

Schlussbericht

für das Projekt

Einfluss von 3-Nitrooxypropanol und variierendem Konzentratanteil in der Ration auf die Methanemis- sion und Tiergesundheit bei peripartalen Milchkühen

Entwicklungsschwerpunkt: Klimaschutz und Tiergesundheit

Vorhaben-Akronym: **MethaNiKuh**

Zuweisungsempfänger: Friedrich-Loeffler-Institut
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Südufer 10
17493 Greifswald

Förderkennzeichen: 281B101416

Laufzeit des Vorhabens: 01.07.2018 – 30.06.2021

Inhaltsverzeichnis

I. Kurze Darstellung.....	3
1. Aufgabenstellung.....	3
2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde.....	4
3. Planung und Ablauf des Vorhabens.....	5
4. Wissenschaftlicher und technischer Stand	9
5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen	10
II. Eingehende Darstellung.....	11
1. Erzielte Ergebnisse im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele.....	11
2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises.....	17
3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit	17
4. Voraussichtlicher Nutzen, Verwertbarkeit des Ergebnisses.....	17
5. Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen.....	18
6. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen der Ergebnisse.....	18
6.1. Erfolgte Veröffentlichungen	18
6.2. Geplante Veröffentlichungen.....	19
III. Kurzfassung	21

Anhang - Literatur

I. Kurze Darstellung

1. Aufgabenstellung

Der Anteil der Methanemissionen aus der Verdauung bei Milchkühen in Deutschland macht einen Anteil von 3% an den gesamten Treibhausgasemissionen der Bundesrepublik aus. Dabei hat CH_4 , über einen Zeitraum von 100 Jahren, ein 28-fach höheres Treibhausgaspotential als CO_2 . Der peripartale Zeitraum ist bei Milchkühen mit vielen metabolischen Herausforderungen verbunden, die starke Auswirkungen auf die Gesundheit der Tiere haben können. Die letzten drei Wochen vor und die ersten drei Wochen nach der Kalbung werden als Transitphase definiert. In dieser Phase erfolgt die Umstellung des Organismus von der Trächtigkeit auf die Laktation. An die Transitphase schließt sich die Phase der Frühlaktation bis zum 100. Laktationstag an. Um den Energiebedarf, besonders für die Milchproduktion decken zu können, werden Energiereserven (insbesondere aus den Körperfettdepots) mobilisiert und energiereiche Rationen (höherer Krafffutteranteil (KFA)) gefüttert, da eine geringe Futteraufnahme im Zeitraum der Kalbung zu erwarten ist. Das Ausmaß dieser Lipolyse ist dabei abhängig von der Energieaufnahme über das Futter, der mobilisierten Energie aus Körperfett und der Energieabgabe mit der Milch. Da die Energieabgabe die Energiebereitstellung in der Regel übersteigt, ergibt sich eine negative Energiebilanz (NEB). Die NEB kann zu Stoffwechselerkrankungen (z.B. Ketose) führen. Die mikrobielle Fermentation einer faserreichen Ration (hohe Gehalte an Neutraler Detergenzienfaser (NDF)) begünstigt die Synthese von Essigsäure, wobei molekularer Wasserstoff (H_2) entsteht. Um den H_2 -Partialdruck im Pansen im Gleichgewicht zu halten, wird bei der Methanogenese in den Archaeen CO_2 mittels H_2 zu CH_4 reduziert. Über den Ruktus und die Atmung wird das Methan emittiert. Die Methanogenese bedeutet einen Energieverlust von ca. 6,5% der aufgenommenen Bruttoenergie. Die Fermentation der höheren Anteile an Nicht-Faserkohlenhydrate (NFC) in krafffutterbetonten Ration (insbesondere Stärke) führt zu einer vermehrten Bildung von Propionsäure im Pansen, was unter Wasserstoffentzug geschieht. Somit stellt die Propionatsynthese einen Kompetitor zur Methanogenese dar, was, neben einer geringeren Faserverdaulichkeit und Retentionszeit der Digesta im Pansen, die methanreduzierenden Effekte einer krafffutterbetonten Ration erklärt. Zudem stellt Propionat die wichtigste Vorstufe zur Glukoneogenese dar, was für den Ausgleich der NEB im peripartalen Zeitraum in besonderem Maße relevant wird. Der chemische CH_4 -Inhibitor 3-Nitrooxypropanol (3-NOP) hemmt den letzten Schritt der Methanogenese und könnte somit die Methanemissionen der Kuh reduzieren. Eine daraus resultierende potentiell höhere H_2 -Verfügbarkeit im Pansen könnte alternative H_2 -verbrauchende Fermentationsprozesse und daher die Propionatsynthese begünstigen. Die Wirkung von Futterzusatzstoffen zur Methanhemmung können Dosis-Diät-Abhängigkeiten unterliegen, welche *in vitro* mit Hilfe der Pansensimulationstechnik (RUSITEC) untersucht werden können. Die Kombination eines direkten (3-NOP) mit einem indirekten (krafffutterreiche Ration) CH_4 -mindernden Ernährungsfaktor könnte

Schlussbericht nach Nr. 3.2 BNBest-BMBF 98

zu synergistischen Effekten auf die Reduktion der Methanemission sowie eine verbesserte Energieversorgung der Kuh im peripartalen Zeitraum führen.

Hypothesen:

Das Ziel der Studie war die Untersuchung von Dosis-Diät-Wechselwirkungen zwischen 3-NOP und unterschiedlichen Konzentratanteilen in der Ration *in vitro* mit Hilfe der Pansensimulationstechnik (RUSITEC). Das Ziel der *in vivo* Untersuchungen war es, das Auftreten möglicher Kombinationseffekte zwischen 3-NOP und variierenden Konzentratanteilen in der Ration auf die Methanemission und die Gesundheit (Pansen- und Energiestoffwechsel) der peripartalen Kuh zu untersuchen.

Hypothesen im Rahmen des Projekts:

- 1) die Wirksamkeit von 3-NOP in der Methanminderung unterliegt Dosis-Diät-Wechselwirkungen, wobei höhere Dosierungen und Krafffutteranteile die Effektivität des Inhibitors erhöhen
- 2) 3-NOP und ein hoher Krafffutteranteil in der Ration senken synergistisch die Methanemission von Milchkühen im peripartalen Zeitraum
- 3) Die Kombination von 3-NOP und hohen Krafffutteranteilen in der Ration verschiebt ruminale Fermentationsprozesse von H₂-freisetzenden zu H₂-verbrauchenden mikrobiellen Stoffwechselprozessen
- 4) Die höheren Anteile an glukogenem Propionat in der Pansenflüssigkeit steigern die hepatische Glukoneogenese, was die Mobilisierung von Energiereserven aus den Körperfettdepots und NEB senkt und zu einer Steigerung der Milchleistung führt

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Das Institut für Tierernährung (FLI) ist langjährig experimentell im Bereich der Milchviehernäherung und der Messung verdauungsphysiologischer, immunologischer sowie energiestoffwechsel-assoziiierter Parameter tätig. In der institutseigenen Versuchsstation standen automatisierte Methoden zur Bestimmung von Futteraufnahme, Lebendmasse und Leistung (Milchmenge) sowie zur Quantifizierung der oralen Methanausscheidung mit Hilfe des innovativen GreenFeed Systems (C-Lock Inc., Rapid City, USA) zur Verfügung. Zu den Schwerpunkten der bisher durchgeführten Arbeiten gehören u.a. die Bestimmung von Nährstoff-assoziierten Einflussfaktoren auf die Stoffwechselfunktion und die Gesundheit von Milchkühen (Keese et al. 2008; von Soosten et al. 2011; Pappritz et al. 2011). Für den *in vitro*-Versuch stand eine RUSITEC-Apparatur mit vier Fermentern sowie drei fistulierte Kühe als Spendertiere (Inokulum) zur Verfügung. Die RUSITEC-Methode wurde während des Projekts im Institut etabliert.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Versuchsdesign:

In vitro- Dosis-Wirkungs-Studien mit der Pansensimulationstechnik (RUSITEC) zur Untersuchung von Dosis-Diät-Wechselwirkungen von 3-NOP und variierendem Konzentratanteil in der Ration.

In drei Messwiederholungen wurden drei Dosierungen (73, 160 und 1200 mg 3-NOP/kg Futter-T) des Futterzusatzstoffes und Methaninhibitors 3-NOP kombiniert mit einer faser- (30 % Kraftfutter(KF)) oder kraftfutterbetonten (55 % KF) Ration im RUSITEC inkubiert (Czerkawski and Breckenridge 1977). Ein Lauf erstreckte sich über 12 Tage, von denen 8 Tage zur Adaptation und 4 Tage zur Sammlung festgelegt wurden. Es standen vier Fermenter zur Verfügung.

Die statistische Auswertung des 4×2 faktoriellen Designs erfolgte mit PROC MIXED (Version 9.4; SAS Institute Inc., Cary, NC). In dem gemischten Modell (Littell et al. 1998) wurden die 3-NOP Dosierung (DOSE), der Kraftfutteranteil in der Ration, der RUSITEC-Lauf und deren Interaktion als fixe Effekte und der Fermenter als zufälliger Faktor gesetzt.

Datenerfassung:

in vitro:

Gasproduktion

Fermentationsgase (CH₄, CO₂, H₂)

Futterzusammensetzung/Nährstoffkonzentration, Energie der Ration

Abbauraten der organischen Masse (OM), Trockenmasse (TM), Neutrale-Detergenzienfaser (NDF)

Fettsäuremuster in Fermenterflüssigkeit (Propionat, Azetat, Butyrat, Valerat, iso-Butyrat, iso-Valerat)

Ammoniak

Überlaufvolumen

pH und Redoxpotential in Fermenterflüssigkeit

Technische Parameter: Lufttemperatur, Luftdruck

In vivo:

Exakt-Fütterungsversuch an Milchkühen mit möglichem Einfluss von 3-NOP und variierendem Konzentratanteil in der Ration auf die Methanemission, die Körperfettmobilisierung, Energiebilanz, Tiergesundheit sowie den Pansenstoffwechsel.

Für den am Institut für Tierernährung durchgeführten Milchkuhversuch standen 56 schwarz-bunte Milchkühe der Rasse Deutsche Holstein zur Verfügung. Durch die planmäßige saisonale

Abkalbung war eine gleichmäßige Besetzung aller vier im Versuchsdesign vorgesehenen Versuchsgruppen bei annähernd ähnlichem physiologischem Status möglich. Die Durchführung, Datenerfassung und Probenahme während des Versuchs mit 56 Milchkühen erfolgte beginnend vier Wochen vor der voraussichtlichen Abkalbung der einzelnen Kühe und wurde über den Verlauf der ersten 17 Laktationswochen in den experimentellen Einrichtungen des Instituts für Tierernährung (FLI) in Braunschweig fortgesetzt. Durch die in der Versuchsstation vorhandenen Einrichtungen zur kontinuierlichen einzeltierbezogenen Messung der Futteraufnahme, Milchmenge, Lebendmasse und der diskontinuierlichen Quantifizierung der Methanemission pro Tier und Tag sowie der Analyse von Metaboliten im Pansenfluid und biochemischer energiestoffwechsel-assoziiertes Blutparameter, war die Datengrundlage für die statistische Datenauswertung gegeben.

Vor Versuchsbeginn wurden die 56 anhand ihres BCS, der Milchleistung in der vorherigen Laktation sowie der Laktationszahl gleichmäßig auf die vier Versuchsgruppen verteilt.

Für den Versuchszeitraum (Tag 28 *ante partum* (a.p.) bis Tag 120 *post partum* (p.p.)) standen 56 pluripare Milchkühe (Deutsche Holstein) zur Verfügung. Die Tiere waren in vier Fütterungsgruppen nach einem 2×2-faktoriellen Versuchsdesign eingeteilt. Es wurden niedrige (KFN) und hohe (KFH) Krafftutteranteile in der Ration mit 3-Nitrooxypropanol (3-NOP) oder einem Placebo (KON) (DSM Nutritional Products AG) kombiniert. Beide Supplemente bestanden nach Herstellerangaben aus Propylenglykol und SiO₂, die als Trägerstoff der aktiven 3-NOP-Substanz (Mononitratester von 1,3-Propanediol) dienen, wobei letztere mit 10 % nur im 3-NOP-Supplement enthalten war.

Die Kühe erhielten eine Teil-TMR *ad libitum* bestehend aus 90 % Grundfutter (78 % Mais- und 22 % Grassilage) sowie 10 % pelletiertem KF (T-Basis). Zusätzliches pelletiertes KF wurde über Automaten schrittweise dem Laktationstag angepasst. Bis zur Kalbung wurde der KFA der Gesamtration auf 15 % (KFN) bzw. 40 % (KFH) eingestellt. Ab dem Zeitpunkt der Kalbung erhielten die Tiere der KFN-Gruppen 30 % KFA, wohingegen der KFA der Gesamtration bei den KFH-Gruppen bis zum 21. Laktationstag auf 55 % schrittweise angehoben wurde. Der Futterzusatzstoff wurde monatlich in das pelletierte Krafftutter eingemischt, kühl, dunkel und trocken gelagert und sowohl über das Krafftutter der Teil-TMR als auch über die Krafftutterstation bereitgestellt. Somit wurde eine hohe Wiederfindungsrate, kontinuierliche 3-NOP-Aufnahme über den Tagesverlauf sowie zeitgleich zur Futteraufnahme gewährleistet. Die Nährstoff- und Strukturversorgung erfolgte entsprechend der aktuellen Empfehlungen des Ausschusses für Bedarfsnormen der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie.

Über den gesamten Versuchszeitraum wurden Futterproben entnommen und deren Gehalt an Rohrnährstoffen sowie Neutral-Detergenzien-Faser, Säure-Detergenzien-Faser und Stärke bestimmt (Tabelle 1). Eine 3-NOP-Konzentration von $48,4 \pm 2,7$ (3-NOP-KFN) und $51,1 \pm 2,9$ (3-NOP-KFH) mg 3-NOP pro kg Futter-T wurde analysiert. Die tierindividuelle T-Aufnahme wurde über die Futterwiegetröge (RIC; Insentec B.V., Marknesse, Niederlande) und Krafffutterautomaten erfasst.

Die Kühe wurden zweimal täglich gemolken (autom. Milchmengenerfassung, Auto-Tandem). Zweimal wöchentlich wurden Milchproben (jeweils Morgen- und Abendmelk) entnommen. Milchhaltsstoffe (Fett, Protein, Laktose) wurden im Fourier-Transformations-Infrarotspektrometer (MilkoScan FT 6000; Foss Electric, Hillerød, Dänemark) analysiert. Die Lebendmasse der Tiere wurde mittels elektrischer Wiegung am Ausgang des Melkstands erfasst. Die Berechnung der EB erfolgte nach GfE (1995).

Der tierindividuelle Gasmassenfluss an emittiertem CH₄ und CO₂ sowie die Aufnahme von O₂ wurden mit dem GreenFeed (GF) System (C-Lock Inc., Rapid City, USA) erfasst. Über den Tag verteilt erhielten die Tiere Zugang zu maximal 6 GF-Besuchen (Zeitintervall zw. Besuchen >180 Min), bei denen je Besuch 8 Portionen (à 34 g Krafffutter) im Abstand von 40 Sek gefüttert wurden. Der perforierte Futtertrog, Luftfilter und Kopfpositionssensor wurden täglich gereinigt. CO₂-Recovery-Tests wurden monatlich durchgeführt, die Sensorkalibrierung erfolgte täglich.

Pansensaft wurde vor der Morgenfütterung an Tag 28, 14, 7 a.p. und 7, 28, 49, 73, 98 und 120 p.p. per Schlundsonde entnommen (Geishauser 1993). Flüchtige Fettsäuren (FFS) wurden mittels Gaschromatographie (mit Flammenionisationsdetektor) (Clarus 680, PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau) analysiert. Der Gehalt an Ammoniak, der pH-Wert und die Anzahl an Protozoen in der Probe wurden bestimmt. Die 16S rDNA in der Pansensaftproben wurde an Tag 28 a.p. sowie Tag 49 und 120 p.p. sequenziert.

Zur Schätzung der Fettmassen in den Körperfettdepots wurde an verschiedenen topographischen Punkten die Fettauflagendicke mittels Ultraschalltechnik an Tag 3 und 28 p.p. gemessen (Raschka et al. 2016). Zusammen mit der wöchentlichen Ermittlung der Körperkondition (Edmonson et al. 1989) (Body Condition Score, BCS) konnten somit Rückschlüsse auf das Ausmaß der Körperfettmobilisierung gezogen werden .

Zur Bestimmung des Leberfettgehaltes wurde das Lebergewebe an Tag 7 und 28 p.p. bei 32 Tieren bioptiert.

Durch Punktierung einer *Vena jugularis externa* wurden Blutproben an Tag 28, 14, 7, 3 a.p. und Tag 1, 3, 7, 14, 21, 28, 35, 49, 73, 98, 120 p.p. entnommen. Die Konzentration verschie-

dener klinisch-chemischer Blutparameter wie nicht-veresterte Fettsäuren (NEFA), Triacylglyceride (TAG), Glucose, β -Hydroxybuttersäure (BHB) und Elektrolyte wurde bestimmt. Zudem wurde das hämatologische Profil der Milchkühe charakterisiert.

Im Versuchszeitraum wurden die pansenfistulierten Kühe mit pH-Messsonden (LRCpH Measurement System, Dascor, Inc., Escondido, CA, USA) und dem RumiWatch-System (Messung Wiederkauaktivität und Fressverhalten) ausgestattet. Von den 10 pansen- und duodenalfistulierten Kühe wurden während einer dreifach wiederholten 5-Tage-Periode Darmchymusproben entnommen und es wurde, unter Einsatz von NIR-Spektroskopie, die mikrobielle Proteinsynthese berechnet.

Die Probenahme und die Erhebung von Messwerten entsprachen den in der Projektplanung vorgegebenen Zielen.

Die statistische Auswertung erfolgte mit PROC MIXED (9.4; SAS Institute Inc.) mit Kuh-ID als zufälligen Effekt und Kraftfutteranteil (KFA), 3-NOP Supplementierung (3-NOP), Zeit relativ zur Kalbung (ZEIT) und deren Interaktion als fixe Faktoren. Die Basalwerte von Tag -28 wurden für die Auswertung teilweise als Kovariable in der Statistik berücksichtigt.

Faktoren:

Gruppierung der Milchkühe im 2×2-faktoriellen Versuchsdesign:

- Ernährungsfaktor 1: 3-NOP: Stufen: Zulage von 3-NOP (51,2 (NOPHC) und 48,4 (NOPLC) mg 3-NOP/kg Futter-TM) (3-NOP) oder eines Placebos (KON)
- Ernährungsfaktor 2: KFA: Stufen: hoher (KFH) oder niedriger (KFN) KFA in der Ration

Datenerfassung:

In vivo:

Futteraufnahme, Wasseraufnahme

Futterzusammensetzung/Nährstoffkonzentration, Energie

Physikalische Eigenschaften der Mischration (Partikellänge, $peNDF_{8mm}$)

Milchmenge, Milchinhaltstoffe (MLP, FT-MIR)

CH₄- und CO₂-Emission, O₂-Aufnahme (GreenFeed-System, C-Lock Inc., Rapid City, USA)

Lebendmasse, Body Condition Score

Leberbiopate zur Bestimmung des Leberfettgehaltes

Ultraschallmessung zur Schätzung verschiedener Körperfettdepotmassen

Biochemische Blutparameter (klinisch-chemische Parameter nicht-veresterte Fettsäuren

(NEFA), β -Hydroxybutyrat (BHB), Glukose, Triazylglyzeride (TAG), Elektrolyte)

Hämatologisches Profil und immunologische Parameter

Pansenfluid: Fettsäuremuster (Propionat, Azetat, Butyrat, Valerat, iso-Butyrat, iso-Valerat),

Ammoniak, pH, Anzahl Protozoen in der Probe

16S rDNA Sequenzierung

Fistulierte Kühe:

Kontinuierliche pH-Messung (LRCpH Measurement System, Dascor, Inc., Escondido, CA, USA).

Wiederkauaktivität und Fressverhalten (RumiWatch System, Itin + Hoch, Liestal, Schweiz, Nasenbanddrucksensor)

Darmchymusproben und Analyse mit Hilfe von NIR-Spektroskopie

Harn, Kot, Kotpartikelsiebung

4. Wissenschaftlicher und technischer Stand

Die Fermentation des Futters beim Wiederkäuer trägt mit 17 % zu den globalen anthropogenen Methanemissionen bei (Knapp et al. 2014). Bei 3-NOP handelt es sich um einen chemischen Methaninhibitor der den zootechnischen Futterzusatzstoffen zugeordnet wird. 3-NOP ist ein Strukturanalogon des Methyl-Coenzym M (CoM) in den ruminalen Archaeen. Es nimmt dessen Platz ein, sodass das Enzym Methyl-Coenzym M-Reduktase nicht an CoM binden kann, wodurch der letzte Schritt in der Methanogenese gehemmt wird (Duin et al. 2016). In einer Meta-Analyse konnte festgestellt werden, dass die Wirkung von 3-NOP zur Reduzierung der Methanemission negativ mit dem NDF-Gehalt der Ration korreliert und einer Dosisabhängigkeit unterliegt. Die empfohlene Dosierung wird derzeit mit 60 mg 3-NOP/kg Futter-T angegeben. Die Meta-Analyse ergab eine mittlere Reduktion der Methanemission um 39 % bei Milchkühen (Dijkstra et al. 2018). Verschiebungen in der mikrobiellen Gemeinschaft wurden nach Supplementierung von 3-NOP in Milchviehrationen berichtet (Lopes et al. 2016; Pitta et al. 2021). 3-NOP kann dabei in pelletiertes Krafftutter ohne Wirksamkeitsverluste eingemischt werden (Van Wesemael et al. 2019). Dabei ist der Zusatzstoff zeitgleich zur Futteraufnahme zu verabreichen und wird daher in die TMR eingemischt. 3-NOP ist wasserlöslich und wird im Pansen schnell zu Nitrat, Nitrit und 1,3-Propandiol abgebaut. 3-NOP wirkt direkt hemmend auf die Methansynthese nach Verabreichung, wobei der methanreduzierende Effekt reversibel ist. So konnte gezeigt werden, dass die Methanemission innerhalb von einer Woche nach Beendigung der 3-NOP-Fütterung wieder auf dem Niveau der Kontrolltiere anstieg (Romero-Pérez et al. 2015b). Es konnte in bisherigen Studien gezeigt werden, dass 3-NOP keinen Einfluss auf die Milchleistung nimmt, wohingegen Hristov et al. (2015) erhöhte Körpermassezunahmen

Schlussbericht nach Nr. 3.2 BNBest-BMBF 98

bei 3-NOP supplementierten Milchkühen feststellte. Inkonsistente Effekte auf den Milchfettgehalt sowie Änderungen im Milchfettsäuremuster ergaben sich auf Grund einer 3-NOP Fütterung (Hristov et al. 2015; van Gastelen et al. 2020). Die Energiebilanz war, so konsistent in vorherigen Studien berichtet, nicht durch 3-NOP beeinflusst.

Bisherige wissenschaftliche Untersuchungen zum Einfluss der Transitperiode auf die NEB konzentrierten sich insbesondere auf den Zusammenhang zwischen Energieaufnahme, Energiemobilisierung über Körperfett, Energieabgabe über die Milch, sowie die daraus resultierende NEB, welche von großer Bedeutung für die Tiergesundheit ist (Grummer 1993; Drackley 1999). Die Änderungen im Stoffwechselstatus von Milchkühen in der Transitphase wurden bisher noch nicht unter Einfluss einer 3-NOP-Fütterung und Methanogenesehemmung untersucht. Eine 3-NOP-Fütterung sowie eine kraftfutterbetonte Ration führten, wie konsistent aus bisherigen wissenschaftlichen Untersuchungen hervorgeht, zu einer Verschiebung im ruminalen Fermentationsmuster und erhöhten Propionatanteilen, wohingegen die molaren Anteile an Azetat abnahmen (Jayanegara et al. 2018). Im Zusammenhang mit möglicherweise reduzierten Futterenergieverlusten aufgrund der geringeren Methanbildung, könnte damit die Energieversorgung der Milchkuh im peripartalen Zeitraum verbessert und die NEB reduziert werden. Dies wurde bisher noch nicht untersucht. Insbesondere fehlt die Datengrundlage zur Bewertung der 3-NOP Effizienz bei einer möglichen Wechselwirkung mit Futtermischungen unterschiedlicher Kraftfuttergehalte. Hierbei steht insbesondere die Betrachtung der Persistenz der methaninhibierenden Wirkung sowie der möglichen Effekte auf den Energiestoffwechsel im Vordergrund. Langzeitversuche, die die Transitphase der Milchkuh einschließen, wurden bisher noch nicht vorgenommen. Die grundsätzlichen Zusammenhänge zu Dosis-Diät-Wechselwirkungen zwischen 3-NOP und Rationen mit unterschiedlichen Kraftfutterniveau wurden bisher noch nicht untersucht. Bisherige in vitro-Studien weisen auf einen signifikanten Dosis-Wirkungszusammenhang bei 3-NOP hin, wobei die bisher inkubierten Rationen nicht mit regional gestalteten Fütterungskonzepten vergleichbar sind (Romero-Pérez et al. 2015a; 2016; 2017).

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Forschungsbegleitung Klimagerechtes Handeln in der Landwirtschaft – KlimAgrar, Landwirtschaften, Universität Potsdam

DSM Nutritional Products AG, Kaiseraugst, Schweiz

C-Lock Inc., Rapid City, USA

Humboldt-Universität Berlin, Tierernährung, Betreuung Masterstudentin im Projekt zum Thema der Effekte der Ernährungsfaktoren auf die mikrobielle Proteinsynthese

II. Eingehende Darstellung

1. Erzielte Ergebnisse im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

3. Ergebnisse

In Tabelle 1 sind die Analysenergebnisse der verschiedenen Futterrationen dargestellt. Es wurden Rationen mit den variierenden KFA erfolgreich konzipiert.

Tab. 1: Trockenmassegehalt, chemische Zusammensetzung und Energiekonzentration der Futterrationen im Versuchszeitraum (Tag 28 *ante partum* bis Tag 120 *post partum*) auf T-Basis.

Inhaltsstoff	KON		3-NOP	
	KFN	KFH	KFN	KFH
Trockenmasse (T, g/kg Frischmasse)	467	582	467	597
Chemische Zusammensetzung (g/kg T)				
Rohasche	63	61	63	61
Rohprotein	130	138	129	140
nutzbares Rohprotein	142	150	142	151
Rohfett	32	35	32	36
Neutral-Detergenzien-Faser (aNDFom)	402	344	404	337
Säure-Detergenzien-Faser (ADFom)	226	191	227	187
peNDF _{>8mm} in der Teil-TMR ¹⁾	268	269	274	273
Stärke	249	303	246	307
Netto-Energie-Laktation (MJ NEL/kg T)	6,6	7,0	6,6	7,1

¹⁾ physikalisch-effektive NDF; 19- und 8-mm Siebfraktion multipliziert mit NDF-Gehalt der Ration.

3-NOP und KFA hatten keinen Effekt auf die Lebendmasse und deren Veränderung. Die T-Aufnahme war in den KFH-Gruppen um 10 % höher (KFA; $p < 0,001$) und nahm nach der reduzierten T-Aufnahme zur Kalbung in allen Gruppen im Versuchsverlauf zu (ZEIT; $p < 0,001$). Die NEL-Aufnahme (und Milchmenge) nahm im zeitlichen Verlauf in den KFH-Gruppen in größerem Umfang zu als in den KFN-Gruppen (KFA×ZEIT; $p < 0,001$; Abb. 1a).

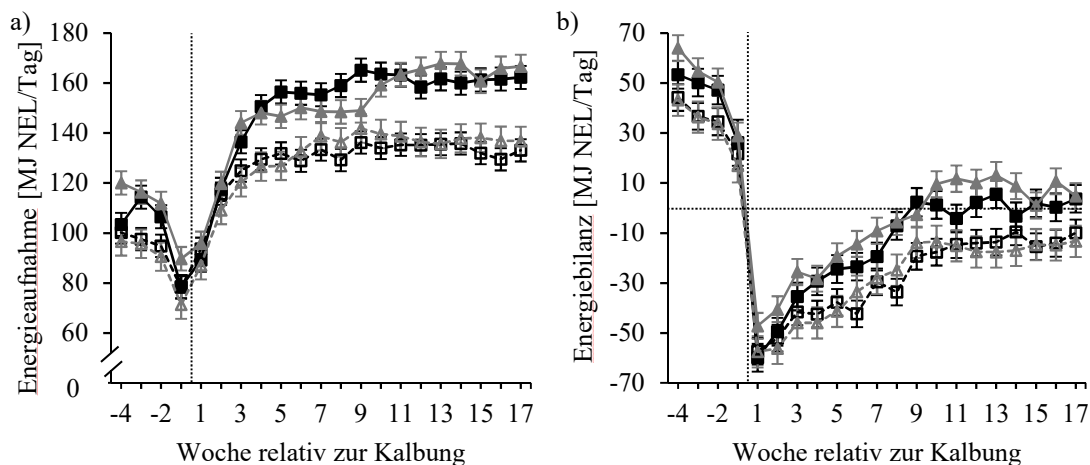


Abb. 1: Effekt von 3-Nitrooxypropanol (3-NOP), Kraffutteranteil (KFA) und Zeit relativ zur Kalbung (ZEIT) auf die Energieaufnahme und -bilanz. ■ = Kontrolle KFA hoch (KON-KFH); □ = Kontrolle KFA niedrig (KON-KFN); ▲ = 3-NOP KFA hoch (3-NOP-KFH); △ = 3-NOP KFA niedrig (3-NOP-KFN).

Milchmenge, NEL- und T-Aufnahme waren von der 3-NOP-Supplementierung unbeeinflusst. Jedoch wurde eine niedrigere energiekorrigierte Milchmenge (ECM) in der 3-NOP-KFH Gruppe (36,2 kg ECM) im Vergleich zur KON-KFH (39,7 kg ECM) festgestellt (3-NOP×KFA; p

= 0,039), wohingegen sich die KFN-Gruppen nicht unterschieden (36,6 und 36,8 kg ECM in KON-KFN bzw. 3-NOP-KFN).

Es zeigte sich kein Effekt von 3-NOP auf die Eiweiß- und Laktosegehalte der Milch. Im zeitlichen Verlauf nahm der Milchfettgehalt in der 3-NOP-KFN in geringerem Umfang zu als in der KON-KFN-Gruppe (3-NOP×ZEIT; $p = 0,005$). Im zeitlichen Verlauf führte der niedrigere KFA zu höherem Milchfettgehalt, während die Milcheiweißkonzentration in den KFH-Gruppen stärker zunahm (KFA×ZEIT; $p < 0,05$).

Die Methanemission, -produktion und -emissionsintensität (Abb. 2a-c) wurden signifikant sowohl mittels 3-NOP (durchschnittlich um 23 % bei 3-NOP-KFN und 33 % bei 3-NOP-KFH) als auch erhöhte KFA in der Ration (durchschnittlich um 11 % bei KON- und 18 % bei 3-NOP-Gruppen) gemindert. Im experimentellen Zeitverlauf führte die Kombination aus 3-NOP-Supplementierung und erhöhtem KFA in der Ration zu synergistischen Effekten auf die Minderung der CH₄-Emission (3-NOP×KFA×ZEIT; $p = 0,006$). Unter den vorliegenden Versuchsbedingungen zeigte sich von Woche 12 p.p. bis zum Versuchsende ein Anstieg der CH₄-Emission in der 3-NOP-KFN-Gruppe auf das Niveau der KON-Gruppen (Abb. 2a-c).

3-NOP und erhöhte KFA in der Ration veränderten das Fermentationsmuster im zeitlichen Verlauf zu erhöhten prozentualen molaren Propionsäure-, Buttersäure-, Valeriansäure und niedrigeren Essigsäureanteilen in der Pansenflüssigkeit (3-NOP×ZEIT; $p < 0,05$; KFA×ZEIT; $p < 0,05$; Abb. 2d). Die Kalbung führte zu einer Veränderung der Gesamtkonzentration an FFS. Die Abundanz von Protozoen war nicht durch die Ernährungsfaktoren beeinflusst. Der höhere KFA und die 3-NOP-Supplementierung führten zu einer geringeren alpha- und beta-Diversität der mikrobiellen Gemeinschaft. Die 3-NOP Supplementierung beeinflusste nicht die Effizienz der mikrobiellen Proteinsynthese. Entgegen der Erwartung führte ein niedrigerer KFA zu einer höheren Effizienz der mikrobiellen Proteinsynthese pro kg fermentierbarer organischer Substanz.

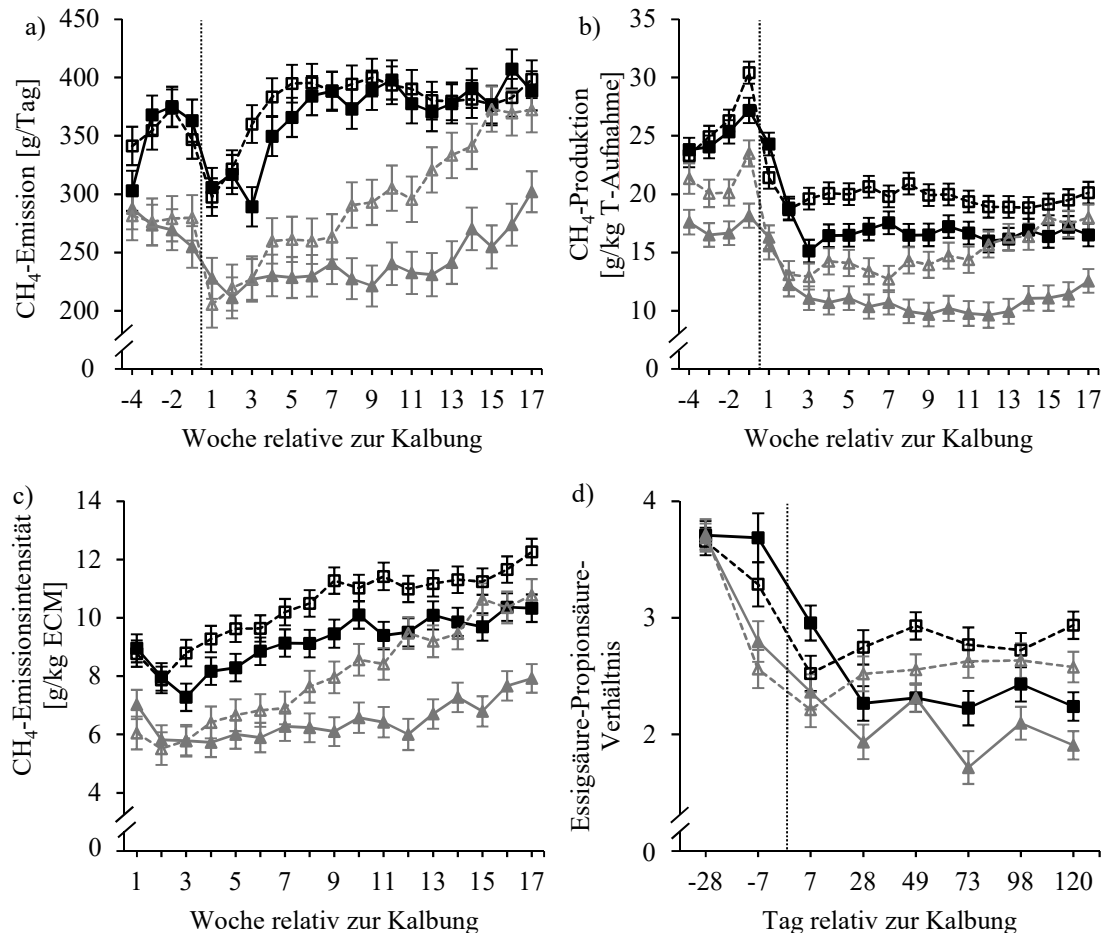


Abb. 2: Effekte von 3-Nitrooxypropanol (3-NOP), Kraftfutteranteil (KFA) und Zeit relativ zur Kalbung (ZEIT) auf die Methanemission und das Essigsäure-Propionsäure-Verhältnis peripartaler Milchkühe. ■ = Kontrolle KFA hoch (KON-KFH); □ = Kontrolle KFA niedrig (KON-KFN); ▲ = 3-NOP KFA hoch (3-NOP-KFH); △ = 3-NOP KFA niedrig (3-NOP-KFN).

Die Körperfettmobilisierung und der BCS unterschieden sich nicht zwischen 3-NOP und Kontrollgruppen, waren jedoch, wie auch die Lebendmasseveränderung, signifikant durch die Kalbung beeinflusst. Der höhere KFA führte zu einer höheren Lebendmassezunahme.

Über den Versuchszeitraum betrachtet führte die Kombination aus hohem KFA und 3-NOP-Zulage zu einer positiveren und frühzeitiger ausgeglichenen Energiebilanz (EB) (3-NOP×KFA; $p = 0,001$; Abb. 1b). Es zeigte sich der charakteristische NEFA-Peak zum Zeitpunkt der Kalbung in allen Gruppen (ZEIT; $p < 0,001$). Die Konzentration an NEFA im Blutserum war signifikant niedriger bei den 3-NOP-Gruppen (3-NOP; $p < 0,001$; Abb. 3a), jedoch nicht beeinflusst durch den KFA. Im Gegensatz dazu wurden im Zeitverlauf geringere Serum-BHB-Konzentrationen bei den KFH-Gruppen gemessen (KFA×ZEIT; $p = 0,009$; Abb. 3b), während 3-NOP keinen Einfluss auf die untersuchten Ketonkörper nahm. Die Konzentration an TAG und Glukose war von der 3-NOP Zulage unbeeinflusst. Jedoch führte der höhere KFA zu einem erhöhten Glukosespiegel im Serum. Der Leberfettgehalt stieg signifikant zum Zeitpunkt der Kalbung an und nahm im Anschluss an die Transitperiode im Verlauf der Früh lactation wieder ab. Die Ernährungsfaktoren nahmen keinen Einfluss auf den Leberfettgehalt. Das hämatologische

Profil war nicht durch die Ernährungsfaktoren beeinflusst. Ausnahmen blieben hierbei der relative Anteil an Monozyten, die in 3-NOP-Gruppen niedriger im Vergleich zu den KON-Gruppen war. Der Anteil an Granulozyten variierte unterschiedlich zwischen den KFH- und KFN-Gruppen über die Zeit (KFA×ZEIT; $p = 0,041$). Die Untersuchung der Blutparameter zeigte konsistent den deutlichen Effekt der Kalbung als physiologisches Ereignis über die biochemischen und hämatologischen Blutparameter.

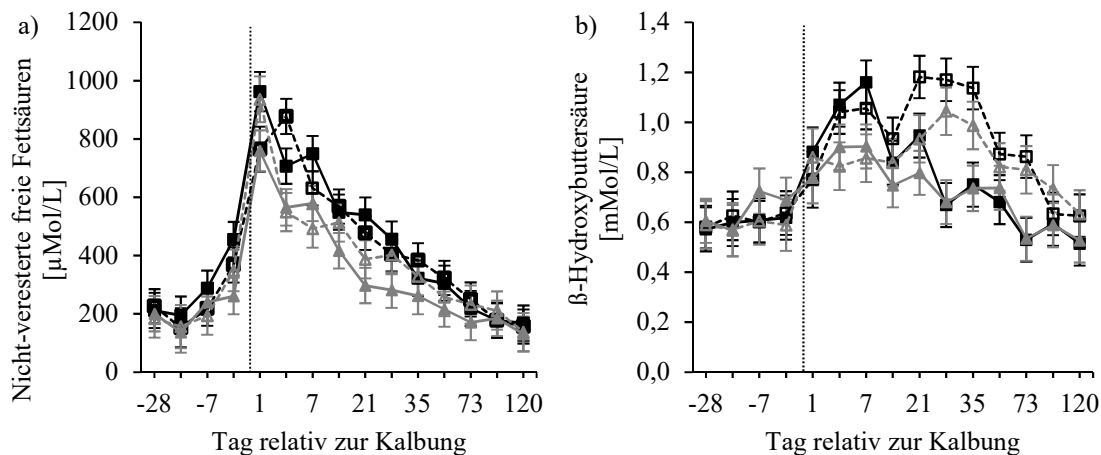


Abb. 3: Effekte von 3-Nitrooxypropanol (3-NOP), Krafftutteranteil (KFA) und Zeit relativ zur Kalbung (ZEIT) auf klinisch-chemische Parameter im Serum peripartaler Milchkühe. ■ = Kontrolle KFA hoch (KON-KFH); □ = Kontrolle KFA niedrig (KON-KFN); ▲ = 3-NOP KFA hoch (3-NOP-KFH); △ = 3-NOP KFA niedrig (3-NOP-KFN).

In der *in vitro*-Studie konnten signifikante Dosis-Wechselwirkungen von 3-NOP auf den prozentualen Anteil an Methan und Wasserstoff im Fermentationsgas festgestellt werden, die unabhängig vom KFA auftraten ($L: p < 0.01$; Tab. 2). Wechselwirkungen zwischen der Dosis und der Diät wurden somit unter *in vitro*-Bedingungen nicht beobachtet. Mit zunehmender 3-NOP Dosierung nahm der relative Anteil an Methan ab, wohingegen der Anteil an Wasserstoff signifikant anstieg. Die Gasproduktion war weder vom KFA noch von der 3-NOP Supplementierung beeinflusst. Die Abbaubarkeiten der T und organischen Masse (OM) variierten in Abhängigkeit von der 3-NOP Dosis, unterschieden sich jedoch nicht signifikant zwischen Krafftutterniveaus. Entgegen der Erwartung wurde ein signifikant niedrigerer pH-Wert in der KFN-Behandlung beobachtet, wobei 3-NOP den pH-Wert nicht beeinflusste. Das Redoxpotential variierte über die 3-NOP Dosierungen (Tab. 2).

Eine höhere Produktion an FFS wurde steigender 3-NOP-Dosierung (Dosis: $p = 0.05$; Tab. 2) und niedrigerem KFA (KFA: $p = 0.012$; Tab. 2) beobachtet. Die $\text{NH}_3\text{-N}$ Konzentration [mg/L] war, im Vergleich zu den KFH-Behandlungen, um 41% niedriger in KFN-Behandlungen (KFA: $p = 0.009$; Tab. 2). Der molare Anteil an Azetat und Valerat nahm bei steigender 3-NOP Dosis ab, änderte sich jedoch nicht durch die Inkubation variierender KFA. Der molare Anteil an Propionat war durch eine Dosis-Diät-Wechselwirkung beeinflusst ($p < 0.05$) und ein quadratischer Effekt der 3-NOP Dosierung auf die molaren Anteile von Propionat wurden festgestellt.

Der KFA und die 3-NOP Dosierung beeinflussten wechselwirkend das Azetat/Propionat-Verhältnis (KFA×Dosis: $p = 0.032$). Die molaren Anteile an Buttersäure änderten sich nicht in Folge der experimentellen Behandlungen.

Tab 2: Effekte unterschiedlicher Dosierungen (Dosis) von 3-Nitrooxypropanol (3-NOP) (PLA: 0, LOW: 73, MED: 160 and HIGH: 1200 mg 3-NOP/kg T) und niedrigem (KFN) oder hohem (KFH) Krafftutteranteil (KFA) in der Ration auf die Abbaurrate und Fermentationsparameter in der Pansensimulationstechnik (RUSITEC).

Item	Behandlung [†]					SEM [§]	p-Werte ⁺						
	KFA	PLA	LOW	MED	HIGH		KFA	Dosis	KFA× Dosis	L	Q	$\beta_L > F$	$\beta_Q > F$
Abbaubarkeit [g/kg T]													
Trockenmasse	KFN	640	718	638	596	26	0.640	0.041	0.335	0.464	0.229	0.364	0.216
	KFH	655	687	627	658					0.703	0.743		
Org. Masse	KFN	643	723	642	601	26	0.654	0.052	0.254	0.395	0.170	0.275	0.136
	KFH	658	687	628	669					0.621	0.620		
NDF [#]	KFN	358	505	362	293	49	0.091	0.246	0.145	0.346	0.149	0.349	0.162
	KFH	310	319	288	350					0.699	0.585		
Gasproduktion [mL/Tag]													
Gasbildung ges	KFN	1902	1904	1664	1818	18	0.506	0.600	0.978	0.411	0.479	0.823	0.732
	KFH	1844	1797	1648	1654					0.543	0.705		
Gaszusammensetzung [Vol.-%]													
CH ₄	KFN	5.8	5.1	2.2	0.2	0.3	0.138	<0.001	0.094	0.002	0.566	0.082	0.124
	KFH	5.5	5.0	3.6	0.5					0.241	0.119		
CO ₂	KFN	36.6	38.5	39.6	33.5	1.9	0.567	0.430	0.302	0.146	0.066	0.173	0.086
	KFH	35.6	37.8	35.0	36.6					0.979	0.959		
H ₂	KFN	0.2	0.9	2.6	3.9	0.5	0.755	<0.001	0.458	0.046	0.579	0.233	0.307
	KFH	0.5	1.2	1.5	3.7					0.699	0.368		
CH ₄ /CO ₂	KFN	0.157	0.131	0.055	0.004	0.01	0.024	<0.001	0.026	<0.001	0.220	0.035	0.048
	KFH	0.155	0.133	0.102	0.014					0.177	0.082		
CO ₂ /CH ₄	KFN	6.4	7.8	18.9	915.6	193	0.185	0.036	0.179	0.398	0.066	0.592	0.238
	KFH	6.5	7.6	10.0	163.6					0.887	0.741		
CH ₄ /H ₂	KFN	39.45	5.84	0.86	0.04	2.65	0.002	<0.001	0.001	<0.001	0.001	0.001	0.002
	KFH	10.53	4.32	3.00	0.22					0.183	0.422		
Fermentationsparameter [mmol/g abgebauter T]													
Flüchtige Fettsäuren	KFN	7.18	6.86	7.11	7.36	0.26	0.012	0.050	0.409	0.569	0.416	0.468	0.997
	KFH	6.22	6.26	6.56	7.32					0.927	0.418		
Fettsäuremuster [mol %]													
Azetat	KFN	53.4	53.1	49.4	51.0	1.1	0.548	0.044	0.705	0.097	0.193	0.180	0.267
	KFH	51.4	52.3	49.8	50.7					0.594	0.730		
Propionat	KFN	17.9	18.4	18.1	13.8	0.7	0.326	0.012	0.029	0.197	0.017	0.683	0.135
	KFH	16.2	15.9	17.2	16.0					0.387	0.385		
Butyrat	KFN	13.6	13.5	15.5	15.3	1.1	0.190	0.864	0.281	0.414	0.629	0.495	0.988
	KFH	16.7	16.7	16.1	14.6					0.964	0.641		
Iso-butyrat	KFN	0.91	0.82	0.83	0.79	0.03	0.003	<0.001	0.014	0.134	0.371	0.170	0.034
	KFH	0.98	1.00	0.92	0.74					0.821	0.052		
Valerat	KFN	4.9	4.3	5.8	4.5	0.4	0.122	0.005	0.255	0.238	0.209	0.772	0.872
	KFH	6.2	5.9	6.5	4.8					0.396	0.152		
Iso-valerat	KFN	9.3	9.8	10.4	14.7	0.8	0.044	<0.001	0.893	0.828	0.102	0.797	0.867
	KFH	8.6	7.9	9.4	13.1					0.569	0.066		
C ₂ /C ₃ Ratio [§]	KFN	3.03	2.92	2.77	3.80	0.2	0.832	0.011	0.032	0.068	0.008	0.414	0.090
	KFH	3.23	3.36	2.91	3.19					0.335	0.392		

pH	KFN	6.39	6.29	6.44	6.42	0.05	0.019	0.552	0.083	0.912	0.830	0.880	0.495
	KFH	6.49	6.51	6.48	6.40					0.753	0.470		
<i>Eh</i> [mV] [‡]	KFN	-279	-244	-302	-268	12	0.066	0.010	0.517	0.623	0.645	0.100	0.178
	KFH	-308	-271	-299	-281					0.621	0.745		
Effluent [mL/Tag]	KFN	656	588	650	655	25	0.950	0.789	0.065	0.442	0.328	0.433	0.361
	KFH	622	666	625	642					0.731	0.752		
NH ₃ -N [mg/L]	KFN	157	165	136	142	8	0.009	0.006	0.499	0.344	0.611	0.187	0.125
	KFH	214	235	207	191					0.608	0.228		

[†]Werte dargestellt als LS-means. [‡]SEM, Standardfehler der Mittelwerte. [‡]Effekte von KFA, 3-NOP Dosierung und Interaktionen zwischen den Faktoren; L, Q, *p*-Werte der linearen und quadratischen Effekte von 3-NOP; $\beta_L > F$, $\beta_Q > F$, Wahrscheinlichkeit unter H_0 , dass eine F-verteilte Zufallsvariable die beobachteten F-Werte für die Unterschiede der linearen und quadratischen Regressionskoeffizienten zwischen KFN und KFH übersteigt. NDF[#], Neutrale-Detergenzienfaser. [§]C₂/C₃ Ratio, Azetat/Propionat Ratio. [¶]*Eh*, Redoxpotential.

2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die Verwendung der Mittel erfolgte entsprechend der im Projekt vorgesehenen Arbeiten und gemäß Zuwendungsbescheid. Die Personalmittel wurden zur Finanzierung einer Doktorandenstelle für 3 Jahre (Herr Matthias Schilde) eingesetzt.

Die Reisetätigkeit von Herrn Schilde beinhaltete Reisen, die Teilnahme an Tagungen und Arbeitsbesprechungen im Rahmen des Projektes betrafen. Die Verbrauchsmittelgelder wurden für die Beschaffung von Materialien zur Durchführung der Probenahme und der sich anschließenden Analysen eingesetzt

3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die geleistete Arbeit war zur Erreichung der in der Projektplanung vorgegebenen Ziele notwendig und angemessen.

4. Voraussichtlicher Nutzen, Verwertbarkeit des Ergebnisses

Die vorliegende Untersuchung hat gezeigt, dass in vitro-Beobachtungen nur sehr begrenzt auf in vivo-Bedingungen anwendbar sind. Die vorliegende Untersuchung hat gezeigt, dass die Wirksamkeit des CH₄-Inhibitors 3-NOP die Durchführung von Langzeitversuchen unter Berücksichtigung unterschiedlicher Futterrationen und physiologischer Stadien, in denen sich die Tiere befinden, an einer adäquaten Tierzahl durchzuführen sind, um tierindividuelle Einflüsse und interaktive Effekte mit der Futterration zu erfassen sowie potentiell auftretende mikrobielle Adaptationen an den Futterzusatzstoff ausschließen zu können. Die vorliegende Studie hat gezeigt, dass insbesondere Interaktionen zwischen Futterration, Futterzusatzstoff sowie Dosis und Tierindividualität auftreten und vor Inverkehrbringen des Zusatzstoffes zu untersuchen sind. Es hat sich gezeigt, dass eine eindimensionale Betrachtung des Parameters „Methanemission“ nicht ausreichend ist, da eine Reihe weiterer Tiergesundheitsparameter (Pansenfermentationsmuster, weitere Fermentationsgase, klinisch-chemische Blutparameter) durch den Zusatzstoff und auch in Abhängigkeit von der Futterration beeinflusst wurden. Die in dieser Studie angewandte CH₄-Minderungsstrategie basierend auf der Kombination des chemischen Futterzusatzstoffes 3-NOP und hoher Krafftutteranteile in der Ration führte zu synergistischen Effekten auf die Reduktion der Methanemissionen und zeigt perspektivische Potentiale für zukünftige Ansätze auf: Methanminderungsstrategien sollten die möglichen interaktiven Effekte zwischen der Diät und dem CH₄-Inhibitor nutzen. 3-NOP kann als vielversprechender Methaninhibitor betrachtet werden, der die Methanemission um bis zu 33 % senken kann. Jedoch sollte die Anwendung von 3-NOP und die adäquate Dosierung in Abhängigkeit der gefütterten Ration bewertet werden. Weitere Betrachtungen zu Adaptationen der ruminalen Mikrobiota

und des Immunsystems werden empfohlen. Die Ergebnisse der 3-NOP-Diät-Wechselwirkungen hinsichtlich der Wirksamkeit zur Senkung der Methanemission sollten weiterhin in die Fütterungspraxis transferiert, kommuniziert und berücksichtigt werden, damit die Anwendung von 3-NOP in der Praxis nur bei ausreichender Wirksamkeit erfolgt. Die Anwendung von hohen Kraftfutteranteilen zur Senkung der Methanemission ist limitiert. So ist eine Normierung der Methanemission (CH₄-Emission absolut, pro kg T-Aufnahme oder pro kg erzeugter Milchmenge) entscheidend für die Berichterstattung. Hohe Kraftfutteranteile erhöhen die absolute Methanemission, senken jedoch die Methanemission pro kg erzeugter Milchmenge. Eine nicht-adäquate, sprich zu hohe, Kraftfutterfütterung ist nicht nur aufgrund negativer Auswirkungen auf die Tiergesundheit (Pansenazidose) bedenklich, sondern steht auch in Konkurrenz zur Lebensmittelerzeugung, es sei denn Nebenprodukte werden als Kraftfutter eingesetzt. Daher sollten Methanminderungsstrategien hinsichtlich tiergesundheitlicher Effekte und in einer Gesamtsystemorientierung mittels Lebenszyklusanalyse bewertet werden. Die nährstoffbedarfsdeckende Versorgung der Milchkuh bleibt im „One Health“ Kontext oberste Priorität (Tiergesundheit bedeutet Klimaschutz). Emissionsmindernde Fütterung sollte basierend auf der Nutzung ressourcenschonender Futtermittel und Zusatzstoffe weiterentwickelt werden.

5. Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Dem ZE ist auf dem im Rahmen des Projekts untersuchtem Gebiet kein Fortschritt bei anderen Stellen bekannt geworden.

6. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen der Ergebnisse

6.1. Erfolgte Veröffentlichungen

Wissenschaftliche Artikel

- 2021 Schilde, M.; von Soosten, D.; Hüther, L.; Kersten, S.; Meyer, U.; Zeyner, A.; Dänicke, S. *Dose-Response Effects of 3-Nitrooxypropanol Combined with Low and High Concentrate Feed Proportions in the Diet on Fermentation Parameters in a Rumen Simulation Technique*. **Animals** 2021, 11, 1784. doi:<https://doi.org/10.3390/ani11061784>.
- 2021 Schilde, M.; von Soosten, D.; Hüther, L.; Meyer, U.; Zeyner, A.; Dänicke, S. *Effects of 3-nitrooxypropanol and varying concentrate feed proportions in the ration on methane emission, rumen fermentation and performance of periparturient dairy cows*. **Arch. Anim. Nutr.** 2021, 75, 79-104, doi:<https://doi.org/10.1080/1745039X.2021.1877986>.

Tagungsbeiträge

- 2021 Schilde, M.; von Soosten, D.; Hüther, L.; Frahm, J.; Kersten, S.; Meyer, U.; Zeyner, A.; Dänicke, S. *Effekte von 3-Nitrooxypropanol und variierendem Konzentratanteil in der Ration auf die Methanemission, Pansenfermentation sowie Leistungsparameter bei* Schlussbericht nach Nr. 3.2 BNBest-BMBF 98

Milchkühen im peripartalen Zeitraum. Forum angewandte Forschung in der Rinder- und Schweinefütterung, Online conference 27./28. April 2021, Verband der Landwirtschaftskammern – *Scientific Talk*.

- 2021 Schilde, M.; von Soosten, D.; Hüther, L.; Frahm, J.; Kersten, S.; Meyer, U.; Zeyner, A.; Dänicke, S. *Effects of 3-Nitrooxypropanol and varying concentrate feed proportions in the ration on rumen volatile fatty acids and hepatic function parameters in peripartal dairy cows. Proceedings of the Society of Nutrition Physiology*, 2021, 30, p. 124 – *Scientific Talk*.
- 2020 Steinmetz, M.; von Soosten, D.; Meyer, U.; Zeyner, A.; Dänicke, S. *Effects of 3-Nitrooxypropanol and varying concentrate feed proportions in the ration on mobilization of fat depot masses in dairy cows. Proceedings of the Society of Nutrition Physiology*, 2020, 29, p. 97– *Poster*.
- 2020 Steinmetz, M.; von Soosten, D.; Hüther, L.; Frahm, J.; Kersten, S.; Meyer, U.; Zeyner, A.; Dänicke, S. *Effects of 3-Nitrooxypropanol and varying concentrate feed proportions in the ration on methane emissions, ketone bodies in blood serum and energy balance in peripartal dairy cows. Proceedings of the Society of Nutrition Physiology*, 2020, 29, p. 96 – *Scientific Talk*.
- 2019 Steinmetz, M., Johannes, M., von Soosten, D., Meyer, U., Westendarp, H., Dänicke, S. *Untersuchungen zur Futterselektion einer Totalen-Mischration (TMR) bei Milchkühen mittels Penn State Particle Separator (PSPS). 131. VDLUFA conference*, Giessen, 2019, p. 92, VDLUFA-Verlag, Darmstadt, Germany – *Poster*.

Vorträge

- 2021 Schilde, M. *Ein Teelöffel Pulver gegen den „Klimakiller Kuh“? Chancen einer kombinierten Methanminderungsstrategie mittels Futterzusatzstoff und Rationsgestaltung. Wissenschaftliches Symposium aus Anlass des 111. Jubiläums des FLI: One Health - Forschung für die Gesundheit von Mensch, Tier und Umwelt*, Alfred-Krupp-Wissenschaftskolleg, Greifswald, 11 – 12 October 2021 – *Scientific Talk*.
- 2021 Schilde, M. *„Unter 2 Grad – der KlimAgrar-Transferpodcast“: Interview des Projektes Innovative Hochschule Potsdam mit Matthias Schilde über seine Arbeit bei Metha-NiKuh*. Universität Potsdam, © Innovative Hochschule Potsdam / KlimAgrar, 2021 – *Podcast*.
- 2021 Schilde, M., von Soosten, D., Hüther, L., Frahm, J., Kersten, S., Meyer, U., Zeyner, A., Dänicke, S. *Inside view of the project MethaNiKuh - Effects of 3-nitrooxypropanol and concentrate feed proportions on methane emissions, rumen fermentation and energy metabolism in peripartal dairy cows. KlimAgrar – Workshop: „Futter: alte und neue Futtermittel, regionaler Anbau und internationaler Handel“*, Online-Workshop, 4 March 2021 – *Scientific Talk*.

6.2. Geplante Veröffentlichungen

- 2021 Schilde, M.; von Soosten, D.; Frahm, J.; Kersten, S.; Meyer, U.; Zeyner, A.; Dänicke, S. *Assessment of Metabolic Adaptations in Periparturient Dairy Cows Provided 3-Nitrooxypropanol and Varying Concentrate Proportions by Using the GreenFeed System*

for Indirect Calorimetry, Biochemical Blood Parameters and Ultrasonography of Adipose Tissues. **Dairy** 2021, *accepted*.

2022

Schilde, M., Billenkamp, F., Höper, D., Bühler, S., Hüther, L., von Soosten, D., Meyer, M., Zeyner, A., Dänicke, S. *Alterations in the ruminal microbiome diversity and composition of periparturient dairy cows supplied with 3-Nitrooxypropanol and varying concentrate feed proportions in the ration. Proceedings of the Society of Nutrition Physiology, 2022, submitted – Scientific Talk*

III. Kurzfassung

Die Methanemissionen aus der enterischen Fermentation des Futters bei Wiederkäuern tragen mit einem Anteil von 39.4 % zu den gesamten anthropogen verursachten Treibhausgasemissionen der Landwirtschaft in Deutschland bei. Die Methanogenese führt zu einem Verlust von bis zu 12 % der mit dem Futter aufgenommenen Bruttoenergie, stellt jedoch den bedeutendsten Stoffwechselweg zur Elimination des während der Pansenfermentation anfallenden Wasserstoffs dar. Der chemische Methaninhibitor 3-Nitrooxypropanol (3-NOP) ist ein Strukturanalogon zu Methyl-Coenzym M und inaktiviert das Enzym Methyl-Coenzym M Reduktase, das den letzten Schritt der Methanogenese katalysiert. Es konnte gezeigt werden, dass 3-NOP zu einer Verschiebung des ruminalen Fermentationsmusters in Richtung erhöhter Propionsäure- und niedrigerer Azetatanteile führt. Die Fütterung hoher Krafftutteranteile (KFA) in der Ration ist als eine indirekte Methanminderungsstrategie bekannt. In diesem Zusammenhang führen die erhöhten Anteile an Nicht-Faserkohlenhydraten zu einer vermehrten wasserstoffverbrauchenden Propionsäurebildung und damit zu einer Substratkonkurrenz mit der Methanogenese im Pansen. Im perinatalen Zeitraum unterliegen Milchkühe drastischen endokrinologischen und stoffwechselbedingten Veränderungen. Diese werden von einer negativen Energiebilanz begleitet, wenn der Energiebedarf für die Milchsynthese die Energiezufuhr auf Grund der verminderten Futteraufnahme übersteigt. Infolge dessen kommt es zu einer massiven Mobilisierung von Körperenergieserven in Form von nicht-veresterten freien Fettsäuren (NEFA), was zu einer Akkumulation von β -Hydroxybuttersäure (BHB) in der Blutzirkulation führt und mit Erkrankungen des Stoffwechsels und der Leber verbunden ist.

Daraus ergeben sich folgende Fragestellungen: Der kombinierte Ansatz der Fütterung von 3-NOP und hohen Krafftutteranteilen in der Ration führt zu additiven Effekten auf eine verminderte Methanogenese, insofern als dass sich die oben beschriebenen Wirkmechanismen der Faktoren 3-NOP und KFA auf die Methaninhibierung unterscheiden. Zudem werden weitere synergistische Effekte der kombinierten Methanminderungsstrategie erwartet, da die begünstigte wasserstoffverbrauchende Propionsäurebildung aus der stärkereichen Ration die von 3-NOP induzierte erhöhte Wasserstoffakkumulation im Pansen kompensieren könnte, wodurch die 3-NOP Effizienz gesteigert werden würde. Des Weiteren könnte die erhöhte Synthese von glukogenem Propionat als Resultat der Fütterung einer krafftutterreichen Ration sowie der von 3-NOP induzierten Verschiebung der Fermentationsprozesse zusammen mit der erhöhten Futtereffizienz durch die verminderte Methanogenese zu einer verbesserten Energieversorgung der Milchkuh im perinatalen Zeitraum beitragen.

Zur Beantwortung dieser Hypothesen wurden 55 pluripare Milchkühe der Rasse Deutsche Holstein während der perinatalen und frühlaktierenden Phase, die den Zeitraum von Tag 28

ante partum bis Tag 120 post partum überspannte, in einem Exakt-Fütterungsversuch verwendet. Die Kühe wurden in einem 2×2 faktoriellen Versuchsdesign nach hohem (KFH) und niedrigem (KFN) KFA sowie einer Supplementierung mit (3-NOP) oder ohne (KON) 50 mg 3-NOP pro kg Futter-Trockenmasse in der Ration gruppiert. Im Zeitraum vor der Kalbung betrug der KFA in der KFN-Gruppe 15 %, der der KFH-Gruppe 40 %. Vom Zeitpunkt der Kalbung bis Tag 21 post partum wurde der KFA in der KFH-Gruppe schrittweise von 30 % auf 55 % angehoben, wohingegen der KFA der KFN-Gruppe auf 30 % in der Ration festgelegt wurde. Die Methanemissionen wurden mit Hilfe des GreenFeed Systems (C-Lock Inc., Rapid City, SD, USA) quantifiziert und die Futteraufnahme über Wiegetröge erfasst. Die Probenentnahmen von Pansenflüssigkeit, Blut und der Ration erfolgten zu verschiedenen Zeitpunkten. Ultraschallmessungen der Fettauflagen zur Abschätzung der Fettdepotmassen sowie die Körperkonditionsbeurteilung wurden durchgeführt, um potentielle Behandlungseffekte auf die Körperfettmobilisierung zu untersuchen. Zusätzlich wurden Dosis-Wirkungs-Beziehungen zwischen 3-NOP Dosierungen von 0, 73, 160 und 1200 mg 3-NOP pro kg Futter-Trockenmasse kombiniert mit hohem und niedrigem KFA in einem 4×2 faktoriellen Design mit Hilfe der Pansensimulationstechnik (RUSITEC) untersucht.

Die in der vorliegenden in vivo Studie gezeigten interaktiven Effekte resultierend aus der Supplementierung einer kraffturreichen Ration mit 50 mg 3-NOP pro kg Futter-Trockenmasse führten zu einer Reduktion der CH₄-Emissionen (g/Tag, g/kg Futter-Trockenmasseaufnahme, g/kg energiekorrigierte Milchmenge) um 33 %. In der mit 3-NOP supplementierten KFN-Gruppe wurde eine weniger persistente und ausgeprägte Minderung der CH₄-Emission beobachtet, diese betrug über den gesamten Versuchsverlauf gemittelt 23 %. Unter der Annahme, dass diese Wirkung von 3-NOP in allen Produktionssystemen mit Wiederkäuern in Deutschland erreicht werden würde und anhaltend wäre, könnte 3-NOP die Treibhausgasemissionen um 5,75 (KFN) bis 8,25 (KFH) Millionen Tonnen CO₂-Äquivalente reduzieren, was einem Anteil von 0,67% bis 0,96% an den gesamten deutschen Treibhausgasemissionen (858 Millionen Tonnen CO₂-Äquivalente in 2018) entspräche. Die Fütterung hoher KFA in der Ration reduzierte die CH₄-Emissionen pro kg Futter-Trockenmasse sowie pro kg energiekorrigierter Milchmenge um 12 % bis 17 %, wobei die Reduktion der absoluten CH₄-Emissionen (g/Tag) mit 4 % in den Kontrollgruppen geringer ausfiel. Die in vivo beobachteten interaktiven Effekte zwischen 3-NOP und dem KFA in der Ration konnten in vitro nicht bestätigt werden. Allerdings zeigte sich, dass die genannten 3-NOP Dosierungen zu einer linearen Abnahme der Methanproduktion um 12 %, 61 % und 97 % in den KFN-Behandlungen und um 10 %, 35 % und 90 % in den KFH-Behandlungen führten. Die Reduktion der CH₄-Emissionen war begleitet von einem 27-fachen Anstieg der Wasserstoffemission in vitro, wobei negative Effekte auf die Abbaubarkeit der Trockensubstanz nicht beobachtet wurden. Zudem zeigten sich keine Behandlungseffekte auf die Gesamtproduktion an flüchtigen Fettsäuren, die Abundanz der Protozoen

Schlussbericht nach Nr. 3.2 BNBest-BMBF 98

sowie den pH-Wert in der Pansenflüssigkeit unter in vitro und, mit Ausnahme des Effekts der Kalbung, unter in vivo Bedingungen. Allerdings wurden signifikante Effekte von 3-NOP, dem KFA in der Ration und der Kalbung auf die molaren Anteile der flüchtigen Fettsäuren in der Pansenflüssigkeit festgestellt. Die Supplementierung von 3-NOP führte unter in vivo Bedingungen zu einer Verschiebung der Fermentationsprozesse in Richtung einer erhöhten wasserstoffverbrauchenden Bildung von Propion-, Valerian- und iso-Valeriansäure, wohingegen die der wasserstoffreisetzenden Essigsäure reduziert war. Im RUSITEC-Experiment verblieben die alternativen Wasserstoffsäuren Propion- und Valeriansäure unverändert, während die molaren Anteile an Essigsäure ebenfalls mit zunehmender 3-NOP Dosierung abnahmen.

Unabhängig von der 3-NOP Zulage wurde eine höhere Futter-Trockenmasseaufnahme bei den KFH-Gruppen beobachtet, die zudem zum Zeitpunkt der Kalbung in allen Gruppen deutlich abnahm. Der Milchlaktosegehalt war im Vergleich zur Kontrolle in den Kühen mit Supplementierung von 3-NOP höher, während ein niedrigerer Milchfettgehalt in der 3-NOP-KFN-Gruppe sowie eine reduzierte 4 % fettkorrigierte Milchmenge in der 3-NOP-KFH-Gruppe beobachtet wurden. Die Energiebilanz der 3-NOP-KFH-Gruppe war positiver als die der anderen Gruppen. Die mit der Konvertierung der Futter-Bruttoenergie assoziierten Energieverluste in Form von CH₄ betragen 5,8 % und 6,7 % der Gesamt-Bruttoenergieaufnahme in den KFN- bzw. KFH-Gruppen. Diese Futterineffizienz wurde kalkulatorisch durch 3-NOP um 2 % bzw. 1,6 % reduziert, was theoretisch zu einer zusätzlichen Energiezufuhr geführt haben könnte, die für einen Anstieg der Milchleistung um 0,86 kg in den KFH-Gruppen bzw. 0,59 kg in den KFN-Gruppen ausreichen würde. Der Effekt einer potentiell verbesserten Futtereffizienz wurde in der vorliegenden Studie jedoch nicht in Form einer erhöhten Milchleistung oder Körpermassezunahme wiedergefunden. Allerdings zeigte sich ein signifikant reduzierter NEFA-Spiegel in den Gruppen mit 3-NOP Supplementierung. Demgegenüber wurden keine Effekte von 3-NOP auf die Konzentration an BHB, Glukose und Triglyzeriden im Serum sowie den BCS und die ultrasonographisch bestimmte Mobilisierung von Körperenergie reserven aus den Fettdepots beobachtet. Hierbei wurden teilweise Effekte des KFA in der Ration und der Kalbung festgestellt. Damit ist festzuhalten, dass die beobachteten synergistischen Effekte zwischen 3-NOP und einem hohen KFA auf die Minderung der CH₄-Emission zu keiner konsistent beobachteten Verbesserung der Energieversorgung der Milchkuh beitrugen.

Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass 3-NOP als ein vielversprechender Methaninhibitor mit dosis- und rationsabhängiger Wirksamkeit angesehen werden kann, wobei konsistente positive Effekte von 3-NOP auf das Energiebudget der Kuh in den vorliegenden Experimenten nicht belegt werden konnten. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie implizieren, dass weitere Experimente hinsichtlich der rations- und dosisabhängigen Wirksamkeit von 3-NOP bei Milch-

kühen in unterschiedlichen Laktationsstadien durchgeführt werden sollten, bevor der Zusatzstoff weitverbreitete Anwendung in Milchviehbetrieben findet. Zusätzlicher Forschungsbedarf besteht bezüglich der Fragestellung, inwiefern die beobachteten 3-NOP induzierten Verschiebungen im Fermentationsmuster der flüchtigen Fettsäuren mit strukturellen Veränderungen der mikrobiellen Gemeinschaft im Pansen korrespondieren. Zudem schließt sich die Frage an, ob diese potentiellen Zusammenhänge mittels Infrarotspektroskopie der Milch reflektiert werden können und anschließend in der Entwicklung von Modellen zur Vorhersage der Methanemissionen in einem 3-NOP basierten Methanminderungsszenario für die Treibhausgasinventarisierung Anwendung finden könnten. Untersuchungen zur Genexpression in der Leber genauso wie zu potentiellen Veränderungen im Metabolom im Plasma sowie funktionalen Parametern des Immunsystems könnten einen tieferen Einblick bezüglich eines potentiellen vorteilhaften Effekts der 3-NOP vermittelten Methanminderung auf den Energiestoffwechsel der Kuh geben.

Anhang – Literatur

Czerkawski JW and Breckenridge G. 1977. Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec). *Br. J. Nutr.* 38:371-384.

Dijkstra J, Bannink A, France J, Kebreab E, van Gastelen S. 2018. Short communication: Antimethanogenic effects of 3-nitrooxypropanol depend on supplementation dose, dietary fiber content, and cattle type. *J. Dairy Sci.* 101:9041-9047.

Drackley JK. 1999. Biology of Dairy Cows During the Transition Period: the Final Frontier? *J. Dairy Sci.* 82:2259-2273.

Duin EC, et al. 2016. Mode of action uncovered for the specific reduction of methane emissions from ruminants by the small molecule 3-nitrooxypropanol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 113:6172-6177.

Edmonson AJ, Lean IJ, Weaver LD, Farver T, Webster G. 1989. A Body Condition Scoring Chart for Holstein Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 72:68-78.

Geishauser T. 1993. An instrument for collection and transfer of ruminal fluid and for administration of water soluble drugs in adult cattle. *Bovine Pract.* 27:38-42.

GfE. 1995. Zur Energiebewertung beim Wiederkäuer. *Proc Soc Nutr Physiol.* 4:121-123.

Grummer RR. 1993. Etiology of Lipid-Related Metabolic Disorders in Periparturient Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 76:3882-3896.

Hristov AN, et al. 2015. An inhibitor persistently decreased enteric methane emission from dairy cows with no negative effect on milk production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 112:10663-10668.

Jayanegara A, Sarwono KA, Kondo M, Matsui H, Ridla M, Laconi EB, Nahrowi. 2018. Use of 3-nitrooxypropanol as feed additive for mitigating enteric methane emissions from ruminants: a meta-analysis. *Ital. J. Anim. Sci.* 17:650-656.

Keese C, Meyer U, Rehage J, Spilke J, Boguhn J, Breves G, Danicke S. 2008. On the effects of the concentrate proportion of dairy cow rations in the presence and absence of a fusarium toxin-contaminated triticale on cow performance. *Arch. Anim. Nutr.* 62:241-262.

Knapp JR, Laur GL, Vadas PA, Weiss WP, Tricarico JM. 2014. Invited review: Enteric methane in dairy cattle production: quantifying the opportunities and impact of reducing emissions. *J. Dairy Sci.* 97:3231-3261.

Littell RC, Henry PR, Ammerman CB. 1998. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *J. Anim. Sci.* 76:1216-1231.

Lopes JC, et al. 2016. Effect of 3-nitrooxypropanol on methane and hydrogen emissions, methane isotopic signature, and ruminal fermentation in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 99:5335-5344.

Pappritz J, Meyer U, Kramer R, Weber EM, Jahreis G, Rehage J, Flachowsky G, Danicke S. 2011. Effects of long-term supplementation of dairy cow diets with rumen-protected

conjugated linoleic acids (CLA) on performance, metabolic parameters and fatty acid profile in milk fat. *Arch. Anim. Nutr.* 65:89-107.

Pitta DW, et al. 2021. Temporal changes in total and metabolically active ruminal methanogens in dairy cows supplemented with 3-nitrooxypropanol. *J. Dairy Sci.* 104:8721-8735.

Raschka C, Ruda L, Wenning P, von Stemm CI, Pfarrer C, Huber K, Meyer U, Dänicke S, Rehage J. 2016. In vivo determination of subcutaneous and abdominal adipose tissue depots in German Holstein dairy cattle. *J Anim Sci.* 94:2821-2834.

Romero-Pérez A, Okine EK, Guan LL, Duval SM, Kindermann M, Beauchemin KA. 2015a. Effects of 3-nitrooxypropanol on methane production using the rumen simulation technique (Rusitec). *Anim. Feed Sci. Technol.* 209:98-109.

Romero-Pérez A, Okine EK, Guan LL, Duval SM, Kindermann M, Beauchemin KA. 2016. Effects of 3-nitrooxypropanol and monensin on methane production using a forage-based diet in Rusitec fermenters. *Anim. Feed Sci. Technol.* 220:67-72.

Romero-Pérez A, Okine EK, Guan LL, Duval SM, Kindermann M, Beauchemin KA. 2017. Rapid Communication: Evaluation of methane inhibitor 3-nitrooxypropanol and monensin in a high-grain diet using the rumen simulation technique (Rusitec). *J. Anim. Sci.* 95:4072-4077.

Romero-Pérez A, Okine EK, McGinn SM, Guan LL, Oba M, Duval SM, Kindermann M, Beauchemin KA. 2015b. Sustained reduction in methane production from long-term addition of 3-nitrooxypropanol to a beef cattle diet. *J. Anim. Sci.* 93:1780-1791.

van Gastelen S, Dijkstra J, Binnendijk G, Duval SM, Heck JML, Kindermann M, Zandstra T, Bannink A. 2020. 3-Nitrooxypropanol decreases methane emissions and increases hydrogen emissions of early lactation dairy cows, with associated changes in nutrient digestibility and energy metabolism. *J. Dairy Sci.* 103:8074-8093.

Van Wesemael D, Vandaele L, Ampe B, Cattrysse H, Duval S, Kindermann M, Fievez V, De Campeneere S, Peiren N. 2019. Reducing enteric methane emissions from dairy cattle: Two ways to supplement 3-nitrooxypropanol. *J. Dairy Sci.* 102:1780-1787.

von Soosten D, Meyer U, Weber EM, Rehage J, Flachowsky G, Dänicke S. 2011. Effect of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid on performance, adipose depot weights, and liver weight in early-lactation dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94:2859-2870.