



Het potentieel van bomen, struiken en kruiden voor methaanreductie bij biologische herkauwers

Auteurs: Jan Valckx, Joni Van Mullem, Jeyamalar Jeyanathan, Joran Barbry, Wim Govaerts, Veerle Fievez

Inhoud

Inleiding	2
<i>In vitro</i> fermentatie	3
Resultaten brede screening.....	4
Methaanreductie door soorten uit productief kruidenrijk grasland?	8
Het aandeel in het rantsoen bepaalt het methaaneffect.....	10
Seizoenale verschillen	11
Effect van inkuilen op methaanreductiepotentieel.....	15
Werkingsmechanismes ontrafeld?	17
Conclusies.....	20
Partners en financiering	21
Contact	21

Inleiding

In Vlaanderen is de landbouwsector verantwoordelijk voor ongeveer 10% van de uitstoot van alle broeikasgassen. Daarvan gebeurt de helft onder vorm van methaan, die nagenoeg volledig toe te schrijven is aan de veeteelt. Het zijn vooral de herkauwers, en met name het fermentatieproces in de pens, die zorgen voor zogenaamde enterische emissies van methaan.

Methaan is een sterk broeikasgas met een opwarmingspotentieel van 28 keer dat van CO₂. Het verminderen van de uitstoot van enterische methaan door herkauwers is van strategisch belang om de wereldwijde temperatuurstijging te beperken tot 1,5 °C in 2050.

De Vlaamse Overheid en diverse partners uit de brede agrovoedingsketen ondertekenden daarom het Convenant Enterische Emissies Rundvee. Gezamenlijk engageren ze zich om in de periode 2021-2030 de enterische emissies te verminderen met 19% ten opzichte van 2005.

De gangbare rundveesector zet naast andere methaanmitigerende strategieën (dier- en veestapelmanagement, genetica) sterk in op aangepaste rantsoenen en voederadditieven om methaan te reduceren. Ze kunnen daarvoor beroep doen op een ecoregeling (geëxtrudeerd lijnzaad, 3-NOP, nitraat, of bepaalde combinaties).

Biologische veehouders stoten in hun parallelle zoektocht naar klimaatmitigerende voederstrategieën op een aantal obstakels binnen een holistische systeembenadering kenmerkend voor de biologische landbouw.

Sommige bewezen methaanreducerende maatregelen voldoen immers niet aan de wettelijke normen voor biologische landbouw (nitraat, 3-NOP, geëxtrudeerd lijnzaad), andere druisen in tegen de biologische principes (groter aandeel zetmeelrijk krachtvoer, geëxtrudeerd lijnzaad, koolzaadvet en bierdraf in een ruim snijmaïsrantsoen, kunstmest voederen aan een herkauwer met bovendien potentiële gezondheidsrisico's) of ze botsen op praktische bezwaren, bijvoorbeeld het niet of niet voldoende beschikbaar zijn van de biologische variant van bepaalde voedermiddelen (bv. bierdraf).

Binnen het project 'Biomora – naar een biologisch verantwoord methaanonderdrukkend rantsoen' (2022-2024) gingen we daarom op zoek naar methaanreducerende middelen of strategieën die passen binnen de wettelijke, landbouwkundige, en ideologische kaders waarbinnen de biologische veehouderij opereert, en die idealiter op meerdere vlakken systemisch doorwerken (bv. ammoniakreductie, koolstofvastlegging ten velde,...).

Uit voorbereidend onderzoek van de projectpartners en de literatuur kwam naar voor dat bepaalde kruiden, struik- en boomsoorten methaaninhiberend kunnen werken op pensniveau door toedoen van plant secundaire metabolieten (bv. tannines). Het Biomora-project had tot doel deze veelbelovende gewassen verder te identificeren, hun methaanreducerend effect op pensniveau te begroten, en de werkingsmechanismen bloot te leggen.

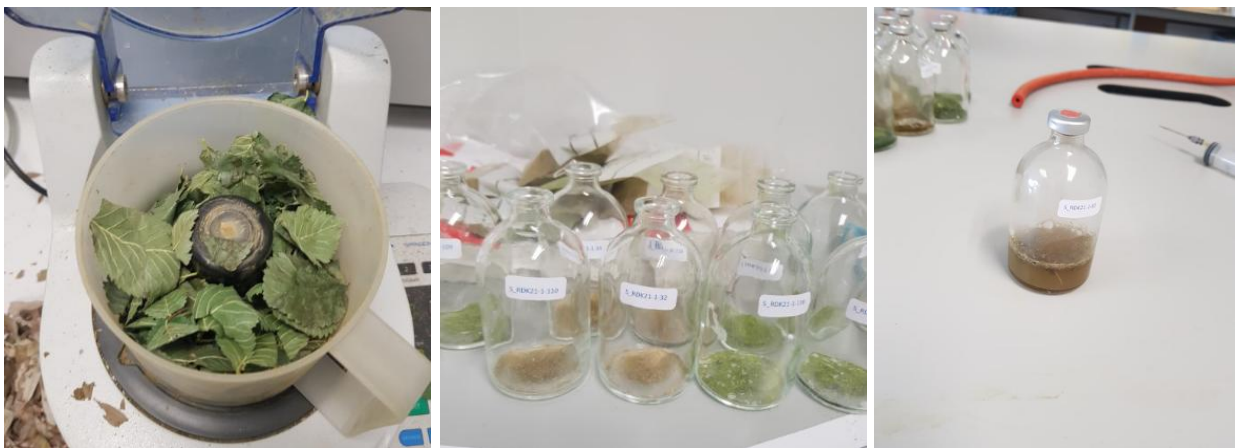
In vitro fermentatie

Metingen van de *in vitro* microbiële fermentatie laten relatief eenvoudig toe om het methaanonderdrukkend potentieel van een breed scala aan plantensoorten te onderzoeken en met elkaar te vergelijken. Ideaal voor een verkennend onderzoek dus.

Een afgemeten hoeveelheid plantenmateriaal werd daartoe in flacons gebracht waarin de omstandigheden van de pens zo goed mogelijk werden benaderd, zoals temperatuur, pH van het pensvocht, en gassamenstelling (100% CO₂) (Figuur 1). Het pensvocht van levende koeien werd toegevoegd. Na 24u incuberen van de flacons werden de geproduceerde fermentatiegassen afgetapt en via massaspectrometrie op naam gebracht en gekwantificeerd. Zowel methaan (CH₄) als de vluchtige vetzuren (VVZ) werden in beeld gebracht.

Plantensoorten die aanleiding geven tot de grootste relatieve methaaninhibitie (berekend op basis van de verhouding methaanproductie t.o.v. totale vluchtige vetzuurproductie). Vermindering van de methaanproductie kan immers ook resulteren uit verminderde fermenteerbaarheid van het plantenmateriaal, wat niet wenselijk is voor de productiviteit van dieren.

Een controlemengsel van 65% Engels raaigras en 35% witte klaver (op basis van droge stof (DS)) werd steeds mee geïncubeerd als referentie. Het methaanreducerend effect van een bepaalde ruwvoedercomponent werd steeds bekeken ten opzichte van dit controlemengsel.



Figuur 1 Illustratie van de *in vitro* set-up met het afwegen van gevriesdroogd plantenmateriaal, het vullen van de incubatieflacons, en het resultaat na 24u incubatie.

In een eerste brede screening werden 45 plantensoorten getest op hun methaaninhiberend vermogen. Het ging om 29 soorten bomen, struiken of klimplanten en 16 kruidachtige soorten. Daarnaast werden nog 9 courante soorten gras en klaver van productief kruidenrijk grasland meegenomen in de screening. Deze soorten werden geselecteerd op basis van hun methaanonderdrukkend potentieel zoals beschreven in de literatuur (indien gekend), voorbereidend onderzoek van de projectpartners, (potentiële) beschikbaarheid en toepasbaarheid in een Vlaamse context, en input vanuit de begeleidingsgroep.

Plantenmateriaal werd op 3 verschillende locaties in Vlaanderen geoogst. Deze 3 locaties vertegenwoordigen de lichte, middelmatige en zware gronden. Bij houtachtige soorten werden enkel bladeren, twijgen en eventueel bloeiwijzen geoogst die in het jaar van oogst nieuw aangegroeid waren, en zich tussen 1 en 2 m hoogte boven het maaiveld bevonden (binnen het browsebereik van een rund). Na het oogsten werden de stalen onmiddellijk gevriesdroogd en bewaard.

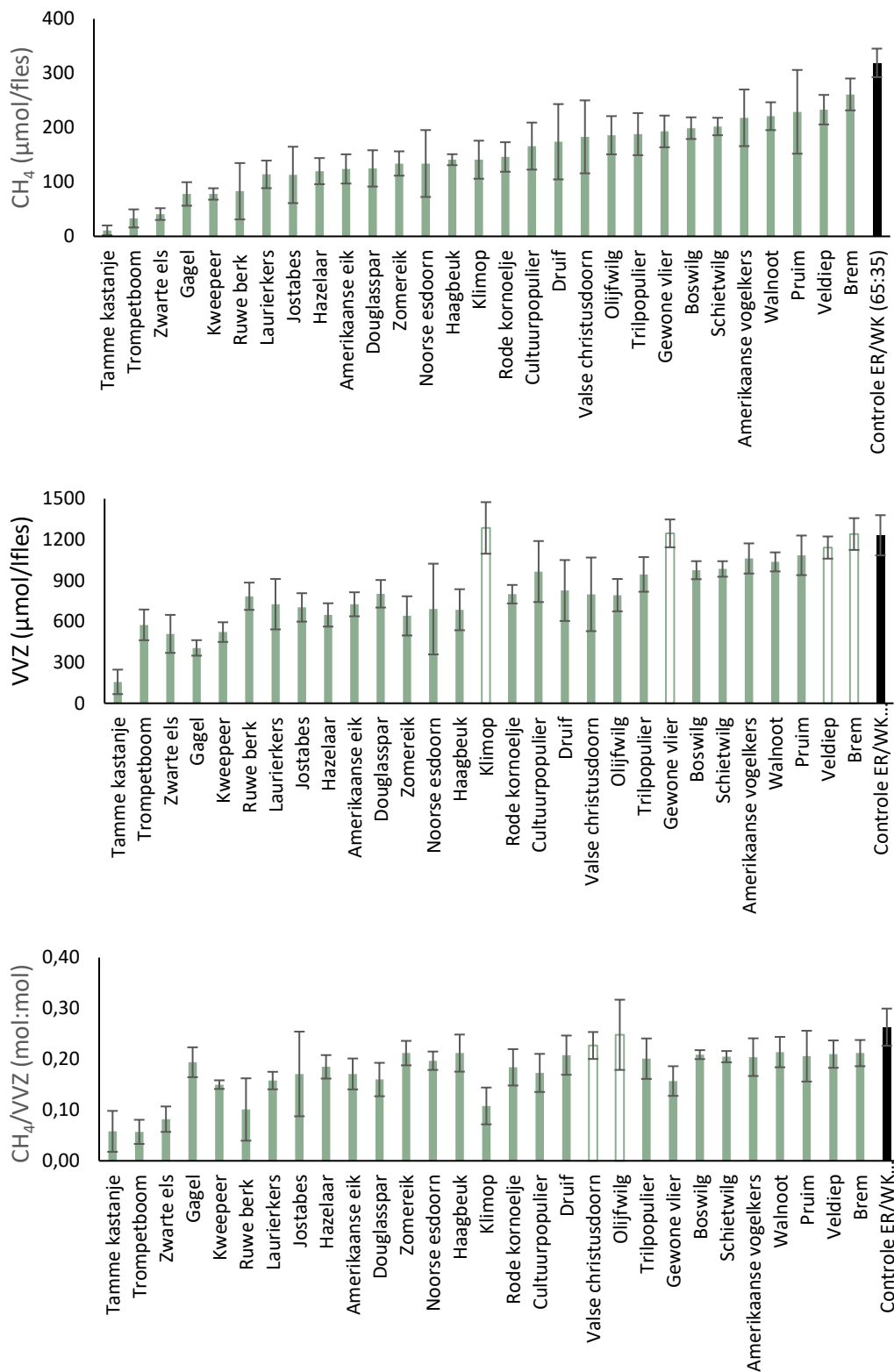
Resultaten brede screening

Voor de brede screening werd het plantmateriaal geogst rond Sint-Jan (langste dag) in 2022.

Het valt op dat alle houtige soorten een lagere absolute methaanproductie laten optekenen dan het controlemengsel van Engels raigras en witte klaver (*Figuur 2*, boven). Tamme kastanje (-97%), trompetboom (-90%) en zwarte els (-87%) onderdrukken de methaanproductie het sterkst. Hekkensluiter Brem onderdrukt de methaanproductie nog steeds met 18%.

Klimop, gewone vlier, veldiep en brem produceren evenveel vluchtige vetzuren als het controlemengsel (*Figuur 2*, midden), wat wijst op een vergelijkbare fermenteerbaarheid van deze soorten ten opzichte van grasklaver. De overige houtige soorten vertonen een lagere productie van vluchtige vetzuren dan het controlemengsel. Dit kan erop wijzen dat het methaaninhiberende effect zoals hierboven beschreven (deels) gerelateerd kan zijn aan een verminderde fermentatie en dus een verlaagde productie van vluchtige vetzuren. Tamme kastanje spant de kroon op dat vlak en laat een reductie van de vluchtige vetzuurproductie zien van -87%.

Wanneer we beide bovenstaande variabelen ten opzichte van elkaar uitdrukken (de relatieve methaanproductie of CH_4/VVZ) (*Figuur 2*, onder), stellen we vast dat alle houtige soorten uitgezonderd olijfwilg en valse christusdoorn methaan onderdrukken ten opzichte van het controlemengsel. Ook hier vertonen tamme kastanje, trompetboom, en zwarte els het sterkste methaaninhiberend vermogen.



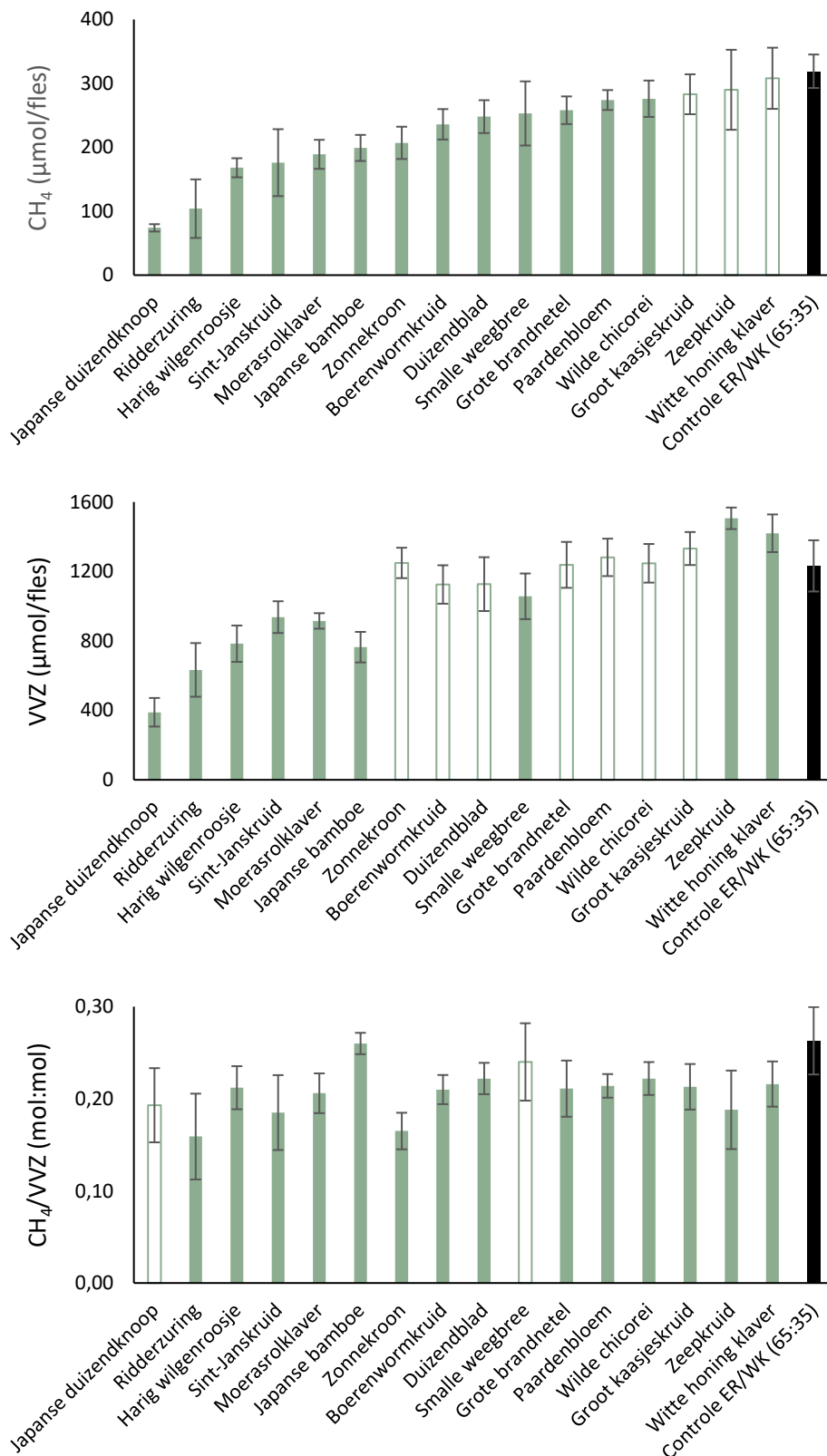
Figuur 2

Absolute methaanproductie (CH₄) (boven), totale vluchtige vetzuurproductie (VVZ) (midden) en relatieve methaanproductie (CH₄/VVZ) (onder) van 29 houtachtige plantensoorten (bomen, struiken, klimplanten) ten opzichte van een controlemengsel van Engels raaigras (65%) en witte klaver (35%) (ER/WK) op basis van in vitro incubaties (24u, 100% CO₂, 100% dosis). De foutenbalken geven de standaarddeviaties van de gemiddeldes weer. Soorten aangeduid met gekleurde balken verschillen significant ($P \leq 0,05$) van het controlemengsel; soorten met witte balken verschillen niet significant ($P > 0,05$) van het controlemengsel.

Ook de geteste kruidachtige soorten zijn in staat om de methaanproductie af te remmen (uitgezonderd groot kaasjeskruid, zeepkruid en witte honingklaver) (Figuur 3, boven). Het aantal soorten en de reductiepercentages liggen evenwel vaak lager dan bij de hierboven besproken houtige soorten (range tussen -77% en -13% (kruidachtigen) en -97% en -18% (houtachtigen)).

Zeepkruid en witte honingklaver produceren meer vluchtige vetzuren dan het grasklaver controlemengsel (Figuur 3, midden). Dit wijst op een hogere mate van fermenteerbaarheid dan grasklaver. Zonnekroon, boerenwormkruid, duizendblad, grote brandnetel, paardenbloem, wilde chicorei en groot kaasjeskruid vertonen daartegen een lagere fermenteerbaarheidsgraad dan het controlemengsel.

De sterkste reductie van de relatieve methaanproductie is te vinden bij ridderzuring (-39%), zonnekroon (-37%), Sint-Janskruid (-30%), zeepkruid (-28%) en Japanse duizendknoop (-27%) (Figuur 3, onder). Japanse bamboe en smalle weegbree verschillen niet van het controlemengsel wat betreft relatieve methaanproductie.



Figuur 3 Absolute methaanproductie (CH₄) (boven), totale vluchtige vetzuurproductie (VVZ) (midden) en relatieve methaanproductie (CH₄/VVZ) (onder) van 16 kruidachtige plantensoorten ten opzichte van een controlemengsel van Engels raaigras (65%) en witte klaver (35%) (ER/WK) op basis van in vitro incubaties (24u, 100% CO₂, 100% dosis). De foutenbalken geven de standaarddeviaties van de gemiddeldes weer. Soorten aangeduid met gekleurde balken verschillen significant ($P < 0,05$) van het controlemengsel; soorten met witte balken verschillen niet significant ($P > 0,05$) van het controlemengsel.

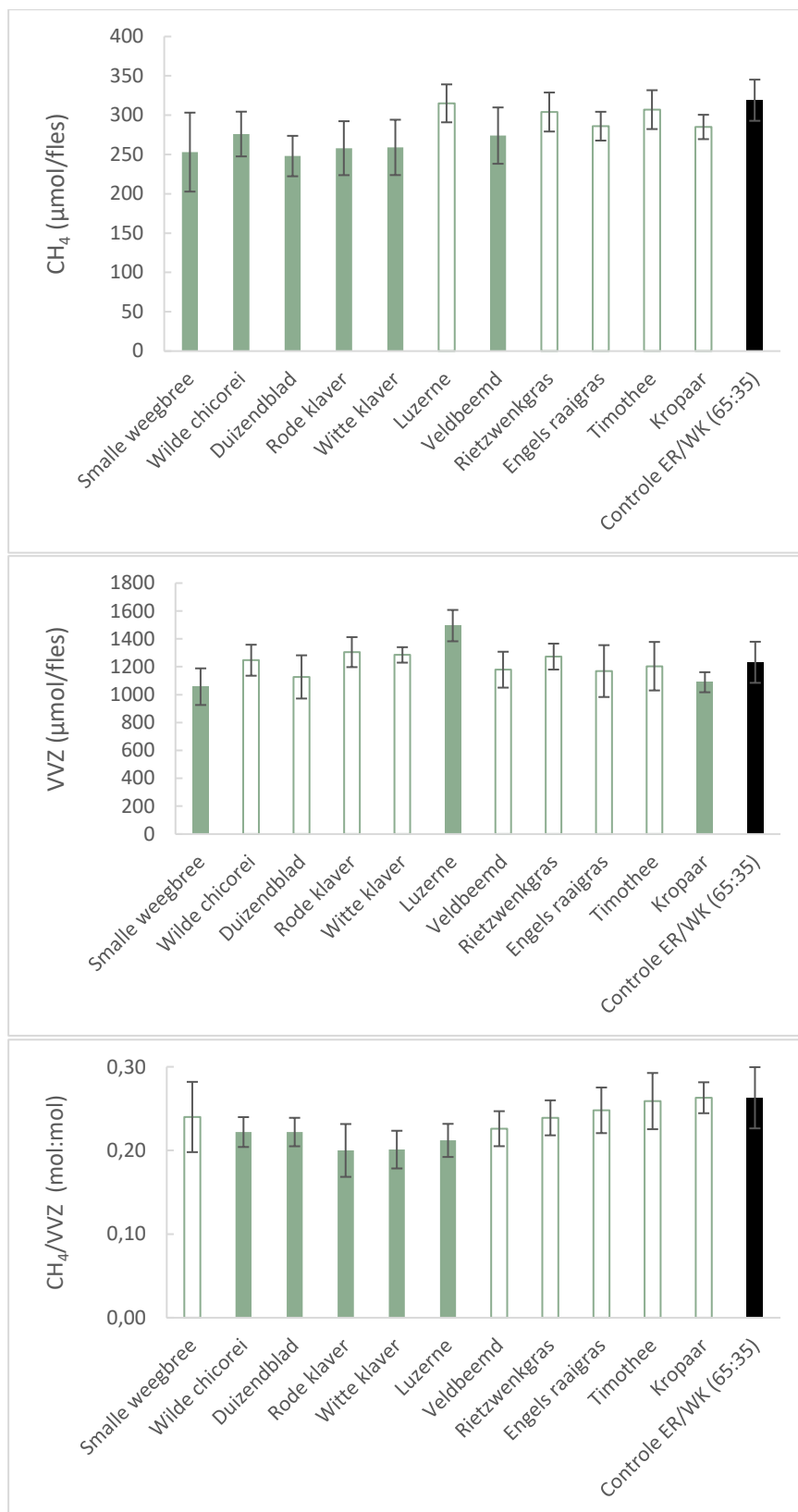
Methaanreductie door soorten uit productief kruidenrijk grasland?

We namen ook de methaaninhiberende werking van enkele veel voorkomende grassoorten, vlinderbloemigen en kruiden onder de loep die courant in mengsels worden gebruikt voor productief kruidenrijk grasland (Figuur 4). We bekeken enkel de individuele soorten, niet een mengsel ervan (we testten wel enkele alternatieve praktijkrelevante mengsels op hun methaanonderdrukkende eigenschappen).

Van de grassen vertoont enkel veldbeemd een lagere absolute methaanproductie in vergelijking met het controlemengsel van Engels raaigras en witte klaver (in een 65:35 verhouding) (Figuur 4, boven). Onder de vlinderbloemigen onderdrukken zowel rode als witte klaver de absolute methaanproductie, maar luzerne doet dit niet. Evenmin doen de kruiden smalle weegbree, wilde chicorei en duizendblad dit.

Smalle weegbree en kropaar produceren minder vluchtige vetzuren dan het controlemengsel (Figuur 4, midden). Luzerne daarentegen vertoont een sterke fermenteerbaarheid en scoort dus hoog op vlak van vluchtige vetzuurproductie.

Wanneer we de productie van methaan en vluchtige vetzuren gezamenlijk bekijken, dan zien we dat de geteste vlinderbloemigen de relatieve methaanproductie doen dalen (rode klaver (-24%), witte klaver (-24%), luzerne (-19%)), evenals de kruiden wilde chicorei (-15%) en duizendblad (-15%) (Figuur 4, onder). De geteste grassen vertonen geen verlaagde relatieve methaanproductie.



Figuur 4 Absolute methaanproductie (CH₄) (boven), totale vluchtige vetzuurproductie (VVZ) (midden) en relatieve methaanproductie (CH₄/VVZ) (onder) van 11 kruidachtige plantensoorten die vaak voorkomen in mengsels van productief kruidenrijk grasland ten opzichte van een controlemengsel van Engels raaigras (65%) en witte klaver (35%) (ER/WK) op basis van in vitro incubaties (24u, 100% CO₂, 100% dosis). De foutenbalken geven de standaarddeviaties van de gemiddeldes weer. Soorten aangeduid met gekleurde balken verschillen significant (P ≤ 0,05) van het controlemengsel; soorten met witte balken verschillen niet significant (P > 0,05) van het controlemengsel.

Het aandeel in het rantsoen bepaalt het methaaneffect

Bovenstaande resultaten zijn op basis van *in vitro* incubaties van 100% zuiver materiaal van de geteste plantensoorten. Vertaald naar de praktijk zou dit willen zeggen dat een rantsoen voor 100% uit 1 welbepaalde plantensoort zou bestaan. Dit is natuurlijk niet realistisch en bovendien valt te verwachten dat het methaanreducerende effect afhangt van het aandeel van deze of gene plantensoort in het rantsoen. Daarom werden ook zogenaamde dosis-respons incubaties uitgevoerd.

Van de origineel 45 geteste plantensoorten selecteerden we de 20 meest beloftevolle zowel op basis van literatuur als de resultaten van het eerste experiment (+ ook rekening houdend met de praktische mogelijkheden van de planten). Het gaat om 12 houtachtige en 8 kruidachtige soorten. Uit voorgaande weten we dat sommige plantensoorten de productie van vluchtige vetzuren sterk kunnen onderdrukken (en hiermee ook de methaanproductie). Dit is een minder wenselijke eigenschap, omdat hiermee ook de productiviteit van de dieren in het gedrang kan komen. Daarom kozen we ervoor om soorten die voor een daling van 25% of meer van de vluchtige vetzuurproductie zorgen, slechts in geringe mate in te mengen in een mengsel met Engels raaigras-witte klaver. Het gaat om de houtachtige soorten tamme kastanje, trompetboom, zwarte els, hazelaar, kweepeer, gagel, jostabes en framboos en ridderzuring ten slotte als kruidachtige soort. We kozen voor deze soorten voor inmengpercentages van 2,5%, 5%, 7,5% en 10%. De rest van het testmengsel bestond uit materiaal van het controlemengsel (Engels raaigras – witte klaver in een verhouding van 65:35 op basis van DS) (respectievelijk 97,5%, 95%, 92,5% en 90%). Soorten die de vluchtige vetzuurproductie slechts in geringe mate (< 25%) verlaagden, werden ingemengd aan hogere percentages: 10%, 20%, 30% en 40%. Het ging om de houtige soorten klimop, cultuurpopulier, brem en gewone vlier en de kruidachtige soorten sint-janskruid, witte honingklaver, zeepkruid, zonnekroon, paardenbloem, wilde chicorei en smalle weegbree.

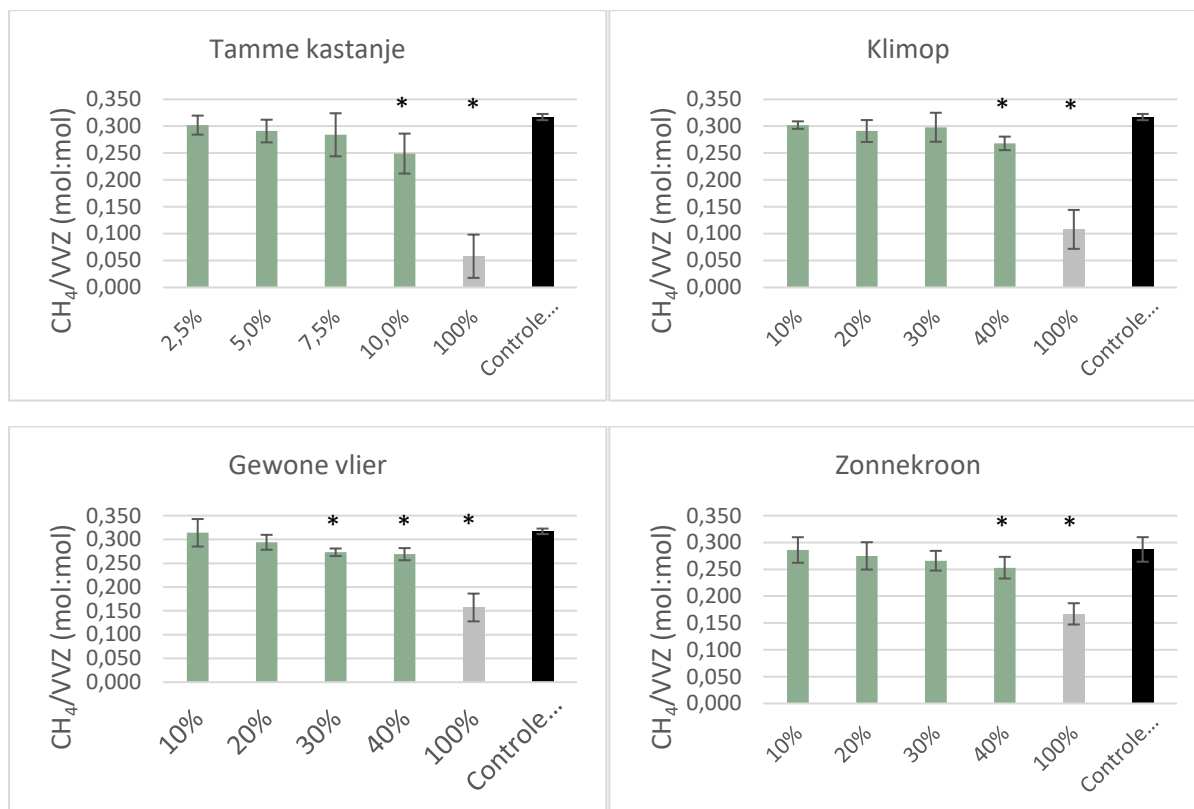
Van de 20 soorten waarvan een dosis-respons werd getest, bleken er maar een viertal een significante reductie van methaan als effect te hebben:

Een grasklavermengsel met 10% tamme kastanje onderdrukt de relatieve methaanproductie met 21,5% ten opzichte van het standaard controlemengsel met 100% grasklaver (Figuur 5). Lagere inmengpercentages van tamme kastanje (7,5% - 5% - 2,5%) vertonen lagere reductiepercentages maar deze zijn niet significant.

Grasklaver met 40% klimop verlaagt de relatieve methaanproductie met 15,5% ten opzichte van 100% grasklaver. Lagere dosissen (30% - 20% - 10%) geven geen significante resultaten.

In het geval van gewone vlier is een minimum aandeel van 30% in een grasklavermengsel nodig om een daling van 13,9% van de relatieve methaanproductie te bewerkstelligen. Het aandeel optrekken tot 40% geeft een sterkere reductie van methaan van 15,1%, terwijl aandelen van 10-20% in het mengsel geen significante invloed hebben op de methaanproductie.

Zonnekroon is de enige kruidachtige soort die bij een dosering van 40% in een grasklavermengsel de methaanproductie met 11,8% naar beneden haalt. Lager doseringen vertonen ook hier geen effect meer.



Figuur 5 Dosis-respons resultaten uitgedrukt als relatieve methaanproductie (CH_4/VVZ) van tamme kastanje (links boven), klimop (rechts boven), gewone vlier (links onder) en zonnekroon (rechts onder) bij verschillende inmengpercentages van de geteste soort in een standaard controlemengsel (Engels raagrass – witte klaver in een verhouding van 65:35 op basis van DS) op basis van in vitro incubaties (24u, 100% CO_2). De foutenbalken geven de standaarddeviaties van de gemiddeldes weer. Ter referentie geeft de lichtgrijze balk de relatieve methaanproductie bij een dosis van 100% van de geteste soort. Inmengpercentages aangeduid met een asterisk verschillen significant ($P \leq 0,05$) van het controlemengsel.

Seizoenale verschillen

We waren ook benieuwd of en hoe het methaanreducerend effect van de plantensoorten fluctueerde doorheen een gans groeiseizoen.

Daarom werden er in 2023 stalen verzameld van de 20 meest beloftevolle soorten (cfr. dosis-respons testen hierboven) op 3 oogstmomenten in het jaar: half mei (voorjaar), half juli (zomer) en half september (najaar). Ook het grasklaver controlemengsel (65% Engels raagrass en 35% witte klaver (op DS basis)) werd op deze 3 momenten in het seizoen geoogst, en als referentie telkens meegenomen in de incubaties.

Absolute methaanproductie

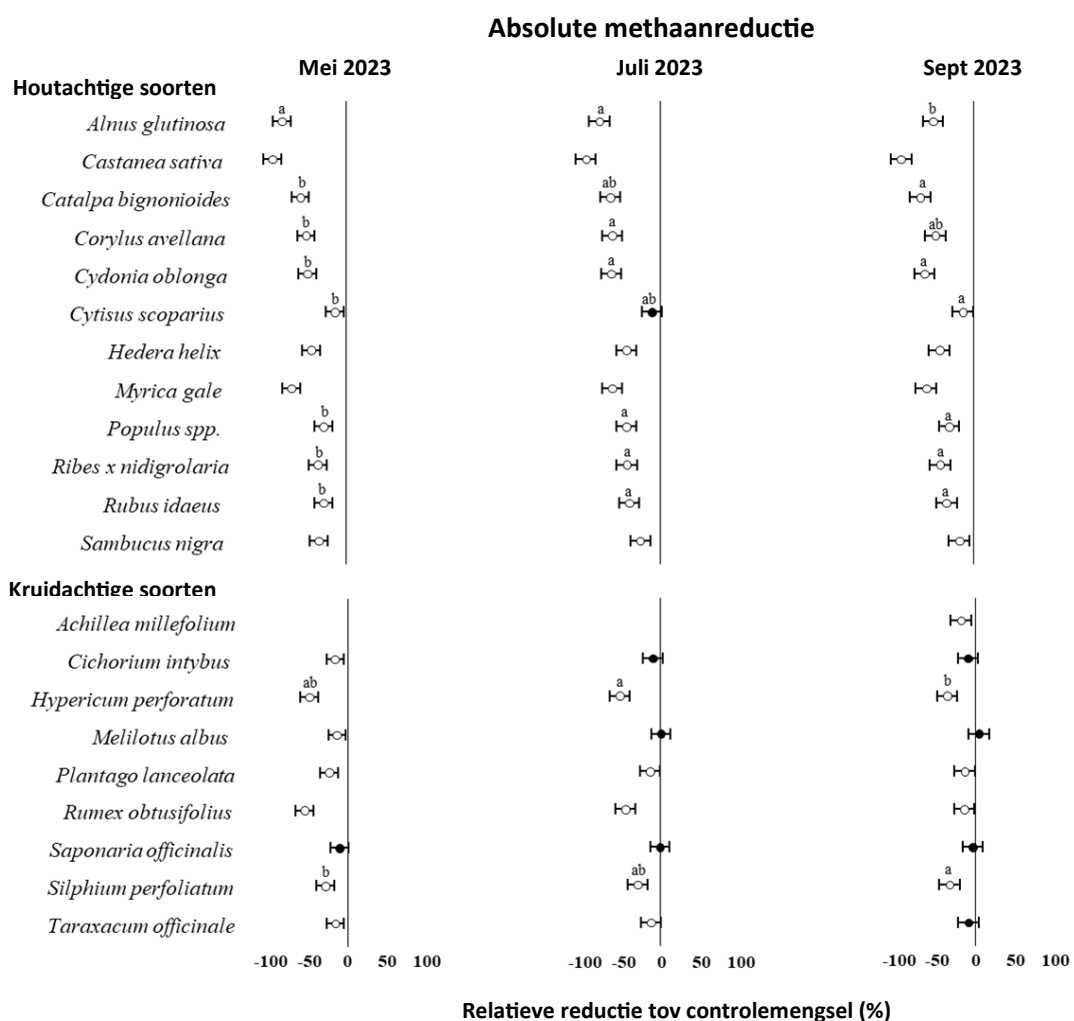
Absolute CH_4 -emissies ($\mu\text{mol/g DM}$) (Figuur 6) werden significant ($P < 0,01$) beïnvloed door plantensoort, oogstmoment en de interactie tussen beide. Het oogstmoment had dus in het algemeen invloed op de absolute CH_4 -productie, maar het effect hing af van de plantensoort.

Houtachtige soorten die uitblonden in consequentie over de seizoenen zijn tamme kastanje (*Castanea sativa*), klimop (*Hedera helix*), gagel (*Myrica gale*) en gewone vlier (*Sambucus nigra*). Bij de kruidachtigen gaat het om smalle weegbree (*Plantago lanceolata*) en ridderzuring (*Rumex*

obtusifolius) die een even sterke reductie in absolute methaanproductie laten optekenen in alle seizoenen ten opzichte van grasklaver.

Brem (*Cytisus scoparius*) werkte minder krachtig in de zomer om methaan te reduceren. Wilde chicorei (*Cichorium intybus*) en witte honingklaver (*Melilotus albus*) reduceerden de absolute methaanproductie in het voorjaar, en paardenbloem (*Taraxacum officinale*) zowel in het voorjaar als de zomer. In het najaar verliezen deze drie soorten echter hun methaanreducerend vermogen. Zeepkruid (*Saponaria officinalis*) was op geen enkel oogstmoment in staat de methaanproductie te beïnvloeden.

In het algemeen slagen de houtige soorten er beter in de absolute methaanproductie te reduceren naarmate het groeiseizoen vordert. De kruidachtige soorten lijken deze trend minder te volgen, uitgezonderd zonnekroon (*Silphium perfoliatum*).



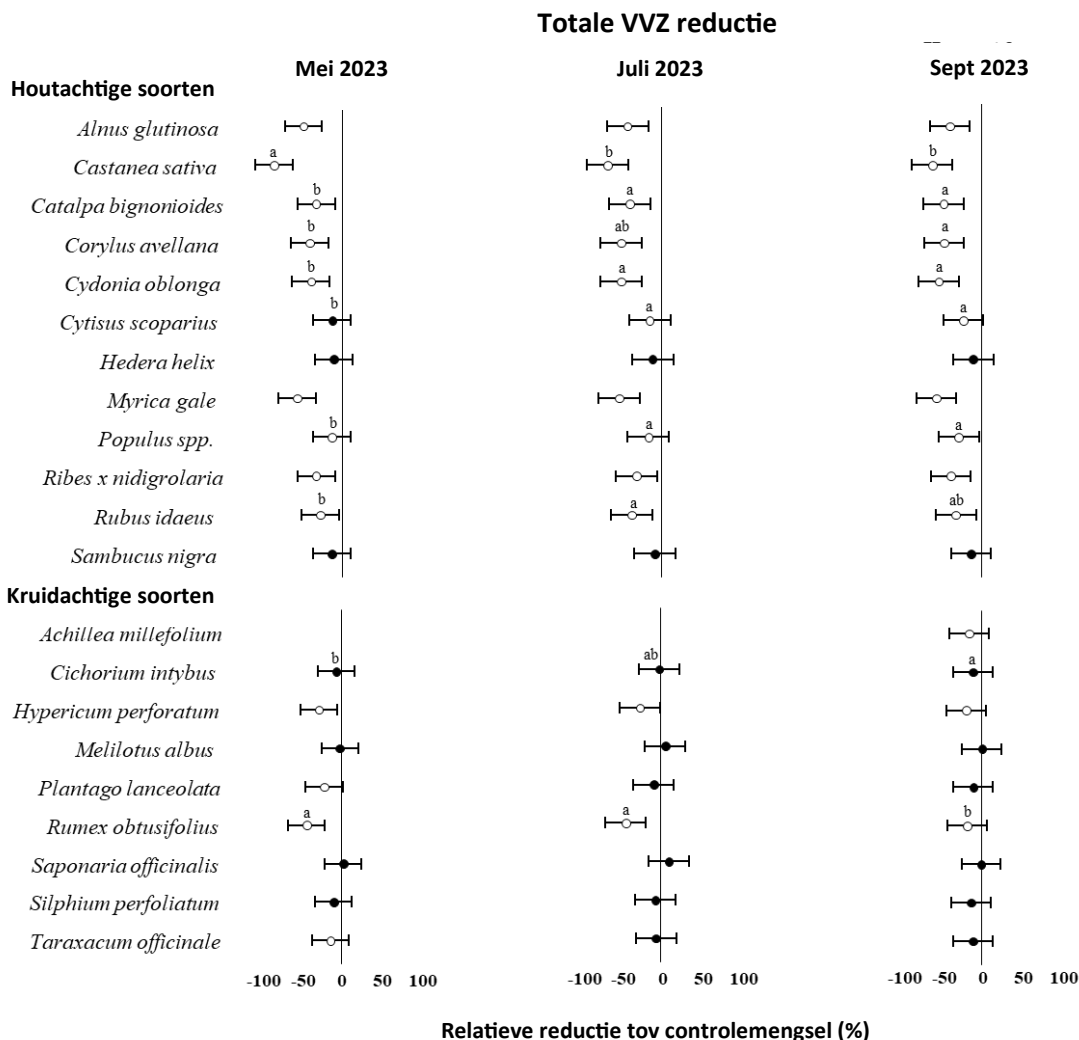
Figuur 6 Absolute methaanreductie ten opzichte van het controlemengsel (mengsel van 65% *Lolium perenne* (Engels raai gras) en 35% *Trifolium repens* (witte klaver) op verschillende oogstmomenten (mei 2023, juli 2023, september 2023). De verticale lijn stelt een reductie van 0% of geen effect voor. Plantensoorten aangeduid met o verschillen significant ($P \leq 0,05$) van het controlemengsel. Plantensoorten aangeduid met ● verschillen niet significant ($P > 0,05$) van het controlemengsel. Verschillen tussen plantensoorten en het controlemengsel zijn gebaseerd op een Dunnett's post-hoc test. a, b: duidt significante verschillen ($P \leq 0,05$) aan tussen oogstmomenten binnen een plantensoort gebaseerd op een Tukey post-hoc test. De getoonde waarden zijn de relatieve reducties van de 'least square means' en hun 95% betrouwbaarheidsintervallen.

Totale vluchtige vetzuurproductie

De totale vluchtige vetzuurproductie ($\mu\text{mol/g DS}$) werd beïnvloed door de plantensoort ($P < 0,01$), het oogstmoment ($P < 0,05$) en de interactie tussen beide ($P < 0,01$) (Figuur 7).

Klimop (*Hedera helix*) en gewone vlier (*Sambucus nigra*) zijn de twee houtachtige plantensoorten die geen vermindering van de totale vluchtige vetzuurproductie vertoonden over de drie oogstmomenten. Bij de kruidachtige soorten gaat het om wilde chicorei (*Cichorium intybus*), witte honingklaver (*Melilotus albus*), zeepkruid (*Saponaria officinalis*) en zonnekroon (*Silphium perfoliatum*). Ze vertonen dus alle een vergelijkbare fermenteerbaarheid als grasklaver een heel groeiseizoen lang.

Brem (*Cytisus scoparius*) had geen lagere totale VVZ-productie dan grasklaver in het voorjaar, maar wel in de zomer en het najaar. Paardenbloem (*Taraxacum officinale*) en smalle weegbree (*Plantago lanceolata*) hadden net het omgekeerde effect: ze hadden een lagere totale VVZ-productie in het voorjaar, maar een vergelijkbare VVZ-productie in zomer en najaar als grasklaver.



Figuur 7 Reductie van de totale vluchtige vetzuurproductie ten opzichte van het controlemengsel (mengsel van 65% *Lolium perenne* (Engels raai gras) en 35% *Trifolium repens* (witte klaver) op verschillende oogstmomenten (mei 2023, juli 2023, september 2023). De verticale lijn stelt een reductie van 0% of geen effect voor. Plantensoorten aangeduid met o verschillen significant ($P \leq 0,05$) van het controlemengsel. Plantensoorten aangeduid met ● verschillen niet significant ($P > 0,05$) van het controlemengsel. Verschillen tussen plantensoorten en het controlemengsel zijn gebaseerd op een Dunnet's post-hoc test. a, b: duidt significante verschillen ($P \leq 0,05$) aan tussen oogstmomenten binnen een plantensoort gebaseerd op een Tukey post-hoc test. De getoonde waarden zijn de 'least square means' en hun 95% betrouwbaarheidsintervallen.

Relatieve methaanproductie

De relatieve CH₄-productie (mol/mol) werd over het algemeen beïnvloed door de plantensoort en de interactie tussen de plantensoort en het oogstmoment, maar niet door het oogstmoment op zich (Figuur 8).

Negen van de 12 houtachtige plantensoorten verminderden de relatieve CH₄-productie op ten minste 1 oogstmoment.

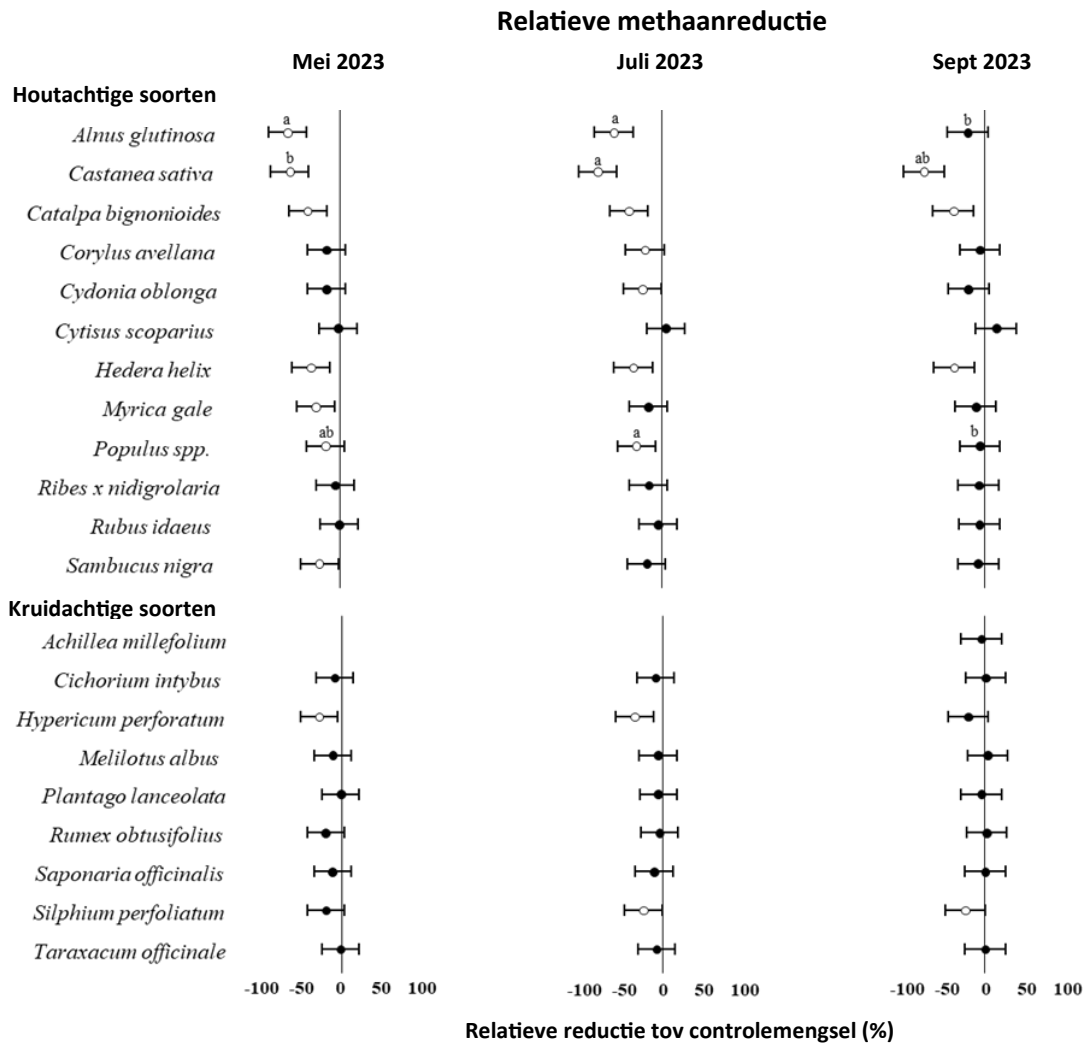
Trompetboom (*Catalpa bignonioides*) en klimop (*Hedera helix*) waren de toppers: ze waren een heel groeiseizoen consequent methaanonderdrukkend.

Brem (*Cytisus scoparius*), jostabes (*Ribes x nidigrolaria*) en framboos (*Rubus idaeus*) daarentegen onderdrukten op geen enkel oogstmoment de relatieve methaanproductie, terwijl deze 3 houtachtige soorten wel een verschil vertoonden met grasklaver in termen van absolute CH₄-productie (met uitzondering van *Cytisus scoparius* in de zomer). In deze 3 gevallen was de methaanreductie dus voornamelijk het gevolg van een verminderde fermenteerbaarheid ten opzichte van grasklaver.

De overige houtachtige plantensoorten hadden specifieke momenten in het seizoen waarin ze hun methaanreducerend vermogen konden uitspelen. Zwarte els (*Alnus glutinosa*) en populier (*Populus spp.*) reduceerden methaan in het voorjaar en de zomer, maar niet in het najaar. Hazelaar (*Corylus avellana*) en kweepeer (*Cydonia oblonga*) kwamen enkel in de zomer uit de verf. Gagel (*Myrica gale*) en gewone vlier (*Sambucus nigra*) waren enkel in het voorjaar in staat om de relatieve methaanproductie te doen dalen ten opzichte van grasklaver.

Twee van de 9 kruidachtige plantensoorten vertoonden een vermindering van de relatieve CH₄-productie. Sint-Janskruid (*Hypericum perforatum*) was op zijn sterkst in voorjaar en zomer om de relatieve methaanproductie te remmen, zonnekroon (*Silphium perfoliatum*) in zomer en najaar.

De overige kruidachtige plantensoorten verschilden niet van het grasklaver controlemengsel.



Figuur 8 Relatieve methaanreductie ten opzichte van het controlemengsel (mengsel van 65% *Lolium perenne* (Engels raaigras) en 35% *Trifolium repens* (witte klaver) op verschillende oogstmomenten (mei 2023, juli 2023, september 2023). De verticale lijn stelt een reductie van 0% of geen effect voor. Plantensoorten aangeduid met o verschillen significant ($P \leq 0,05$) van het controlemengsel. Plantensoorten aangeduid met ● verschillen niet significant ($P > 0,05$) van het controlemengsel. Verschillen tussen plantensoorten en het controlemengsel zijn gebaseerd op een Dunnet's post-hoc test. a, b: duidt significante verschillen ($P \leq 0,05$) aan tussen oogstmomenten binnen een plantensoort gebaseerd op een Tukey post-hoc test. De getoonde waarden zijn de relatieve reducties van de 'least square means' en hun 95% betrouwbaarheidsintervallen.

Effect van inkuilen op methaanreductiepotentieel

De resultaten tot nu toe zijn steeds gebaseerd op 'vers' plantenmateriaal. Vers in die zin dat het materiaal onmiddellijk na oogst vers werd gevriesdroogd voor later gebruik in de incubaties. Om het effect van inkuilen op de methaanreductie na te gaan, werd een deel van het vers geogste materiaal ook ingekuild in microkuiltjes. Na het inkuilproces werd het ingekuilde materiaal eveneens gevriesdroogd voor verder gebruik in de incubaties.

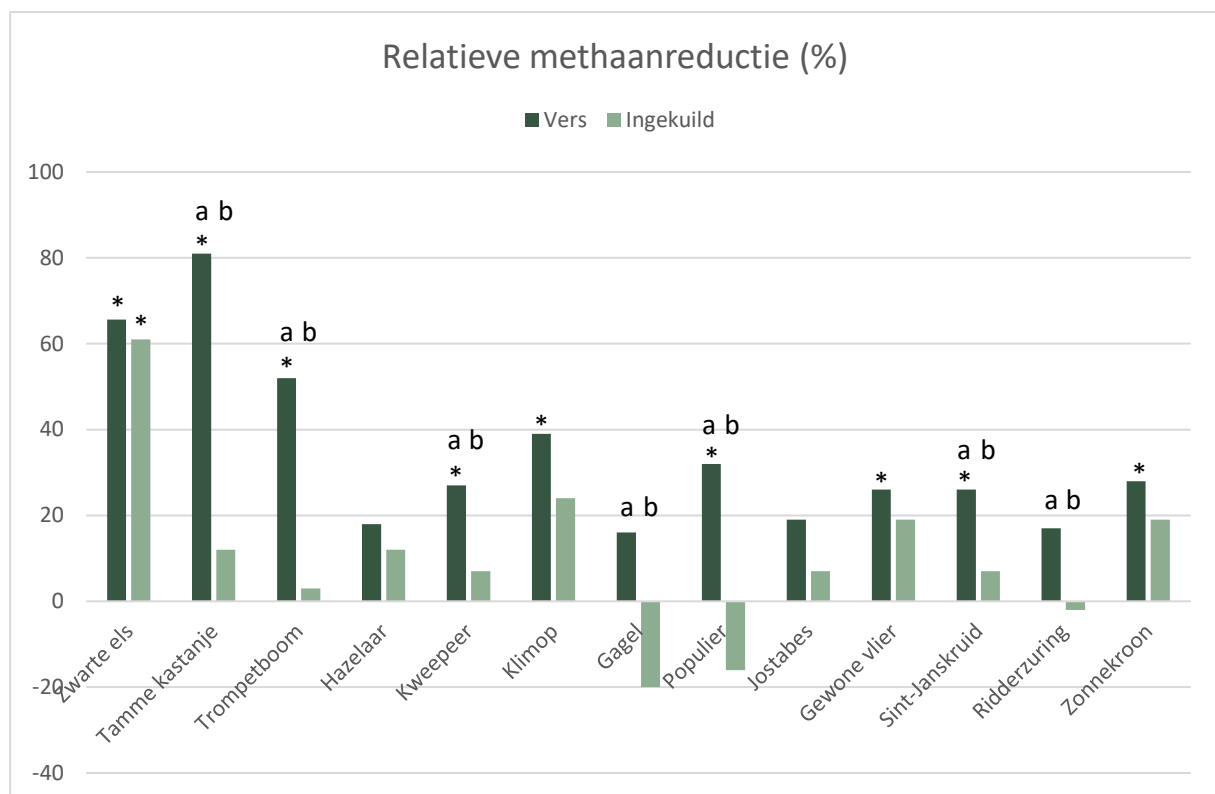
Wanneer we zowel vers als ingekuild materiaal testen op methaaninhiberend vermogen, stellen we een algemene tendens vast dat inkuilen het methaanonderdrukkend potentieel verlaagt (Figuur 9).

Eerst en vooral vertoont het controlemengsel geen verschil in methaaninhibitie tussen vers en ingekuilde grasklaver.

Enkel zwarte els is in staat zowel in verse als in ingekuilde vorm de relatieve methaanproductie (sterk) te doen dalen. Het methaanreducerend vermogen van vers en ingekuild materiaal van klimop, gewone vlier en zonnekroon zit ook dicht bij elkaar. Echter enkel het verse materiaal verlaagt aantoonbaar de relatieve methaanproductie. Deze vaststellingen opent perspectieven voor het gebruik van deze soorten, en in het bijzonder van zwarte els, in ingekuilde vorm, bv. bij winterstalvoeding.

De andere toppers in verse vorm, namelijk tamme kastanje en trompetboom, verliezen heel wat van hun pluimen wanneer ze worden ingekuild. Hetzelfde geldt voor kweepeer en sint-janskruid. Dit lijstje van soorten leent zich dus beter tot vers gebruik om methaan te reduceren.

Populier, gagel en ridderzuring volgen dezelfde tendens: minder methaanreductie door het inkuilen van het materiaal ten opzichte van vers, in die mate zelfs dat de relatieve methaanemissies stijgen bij inkuilen.



Figuur 9 Relatieve methaanreductie ten opzichte van het controlemengsel (mengsel van 65% *Lolium perenne* (Engels raaigras) en 35% *Trifolium repens* (witte klaver) in verse toestand vs. na inkuilen. Plantensoorten aangeduid met * verschillen significant ($P \leq 0,05$) van het controlemengsel. a, b: duidt significante verschillen ($P \leq 0,05$) aan tussen vers en ingekuild materiaal binnen een plantensoort.

Werkingsmechanismes ontrafeld?

Om diepere inzichten te krijgen over waarom deze of gene plantensoort methaan in meer of mindere mate kan reduceren, werd een selectie van 13 plantensoorten onderworpen aan enkele bijkomende proeven.

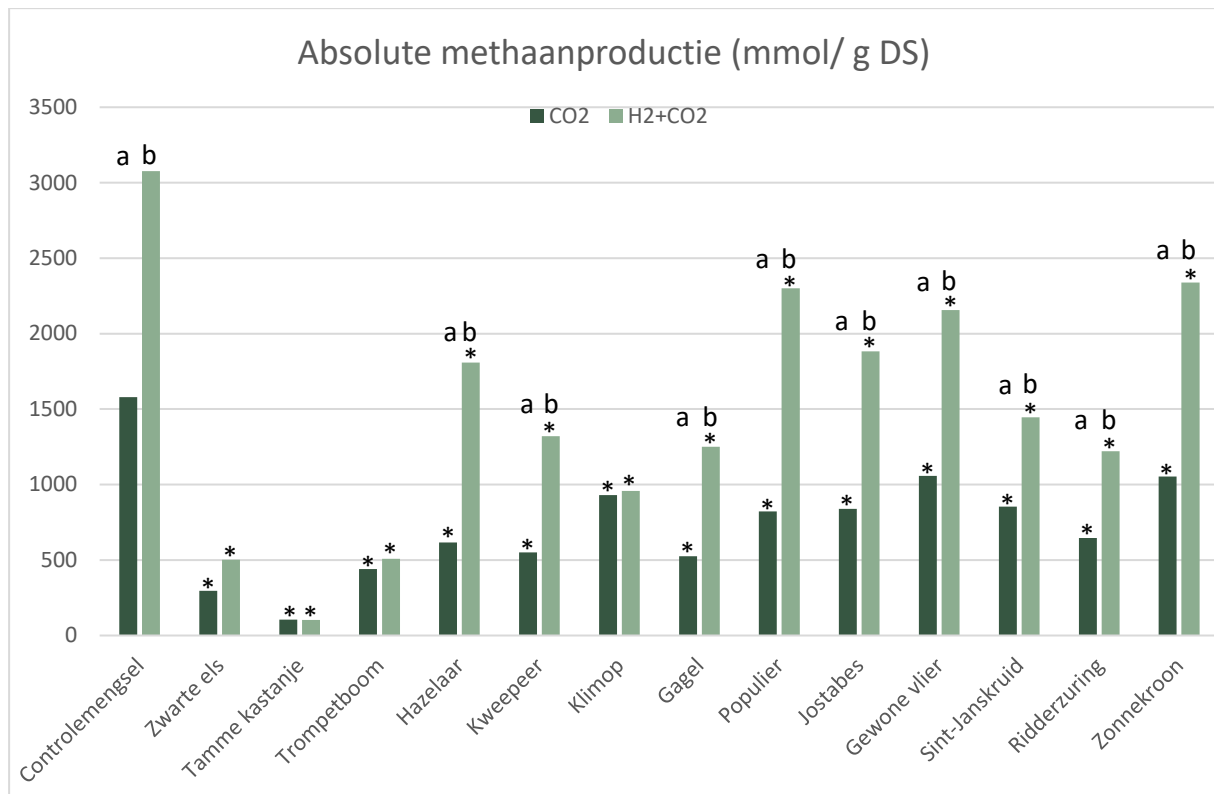
Rechtstreekse onderdrukking van methaanvormende pensorganismen?

In een eerste proef werden incubaties onder een 100% CO₂ atmosfeer (zoals alle andere voorgaande incubaties hierboven) vergeleken met incubaties onder een gewijzigde atmosfeer van 50% CO₂ + 50% H₂. Het idee daarachter is de volgende: in de pens worden voedermiddelen door micro-organismen omgezet naar vluchtige vetzuren en daarbij wordt er naast CO₂ door sommige ook H₂ geproduceerd. Beide moleculen worden door methaanvormende pensorganismen als bouwstenen gebruikt om CH₄ te vormen. Een verminderde methaanproductie kan het gevolg zijn van verschillende manieren van onderdrukken van pensorganismen. Enerzijds, indien H₂ producerende pensorganismen onderdrukt worden; leidt dit tot een verminderde H₂ productie en dus minder methaan. Anderzijds kunnen de methaanvormende organismen geremd worden, waardoor, ondanks de aanwezigheid van H₂, minder/geen methaan gevormd zal worden. Door H₂ toe te voegen aan de atmosfeer tijdens de incubatie hebben de methaanvormende organismen alle bouwstenen voor handen om methaan te vormen en kan er ingeschat worden of specifiek deze organismen onderdrukt worden.

De absolute methaanproductie van het grasklaver controlemengsel verschilt sterk in beide gasomgevingen (Figuur 10). Dit duidt erop dat de pensorganismen niet worden onderdrukt door grasklaver. De stijging in methaanproductie in aanwezigheid van H₂ is de stijging die verwacht kan worden als de methaanvormende organismen niet onderdrukt worden. Van plantensoorten die een gelijkaardige stijging in methaanproductie als het controlemengsel vertonen, kan aangenomen worden dat ze de methaanvormende pensorganismen niet afremmen. Plantensoorten met een kleinere stijging wijzen op een gedeeltelijke onderdrukking van de methaanvormers onder de pensorganismen. Indien er tenslotte geen verschil in methaanproductie is tussen de twee atmosferen, kan geconcludeerd worden dat de methaanvormende pensorganismen volledig worden geïnhibeerd door de desbetreffende plantensoort.

Zwarte els, tamme kastanje, trompetboom en klimop vertonen geen verschil tussen absolute methaanproductie in beide gasomgevingen. Dit is een sterke indicatie dat deze plantensoorten rechtstreeks op de methaanvormende pensorganismen inwerken.

De overige soorten vertonen wel een verschil in absolute methaanproductie in beide incubatie-atmosferen. Dit wijst erop dat hun methaanreducerend vermogen niet gelinkt is aan een rechtstreekse onderdrukking van methaanvormende pensorganismen.



Figuur 10 Absolute methaanproductie ten opzichte van het controlemengsel (mengsel van 65% *Lolium perenne* (Engels raai gras) en 35% *Trifolium repens* (witte klaver) in een 100% CO₂ atmosfeer vs. in een 50% CO₂ + 50% H₂ atmosfeer. Plantensoorten aangeduid met * verschillen significant ($P \leq 0,05$) van het controlemengsel. a, b: duidt significante verschillen ($P \leq 0,05$) aan tussen incubatie onder 100% CO₂ atmosfeer vs. incubatie onder 50% CO₂ + 50% H₂ atmosfeer binnen een plantensoort.

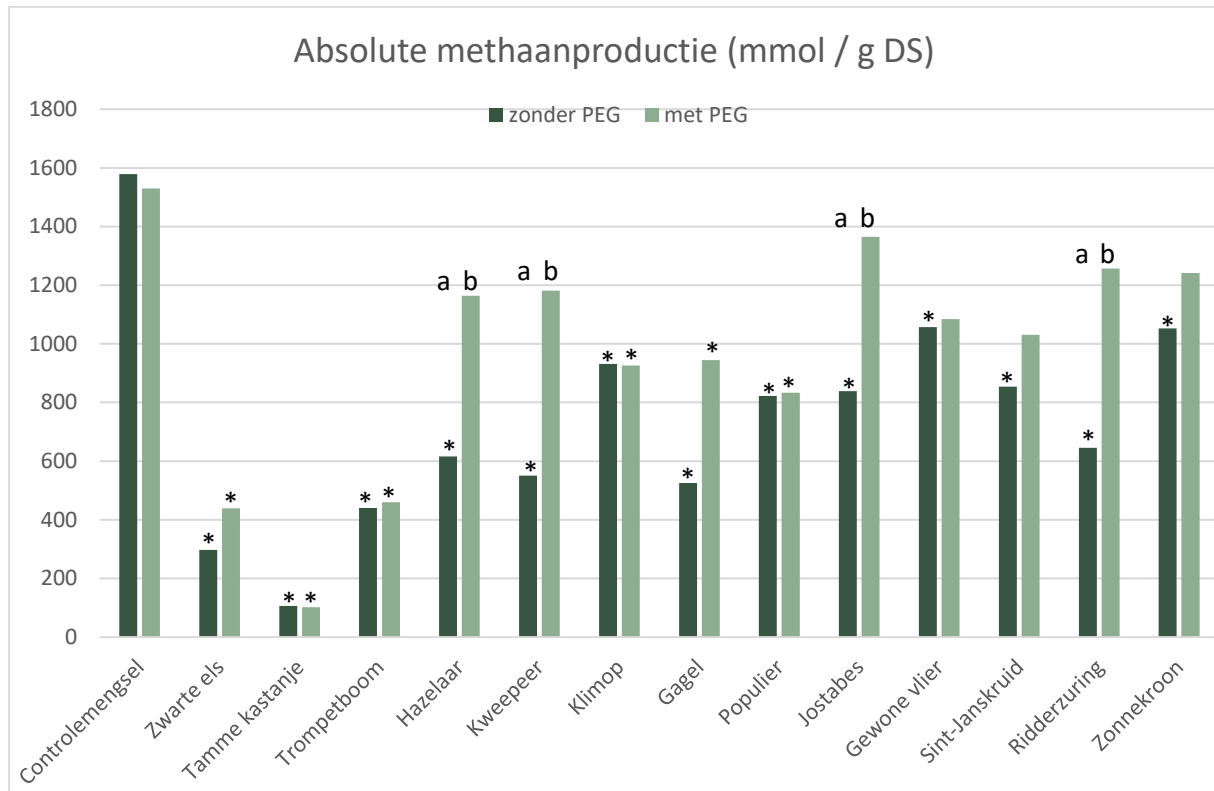
Tannines verantwoordelijk voor methaanreducerend effect?

Tannines zijn fenolische verbindingen die in veel planten voorkomen en die bekend staan om bepaalde pensorganismen betrokken in de methaanvorming te onderdrukken (bacteriën, methaanvormende organismen, protozoa). Het type en de hoeveelheid tannine kan echter per plant verschillen. Polyethyleenglycol (PEG) bindt tannines effectief, waardoor hun werking wordt onderdrukt.

Om het methaanreducerende effect van tannines te beoordelen, werden incubaties uitgevoerd met en zonder PEG. Daarvoor werd 50 g PEG "on top" toegevoegd, dus 250 g plantenmateriaal + 50 g PEG en werd de methaanproductie gemeten. Als er een toename is in de methaanproductie in de flacons met PEG vergeleken met die zonder PEG, kan worden geconcludeerd dat tannine de effectieve planteninhoudsstof was die verantwoordelijk was voor de methaanreductie.

Plantenmateriaal van hazelaar, kweepeer, jostabes en ridderzuring waaraan PEG is toegevoegd vertoont een hogere absolute methaanproductie dan plantenmateriaal zonder PEG. Dit wijst erop dat tannines een duidelijke methaanonderdrukkende werking hebben bij deze plantensoorten (Figuur 11). Bij de overige soorten werden statistisch geen significante verschillen in methaanproductie gevonden tussen materiaal met en zonder PEG. Puur kwantitatief zijn er bovendien nauwelijks waarneembare verschillen tussen de methaanproductie met en zonder PEG bij tamme kastanje, trompetboom, klimop, populier en gewone vlier. Uitgedrukt in relatieve methaanproductie (CH₄/VVZ)(resultaten niet getoond) stellen we geen verschil met en zonder PEG vast voor de hoger genoemde soorten hazelaar, kweepeer, jostabes en ridderzuring. Dit wijst erop dat de productie van

vluchtige vetzuren proportioneel wordt geremd bij deze soorten bij toevoegen van PEG. Tannines lijken dus een directe invloed te hebben op de fermenterende pensorganismen en het fermentatieproces. Naast tannines zijn er nog andere mogelijke planteninhoudsstoffen die een methaanonderdrukkend effect kunnen hebben. Deze componenten werden niet meegenomen in dit project.



Figuur 11 Absolute methaanproductie ten opzichte van het controlemengsel (mengsel van 65% *Lolium perenne* (Engels raai gras) en 35% *Trifolium repens* (witte klaver) in een substraat zonder en met polyethyleenglycol (PEG). Plantensoorten aangeduid met * verschillen significant ($P \leq 0,05$) van het controlemengsel. a, b: duidt significante verschillen ($P \leq 0,05$) aan tussen incubatie met en zonder PEG binnen een plantensoort.

Conclusies

Via het Biomora-project hebben we het methaaninhiberend potentieel van een heel aantal plantensoorten onder labo-omstandigheden onder de loep kunnen nemen. Ook hebben we de invloed van jaar, seizoen, dosis, en al of niet inkuilen in beeld kunnen brengen. Voorlopig kunnen we volgende zaken concluderen:

- In het algemeen is het methaaninhiberend vermogen van houtachtige plantensoorten groter dan van kruidachtige plantensoorten.
- Methaaninhibitie gaat in meer of mindere mate gepaard met een verminderde vluchtige vetzuurproductie, maar dit varieert per plantensoort.
 - Sommige soorten vertonen een sterke methaaninhibitie, maar die gaat gepaard met een sterk verminderde vluchtige vetzuurproductie. Met deze soorten moeten we dus opletten om de productiviteit op dierniveau niet in het gedrang te brengen. Ze hebben wel potentieel als 'voederadditief'. Sommige soorten zijn in staat om met een laag aandeel in het rantsoen ($\leq 10\%$) toch nog aanzienlijk methaan te kunnen reduceren. Een exemplarisch voorbeeld van deze categorie zijn bladeren van tamme kastanje.
 - Een andere categorie van methaanreducerende plantensoorten vertonen een minder uitgesproken methaaninhibitie, maar vertonen tegelijkertijd geen (bv. klimop) of slechts een beperkte daling van de vluchtige vetzuurproductie (bv. gewone vlier) ten opzichte van grasklaver. Hier is het risico op productiedaling op dierniveau eerder beperkt. Van deze soorten kan een substantieel aandeel (30-40%) in het rantsoen gemengd worden.
- Het methaaninhiberend effect is dosisafhankelijk. Welke laagste dosis nog effectief is, is dan weer plantensoortafhankelijk (zie hierboven).
- Het methaaninhiberend effect is variabel in de tijd: zowel het jaar als het seizoen spelen een rol.
- Naarmate het seizoen vordert, lijken houtachtige plantensoorten beter in staat om methaan te onderdrukken.
- Sommige plantensoorten onderdrukken rechtstreeks de methaanvormende pensorganismen.
- Secundaire plantmetabolieten spelen een rol in methaaninhibitie: voor sommige plantensoorten kon de actieve rol van tannines aangetoond worden. Bij andere soorten is het duidelijk dat er andere (niet geïdentificeerde) planteninhoudsstoffen een invloed hebben. Verder onderzoek is nodig.
- Inkuilen ondermijnt in het algemeen het methaaninhiberend effect, bij sommige soorten zeer sterk. Een minderheid van de soorten behoudt zijn methaanonderdrukkend vermogen eens ingekuild.

Tenslotte willen we benadrukken dat voorgaande resultaten bekomen werden onder *in vitro* labo-omstandigheden. Naast de andere opgesomde onderzoeksvragen die komen bovendrijven, is het zaak om in een volgende fase de meest beloftevolle zaken ook onder *in vivo* omstandigheden na te gaan. Testen met levende dieren leveren extra inzichten over opname, productiviteit, en gezondheid van het dier en kwaliteitsparameters van de dierlijke producten (melk, vlees).

Belangrijk daarbij zal zijn om te bewaken dat evenwichtige rantsoenen die de behoeftes dekken kunnen samengesteld worden. De voederwaardes en antinutritionele factoren doorheen het seizoen van enkele beloftevolle methaanreducerende soorten (tamme kastanje, klimop, gewone vlier) en houtige gewassen in het algemeen vragen verder onderzoek.

Partners en financiering

Het Biomora-project (Naar een biologisch verantwoord methaanonderdrukkend rantsoen) was een samenwerkingsverband tussen UGent – Lanupro (Joni Van Mullem, Jeyamalar Jeyanathan, Veerle Fievez), Inagro – afdeling bio (Joran Barbry) en adviesbureau W. Govaerts & Co (Jan Valckx en Wim Govaerts). Het project werd gefinancierd vanuit het Agentschap Landbouw en Zeevisserij met middelen van het Vlaams bio-onderzoek. Het project liep van april 2022 tot en met september 2024.

Contact

Jan Valckx, Govaerts & Co, jan@wimgovaertsenco.be