制甲烷产生^[39]. 3-NOP可以以较低的剂量发挥显著的作用, Hristov等人^[40]研究表明, 与对照组相比, 饲喂40, 60, 80 mg/kg饲料干物质的3-NOP后, 使用Green-Feed系统测得的奶牛平均甲烷排放量分别降低了25%, 31%和32%, 并且奶牛的体重得到增加, 对采食量、产奶量和乳成分也没有负面影响, 但3-NOP对甲烷的抑制作用随实验进行有所下降. 另外, 3-NOP的安全性已得到大量的研究证实^[40-43], 但其长期作用是否有效, 以及使用3-NOP时瘤胃中 H_2 的大量积累是否能有效解决

等问题在3-NOP成功商品化之前还需长期观测。

除了3-NOP这一目前最有潜力的抑制剂, 还有多种化合物可以直接抑制甲烷的产生。9,10-蒽醌(9,10 anthraquinone, AQ)对ATP合成具有解偶联作用, 抑制甲基辅酶M还原为甲烷, 但在绵羊体内抑制效果未超过19 d^[44]。2-溴乙烷磺酸盐(2-bromoethanesulfonic acid, BES)是甲基辅酶M的类似物, 和3-NOP类似, BES与甲基辅酶M竞争, 将辅酶F₄₃₀中的Ni(I)氧化, 导致MCR失活, 从而阻断甲烷生产通路, 但其在体内实验中作用效果短暂^[45], 很可能是产甲烷菌对其产生了适应性。

在沃尔夫循环中, 第6步反应甲基辅酶M的生成由甲基转移酶(methyltransferase, MTR)催化, 该步骤是氢营养型和乙酸营养型产甲烷菌所共有的, 其中MTR含有的类咕啉辅基cob(I)alamin在甲基基团的转移中形成中间体CH₃-cob(III)alamin, 而卤代脂肪烃如氯仿、溴仿、四氯化碳、水合氯醛、溴氯甲烷、三氯乙酰胺、三氯乙酯己二酸等可以抑制该甲基转移过程, 还能通过作为终端电子受体竞争电子以抑制甲烷生成^[46,47]。但由于该类化合物易挥发、毒性高、破坏臭氧层、致癌等缺点, 卤代烃在实际生产中不太可能大规模用于反刍动物的甲烷减排。作为代替, 含有多种卤代烃的一种红藻——紫杉状海门冬(*Asparagopsis taxiformis*)被证明在体外和体内实验中大幅度减少甲烷的排放, 减排比例分别可达99%^[48]和80%以上^[49,50], 但要注意的是高剂量的*Asparagopsis taxiformis*会降低采食量和生产性能^[51], 也可能通过溴仿等积累影响牛奶等动物产品^[52]。

此外, 作为氢营养型产甲烷菌的重要辅酶, F₄₂₀在沃尔夫循环的第4、5步甲炔基还原为亚甲基和甲基时作为电子供体, 蝶呤和他汀类化合物可作为F₄₂₀的结构类似物, 可以竞争性抑制甲烷的生成^[47]。然而, 蝶呤在混合瘤胃培养物中抑制效果较差^[53], 也未在体内瘤胃条件下进行实验; 他汀类药物价格昂贵, 不适合用于实际生产中的甲烷减排, 而天然来源, 如紫红曲霉、红曲霉、青霉、土曲霉等真菌产生的他汀类有较好的甲烷抑制效果, 但也要考虑霉菌毒素的产生和他汀类物质在动物产品中的残留问题^[47,54]。

3 作用于瘤胃细菌和真菌的甲烷减排措施及机理

瘤胃中利用CO₂和H₂的氢营养型产甲烷菌约占产

甲烷菌总量的82%^[9], 而CO₂约占瘤胃气体总量的65%, 并不是瘤胃产甲烷的限制性底物^[55], 因此减少H₂这一电子供体是极为有效的方法, 主要模式有两种, 分别是减少氢的产生, 以及让瘤胃细菌与产甲烷菌竞争氢(图2蓝色方框部分)。

3.1 减少氢的产生

瘤胃中的细菌和真菌是纤维素代谢和氢产生的重要介导者^[26], 其将碳水化合物降解为乙酸和丁酸时会释放氢(C₆H₁₂O₆+2H₂O→2CH₃COOH+2CO₂+4H₂; C₆H₁₂O₆→CH₃(CH₂)₂COOH+2CO₂+2H₂), 而降解为丙酸时会利用氢(C₆H₁₂O₆+2H₂→2CH₃CH₂COOH+2H₂O), 因此提高丙酸在VFA中的相对比例, 降低乙酸丙酸比, 可以使H₂更多用于丙酸合成, 减少甲烷的排放量^[22]。相较于纤维素, 淀粉等非纤维碳水化合物在瘤胃中降解生成的丙酸更多, 乙酸更少, 饲喂高淀粉日粮或提高饲料精粗比有利于减少甲烷的生成^[56]。Li等人^[57]研究表明, 高纤维日粮通过富集以产琥珀酸丝状杆菌(*Fibrobacter succinogenes*)为代表的纤维分解菌群, 提高了乙酸和氢的产量, 促进了甲烷菌增殖和甲烷生成。高淀粉日粮则通过富集淀粉降解菌如嗜淀粉瘤胃杆菌(*Ruminobacter amylophilus*)和乳酸利用菌如埃氏巨球形菌(*Megasphaera elsdenii*), 促进了以乳酸为中间产物的丙烯酸酯途径生成丙酸, 减少甲烷生成。并且体外实验中乳酸虽然显著增加, 但在体内实验中并没有出现pH降至6.0以下和瘤胃上皮损害的瘤胃酸中毒表现, 这很可能是通过丙烯酸酯途径代谢乳酸的菌群富集的结果。此外, 提高饲料消化率也可以增加丙酸在瘤胃发酵产物中的比例, 具体的措施有饲喂含可溶性多糖更多的低成熟度饲草, 采用粉碎、氨化、青贮等饲料加工方式等^[19,31]。

除改变日粮成分外, 还可以通过添加离子载体、皂苷、黄酮类化合物等减少产氢。离子载体是一类亲脂性的载体分子, 其作用机制是提高靶细胞膜对某些离子的通透性, 通常是促进细胞内K⁺与细胞外Na⁺和质子的交换, 迫使细胞通过消耗ATP排出胞内多余的Na⁺和质子维持离子的正常浓度梯度, 导致细胞能量储备耗尽而死亡^[58]。瘤胃中产生乙酸、丁酸的细菌大多属于革兰氏阳性菌, 对离子载体敏感, 而产丙酸的细菌大多属于革兰氏阴性菌, 因其细胞壁、细胞膜结构和转运系统的差异而对离子载体具有抗性, 离子载

体通过抑制产乙酸、丁酸菌改变瘤胃的发酵模式, 降低乙酸丙酸比, 从而抑制甲烷产生^[59]。但由于瘤胃微生物的适应性, 离子载体在长期作用下可能并不能持续抑制甲烷产生^[59,60]。并且, 离子载体属于抗生素的范畴, 在畜牧业饲料禁抗的背景下, 离子载体并不适合作为产甲烷抑制剂在生产中使用。皂苷、类黄酮作为植物次生代谢物, 同样具有抑制革兰氏阳性菌、降低乙酸丙酸比以抑制甲烷产生的作用^[31,61,62], 具有较为良好的应用前景。

3.2 与产甲烷菌竞争氢

与产甲烷菌竞争H₂的模式可分为两类, 一类是加入耗氢化合物, 经瘤胃微生物利用并消耗氢气, 另一类则是直接饲喂微生物(direct-fed microbial, DFM)的方式。

产甲烷菌竞争H₂的物质通常是还原氢受体, 如多不饱和脂肪酸可以用作还原性氢受体, 在瘤胃中经过细菌、真菌和原虫的生物氢化作用消耗氢^[34,63], 但以此途径对甲烷生成减少的贡献在补充脂质抑制甲烷生成中可能并不大^[64]。硝酸盐在瘤胃中被硝酸盐/亚硝酸盐还原菌利用氢气还原为亚硝酸盐, 随后还原为氨, 这两步反应对氢的敏感性高于CO₂, 与产甲烷菌竞争H₂的利用, 同时亚硝酸盐对产甲烷菌增殖可能有抑制作用^[65,66], 但同时也要注意补充硝酸盐剂量过高时, 反刍动物无法完全将亚硝酸盐转化而导致的中毒, 以及补充硝酸盐后会导致另一温室气体N₂O的排放增加问题^[67]。饲料中添加的硫酸盐可以被硫酸盐还原菌利用竞争H₂减少甲烷排放^[68], 同时硫酸盐的补充有助于防止硝酸盐的中毒^[31]。富马酸作为琥珀酸途径中的丙酸

前体, 通过被丙酸形成菌利用而消耗H₂减少甲烷的产生^[69]。缩合单宁通过充当还原氢受体抑制甲烷生成则作为一种假设被提出^[70]。

DFM也可称为益生菌, 已广泛用于提高动物生产力和改善健康状况^[71]。对于抑制甲烷生成而言, 同型产乙酸菌作为氢营养型产甲烷菌的竞争者, 可以利用己糖、戊糖、醇、甲酸等有机物异养生长, 也可利用CO₂、CO和H₂等无机物自养生长。虽然在热力学上, 将CO₂和H₂转化为甲烷比乙酸更有利(生成吉布斯自由能低的产物的反应在热力学上更有利, 表1), 这是直接饲喂同型产乙酸菌的局限性, 但筛选添加其有利底物、分离培育低H₂生长阈值菌株、增加同型产乙酸菌在瘤胃中密度等方法有助于拓展应用前景^[22]。酿酒酵母被认为可以促进同型产乙酸菌对氢的竞争性利用^[72], 但Darabighane等人^[73]的荟萃分析结果显示, 酿酒酵母并不能减少奶牛和肉牛的甲烷排放。补充丙酸形成菌可以提高丙酸生成中氢的利用, Vyas等人^[74]在对肉牛补充丙酸杆菌, 每千克干物质采食量的甲烷排放下降了13%, 效果上可能不如直接补充富马酸等丙酸前体物质。而乳酸菌可以产生丙烯酸酯途径的中间产物乳酸, 将乳酸菌作为丙酸形成菌的功能互补DFM在体内实验中取得了不错的甲烷减排效果^[75], 乳酸菌还可通过产生细菌素抑制产甲烷菌, 但相关的体内实验非常有限^[76]。而硝酸盐/亚硝酸盐还原菌、硫酸还原菌因其丰度低或缺乏底物, 通常是在饲料中添加其底物而非DFM的方式抑制甲烷生成^[77]。Xie等人^[78]构建了7种反刍动物的全消化道微生物基因集, 并发现352个除产甲烷菌外的耗氢微生物基因组, 这将为后续甲烷减排DFM的筛选制作提供理论支撑。

表1 甲烷生成、与产甲烷菌竞争氢和甲烷厌氧氧化反应的吉布斯自由能^[65,103,104]

Table 1 Gibbs free energy of methanogenesis, competition with methanogens for hydrogen and anaerobic oxidation of methane^[65,103,104]

反应名称	反应方程式	吉布斯自由能ΔG (kJ/mol)
甲烷生成	CO ₂ +4H ₂ →CH ₄ +2H ₂ O	-67.9
硫酸盐还原	SO ₄ ²⁻ +4H ₂ +H ⁺ →HS ⁻ +4H ₂ O	-84.4
硝酸盐还原	NO ₃ ⁻ +H ₂ →NO ₂ ⁻ +H ₂ O	-130
亚硝酸盐还原	NO ₂ ⁻ +3H ₂ +2H ⁺ →NH ₄ ⁺ +2H ₂ O	-372
同型产乙酸	2CO ₂ +4H ₂ →CH ₃ COO ⁻ +H ⁺ +2H ₂ O	-8.7
富马酸还原	富马酸+H ₂ →琥珀酸	-63.6
S-DAOM	CH ₄ +SO ₄ ²⁻ →HSO ₃ ⁻ +HS ⁻ +H ₂ O (反向产甲烷途径)	≤-16.6
N-DAOM(NO ₃ ⁻)	5CH ₄ +8NO ₃ ⁻ +8H ⁺ →5CO ₂ +4N ₂ +14H ₂ O	-765
N-DAOM(NO ₂ ⁻)	3CH ₄ +8NO ₂ ⁻ +8H ⁺ →3CO ₂ +4N ₂ +10H ₂ O	-928

4 作用于原虫的甲烷减排措施及机理

瘤胃中原虫和产甲烷菌之间存在着密切的共生关系。据估计, 与原虫共生的产甲烷菌占总产甲烷菌的10%~20%^[79], 这部分产甲烷菌生成的甲烷占甲烷生成总量的9%~25%^[80]。Eugène等人^[81]通过荟萃分析显示, 瘤胃去原虫会导致瘤胃中VFA浓度下降, 其中乙酸和丁酸的摩尔比例下降, 丙酸的摩尔比例上升, 这表示除了减少产甲烷菌数量外, 去原虫还可以通过改变瘤胃发酵模式减少甲烷的生成。同时去原虫后饲料转化效率和日增重得到提高, 去原虫动物可以更好地利用营养物质。Dai等人^[82]荟萃分析结果显示, 反刍动物甲烷排放量和瘤胃原虫总量之间存在着显著的正相关关系, 而属于全毛虫的等毛虫在甲烷生成中更为重要。因此, 去除瘤胃原虫, 尤其是等毛虫, 有助于反刍动物的甲烷减排(图2紫色方框部分)。

目前直接靶向瘤胃原虫的方法主要为使用对纤毛虫有毒性作用的化学试剂, 如琥珀磺酸二辛钠、硫酸铜、壬基酚聚氧乙烯醚、十二烷基硫酸钠等表面活性剂、过氧化钙等可以有效去除甚至完全消除瘤胃纤毛虫^[19,83], 但由于其对瘤胃其他微生物和反刍动物宿主的毒性作用, 没有一种试剂在生产中被常规化使用^[84]。而离子载体、脂质和植物次生代谢物除前文所述机理外, 还可通过抑制瘤胃纤毛虫减少甲烷生成。离子载体除了抑制革兰氏阳性菌外, 对原虫也有同样的作用^[59], Martinele等人^[85]在泌乳奶牛日粮中添加莫能菌素, 结果减少了瘤胃原虫的数量, 但等毛虫属未显著减少。并且由于耐药性等问题, 在饲料禁抗的背景下, 离子载体很难在生产上被用于甲烷减排。中链脂肪酸对原虫有抑制作用, Hristov等人在饲喂前^[86]和饲喂后^[87]向奶牛瘤胃中添加240 g/d月桂酸, 瘤胃原虫数量分别降低了80%和96%, 而多不饱和脂肪酸对瘤胃原虫数量没有显著影响^[83]。缩合单宁、皂苷、精油等植物次生代谢物都表现出不同程度抑制原虫的作用^[32]。褪黑素在降低产甲烷菌丰度的同时, 还减少了瘤胃原虫的数量, 打破了两者的共生关系^[36]。

5 甲烷减排的未来发展

5.1 噬菌体疗法

早在20世纪初, 噬菌体被发现并被提出可用于治

疗人类细菌感染^[88], 随后被逐渐用于多种细菌感染疾病, 如黑死病、霍乱等。但由于缺乏足够认知, 人们将噬菌体用于病毒性疾病而对其疗效产生怀疑, 同时随着抗生素的大规模使用, 人们对噬菌体疗法的兴趣逐渐下降, 直至抗生素耐药菌株的日益增长并成为人类健康的重大威胁, 噬菌体疗法重新被人们重视, 并被用于治疗超级细菌的感染^[89,90]。

噬菌体可分为裂解性(烈性)噬菌体和溶原性(温和)噬菌体, 裂解性噬菌体在宿主体内增殖后将菌体裂解释放子代, 而溶原性噬菌体不会裂解宿主, 甚至会起到耐药基因传递的作用。因此, 在疾病治疗中, 噬菌体疗法必须选用的是严格的裂解性噬菌体^[91]。基于噬菌体的高度特异性, 通常将多种噬菌体混合制成噬菌体鸡尾酒, 以扩大其抗菌谱进行治疗。与传统的抗生素治疗相比, 噬菌体具有高效性, 高特异性, 无明显副作用, 不受抗生素导致的细菌耐药性的限制, 自动给药(即其数量相对于靶细菌的数量增加或减少, 当靶细菌完全消灭后也没有噬菌体残留), 对其他菌群的影响较小或几乎没有, 随技术的进步可以快速且廉价生产, 可用于个性化医疗等优点^[90,91]。

在如今减抗、禁抗的畜牧业生产中, 噬菌体可作为替抗类产品, 并且噬菌体疗法已被认为是反刍动物甲烷减排的策略之一(该方法及下文所述两种未来发展方向请见图2绿色方框部分), 通过研究靶向产甲烷菌的噬菌体制剂, 以减少瘤胃中产甲烷菌的丰度, 进而减少甲烷的生成^[28]。目前关于产甲烷菌噬菌体分离培养的研究很少, Weidenbach等人^[92]从消化池污泥中分离出一种靶向甲烷八叠球菌属的裂解性病毒MetSV, 但目前未有关于其在体外瘤胃发酵系统或反刍动物体内甲烷减排作用的研究。而Gehlert等人^[93]建立了MetSV感染马氏甲烷八叠球菌(*Methanosarcina mazei*)的初步感染模型, 这进一步证明了噬菌体疗法用于瘤胃甲烷减排的可能性。Yan等人^[30]创建了全球第一个瘤胃病毒组数据库(rumen virome database, RVD), 并鉴定出可感染25个古菌属的2403个古菌噬菌体。Medvedeva等人^[94]对不同环境中产甲烷菌病毒进行了鉴定和功能注释, 这都将对未来靶向产甲烷菌噬菌体的鉴定、分离培养和相关机制研究提供有力的资源和理论框架。此外, 相较于噬菌体, 噬菌体裂解酶(内容素)具有抗菌谱更宽、与细菌接触即可消灭细菌的高效性、不易引起细菌抗性、更容易被改造等优点^[95], 同样可

以作为甲烷减排产品研发使用. Altermann等人^[96]利用基因工程使大肠杆菌生产包含反刍甲烷短杆菌噬菌体 ϕ pmru的裂解酶PeiR的纳米颗粒, 在体外实验中抑制了包括原始宿主在内的一系列反刍甲烷短杆菌菌株, 减少了高达97%的甲烷排放. 后续Altermann等人^[97]对纳米颗粒进行改进, 并在11天内使体外瘤胃发酵系统的甲烷生成量减少了15%, 但其在体内中的甲烷减排效果有待进一步研究.

仍需注意的是, 噬菌体疗法可能具有一定局限, 特别是关于反刍动物的相关研究还处于起步阶段, 因此需要关注噬菌体疗法中可能产生的问题, 比如细菌也可能对噬菌体产生耐药性, 尽管噬菌体和细菌处于共同进化的“军备竞赛”中^[98]. 目前未有报道称噬菌体疗法有明显副作用, 但也要对噬菌体作用后其他瘤胃微生物和反刍动物受何影响进行研究. 此外, 噬菌体鸡尾酒制剂在应用前安全性、稳定性和有效性需要得到验证, 不能引入毒素编码基因或抗生素抗性基因等^[90].

关于噬菌体疗法真正用于反刍动物甲烷减排还需进行大量的研究, 在这个过程中, 也可以从噬菌体用于人类疾病治疗的案例中汲取经验, 比如通过基因工程改造噬菌体, 拓宽其抗菌谱和提高其杀菌能力^[99,100]. 由于产甲烷菌严格厌氧导致产甲烷菌噬菌体的难培养性, 也可从头构建人工噬菌体, 或者寻找靶向纤毛虫等与宿主甲烷排放量呈正相关微生物的裂解性病毒.

5.2 甲烷厌氧氧化

甲烷氧化菌(methanotroph)是一类可以利用甲烷为唯一碳源和能源进行生长的兼性厌氧菌, 广泛分布于湿地、稻田、草甸、海洋、火山等各种环境中, 后也被发现存在于反刍动物瘤胃中, 但活性有限^[15,101]. 甲烷氧化菌的甲烷厌氧氧化(anaerobic oxidation of methane, AOM)已得到广泛的研究, 并被认为是减少厌氧环境中甲烷排放的有效方法^[102]. AOM可分为三种类型, 分别是硫酸盐依赖型(sulfate-dependent anaerobic methane oxidation, S-DAOM)、硝酸盐/亚硝酸盐依赖型(nitrate/nitrite-dependent anaerobic methane oxidation, N-DAOM)、金属依赖型(metaldependent anaerobic oxidation of methane, M-DAOM). 在热力学上, N-DAOM比硝酸盐/亚硝酸盐还原反应更加有利^[103,104](表1), 而S-DAOM未探明确切的机制, 在多种可能的机制中, 最先提出的反向产甲烷途径吉布斯自由能仅

为 $-16.6 \text{ kJ/mol CH}_4$ (表1), 该热力学产量对于甲烷氧化菌和硫酸盐还原菌过低, 而之后提出的多种S-DAOM机制具有更高的热力学产量^[104,105]. 因此在反刍动物日粮中添加的硝酸盐和硫酸盐还可能通过被甲烷氧化菌利用而减少甲烷的排放. Liu等人^[106]在体外实验中, 对含有瘤胃液的培养基加入硝酸盐, 最终甲烷的生成量减少, 同时NC10门细菌(参与N-DAOM的微生物)的相对比例增加, 这证明了瘤胃中很可能存在N-DAOM这种硝酸盐减少瘤胃甲烷生成的另一可能机制.

目前AOM和甲烷氧化菌在其他环境中得到了广泛的研究, 但在反刍动物中的研究和应用很少. 刘欢^[107]从奶牛粪便中分离筛选甲烷氧化菌, 制成微生态制剂并给奶牛灌服, 显著减少了瘤胃甲烷生成量, 并且该制剂对奶牛生产是安全的. 适合反刍动物的甲烷氧化菌分离筛选和作用效果需要更多的研究, 以此进一步评估将甲烷氧化菌作为反刍动物甲烷减排DFM的潜力.

5.3 瘤胃微生物组的早期调控

事实上, 反刍动物甲烷排放量与瘤胃中产甲烷菌总丰度无关, 而与产甲烷菌的群落结构有关. Wright等人^[108]研发靶向3种产甲烷菌(约占瘤胃产甲烷菌群体20%)的疫苗, 使绵羊每千克干物质采食量的甲烷排放量减少了7.7%; 后续Williams等人^[109]研发出靶向5种产甲烷菌(约占瘤胃产甲烷菌群体52%)的疫苗, 接种该疫苗的绵羊甲烷排放量却比对照组提高了18%, 16S测序和实时荧光定量PCR结果表明, 疫苗并没有显著改变处理组绵羊瘤胃产甲烷菌的总丰度, 但显著改变了产甲烷菌群落的多样性和组成. Danielsson等人^[110]对不同甲烷排放量的奶牛的瘤胃微生物组进行研究, 将产甲烷菌群划分为SGMT组和RO组, 并发现包括反刍甲烷短杆菌(*Methanobrevibacter ruminantium*)和奥氏甲烷短杆菌(*Methanobrevibacter olleyae*)在内的RO组相对丰度越高, 奶牛的甲烷排放量越低. 因此, 反刍动物的甲烷减排应更关注于某些产甲烷菌而非整体.

幼年反刍动物的瘤胃微生物组组成对成年动物的瘤胃微生物组组成有着重要影响. Furman等人^[111]对奶牛一生中驱动瘤胃微生物组组装的动力进行研究, 发现瘤胃微生物组组成与奶牛年龄和饮食有密切关系, 而奶牛出生24 h内的瘤胃微生物组成对瘤胃微生物组

装过程和奶牛成年后的瘤胃微生物组有长远的影响。因此,在反刍动物幼年时期,采用日粮调控、DFM、去原虫等方法对产甲烷菌群乃至瘤胃微生物群进行调控,将有利于减少反刍动物的甲烷排放和提高饲料转化率。与之类似的是,可以通过育种计划选育低甲烷排放的反刍动物。甲烷排放是一种可遗传性状,荷斯坦奶牛的甲烷排放遗传力为0.12~0.45,可视为中等遗传力性状^[112]。Wallace等人^[113]在荷斯坦奶牛瘤胃中鉴定出39种可遗传的核心微生物,其中一部分与宿主甲烷排放量密切相关。不过甲烷排放量和荷斯坦奶牛产奶量之间已被证实存在正相关关系(相关系数0.49~0.54)^[112],因此选育低甲烷排放反刍动物时也需要关注其生产性能是否受影响。

6 总结与展望

在全球温室效应日益严峻的背景下,反刍动物甲烷减排得到了越来越多的重视和研究,而未来生产中的甲烷减排非常可能是多种策略的综合应用,在不影响反刍动物生产和健康的前提下减少甲烷的排放量,达到最佳的组合效益。比如,Liu等人^[114]使用3-NOP和富马酸进行体外实验,两者在增强对甲烷生成的抑制

作用时缓解了氢的积累;Gruninger等人^[115]使用3-NOP和富含不饱和脂肪酸的菜籽油进行体内实验,在得到了两者对肉牛甲烷减排作用的加性组合效应的同时缓解了氢的积累。但在综合应用甲烷减排策略时需要注意在微生物机理上不能发生冲突,因此本文从反刍动物瘤胃微生物和甲烷生成机理的角度出发,总结了针对瘤胃产甲烷菌、细菌和真菌、原虫的甲烷减排机理和相应方法,希望可以为未来甲烷减排措施的综合应用提供参考。同时,本文列举了三种反刍动物甲烷减排的未来发展思路,尽管相关的研究很少或仍处于起步阶段,但相信随着未来科技水平的发展,这些方法可以联合使用在反刍动物的甲烷减排上,获得显著的协同效益,尤其是噬菌体疗法,已有足够的研究表明其在疾病治疗、食品安全、环境净化等领域中的优异性。需要注意的是,在任何一种甲烷减排措施用于实际生产前,仍需要进行大量关于减排效果和安全性等方面的研究,尤其是长期的作用效果,这是目前很多研究所不具备的,所以在这个过程中仍需开展大量的工作。相信在不远的未来,反刍动物生产中能建立起一套从幼年开始的完整甲烷减排体系,为《巴黎协定》中的1.5℃温控目标做出重要的贡献,助力构建人类绿色低碳的美好家园。

参考文献

- 1 United Nations Environment Programme. Emissions Gap Report 2023: Broken Record—Temperatures Hit New Highs, Yet World Fails to Cut Emissions (Again). Nairobi: United Nations Environment Programme, 2023
- 2 IPCC. Climate Change 2023: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Geneva: Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC), 2023
- 3 Shi F Y, Jing X P, Huang X D, et al. Research advances on enteric methane emission from ruminants in natural grazing system (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2023, 53: 916–930 [石福于, 景小平, 黄小丹, 等. 天然放牧系统反刍动物甲烷排放研究进展. 中国科学: 生命科学, 2023, 53: 916–930]
- 4 United Nations Environment Programme and Climate and Clean Air Coalition. Global Methane Assessment: Benefits and Costs of Mitigating Methane Emissions. Nairobi: United Nations Environment Programme, 2021
- 5 IPCC. Climate Change 2021—The Physical Science Basis: Working Group I Contribution to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, 2023
- 6 Crutzen P J. Photochemical reactions initiated by and influencing ozone in unpolluted tropospheric air. *Tellus*, 1974, 26: 47–57
- 7 McGurrian A, Maguire J, Tiwari B K, et al. Anti-methanogenic potential of seaweeds and seaweed-derived compounds in ruminant feed: current perspectives, risks and future prospects. *J Anim Sci Biotechnol*, 2023, 14: 145
- 8 Diao Q Y. Methane production and emission reduction measures of nutrient regulation in ruminants (in Chinese). *Anim Agric*, 2023, 1: 39–43 [刁其玉. 反刍动物甲烷生成与营养调控减排措施. 畜牧产业, 2023, 1: 39–43]
- 9 Gao J, Yang Y J, Jiang B, et al. Greenhouse gas emission characteristics and emission reduction path of animal husbandry (in Chinese). *Agric Engin*, 2023, 53: 916–930 [高娇, 杨雅静, 蒋彬, 等. 畜牧养殖业温室气体排放特征与减排路径. 农业工程, 2022, 12: 52–54]

- 10 Kumari S, Fagodiya R K, Hiloidhari M, et al. Methane production and estimation from livestock husbandry: a mechanistic understanding and emerging mitigation options. *Sci Total Environ*, 2020, 709: 136135
- 11 Mu C L, Li X, Wu H Q, et al. Gut microbiome and gastrointestinal nutrition in animals (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2023, 53: 626–636 [慕春龙, 李轩, 吴海琴, 等. 微生物群系与动物消化道营养. 中国科学: 生命科学, 2023, 53: 626–636]
- 12 Duan C H, Zhang C J, Sun Y H, et al. Recent advances on the novel methanogens (in Chinese). *Acta Microbiol Sin*, 2019, 59: 981–995 [段昌海, 张翠景, 孙艺华, 等. 新型产甲烷古菌研究进展. 微生物学报, 2019, 59: 981–995]
- 13 Ding J J, Liu F, Gu H, et al. Isolation and culture of methanogenic and methanotrophic archaea: a review (in Chinese). *Microbiol China*, 2022, 49: 2266–2280 [丁吉娟, 刘飞, 顾航, 等. 甲烷代谢古菌分离培养研究进展. 微生物学通报, 2022, 49: 2266–2280]
- 14 Janssen P H, Kirs M. Structure of the archaeal community of the rumen. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74: 3619–3625
- 15 Moissl-Eichinger C, Pausan M, Taffner J, et al. Archaea are interactive components of complex microbiomes. *Trends Microbiol*, 2018, 26: 70–85
- 16 Mizrahi I, Wallace R J, Morañs S. The rumen microbiome: balancing food security and environmental impacts. *Nat Rev Microbiol*, 2021, 19: 553–566
- 17 Wang J, Yuan J J, Liu D Y, et al. Research progresses on methanogenesis pathway and methanogens in coastal wetlands (in Chinese). *Chin J Appl Ecol*, 2016, 27: 993–1001 [王洁, 袁俊吉, 刘德燕, 等. 滨海湿地甲烷产生途径和产甲烷菌研究进展. 应用生态学报, 2016, 27: 993–1001]
- 18 Rouvière P E, Wolfé R S. Novel biochemistry of methanogenesis. *J Biol Chem*, 1988, 263: 7913–7916
- 19 Sun J, Zhao G, Li M M. Using nutritional strategies to mitigate ruminal methane emissions from ruminants. *Front Agr Sci Eng*, 2023, 0: 0
- 20 Borrel G, Parisot N, Harris H M, et al. Comparative genomics highlights the unique biology of *Methanomassiliicoccales*, a *Thermoplasmatales*-related seventh order of methanogenic archaea that encodes pyrrolysine. *BMC Genomics*, 2014, 15: 679
- 21 Lai Z L, Huang G F, Bai L P. Advances of structure, function, and catalytic mechanism of methyl-coenzyme M reductase (in Chinese). *Chin J Biotechnol*, 2021, 37: 4147–4157 [赖贞丽, 黄钢锋, 白丽萍. 甲基-辅酶M还原酶结构、功能及催化机制研究进展. 生物工程学报, 2021, 37: 4147–4157]
- 22 Janssen P H. Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics. *Anim Feed Sci Tech*, 2010, 160: 1–22
- 23 Lan W, Yang C. Ruminal methane production: Associated microorganisms and the potential of applying hydrogen-utilizing bacteria for mitigation. *Sci Total Environ*, 2019, 654: 1270–1283
- 24 Li K N, Du H D, Shi B L, et al. Colonization process and early regulation of rumen microorganisms in young ruminants (in Chinese). *Chin J Anim Nutr*, 2022, 34: 3418–3426 [李科南, 杜海东, 史彬林, 等. 幼龄反刍动物瘤胃微生物的定植过程及早期调控. 动物营养学报, 2022, 34: 3418–3426]
- 25 Hu W L, Lv J M, Zhai S W, et al. Effect of ciliates on methanogens and methane production in rumen (in Chinese). *Chin J Anim Sci*, 2004: 43–46 [胡伟莲, 吕建敏, 翟少伟, 等. 瘤胃纤毛虫对甲烷菌和甲烷产量的影响. 中国畜牧杂志, 2004: 43–46]
- 26 Lee S S, Ha J K, Cheng K J. Relative contributions of bacteria, protozoa, and fungi to *in vitro* degradation of orchard grass cell walls and their interactions. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66: 3807–3813
- 27 Gruninger R J, Puniya A K, Callaghan T M, et al. Anaerobic fungi (phylum Neocallimastigomycota): advances in understanding their taxonomy, life cycle, ecology, role and biotechnological potential. *FEMS Microbiol Ecol*, 2014, 90: 1–17
- 28 Lobo R R, Faciola A P. Ruminal phages—a review. *Front Microbiol*, 2021, 12: 763416
- 29 Solden L M, Naas A E, Roux S, et al. Interspecies cross-feeding orchestrates carbon degradation in the rumen ecosystem. *Nat Microbiol*, 2018, 3: 1274–1284
- 30 Yan M, Pratama A A, Somasundaram S, et al. Interrogating the viral dark matter of the rumen ecosystem with a global virome database. *Nat Commun*, 2023, 14: 5254
- 31 Arndt C, Hristov A N, Price W J, et al. Full adoption of the most effective strategies to mitigate methane emissions by ruminants can help meet the 1.5 °C target by 2030 but not 2050. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2022, 119: e2111294119
- 32 Ku-Vera J C, Jiménez-Ocampo R, Valencia-Salazar S S, et al. Role of secondary plant metabolites on enteric methane mitigation in ruminants. *Front Vet Sci*, 2020, 7: 584
- 33 Aboagye I A, Oba M, Koenig K M, et al. Use of gallic acid and hydrolyzable tannins to reduce methane emission and nitrogen excretion in beef

- cattle fed a diet containing alfalfa silage^{1,2}. *J Anim Sci*, 2019, 97: 2230–2244
- 34 Patra A K, Yu Z. Effects of essential oils on methane production and fermentation by, and abundance and diversity of, rumen microbial populations. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78: 4271–4280
 - 35 Patra A K. The effect of dietary fats on methane emissions, and its other effects on digestibility, rumen fermentation and lactation performance in cattle: a meta-analysis. *Livest Sci*, 2013, 155: 244–254
 - 36 Fu Y, Yao S, Wang T, et al. Effects of melatonin on rumen microorganisms and methane production in dairy cow: results from *in vitro* and *in vivo* studies. *Microbiome*, 2023, 11: 196
 - 37 Ermler U, Grabarse W, Shima S, et al. Crystal structure of methyl-coenzyme M reductase: the key enzyme of biological methane formation. *Science*, 1997, 278: 1457–1462
 - 38 Thauer R K. Methyl (Alkyl)-coenzyme M reductases: nickel F-430-containing enzymes involved in anaerobic methane formation and in anaerobic oxidation of methane or of short chain alkanes. *Biochemistry*, 2019, 58: 5198–5220
 - 39 Duin E C, Wagner T, Shima S, et al. Mode of action uncovered for the specific reduction of methane emissions from ruminants by the small molecule 3-nitrooxypropanol. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: 6172–6177
 - 40 Hristov A N, Oh J, Giallongo F, et al. An inhibitor persistently decreased enteric methane emission from dairy cows with no negative effect on milk production. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 10663–10668
 - 41 Martinez-Fernandez G, Duval S, Kindermann M, et al. 3-NOP vs. halogenated compound: methane production, ruminal fermentation and microbial community response in forage fed cattle. *Front Microbiol*, 2018, 9: 1582
 - 42 Dijkstra J, Bannink A, France J, et al. Short communication: Antimethanogenic effects of 3-nitrooxypropanol depend on supplementation dose, dietary fiber content, and cattle type. *J Dairy Sci*, 2018, 101: 9041–9047
 - 43 Melgar A, Welter K C, Nedelkov K, et al. Dose-response effect of 3-nitrooxypropanol on enteric methane emissions in dairy cows. *J Dairy Sci*, 2020, 103: 6145–6156
 - 44 Kung L, Smith K A, Smagala A M, et al. Effects of 9,10 anthraquinone on ruminal fermentation, total-tract digestion, and blood metabolite concentrations in sheep¹. *J Anim Sci*, 2003, 81: 323–328
 - 45 Immig I, Demeyer D, Fiedler D, et al. Attempts to induce reductive acetogenesis into a sheep rumen. *Archiv für Tierernährung*, 1996, 49: 363–370
 - 46 Patra A, Park T, Kim M, et al. Rumen methanogens and mitigation of methane emission by anti-methanogenic compounds and substances. *J Anim Sci Biotechnol*, 2017, 8: 13
 - 47 Patra A K, Puchala R. Methane mitigation in ruminants with structural analogues and other chemical compounds targeting archaeal methanogenesis pathways. *Biotechnol Adv*, 2023, 69: 108268
 - 48 Machado L, Magnusson M, Paul N A, et al. Effects of marine and freshwater macroalgae on *in vitro* total gas and methane production. *PLoS One*, 2014, 9: e85289
 - 49 Li X, Norman H C, Kinley R D, et al. *Asparagopsis taxiformis* decreases enteric methane production from sheep. *Anim Prod Sci*, 2018, 58: 681
 - 50 Kinley R D, Martinez-Fernandez G, Matthews M K, et al. Mitigating the carbon footprint and improving productivity of ruminant livestock agriculture using a red seaweed. *J Clean Prod*, 2020, 259: 120836
 - 51 Stefenoni H A, Räisänen S E, Cueva S F, et al. Effects of the macroalga *Asparagopsis taxiformis* and oregano leaves on methane emission, rumen fermentation, and lactational performance of dairy cows. *J Dairy Sci*, 2021, 104: 4157–4173
 - 52 Muizelaar W, Groot M, van Duinkerken G, et al. Safety and transfer study: transfer of bromoform present in *Asparagopsis taxiformis* to milk and urine of lactating dairy cows. *Foods*, 2021, 10: 584
 - 53 Ungerfeld E M, Rust S R, Boone D R, et al. Effects of several inhibitors on pure cultures of ruminal methanogens. *J Appl Microbiol*, 2004, 97: 520–526
 - 54 Faseleh Jahromi M, Liang J B, Mohamad R, et al. Lovastatin-enriched rice straw enhances biomass quality and suppresses ruminal methanogenesis. *Biomed Res Int*, 2013, 2013: 1–13
 - 55 Jeyanathan J, Martin C, Morgavi D P. The use of direct-fed microbials for mitigation of ruminant methane emissions: a review. *Animal*, 2014, 8: 250–261
 - 56 Hammond K J, Jones A K, Humphries D J, et al. Effects of diet forage source and neutral detergent fiber content on milk production of dairy cattle and methane emissions determined using GreenFeed and respiration chamber techniques. *J Dairy Sci*, 2016, 99: 7904–7917

- 57 Li Q S, Wang R, Ma Z Y, et al. Dietary selection of metabolically distinct microorganisms drives hydrogen metabolism in ruminants. *ISME J*, 2022, 16: 2535–2546
- 58 Russell J B, Strobel H J. Effect of ionophores on ruminal fermentation. *Appl Environ Microbiol*, 1989, 55: 1–6
- 59 Tedeschi L O, Fox D G, Tylutki T P. Potential environmental benefits of ionophores in ruminant diets. *J Env Qual*, 2003, 32: 1591–1602
- 60 Melchior E A, Hales K E, Lindholm-Perry A K, et al. The effects of feeding monensin on rumen microbial communities and methanogenesis in bred heifers fed in a drylot. *Livest Sci*, 2018, 212: 131–136
- 61 Zhou Y Y, Mao H L, Jiang F, et al. Inhibition of rumen methanogenesis by tea saponins with reference to fermentation pattern and microbial communities in Hu sheep. *Anim Feed Sci Tech*, 2011, 166–167: 93–100
- 62 Ma T, Chen D, Tu Y, et al. Dietary supplementation with mulberry leaf flavonoids inhibits methanogenesis in sheep. *Anim Sci J*, 2017, 88: 72–78
- 63 Zhao X W, Wang J Q, Bu D P, et al. Advances in ruminant biohydrogenation of unsaturated fatty acids (in Chinese). *Acta Agric Boreali-Sin*, 2010, 25: 53–58 [赵小伟, 王加启, 卜登攀, 等. 瘤胃中不饱和脂肪酸生物氢化的研究进展. *华北农学报*, 2010, 25: 53–58]
- 64 Beauchemin K A, McGinn S M, Benchaar C, et al. Crushed sunflower, flax, or canola seeds in lactating dairy cow diets: effects on methane production, rumen fermentation, and milk production. *J Dairy Sci*, 2009, 92: 2118–2127
- 65 Feng X Y, Dijkstra J, Bannink A, et al. Antimethanogenic effects of nitrate supplementation in cattle: a meta-analysis. *J Dairy Sci*, 2020, 103: 11375–11385
- 66 Beauchemin K A, Ungerfeld E M, Eckard R J, et al. Review: fifty years of research on rumen methanogenesis: lessons learned and future challenges for mitigation. *Animal*, 2020, 14: s2–s16
- 67 Petersen S O, Hellwing A L F, Brask M, et al. Dietary nitrate for methane mitigation leads to nitrous oxide emissions from dairy cows. *J Environ Qual*, 2015, 44: 1063–1070
- 68 Wu H, Meng Q, Yu Z. Effect of pH buffering capacity and sources of dietary sulfur on rumen fermentation, sulfide production, methane production, sulfate reducing bacteria, and total Archaea in *in vitro* rumen cultures. *Bioresour Tech*, 2015, 186: 25–33
- 69 Li Z, Liu N, Cao Y, et al. Effects of fumaric acid supplementation on methane production and rumen fermentation in goats fed diets varying in forage and concentrate particle size. *J Anim Sci Biotechnol*, 2018, 9: 21
- 70 Naumann H D, Tedeschi L O, Zeller W E, et al. The role of condensed tannins in ruminant animal production: advances, limitations and future directions. *R Bras Zootec*, 2017, 46: 929–949
- 71 Han X B, Yuan X N, Fang J, et al. Role of lactic acid bacteria in maintaining animal intestinal health (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2023, 53: 464–479 [韩雪冰, 元香南, 方俊, 等. 乳酸菌维持动物肠道健康的研究进展. *中国科学: 生命科学*, 2023, 53: 464–479]
- 72 Chaucheyras-Durand F, Walker N D, Bach A. Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: past, present and future. *Anim Feed Sci Tech*, 2008, 145: 5–26
- 73 Darabighane B, Salem A Z M, Mirzaei Aghjehgheshlagh F, et al. Environmental efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* on methane production in dairy and beef cattle via a meta-analysis. *Environ Sci Pollut Res*, 2019, 26: 3651–3658
- 74 Vyas D, McGeough E J, McGinn S M, et al. Effect of *Propionibacterium* spp. on ruminal fermentation, nutrient digestibility, and methane emissions in beef heifers fed a high-forage diet. *J Anim Sci*, 2014, 92: 2192–2201
- 75 Philippeau C, Lettat A, Martin C, et al. Effects of bacterial direct-fed microbials on ruminal characteristics, methane emission, and milk fatty acid composition in cows fed high- or low-starch diets. *J Dairy Sci*, 2017, 100: 2637–2650
- 76 Doyle N, Mbandiwa P, Kelly W J, et al. Use of lactic acid bacteria to reduce methane production in ruminants, a critical review. *Front Microbiol*, 2019, 10: 2207
- 77 Zhang H Y, Zhou J J, Zhang C J, et al. Interspecies electron transfer during microbial syntrophic methanogenesis (in Chinese). *Acta Microbiol Sin*, 2023, 63: 2047–2065 [张瀚云, 周瑾洁, 张翠景, 等. 微生物互营产甲烷过程中的种间电子传递. *微生物学报*, 2023, 63: 2047–2065]
- 78 Xie F, Jin W, Si H, et al. An integrated gene catalog and over 10,000 metagenome-assembled genomes from the gastrointestinal microbiome of ruminants. *Microbiome*, 2021, 9: 137
- 79 Stumm C K, Gijzen H J, Vogels G D. Association of methanogenic bacteria with ovine rumen ciliates. *Br J Nutr*, 1982, 47: 95–99
- 80 Newbold C J, Lassalas B, Jouany J P. The importance of methanogens associated with ciliate protozoa in ruminal methane production *in vitro*. *Lett Appl Microbiol*, 1995, 21: 230–234
- 81 Eugène M, Archimède H, Sauvant D. Quantitative meta-analysis on the effects of defaunation of the rumen on growth, intake and digestion in

- ruminants. *Livestock Prod Sci*, 2004, 85: 81–97
- 82 Dai X, Kalscheur K F, Huhtanen P, et al. Effects of ruminal protozoa on methane emissions in ruminants—a meta-analysis. *J Dairy Sci*, 2022, 105: 7482–7491
- 83 Tan C. Effects of tea seed saponin on the community composition of microorganism and methanogenesis in rumen of beef cattle (in Chinese). Dissertation for Doctoral Degree. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2016 [谭翠. 茶皂素调控肉牛瘤胃微生物菌群结构及甲烷生成的研究. 博士学位论文. 雅安: 四川农业大学, 2016]
- 84 Islam M, Lee S S. Advanced estimation and mitigation strategies: a cumulative approach to enteric methane abatement from ruminants. *J Anim Sci Technol*, 2019, 61: 122–137
- 85 Martinele I, Eifert E C, Lana R P, et al. Effect of monensin and soybean oil on rumen ciliate protozoa and correlation between protozoa with ruminal fermentation and digestive parameters. *Rev Bras Zootecn*, 2008, 37: 1129–1136
- 86 Hristov A N, Vander Pol M, Agle M, et al. Effect of lauric acid and coconut oil on ruminal fermentation, digestion, ammonia losses from manure, and milk fatty acid composition in lactating cows. *J Dairy Sci*, 2009, 92: 5561–5582
- 87 Hristov A N, Lee C, Cassidy T, et al. Effects of lauric and myristic acids on ruminal fermentation, production, and milk fatty acid composition in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*, 2011, 94: 382–395
- 88 D'Herelle F. On an invisible microbe antagonistic toward dysenteric bacilli: brief note by Mr. F. D'Herelle, presented by Mr. Roux. *Res Microbiol*, 2007, 158: 553–554
- 89 Jin Y, Li W, Zhang H, et al. The post-antibiotic era: a new dawn for bacteriophages. *Biology*, 2023, 12: 681
- 90 Jones J D, Varghese D, Pabary R, et al. The potential of bacteriophage therapy in the treatment of paediatric respiratory infections. *Paediatr Respir Rev*, 2022, 44: 70–77
- 91 Zalewska-Piątek B. Phage therapy—challenges, opportunities and future prospects. *Pharmaceuticals*, 2023, 16: 1638
- 92 Weidenbach K, Nickel L, Neve H, et al. Methanosarcina spherical virus, a novel archaeal lytic virus targeting Methanosarcina strains. *J Virol*, 2017, 91: e00955-17
- 93 Gehlert F O, Sauerwein T, Weidenbach K, et al. Dual-RNAseq analysis unravels virus-host interactions of MetSV and *Methanosarcina mazei*. *Viruses*, 2022, 14: 2585
- 94 Medvedeva S, Borrel G, Krupovic M, et al. A compendium of viruses from methanogenic archaea reveals their diversity and adaptations to the gut environment. *Nat Microbiol*, 2023, 8: 2170–2182
- 95 Abdelrahman F, Easwaran M, Daramola O I, et al. Phage-encoded endolysins. *Antibiotics*, 2021, 10: 124
- 96 Altermann E, Schofield L R, Ronimus R S, et al. Inhibition of rumen methanogens by a novel archaeal lytic enzyme displayed on tailored bionanoparticles. *Front Microbiol*, 2018, 9: 2378
- 97 Altermann E, Reilly K, Young W, et al. Tailored nanoparticles with the potential to reduce ruminant methane emissions. *Front Microbiol*, 2022, 13: 816695
- 98 Koskella B, Brockhurst M A. Bacteria-phage coevolution as a driver of ecological and evolutionary processes in microbial communities. *FEMS Microbiol Rev*, 2014, 38: 916–931
- 99 Mahichi F, Synnott A J, Yamamichi K, et al. Site-specific recombination of T2 phage using IP008 long tail fiber genes provides a targeted method for expanding host range while retaining lytic activity. *FEMS Microbiol Lett*, 2009, 295: 211–217
- 100 Chen Y, Batra H, Dong J, et al. Genetic engineering of bacteriophages against infectious diseases. *Front Microbiol*, 2019, 10: 954
- 101 Valdés C, Newbold C J, Hillman K, et al. Evidence for methane oxidation in rumen fluid *in vitro*. *Anim Res*, 1996, 45: 351
- 102 Li L, Xue S, Xi J. Anaerobic oxidation of methane coupled to sulfate reduction: consortium characteristics and application in co-removal of H₂S and methane. *J Environ Sci*, 2019, 76: 238–248
- 103 Caldwell S L, Laidler J R, Brewer E A, et al. Anaerobic oxidation of methane: mechanisms, bioenergetics, and the ecology of associated microorganisms. *Environ Sci Technol*, 2008, 42: 6791–6799
- 104 Cui M, Ma A, Qi H, et al. Anaerobic oxidation of methane: an “active” microbial process. *MicrobiologyOpen*, 2015, 4: 1–11
- 105 Hatzikioseyan A, Bhattarai S, Cassarini C, et al. Dynamic modeling of anaerobic methane oxidation coupled to sulfate reduction: role of elemental sulfur as intermediate. *Bioproc Biosyst Eng*, 2021, 44: 855–874
- 106 Liu L, Xu X, Cao Y, et al. Nitrate decreases methane production also by increasing methane oxidation through stimulating NC10 population in ruminal culture. *AMB Expr*, 2017, 7: 76

- 107 Liu H. Isolation and identification of methanotrophs and the effect of viable preparations on the methane emissions in the rumen (in Chinese). Dissertation for Master's Degree. Changchun: Jilin University, 2016 [刘欢. 甲烷氧化菌的分离与鉴定及其活菌制剂对奶牛瘤胃内甲烷排放量的影响. 硕士学位论文. 长春: 吉林大学, 2016]
- 108 Wright A, Kennedy P, O'Neill C J, et al. Reducing methane emissions in sheep by immunization against rumen methanogens. [Vaccine](#), 2004, 22: 3976–3985
- 109 Williams Y J, Popovski S, Rea S M, et al. A vaccine against rumen methanogens can alter the composition of archaeal populations. [Appl Environ Microbiol](#), 2009, 75: 1860–1866
- 110 Danielsson R, Dicksved J, Sun L, et al. Methane production in dairy cows correlates with rumen methanogenic and bacterial community structure. [Front Microbiol](#), 2017, 8: 226
- 111 Furman O, Shenhav L, Sasson G, et al. Stochasticity constrained by deterministic effects of diet and age drive rumen microbiome assembly dynamics. [Nat Commun](#), 2020, 11: 1904
- 112 Breider I S, Wall E, Garnsworthy P C. Short communication: heritability of methane production and genetic correlations with milk yield and body weight in Holstein-Friesian dairy cows. [J Dairy Sci](#), 2019, 102: 7277–7281
- 113 Wallace R J, Sasson G, Garnsworthy P C, et al. A heritable subset of the core rumen microbiome dictates dairy cow productivity and emissions. [Sci Adv](#), 2019, 5: eaav8391
- 114 Liu Z, Wang K, Nan X, et al. Synergistic effects of 3-nitrooxypropanol with fumarate in the regulation of propionate formation and methanogenesis in dairy cows *in vitro*. [Appl Environ Microbiol](#), 2022, 88: e01908-21
- 115 Gruninger R J, Zhang X M, Smith M L, et al. Application of 3-nitrooxypropanol and canola oil to mitigate enteric methane emissions of beef cattle results in distinctly different effects on the rumen microbial community. [Anim Microbiome](#), 2022, 4: 35

Microbial regulatory pathways of methane emission reduction in the rumen of ruminants

CHEN Liang, TANG YiFan, CHEN HongYi, LIU JianXin & SUN HuiZeng*

Institute of Dairy Science, College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

* Corresponding author; E-mail: huiheng@zju.edu.cn

The large amount of greenhouse gas emissions produced by human activities is an important cause of global warming. As the second largest greenhouse gas in the atmosphere, methane emissions seriously affect human health, ecosystem and food security. Low-carbon emission reduction is a common goal of the world. Methane emissions from ruminants, more than 90% of which comes from the rumen, contribute about 17% of total methane emissions worldwide. Rumen methanogenesis in ruminants is the result of direct process of microorganisms, and its methane emission reduction methods have been extensively studied. However, the specific mechanism of methane emission reduction strategies is still unclear, which prevents the development of effective and precise approaches. Therefore, from the perspective of rumen microorganisms and methanogenesis mechanism, this paper summarizes the existing methane emission reduction mechanisms and corresponding methods for different rumen microbiota, including reducing the abundance of methanogens or inhibiting methanogenic pathway, reducing hydrogen production or competing for hydrogen by acting on rumen bacteria and fungi, and indirectly affecting methanogens by defaunation. At the same time, this paper proposes three future development directions of methane reduction in ruminants, including phage therapy, anaerobic oxidation of methane, and early regulation of the rumen microbiome, aiming to provide reference for the effective design and comprehensive application of ruminant methane emission reduction measures in the future.

methane emission reduction, rumen microbes, ruminants

doi: [10.1360/SSV-2024-0024](https://doi.org/10.1360/SSV-2024-0024)



孙会增, 浙江大学“百人计划”研究员, 博士生导师, 动物科技系副主任. 2022年获得浙江省科学技术厅“杰出青年科学基金项目”资助, 2023年获得国家自然科学基金委“优秀青年科学基金项目”资助. 主要从事反刍动物营养和消化道微生物组研究, 发表系列研究性论文50余篇, 近3年作为通讯作者在*Nature Microbiology*, *Microbiome*, *Journal of Advanced Research*等高影响力期刊上发表文章. 担任*Microbiome*, *Animal Microbiome*期刊编委, *iMeta*期刊青年编委, *Animal Nutriomics*期刊编辑部副主任. 荣获第七届“井冈新秀”“颐和”青年创新奖、杨胜营养科技创新奖、动物营养学会青年学者讲坛优胜奖等奖励荣誉.