



Vergelijking van methaanemissieniveau en pensmicrobiom van Holstein Friesian kalveren en hun lacterende moederdieren die geclassificeerd waren als laag of hoog methaan producerend

Een dierstudie zonder interventies of behandelingen om te onderzoeken en in hoeverre het pensmicrobiom alsmede het methaanemissie-niveau wordt overgedragen van moederdier op kalf.

Sanne van Gastelen, Harmen van Laar, Soumya Kar, Elianne van der Valk, Edoardo Zaccaria en Léon Šebek



WAGENINGEN
UNIVERSITY & RESEARCH

Openbaar
Rapport 1524

Vergelijking van methaanemissieniveau en pensmicrobioom van Holstein Friesian kalveren en hun lacterende moederdieren die geclassificeerd waren als laag of hoog methaan producerend

Een dierstudie zonder interventies of behandelingen om te onderzoeken in hoeverre het pensmicrobioom alsmede het methaanemissieniveau wordt overgedragen van moederdier op kalf.

Sanne van Gastelen¹, Harmen van Laar¹, Soumya Kar¹, Elianne van der Valk¹, Edoardo Zaccaria¹ en Léon Šebek¹

¹ Wageningen Livestock Research, Wageningen University & Research, Postbus 338, 6700 AH Wageningen, Nederland

Dit onderzoek is uitgevoerd door Wageningen Livestock Research en gesubsidieerd door het ministerie van Landbouw, Visserij, Voedselzekerheid en Natuur, in het kader van het Beleidsondersteunend onderzoek thema 'Emissiereductie methaan veehouderij' (projectnummer BO-43.10-002-011).

Wageningen Livestock Research
Wageningen, november 2024

Rapport 1524

van Gastelen, S., van Laar, H., Kar, S., van der Valk, E., Zaccaria, E. en Šebek, L. 2024. Vergelijking van methaanemissieniveau en pensmicrobioom van Holstein Friesian kalveren en hun lacterende moederdieren die geclassificeerd waren als laag of hoog methaan producerend; Een dierstudie zonder interventies of behandelingen om te onderzoeken en in hoeverre het pensmicrobioom alsmede het methaanemissieniveau wordt overgedragen van moederdier op kalf. Wageningen Livestock Research, Rapport 1524.

Dit rapport is gratis te downloaden op <https://doi.org/10.18174/677391> of op www.wur.nl/livestock-research (onder Wageningen Livestock Research publicaties).



Dit werk valt onder een Creative Commons Naamsvermelding-Niet Commercieel 4.0 Internationaal-licentie.

© Wageningen Livestock Research, onderdeel van Stichting Wageningen Research, 2024

De gebruiker mag het werk kopiëren, verspreiden en doorgeven en afgeleide werken maken. Materiaal van derden waarvan in het werk gebruik is gemaakt en waarop intellectuele eigendomsrechten berusten, mogen niet zonder voorafgaande toestemming van derden gebruikt worden. De gebruiker dient bij het werk de door de maker of de licentiegever aangegeven naam te vermelden, maar niet zodanig dat de indruk gewekt wordt dat zij daarmee instemmen met het werk van de gebruiker of het gebruik van het werk. De gebruiker mag het werk niet voor commerciële doeleinden gebruiken.

Wageningen Livestock Research aanvaardt geen aansprakelijkheid voor eventuele schade voortvloeiend uit het gebruik van de resultaten van dit onderzoek of de toepassing van de adviezen.

Wageningen Livestock Research is NEN-EN-ISO 9001:2015 gecertificeerd.

Op al onze onderzoeksopdrachten zijn de Algemene Voorwaarden van de Animal Sciences Group van toepassing. Deze zijn gedeponeerd bij de Arrondissementsrechtbank Zwolle.

Wageningen Livestock Research Rapport 1524

Inhoud

Voorwoord	5	
Samenvatting	7	
1	Introductie	9
2	Materiaal en Methoden	11
2.1	Moederdieren	11
2.1.1	Moederdieren voedingsstal	11
2.1.2	Moederdieren beweidingsproef	11
2.1.3	Afkalven	12
2.1.4	Orale uitstrijkjes	12
2.1.5	Methaanemissie moederdieren – indeling kalveren	12
2.2	Kalveren	17
2.2.1	Fase 1 – de eerste 24 levensuren	17
2.2.2	Fase 2 – individuele huisvesting kalveriglo's tot 3 weken leeftijd	19
2.2.3	Fase 3 – groepshuisvesting zonder metingen tot 12 à 15 weken leeftijd	19
2.2.4	Fase 4 – groepshuisvesting met metingen tot 16 à 19 weken leeftijd	20
2.3	Monsternamen en metingen	21
2.3.1	Methaanemissie metingen	21
2.3.2	Voermonsters en chemische analyse	21
2.3.3	Orale uitstrijkjes en microbiële analyse	21
2.4	Microbiële analyse	22
2.5	Data-analyse	22
2.5.1	Statistische analyse kalf gegevens	22
2.5.2	Microbiële statistische analyse	23
3	Resultaten	24
3.1	Lichaamsgewicht, lichaamsafmetingen en groei	24
3.2	Voeropname	24
3.3	Methaanemissies	24
3.4	Microbioom	27
3.4.1	Moederdieren	27
3.4.2	Moederdieren in relatie tot de kalveren	29
3.4.3	Kalveren	31
4	Discussie	34
4.1	Effect van week	34
4.2	De moederdieren	34
4.2.1	Methaanemissie	34
4.2.2	Pensmicrobioom	34
4.3	De kalveren	35
4.3.1	Opfok	35
4.3.2	Groei en voeropname	35
4.3.3	Methaanemissie	36
4.3.4	Pensmicrobioom	39
5	Conclusies	41
	Literatuur	42
Bijlage 1	Verklarende variabelen variatie methaanemissie	46

Voorwoord

De wereldwijde klimaatdoelstellingen voor de lange termijn, die in december 2015 door bijna 200 landen zijn aangenomen met het Akkoord van Parijs, impliceren de noodzaak van meer inspanningen voor broeikasgasemissiereducties in Nederland. Ten opzichte van het referentiejaar 1990 moet de Nederlandse uitstoot van broeikasgassen in 2030 met 55% en in 2050 met 95% dalen. De vertaling van de doelen van het internationale klimaatregime naar de context van Nederland is gebaseerd op de vergelijking van verschillende emissiereductiescenario's. Deze scenario's omvatten reductiedoelstellingen voor de zuivelsector en hebben tot gevolg dat het verminderen van methaanemissies van o.a. melkvee noodzakelijk is. Dit betreft de totale methaanmissie van de melkveestapel, bestaande uit methaan die vrijkomt uit de koe (enterische methaan; ~70% van de methaanemissie in de melkveehouderij) en methaan uit de mest (~30% van de methaanemissie in de melkveehouderij).

De reductie van de methaanemissie (in CO₂ equivalenten) is niet alleen belangrijk binnen het Nederlandse klimaatakkoord. Nederland heeft zich in 2021 ook gecommitteerd aan de Global Methane Pledge en heeft dan ook een Nationale methaanstrategie opgesteld. In 2030 moet de nationale methaanemissie 30% lager zijn dan de methaanemissie in 2020.

De reductiepotentie voor enterische methaanemissie bij melkvee groot is en op basis daarvan zijn 3 sporen voorgesteld om methaanemissie te reduceren, namelijk via voerstrategieën, via fokkerijstrategieën en via beïnvloeding van het microbiom in de pens. Het in dit rapport beschreven onderzoek richt zich op het spoor van microbiom en heeft als doel in kaart te brengen in hoeverre het pensmicrobiom alsmede het methaanemissieniveau overdragen wordt van moederdier op kalf zonder interventie of behandelingen. Dit onderzoek is uitgevoerd door Wageningen Livestock Research en gefinancierd door het Ministerie van Landbouw, Visserij, Voedselzekerheid en Natuur en maakt deel uit van de programmatische aanpak 'Integraal Aanpakken' als onderdeel van de Klimaatenvolpe.

Samenvatting

Dit onderzoek had als doel om in kaart te brengen in hoeverre het pensmicrobioom alsmede het methaanemissieniveau overgedragen wordt van moederdier op kalf, zonder gebruik te maken van interventies dan wel behandelingen. Voor dit onderzoek werden de volgende hypothesen opgesteld: (1) de kalveren afkomstig uit moederdieren met een hoge methaanemissie, zullen zelf ook een hoog methaanemissieniveau hebben en (2) het pensmicrobioom van de kalveren zal grote overeenkomsten hebben met het pensmicrobioom van hun moeders.

Deze studie is uitgevoerd op de onderzoeksfaciliteiten van Wageningen Livestock Research (Dairy Campus, Leeuwarden, Nederland) en was opgebouwd uit 2 fases, namelijk (1) de moederdieren en (2) de daarvan afkomstige kalveren. De moederdieren, 38 in totaal, hebben meegelopen in andere studies, waarbij de methaanemissie onder gestandaardiseerde omstandigheden gemeten werd. Op basis van de gemeten methaanemissie, werden de moederdieren ingedeeld als laag methaan producerend dan wel hoog methaan producerend. Tevens werd van de moederdieren een oraal uitstrijkje verzameld rond het moment van afkalven, welke geanalyseerd werden op microbiële samenstelling en waarbij de aanname werd gedaan dat microbiële samenstelling verzameld via het orale uitstrijkje representatief is voor de microbiële samenstelling in de pens.

De geboren kalveren werden op basis van de geboortedatum verdeeld in 4 groepen, waarbij de spreiding in leeftijd tussen het jongste en oudste kalf binnen een groep maximaal 28 dagen (4 weken) was. De kalveren kregen direct na de geboorte een methaan ranking toegewezen op basis van het methaanemissieniveau van de moederdieren (d.w.z. laag dan wel hoog methaan producerend). Na de geboorte verbleven de kalveren 1 tot 1,5 uur bij de moeder, waarna ze gescheiden werden van de moederdieren en verplaatst werden naar een eenling box. Binnen 24 uur ontvingen de kalveren minimaal 6 liter biest, bij voorkeur afkomstig van de eigen moeder. Na 24 uur werden de kalveren verplaatst naar kalveriglo's voor individuele huisvesting gedurende 3 weken. Vanaf dat moment ontvingen de kalveren tweemaal daags kalvermelk en werd er onbeperkt drinkwater en een complete mix van ruwvoer en krachtvoer (vanaf nu kalver TMR genoemd) aangeboden. Vanaf 3 weken leeftijd werden de kalveren verplaatst naar een groepshuisvesting, op basis van methaan ranking. Gedurende deze periode ontvingen de kalveren kalvermelk op individueel dierniveau via een kalverdrinkautomaat. Daarnaast was er onbeperkt drinkwater beschikbaar en werd de kalver TMR onbeperkt op groepsniveau aangeboden. De kalveren werden gespeend op 10 weken leeftijd, waarna ze enkel nog water en kalver TMR aangeboden kregen. Pas wanneer het jongste kalf van een bepaalde groep kalveren een leeftijd van 12 weken had bereikt (op dit moment waren de oudste kalveren binnen de groep ruwweg 15 à 16 weken oud), ging de meetperiode van start voor de groep kalveren. Gedurende deze periode van 4 weken werden de dieren als groep gevoerd (d.w.z. onbeperkt kalver TMR en drinkwater) en werd de methaanemissie individueel gemeten. Tevens werd van ieder kalf een oraal uitstrijkje verzameld voor microbiële analyse.

Het verschil in methaanemissie tussen de laag en hoog methaan producerende moederdieren was 10 dan wel 15% (beweidingsproef en voedingsstal, respectievelijk). De samenstelling van het pensmicrobioom was ook verschillend tussen de laag en hoog methaan producerende moederdieren. Bij de kalveren zagen we, op de opname van kalver TMR na (tendens), geen verschil in de groei, lichaamsgewicht, lichaamsafmetingen, opname van de GreenFeed lokbrok en de totale voeropname (TMR + GreenFeed lokbrok) tussen de kalveren die een lage dan wel hoge methaan ranking toegewezen hebben gekregen op basis van de methaanemissie van de moederdieren. De resultaten rondom de methaanemissie van de kalveren waren niet eenduidig en verschillen bovendien met de eenheid waarin de methaanemissie uitgedrukt werd. Wanneer er sprake was van een verschil in de methaanemissie, was dit juist in tegenovergestelde richting, namelijk 7 tot 8% lager bij de kalveren die een hoge methaan ranking toegewezen hadden gekregen t.o.v. de kalveren die een lage methaan ranking toegewezen hadden gekregen. Dit geeft aan dat het niveau van de methaanemissie niet 1 op 1 van moederdier op kalf overgedragen wordt. Dus wanneer een moederdier een relatief lage hoeveelheid methaan produceert, zal dit niet direct gelden voor het kalf dat uit dat moederdier wordt geboren.

De samenstelling van het pensmicrobioom van de kalveren verschilde sterk van dat van de moederdieren. Er kon namelijk maar liefst 23,48% van de variatie in de samenstelling van het pensmicrobioom verklaard worden door alleen het type dier (d.w.z. moederdier t.o.v. kalf). Mogelijke oorzaken zijn enerzijds dat de pens van de kalveren nog volop in ontwikkeling was i.t.t. de pens van de moederdieren en anderzijds dat het rantsoen van de kalveren sterk verschilde van het rantsoen van de moederdieren in grondstoffen en chemische samenstelling. De bacteriën die voornamelijk bij kalveren gevonden werden, spelen hoofdzakelijk een rol bij de vroege kolonisatie en ontwikkeling van de pens. Bij de moederdieren daarentegen waren voornamelijk bacteriën in de pens aanwezig die in verband kunnen worden gebracht met het verteren van complexe koolhydraten. Daarnaast bleek dat de samenstelling van het pensmicrobioom van de kalveren niet sterker is gerelateerd (d.w.z. meer gelijkenis vertoond) met de samenstelling van het pensmicrobioom van het eigen moederdier (biologisch kalf-moederpaar) dan met de samenstelling van het pensmicrobioom van elk ander moederdier (willekeurig kalf-moederpaar). Dit is mogelijk deels te verklaren door het feit dat bij de helft van de kalveren (een deel) van de biest afkomstig was van 'donordieren'. Dus van een andere koe dan van haar of zijn eigen moeder. Verder was er een duidelijke overlap te zien in de samenstelling van het pensmicrobioom van de kalveren, ongeacht de toegewezen methaan ranking. Dit geeft aan dat het pensmicrobioom van de kalveren, of zij nu een lage dan wel een hoge methaan ranking toegewezen hadden gekregen, zeer vergelijkbaar was. Echter, er was een klein, maar significant verschil zichtbaar, waarbij 1,15% van de variatie in het pensmicrobioom van de kalveren verklaard werd door de toegewezen methaan ranking (o.b.v. de methaanemissie van de moederdieren). Deze resultaten suggereren dat niet de methaan ranking, maar andere factoren wellicht een belangrijkere rol spelen bij de ontwikkeling van de samenstelling van het pensmicrobioom van de kalveren.

In conclusie, in de experimentele omstandigheden van deze studie laten de resultaten zien (1) dat het methaanemissieniveau van moederdieren niet overgedragen werd op de kalveren en (2) dat andere factoren dan het pensmicrobioom van de moederdieren een belangrijkere rol speelden bij de vorming van de samenstelling van het pensmicrobioom van de kalveren. Maternale overdracht van pensmicrobioom en methaanemissieniveau lijkt dus slechts een kleine rol te spelen en lijkt geen belemmering (maar ook geen voordeel) te vormen voor interventiemogelijkheden om de methaanemissie van een veestapel te verlagen. Dit heeft ons doen besluiten het vervolgonderzoek te richten op een actieve overdracht, namelijk het op jonge leeftijd (gedurende de periode dat micro-organismen de pens koloniseren) enten van de pens met een extern en laag methaan producerend microbioom.

1 Introductie

Methaan wordt in de pens van herkauwers gevormd als gevolg van microbiële fermentatie van het geconsumeerde voer. Methaan is een broeikasgas wat een belangrijke bijdrage levert aan de opwarming van de aarde. Het is het doel de methaanemissie uit de melkveehouderij in 2030 met 30% te reduceren ten opzichte van de methaanemissie in 2020, conform het doel van de Nationale Methaanstrategie (ook wel 'Global Methane Pledge'). In potentie kan het doel van de Nationale Methaanstrategie voor volwassen melkvee gerealiseerd worden met voerstrategieën, eventueel in combinatie met voeradditieven. Echter, na 2030 zal een verdere reductie van de methaanemissie nodig zijn om bij te dragen aan de doelen zoals beschreven in de Klimaatwet. Daarvoor zullen aanvullende maatregelen nodig zijn. Eén van die mogelijkheden is het verlagen van het basisniveau van de methaanemissie van de melkveestapel. Dit zou gerealiseerd kunnen worden door de ontwikkeling van het pensmicrobioom van het jonge kalf te sturen richting een lage methaanemissie. Deze sturing zou op 2 manieren kunnen plaatsvinden: (1) maternale overdracht van moederdier op kalf of (2) actief sturen door het enten van de pens met een extern microbioom. Dit onderzoek richt zich specifiek op de eerste manier, namelijk maternale overdracht.

Het pensmicrobioom blijkt, naast voeding en genetica van het dier, verantwoordelijk voor variatie in methaanproductie (g/d) van volwassen melkkoeien (Difford et al., 2018; Ramayo-Caldas et al., 2020). Met andere woorden, wanneer dieren verschillen in methaanemissie, zou dit verschil veroorzaakt kunnen worden door een verschillend pensmicrobioom. Op de invloed van voeding na, blijkt het pensmicrobioom van een volwassen koe lastig te veranderen (Henderson et al., 2015; Weimer et al., 2015). Mogelijke oorzaken hiervoor zijn de algemene anatomie van de pens (bijv. grootte en doorstromingsnelheid), invloed van het immuunsysteem van de koe op het pensmicrobioom d.m.v. uitscheiding van antilichamen in speeksel (Yáñez-Ruiz et al., 2015), alsmede mogelijke relaties tussen de genetica van de koe en het pensmicrobioom (Wallace et al., 2019).

Het pensmicrobioom van een volwassen koe is het resultaat van de ontwikkeling van kalf tot koe. Er zijn studies die laten zien dat er micro-organismen in het meconium (de eerste ontlasting na de geboorte) van het kalf aanwezig zijn, wat suggereert dat er reeds voor de geboorte micro-organismen in het maagdarmkanaal van het kalf aanwezig zouden zijn (Nylund et al., 2014). Toch wordt doorgaans aangenomen dat een kalf effectief steriel wordt geboren (d.w.z. zonder microbioom in de pens en de rest van het maagdarmkanaal). De vestiging van het pensmicrobioom is het gevolg van blootstelling aan zowel maternale als omgevingsmicro-organismen. De eerste blootstelling gebeurt in het geboortekanaal van de koe, door vaginale micro-organismen (Diao et al., 2019). De verdere ontwikkeling van het pensmicrobioom na de geboorte wordt beïnvloed door oraal contact met de buitenwereld, bijvoorbeeld door het drooglikken van het kalf door het moederdier, de biest die het kalf ontvangt en contact met de omgeving. Zowel Furman et al. (2020) als Morgavi et al. (2020) laten zien dat de kolonisatie van de pens door micro-organismen grotendeels plaatsvindt in de eerste 20 levensdagen. De meerderheid van de micro-organismen die gedurende deze periode zich in de pens vestigen, vormen de kern/de basis van het pensmicrobioom gedurende de rest van het leven van het kalf, ook wanneer zij een volwassen melkkoe is.

Dit laatste kan mogelijkheden bieden om de ontwikkeling van het pensmicrobioom van het jonge kalf te sturen. Dit sturen zou richting een samenstelling met een lage methaanemissie kunnen zijn, vanwege de relatie tussen het pensmicrobioom en methaanemissie (Wallace et al., 2015; Roehe et al., 2016; Danielsson et al., 2017; Difford et al., 2018; Wallace et al., 2019; Ramayo-Caldas et al., 2020). Dit zou gerealiseerd kunnen worden door het enten van de pens op jonge leeftijd (gedurende de periode dat micro-organismen de pens koloniseren) met een extern en laag methaan producerend microbioom. Of het enten van pensmicrobioom ook praktisch effectief is hangt onder andere af van de vraag hoe dominant maternale overdracht van microbioom is. Het moederdier kan namelijk een belangrijke bron van micro-organismen zijn voor het kalf.

Wanneer een moederdier de samenstelling van het pensmicrobioom doorgeeft aan haar kalf, zou dit een belemmering zijn voor interventiemogelijkheden om de methaanemissie van het kalf (en mogelijk ook in het latere leven als koe) te verlagen via sturing van de ontwikkeling van het pensmicrobioom. Hierover is echter weinig bekend.

Uit een eerdere berekening (zie bijlage 1; Dijkstra et al., 2018), waarbij data van meerdere proeven met melkvee in klimaatrespiratiekamers gebruikt is, kwam naar voren dat koeien die veel methaan uitstoten (in g/d) op het ene rantsoen, ook veel methaan uitstoten op een ander rantsoen. Dit was te verklaren door consequente variatie in voeropname tussen de koeien, waardoor voeropname daarmee de meest sterke factor is om individuele variatie in methaanproductie (in g/d) te verklaren. Echter, de variatie in methaanopbrengst (in g/kg droge stof voeropname) en in methaanintensiteit (in g/kg vet- en eiwitgecorrigeerde melk) kon niet goed verklaard worden uit de variatie in voeropname en melkproductie tussen de individuele koeien. Ook de variatie in verteerbaarheid van het voer tussen de koeien bleek een matig tot soms redelijk verband te hebben met de methaanopbrengst en methaanintensiteit van de koeien. Dit geeft aan dat we veel, maar niet alle variatie in de geobserveerde methaanemissie kunnen verklaren. Dit impliceert ook dat de onverklaarde variatie in methaanemissie (restvariatie) mogelijk toegewezen kan worden aan de variatie in de samenstelling van het pensmicrobioom dan wel in de genetica van de koeien. Eerdere studies hebben laten zien dat het pensmicrobioom 15 tot 25% van de variatie in methaanproductie van volwassen melkkoeien verklaard (Difford et al., 2018; Ramayo-Caldas et al., 2020), waarbij een aantal micro-organismen in de pens sterk geassocieerd zijn met methaanemissie (Danielsson et al., 2017). Daarnaast heeft van Breukelen et al. (2023) laten zien dat de erfelijkheidsgraad voor methaanemissie varieert tussen de 18 en 33%, afhankelijk van de meetmethode (GreenFeed systeem t.o.v. de sniffer) en de periode waarover methaanemissie gemeten is (dag t.o.v. week).

Het hier beschreven onderzoek is ontworpen en uitgevoerd om een beeld te krijgen van de rol van maternale overdracht bij de ontwikkeling van het pensmicrobioom in het jonge kalf enerzijds en de mate waarin daarmee het methaanemissieniveau wordt overgedragen anderzijds.

2 Materiaal en Methoden

De dierstudie is uitgevoerd van februari t/m augustus 2021 op de onderzoeksfaciliteiten van Wageningen Livestock Research (Dairy Campus, Leeuwarden, Nederland). De dierstudie was opgebouwd uit 2 fases, namelijk (1) de fase met het testen van de moederdieren en (2) de fase met het testen van de daarvan afkomstige kalveren. De fase van de moederdieren bestond uit het meten van de methaanemissie onder gestandaardiseerde omstandigheden (d.w.z. de moederdieren waren onderdeel van andere dierstudies) alsmede het nemen van een oraal uitstrijkje binnen 24 uur na het afkalven. Dit is gedetailleerd omschreven in sectie 2.1. De fase met de kalveren bestond uit 4 rondes, elk met ruwweg 10 kalveren. Elke ronde bestond uit 3 weken individuele huisvesting in kalveriglo's, gevolgd door groepshuisvesting bij een kalverdrinkautomaat tot het jongste kalf van de groep gespeend en 12 weken oud was, met als laatste 4 meetweken waarbij de methaanemissie van de kalveren werd bepaald en een oraal uitstrijkje werd genomen. Dit is gedetailleerd omschreven in sectie 2.2.

2.1 Moederdieren

De moederdieren, 38 in totaal, hebben meegelopen in andere dierstudies. Hierbij maken we onderscheid tussen een dierstudie die plaatsvond in de voedingsstal van Dairy Campus (29 moederdieren) en een dierstudie die plaatsvond tijdens beweiding (9 moederdieren). We hebben bewust de keuze gemaakt om gebruik te maken van deze dieren en niet van andere melkkoeien uit de melkveestapel van Dairy Campus, omdat van deze dieren de methaanemissie onder gestandaardiseerde omstandigheden gemeten was (d.w.z. binnen een gecontroleerde dierproef).

2.1.1 Moederdieren voedingsstal

Deze moederdieren waren onderdeel van een dierstudie die plaatsvond in de voedingsstal van Dairy Campus, waar zij het controle rantsoen ontvingen dat op individueel dierniveau is gemeten met behulp van RIC bakken. Deze studie is in detail omschreven in van Gastelen et al. (2024). Gedurende de laatste 6 weken van de lactatie ontvingen deze koeien een rantsoen dat specifiek voor de late-lactatie was geformuleerd. Dit rantsoen bestond uit 53% graskuil, 23% maiskuil, 24% krachtvoer (bestaande uit krachtvoerbrok, sojaschroot, gerstemeel en mineralen) op droge stof basis en had gemiddeld 17,9% ruw eiwit, 35,7% neutral detergent fiber (NDF) en 13,3% zetmeel. Zes weken voor de verwachte afkalfdatum werden deze moederdieren drooggezet en ontvingen zij het droogstandsrantsoen. Dit rantsoen bestond uit 27% graskuil, 19% maiskuil, 36% tarwestro en 18% krachtvoer (wederom bestaande uit krachtvoerbrok, sojaschroot, gerstemeel en mineralen) op droge stof basis en had gemiddeld 13,9% ruw eiwit, 50,2% NDF en 11,5% zetmeel. Normaliter wordt er geen krachtvoerbrok tijdens de droogstand gevoerd, maar dit was voor de proef noodzakelijk om methaanemissie te kunnen meten.

Zowel gedurende de laatste 6 weken van de lactatie als tijdens de droogstand werden de koeien gehuisvest in de voedingsstal en werd methaanemissie gemeten door middel van bezoeken van de koeien aan het GreenFeed systeem (C-Lock Inc., Rapid City, South Dakota, Verenigde Staten van Amerika; Zimmerman et al., 2011). De moederdieren werden naar de afkalfstal begeleidt wanneer een moederdier zichtbare verschijnselen van afkalven vertoonde (bijv. verslachte banden, gevuld uier, gezwollen kling en/of zichtbare waterblaas). Ook wanneer verwacht werd dat het moederdier binnen 12 uur zou afkalven, werd het moederdier nog voor de nacht naar de afkalfstal begeleidt.

2.1.2 Moederdieren beweidingproef

Deze moederdieren waren onderdeel van een beweidingproef die plaatsvond in het voorjaar, zomer en najaar van 2020 (Klootwijk et al., 2021).

De methaanemissie van deze moederdieren is niet gemeten rondom het moment van droogstand of afkalven (zoals wel het geval was bij de moederdieren uit de voedingsstalproef), maar tussen de 80 en 250 dagen in lactatie. Ook in deze proef werd de methaanemissie gemeten met behulp van het GreenFeed systeem (in de stal dan wel in de weide). De melkkoeien ontvingen een rantsoen bestaande uit volledig graskuil, volledig vers gras op stal (zomerstalvoeding) of volledige weidegang.

De moederdieren van de beweidingsproef bevonden zich gedurende de droogstand niet meer in de beweidingsproef en dus, conform standaardprocedure Dairy Campus, in de afkalfstal tussen de reguliere dieren van Dairy Campus. Deze moederdieren werden op moment van afkalven verplaatst naar dezelfde locatie in de afkalfstal waar de moederdieren vanuit de voedingsstal zich bevonden.

2.1.3 Afkalven

Tijdens het afkalfproces werden de moederdieren zo veel mogelijk met rust gelaten tot de 2 pootjes van het kalf zichtbaar waren. Indien het afkalfproces soepel verliep, werd er geen ondersteuning geboden. Was er tot 2 uur later geen actieve vooruitgang in het afkalfproces zichtbaar, dan werd wel ondersteuning geboden (bijv. afkalftouwtjes dan wel verlosapparaat).

Direct na het afkalfproces werden het kalf en het moederdier gecontroleerd. Bij het moederdier werd de vitale gesteldheid gecontroleerd met specifieke aandacht voor "het goed op de been zijn", alertheid (bijv. aandacht richting het kalf) alsmede het hebben van eetlust. Bij het kalf werd de ademhaling gecontroleerd alsmede de eventuele aanwezigheid van slijmresten in de luchtwegen. Tevens werd de navel van het kalf gecontroleerd en ontsmet met jodium. Na 1 tot 1,5 uur na het afkalfproces werd het kalf weggehaald en verplaatst naar een schone kalveriglo. Wanneer het kalf gedurende de nacht geboren was, werd het kalf pas in de ochtend bij de moeder weggehaald. Vanaf het moment dat een moederdier van haar kalf gescheiden werd, werd het moederdier niet verder gevolgd voor deze proef.

2.1.4 Orale uitstrijkjes

Op het moment dat de moederdieren vanuit de voedingsstalproef naar de afkalfstal begeleid werden, werd een oraal uitstrijkje genomen. Deze monsternamen bij de moederdieren van de voedingsstal vond plaats voor het afkalfproces. Bij de moederdieren van de weidegangproef, welke zich al in de afkalfstal bevonden, werd het orale uitstrijkje genomen na het afkalven, nadat het geboren kalf weggehaald was. De orale uitstrijkjes werden geanalyseerd op microbiële samenstelling, waarbij de aanname werd gedaan dat het microbioom verzameld met een orale uitstrijk een sterke relatie heeft met het microbioom in de pens (Tapio et al., 2016). We spreken dan ook in dit rapport over het pensmicrobioom.

2.1.5 Methaanemissie moederdieren – indeling kalveren

De gemeten methaanopbrengst (in g/kg droge stof opname) tijdens de droogstand (6 weken) en de laatste 6 weken van de vorige lactatieperiode van de voedingsstal moederdieren is weergegeven in Tabel 1. De gemeten methaanintensiteit (in g/kg vet- en eiwit-gecorrigeerde melkgift) van de weidegang moederdieren is weergegeven in Tabel 2. In beide tabellen is de grens aangegeven op basis waarvan bepaald werd of een moederdier als laag of hoog methaan producerend werd ingedeeld. Bij de moederdieren uit de voedingsstal was de indeling tijdens de droogstand leidend wanneer een koe verschillend ingedeeld zou worden (laag t.o.v. hoog) tijdens de droogstand en de laatste 6 weken van de lactatieperiode. Bij de weidegang moederdieren is deze indeling gedaan op basis van methaanintensiteit in plaats van methaanopbrengst, omdat het meten van voeropname (en dus de methaanopbrengst) tijdens de weidegang niet mogelijk is. De voeropname werd in deze proef enkel geschat op basis van de VEM-dekking, wat minder betrouwbaar is dan wanneer koeien binnen gehuisvest worden met individuele voeropname. Tabellen 3 en 4 laten respectievelijk de omschrijvende statistiek van de moederdieren in de voedingsstal en bij weidegang zien wat betreft methaanemissies, zowel voor alle moederdieren als per indelingscategorie. De indeling van de moederdieren als laag dan wel hoog methaan producerend, werd vervolgens gebruikt om de geboren kalveren in te delen.

Voor de moederdieren uit de voedingsstal (Tabel 3) was de gemiddelde methaanopbrengst numeriek lager (19,9 gram methaan per kg droge stof opname) tijdens de laatste 6 weken van de lactatie ten opzichte van de droogstaand (21,3 gram methaan per kg droge stof opname). Dit is conform de verwachting, gezien de grote hoeveelheid stro in het droogstandsrantsoen alsmede de lagere opname van dit rantsoen. Door de grote hoeveelheid stro in het rantsoen werd het NDF-gehalte verhoogd met meer azijnzuur vorming in de pens tot gevolg alsmede meer methaanemissie. De droge stof opname in de droogstand is lager dan tijdens de laatste 6 weken van de lactatie, hierdoor wordt de passagesnelheid in de pens lager en een groter aandeel van het voer gefermenteerd, met meer methaanproductie tot gevolg. Dit laatste effect wordt ook gebruikt in de rekenregels van de kringloopwijzer (van Dijk et al. 2023). Zoals vermeld is de indeling van de moederdieren uit de voedingsstal (laag t.o.v. hoog methaan producerend) gemaakt op basis van de methaanopbrengst tijdens de droogstand. Daarom sluiten de maxima en minima van respectievelijk de groep laag en hoog methaan producerende dieren tijdens de droogstand aan (respectievelijk 15,2-21,5 en 21,6-27,0 gram methaan per kg droge stof opname), terwijl de ranges overlappen (maximum van categorie laag is hoger dan minimum van categorie hoog) van de methaanopbrengst gemeten tijdens de laatste 6 weken van de lactatie. Dit is inherent aan de gebruikte methode waarbij de indeling gemaakt is op basis van uitsluitend de metingen tijdens de droogstand.

Tabel 1 Indeling¹ van moederdieren uit de voedingsstal van Dairy Campus als laag of hoog op basis van de gemeten methaan opbrengst (g/kg droge stof opname) tijdens zowel de droogstand (6 weken) als de laatste 6 weken van de vorige lactatieperiode.

Koenummer	Indeling	Droogstand		Lacterend	
		Droge stof opname (kg/d)	Methaan opbrengst (g/kg droge stof opname)	Droge stof opname (kg/d)	Methaan opbrengst (g/kg droge stof opname)
Grens laag-hoog			21,5		19,9
265	Laag	15,3	19,0	19,0	18,8
310	Laag	18,2	18,5	24,6	17,6
555	Laag	16,5	20,2	19,7	19,3
659	Laag	16,6	21,3	22,2	17,8
664	Laag	13,5	16,9	19,1	19,4
1313	Laag	19,5	19,4	22,6	18,5
1360	Laag	18,5	21,3	22,1	19,9
1366	Laag	15,0	21,3	18,0	19,9
1412	Laag	17,2	20,5	21,7	20,7
1491	Laag	18,1	15,2	22,2	14,2
1868	Laag	15,4	18,0	18,9	16,7
1947	Laag	17,3	19,2	19,8	17,9
1960	Laag	17,0	20,5	22,1	18,5
2000	Laag	15,4	21,1	18,8	18,7
8061	Laag	16,8	21,5	20,6	18,4
667	Hoog	16,9	23,1	21,7	21,7
1419	Hoog	18,8	22,6	21,8	20,1
1619	Hoog	18,9	23,1	22,3	21,8
1758	Hoog	15,8	21,9	19,1	23,6
1872	Hoog	16,8	22,5	20,1	18,8
1913	Hoog	17,0	22,1	20,6	20,0
1951	Hoog	15,3	27,0	20,6	23,9
2003	Hoog	15,6	26,1	17,9	21,4
4262	Hoog	19,3	21,6	23,1	22,5
6847	Hoog	16,4	21,8	20,7	20,8
7857	Hoog	16,5	24,2	21,2	24,3
8090	Hoog	15,2	21,9	20,2	19,6

8248	Hoog	19,2	21,7	23,3	21,6
9905	Hoog	14,2	23,4	19,2	20,2

¹ Indeling op basis van de grens laag-hoog zoals vermeld staat in de tabel. Wanneer een koe verschillend ingedeeld zou worden (laag t.o.v. hoog) tijdens de droogstand en de laatste 6 weken van de lactatieperiode, was de indeling tijdens de droogstand leidend.

Tabel 2 Indeling¹ van weidegang moederdieren van Dairy Campus als laag of hoog op basis van de gemeten methaan intensiteit (g/kg vet- en eiwit-gecorrigeerde melk).

Koenummer	Indeling	Vet- en eiwit-gecorrigeerde melk (kg/d)	Methaan intensiteit (g/kg vet- en eiwit-gecorrigeerde melk)
Grens hoog-laag			12,9
584	Laag	32,3	11,8
7926	Laag	32,3	11,9
717	Laag	30,2	12,6
7801	Laag	29,6	12,7
737	Laag + Hoog ²	28,1	12,9
1460	Hoog	25,7	13,7
1456	Hoog	26,6	14,0
210	Hoog	28,3	14,1
1949	Hoog	25,0	14,3

¹ Indeling op basis van de grens laag-hoog zoals vermeld staat in de tabel. De gerapporteerde methaanemissies is gemeten van de koeien over verschillende behandelingen (d.w.z. weidegang, graskuil dan wel zomerstalvoeding). Aangezien voeropname tijdens weidegang alleen een schatting betreft, zijn deze koeien ingedeeld op basis van methaan intensiteit (g/kg vet- en eiwit-gecorrigeerde melk).

² Dit moederdier heeft een tweeling gekregen. Aangezien haar methaan intensiteit gelijk was aan de grens tussen laag en hoog voor de indeling, is 1 kalf toegewezen aan laag en 1 kalf toegewezen aan hoog.

Tabel 3 Omschrijvende statistiek van de moederdieren uit de voedingsstal van Dairy Campus.

	Alle moederdieren				Laag methaan moederdieren				Hoog methaan moederdieren			
	Gem. ¹	Min. ²	Max. ³	StDev. ⁴	Gem.	Min.	Max.	StDev.	Gem.	Min.	Max.	StDev.
Droogstand												
Droge stof opname (kg/d)	16,8	13,5	19,5	1,57	16,7	13,5	19,5	1,57	16,8	14,2	19,3	1,63
Methaan productie (g/d)	356	228	438	49,3	327	228	394	43,3	387	332	438	34,7
Methaan opbrengst (g/kg droge stof opname)	21,3	15,2	27,0	2,47	19,6	15,2	21,5	1,85	23,1	21,6	27,0	1,66
Lactatie												
Droge stof opname (kg/d)	20,8	17,9	24,6	1,70	20,8	18,0	24,6	1,89	20,8	17,9	23,3	1,54
Methaan productie (g/d)	413	313	521	56,8	381	313	450	42,1	447	378	521	51,4
Methaan opbrengst (g/kg droge stof opname)	19,9	14,2	24,3	2,21	18,4	14,2	20,7	1,55	21,5	18,8	24,3	1,68

¹ Gemiddelde.² Minimum.³ Maximum.⁴ Standaarddeviatie.**Tabel 4** Omschrijvende statistiek van de weidegang moederdieren van Dairy Campus.

	Alle moederdieren				Laag methaan moederdieren				Hoog methaan moederdieren			
	Gem. ¹	Min. ²	Max. ³	StDev. ⁴	Gem.	Min.	Max.	StDev.	Gem.	Min.	Max.	StDev.
Vet- en eiwit-gecorrigeerde melk (kg/d)	28,7	25,0	32,3	2,65	30,3	28,1	32,3	1,72	26,8	25,0	28,3	1,45
Methaan productie (g/d)	374	352	398	14,2	372	348	385	13,7	369	352	398	18,0
Methaan intensiteit (g/kg vet- en eiwit-gecorrigeerde melk)	13,1	11,8	14,3	0,95	12,3	11,8	12,9	0,48	13,8	12,9	14,3	0,53

¹ Gemiddelde.² Minimum.³ Maximum.⁴ Standaarddeviatie.

2.2 Kalveren

In totaal zijn 39 kalveren uit de 38 moederdieren geboren. Er was sprake van 1 tweeling en er zijn geen kalveren uitgevallen. Van de 39 kalveren, waren er 21 stierkalveren en 18 vaarskalveren. Aangezien er geen sprake was van een gesynchroniseerde inseminatie dan wel dracht, werden de kalveren niet gelijktijdig geboren maar gespreid over een langere periode. De geboren kalveren zijn op basis van de geboortedatum verdeeld in 4 groepen, waarbij de spreiding in leeftijd tussen het jongste en oudste kalf binnen een groep maximaal 28 dagen (4 weken) was. Voor elk kalf bestond de studie uit de volgende 4 fasen:

1. De eerste 24 levensuren (dag 1).
2. Individuele huisvesting in kalveriglo's tot 3 weken leeftijd.
3. Groepshuisvesting zonder specifieke metingen tot het jongste kalf van een groep een leeftijd van 12 weken had bereikt.
4. Groepshuisvesting met metingen gedurende een periode van 4 weken.

2.2.1 Fase 1 – de eerste 24 levensuren

Na de geboorte verbleef het kalf 1 tot 1,5 uur bij de moeder. Wanneer het kalf gedurende de nacht geboren was, werd het kalf pas in de ochtend (> 1,5 uur) bij de moeder weggehaald. Gedurende deze periode van samenzijn had de moeder de mogelijkheid haar kalf "droog" te likken. Dit werd ook gestimuleerd om een overdracht van micro-organismen van het moederdier naar het kalf te realiseren. Na deze periode werd het kalf gescheiden van de moeder en verplaatst naar een schone eenling box voorzien van strobedding en een warmtelamp. De kalveren ontvingen binnen 3 uur na de geboorte minimaal 3 liter biest. Dit werd gevolgd door binnen 12 uur nogmaals minimaal 3 liter biest te verstrekken. De biest was bij voorkeur afkomstig van de eigen moeder. Wanneer de moeder echter te weinig biest produceerde of wanneer de biest van onvoldoende kwaliteit was (d.w.z. brix waarde lager dan 20), werd gebruik gemaakt van biest van een donordier. De omschrijvende statistiek rondom de geboorte van de kalveren (bijv. geboortegewicht, biestgegevens en tijdsduur dat de kalveren bij de moederdieren hebben doorgebracht) is weergegeven in Tabel 5. Bij het statistisch toetsen van deze getallen, bleek geen van deze variabelen verschillend te zijn tussen de kalveren van laag dan wel hoog methaan producerende moederdieren ($P > 0.050$), behalve de opname van de eerste biest ($P = 0.010$) (dus niet van de totale biestopname). De kalveren van hoog methaan producerende moederdieren hadden een hogere eerste biestopname dan de kalveren van laag methaan producerende moederdieren.

Tabel 5 Omschrijvende statistiek voor geboortegewicht van de kalveren, tijdsduur bij moederdier na de geboorte en de biestgegevens.

	Alle kalveren				Kalveren van 'laag' methaan moederdieren ¹				Kalveren van 'hoog' methaan moederdieren ¹			
	Gem. ²	Min. ³	Max. ⁴	StDev. ⁵	Gem.	Min.	Max.	StDev.	Gem.	Min.	Max.	StDev.
Geboortegewicht (kg)	41	29	53	5,9	39	29	53	5,5	42	31	57	6,0
Duur bij moederdier (uur)	3,1	1,1	9,0	2,05	3,1	1,1	9,0	1,97	3,1	1,2	9,3	2,19
Tijdsduur tot eerste biestgift (uur)	1,9	0,5	4,5	1,22	2,0	0,5	4,5	1,20	1,7	0,3	4,3	1,25
Tijdsduur tot tweede biestgift (uur)	12,5	4,5	19,8	5,15	13,3	4,5	19,8	5,67	11,7	4,1	21,5	4,72
Biestopname eerste biestgift (L)	2,9	0,8	3,5	0,64	2,7	0,8	3,5	0,71	3,2	2,8	4,5	0,43
Biestopname tweede biestgift (L)	2,3	1,0	3,0	0,86	2,3	1,0	3,0	0,68	2,3	0,0	4,0	1,01
Totale biestopname (L)	5,4	3,5	6,5	1,04	5,2	3,5	6,5	0,96	5,6	3,0	7,0	1,10
Brix waarde biest	26	20	30	3,3	25	20	30	2,9	27	20	34	3,6

¹ Zowel voedingsstal moederdieren als weidegang moederdieren.

² Gemiddelde.

³ Minimum.

⁴ Maximum.

⁵ Standaarddeviatie.

2.2.2 Fase 2 – individuele huisvesting kalveriglo's tot 3 weken leeftijd

Na 24 uur werden de kalveren verplaatst naar schone kalveriglo's voor individuele huisvesting gedurende 3 weken. Deze iglo's bestonden uit een overdekt gedeelte met strobedding en een uitloopruimte. Vanaf dit moment ontvingen de kalveren tweemaal daags (om 07.30 uur en 15.30 uur) kalvermelk vanuit een speenemmer. Alle kalveren kregen hetzelfde melkschema conform de standaardprocedures van Dairy Campus. De eventuele melkrest die een kalf niet opgedronken had, werd terug gewogen en genoteerd. Dit werd gedaan om een duidelijk beeld van gezondheid en welzijn te krijgen. De chemische samenstelling van de kalvermelk is weergegeven in Tabel 6. Daarnaast was onbeperkt schoon drinkwater en een complete mix van ruwvoer en krachtvoer (vanaf nu kalver TMR genoemd) beschikbaar. De chemische samenstelling alsmede de grondstofsamenstelling van deze kalver TMR zijn weergegeven in respectievelijk Tabel 6 en 7. Tabel 6 geeft ook de samenstelling van stro weer. Stro is niet als zodanig gevoerd, maar de hokken in fases 2 t/m 4 waren ingestrooid met stro. Theoretisch zouden de kalveren tijdens deze fases een kleine onbekende hoeveelheid stro opgenomen kunnen hebben.

De kalveren vraten op deze leeftijd nog weinig van de kalver TMR, ruwweg 10 gram per dag. Deze opname is echter belangrijk voor een snelle en goede start van de pensontwikkeling. Hetzelfde was van toepassing voor de opname van water, wat ook belangrijk is voor een goede pensontwikkeling. Zowel het water als de kalver TMR werd tweemaal dagelijks (na het verstrekken van de kalvermelk) ververs.

2.2.3 Fase 3 – groepshuisvesting zonder metingen tot 12 à 15 weken leeftijd

Vanaf 3 weken leeftijd werden de kalveren verplaatst naar een groepshuisvesting. Er waren in totaal 4 strohokken beschikbaar, waarvan 2 toegewezen waren aan de kalveren afkomstig van laag methaan producerende moederdieren en 2 aan de kalveren afkomstig van hoog methaan producerende moederdieren. Per hok konden 10 kalveren gehuisvest worden. Wanneer het eerste hok per methaanemissieniveau gevuld was met 10 kalveren, werd het begonnen met het vullen van het volgende hok.

Gedurende fase 3 ontvingen de kalveren kalvermelk op individueel dierniveau via een kalverdrinkautomaat. Daarnaast was er een drinknippel aanwezig in elk hok voor onbeperkt schoon drinkwater en werd de kalver TMR onbeperkt aangeboden in een voertrog op groepsniveau. De kalveren werden gespeend op 10 weken leeftijd, waarna ze enkel nog water en kalver TMR aangeboden kregen.

Pas wanneer het jongste kalf van een bepaalde groep kalveren een leeftijd van 12 weken had bereikt (op dit moment waren de oudste kalveren binnen de groep 15 tot 16 weken oud), schoof de gehele groep kalveren door naar de volgende fase van de proef.

Tabel 6 Chemische samenstelling (in g/kg droge stof, tenzij anders aangegeven) van de voedermiddelen voor de kalveren.

	Kalvermelkpoeder ¹	Stro	Kalver TMR ²	GreenFeed lokbrok
Droge stof (g/kg)	970	924	901	892
Organische stof	926	928	918	923
Ruw eiwit	233	39	187	199
Ruw vet	183	11	37	57
Neutral Detergent Fiber	n.b. ³	785	370	304
Acid Detergent Fiber	n.b.	488	228	186
Acid Detergent Lignin	n.b.	48	27	13
Zetmeel	n.b.	21	101	148
Suiker	291	11	98	78
Bruto energie (MJ/kg droge stof)	21,2	18,2	18,1	18,5

¹ 175 gram kalvermelkpoeder werd opgelost in 1L water.

² Total mixed ration (d.w.z. alle benodigdheden in 1 rantsoen).

³ Niet bepaald; wordt aangenomen dat dit gelijk aan 0 is.

Tabel 7 Grondstofsamenstelling (% op product basis) van het kalver TMR¹ en de GreenFeed lokbrok.

Grondstoffen	Kalver TMR	GreenFeed lokbrok
Sojahullen	18,85	21,66
Tarwegries	11,89	-
Raapzaadschroot	11,89	-
Bietenpulp	9,47	12,37
Biet melasse	6,68	4,46
Tarwestro	5,80	-
Maisglutenvoermeel	4,94	8,54
Palmpitschilfers	4,94	-
Sojaschroot	4,94	15,05
Veldbonenhullen	4,94	-
Koekjesmix	2,98	-
Voormengsel	2,88	-
Zonnebloemzaadschroot	2,53	-
Erwten	2,53	-
Gerst	1,87	11,34
Lijnzaad	1,59	5,00
Lupinen	1,32	-
Mais	-	8,73
Raapzaad schroot bestendig	-	4,07
Haverdoppen	-	4,00
Raapzaadschilfers	-	1,87
Zout	-	0,68
Mono calciumfosfaat	-	0,55
Mineralen premix	-	0,50
Krijt	-	0,45
Lijnolie	-	0,30
Vitamines	-	0,15
MgO 90%	-	0,14
Gistcultuur	-	0,10
Smaakaroma	-	0,04

¹ Total mixed ration (d.w.z. alle benodigdheden in 1 rantsoen).

2.2.4 Fase 4 – groepshuisvesting met metingen tot 16 à 19 weken leeftijd

Fase 4 betrof een meetperiode van 4 weken. Na fase 3 (op 12 à 15 weken leeftijd) werden de kalveren van de groepshuisvesting zonder methaanemissie metingen verplaatst naar de groepshuisvesting met methaanemissie metingen. Daarbij werden de kalveren voorzien van halsbanden met RFID-chip in verband met herkenning van de kalveren bij de jongvee GreenFeed systemen (zie hoofdstuk 2.3.1) voor methaanemissie metingen. Tevens werd het lichaamsgewicht en de borstomvang van de kalveren gemeten en werd een oraal uitstrijkje genomen. Deze orale uitstrijkjes werden geanalyseerd op microbiële samenstelling, waarbij wederom de aanname werd gedaan dat het microbiom verzameld met een orale uitstrijk een sterke relatie heeft met het microbiom in de pens (Tapio et al., 2016). We spreken dan ook in dit rapport over het pensmicrobiom.

Voor deze periode van 4 weken waren 2 strohokken beschikbaar, waarvan 1 toegewezen was aan de kalveren afkomstig van laag methaan producerende moederdieren en 1 aan de kalveren afkomstig van hoog

methaan producerende moederdieren. In elk hok was een drinknippel aanwezig voor onbeperkt schoon drinkwater en werd de kalver TMR onbeperkt aangeboden in een voertrog op groepsniveau. Dagelijks werd vastgelegd hoeveel kalver TMR werd aangeboden alsmede hoeveel er na 24 uur werd terug gewogen om de dagelijkse voeropname op groepsniveau te bepalen. De kalveren ontvingen in de jongvee GreenFeed systemen een lokbrok om de kalveren naar de GreenFeed te lokken voor methaanemissie metingen. De chemische samenstelling en grondstofsamenstelling van deze GreenFeed lokbrok is respectievelijk weergegeven in Tabel 6 en 7. Elke week en na het beëindigen van de 4 meetweken werd het lichaamsgewicht en de borstomvang van de kalveren gemeten.

2.3 Monsternamen en metingen

2.3.1 Methaanemissie metingen

De methaanemissie werd gemeten op individueel dierniveau met behulp van 2 jongvee GreenFeed systemen (C-Lock Inc.; Zimmerman et al., 2011). Het jongvee GreenFeed systeem meet zowel de luchtstroom als de concentratie van methaan in de afvoerlucht. Elk jongvee GreenFeed systeem was uitgerust met een koppositie-sensor en gasemissiegegevens werden afgewezen wanneer niet aan de criteria voor de koppositie werd voldaan. De gegevensverzameling was afhankelijk van de vrijwillige bezoeken van de kalveren aan de jongvee GreenFeed systemen. De GreenFeed lokbrok (Tabel 6 en 7) werd aangeboden om de kalveren te verleiden om verdeeld over de dag de jongvee GreenFeed systemen te bezoeken en om de kalveren tijdens een bezoek te stimuleren een geschikte koppositie aan te houden voor nauwkeurige metingen. Per bezoek aan de jongvee GreenFeed werden maximaal 25 zogenaamde 'cup drops' van de lokbrok verstrekt en tussen 2 van deze cup drops zat 12 seconden. Dit resulteerde in een maximale bezoekduur van 5 minuten, wat ruim voldoende is voor betrouwbare methaanemissie metingen. Er zat minimaal 3 uur tussen twee bezoeken aan de jongvee GreenFeed bezoeken en een kalf kon de jongvee GreenFeed maximaal vijfmaal daags bezoeken.

De methaanemissie werd berekend door de geregistreerde achtergrondgasconcentratie af te trekken van de concentratie die tijdens het bezoek van een kalf in de GreenFeed werd geregistreerd. Dit verschil in concentratie werd vervolgens vermenigvuldigd met de luchtstroom om tot een emissiesnelheid in gram per dag te komen, met behulp van de ideale gaswet en correctie voor temperatuur en druk. Zie van Gastelen et al. (2022) voor meer details over de procedures die in dit onderzoek worden toegepast voor het GreenFeed-systeem.

2.3.2 Voermonsters en chemische analyse

Wekelijks werden monsters van de kalvermelkpoeder, kalver TMR en GreenFeed lokbrok verzameld en vervolgens bewaard bij $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in afwachting van analyse. Vlak voor analyse werden de voermonsters uit de vriezer gehaald, ontdooid bij kamertemperatuur en gemalen met behulp van een ultracentrifugale molen (met uitzondering van de kalvermelkpoeder; Retsch ZM200, Retsch GmbH). De monsters werden vervolgens geanalyseerd voor droge stof, as, stikstof, zetmeel, suikers, ruw vet, NDF, acid detergent fiber (ADF) en acid detergent lignin (ADL) zoals beschreven door Abrahamse et al. (2008). Bruto-energie werd bepaald met behulp van bomcalorimetrie (ISO 9831; International Organization for Standardization, 1998), en ruw eiwit werd berekend als stikstof $\times 6,25$, waarbij stikstof werd bepaald met behulp van de Kjeldahl-methode (ISO 5983; Internationale Organisatie voor Standardisatie, 2005).

2.3.3 Orale uitstrijkjes en microbiële analyse

Zowel bij de moederdieren als bij de kalveren werden orale uitstrijkjes genomen met behulp van zogenaamde wattenstaafjes (PERFORMAgene Livestock PG-100, DNA Genotek Inc., Ottawa, Ontario, Canada). Gedurende maximaal 30 seconden werd met een wattenstaafje langs de binnenzijde van de wang (de groeven in het bijzonder) geveegd. Vervolgens werd het wattenstaafje in het buisje met een PG-AC extractie reagens geplaatst, minimaal 10 keer gezwenkt, in droogijs geplaatst en vervolgens bewaard bij $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in afwachting van analyse. Per dier werden 2 wattenstaafjes gebruikt om voldoende materiaal te verzamelen voor microbiële analyse.

2.4 Microbiële analyse

De orale uitstrijkjes werden ontdooid bij kamertemperatuur, gevolgd door een incubatie van 1 uur bij 50°C in de lytische buffer die werd geleverd door de fabrikant van de orale uitstrijkjes (PG-100, DNA Genotek). Er werd een centrifugestap van 5 minuten van 500xg uitgevoerd om alle lytische buffer uit het orale uitstrijkje te verwijderen. Twee keer werd 200uL van de orale uitstrijkjes vloeistof toegevoegd aan 2 parelbuisjes met 800uL lysisbuffer (geleverd was door de Purelink microbiom DNA-zuiveringskit; A29789, Invitrogen) en werden gedurende 20 minuten geïncubeerd bij 80°C. Vervolgens werd het microbiom verder gelyseerd in de bead beater Precellys Evolution Homogenizer (Bertin Technologies). Daarna werden de monsters opnieuw gedurende 20 minuten bij 80°C geïncubeerd. De vloeistof werd vervolgens op dezelfde kolom geplaatst om de DNA-concentratie te verhogen. DNA werd geëxtraheerd uit de orale uitstrijkjes vloeistof volgens de Purelink Microbiome DNA-zuiveringskit. DNA-concentraties werden gemeten met behulp van de Quant-iT 1X dsDNA HS-testkit (Q33232, Invitrogen) vóór de verzending voor sequencing.

Het DNA werd geamplificeerd voor het V5-V6-gebied van het 16S rRNA-gen en gesequenced met behulp van een Novaseq 6000, PE250 (Illumina, VS). De ruwe sequencing bestanden werden geïmporteerd in QIIME v.2 en verwerkt met behulp van cutadapt en DADA2 om amplicon sequentie varianten (ASV's) te verkrijgen. De verwerkingsparameters omvatten het afkappen van voorwaartse metingen bij 180 bp en achterwaartse metingen bij 175 bp, met een maximum van 2 meerduidige basen en een maximaal verwacht foutenpercentage van 2. Chimaera's werden geïdentificeerd met behulp van de consensusmethode en taxonomische classificatie werd uitgevoerd met behulp van een naïeve Bayesiaanse classificator die was getraind op de Silva v138.1-database.

2.5 Data-analyse

2.5.1 Statistische analyse kalf gegevens

Zoals reeds aangegeven waren de kalveren verdeeld in 4 groepen op basis van de geboortedatum, waarbij de spreiding in leeftijd tussen het jongste en oudste kalf binnen een groep maximaal 28 dagen (4 weken) was. Binnen elke groep (1 – 4) hadden we (a) een partij kalveren van laag methaan producerende moederdieren en (b) een partij kalveren van hoog methaan producerende moederdieren.

Voor de metingen die aan individuele dieren zijn uitgevoerd is het kalf als statistische eenheid gekozen. Dit geldt voor de lichaamsafmetingen (lichaamsgewicht, borstomvang, buikomvang, schofhoogte en groei), de methaanemissie kenmerken (uitgedrukt in gram per dag, gram per kg groei, en gram per kg lichaamsgewicht, allen op weekbasis) en de opname van de kalvermelk (liter per dag) en GreenFeed lokbrok (gram DS per dag op weekbasis). Voor de lichaamsafmetingen zijn de gegevens geanalyseerd met het geboortegewicht als co-variabele om te corrigeren voor eventuele verschillen die al vanaf de geboorte aanwezig waren. Voor methaanemissie kenmerken is geen co-variabele meegenomen. Vervolgens werd deze data geanalyseerd met de MIXED procedure in SAS (versie 9,4, SAS Institute Inc., Cary, NC, Amerika), waarbij de methaan ranking (d.w.z. laag t.o.v. hoog), week (d.w.z. week 1 t/m 4) en de interactie tussen methaan ranking en week als onafhankelijke variabelen in het statistische model waren opgenomen. Voor de opname van de kalvermelk werd niet week, maar levensdag meegenomen in het statistisch model. Daarbij is groep (1 – 4) als random variabele en het individuele kalf als herhaalde waarneming meegenomen en is een eerste orde autoregressieve covariantiematrix gebruikt met een heterogene variantie (arh1).

Aangezien de kalveren per groep gehuisvest werden tijdens de meetperiode en we voeropname van de kalver TMR alleen op hokniveau konden meten, zijn alle metingen waarbij voeropname betrokken was geanalyseerd met groep kalveren als de statistische eenheid. Daarvoor werden alle variabelen gemiddeld per groep en per week met behulp van de MEANS procedure in SAS. Vervolgens werd deze data geanalyseerd met de MIXED procedure in SAS, waarbij de methaan ranking (laag, hoog), week (1 t/m 4) en de interactie tussen methaan ranking en week als onafhankelijke variabelen in het statistische model opgenomen.

Voor alle statistische analyses zijn de gemiddelde berekend als LSMEANS en werd de standaardfout van het gemiddelde berekend als de gepoolde standaardfout van (1) de methaan ranking en (2) methaan ranking binnen weken. Voor de statistische vergelijking tussen weken is gebruik gemaakt van de Tukey-Kramer correctie voor meervoudige vergelijkingen. Voor de statistiek in Figuur 2, is de statistische vergelijking binnen week gedaan met de SLICE optie binnen de LSMEANS-opdracht. Er wordt gesproken over een statistisch verschil bij een P-waarde kleiner dan of gelijk aan 0,05 en er wordt gesproken over een trend wanneer de P-waarde groter is dan 0,05, maar kleiner dan of gelijk aan 0,10.

2.5.2 Microbiële statistische analyse

De nabewerking van de microbiële data omvatte het uitfilteren van ASV's die verband houden met chloroplasten en mitochondriën. Principale-componentenanalyse (PCA) en redundante analyse (RDA) werden uitgevoerd om de gegevensstructuur en relaties tussen monsters te onderzoeken. Differentiële abundantieanalyse werd uitgevoerd met behulp van DESeq2 met standaardparameters, wat een robuuste identificatie van aanwezige taxa garandeert.

De uiteindelijke dataset bevatte 15.360.744 pseudoreads toegewezen aan 41.985 ASV's. Microbioom gegevens werden geanalyseerd met behulp van R (versie 4.3.3, R Foundation for Statistical Computing, Wenen, Oostenrijk), met de pakketten Canoco, phyloseq, vegan, DESeq2, dplyr en tidyverse. De ruwe data werden genormaliseerd door het aantal monsters om te zetten in relatieve hoeveelheid en verder gestabiliseerd door het aantal ruwe tellingen met 10.000 te schalen en log te transformeren. Deze genormaliseerde en getransformeerde data werden gebruikt voor PCA, RDA en gedeeltelijke redundante analyse (pRDA). Zowel RDA als pRDA werden uitgevoerd met behulp van het vegan pakket, met Canoco voor gedetailleerde analyse waarbij de significantie van verschillen in microbiële samenstelling werd beoordeeld via permutatietests. Voor differentiële abundantieanalyse werden filters toegepast om alleen met taxa te werken die in ten minste 5% van de monsters met een gemiddelde hoeveelheid groter dan 0,01 aanwezig waren. Het vegan pakket werd gebruikt om de alfa-diversiteit (bijv. Chao1 en Shannon) en de bèta-diversiteit (bijv. Bray-Curtis afstand) te berekenen. Verschillen in bèta-diversiteit werden beoordeeld met behulp van PERMANOVA- en ANOSIM-analyses.

3 Resultaten

3.1 Lichaamsgewicht, lichaamsafmetingen en groei

De resultaten van fase 4 (lichaamsgewicht, lichaamsafmetingen en groei) zijn weergegeven in Tabel 8. Een methaan ranking \times week interactie werd waargenomen voor de borstomvang ($P = 0,037$) en de buikomvang ($P = 0,034$) van de kalveren. Ondanks deze interactie, was er in geen van de 4 weken een significant verschil in de borstomvang of buikomvang tussen de laag en hoog methaan ranking. Er werd geen effect waargenomen van de methaan ranking op lichaamsgewicht, schofthoogte en groei, maar ze waren allemaal wel beïnvloed door week ($P < 0,001$). Het lichaamsgewicht nam toe over de tijd, waarbij de kalveren elke week een hoger lichaamsgewicht hadden. De schofthoogte van de kalveren was hoger in week 3 en 4 (geen verschil in schofthoogte tussen deze 2 weken) ten opzichte van week 1 en 2 (geen verschil in schofthoogte tussen deze 2 weken). De groei van de kalveren was lager in week 4 ten opzichte van week 1 en 2, waarbij er geen verschil werd waargenomen in de groei tussen week 1 en 2.

3.2 Voeropname

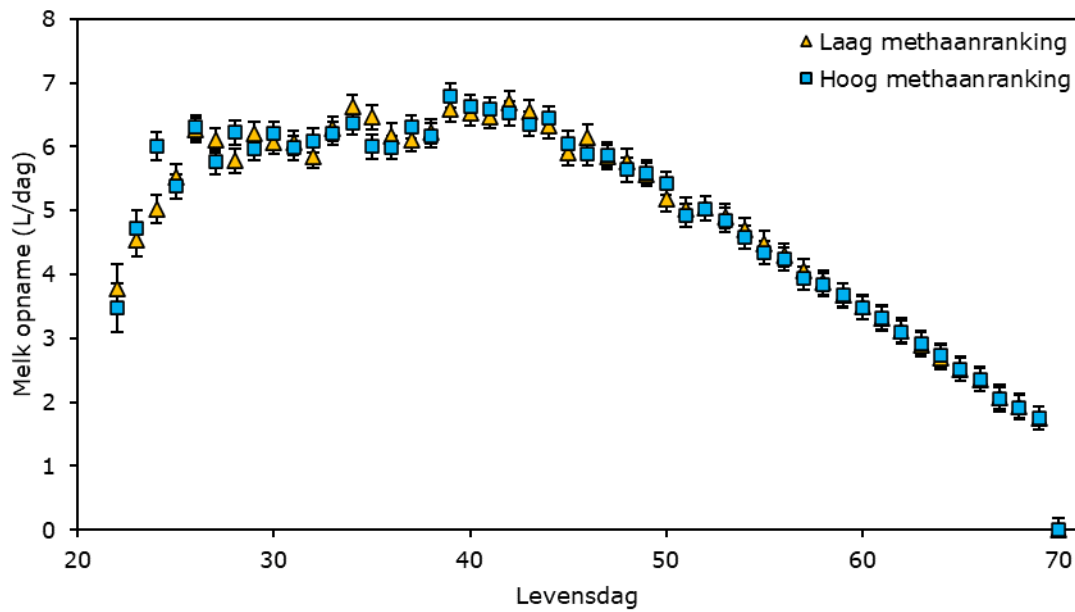
De melk opname (in L/d) tijdens de groepshuisvesting via de kalverdrinkautomaat (fase 3) is weergegeven in Figuur 1. Het melkschema was voor alle kalveren hetzelfde, maar er was variatie aanwezig omdat niet alle kalveren elke dag de volledige melkhoeveelheid consumeerden. De opname van de melk werd niet beïnvloed door methaan ranking ($P = 0,896$) en er werd geen methaan ranking \times levensdag interactie waargenomen. De opname van de melk werd wel beïnvloed door levensdag ($P < 0,001$) als gevolg van het melkschema waarbij de melkgift eerst werd opgebouwd tot een maximum van 6,5 L/d en vervolgens wordt afgebouwd tot de kalveren gespeend werden op 10 weken leeftijd.

De resultaten van voeropname gemeten tijdens de 4-weekse meetperiode (fase 4) zijn weergegeven in Tabel 8. Er werd geen methaan ranking \times week interactie waargenomen. Er was een tendens ($P = 0,088$) voor een hogere opname van de kalver TMR voor de hoog methaan ranking kalveren ten opzichte van de laag methaan ranking kalveren. De opname van de GreenFeed lokbrok alsmede de totale voeropname werden niet beïnvloed door methaan ranking. Alle voeropname variabelen werden beïnvloed door week ($P \leq 0,031$). De opname van de kalver TMR alsmede de totale voeropname waren hoger in week 4 ten opzichte van week 1, waarbij de opname in week 2 en 3 niet anders was van de opname in zowel week 1 als 4. De opname van de GreenFeed lokbrok nam toe over de tijd, waarbij er alleen geen significante toename werd waargenomen tussen week 3 en week 4.

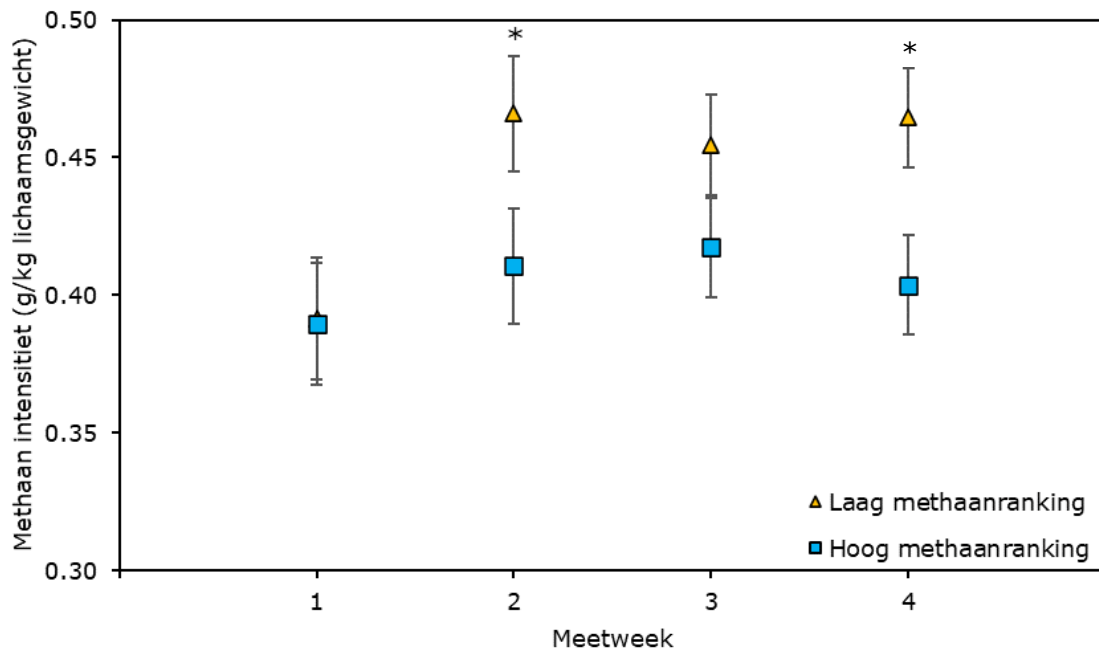
3.3 Methaanemissies

De resultaten rondom de methaanemissie zijn weergegeven in Tabel 8. Een methaan ranking \times week interactie werd waargenomen voor de methaanintensiteit in g/kg lichaamsgewicht ($P = 0,046$). Dit is ook visueel weergegeven in Figuur 2. De methaanintensiteit in g/kg lichaamsgewicht was niet significant verschillend in week 1 en 3, maar in week 2 en 4 was de methaanintensiteit in g/kg lichaamsgewicht hoger ($P \leq 0,050$) voor de kalveren van de lage methaan ranking t.o.v. kalveren van de hoge methaan ranking. Methaanproductie in g/d en methaanintensiteit in g/kg groei werden niet beïnvloed door methaan ranking, maar er werd een trend ($P = 0,091$) waargenomen voor een hogere methaanopbrengst in g/kg droge stof voeropname voor de kalveren met een lage methaan ranking t.o.v. kalveren met een hoge methaan ranking. Methaanproductie in g/d en methaanintensiteit in g/kg groei werden beïnvloed door week ($P \leq 0,001$), waarbij de methaanproductie toenam van week 1 naar week 2 en vervolgens naar week 4.

In week 3 was de methaanproductie wel hoger dan in week 1, maar niet verschillend van de methaanproductie gemeten in week 2 en week 4. De methaanintensiteit in g/kg groei was hoger in week 3 ten opzichte van week 1.



Figuur 1 Melkopname (in L/d) tijdens de groepshuisvesting met kalverdrinkautomaat van de kalveren die op basis van de moederdieren gerankt waren als 'laag' dan wel 'hoog' methaan.



Figuur 2 Methaanintensiteit (in g/kg lichaamsgewicht) van kalveren die op basis van de moederdieren gerankt waren als 'laag' dan wel 'hoog' methaan. Een * geeft een significant verschil ($P \leq 0,050$) weer.

Tabel 8 Lichaamsgewicht en afmetingen, groei, voeropname en methaanemissie van kalveren in fase 4 en die op basis van de moederdieren gerankt waren als 'laag' dan wel 'hoog' methaan.

	Ranking methaan		SEM	Week				SEM	Geboortegewicht ¹	P-waarde		Ranking × Week
	Laag	Hoog		1	2	3	4			Ranking	Week	
Lichaamsgewicht en afmetingen												
Lichaamsgewicht (kg)	163	169	5,7	151 ^a	162 ^b	171 ^c	179 ^d	4,0	0,028	0,448	< 0,001	0,405
Borstomvang (cm) ²	127	128	2,0	123	128	129	129	1,9	0,040	0,634	< 0,001	0,037
Buikomvang (cm) ³	154	156	3,2	150	157	157	157	3,0	0,104	0,534	< 0,001	0,034
Schofthoogte (cm)	105	106	0,8	103 ^a	104 ^a	107 ^b	107 ^b	0,7	0,015	0,176	< 0,001	0,745
Groei (kg/d)	1,43	1,38	0,065	1,61 ^a	1,50 ^a	1,38 ^{ab}	1,15 ^b	0,101	0,019	0,437	< 0,001	0,523
Voeropname												
Kalver TMR (kg/d)	5,36	5,73	0,144	5,08 ^a	5,38 ^{ab}	5,77 ^{ab}	5,96 ^b	0,204		0,088	0,031	0,506
GreenFeed lokbrok (g/d)	281	298	54,2	183 ^a	275 ^b	342 ^c	357 ^c	52,3		0,653	< 0,001	0,315
Totaal (kalver TMR + GreenFeed lokbrok; kg/d)	5,66	6,01	0,145	5,28 ^a	5,65 ^{ab}	6,10 ^{ab}	6,31 ^b	0,205		0,103	0,010	0,519
Methaanemissies												
Productie (g/d)	71,2	70,0	4,14	59,6 ^a	70,8 ^b	74,6 ^{bc}	77,5 ^c	3,63		0,794	< 0,001	0,130
Intensiteit (g/kg groei)	47,2	53,7	15,77	35,3 ^a	30,8 ^{ab}	60,6 ^b	75,2 ^{ab}	22,24		0,769	0,001	0,839
Intensiteit (g/kg lichaamsgewicht) ⁴	0,444	0,405	0,0171	0,391	0,438	0,436	0,434	0,0154		0,072	0,001	0,046
Opbrengst (g/kg droge stof voeropname)	12,4	11,5	0,35	11,3	12,4	12,0	12,0	0,50		0,091	0,522	0,261

¹ Geboortegewicht meegenomen als covariabele om lichaamsgewicht, afmetingen en groei te corrigeren voor eventuele verschillen die al vanaf de geboorte aanwezig waren.

² Een ranking × week interactie waargenomen, maar in geen van de 4 weken was er een significant verschil in borstomvang tussen de laag en hoog methaan ranking.

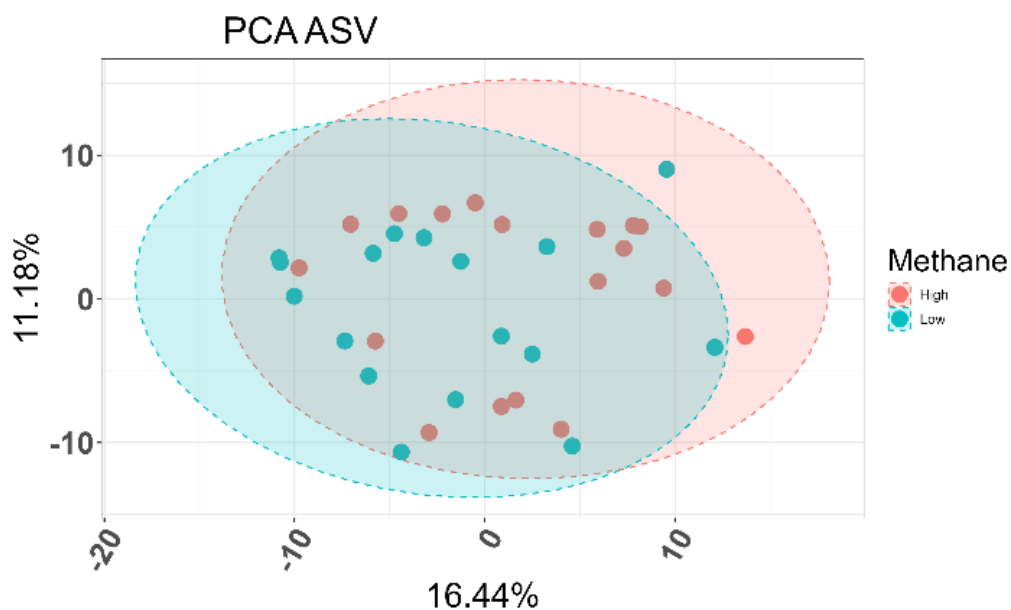
³ Een ranking × week interactie waargenomen, maar in geen van de 4 weken was er een significant verschil in buikomvang tussen de laag en hoog methaan ranking.

⁴ Een ranking × week interactie waargenomen, welke is weergegeven in Figuur 2.

3.4 Microbioom

3.4.1 Moederdieren

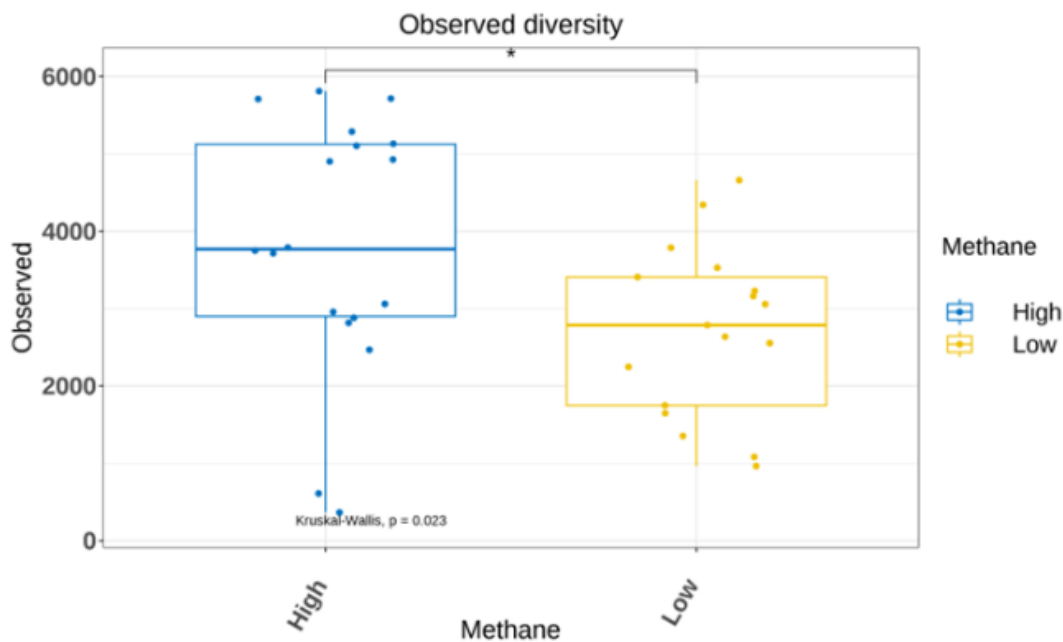
We richten ons in deze sectie specifiek op het pensmicrobioom van de moederdieren (bemonsterd m.b.v. orale uitstrijkjes) en de relatie hiervan met het niveau van de methaanemissies. De monsters werden verdeeld in 2 groepen op basis van de methaanemissie van de moederdieren (laag t.o.v. hoog). Figuur 3 is een principale-componentenanalyse (PCA) grafiek van de variatie in microbiële samenstelling van de moederkoeien. Een PCA is een statistische analysemethode waarbij een complexe dataset visueel weergegeven wordt met een kleiner aantal relevante componenten, ook wel de principale componenten genoemd. Elk punt in de PCA geeft de microbiële samenstelling van 1 moederdier weer. De principale componenten zijn weergegeven als x- en y-as, en zelf niet bekend of gedefinieerd, maar hiermee wordt wel de variatie of relatie tussen de punten zichtbaar. De kleurcodering staat voor het methaanemissieniveau (laag t.o.v. hoog). Dit geldt zowel voor de afzonderlijke punten alsmede voor de clusters (ovale vlakken). De clusters geven het gebied aan waarbinnen de microbiële samenstelling van een bepaalde groep moederdieren varieert. Dit gezamenlijk geeft de mogelijke relatie tussen het pensmicrobioom en het niveau van de methaanemissie van de moederdieren weer. Hoewel het pensmicrobioom visueel verschillende clusters leek te vormen (blauw voor laag methaan t.o.v. rood voor hoog methaan), was er vooral veel overlap tussen die clusters. Dit laatste suggereert dat er geen grote verschillen zijn in de samenstelling van het pensmicrobioom, verzameld met orale uitstrijkjes, tussen de laag en hoog methaan producerende moederdieren.



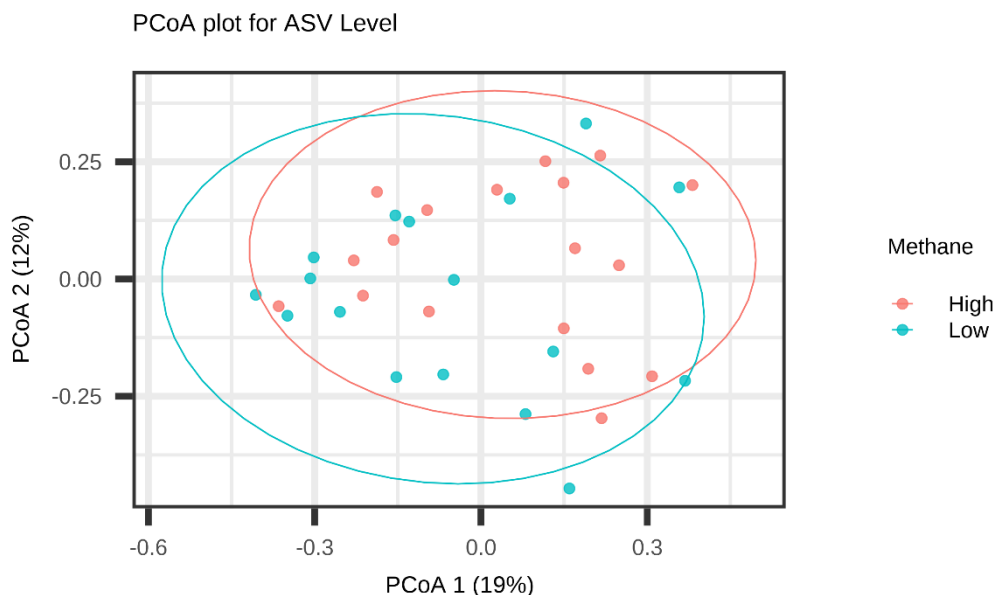
Figuur 3 Principale componentenanalyse (PCA) grafiek van de het pensmicrobioom en de methaanemissie van de moederdieren. Blauw is van de laag methaan producerende moederdieren en rood is voor de hoog methaan producerende moederdieren. Ondanks enige clustering is er grote overlap en geen significant verschil ($P > 0.050$).

De term alfadiversiteit wordt gebruikt om de complexiteit van een microbiom aan te duiden. Hoe meer verschillende taxa er aanwezig zijn binnen een microbiom (zonder naar de relatieve hoeveelheid te kijken) en hoe meer deze taxa van elkaar verschillen, hoe hoger de alfadiversiteit (Wagner et al., 2018). De resultaten van de huidige studie laten zien dat het pensmicrobioom van de hoog methaan producerende moederdieren een hogere alfadiversiteit had (Figuur 4; Kruskal-Wallis-test, $P = 0,023$). De alfadiversiteit werd ook gemeten en geanalyseerd door de Shannon en Chao1 indexen, wat resulteerde in vergelijkbare resultaten (gegevens niet getoond). Dit suggereert dat de complexiteit en rijkdom van het pensmicrobioom gerelateerd is aan het methaanemissieniveau.

Om de structuur van het microbioom te begrijpen, werd de bètadiversiteit berekend. De term bètadiversiteit wordt gebruikt om de gelijkenis tussen verschillende microbioom composities aan te duiden (laag t.o.v. hoog methaan ranking), bijvoorbeeld hoeveel taxa de twee microbioom composities gemeen hebben, hoe verwant deze aan elkaar zijn en in hoeverre deze kwantitatief overeenkomen. Dit gaat m.b.v. de Bray-Curtis-ongelijkheidsindex die dit specifiek kwantificeert door de hoeveelheid aan bacteriële kenmerken te vergelijken. Figuur 5 is een Principale Coördinaten Analyse (PCoA) grafiek, waar de bètadiversiteit van de moederdieren wordt weergegeven. Er was een groot overlap zichtbaar tussen de laag en hoog methaan producerende moederdieren, waarbij geen statistisch verschil werd waargenomen (Permanova: $P = 0,313$; Anosim: $P = 0,260$).

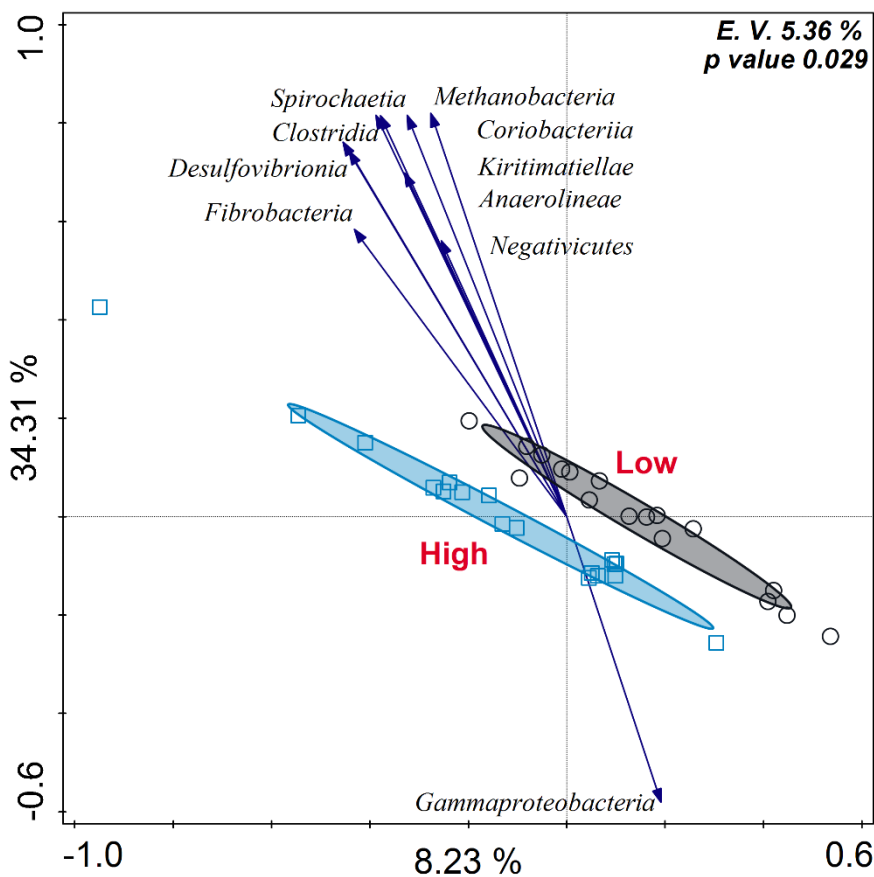


Figuur 4 Alfadiversiteit van het pensmicrobiom van de moederdieren. Blauw is van de hoog methaan producerende moederdieren en geel is voor de laag methaan producerende moederdieren. De alfadiversiteit was significant verschillend (Kruskal-Wallis-test; $P = 0,023$).



Figuur 5 Bètadiversiteit en PCoA-grafiek, gebaseerd op Bray-Curtis-ongelijkheid index, van het pensmicrobiom van de moederdieren. Blauw is van de laag methaan producerende moederdieren en rood is voor de hoog methaan producerende moederdieren. Ondanks enige clustering is er grote overlap en geen significant verschil (Permanova: $P = 0,313$; Anosim: $P = 0,260$).

Figuur 6 laat een partieel redundante analyse (pRDA) plot zien. Een RDA is een canonieke uitbreiding van de PCA, waarbij de variatie in een set variabelen verklaard wordt op basis van hun relatie met een andere set verklarende variabelen. In dit geval betreft het een pRDA, omdat de variatie in de samenstelling van het pensmicrobioom in relatie tot het methaanemissieniveau van de moederdieren wordt weergegeven, waarbij de experimentele toestand van de moederdieren (voedingsstal t.o.v. beweiding) als co-variabele werd meegenomen. De grafiek laat een significante scheiding (clusters) zien tussen de laag en hoog methaan producerende moederdieren ($P = 0,029$ met een verklaarde variatie (E.V.) van 5,36%). Dit is op basis van een hoger taxonomisch niveau geanalyseerd, namelijk Klasse (Figuur 6) en Stam (niet getoond; $P = 0,023$ en E.V. = 5,88%). De pijlen in Figuur 6 vertegenwoordigen de top 10 van belangrijkste bacteriële taxa die bijdragen aan de verschillen tussen de laag en hoog methaan producerende moederdieren. Het feit dat deze pijlen niet naar het centrum van de clusters wijzen, suggereert dat – hoewel deze taxa belangrijk zijn – andere factoren naast de methaan ranking ook bijdragen aan het verschil in de samenstelling van het pensmicrobioom van de moederdieren.

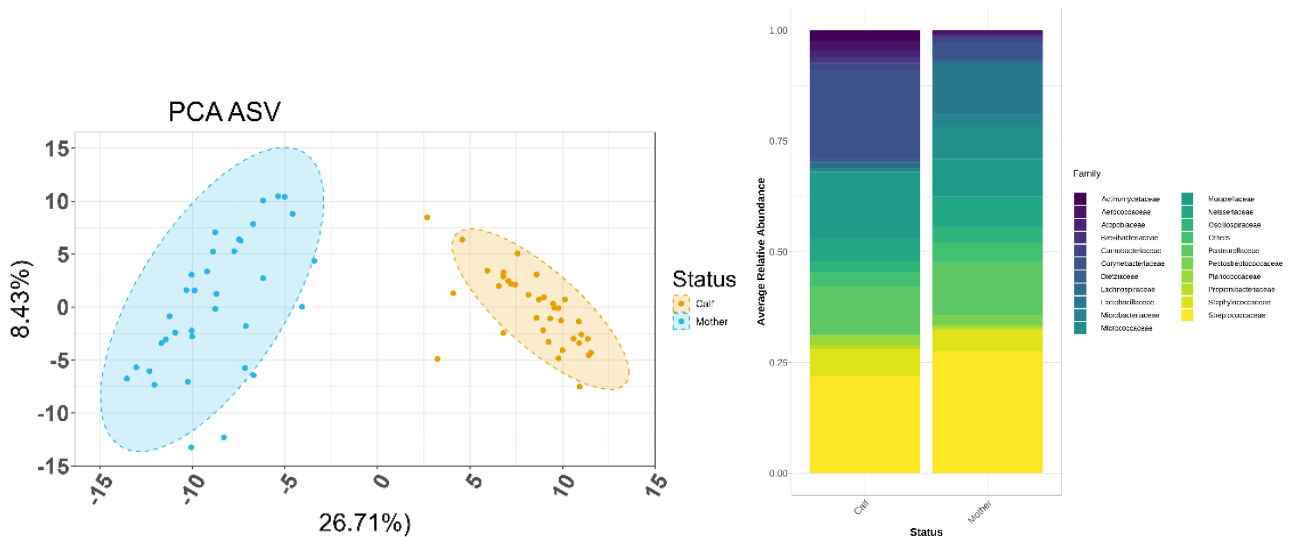


Figuur 6 De pRDA-grafiek van de moederdieren. Zwart is voor de laag methaan producerende moederdieren en blauw is voor de hoog methaan producerende moederdieren. Er is een significante scheiding zichtbaar ($P = 0,029$; E.V. = 5,36%), met pijlen die de top 10 bijdragende bacteriële taxa aangeven.

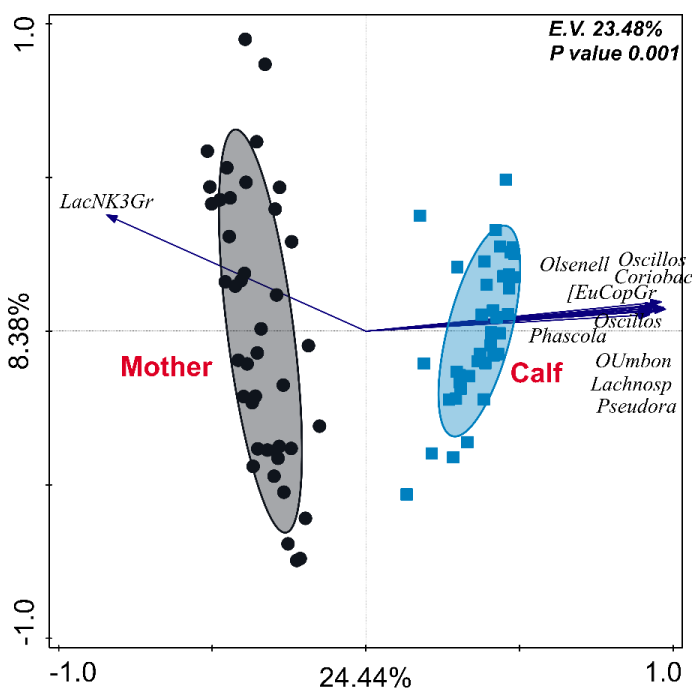
3.4.2 Moederdieren in relatie tot de kalveren

In deze sectie richten we ons specifiek op het pensmicrobioom van de moederdieren in vergelijking met die van de kalveren. Hierbij werd gekeken naar de onderliggende verschillen, maar ook in hoeverre het pensmicrobioom van de kalveren gerelateerd was aan dat van hun moeder. De PCA-grafiek (Figuur 7, linker paneel) toont een duidelijke clustering van de microbiota voor de moederdieren en voor de kalveren. Dit suggereert significante verschillen in samenstelling van het pensmicrobioom op ASV-niveau tussen de moederdieren en de kalveren. ASV's zijn fragmenten genetisch materiaal (sequenties van nucleotiden) op basis waarvan het microbiom ingedeeld kan worden naar welke specifieke groepen micro-organismen aanwezig zijn.

Van ASV's is de sequentie van de nucleotiden op 1 nucleotide nauwkeurig bekend. ASV's worden gebruikt in microbiom studies om een gedetailleerd beeld te krijgen van een ecosysteem of microbiële gemeenschap. Het staafdiagram (Figuur 7, rechter paneel) illustreert de relatieve hoeveelheid van de 20 meest voorkomende bacteriefamilies in het pensmicrobiom van de kalveren en moederdieren. De meest voorkomende families bij de kalveren zijn Streptococcaceae (22,0%), Corynebacteriaceae (20,1%) en Moraxellaceae (15,0%). Bij de moederdieren zijn de meest voorkomende families Streptococcaceae (27,6%), Pasteurellaceae (11,9%) en Lactobacillaceae (11,4%). Deze verschillen suggereren grote verschillen in het pensmicrobiom tussen de moederdieren en kalveren. De RDA-grafiek (Figuur 8; geen co-variabelen meegenomen) bevestigt de duidelijke scheiding van het pensmicrobiom van de moederdieren en kalveren, waarbij het verschil goed is voor 23,48% van de totale variatie ($P = 0,001$).

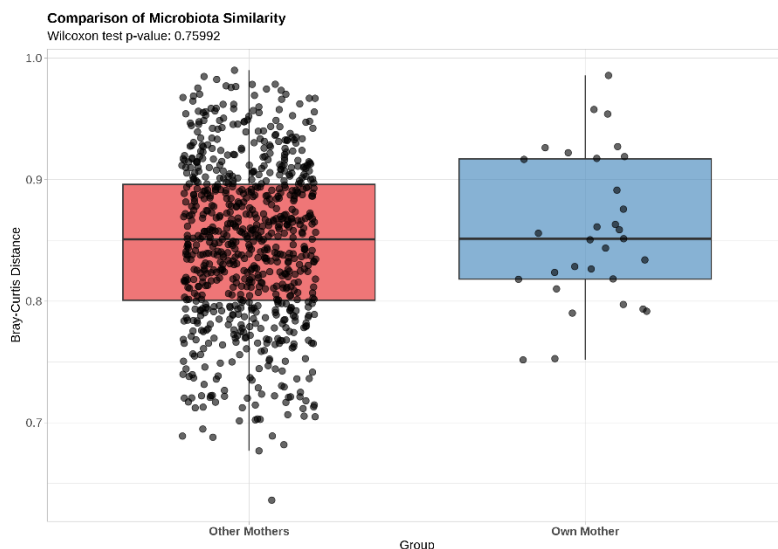


Figuur 7 De microbiële samenstelling en relatieve hoeveelheid van het pensmicrobiom van de moederdieren en kalveren. Linker paneel: PCA-grafiek met een duidelijke clustering tussen kalveren (geel) en moederdieren (blauw). Het staafdiagram (rechts) toont de relatieve hoeveelheid van de 20 meest voorkomende bacteriefamilies in het pensmicrobiom van de kalveren en moederdieren.



Figuur 8 De RDA-grafiek van de moederdieren (zwart) en de kalveren (blauw). Er is een significante scheiding zichtbaar ($P = 0,001$; E.V. = 23,48%), met pijlen die de top 10 bijdragende bacteriële taxa aangeven.

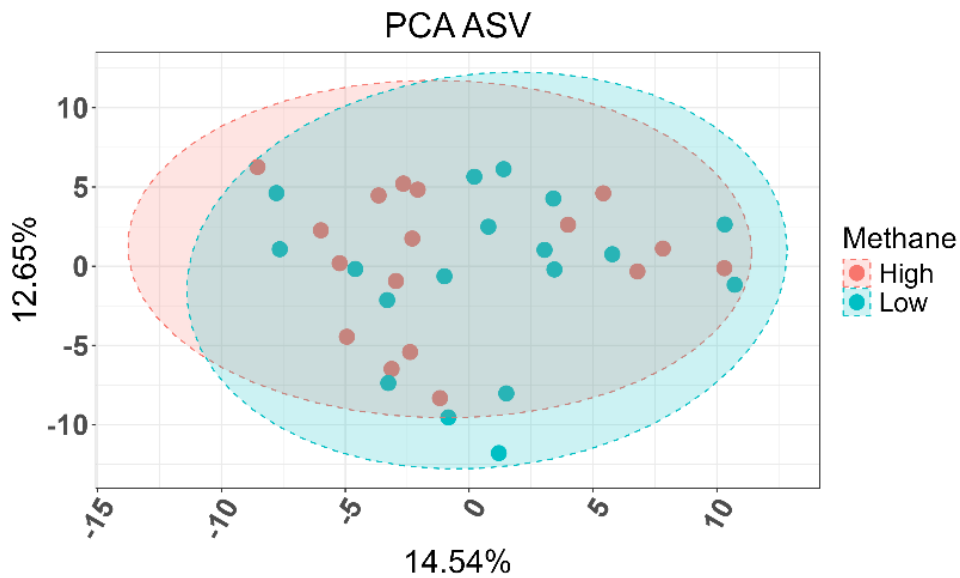
Zoals hierboven weergegeven, verschilt het pensmicrobioom sterk tussen de moederdieren en kalveren. De redenen hiervoor zijn enerzijds dat de pens van de kalveren nog volop in ontwikkeling is (mede afhankelijk van rantsoen en voeropnamedegrad) i.t.t. de pens van de moederdieren, en anderzijds dat het rantsoen van moederdieren en kalveren sterk verschilt in grondstof en chemische samenstelling. Desondanks kan het pensmicrobioom van een kalf een grotere overeenkomst hebben met dat van de moeder ten opzichte van elke andere willekeurige moeder. Om dit in kaart te brengen, analyseerden we het aantal gedeelde ASV's en berekenden we de Bray-Curtis-afstand. Hierbij is de gelijkheid in het microbioom van biologische moeder-kalf paren (d.w.z. kalf in vergelijking met zijn/haar eigen moeder) vergeleken met de gelijkheid in het microbioom van willekeurige moeder-kalf paren (d.w.z. kalf in vergelijking tot elk ander moederdier behalve haar/zijn eigen moederdier). De Bray-Curtis-afstandsanalyse, op basis van de bètadiversiteit, toonde geen significant verschil ($P = 0,760$) tussen biologische en willekeurige moeder-kalfparen (Figuur 9). Het microbioom van kalveren heeft dus geen sterkere gelijkheid met het microbioom van de eigen moeder dan met het microbioom van een andere willekeurige moeder.



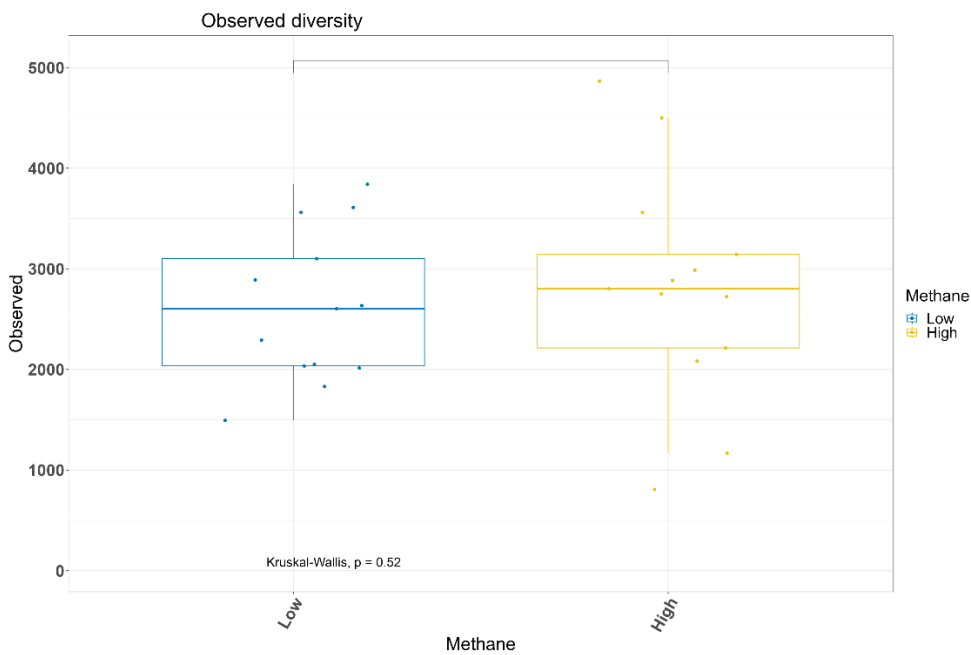
Figuur 9 De Bray-Curtis-afstandsanalyse, op basis van de bètadiversiteit, van de gelijkheid van het pensmicrobioom tussen biologische (blauw) en willekeurige (rood) moeder-kalfparen. De y-as geeft de afstand aan (0 = geen afstand, volledige gelijkheid; 1 = volledige afstand, geen enkele gelijkheid).

3.4.3 Kalveren

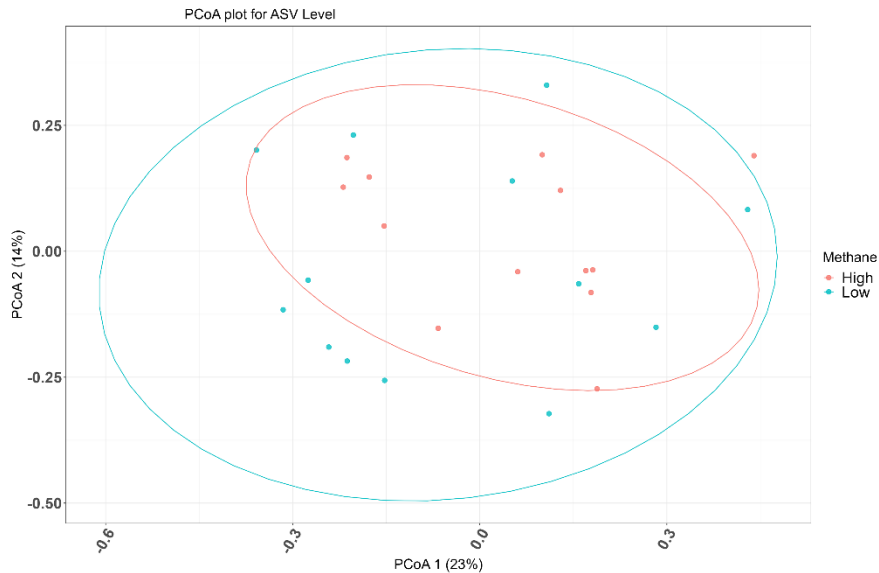
In deze sectie kijken we specifiek naar het pensmicrobioom van de kalveren en of de samenstelling hiervan gerelateerd is aan de toegewezen methaan ranking (d.w.z. het methaanemissieniveau van de moederdieren). De PCA-grafiek (Figuur 10; op ASV niveau) toont een grote overlap en geen verschil tussen de clusters van het pensmicrobioom van de kalveren die een lage dan wel hoge methaan ranking toegewezen hadden gekregen ($P > 0,050$). Dit suggereert dat het pensmicrobioom van de kalveren met aan lage dan wel hoge toegewezen methaan ranking zeer vergelijkbaar was. Er werd geen verschil waargenomen in de alfadiversiteit van het pensmicrobioom van de kalveren die een lage dan wel hoge methaan ranking toegewezen hadden gekregen (Figuur 11; Kruskal-Wallis-test, $P = 0,520$). De alfadiversiteit werd ook gemeten en geanalyseerd door de Shannon en Chao1 indexen, wat resulteerde in vergelijkbare resultaten (gegevens niet getoond). Dit suggereert dat de complexiteit en rijkdom van het pensmicrobioom van de kalveren vergelijkbaar was. Figuur 12 is een PCoA-grafiek, waar de bètadiversiteit van de kalveren wordt weergegeven. Er is een grote overlap zichtbaar tussen de kalveren die een lage dan wel hoge methaan ranking toegewezen hadden gekregen, waarbij geen statistisch verschil werd gevonden (Permanova: $P = 0,334$). De pRDA-grafiek (Figuur 13), die de experimentele groepen (1 – 4) als co-variabele gebruikt, onthult een kleine maar significante scheiding tussen de kalveren op basis van de toegewezen methaan ranking ($P = 0,049$ en E.V. = 1,15%). De pijlen vertegenwoordigen de top 10 van belangrijkste ASV's die bijdragen aan dit verschil. Het feit dat deze pijlen niet naar het centrum van de clusters wijzen, suggereert dat – hoewel deze ASV's belangrijk zijn – andere factoren naast de toegewezen methaan ranking ook bijdragen aan het verschil in de samenstelling van het pensmicrobioom van de kalveren.



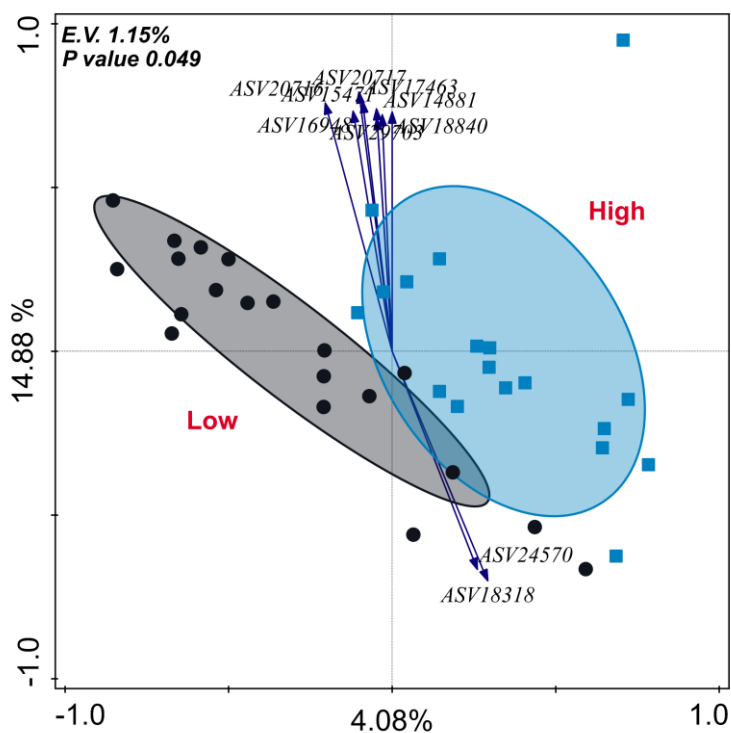
Figuur 10 PCA-grafiek van het pensmicrobioom van de kalveren. Blauw is van de kalveren die een lage methaan ranking hebben toegewezen en rood is van de kalveren die een hoge methaan ranking hebben toegewezen. Er grote overlap en geen significant verschil ($P > 0,050$).



Figuur 11 Alfadeiversiteit van het pensmicrobioom van de kalveren. Blauw is van de kalveren die een lage methaan ranking (op basis van de methaanemissie van hun moeder) hadden ontvangen. Geel is van de kalveren die een hoge methaan ranking (op basis van de methaanemissie van hun moeder) hadden ontvangen. De alfadeiversiteit was niet verschillend (Kruskal-Wallis-test; $P = 0,520$).



Figuur 12 Bètadiversiteit en PCoA-grafiek, gebaseerd op Bray-Curtis-ongelijkheid index, van het pensmicrobioom van de kalveren. Blauw van de kalveren die een lage methaan ranking (op basis van de methaanemissie van hun moeder) hadden ontvangen. Geel is van de kalveren die een hoge methaan ranking (op basis van de methaanemissie van hun moeder) hadden ontvangen. Ondanks enige clustering is er grote overlap en geen significant verschil (Permanova: $P = 0,334$).



Figuur 13 De pRDA-grafiek van de kalveren met een lage methaan ranking toegewezen (zwart) en de kalveren met een hoge methaan ranking toegewezen (blauw). Er is een significante scheiding zichtbaar ($P = 0,049$; E.V. = 1,15%), met pijlen die de top 10 bijdragende ASV's aangeven.

4 Discussie

4.1 Effect van week

Voor de discussie van de resultaten wordt in het bijzonder aandacht besteed aan het effect van de aan de kalveren toegewezen methaan ranking op basis van de methaanemissie van de moederdieren. Het effect van tijd (in levensdag dan wel meetweek) wordt dan ook niet in detail bediscussieerd. De kalveren waren 12 tot 16 weken oud op het moment dat de meetperiode achter de GreenFeed systemen van start ging. De kalveren waren dus nog volop in ontwikkeling en groei, wat voor een groot deel het effect van tijd verklaard. Conform de groeicurve, werden de kalveren groter en zwaarder. De groei was ook conform de norm (Soberon et al., 2012). Conform verwachting, nam de voeropname van de kalveren toe over de tijd, enerzijds doordat de behoefte van de kalveren toeneemt (i.v.m. groter lichaam), anderzijds omdat de capaciteit van de kalveren om voer tot zich te nemen toeneemt. Dit laatste komt door anatomische groei van de pens (d.w.z. toename totale massa en spiermassa van de pens alsmede ontwikkeling van de penswand en penspapillen; Reynolds et al., 2004) alsmede door functionele groei van de pens (d.w.z. toename van de fermentatie capaciteit en enzymactiviteit; Rey et al., 2012; Faubladiet et al., 2013). De sterke toename in de opname van de GreenFeed lokbrok, in het bijzonder t.o.v. week 1, heeft waarschijnlijk te maken met de gewenning aan het GreenFeed systeem. De kalveren waren voorafgaand aan de meetperiode immers niet getraind om van de GreenFeed gebruik te maken.

4.2 De moederdieren

4.2.1 Methaanemissie

Bij de moederdieren uit zowel de voedingsstal als de beweidingsproef was een substantieel verschil in methaanemissie waargenomen. De laag methaan producerende moederdieren uit de voedingsstal ($19,6 \pm 1,85$ g methaan per kg droge stof opname) hadden gemiddeld een 15% lagere methaanopbrengst t.o.v. de hoog methaan producerende moederdieren uit de voedingsstal ($23,1 \pm 1,66$ g methaan per kg droge stof opname). De laag methaan producerende moederdieren uit de beweidingsproef ($12,4 \pm 0,51$ g methaan per kg vet- en eiwit-gecorrigeerde melk) hadden gemiddeld een 10% lagere methaanintensiteit t.o.v. hoog methaan producerende moederdieren uit de beweidingsproef ($13,8 \pm 0,53$ g methaan per kg vet- en eiwit-gecorrigeerde melk). Deze niveauverschillen (10 tot 15%) in methaanemissie is natuurlijke variatie, aangezien geen van deze moederdieren een behandeling heeft ontvangen. Deze natuurlijke variatie kan door verschillende factoren verklaard worden, waaronder voeropnameniveau (kg droge stof per dag; Mills et al., 2003), pariteit en lactatiestadium (Garnsworthy et al., 2012; Koning et al., 2020), passage snelheid van de pensinhoud en de daaraan gekoppelde verteringscapaciteit (Swainson et al., 2008) en het aanwezige pensmicrobioom. Normaliter speelt rantsoensamenstelling ook een rol, maar binnen de groep van moederdieren van de voedingsstal en binnen de groep moederdieren uit de beweidingsproef werd hetzelfde rantsoen geconsumeerd, waardoor deze factor grotendeels was uitgesloten.

4.2.2 Pensmicrobioom

Het pensmicrobioom wordt verantwoordelijk gehouden voor een 15 tot 25% van de variatie in methaanproductie van volwassen melkkoeien (Difford et al., 2018; Ramayo-Caldas et al., 2020), waarbij een aantal micro-organismen in de pens sterk geassocieerd zijn met methaanemissie (Danielsson et al., 2017). Dit was ook de onderliggende hypothese van het hier beschreven onderzoek: de moederdieren hadden een ander methaanemissieniveau, welke deels veroorzaakt werd door een verschillende samenstelling van het pensmicrobioom. De resultaten van de microbiële analyse geven dit ook, hoewel niet consistent, aan.

De alfadiversiteit was verschillend tussen de moederdieren (voedingsstal en beweidingsonderzoek gezamenlijk), namelijk hoger voor de moederdieren met de hoge methaan ranking t.o.v. de moederdieren met een lage methaan ranking. De bètadiversiteit van het microbioom was echter gelijk voor alle moederdieren, ongeacht methaan ranking. Een gebrek aan een significant verschil in bètadiversiteit tussen de moederdieren met een lage en hoge methaan ranking suggereert dat, ondanks verschillen in alfadiversiteit, de samenstelling van het pensmicrobiom op soortniveau vergelijkbaar is. Echter, wanneer we op een hoger niveau kijken in de taxonomie, namelijk klasse en stam, laat de redundantie analyse een duidelijk verschil zien tussen de laag en hoog methaan producerende moederdieren. Er werd 5,88% en 5,36% van de variatie in het pensmicrobiom op respectievelijk stam en klasse niveau van de taxonomie verklaard door de methaan ranking van de moederdieren. De pijlen in de grafiek gaven de top 10 bacteriële taxa aan die bijdroegen aan deze scheiding, maar de richting van de pijlen (d.w.z. niet naar het midden van de clusters) suggereerde dat ook andere factoren hebben bijgedragen aan het verschil in de samenstelling van het pensmicrobiom tussen laag en hoog methaan producerende moederdieren. Er kan dan ook geen Stam of Klasse micro-organismen aangewezen worden die specifiek verschilden tussen de laag en hoog methaan producerende moederdieren. Al met al kunnen we concluderen dat het pensmicrobiom van de moederdieren verschillend was, wat deels het verschil in het methaanemissieniveau verklaarde. Dit is in overeenstemming met de literatuur.

4.3 De kalveren

4.3.1 Opfok

Het is voor dit onderzoek van belang te benadrukken dat er geen specifieke behandeling bij de kalveren is opgelegd. Alle kalveren zijn op exact dezelfde wijze opgefokt en behandeld (denk hierbij aan huisvesting, melkschema, rantsoen, proefopzet). Daarom spreken we in dit rapport dan ook niet van een behandelingseffect. De kalveren hebben alleen een methaan ranking toegewezen gekregen op basis van de methaanemissie van de moederdieren met als doel in kaart te brengen in hoeverre het pensmicrobiom alsmede het methaanemissieniveau overgedragen wordt van moederdier op kalf.

Ondanks dat dezelfde opfokstrategie en aanpak is toegepast, werden toch kleine numerieke verschillen geconstateerd. Zo zien we bijvoorbeeld dat de kalveren die een hoge methaan ranking toegewezen hadden gekregen, numeriek iets zwaarder waren bij de geboorte (42 t.o.v. 39 kg; niet significant verschillend). Hoewel de kalveren dus statistisch gezien niet verschilden in geboortegewicht, was er een numerieke 7% hoger geboortegewicht bij een hoge methaan ranking. Het is vanuit dit onderzoek niet te zeggen in hoeverre dit beeld structureel is, maar het is een belangrijk element om rekening mee te houden en te evalueren. Dit geldt wellicht in nog sterkere mate wanneer we in de toekomst door verschillende interventies een laag methaan producerende melkveestapel in Nederland hebben. In dit onderzoek is gecorrigeerd voor het verschil in geboortegewicht in de statistische analyse van de variabelen rondom lichaamsgewicht en lichaamsafmetingen. Daarnaast hadden de kalveren die een hoge methaan ranking toegewezen hadden gekregen, een significant hogere eerste biestopname en een numeriek (niet significant) hogere totale biestopname van een biest met een numeriek (niet significant) hogere brix waarde. Wij verwachten dat dit verschil van minimaal belang is wat betreft methaanemissie en samenstelling van het pensmicrobiom, wellicht in tegenstelling tot het belang van de hoeveelheid antilichamen die de kalveren via de biest ontvangen en vervolgens hun immuniteit opbouwen (Ferwerda-van Zonneveld et al., 2017). Wij hebben echter geen verschillen waargenomen in de gezondheid tussen de kalveren, vanaf de geboorte tot het einde van de proef.

4.3.2 Groei en voeropname

Op de opname van kalver TMR na (waarvoor een tendens te zien was), zien we geen verschil in de groei en voeropname tussen de kalveren met een lage dan wel hoge methaan ranking. Er zijn studies die een relatie hebben gevonden tussen het pensmicrobiom en de prestatie van de dieren in het latere leven. Zo waren sommige micro-organismen uit de pens geassocieerd met de prestaties van de melkkoeien, waaronder voerefficiëntie, metabolisme en gezondheid (Bickard en Weier, 2018; Zue et al., 2020; Wang et al., 2021). Tijdens het jonge leven heeft het pensmicrobiom impact op de ontwikkeling van de pens.

De aanwezigheid van vluchtige vetzuren en vervolgens de ontwikkeling van penspapillen (Lane en Jesse, 1997) is afhankelijk van het vermogen van het pensmicrobioom om complexe koolhydraten te fermenteren (Heinrichs, 2005). Ondanks dat de kalveren in deze proef minimaal 1.5 uur in contact zijn geweest met het microbioom van de moederdieren, lijkt de impact hiervan klein te zijn geweest op de groei en voeropname van de kalveren omdat (i) de verschillen in pensmicrobioom tussen de lage en hoge methaan producerende moederdieren klein was, (ii) het effect van opfokstrategie naar alle waarschijnlijkheid van groter belang is en (iii) de periode waarin binnenkomende micro-organismen de ontwikkeling van het pensmicrobioom kunnen beïnvloeden op ongeveer de eerste 20 levensdagen wordt geschat. Aangezien de opfok gelijk is geweest voor alle kalveren, is het gebrek aan een mogelijk effect van de methaan ranking van de moederdieren op de groei en voeropname van de kalveren waarschijnlijk veroorzaakt doordat het mogelijke effect verdund werd door andere effecten die veel langer de kans hebben gekregen om van invloed te zijn.

4.3.3 Methaanemissie

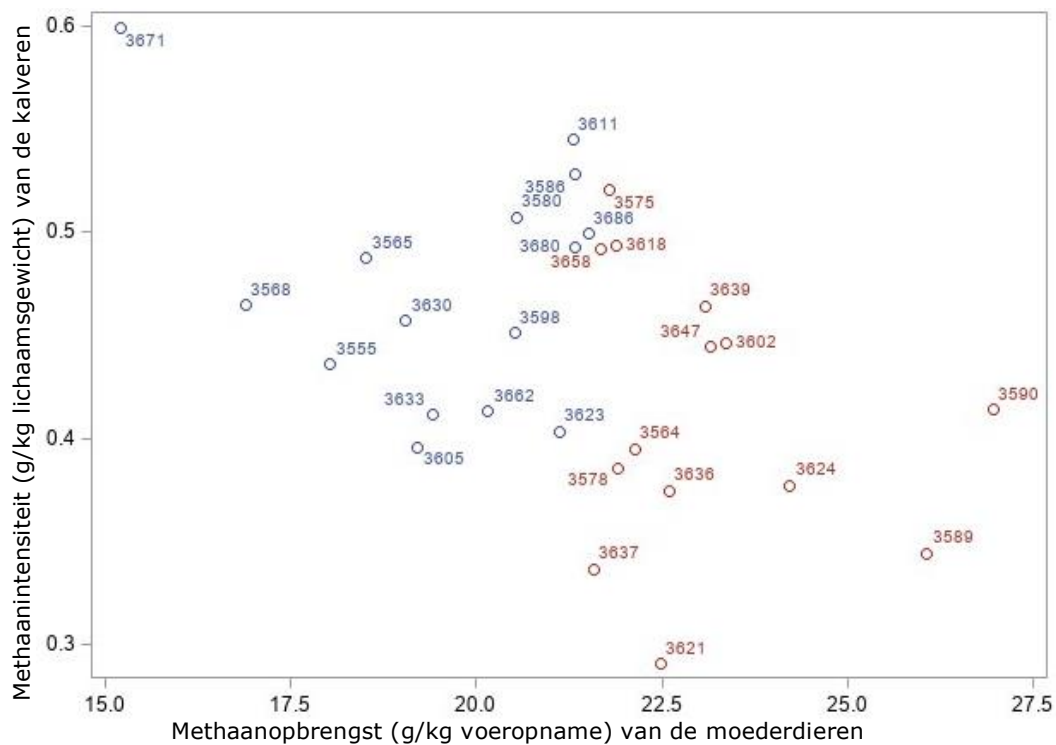
De resultaten rondom de methaanemissie van de kalveren zijn niet eenduidig en verschillen per eenheid waarin de methaanemissie uitgedrukt wordt. Zo zien we geen effect van de methaan ranking op methaanproductie (g/d) en methaanintensiteit (g/kg groei). Daarnaast is er sprake van een interactie tussen methaan ranking en week voor methaanintensiteit (g/kg lichaamsgewicht), waarbij het verschil in methaanemissie niet consistent is over de tijd. Echter, wanneer er een verschil is (in week 2 en 4; Figuur 2), is de methaanintensiteit (g/kg lichaamsgewicht) lager voor de kalveren die een hoge methaan ranking hebben toegewezen t.o.v. de kalveren die een lage methaan ranking hebben toegewezen. Ditzelfde geldt voor methaanopbrengst (tendens). De verschillen die we bij de kalveren zien, zijn te verklaren door de numeriek hogere methaanproductie in combinatie met een numeriek lager lichaamsgewicht voor de kalveren die een laag methaan ranking hadden gekregen. Hetzelfde geldt voor methaanopbrengst, waarbij de methaanproductie numeriek lager en de voeropname numeriek hoger is voor de kalveren die een laag methaan ranking hebben toegewezen. Daarnaast is in Figuur 2 de methaanintensiteit (g/kg lichaamsgewicht) van de kalveren over de tijd zichtbaar. Waar de methaanintensiteit van de kalveren met een hoge methaan ranking relatief stabiel is over de tijd, is de methaanintensiteit van de kalveren met een lage methaan ranking niet stabiel met een verschil tussen week 1 en weken 2 t/m 4 (week 1 is zo'n 15% lager). Dit kan niet verklaard worden, maar geeft wel aan dat er veel variatie in uitkomsten is.

Wanneer bij de kalveren vergelijkbare verschillen in methaanemissie werden gevonden als bij de moederdieren, waren deze verschillen groot genoeg om de hypothese te testen. Mocht er echter sprake zijn van een verschil in de methaanemissie zoals in de huidige studie, dan wijzen de uitkomsten juist in een tegenovergestelde richting, namelijk een 7 tot 8% lagere methaanemissie bij de kalveren die een hoge methaan ranking toegewezen hadden gekregen t.o.v. de kalveren die een lage methaan ranking toegewezen hadden gekregen. Dit geeft duidelijk aan dat het niveau van de methaanemissie niet 1 op 1 van moederdier op kalf overgedragen werd. Wanneer een moederdier een relatief lage hoeveelheid methaan produceert, zal dit niet direct gelden voor het kalf dat uit dat moederdier wordt geboren. Onze dierstudie is vanwege het kleine aantal gebruikte dieren (38 moederdieren en 39 kalveren) niet geschikt om conclusies te trekken met betrekking tot de erfelijkheid van de methaanemissie. In andere studies is de erfelijkheid van het niveau van methaanemissie wel aangetoond. Onder andere de studie van van Breukelen et al. (2023) laat dat zien voor methaanemissie gemeten gedurende een periode van 2 weken tot 3 maanden met het GreenFeed systeem en de sniffer in de automatische melkrobot, voor methaanemissie op zowel dagbasis als weekbasis. Een belangrijk onderscheid tussen de huidige studie en het erfelijkheidsonderzoek is dat de methaanemissie voor erfelijkheidsonderzoek doorgaans wordt uitgedrukt in methaanproductie (g/d) terwijl we in de huidige studie gekeken hebben naar methaanopbrengst dan wel methaanintensiteit.

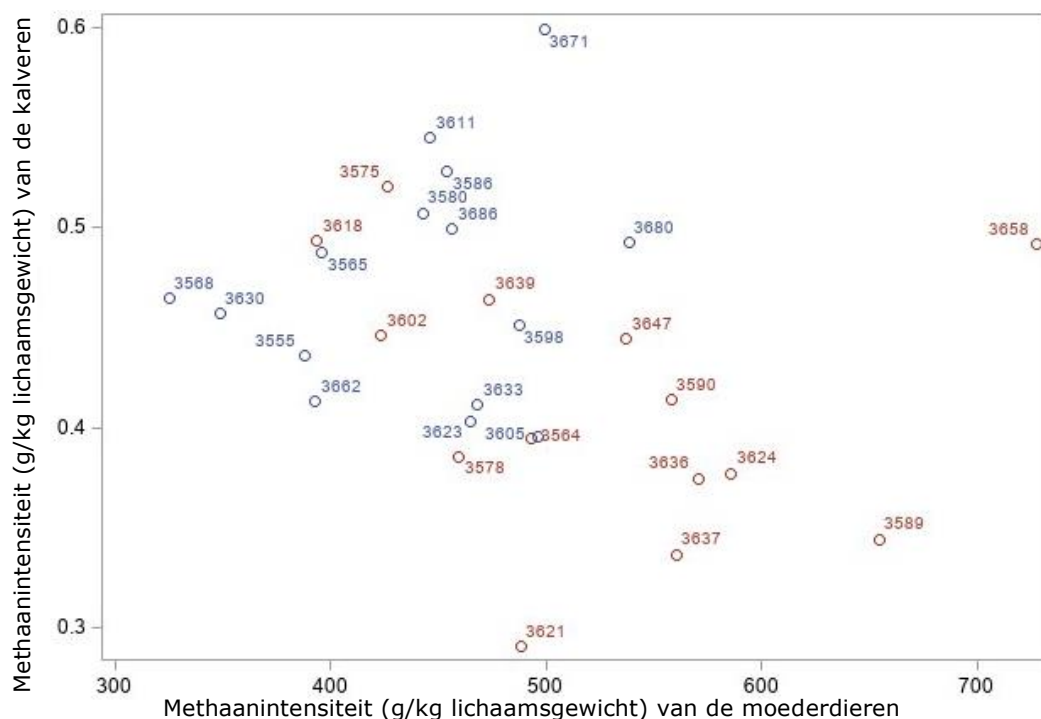
Er zijn 2 factoren om mee te wegen bij het beoordelen van de huidige proefresultaten. Zo hebben we in dit onderzoek gewerkt met de natuurlijke variatie in methaanemissie bij de moederdieren. Als we kijken naar de methaanopbrengst van de moederdieren uit de voedingsstal tijdens de droogstand (Tabel 1), werd gemiddeld genomen over de laag en hoog methaan producerende moederdieren een verschil van 15% geconstateerd. De grens tussen beide groepen is gelegd op 21,5 gram methaan per kg droge stof opname. In de laag methaan producerende groep moederdieren uit de voedingsstal, was de methaanopbrengst van 5 dieren tussen de 21,1 en 21,5 g/kg droge stof opname.

In de hoog methaan producerende groep moederdieren uit de voedingsstal, was de methaanopbrengst van 5 dieren tussen de 21,6 en 21,9 g/kg droge stof opname. Met andere woorden, het verschil tussen sommige moederdieren uit beide groepen bleef klein. Een alternatieve keuze was geweest om gebruik te maken van alleen de meest extreem methaan producerende moederdieren (bijv. de laagste 10% en de hoogste 10%) om de maternale overdracht van het methaanemissieniveau te onderzoeken, wat mogelijk duidelijkere verschillen aan het licht zou hebben gebracht. Voor extra inzicht in de huidige gegevens voor de relatie tussen de methaanemissie in moederdieren en kalveren is een regressieanalyse uitgevoerd met specifiek de moederdieren en hun kalveren uit de voedingsstal. Van deze moederdieren was namelijk de gemeten methaanopbrengst bekend (CH₄/kg droge stof). In Figuur 14 is de methaanintensiteit (g/kg lichaamsgewicht) van de kalveren (y-as) uitgezet tegen de methaanopbrengst (in g/kg droge stof voeropname) van de moederdieren (x-as). Elk punt geeft een kalf weer en de kleurcodering geeft aan welke methaan ranking het kalf toegewezen had gekregen op basis van de methaanemissie van de moederdieren. Zoals zichtbaar is, bevinden de kalveren met toegewezen lage methaan ranking zich aan de linkerzijde van de grafiek en de kalveren met de toegewezen hoge methaan ranking juist aan de rechterzijde van de grafiek. Dat wordt veroorzaakt door de experimentele opzet, namelijk het toewijzen van een methaan ranking op basis van de methaanemissie van de moederdieren (x-as). Met behulp van de regressieanalyse is vervolgens gekeken in hoeverre er een samenhang is tussen de methaanemissies van de moederdieren en de kalveren. De regressie blijkt significant ($P = 0.016$) negatief te zijn. Hieruit kan geconcludeerd worden dat de kalveren van moederdieren met een hoge methaanopbrengst juist een lagere methaanintensiteit (g/kg lichaamsgewicht) hadden en de kalveren van moederdieren met een lage methaanopbrengst juist een hoge methaanintensiteit (g/kg lichaamsgewicht) hadden. De hierboven weergegeven resultaten uit de statistische analyse komen dus op dezelfde wijze terug in deze lineaire regressie. Deze uitkomst is tegenstrijdig met de verwachting dat moederdieren met een hoge methaanopbrengst kalveren zouden hebben met een hoge methaanintensiteit op basis van de hypothese die we hadden voor deze studie. Mogelijk dat de negatieve relatie (deels) veroorzaakt wordt door het verschil in de methaanemissie eenheden die gebruikt zijn. De methaanemissie van de moederdieren was uitgedrukt t.o.v. droge stof voeropname (methaanopbrengst) maar dit was niet mogelijk bij de kalveren omdat zij op groepsniveau gevoerd werden. Gezien de relatie tussen voeropname en lichaamsgewicht bij kalveren (e.g., Goetsch et al., 1991), hebben wij aangenomen dat lichaamsgewicht bij kalveren een indicatie van de voeropname geeft en hebben we de methaanemissie van de kalveren uitgedrukt t.o.v. lichaamsgewicht (ook gebaseerd op individuele metingen). De vraag is of de negatieve relatie van Figuur 14 nog steeds tot uiting komt indien de methaanemissie van zowel de moederdieren als de kalveren wordt uitgedrukt in dezelfde eenheid van emissie. Hiervoor werd eveneens de methaanproductie (g/d) van dezelfde moederdieren uitgedrukt t.o.v. van hun lichaamsgewicht tijdens de droogstand (eveneens methaanintensiteit) om vervolgens nogmaals de regressieanalyse uit te voeren. Deze regressie, weergegeven in Figuur 15, was niet significant ($P = 0.136$) en ook de kalveren clusteren zich niet meer op de x-as zoals in Figuur 14. Echter, bij verwijdering van een uitbijter (kalf 3658) werd wel een significante relatie verkregen ($P = 0.023$), waarbij evenals in Figuur 14 moederdieren met een hoge methaanintensiteit kalveren lijken te geven met een lage methaanintensiteit.

Op basis van de resultaten uit de huidige studie lijkt het erop dat de methaanemissie alsmede de ranking op methaanemissie van de moederdieren (volwassen melkvee) niet te vergelijken is met de methaanemissie alsmede ranking op methaanemissie van hun kalveren. Een moederdier heeft een volledig ontwikkelde pens met een stabiel microbiom, terwijl bij de kalveren de pens nog volop in ontwikkeling is en het microbiom nog niet een stabiele samenstelling heeft aangenomen. Mogelijk dat hierdoor geen duidelijke relatie naar voren komt, ondanks dat de in deze studie onderzochte levensfase van de kalveren verondersteld wordt cruciaal te zijn wat betreft deze ontwikkeling. Mogelijk dat de methaanemissie en daardoor de ranking van de kalveren sterk afhankelijk is geweest van variatie in de mate waarin het pensmicrobiom zich heeft ontwikkeld op het moment van meten. Ook kan het zijn dat de gemeten methaanemissie alsmede ranking zoals we die nu gemeten hebben bij de kalveren op 12 tot 16 weken leeftijd nog niet representatief is voor de latere levensfase waarin ze melkkoe zijn. Deze kennis ontbreekt momenteel maar is nodig om langdurig laag methaan emitterende kalveren en koeien te creëren door interventie in het jonge leven van het kalf. Op dit moment is er nog te veel onzekerheid om stellige conclusies omtrent de relatie tussen de methaan emissie van koe en kalf te trekken maar de huidige studie geeft in ieder geval geen bevestiging dat de ranking voor methaanemissie in kalveren overeenkomt met die van de moederdieren.



Figuur 14 Regressieanalyse tussen de methaanopbrengst (g/kg voeropname) van de moederdieren (op de x-as) en de methaanintensiteit (g/kg lichaamsgewicht) van de kalveren (op de y-as). Elk is representatief aan een kalf (incl. oornummer kalveren) en de kleurcodering geeft aan welke methaan ranking het kalf toegewezen hadden gekregen op basis van de methaanemissie van de moederdieren (blauw = laag; rood = hoog). De regressie is significant negatief ($P = 0.016$).



Figuur 15 Regressieanalyse tussen de methaanintensiteit (g/kg lichaamsgewicht) van de moederdieren (op de x-as) en de methaanintensiteit (g/kg lichaamsgewicht) van de kalveren (op de y-as). Elk is representatief aan een kalf (incl. oornummer kalveren) en de kleurcodering geeft aan welke methaan ranking het kalf toegewezen hadden gekregen op basis van de methaanemissie van de moederdieren (blauw = laag; rood = hoog). De regressie is niet significant ($P = 0.136$).

4.3.4 Pensmicrobioom

Zoals hierboven reeds aangegeven, hebben wij gebruik gemaakt van orale uitstrijkjes. Wij hebben op basis van de resultaten van Tapio et al. (2016) aangenomen dat orale uitstrijkjes een goede proxy zijn voor het pensmicrobioom. Met andere woorden, dat het microbioom dat verzameld wordt met een oraal uitstrijkje een goede afspiegeling is van het microbioom in de pens. Dit is ook de reden dat wij naar het pensmicrobioom refereren in dit rapport. Recentelijk onderzoek geeft echter aan dat deze relatie tussen het microbioom in de bek (verzameld met een orale uitstrijk) en de pens sterk variabel is en ook niet altijd aanwezig (Young et al., 2020; Lamichhane et al., 2024; Skarlupka et al., 2024). In hoeverre er sprake is van een relatie tussen het microbioom in de bek en de pens binnen de huidige studie is niet bekend, aangezien er geen microbioom direct uit de pens verzameld is. We hebben intussen additioneel onderzoek gestart om te testen of er sprake is van een relatie tussen het microbioom in de bek en de pens bij zowel kalveren als volwassen melkkoeien op Dairy Campus. De resultaten daarvan zijn echter nog niet bekend en daardoor ook geen onderdeel van dit rapport. Voor nu – voor deze studie – doen we aanname dat het microbioom verzameld via een orale uitstrijk het pensmicrobioom goed weergeeft en we blijven dan ook refereren naar het pensmicrobioom.

Zoals hierboven aangegeven, hadden de moederdieren in de hoog en laag methaan groep – deels afhankelijk van de methaan ranking – een ander pensmicrobioom. De onderzoeksvraag was in hoeverre het pensmicrobioom van de moederdieren een rol speelt bij de vorming van het pensmicrobioom van de kalveren. Uit onderzoek is inmiddels duidelijk geworden dat de samenstelling van het pensmicrobioom beïnvloed kan worden door de genetica van het dier zelf (Goodrich et al., 2014), de samenstelling van het rantsoen (Smith et al., 2015; Sonnenburg et al., 2016), diergezondheid en geografische locatie (Linnenbrink et al., 2013) en de verticale transmissie of overerving van micro-organismen (d.w.z. overdracht van moeder op kalf; Paul et al., 2016). Meerdere studies hebben de erfelijkheid aangetoond van bepaalde taxa micro-organismen van het pensmicrobioom (bijv. Li et al., 2019; Sasson et al., 2017; Wallace et al., 2019; Jin et al., 2023). Een recente studie toonde aan dat vaginale microbiota, gevolgd door de huid van de uier en de biest een rol spelen bij het koloniseren van de pens van pasgeboren kalveren met bacteriën en archaea (Wang et al., 2016; Yeoman et al., 2018). Hierbij is de biest in het bijzonder relevant omdat het, samen met immunologische factoren, de vroegste vorm van voeding biedt aan zowel het pasgeboren kalf als aan de microbiota, inclusief die van de pens (Yeoman et al., 2018). Zo heeft o.a. Belanche et al. (2019) laten zien dat natuurlijke biest, in vergelijking tot een biestvervanger, de microbiële kolonisatie in de pens kan bevorderen, alsmede dat natuurlijk gespeende lammeren (d.w.z. aanwezigheid van het moederdier) bij het spenen een microbiologisch rijpere pens hadden in vergelijking met kunstmatig opgefokte lammeren. Dit laatste waarschijnlijk als gevolg van twee factoren: (i) een hogere opname van vast voer als gevolg van voedingsgedrag dat is aangeleerd van de moederdieren (Vieira et al., 2012) en (ii) een rol van moederdieren als microbiële 'incubators' van de lammeren (Abecia et al., 2014a, b). Ondanks dat er variatie zal zijn tussen de verschillende bacteriën alsmede tussen bacteriën en archaea, geeft gerapporteerd onderzoek aan dat het moederdier een belangrijke rol speelt bij de ontwikkeling van het pensmicrobioom van jonge herkauwers.

In de huidige studie hebben we op verschillende manieren naar maternale overdracht gekeken en de resultaten voor de maternale overdracht van het pensmicrobioom waren niet eenduidig. Hoewel de PCA-grafiek een duidelijk overlap liet zien in de samenstelling van het pensmicrobioom van de kalveren, ongeacht de toegewezen methaan ranking, laat de pRDA van de kalveren een klein, maar significant verschil zien. Zo werd 1,15% van de variatie in het pensmicrobioom van de kalveren verklaard door de toegewezen methaan ranking (o.b.v. de methaanemissie van de moederdieren). Het feit dat alle pijlen niet naar het centrum van de clusters wijzen, suggereert echter dat andere factoren naast de toegewezen methaan ranking hebben bijgedragen aan het verschil in de samenstelling van het pensmicrobioom van de kalveren. De samenstelling van het pensmicrobioom van de kalveren blijkt sterk te verschillen van dat van de moederdieren, ongeacht of het laag dan wel hoog methaan producerende dieren betreft. De redundantie analyse laat een duidelijk verschil zien in het pensmicrobioom van de moederdieren en de kalveren, waarbij 23,48% van de variatie in de samenstelling van het pensmicrobioom verklaard wordt door het type dier (d.w.z. moederdier t.o.v. kalf). De redenen hiervoor zijn enerzijds dat de pens van de kalveren nog volop in ontwikkeling is i.t.t. de pens van de moederdieren en anderzijds dat het rantsoen van moederdieren en kalveren sterk verschilt in grondstof en chemische samenstelling. De bacteriën die voornamelijk bij kalveren gevonden waren (o.a. Pasteurellaceae, Carnobacteriaceae, Moraxellaceae, Porphyromonas, Neisseria, Romboutsia, Nosocomiicoccus, Staphylococcus, en Jeotgalibaca), spelen voornamelijk een rol bij de vroege kolonisatie en ontwikkeling van het pensmicrobioom.

Bij de moederdieren daarentegen waren de bacteriën Lachnospiraceae, Actinomycetaceae, Rhizobiaceae, Conchiformibius, Kurthia, Jeotgalicoccus, Caryophanon en Streptococcus hoofdzakelijk aanwezig. Deze bacteriën worden in verband gebracht met het verteren van complexe koolhydraten. Het is dan ook de vraag, net zoals bij de methaanemissie, in hoeverre het pensmicrobioom van de moederdieren (volwassen melkvee) te vergelijken is met dat van de kalveren. Om de invloed van deze verschillen tussen moederdieren en kalveren uit te sluiten is een analyse op de overeenkomsten tussen kalf en moederdier enerzijds en tussen kalf en een willekeurige koe anderzijds uitgevoerd. Daaruit bleek dat de samenstelling van het pensmicrobioom van de kalveren niet sterker was gerelateerd (d.w.z. meer gelijkenis vertoont) met de samenstelling van het pensmicrobioom van het eigen moederdier (biologisch kalf-moederpaar) dan met de samenstelling van het pensmicrobioom van elk ander moederdier (willekeurig kalf-moederpaar). De resultaten van de huidige studie geven weer dat de samenstelling van het microbioom van de moederdieren een kleine rol heeft gespeeld bij de samenstelling van het microbioom van de kalveren. Hier zijn vanzelfsprekend dezelfde factoren als bij de methaanemissie van belang (zie sectie 4.3.3), maar de afwezigheid van maternale overdracht van het microbioom kan wellicht misschien ook deels verklaard worden door het feit dat bij de helft van de kalveren (een deel) van de biest afkomstig geweest was van 'donordieren', oftewel van een andere koe dan van haar of zijn eigen moeder. De keuze om biest van een donordier te verstrekken werd gemaakt om 2 redenen: (i) de hoeveelheid biest van de moeder was niet voldoende, of (ii) de biest van de moeder was van onvoldoende kwaliteit (brix waarde < 20; Dairy Campus protocol). Deze keuze heeft tot gevolg gehad dat de helft van de kalveren (hoewel gelijk verdeeld over de laag en hoog methaan ranking; data niet zichtbaar) actief microbioom hebben ontvangen van een donordier. De biest komt in principe niet of slechts gedeeltelijk in de pens terecht omdat de biest met behulp van de zogenaamde slokdarmsleuf reflex direct doorstroomt naar de lebmaag. Waarschijnlijk is deze sluiting echter niet volledig en komt er dus altijd een geringe hoeveelheid biest in de pens terecht. Zoals ook uit de literatuur blijkt (bijv. Belanche et al., 2019), speelt biest een belangrijke rol bij de kolonisatie van de pens en de ontwikkeling van het pensmicrobioom. Het is dan ook aannemelijk dat het geven van biest van donordieren aan de helft van de kalveren in deze proef een niet te verwaarlozen invloed heeft gehad op het microbioom en methaanemissieniveau van de kalveren. De afwezigheid van de maternale overdracht van het microbioom kan wellicht dat ook nog andere factoren veroorzaakt zijn. Denk hierbij o.a. aan het voeren van de biest via een speenemmer i.t.t. het drinken van biest bij de moeder zelf alsmede het omgevingsmicrobioom van de afkalfstal waarmee het kalf direct in aanmerking komt bij de geboorte. In de huidige studie lijkt het erop dat andere factoren dan het pensmicrobioom van de moederdieren een belangrijkere rol gespeeld hebben bij de vorming van de samenstelling van het pensmicrobioom van de kalveren.

5 Conclusies

Onder de experimentele omstandigheden gekozen in de huidige studie laten de resultaten zien dat (1) de samenstelling van het pensmicrobioom slechts voor een klein deel verantwoordelijk is voor het verschil in het methaanemissieniveau van de moederdieren, (2) dat het methaanemissieniveau van de moederdieren niet overgedragen wordt op de kalveren en (3) dat andere factoren dan het pensmicrobioom van de moederdieren een belangrijkere rol lijkt te hebben gespeeld en bij de vorming van de samenstelling van het pensmicrobioom van de kalveren. Hieruit wordt geconcludeerd dat maternale overdracht, volgens de hier gekozen aanpak, slechts een kleine rol speelt en daarmee geen belemmering lijkt te vormen voor interventiemogelijkheden in de ontwikkeling van het pensmicrobioom van het jonge kalf. Dat geeft een goede basis voor vervolgonderzoek naar het sturen van de ontwikkeling van de samenstelling van het pensmicrobioom van het jonge kalf richting een samenstelling die een lage methaanemissie tot gevolg heeft. Om deze reden is besloten vervolgonderzoek te starten gericht op een actieve overdracht van het microbioom, waarbij het effect wordt getoetst van enten van de pens op jonge leeftijd (gedurende de periode dat micro-organismen de pens koloniseren) met een extern en laag methaan producerend microbioom.

Literatuur

- Abecia, A., K. E. Waddams, G. Martínez-Fernandez, A. I. Martín-García, E. Ramos-Morales, C. J. Newbold, and D. R. Yáñez-Ruiz. 2014a. An antimethanogenic nutritional intervention in early life of ruminants modifies Ruminal colonization by Archaea. *Archaea* 1:1-12.
- Abecia, L., E. Ramos-Morales, G. Martínez-Fernandez, A. Arco, A. Martín-García, C. J. Newbold, and D. R. Yáñez-Ruiz. 2014b Feeding management in early life influences microbial colonisation and fermentation in the rumen of newborn goat kids. *Anim. Prod. Sci.* 54:1449-1454.
- Abrahamse, P. A., J. Dijkstra, B. Vlaeminck, and S. Tamminga. 2008. Frequent allocation of rotationally grazed dairy cows changes grazing behavior and improves productivity. *J. Dairy Sci.* 91:2033-2045.
- Belanche, A., D. R. Yáñez-Ruiz, A. P. Detheridge, G. W. Griffith, A. J. Kingston-Smith, and C. J. Newbold. 2019. Maternal versus artificial rearing shapes the rumen microbiome having minor long-term physiological implications. *Environ. Microbio.* 21:4360-4377.
- Bickhart D.M. and P. J. Weimer. 2018. Symposium review: host-rumen microbe interactions may be leveraged to improve the productivity of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 101:7680-7689.
- Danielsson R., J. Dicksved, L. Sun, H. Gonda, B. Müller, A. Schnürer, and J. Bertilsson. 2017. Methane production in dairy cows correlates with rumen methanogenic and bacterial community structure. *Front Microbiol* 8:226.
- Diao, Q., R. Zhang, and T. Fu. 2019. Review of strategies to promote rumen development in calves. *Animals* 9:490.
- Difford, G. F., D. R. Plichta, P. Løvendahl, J. Lassen, S. J. Noel, O. Højberg, A. D. G. Wright, Z. Zu, L. Kristensen, H. B. Nielsen, B. Guldbandsen, and G. Sahana. 2018. Host genetics and the rumen microbiome jointly associate with methane emissions in dairy cows. *PLoS Genet* 14:e1007580.
- Faubladier, C., V. Julliard, J. Danel, and C. Philippeau. 2013. Bacterial carbohydrate-degrading capacity in foal faeces: changes from birth to pre-weaning and the impact of maternal supplementation with fermented feed products. *Br. J. Nutr.* 110:1040-1052.
- Ferwerda-van Zonneveld, R., B. Bos, M. Plomp, A. van der Gaag, and A. Antonis. 2017. Kalversterfte kan minder als zorgvraag kalf centraal staat. Pleidooi voor een hernieuwde blik op kalveropfok. Wageningen livestock research report.
- Furman, O., L. Shenhav, G. Sasson, F. Kokou, H. Honig, S. Jacoby, T. Hertz, O. X. Cordero, E. Halperin, and I. Mizrahi. 2020. Stochasticity constrained by deterministic effects of diet and age drive rumen microbiome assembly dynamics. *Nat. Com.* 11:1904.
- Garnsworthy P. C., J. Craigon, J. H. Hernandez-Medrano, and N. Saunders. 2012. Variation among individual dairy cows in methane measurements made on farm during milking. *J. Dairy Sci.* 95:3181-3189.
- Goetsch, A. L., Z. B. Johnson, D. L. Galloway Sr., L. A. Forster Jr., A. C. Brake, W. Sun, K. M. Landis, M. L. Lagasse, K. L. Hall, and A. L. Jones. Relationships of body weight, forage composition, and corn supplementation to feed intake and digestion by Holstein steer calves consuming bermudagrass hay ad libitum. *J. Anim. Sci.* 69:2643-2645.
- Goodrich, J. K., J. L. Waters, A. C. Poole, S. J. Sutter, O. Koren, R. Blekhman, M. Beaumont, W. van Treuren, R. Knight, J. T. Bell, T. D. Spector, A. G. Clark, and R. E. Ley. 2014. Human genetics shape the gut microbiome. *Cell* 159:789-799.
- Heinrichs, J. 2005. Rumen development in the dairy calf. *Adv. Dairy Technol.* 17:179-87.
- Henderson, G., F. Cox, S. Ganesh, A. Jonker, W. Young, and P. H. Janssen. 2015. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. *Sci. Rep.* 5:14567.
- International Organization for Standardization. 1998. ISO 9831:1998. Animal feedstuffs, animal products, and feces or urine - Determination of gross calorific values–Bomb calorimeter method. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- International Organization for Standardization. 2005. ISO 5983:2005. Animal feeding stuffs. Determination of nitrogen content and calculation of crude protein content–Part 1: Kjeldahl method. International Standards Organization, Geneva, Switzerland.

- Jin, S., Z. Zhang, G. Zhang, B. He, Y. Qin, B. Yang, Z. Yu, and J. Wang. 2023. Maternal rumen bacteriota shapes the offspring rumen bacteriota, affecting the development of young ruminants. *Microbiol. Spectr.* 11:e03590-22.
- Klootwijk, C., L. Koning, G. Holshof, A. Klop, and R. Zom. Enterische methaanemissie van melkvee in relatie tot (vers) graskwaliteit: jaarrapport 1: 2020: resultaten eerste jaar (2020) van een meerjarige beweidingsproef naar methaanemissie bij weidegang, zomerstalvoeding en graskuil. Wageningen Livestock Research, Report 1342.
- Koning, L., J. van Riel, and L. Šebek. 2020. Enteric methane emission of the Dutch dairy herd : Average and variation of enteric methane emission among the Dutch dairy herd. Wageningen Livestock Research, Report 1267.
- Lamichhane, U., M. Dycus, and J. Lourenco. 2024. Investigation of the interrelationship between ruminal and oral microbiomes of Angus bulls. Book of abstracts for the 75th EAAP Annual Meeting, Florence, Italy, 2024.
- Lane, B. A. and B. W. Jesse. 1997. Effect of volatile fatty acid infusion on development of the rumen epithelium in neonatal sheep. *J. Dairy Sci.* 80:740-746.
- Li, F., C. Li, Y. Chen, J. Liu, C. Zhang, B. Irving, C. Fitzsimmons, G. Plastow, and L. L. Guan. 2019. Host genetics influence the rumen microbiota and heritable rumen microbial features associate with feed efficiency in cattle. *Microbiome* 7:92.
- Linnenbrink, M., J. Wang, E. A. Hardouin, S. Künzel, D. Metzler, and J. F. Baines. 2013. The role of biogeography in shaping diversity of the intestinal microbiota in house mice. *Mol. Ecol.* 22:1904-1916.
- Mills, J. A. N., E. Kebreab, C. M. Yates, L. A. Crompton, S. B. Cammell, M. S. Dhanoa, R. E. Agnew, and J. France. 2003. Alternative approaches to predicting methane emissions from dairy cows. *J. Anim. Sci.* 81:3141-3150.
- Morgavi, D. P., M. Popova, D. R. Yáñez-Ruíz, and E. Forano. 2020. Colonization and establishment of the rumen microbiota – opportunities to influence productivity and methane emissions. In: McSweeney, C.S. en R.I. Mackie. *Improving rumen function*. Burleigh Dodds Science Publishing, Cambridge, UK.
- Nylund, L., R. Satokari, S. Salminen, S. and W. M. de Vos. 2014. Intestinal microbiota during early life – impact on health and disease. *Proc. Nutr. Soc.* 73:457-469.
- Paul, H. A., M. R. Bomhof, H. J. Vogel, and R. A. Reimer. 2016. Diet-induced changes in maternal gut microbiota and metabolomic profiles influence programming of offspring obesity risk in rats. *Sci. Rep.* 6:20683.
- Ramayo-Caldas, Y., L. Zingaretti, M. Popova, J. Estellé, A. Bernard, N. Pons, P. Bellot, N. Mach, A. Rau, H. Roume, M. Perez-Encisco, P. Faverdin, N. Edouard, D. Ehrlich, D. P. Morgavi, and G. Renand. 2020. Identification of rumen microbial biomarkers linked to methane emission in Holstein dairy cows. *J Anim Breed Genet.* 137:49-59.
- Rey, M., F. Enjalbert, and V. Monteils. 2012. Establishment of ruminal enzyme activities and fermentation capacity in dairy calves from birth through weaning. *J. Dairy Sci.* 95:1500-1512.
- Reynolds, C., B. Dürst, B. Lupoli, D. J. Humphries, and D. E. Beever. 2004. Visceral tissue mass and rumen volume in dairy cows during the transition from late gestation to early lactation. *J. Dairy Sci.* 87:961-971.
- Roehe, R., R. J. Dewhurst, C. A. Duthie, J. A. Rooke, N. McKain, D. W. Ross, J. J. Hyslop, A. Waterhouse, T. C. Freeman, M. Watson, and R. J. Wallace. 2016. Bovine host genetic variation influences rumen microbial methane production with best selection criterion for Low methane emitting and efficiently feed converting hosts based on metagenomic gene abundance. *PLoS Genet* 12: e1005846.
- Sasson, G., S. Kruger Ben-Shabat, E. Seroussi, A. Doron-Faigenboim, N. Shterzer, S. Yaacoby, M. E. Berg Miller, B. A. White, E. Halperin, and I. Mizrahi. 2017. Heritable bovine rumen bacteria are phylogenetically related and correlated with the cow's capacity to harvest energy from its feed. *mBio* 8:e00703-17.
- Skarlupka J. H., M. S. Cox, A. J. Steinberger, D. L. Sbardellati, J. C. McClure, D. M. Bickhart, A. J. Scheftgen, I. Zuniga-Chaves, L. A. Wolfe, E. Paget, C. Skadron, N. Attipetty, and G. Suen. 2024. Oral swabs as a proxy for direct ruminal microbiome sampling in Holstein dairy cows is correlated with sample color. *Front. Microbiol.* 15:1466375.
- Skillman, L. C., P. N. Evans, G. E. Naylor, B. Morvan, G. N. Jarvis, and K. N. Joblin. 2004. 16S ribosomal DNA-directed PCR primers for ruminal methanogens and identification of methanogens colonising young lambs. *Anaerobe* 10:277-285.
- Smith, C. C. R., L. K. Snowberg, J. Gregory Caporaso, R. Knight, and D. I. Bolnick. 2015. Dietary input of microbes and host genetic variation shape among-population differences in stickleback gut microbiota. *ISME J.* 9:2515-2526.

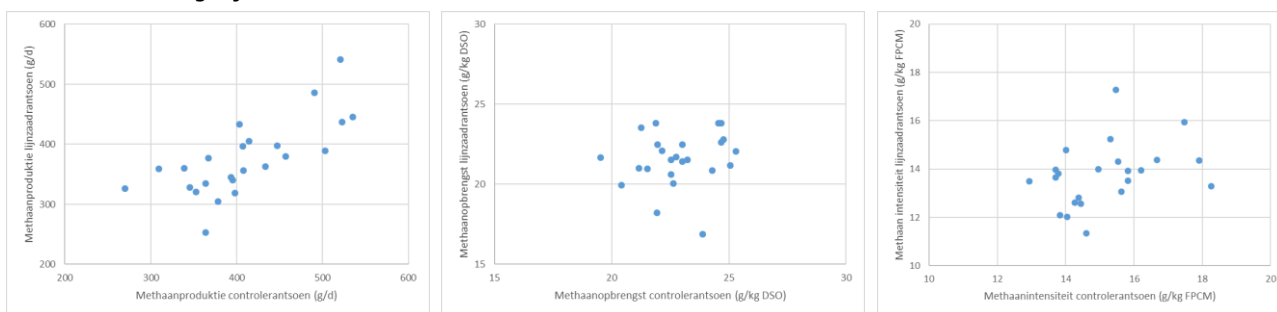
- Soberon, F., E. Raffrenato, R. W. Everett, and M. E. van Amburgh. 2012. Preweaning milk replacer intake and effects on long-term productivity of dairy calves. *J. Dairy Sci.* 95:783-793.
- Sonnenburg, E. D., S. A. Smits, M. Tikhonov, S. K. Higginbottom, N. S. Wingreen, and J. L. Sonnenburg. 2016. Diet-induced extinctions in the gut microbiota compound over generations. *Nature* 529:212-215.
- Swainson, N. M., S. O. Hoskin, H. Clark, C. S. Pinares-Patiño, and I. M. Brookes. 2008. Comparative methane emissions from cattle, red deer and sheep. *Proc. N.Z. Soc. Anim. Prod.* 68:59-62.
- Tapio, I., K. J. Shingfield, N. McKain, A. Bonin, D. Fisher, A. R. Bayat, J. Vilkki, P. Taberlet, T. J. Schnellling, and R. J. Wallace. 2016. Oral samples as non-invasive proxies for assessing the composition of the rumen microbial community. *PLoS ONE* 11(3).
- van Breukelen, A. E., M. N. Aldridge, R. F. Veerkamp, L. Koning, L. B. Sebek, and Y. de Haas. 2023. Heritability and genetic correlations between enteric methane production and concentration recorded by GreenFeed and sniffers on dairy cows. *J. Dairy Sci.* 106:4121-4132.
- van Dijk, W., J. A. de Boer, R. L. M. Schils, M. H. A. de Haan, P. Mostert, J. Oenema, and J. Verloop. 2023. Rekenregels van de KringloopWijzer 2023; Achtergronden van BEX, BEA, BEN, BEP en BEC: actualisatie van de 2022-versie. Wageningen Research, Rapport WPR-1279.
- van Gastelen, S., J. Dijkstra, J. M. L. Heck, M. Kindermann, A. Klop, R. de Mol, D. Rijnders, N. Walker, and A. Bannink. 2022. Methane mitigation potential of 3-nitrooxypropanol in lactating cows is influenced by basal diet composition. *J. Dairy Sci.* 105:4064-4082.
- van Gastelen, S., E. E. A. Burgers, J. Dijkstra, R. de Mol, W. Muizelaar, N. Walker, and A. Bannink. 2024. Long-term effects of 3-nitrooxypropanol on methane emission and milk production characteristics in Holstein-Friesian dairy cows. *J. Dairy Sci.* 107:5556-5573.
- Vieira, A. D. P., M. Von Keyserlingk, D. and Weary. 2012. Presence of an older weaned companion influences feeding behavior and improves performance of dairy calves before and after weaning from milk. *J. Dairy Sci.* 95:3218-3224.
- Wagner, B. D., G. K. Grunwald, G. O. Zerbe, S. K. Mikulich-Gilbertson, C. E. Robertson, E. T. Zemanick, and J. K. Harris. 2018. On the use of diversity measures in longitudinal sequencing studies of microbial communities. *Front. Microbiol.* 9:1037.
- Wallace, R. J., J. A. Rooke, N. McKain, C. A. Duthie, J. J. Hyslop, D. W. Ross, A. Waterhouse, M. Watson, and R. Roehe. 2015. The rumen microbial metagenome associated with high methane production in cattle. *BMC Genomics* 16:839.
- Wallace, R. J., G. Sasson, P. C. Garnsworthy, I. Tapio, E. Gregson, P. Bani, P. Huhtanen, A. R. Bayat, F. Strozzi, F. Biscarini, T. J. Snelling, N. Saunders, S. L. Potterton, J. Craigon, A. Minuti, E. Trevisi, M. L. Callegari, F. P. Cappelli, E. H. Cabezas-Garcia, J. Vilkki, C. Pinares-Patino, K. O. Fliegerová, J. Mrázek, H. Sechovcová, J. Kopečný, A. Bonin, F. Boyer, P. Taberlet, F. Kokou, E. Halperin, J. L. Williams, K. J. Shingfield, and I. Mizrahi. 2019. A heritable subset of the core rumen microbiome dictates dairy cow productivity and emissions. *Sci Adv* 5:eaav8391.
- Wang, W., C. Li, F. Li, X. Wang, X. Zhang, T. Liu, F. Nian, X. Yue, F. Li, X. Pan, Y. La, F. Mo, F. Wang, and B. Li. 2016. Effects of early feeding on the host rumen transcriptome and bacterial diversity in lambs. *Sci. Rep.* 6:32479.
- Wang, Y., X. Nan, Y. Zhao, L. Jiang, M. Wang, H. Wang, F. Zhang, F. Xue, D. Hua, J. Liu, J. Yao, and B. Xiong. 2021. Rumen microbiome structure and metabolites activity in dairy cows with clinical and subclinical mastitis. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 12:36.
- Weimer, P. J. 2015. Redundancy, resilience, and host specificity of the ruminal microbiota: implications for engineering improved ruminal fermentations. *Front. Microbiol.* 6:296.
- Xue, M. Y., H. Z. Sun, X. H. Wu, J. X. Liu, and L. L. Guan. 2020. Multi-omics reveals that the rumen microbiome and its metabolome together with the host metabolome contribute to individualized dairy cow performance. *Microbiome* 8:64.
- Yáñez-Ruíz, D. R., L. Abecia, and C. J. Newbold. 2015. Manipulating rumen microbiome and fermentation through interventions during early life: a review. *Front. Microb.* 6:1133.
- Young, J., J. H. Skarlupka, M. S. Cox, R. T. Resende, A. Fischer, K. F. Kalscheur, J. C. McClure, J. B. Cole, G. Suen, and D. M. Bickhart. 2020. Validating the use of bovine buccal sampling as a proxy for the rumen microbiota by using a time course and random forest classification approach. *Appl. Environ. Microbiol.* 86:e00861-20.
- Yeoman, C. J., S. L. Ishaq, E. Bichi, S. K. Olivo, J. Lowe, and B. M. Aldridge. 2018. Biogeographical differences in the influence of maternal microbial sources on the early successional development of the bovine neonatal gastrointestinal tract. *Sci. Rep.* 8:1-14.

Zimmerman, P., S. Zimmerman, S. Utsumi, and D. Beede. 2011. Development of a user friendly online system to quantitatively measure metabolic gas fluxes from ruminants. *J. Dairy Sci.* 94 (ESuppl.1):760.

Bijlage 1 Verklarende variabelen variatie methaanemissie

Dijkstra, J., L. Šebek, and A. Bannink. 2018.

In een experiment in respiratiekamers van Wageningen University is de methaanproductie, voeropname, en melkproductie van 24 lacterende koeien bepaald (Van Gastelen et al., 2017). Het betrof een cross-over proef, waarbij koeien een controle rantsoen ontvingen (40% maiskuil, 30% graskuil, 30% krachtvoer) of een rantsoen met lijnzaadolie (lijnzaadolie 7,6% (op droge stof basis) van krachtvoer). De helft van de dieren ontving eerst het controle rantsoen en (na een uitwasperiode van 2 weken) het lijnzaadolie rantsoen, en de andere helft van de dieren net omgekeerd. De gewenningsperiode aan het rantsoen was telkens 12 dagen en het verblijf in de respiratiekamers 5 dagen. Deze proef geeft de mogelijkheid om te onderzoeken of koeien consequent (op beide rantsoenen) relatief veel of weinig methaan produceren, en geeft daarmee een indicatie van mogelijke variatiebronnen.



Figuur 1.1. Methaanproductie (g/d; links), methaanopbrengst (g/kg droge stof opname; midden), en methaanintensiteit (g/kg vet- en eiwit-gecorrigeerde melk; rechts) van 24 melkkoeien op een controle rantsoen en een rantsoen met lijnzaadolie.

In Figuur 1.1 zijn methaanemissies weergegeven voor de 24 dieren op beide rantsoenen. Met hulp van Kendall's Tau correlatie (rangcorrelatiecoëfficiënt) is de samenhang tussen methaanemissie op controle en op lijnzaadrantsoen van individuele dieren getest. Kendall's tau wordt gebruikt als er relatief weinig waarnemingen zijn en als niet aan aanname van homoscedasticiteit wordt voldaan. Tabel 1.1 geeft de resultaten.

Bij methaanproductie (g/d) is er een grote mate van samenhang ($\tau = 0,54$; $P < 0,001$) tussen methaanproductie op controle en op lijnzaadrantsoen. Dieren die op het ene rantsoen een hoge methaanproductie hebben, hebben dat op het andere rantsoen ook. Dit geeft aan dat specifieke kenmerken van dieren een deel van de variatie in methaanproductie kan verklaren. Het is aannemelijk dat dieren vanwege verschillen in voeropname (droge stof opname), gerelateerd aan bijvoorbeeld pariteit en lactatiestadium, op beide rantsoenen ten opzichte van de andere dieren consequent hoog of laag in methaanproductie zijn.

Bij methaanopbrengst (g/kg droge stof opname) is er geen significante samenhang ($\tau = 0,15$; $P = 0,298$). Dieren met een hoge methaanopbrengst op het ene rantsoen hoeven geen hoge methaanopbrengst op het andere rantsoen te hebben. Dit geeft aan dat de waargenomen variatie voor methaanopbrengst wellicht niet aan kenmerken zoals voeropname of melkproductie toegewezen kan worden.

Bij methaanintensiteit (g/kg vet- en eiwit-gecorrigeerde melk) is er een trend tot samenhang ($\tau = 0,28$; $P = 0,053$). Hier speelt wellicht mee dat dieren met een hoge melkproductie een kleiner deel van het voer gebruiken voor eigen onderhoud, en daarmee een lagere methaanintensiteit hebben.

Het is aannemelijk dat dieren met een hoge melkproductie (gerelateerd aan genetische achtergrond, pariteit, en lactatiestadium) op het ene rantsoen ook een hoge melkproductie op het andere rantsoen hebben. Een enigszins beperkt deel van waargenomen variatie zou dus zo verklaard kunnen worden.

Tabel 1.1 Methaan emissies per behandeling en Kendall's tau correlatie kenmerken. DSO, voeropname (kg drogestof/dag); FPCM, vet- en eiwit-gecorrigeerde melkproductie (kg/d).

	CH ₄ (g/d)		CH ₄ (g/kg droge stof opname)		CH ₄ (g/kg vet- en eiwit-gecorrigeerde melk)	
	Controle	Lijnzaad	Controle	Lijnzaad	Controle	Lijnzaad
Gemiddelde	409	375	22,9	21,5	15,5	13,8
Standaarddeviatie	69,1	62,5	1,54	1,67	2,10	1,29
Kendall's tau	0,54		0,15		0,28	
Standaarddeviatie	0,146		0,146		0,146	
P-waarde	<0,001		0,298		0,053	
95% confidence interval	0,26 - 0,83		-0,13 - 0,44		0,00 - 0,57	

In de meeste experimenten uitgevoerd in klimaatrespiratiekamers van Wageningen zijn dieren niet herhaald gemeten binnen 1 experiment. De variatie tussen koeien in (eenmalig gemeten) methaanemissie in die experimenten kan gerelateerd zijn aan de opgelegde behandeling (1 of meer rantsoencontrasten) en aan specifieke dierkenmerken. Verschillen tussen dieren in voeropname, in melkproductie, en in vertering van het voer kunnen potentieel variatie in methaanemissie verklaren, en zijn bepaald in een aantal experimenten uit het EmissieArm Veevoer en het TIFN Methaanemissie programma. Dit betreft experimenten waarbij het effect op methaanemissies onderzocht werd van verschillen in graskwaliteit (bij zero-grazing) (4 rantsoencontrasten; Warner et al., 2015), graskuil kwaliteit (via oogststadium en bemestingsnivo; 6 rantsoencontrasten; Warner et al., 2016), graskuil kwaliteit (via oogststadium en voeropnamenivo; 8 rantsoen – opnamenivo-contrasten; Warner et al., 2017), maiskuil kwaliteit (via oogststadium; 4 rantsoencontrasten; Hatew et al., 2016), voeradditieven (docosahexaenoic acid en nitraat; 4 rantsoencontrasten; Klop et al., 2016), en toevoeging lijnzaadolie in eerder genoemd experiment van Van Gastelen et al. (2017). Om te onderzoeken welk deel van de variatie verklaard kan worden uit droge stof opname, melkproductie, of fecale organische stof vertering, werd een mixed model toegepast waarin (per experiment) het specifieke rantsoen als random factor werd opgenomen en vervolgens het resterende deel van de variatie tussen dieren gerelateerd werd (lineaire regressie) aan voeropname, melkproductie en vertering. Bij methaanopbrengst werd een mogelijke verklaring van individuele variatie door voeropname niet meegenomen, omdat voeropname zelf al gebruikt is om methaanopbrengst van ieder dier te bepalen. Eveneens werd bij methaanintensiteit een mogelijke verklaring van individuele variatie door melkproductie niet meegenomen, omdat melkproductie zelf al gebruikt is om methaanintensiteit van ieder dier te bepalen.

Een groot deel van de individuele variatie tussen dieren in methaanproductie (nadat gecorrigeerd is voor het effect van rantsoen) kan verklaard worden door verschillen in voeropname (R^2 tussen 49,7% en 81,2%), en in mindere mate ook door het niveau van de melkproductie (R^2 tussen 29,4% en 70,4%) (Tabel 2.1) Het is uit literatuur algemeen bekend dat de correlatie tussen voeropname en methaanproductie hoog is. Hoe meer voer een dier opneemt, hoe meer methaan er door fermentatie van dit voer geproduceerd kan worden. Melkproductie heeft geen directe invloed op methaanproductie. Het verband kan verklaard worden uit de positieve relatie tussen melkproductie en voeropname.

Tabel 2.1 Relatie tussen methaanproductie (g/d) en voeropname (droge stof opname) en melkproductie (vet- en eiwit gecorrigeerde melkproductie) na correctie voor opgelegd behandelingseffect per experiment.

Experiment	Droge stof opname (kg/d)			Vet- en eiwit-gecorrigeerde melk (kg/d)		
	Snijpunt	Helling	R ² (%)	Snijpunt	Helling	R ² (%)
Warner et al. (2015)	-210 ± 104	35,0 ± 6,9**	55,1	190 ± 44*	6,2 ± 2,1**	49,2
Warner et al. (2016)	43 ± 24	20,5 ± 1,6**	81,2	250 ± 22**	4,0 ± 0,9**	29,4
Warner et al. (2017)	29 ± 32	19,7 ± 1,9**	73,0	216 ± 31**	4,7 ± 1,1**	35,5
Hatew et al. (2016)	153 ± 51 [†]	12,9 ± 2,8**	49,7	209 ± 52*	5,9 ± 1,7**	34,4
Klop et al. (2016)	83 ± 41	14,7 ± 2,1**	71,1	145 ± 43*	7,1 ± 1,4**	58,5
van Gastelen et al. (2017)	66 ± 24	18,4 ± 1,3**	80,8	97 ± 35	10,9 ± 1,1**	70,4

***P* < 0,01; **P* < 0,05; [†]*P* < 0,10; R², aandeel verklaarde variatie.

Van de individuele variatie tussen dieren in methaanopbrengst (na correctie voor het effect van specifieke rantsoen) wordt een klein deel van de verschillen verklaard door variatie in melkproductie (R² tussen 0,2% en 34,4%), waarbij slechts in 1 experiment een significante relatie met melkproductie, en in 2 experimenten een tendens tot relatie met melkproductie, werd gevonden (Tabel 3.1). Variatie in fecale OS-vertering verklaarde een groter, maar nog steeds vrij bescheiden, deel van de individuele variatie tussen dieren in methaanopbrengst (R² tussen 2,1% en 55,0%) (Tabel 3.1). Daarbij werd in 2 van de 6 experimenten een significante relatie met fecale vertering gevonden, en in 2 experimenten een tendens tot relatie met vertering. De relatie met vertering is in 2 gevallen positief en in 2 negatief. Verwacht kan worden dat als voer beter verteerd, dit voor een deel door betere fermentatie in de pens veroorzaakt wordt, en daarmee kan er meer methaan per eenheid opgenomen voer gevormd worden (positieve relatie). Aan de andere kant gaat een hogere vertering vaak gepaard met een verschuiving in het patroon van vluchtige vetzuren in de pens (meer propionzuur en minder azijnzuur), wat juist zou resulteren in een lagere hoeveelheid methaan per eenheid voer (negatieve relatie). Al met al is fecale vertering een niet onbelangrijke, maar variabele factor om variatie in methaanopbrengst te verklaren.

Tabel 3.1 Relatie tussen methaanopbrengst (g/kg droge stof opname) en melkproductie (vet- en eiwit gecorrigeerde melkproductie; kg/d) en fecale organische stof vertering (%) na correctie voor opgelegd behandelingseffect per experiment.

Experiment	Organische stof vertering			vet- en eiwit gecorrigeerde melk		
	Snijpunt	Helling	R ² (%)	Snijpunt	Helling	R ² (%)
Warner et al. (2015)	7,3 ± 6,9	0,176 ± 0,087 [†]	16,7	16,6 ± 2,5**	0,219 ± 0,119 [†]	14,4
Warner et al. (2016)	32,9 ± 5,4**	-0,122 ± 0,069 [†]	6,0	24,3 ± 1,0**	-0,036 ± 0,038	2,7
Warner et al. (2017)	41,1 ± 4,1**	-0,261 ± 0,055**	55,0	21,3 ± 1,4**	0,012 ± 0,047	0,2
Hatew et al. (2016)	11,7 ± 7,7	0,136 ± 0,106	7,3	30,0 ± 2,7**	-0,284 ± 0,086**	34,4
Klop et al. (2016)	-7,0 ± 11,5	0,355 ± 0,106*	33,9	19,2 ± 2,3**	0,026 ± 0,072	0,7
van Gastelen et al. (2017)	14,1 ± 8,3	0,101 ± 0,102	2,1	24,5 ± 1,4*	-0,084 ± 0,046 [†]	6,9

***P* < 0,01; **P* < 0,05; [†]*P* < 0,10; R², aandeel verklaarde variatie.

Van de individuele variatie tussen dieren in methaanintensiteit (na correctie voor het effect van rantsoen) wordt slechts een zeer klein deel van de verschillen verklaard door variatie in voeropname tussen dieren (R² tussen 0% en 25,1%), waarbij slechts in 1 experiment (van de 6) een significante relatie met voeropname werd aangetoond (Tabel 4.1). Variatie in fecale OS-vertering verklaarde een wat groter deel van de individuele variatie tussen dieren in methaanintensiteit (R² tussen 4,9% en 36,0%), met in de helft van de experimenten een significant verband of een tendens tot relatie tussen vertering en methaanintensiteit.

Door een betere vertering zijn er meer nutriënten beschikbaar per eenheid voer om melk te produceren (daardoor een hogere melkproductie), en daarom werd een negatieve relatie tussen vertering en methaanintensiteit verwacht. Dit was het geval in 2 van de 3 experimenten met een significant verband (of tendens tot verband) tussen beide kenmerken. Evenals bij methaanopbrengst is individuele variatie in fecale vertering een niet onbelangrijke, maar veranderlijke factor om variatie in methaanintensiteit te verklaren.

Tabel 4.1 Relatie tussen methaanintensiteit (g/kg FPCM) en voeropname (droge stof opname) en fecale organische stof vertering (%) na correctie voor opgelegd behandelingseffect per experiment.

Experiment	Droge stof opname			Organische stof vertering		
	Snijpunt	Helling	R ² (%)	Snijpunt	Helling	R ² (%)
Warner et al. (2015)	16,3 ± 8,3	-0,043 ± 0,552	0,0	29,0 ± 7,9*	-0,170 ± 0,099 [†]	13,5
Warner et al. (2016)	16,1 ± 3,6**	-0,071 ± 0,240	0,2	-11,0 ± 13,0	0,335 ± 0,167*	22,0
Warner et al. (2017)	12,1 ± 2,2**	0,042 ± 0,134	0,3	18,6 ± 5,2**	-0,078 ± 0,069	6,3
Hatew et al. (2016)	19,5 ± 2,4**	-0,367 ± 0,132*	25,1	6,5 ± 6,0	0,089 ± 0,082	4,9
Klop et al. (2016)	13,0 ± 2,5*	-0,003 ± 0,140	0,0	41,6 ± 11,7*	-0,379 ± 0,154*	36,0
van Gastelen et al. (2017)	15,8 ± 1,7 [†]	-0,065 ± 0,080	1,5	0,5 ± 8,8	0,176 ± 0,109	5,5

***P* < 0,01; **P* < 0,05; [†]*P* < 0,10; R², aandeel verklaarde variatie.

In conclusie; om variatie in methaanproductie te verklaren en eventueel om gebruik te maken van deze variatie voor methaanmitigatie is het belangrijk om voeropname te bepalen van individuele dieren. Als het gaat om variatie in methaanopbrengst en -intensiteit, spelen voeropname en melkproductie geen rol, maar is er wel een (enigszins bescheiden) effect van variatie in verteerbaarheid van het rantsoen, en is het belangrijk om fecale vertering te bepalen bij individuele koeien.

Literatuur

- Hatew, B., A. Bannink, H. van Laar, L. H. de Jonge, and J. Dijkstra. 2016. Effect of nitrogen fertilization rate and regrowth interval of grass herbage on methane emission of zero-grazing lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 99:354-368.
- Klop, G., B. Hatew, A. Bannink, and J. Dijkstra. 2016. Feeding nitrate and docosaehaenoic acid affects enteric methane production and milk fatty acid composition in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 99:1161-1172.
- van Gastelen, S., M. H. P. W. Visker, J. E. Edwards, E. C. Antunes-Fernandes, K. A. Hettinga, S. J. J. Alferink, W. H. Hendriks, H. Bovenhuis, H. Smidt, and J. Dijkstra. 2017. Linseed oil and DGAT1 K232A polymorphism: Effects on methane emission, energy and nitrogen metabolism, lactation performance, ruminal fermentation, and rumen microbial composition of Holstein-Friesian cows. *J. Dairy Sci.* 100:8939-8957.
- Warner, D., S. C. Podesta, B. Hatew, G. Klop, H. van Laar, A. Bannink, and J. Dijkstra. 2015. Effect of nitrogen fertilization rate and regrowth interval of grass herbage on methane emission of zero-grazing lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 98:3383-3393.
- Warner, D., B. Hatew, S. C. Podesta, G. Klop, S. van Gastelen, H. van Laar, J. Dijkstra, and A. Bannink. 2016. Effects of nitrogen fertilisation rate and maturity of grass silage on methane emission by lactating dairy cows. *Anim.* 10:34-43.
- Warner, D., A. Bannink, B. Hatew, H. van Laar, and J. Dijkstra. 2017. Effects of grass silage quality and level of feed intake on enteric methane production in lactating dairy cows. *J. Anim. Sci.* 95:3687-3699.

To explore
the potential
of nature to
improve the
quality of life



Wageningen Livestock Research
Postbus 338
6700 AH Wageningen
T 0317 48 39 53
E info.livestockresearch@wur.nl
www.wur.nl/livestock-research

Wageningen Livestock Research ontwikkelt kennis voor een zorgvuldige en renderende veehouderij, vertaalt deze naar praktijkgerichte oplossingen en innovaties, en zorgt voor doorstroming van deze kennis. Onze wetenschappelijke kennis op het gebied van veehouderijsystemen en van voeding, genetica, welzijn en milieu-impact van landbouwhuisdieren integreren we, samen met onze klanten, tot veehouderijconcepten voor de 21e eeuw.

De missie van Wageningen University & Research is 'To explore the potential of nature to improve the quality of life'. Binnen Wageningen University & Research bundelen 9 gespecialiseerde onderzoeksinstituten van Stichting Wageningen Research en Wageningen University hun krachten om bij te dragen aan de oplossing van belangrijke vragen in het domein van gezonde voeding en leefomgeving. Met ongeveer 30 vestigingen, 6.500 medewerkers en 10.000 studenten behoort Wageningen University & Research wereldwijd tot de aansprekende kennisinstellingen binnen haar domein. De integrale benadering van de vraagstukken en de samenwerking tussen verschillende disciplines vormen het hart van de unieke Wageningen aanpak.

