

Małgorzata Szumacher-Strabel, Adam Cieślak

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

WTÓRNE METABOLITY ROŚLINNE W ŻYWIENIU ZWIERZĄT PRZEŻUWAJĄCYCH

Wstęp

Specyfika budowy przewodu pokarmowego zwierząt przeżuwających, a przede wszystkim budowa żołądka składającego się z czterech komór, w tym trzech przedżołądków, pozwala na symbiozę przeżuwacza z mikroorganizmami zamieszkującymi główną komorę, jaką jest żwacz. Grupy mikroorganizmów zasiedlających żwacz to bakterie, pierwotniaki, metanogeny i grzyby. Średnia pojemność żwacza zwierząt przeżuwających wynosi 40-240 l, podczas gdy masa mikrobiologiczna bakterii i pierwotniaków, najliczniejszych grup mikroorganizmów, wynosi odpowiednio: 1463 i 455 g na krowę (Martin, 2002 – dane niepublikowane).

Trawienie w żwaczu zachodzi jako kombinacja mikrobiologicznej fermentacji i fizycznego rozkładu w czasie przeżuwania (49). Zwierzęta przeżuwające charakteryzują się zdolnością do wykorzystywania niskiej jakości pasz, przetwarzając słaby substrat w wysokiej jakości produkt, jakim jest mleko lub mięso (44). Ta zdolność wynika z symbiotycznych związków między przeżuwaczami a populacją mikroorganizmów bytujących w żwaczu. Dzięki obecności mikroorganizmów zwierzę wykorzystuje niedostępne dla systemu enzymatycznego ssaków składniki pokarmowe, czerpiąc energię z rozkładu węglowodanów strukturalnych (około 80% całkowitego zapotrzebowania) oraz białko z przemian związków azotowych (od 60 do ponad 80% całkowitego zapotrzebowania). Powstałe w wyniku mikrobiologicznego rozkładu węglowodanów strukturalnych lotne kwasy tłuszczowe są wchłaniane głównie w żwaczu, podczas gdy aminokwasy powstałe w wyniku rozkładu białka paszy oraz białka mikrobiologicznego, kwasy tłuszczowe i glicerol pochodzące z rozkładu tłuszczu oraz glukoza z rozkładu zarówno węglowodanów strukturalnych (celuloza i hemiceluloza), jak i niestrukturalnych (skrobia) są wchłaniane w jelicie cienkim. Tę symbiotyczną relację zwierzę–mikroorganizmy cechuje jednak ograniczone wykorzystanie energii i białka zawartych w dawce pokarmowej, znajdujące swoje odzwierciedlenie w produkcji i emisji, odpowiednio metanu i amoniaku (21, 145). Nieefektywność w wykorzystaniu białka i energii dawki pokarmowej prowadzi do strat ekonomicznych w postaci obniżenia rzeczywistej wartości pokarmowej skarmianych pasz, obniżenia produktywności zwierząt, a ponadto zwiększenia zanieczyszczenia środowiska naturalnego.

Aktualnie obserwuje się zwiększenie zainteresowania wykorzystaniem różnorodnych związków pochodzenia roślinnego w żywieniu zwierząt, w tym zwierząt przeżuwających, a główny nacisk położony jest na zmianę kierunku metabolizmu żwacza. Złożoność budowy i różnorodność fitoczynników występujących w roślinach jest jednak czynnikiem limitującym postęp w badaniach nad nimi. Fitoczyinki to nieodżywcze bioaktywne związki występujące w roślinach. Różnią się od tzw. związków pierwotnych, np. węglowodanów, białek i tłuszczów, ograniczoną dystrybucją, będąc zazwyczaj produktami specyficznych gatunków bądź grup roślin. Nawet w ramach poszczególnych gatunków roślin czy pojedynczych osobników występuje ogromne zróżnicowanie ich jakości i ilości. Pierwotnie sądzono, że nie odgrywają one żadnych funkcji w roślinach. Aktualnie wiadomo, że są one niezbędne, chronią bowiem przed patogenami i stresem abiotycznym, np. promieniowaniem UV (16). Służą również jako czynniki ułatwiające zapylenie roślin przez owady. Są często syntetyzowane jako odpowiedź na czynnik stresowy, np. częste koszenie lucerny (*Medicago sativa*) zwiększa koncentrację saponin (85).

Zagadnienie żywienia zwierząt jest nierozdzielnie powiązane z innymi dziedzinami nauki, na przykład z jakością uzyskiwanych od nich produktów oraz ochroną środowiska naturalnego. W ostatnich latach intensywnie wzrasta zainteresowanie żywieniowców bioaktywnymi czynnikami roślinnymi, jako naturalnymi dodatkami paszowymi mogącymi:

- modyfikować procesy fermentacji zachodzące w żwaczu (defaunacja);
- poprawiać metabolizm białka, ograniczając jednocześnie produkcję i emisję amoniaku;
- hamować produkcję i emisję metanu do atmosfery;
- zwiększać koncentrację sprzężonych izomerów kwasu linolowego w produktach uzyskanych od zwierząt (np. w mleku). Wielka różnorodność bioaktywnych fitoczynników – saponin, olejków eterycznych i tanin zawartych w wielu gatunkach roślin została zidentyfikowana jako potencjalny czynnik oddziałujący na wyżej wymienione procesy. Efektywność ich działania nie została w pełni potwierdzona, gdyż zależy od wielu czynników, do których zaliczamy:
 - **ze strony zwierzęcia:** gatunek i kierunek produkcji, a w konsekwencji koncentrację węglowodanów strukturalnych w dawce pokarmowej, rodzaj zastosowanych pasz, szerokość geograficzną występowania zwierzęcia;
 - **ze strony rośliny:** rodzaj czynnika, jego budowę i aktywność, relacje synergistyczne bądź antagonistyczne w stosunku do innych komponentów dawki.

Historyczne uwarunkowania wykorzystania fitoczynników

Tło aktualnego zainteresowania wykorzystaniem roślin i ich biologicznie aktywnych komponentów jako modulatorów przemian zachodzących w przewodzie pokarmowym zwierząt nie jest zagadnieniem nowym. Tzw. etnoweterynaria i etnomedycyna od wieków wykorzystują różne postaci roślin (44). Jedne z pierwszych informacji dotyczących medycyny bazującej na roślinach pochodzą z 2600 roku przed naszą erą

z Mezopotamii i Chin (103). Chińczycy stosowali rośliny w terapii już 5000 lat temu, podczas gdy Egipcjanie stosowali rośliny i aktywne związki w nich zawarte jako konserwanty żywności oraz substancje mumifikujące 1550 lat przed naszą erą (Davidson i Naidu, cyt. za 21). Naturalna medycyna była szeroko stosowana (zwłaszcza na tzw. Zachodzie) do połowy XX wieku, kiedy to nastąpił zwrot w kierunku leków syntetycznych, efektywnych, możliwych do opatentowania i zapewniających duże profity (141). Między 1950 a 1980 rokiem badania naukowe koncentrowały się głównie wokół substytutów składników roślinnych. Od 1980 r. do późnych lat 90. nastąpił zwrot w kierunku wykorzystywania roślin jako potencjalnych źródeł nowych związków chemioterapeutycznych. Jednakże w związku z trudnościami (czas i koszt) związanymi z izolacją i charakterystyką poszczególnych czynników aktywnych, z często bardzo złożonych ekstraktów, a dalej z ich chemiczną syntezą, zainteresowanie tymi związkami było umiarkowane. Rozwój nowoczesnych technik, a przede wszystkim zmiana nastawienia społeczeństwa, skłaniają do skierowania uwagi ponownie w kierunku naturalnych związków pochodzenia roślinnego.

Wykorzystywanie antymikrobiologicznych własności fitoczynników w wielu sferach życia człowieka skłoniło naukowców do zastosowania tych związków również w żywieniu zwierząt. Próby zmian kierunku procesów zachodzących przy udziale mikroorganizmów oraz zwiększenia ich efektywności poprzez modulowanie składu populacji mikrobiologicznej w żwaczu opisywane są w literaturze światowej od wielu lat. Główny kierunek działania to dodatek do pasz związków mogących wpływać na skład i liczebność mikroorganizmów.

Pierwsze naukowe opracowanie dotyczące antymikrobiologicznych własności związków aktywnych występujących w roślinach pojawiło się na początku XX wieku (56). Wyniki pierwszych badań dotyczących wykorzystania biologicznie aktywnych związków w żywieniu zwierząt przeżuwających pochodzą z lat 60. O h i in. (108, 109) oraz N a g y i T e n g e r d y (98) opisali wpływ olejków eterycznych na procesy fermentacji zachodzące w żwaczu w warunkach *in vitro*, w tym produkcję gazów pofermentacyjnych, oraz aktywność bakterii żwaczowych. B o r c h e r e s (15) badał natomiast wpływ wtórnych metabolitów roślinnych na procesy przemiany białek w żwaczu. Otrzymane efekty wskazywały na możliwość modulowania procesów zachodzących w żwaczu w pożądanym kierunku. Jednak wprowadzona w latach 70. legalizacja stosowania antybiotyków jonoforowych jako promotorów wzrostu zahamowała rozwój badań nad stosowaniem naturalnych substancji roślinnych w żywieniu zwierząt i przez około 30 lat opublikowano na ten temat niewiele prac (17). Ponowny intensywny rozwój badań nad możliwością zastosowania fitoczynników, w tym wtórnych metabolitów roślinnych, w żywieniu zwierząt związany jest z ogłoszeniem przez Komisję Europejską zamiaru wprowadzenia zakazu stosowania wykorzystywanych dotychczas antybiotykowych stymulatorów wzrostu. Był to między innymi efekt presji konsumentów, aby wyeliminować wykorzystanie wszystkich nieroślinnych ksenobiotycznych czynników z pasz dla zwierząt i w konsekwencji zwrot (szczególnie w Europie) w kierunku stosowania dodatków naturalnych. Działania te zaowocowały (od 2000 roku) bardzo intensywnym rozwojem badań naukowych oraz wzrastającą lawi-

nowo liczbą publikacji na ten temat. Do roku 2006 stosowano głównie dodatki chemiczne, takie jak: antybiotyki, jonofory i inhibitory produkcji metanu oraz czynniki defaunizujące żwacz (116). Obowiązujący od 1 stycznia 2006 roku, a wprowadzony w 2003 roku, zakaz ich stosowania (dyrektywa 1831/2003/CEE, 37) spowodował intensywny rozwój badań nad znalezieniem i wykorzystaniem efektywnie działających naturalnych związków posiadających podobne własności.

Przyczyn zakazu stosowania związków chemicznych w modulowaniu procesów żwaczowych należy upatrywać w:

- ich toksyczności w stosunku do zwierzęcia i mikroorganizmów, objawiającej się między innymi brakiem wybiórczości w działaniu,
- braku zdolności adaptacyjnych mikroorganizmów w stosunku do zastosowanego środka,
- przechodzeniu do produktów pochodzenia zwierzęcego,
- rosnącej odporności na działanie antybiotyków,
- małej dostępności w praktycznym zastosowaniu (np. czynniki defaunizujące),
- spadającej akceptacji społeczeństwa odnośnie stosowania tych związków.

Powodami, dla których poszukiwano i poszukuje się zamienników wymienionych powyżej związków chemicznych, są również:

- rosnący potencjał genetyczny zwierząt, powodujący konieczność stosowania w żywieniu pasz o wysokiej koncentracji składników pokarmowych i wysokiej możliwości ich efektywnego wykorzystania,
- rosnące zanieczyszczenie środowiska przyrodniczego, będące skutkiem nieefektywnego wykorzystania dawki pokarmowej.

Opisany powyżej paradoks spowodował zwrot w kierunku stosowania w żywieniu zwierząt związków naturalnie występujących w roślinach, które stanowią podstawę dawki pokarmowej przeżuwaczy. Do związków naturalnych zaliczyć można probiotyki, prebiotyki, enzymy, kwasy organiczne i wtórne metabolity roślinne lub charakteryzujące się taką samą budową związki chemiczne. Występujące w roślinach wtórne metabolity, zaliczane do tzw. fitozwiązków, są czynnikami bioaktywnymi, mogącymi potencjalnie modulować procesy fermentacji zachodzące w żwaczu (148). Są to związki niezaangażowane w zasadnicze procesy biochemiczne zachodzące w roślinie, jak wzrost, rozwój i rozmnażanie, lecz stanowiące tzw. linię obrony zapewniającą przetrwanie struktur roślinnych i funkcji rozrodczych, chroniąc przed atakiem drapieżników (np. owadów; 116). Przez lata związki te uważane były za produkty odpadowe metabolizmu pierwotnego. Są one odpowiedzialne za zapach i kolor roślin, są chemicznymi przekaźnikami między rośliną i środowiskiem, a ponadto wykazują szeroką aktywność antymikrobiologiczną przeciwko bakteriom, drożdżom i pleśniom (Gershenzon i Croteau, cyt. za 21).

Zakładając, że globalny rynek antybiotykowych stymulatorów wzrostu miał w swoim szczytowym okresie w 1996 roku wartość 237 x 106 \$ US (44), to nie jest trudno przewidzieć implikacje związane ze wzrostem zainteresowania alternatywnymi modulatorami fermentacji, w tym całymi roślinami, olejami roślinnymi, ekstraktami roślinnymi, czy wreszcie samymi czynnikami biologicznie aktywnymi.

Badania nad związkami występującymi w roślinach, mogącymi wpływać na metabolizm żywca, a w konsekwencji na produktywność zwierząt, powinny być nie tylko strategicznym, ale również fundamentalnym celem pozwalającym na poszerzenie wiedzy na temat współzależności między zwierzęciem a „koktailem” związków fitochemicznych, pobieranym przez nie każdego dnia z paszą.

Oczekiwane kierunki działania wtórnych metabolitów roślinnych w żywcu

Kolejne zapowiedzi zmian legislacyjnych dotyczą zamiaru wprowadzenia przez Komisję Europejską tzw. *cow tax*, podatku od hodowanych zwierząt przeżuwających. Celem jego wprowadzenia jest ograniczenie emisji gazów cieplarnianych do atmosfery. Aktualna propozycja zakłada 5 € za tonę wyemitowanego gazu, co implikuje opłaty rządu 13 € za sztukę krowy mlecznej, 7 € za sztukę bydła niemlecznego, 1 € za owcę. Opisane zmiany są konsekwencją tzw. protokołu z Kioto (1997 r.; wszedł w życie w 2005 r.) stanowiącego uzupełnienie Ramowej Konwencji Narodów Zjednoczonych w sprawie Zmian Klimatu (*United Nations Framework Convention on Climate Change*), a jednocześnie będącego międzynarodowym porozumieniem dotyczącym przeciwdziałania globalnemu ociepleniu. Właśnie ze względu na przyczynianie się produkowanego metanu do ocieplania się klimatu Ziemi, jak i do powstawania wymiernych strat w produkcji zwierzęcej, obserwuje się rosnące zainteresowanie procesem metanogenezy zachodzącym w żywcu u zwierząt przeżuwających. Metan stanowi 18% ogólnej puli gazów cieplarnianych (160), a jego koncentracja w ciągu ostatnich kilku dziesięcioleci wzrosła o 151% i cały czas proces ten postępuje. Ilość powstającego metanu, jako efektu hodowli zwierząt przeżuwających, wynosi od 95 do 97% całkowitej produkcji zwierzęcej (70). Dane zestawione przez J e n s e n a (68) wskazują, że dzienna produkcja metanu przez zwierzęta przeżuwające kształtuje się w zakresie od 30 l (owca o masie 40 kg) do 230 l (krowa o masie 500 kg). W puli gazów produkowanych przez zwierzęta przeżuwające metan stanowi od 30 do 40%. Wielkość produkcji metanu zależy od kilku czynników, w tym od intensywności przemian zachodzących w organizmie, kierunku produkcji oraz rodzaju skarmianej paszy (62). Straty metanu pochodzącego z procesów fermentacyjnych w żywcu, a emitowanego do atmosfery, pogarszając wykorzystanie paszy, obniżają efekt ekonomiczny utrzymania zwierzęcia. J o h n s o n i n. (69) oraz M o s s i n. (96) oszacowali straty energii powstające podczas procesu fermentacji na 2 do 12% energii brutto pobranej w paszy. Proces metanogenezy może zachodzić jedynie w warunkach beztlenowych przy udziale mikroflory żywca, w wyniku międzygatunkowej symbiozy pomiędzy metanogenami a bakteriami, pierwotniakami lub grzybami. Symbioza ta polega, między innymi, na transferze H_2 powstającego w komórkach mikroorganizmów do metanogenów. Drobnoustroje te wykorzystują m.in. CO_2 do redukcji H_2 , a uzyskaną w tym procesie energię spożytkowują na generację ATP. Dzięki procesowi powstawania metanu w żywcu utrzymywane jest niskie stężenie H_2 w atmosferze żywca, co wpływa korzystnie na przemiany węglowodanów w tym środowisku (143, 156).

Z dostępnych danych wynika, że na produkcję metanu w żwaczu krowa zużywa dziennie nawet 800 l H₂ (61). Według badań przeprowadzonych przez Skilman i in. (129) populacja metanogenów w żwaczu już u 3 tygodniowych jagniąt może osiągnąć maksymalną liczebność 10⁸-10⁹ na gram treści żwacza. Dominującymi metanogenami w żwaczu zwierząt gospodarskich są mikroorganizmy należące do rodzaju *Methanobrevibacter* i *Methanosarcina*, a w szczególności gatunki: *Methanobacterium formicicum*, *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanosarcina barkeri*, *Methanosarcina mazei* i *Methanomicrobium mobile* (134). Rozwój nowoczesnych technik molekularnych wskazuje jednak, że to, który metanogen dominuje w żwaczu zależy od gatunku przeżuwacza (67). Wiele ośrodków naukowych na świecie prowadzi intensywne badania nad ograniczeniem negatywnego oddziaływania metanu pochodzącego od zwierząt na środowisko naturalne oraz na związany z tym efekt ekonomiczny produkcji zwierzęcej. Badania te w dużej mierze skupiają się nad możliwością sterowania procesami zachodzącymi w żwaczu, ze szczególnym uwzględnieniem mikroorganizmów w nich uczestniczących. Według Patra i Saxena (116) wtórne metabolity roślinne, tj. saponiny, taniny lub olejki eteryczne mogą modulować proces metanogenezy.

W ograniczenie ilości wyemitowanego metanu wpisuje się również zagadnienie ograniczenia produkcji i emisji amoniaku od zwierząt przeżuwających, które ma równocześnie aspekty naukowe i praktyczne, takie jak: zwiększenie wykorzystania białka dawki pokarmowej i ochronę środowiska naturalnego.

Kolejną przesłanką do stosowania fitoczynników w żywieniu zwierząt przeżuwających jest poprawa jakości mleka, między innymi, poprzez zmiany w procesie biouodorowania w żwaczu oraz w procesie denaturacji jednonienasyconych kwasów tłuszczowych w gruczole mlekowym. Nienasycone kwasy tłuszczowe dochodzące do żwacza prowadziły jednak niejednokrotnie do niezamierzonych niekorzystnych zmian w składzie mikroflory. Zastosowanie bioaktywnych czynników roślinnych w żywieniu przeżuwaczy ma szansę na zapewnienie podobnych efektów bez wcześniej opisanych negatywnych implikacji. W przypadku pozytywnych wyników omawiane fitoczylniki będą mogły znaleźć praktyczne zastosowanie w żywieniu zwierząt oraz w ochronie środowiska naturalnego.

Dobrym przykładem wykazującym (z ekonomicznego punktu widzenia) zasadność wykorzystania fitoczynników w żywieniu zwierząt jest rosnące zainteresowanie przemysłu paszowego wykorzystaniem wymienionych substancji jako komponentów produkowanych pasz. W 1996 roku rynek amerykański wykorzystał około 90 ton tych substancji o wartości rynkowej 413 000 € (Frost i Sullivan, cyt. za 44). Od 1996 roku obserwujemy znaczny wzrost wykorzystania fitoczynników, a prognozy na 2006 rok wynosiły 601 ton o wartości 1 643 000 €. W przypadku uzyskania pozytywnych efektów istnieje realna szansa na włączenie badanych substancji do standardowych mieszanek treściwych dla przeżuwaczy.

Korzystnych efektów wynikających ze stosowania fitoczynników w żywieniu zwierząt przeżuwających można oczekiwać w następujących aspektach:

- zmiany koncentracji lotnych kwasów tłuszczowych w kierunku zwiększenia koncentracji kwasu propionowego bez zmiany koncentracji sumy lotnych kwasów tłuszczowych;
- wpływu na proces biouwodorowania nienasyconych kwasów tłuszczowych poprzez hamowanie biouwodorowania na poziomie *c9*, *t11* C18:2 lub *t11* C18:1, co w efekcie prowadzi do zwiększonej koncentracji wymienionych związków biologicznie aktywnych w mleku;
- zmniejszenie produkcji amoniaku w wyniku obniżania deaminacji i peptydolizy w żwaczu oraz obniżania liczebności i aktywności bakterii wyspecjalizowanych w produkcji amoniaku (*hyper ammonia producing bacteria*), co prowadzi do ograniczenia powstawania nadmiaru amoniaku w żwaczu; mniejsza koncentracja amoniaku w żwaczu, to większe wykorzystanie białka dawki pokarmowej;
- obniżeniu produkcji i emisji metanu poprzez ograniczenie liczebności pierwotniaków i żyjących z nimi w symbiozie mutualnej metanogenów.

Omawiane fitocynniki są bardzo trudne do sklasyfikowania ze względu na różne szlaki metaboliczne ich syntezy, własności i mechanizm działania. Można je jednak podzielić na trzy grupy substancji potencjalnie regulujących procesy zachodzące w żwaczu, a tym samym wpływających na zdrowotność i produktywność przeżuwaczy: olejki eteryczne, saponiny i taniny. Najwięcej opublikowanych informacji, potwierdzonych badaniami w warunkach *in vitro* i *in vivo*, dotyczy wykorzystania olejków eterycznych w żywieniu zwierząt.

Omówienie poszczególnych grup fitocynników

Olejki eteryczne

Pochodzenie i klasyfikacja. Olejki eteryczne są mieszaniną wtórnych metabolitów roślinnych. Występują w roślinach określanych mianem zielarskich, przyprawowych czy zapachowych. Są odpowiedzialne za charakterystyczny zapach (*quinata essentia*) tych roślin. Są to głównie związki lotne, otrzymywane na drodze ekstrakcji parą wodną lub rozpuszczalnikiem z wielu partii roślin, np.: nasion, liści, kwiatów, łodyg, a ich skład i aktywność różnią się w zależności z jakiej rośliny (w tym również odmiany) i z jakiej jej części pochodzą (35). Chemiczne różnice występują również w zależności od materiału genetycznego, wieku rośliny i warunków środowiska (33). Wiele z nich wydaje się mieć działanie bakteriobójcze i bakteriostatyczne. Oddziałują zarówno na bakterie, jak i na grzyby, wirusy oraz pierwotniaki (44). Aktywne składniki olejków eterycznych należą, pod względem chemicznym, do dwóch grup – terpenoidów i fenylopropanoidów – pochodzących od dwóch prekursorów metabolizmu pierwotnego i są syntetyzowane poprzez różne szlaki metaboliczne (21).

Terpenoidy należą do najliczniejszych i najbardziej zróżnicowanych grup wtórnych metabolitów roślinnych. W literaturze opisano ich około 15 000 (Gershenzon i Croteau, cyt. za 21). Olejki eteryczne są mieszaniną głównie monoterpenoidów (C_{10}) i seskwiterpenoidów (C_{15}). W ich skład mogą również wchodzić diterpenoidy (C_{20}) oraz

różnorodne niskocząsteczkowe alifatyczne węglowodory, kwasy, alkohole, aldehydy, estry acylowe, laktony, a także związki zawierające N i S oraz kumaryny i homologi fenylopropanoidów (7, 35). Fenylopropanoidy syntetyzowane są poprzez szlak szikimowy (z fenyloalaniny), proces zachodzący jedynie w mikroorganizmach i roślinach (126).

Biologiczne własności i mechanizmy działania. Olejki eteryczne wykazują szereg biologicznych własności pozwalających na wykorzystanie ich jako związków zapobiegających rozwojowi licznych chorób, jednak najważniejsze, wykorzystywane w żywieniu zwierząt, to własności antymikrobiologiczne. Terpenoidy i fenylopropanoidy rozwinęły swoje antymikrobiologiczne właściwości, przede wszystkim w stosunku do bakterii, oddziałując na ich błony komórkowe (35). Aktywność ta jest odzwierciedleniem hydrofobowej natury cyklicznych węglowodorów, pozwalającej nie tylko na wzajemne oddziaływanie, ale również na akumulowanie się tych związków w bakterijskiej błonie lipidowej, umiejscawiając się między łańcuchami kwasów tłuszczowych (142). W konsekwencji powoduje to zmiany konformacji błony komórkowej objawiające się jej rozszerzeniem i fluidyzacją, prowadząc do przenikania jonów i obniżania gradientu stężeń. Oddziaływanie terpenoidów i fenylopropanoidów nie prowadzi do śmierci komórki, gdyż bakterie jako mechanizm ochronny uruchamiają pompy jonowe. Proces ten powoduje jednak znaczne straty energetyczne, co w konsekwencji ogranicza wzrost bakterii, zmieniając liczebność i proporcje populacji, a w konsekwencji profil fermentacji zwaczowej (45, 142). Aktywność antymikrobiologiczna jest wyższa w przypadku nasyconych cyklicznych węglowodorów, szczególnie o strukturze fenolowej, w której grupa hydroksylowa i przemieszczające się elektrony, dzięki mostkom wodorowym, reagują z wodą, co czyni je szczególnie aktywnymi wobec mikroorganizmów (21, 35, 45).

U l t e e i in. (142) opisali alternatywny mechanizm działania, sprawdzający się głównie w stosunku do grup hydroksylowych związków aromatycznych, zgodnie z którym fenolowe grupy hydroksylowe działają jako transbłonowe nośniki jednowartościowych kationów i protonów, podobnie jak antybiotyki jonoforowe. Powyższy mechanizm nie funkcjonuje w przypadku związków niearomatycznych, ze względu na obecność systemu przemieszczającego się elektronu i wysoką kwasowość fenoli, a także ze względu na zdolność grup hydroksylowych do uwalniania swojego protonu.

Opisane mechanizmy są efektywniejsze w przypadku oddziaływania w stosunku do bakterii gram-dodatnich, w których błona komórkowa oddziałuje bezpośrednio z hydrofobowym charakterem olejków eterycznych (28). W przypadku bakterii gram-ujemnych zewnętrzna ściana komórkowa okalająca błonę komórkową jest hydrofilowa i nie przepuszcza związków lipofilowych. Większość aktywnych substancji występujących w olejkach eterycznych ma charakter lipofilowy i nie ma zdolności przenikania do błon komórkowych bakterii gram-ujemnych (34). Opisany powyżej proces nie zawsze funkcjonuje w odniesieniu do, np. niskocząsteczkowych molekuł, które reagują z wodą (poprzez mostki wodorowe), przenikają przez ścianę komórkową, warstwę lipopolisacharydową lub błonę białkową na drodze dyfuzji i wówczas współdzia-

łają z bakteryjną błoną lipidową (21, 35, 45). Helander i in. (51) zwracają uwagę natomiast na zdolności niektórych węglowodorów aromatycznych obecnych w olejkach eterycznych do uszkodzenia zewnętrznej błony bakterii gram-ujemnych, w efekcie czego następuje uwalnianie lipopolisacharydów i wzrost przepuszczalności błony cytoplazmatycznej.

Powyższe rozważania pozwalają na stwierdzenie, iż małowcząsteczkowe wtórne metabolity roślinne działają zarówno w przypadku bakterii gram-dodatnich, jak i gram-ujemnych, co ma swoje ujemne implikacje w praktycznym żywieniu zwierząt, gdyż ogranicza ich selektywne działanie.

Kolejnym sposobem oddziaływania omawianych powyżej związków na mikroorganizmy jest opisany przez Gustafsona i Bowena (47) potencjał olejków eterycznych do koagulowania niektórych składników błony komórkowej, prawdopodobnie poprzez denaturację białek. Związki fenolowe reagują z białkami poprzez mostki wodorowe i jonowe lub interakcje hydrofobowe, podczas gdy związki niefenolowe reagują z innymi grupami, np. grupą karbonylową (Prescott i in., cyt. za 21 i 112). Szczególnym przypadkiem są związki zawarte w olejkach eterycznych czosnku (*Allium sativum*), aktywne wobec bakterii gram-ujemnych, gram-dodatnich, grzybów, wirusów i pasożytów, a główny mechanizm działania związany jest z ich zdolnością do wchodzenia w reakcje z grupami SH (105).

Podsumowując, działanie antymikrobiologiczne olejków eterycznych związane jest z ich wpływem na bakteryjne błony komórkowe poprzez oddziaływanie na transport elektronów, gradient jonów, translokację białek, fosforylację i inne reakcje enzymoza-
leżne (7, 35, 142).

Olejki eteryczne w żywieniu zwierząt przeżuwających. Badania nad możliwością zastosowania olejków eterycznych w żywieniu zwierząt przeżuwających prowadzone są już od wielu lat, jednak, w efekcie zmian legislacyjnych, wzrost natężenia badań datuje się na przełom XX i XXI wieku. Większość opublikowanych dotychczas prac to efekty doświadczeń przeprowadzonych w warunkach *in vitro* z wykorzystaniem technik hodowli zamkniętej (*batch culture*) lub otwartej (*continuous culture*, *Rumen Simulation Technic – RUSITEC*) opisujące zmiany procesów fermentacyjnych w żwaczu po dodaniu określonego czynnika. Wyniki uzyskiwane w efekcie krótkotrwałej fermentacji, szczególnie z systemu *batch culture*, powinny być weryfikowane w dłuższym czasie zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo* (27). Według Chizzola i in. (31) przyczyną takiego stanu rzeczy jest zdolność populacji zasiedlających żwacz do chemicznej redukcji aktywności składników olejków eterycznych do obojętnych alkoholi. Takie reakcje mogą zachodzić do czasu adaptacji mikroorganizmów do działającego czynnika, czyli w późniejszych okresach danego doświadczenia.

Dopiero w ostatnich kilku latach obserwuje się rosnącą liczbę publikacji dotyczących możliwości wykorzystania olejków eterycznych w bezpośrednim żywieniu zwierząt przeżuwających i opisujących ich wpływ na wyniki produkcyjne.

W przeprowadzonych i opublikowanych badaniach wykorzystywano szereg olejków eterycznych oraz zawartych w nich czynnych związków, stosowano różne pozio-

my suplementacji dawek, składających się z różnych komponentów. Opisane w literaturze światowej wyniki są, w efekcie tych działań, często sprzeczne, a opisywane odpowiedzi, uzyskane w wyniku przeprowadzonych badań w warunkach *in vitro*, nie zawsze znajdują potwierdzenie w doświadczeniach w warunkach produkcyjnych (*in vivo*).

Wpływ olejków eterycznych na poszczególne grupy bakterii, pierwotniaków i grzybów zasiedlających żwacz. Działanie olejków eterycznych, jak i innych związków modulujących procesy fermentacji zachodzące w żwaczu, jest determinowane ich wpływem na mikroflorę w nim bytującą. Analizując wpływ różnorodnych związków, w tym fitoczynników, na bakterie żwaczowe, należy mieć świadomość, że w niektórych ekosystemach, szczególnie w zdominowanych przez wolno rosnące, wyspecjalizowane mikroorganizmy, jedynie niewielka ich frakcja, często mniej niż 1% całkowitej populacji, może być rejestrowana dostępnymi metodami hodowli (2). Dostępne w światowej literaturze dane wskazują na niejednoznaczną odpowiedź poszczególnych grup bakterii na działanie olejków eterycznych. Nie wszystkie bakterie żwaczowe są wrażliwe na olejki eteryczne, pomimo że stosowane wcześniej w tym samym celu antybiotyczne stymulatory wzrostu, np. monenzyna, były skuteczne w ograniczaniu ich liczebności i aktywności i *vice versa*. M c I n t o s h i in. (86) analizowali wpływ mieszaniny olejków eterycznych na bakterie z grup *Lactobacillus plantarum*, *Clostridium sticklandii* i *Streptococcus bovis*. Wrażliwość na działanie czynnika doświadczalnego poszczególnych bakterii była uzależniona od jego koncentracji. Wzrost *Clostridium sticklandii* został ograniczony o 50% przy koncentracji 36 mg · l⁻¹ płynu żwacza, podczas gdy *Streptococcus bovis* pozostał na wyjściowym poziomie nawet przy koncentracji mieszaniny olejków osiągającej wartość 240 mg · l⁻¹. Autorzy w swych badaniach analizowali również zdolności adaptacyjne czystych kultur bakteryjnych w stosunku do zwiększającej się koncentracji mieszaniny olejków. Najistotniejszą zdolność adaptacyjną stwierdzono w grupie *Lactobacillus plantarum*, która zmniejszyła się trzykrotnie w efekcie działania czynnika doświadczalnego. E v a n s i M a r t i n (38) w badaniach nad wpływem poszczególnych roślinnych metabolitów wtórnych na bakterie żwaczowe *Selenomonas ruminantium* i *Selenomonas bovis*, stwierdzili, że 90 mg · l⁻¹ tymolu wykazało efekt selektywny, hamując jedynie wzrost *Selenomonas ruminantium*, podczas gdy 400 mg · l⁻¹ tymolu zahamowało wzrost obydwu grup mikroorganizmów. Analiza uzyskanych wyników jest jednak pełna niekonsekwencji ze względu na brak naszej wiedzy na temat efektywnej koncentracji olejków eterycznych bądź wtórnych metabolitów roślinnych w środowisku żwacza (49).

Zainteresowanie wpływem olejków eterycznych na liczebność i aktywność poszczególnych grup pierwotniaków badało dotychczas kilka zespołów naukowych. N e w b o l d i in. (101) analizowali wpływ 100 mg mieszaniny olejków eterycznych w dziennej dawce dla owiec, natomiast B e n c h a a r i in. (9) dodawali 750 mg mieszaniny olejków do dawki dla bydła mlecznego. W obydwu przypadkach nie stwierdzono wpływu zastosowanych dodatków na liczebność pierwotniaków. Badania A n d o

i in. (3) wskazują, że dzienny dodatek 200 gramów suszonej mięty pieprzowej (*Mentha piperita*) do dawek dla przetokowanych jałówek obniżył liczebność pierwotniaków o 50%.

Niewiele badań przeprowadzono nad wpływem olejków eterycznych na liczebność i aktywność grzybów żwaczowych. McIntosh i in. (86) stwierdzili obniżenie liczebności grzybów bytujących w żwaczu, a należących do wielowiciowego beztlenowego gatunku *Neocallimastix frontalis* (50).

Wpływ olejków eterycznych na procesy fermentacji w żwaczu. W początkowym okresie badań zainteresowanie stosowaniem olejków eterycznych w żywieniu przeżuwaczy wynikało głównie z ich roli w obniżaniu smakowitości niektórych gatunków roślin (7). Pierwsze doniesienia dotyczące wpływu olejków eterycznych na procesy fermentacji zachodzące w żwaczu pochodzą z prac Nagy i Tengerdya (98) oraz Ohi i zespołu (108, 109). Nagy i Tengerdya (98) stwierdzili wpływ olejków eterycznych wyekstrahowanych z bylicy trójzębowej (*Artemisia tridentata*) na ograniczenie aktywności bakterii *in vitro*, natomiast Ohi i in. (109) wykazali podobne zależności w efekcie zastosowania ekstraktu pochodzącego z igieł daglezji zielonej (*Pseudotsuga menziesii*). Stopień oddziaływania zależał każdorazowo od struktury chemicznej podanego związku czynnego. Stwierdzono, że utlenione monoterpeny, szczególnie alkohole i aldehydy, silnie hamują wzrost i metabolizm mikroorganizmów żwaczowych, monoterpeny zawierające w swej strukturze jednostki węglowodorowe nieznacznie, a w pewnych warunkach mogą również stymulować ich aktywność. Te informacje przyczyniły się do dalszych rozważań i badań nad wpływem olejków eterycznych i zawartych w nich związków biologicznie czynnych na metabolizm żwacza, w tym głównie na modulowanie przemian azotowych oraz wykorzystanie energii.

Wpływ olejków eterycznych na metabolizm białka w żwaczu. Symbiotyczna współzależność między przeżuwaczem a zasiedlającymi żwacz mikroorganizmami umożliwia zwierzęciu wykorzystanie niemalże każdego źródła azotu, który wbudowany jest w komórki mikroorganizmów, tworząc tym samym białko o najwyższej wartości biologicznej. Jednak relacja ta nie zabezpiecza zapotrzebowania wysoko produkcyjnych zwierząt na aminokwasy. Jakkolwiek dawki paszowe podawane przeżuwaczom są suplementowane komponentami białkowymi, których zadaniem jest uzupełnienie niedoborów tego składnika, w praktycznym rozrachunku powyższe rozwiązanie zwiększa koszty paszy, nie zawsze prowadząc do oczekiwanych efektów. Ponadto, zbyt wysoka koncentracja białka w dawce prowadzi do jego nieefektywnego wykorzystania, czego efektem są straty azotu zanieczyszczające środowisko naturalne. Według Lapierre i in. (77) na każdą jednostkę pobieranego przez krowy mleczne azotu około 0,3 jest wydalone w moczu. Wartość ta jest uśredniona i zależy w dużej mierze od wielu czynników, w tym np. od:

- poziomu azotu w podanej dawce pokarmowej,
- rodzaju źródła azotu w dawce i jego podatności na degradację do amoniaku w żwaczu (NPN),
- stosunku ilości powstałego w żwaczu amoniaku do ilości dostępnej dla syntezy białka bakteryjnego w żwaczu,

- rodzaju i aktywności enzymatycznej flory bakteryjnej zasiedlającej żwacz,
- tempa wypływu treści ze żwacza do dalszych odcinków przewodu pokarmowego.

Próba wpływu i modelowania przemian białka zachodzących w żwaczu jest zatem jednym z podstawowych wyzwań nowoczesnego żywienia zwierząt. Dodatek olejków eterycznych charakteryzujących się działaniem antymikrobiologicznym pozwala sądzić, że będą one naturalnym dodatkiem paszowym spełniającym te oczekiwania, a mechanizm ich działania będzie związany bezpośrednio z oddziaływaniem na bakterie wyspecjalizowane w produkcji amoniaku, a pośrednio z wpływem na rozkład aminokwasów.

Wczesne doświadczenia przeprowadzone przez B o r c h e r s (15) wykazały, że dodatek 1 grama tymolu na litr płynu żwacza w obecności kazeiny powoduje akumulowanie aminokwasów i obniżenie koncentracji azotu amoniakalnego, co sugeruje hamowanie deaminacji aminokwasów przez bakterie żwaczowe. B r o d e r i c k i B a l l t h r o p (17) w swoich badaniach potwierdzili hamowanie deaminacji aminokwasów w efekcie dodatku tymolu.

Opisane powyżej doświadczenia przedstawiają wpływ poszczególnych pojedynczych substancji na przemiany azotu w żwaczu. W literaturze światowej opublikowano również wyniki szeregu doświadczeń badających dodatki mieszanin fitoczynników i zawartych w nich związków chemicznych, wykorzystując występujące między nimi zjawisko synergii. Przykładem opisywanej zależności są wyniki badań opublikowanych przez B u s q u e t i in. (20), w których dodatek 2,2 mg olejków eterycznych z goździkowca korzennego (*Syzygium aromaticum*) na litr płynu żwacza fermentowanego w systemie *continuous culture* obniżył o 80% koncentrację dużych peptydów, lecz nie miał wpływu na poziom azotu amonowego, co sugeruje silne działanie peptydolityczne zastosowanego dodatku. Jednak zastosowana w tej samej ilości jedynie substancja czynna pochodząca z olejku z goździkowca korzennego – eugenol – nie wykazała żadnego działania, w tym również wpływu na aktywność peptydolityczną. Wyniki te sugerują, że własności peptydolityczne olejków eterycznych pochodzących z goździkowca korzennego są efektem współdziałania wielu zawartych w nim substancji.

Jednak w wielu przypadkach aktywnością charakteryzuje się zarówno pojedynczy składnik, jak i mieszanina substancji czynnych. B u s q u e t i in. (18) wykazali, że zarówno olejek eteryczny z oregano (*Origanum vulgare*), jak również jego główny składnik – biologicznie czynny karwakrol – obniżają koncentrację azotu amonowego analizowanego w systemie *batch culture*. Uzyskane wyniki sugerują, że o aktywności olejku eterycznego uzyskanego z oregano decyduje zawarty w nim karwakrol. Olejki eteryczne można podawać zarówno jako ekstrakt pochodzący bezpośrednio z danej rośliny bądź jako komercyjną mieszaninę.

W 2003 roku M c I n t o s h i in. (86) stwierdzili 9% redukcję tempa deaminacji aminokwasów w wyniku 48-godzinnej fermentacji *in vitro* hydrolizatu kazeiny w systemie *batch culture*. Płyn żwacza do inkubacji pobrano od krowy żywionej dawką

z udziałem 1 grama/dzień komercyjnej mieszanki olejków eterycznych Crina® ruminants (Akzo Surface Chemistry Ltd., Herefordshire, UK). Dodatek Crina® ruminants zawiera 100-300 g · kg⁻¹ komponentów fenolowych, w tym między innymi: rezorcynol, tymol, gwajakol, eugenol (Rossi, cyt. za 7). Podobnie Neboldin (101) stwierdzili obniżenie tempa deaminacji aminokwasów (o 24%) w efekcie zastosowania dodatku 110 mg mieszanki olejków eterycznych do płynu żwacza owiec, inkubowanego wraz z hydrolizatem kazeiny w systemie *in vitro* przez 24 godziny.

W żadnej z cytowanych prac nie stwierdzono wpływu zastosowanych dodatków na aktywność peptydolityczną i proteolityczną, a istotny z żywieniowego punktu widzenia nadmierny rozkład białka w żwaczu często przewyższa możliwość wykorzystania końcowych produktów degradacji, czyli np. wolnych aminokwasów przez mikroorganizmy. Spośród mikroorganizmów żwacza najbardziej proteolityczne są bakterie, wśród których wyróżnia się bakterie ściśle wyspecjalizowane w produkcji amoniaku (*hyper-ammonia producing bacteria* – HAP). Bakterie te występują w żwaczu w niewielkiej ilości (mniej niż 0,01% populacji bakterii w żwaczu), ale charakteryzują się bardzo dużą aktywnością metaboliczną (124). Według danych literaturowych w 50% odpowiedzialne są za rozkład białka w żwaczu i tym samym za produkcję amoniaku (49). Zidentyfikowano 14 morfologicznie różniących się gatunków, jednak największą aktywność przypisuje się *Clostridium sticklandii*, *Clostridium aminophilum*, *Bacteroides rumenicola* i *Peptostreptococcus anaerobius*. Są to bakterie gram-dodatnie, wrażliwe między innymi na antybiotyki jonoforowe. Po raz pierwszy *hyper-ammonia producing bacteria* wyizolowano w Nowej Zelandii i Australii u owiec, krów i jeleniowatych otrzymujących zielonkę (5). Obecność tych bakterii w płynie żwacza zależy od rodzaju dawki pokarmowej, a także od szerokości geograficznej, w której występują zwierzęta.

Wielu autorów wykazało potencjalnie korzystne, z punktu widzenia hodowcy zwierząt, oddziaływanie mieszanki olejków eterycznych na aktywność i liczebność *hyper-ammonia producing bacteria*. McIntoshin (86) wykazali, że mieszanka olejków eterycznych w postaci preparatu Crina® ruminants hamuje wzrost niektórych bakterii (*Clostridium sticklandii*, *Peptostreptococcus anaerobius*). Ponadto badania wykazały niejednakowe oddziaływanie olejków eterycznych na poszczególne bakterie. Mieszanka olejków eterycznych w postaci preparatu Crina® ruminants mniej efektywnie oddziaływała na *Clostridium aminophilum*. Zdaniem Wallace (148) intensywność działania olejków eterycznych na HAP zależy od koncentracji białka w dawce pokarmowej. W przeprowadzonych przez niego badaniach liczebność HAP została obniżona o 77% u owiec żywionych paszą niskobiałkową z dodatkiem 100 mg mieszanki olejków eterycznych na dzień, podczas gdy w grupie owiec otrzymujących paszę wysokobiałkową dodatek olejków eterycznych nie miał wpływu na HAP. Wallace (148) sugeruje, że efekt działania olejków eterycznych w żwaczu może być regulowany przez ich wpływ na *Ruminobacter amylophilus*, amylolityczny i proteolityczny organizm wrażliwy na olejki. Autor ten sugeruje, że *Ruminobacter amylophilus* może odgrywać istotną rolę w procesie kolonizowania substancji bogatych w białka i skrobię w żwaczu.

Efektywność oddziaływania fitoczynników na bakterie wyspecjalizowane w produkcji amoniaku zależy również od ich budowy chemicznej, co potwierdzili w swych badaniach Fl y t h e i K a g a n (39). Wykorzystano bogatą w rozpuszczalne fenole koniczynę czerwoną (*Trifolium pratense*), a bezpośrednio do doświadczeń użyto wyekstrahowane czyste związki fenolowe m.in. biochanin A, a także ekstrakt z całej rośliny. Działanie przeciw *Clostridium sticklandii*, jednej z bakterii należących do grupy HAP, wykazał ekstrakt z całej rośliny oraz biochanin A, podczas gdy w przypadku innych związków fenolowych nie stwierdzono żadnego oddziaływania. Rezultaty badań wskazują, że niektóre zawarte w koniczynie czerwonej związki fenolowe mogą odgrywać rolę w zapobieganiu rozkładowi aminokwasów w żwaczu.

Kolejnym czynnikiem, od którego zależy wpływ dodatku olejków eterycznych do dawki na metabolizm białka w żwaczu, jest czas trwania ekspozycji na czynnik doświadczalny. B e n c h a a r i i n. (7) sugerują, że krótkoterminowe badania przeprowadzane w warunkach *in vitro* (24, 48 godz.) nie odzwierciedlają rzeczywistego wpływu zastosowanych dodatków na populację mikroorganizmów biorących udział w przemianach białka w żwaczu, w przeciwieństwie do badań długookresowych. Wyniki badań przeprowadzonych przez B u s q u e t i i n. (20) oraz C a r d o z o i i n. (22) sugerują, że po 6-7 dniach fermentacji mikroorganizmy mogą się zaadaptować do zmienionych warunków, w tym do obecności mieszaniny olejków eterycznych.

Decydującą rolę w oddziaływaniu na metabolizm białka w żwaczu ma również budowa chemiczna substancji czynnej zastosowanego dodatku. Dane opublikowane przez C a s t i l l e j o s i i n. (25), dotyczące wpływu wzrastających dawek różnych związków czynnych występujących w olejkach eterycznych na koncentrację azotu amonowego w warunkach 24-godzinnej fermentacji *in vitro* wskazują, że aldehyd waniliowy był nieefektywny przy koncentracji 5, 50 i 500 mg · l⁻¹ fermentowanego płynu żwacza, 500 mg · l⁻¹ limonenu o budowie monoterpenu obniżało koncentrację azotu amonowego, eugenol o budowie fenolowej obniżył koncentrację azotu amonowego przy zawartości 5, 50 i 500 mg · l⁻¹ fermentowanego płynu żwacza, natomiast gwajakol (związek fenolowy) działał efektywnie przy wszystkich zastosowanych koncentracjach (5, 50, 500 lub 5000 mg · l⁻¹).

Powyższe badania wskazują również na działanie zależne od ilości zastosowanego dodatku. C a s t i l l e j o s i i n. (26) w doświadczeniach z wykorzystaniem systemu hodowli ciągłej (*continuous culture*) stwierdzili brak wpływu 1,5 mg mieszaniny olejków eterycznych na koncentrację amoniaku, przepływ azotu bakteryjnego i paszowego, rozkład białka surowego oraz efektywność syntezy mikrobiologicznej. Również w kolejnych badaniach przeprowadzonych przez C a s t i l l e j o s i i n. (26) z wykorzystaniem tych samych olejków eterycznych w ilości 5, 50 i 500 mg · l⁻¹ płynu żwacza nie stwierdzono ich wpływu na metabolizm azotu w trakcie 9-dniowej inkubacji. Według M c I n t o s h i i n. (86) koncentracja olejków eterycznych zapewniająca efektywne oddziaływanie na procesy przemiany białka w żwaczu wynosi powyżej 35 mg · l⁻¹ płynu żwacza w warunkach *in vitro*. W badaniach B e n c h a a r i i n. (10, 11) nie stwierdzono zmian we wskaźnikach przemian azotowych, w tym między innymi w koncentracji azotu amonowego i retencji N, w efekcie dodatku do dawki dla

krów mlecznych mieszaniny olejków eterycznych w ilości 0,75 i 2 g dziennie. Przyjmując objętość żwacza dorosłej krowy jako 100 litrów, a tempo wypływu treści jako $0,11 \cdot h^{-1}$, wyżej wymienione koncentracje mieszaniny olejków eterycznych w żwaczu *in vitro* wynosiłyby odpowiednio 3,1 i 8,3 $mg \cdot l^{-1}$ (7). Z przeliczeń powyższych koncentracji na warunki produkcyjne można stwierdzić, że zawartość dodatku w dawce produkcyjnej wynosząca 35 $mg \cdot l^{-1}$ płynu żwacza w warunkach *in vitro* jest trudna do osiągnięcia. Wyniki badań uzyskanych przez B u s q u e t i in. (18) wskazują, że zarówno niektóre olejki eteryczne, jak i ich aktywne biologicznie związki, znacząco obniżają koncentrację azotu amonowego, gdy stosowane są w tak wysokich dawkach, jak 3000 $mg \cdot l^{-1}$, umiarkowanie aktywne przy koncentracji 300 $mg \cdot l^{-1}$ i nie wykazują żadnego działania przy koncentracji 3 $mg \cdot l^{-1}$.

Opisane efekty dotyczące przemian azotu w żwaczu związane są głównie z korzystnym działaniem bakterii. Pierwotniaki z kolei odgrywają negatywną rolę w wykorzystaniu białka przez przeżuwacze (7), gdyż pochłaniają i trawią znaczną ilość bakterii żwaczowych, obniżając tym samym przepływ białka bakteryjnego netto ze żwacza do dwunastnicy (66). Ponieważ pierwotniaki posiadają zdolność do przeprowadzania procesów proteolizy i deaminacji, stąd defaunacja żwacza (wyeliminowanie pierwotniaków z ekosystemu żwacza) prowadzi do zwiększenia ilości azotu pochodzenia mikrobiologicznego docierającego do dwunastnicy. Według I v a n i in. (63) ilość białka bakteryjnego dochodzącego do dwunastnicy defaunowanych owiec jest o 35% większa niż u niedefaunowanych. Według niektórych badaczy olejki eteryczne posiadają niewielki potencjał defaunujący. Od roku 2000 opublikowano zaledwie kilka informacji na temat wpływu olejków eterycznych jako czynników defaunujących żwacz, w tym pracę A n d o i in. (3). Autorzy stwierdzili, że dodatek 200 g dziennie mięty pieprzowej (*Mentha piperita*) do dawek dla jałówek obniżył całkowitą liczbę pierwotniaków, a także rodzajów: *Entodinium*, *Isotricha* i *Diplodinium*. Natomiast w badaniach przeprowadzonych przez B e n c h a a r i in. (7), M c I n t o s h i in. (86) oraz N e w b o l d i in. (101) nie potwierdzono negatywnego wpływu olejków eterycznych na populację pierwotniaków.

Doświadczenie S a n t o s i in. (127), w którym badano wpływ handlowej mieszaniny olejków eterycznych, między innymi, na wykorzystanie azotu dawki pokarmowej, nie wykazało żadnego wpływu zastosowanego dodatku składającego się z eugenolu, octanu geranylu oraz olejku z kolendry siewnej (*Coriandrum sativum*).

Wpływ olejków eterycznych na produkcję lotnych kwasów tłuszczowych w żwaczu. Lotne kwasy tłuszczowe stanowią podstawowe źródło energii dla przeżuwaczy, a ponadto kwas octowy stanowi podstawę do syntezy kwasów tłuszczowych, podczas gdy inne krótkołańcuchowe kwasy (np. izomasłowy, izowalerianowy i walerianowy) inicjują proces syntezy tych kwasów (159). Koncentracja lotnych kwasów tłuszczowych w żwaczu jest również odzwierciedleniem strawności składników pokarmowych stosowanej dawki. Analiza danych literaturowych wskazuje na niejednoznaczny wpływ dodatku olejków eterycznych na koncentrację lotnych kwasów tłuszczowych w żwaczu. W badaniach przeprowadzonych przez C a s t i l l e j o s i in. (26) dodatek 1,5 mg mieszaniny olejków eterycznych na litr płynu żwacza inkubowanego

w systemie hodowli ciągłej (*continuous culture*), przy stałej wartości pH, spowodował wzrost koncentracji sumy lotnych kwasów tłuszczowych bez wpływu na stopień strawności masy organicznej.

B e n c h a r i in. (10) wskazują, że wpływ olejków eterycznych na koncentrację lotnych kwasów tłuszczowych może zależeć m.in. od dawki pokarmowej. W przeprowadzonych badaniach dodatek 750 mg mieszaniny olejków eterycznych dziennie do dawki z udziałem kiszonki z lucerny spowodował nieznaczny wzrost sumy lotnych kwasów tłuszczowych, podczas gdy dodany do dawki, której podstawę stanowiła kiszonka z kukurydzy, obniżył sumę LKT w żwaczu.

Kolejnym czynnikiem decydującym o wpływie olejków eterycznych na koncentrację i wzajemne proporcje lotnych kwasów tłuszczowych w żwaczu jest ilość zastosowanego dodatku. W cytowanych już badaniach przeprowadzonych przez B u s q u e t i in. (18) analizowano dodatek szerokiej gamy olejków eterycznych i poszczególnych wtórnych metabolitów w nich zawartych na procesy fermentacji *in vitro*. W opisywanych badaniach stosowano rosnącą koncentrację dodatków aż do 3 gramów na litr inkubowanego płynu żwacza. Analizowane dodatki nie miały wpływu na koncentrację LKT, jedynie najwyższy dodatek – $3 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ – spowodował spadek sumy lotnych kwasów tłuszczowych, obniżając równocześnie poziom strawności dawki pokarmowej. Podobne badania przeprowadzili C a s t i l l e j o s i in. (25), analizując wpływ poszczególnych wtórnych metabolitów roślinnych w rosnących dawkach dodawanych do płynu żwacza. Wyniki uzyskane przez C a s t i l l e j o s i in. (25) wskazują również na brak działania, z wyjątkiem najwyższych dawek ($5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ płynu żwacza) eugenolu, gwajakolu, limonenu, tymolu i waniliny, które spowodowały obniżenie koncentracji sumy LKT w żwaczu. Obniżenie poziomu produkcji LKT i w efekcie ich koncentracji w żwaczu jest z żywieniowego punktu widzenia zjawiskiem niepożądanym, gdyż obniża wykorzystanie energii pochodzącej z pasz objętościowych, stanowiących jedno z najtańszych źródeł składników pokarmowych dla przeżuwaczy.

Oczekiwane efekty oddziaływania olejków eterycznych dotyczą ich wpływu na zmianę molarnych proporcji lotnych kwasów tłuszczowych (wzrost stężenia kwasu propionowego, redukcja stężenia kwasu octowego), bez obniżania ich całkowitej koncentracji. Zmiany molarnych proporcji dotyczą głównie ograniczenia koncentracji kwasu octowego i podwyższenia koncentracji kwasu propionowego. W badaniach przeprowadzonych przez B u s q u e t i in. (19) stwierdzono wzrost koncentracji kwasu propionowego kosztem kwasu octowego, jakkolwiek przy najwyższej zastosowanej dawce czynnika doświadczalnego zwiększyła się również koncentracja kwasu masłowego. Kolejne badania przeprowadzone przez B u s q u e t i in. (18), w których zastosowano dodatek 300 i 3000 mg olejku z czosnku zwyczajnego (*Allium sativum*) na litr fermentowanego płynu żwacza oraz salicylanu benzylu w takiej samej ilości wykazały, że zastosowane suplementy korzystnie zmieniają wzajemne proporcje kwasu octowego do propionowego, przy równoczesnym wzroście koncentracji kwasu masłowego.

Dodatek olejków eterycznych nie zawsze jednak oddziałuje korzystnie na poziom lotnych kwasów tłuszczowych. Wyniki badań przeprowadzonych przez C a s t i l l e - j o s i n. (25) wykazały, że 500 mg eugenolu obniżyło koncentrację kwasu propionowego bez zmiany sumy lotnych kwasów tłuszczowych. Wyniki doświadczeń C a r d o z o i in. (23) sugerują, że zmiany w koncentracji lotnych kwasów tłuszczowych w żwaczu w efekcie dodatku olejków eterycznych są zależne od wartości pH płynu żwacza. Przy pH równym 7,0 olejek eteryczny, będący źródłem aldehydu cynamonowego, zwiększył stosunek kwasu octowego do propionowego, podczas gdy przy pH wynoszącym 5,5 – obniżył. Z kolei badania innych autorów (19, 22) wskazują na zdolności adaptacyjne mikroorganizmów do zastosowanych dodatków wraz z upływem czasu.

Wpływ olejków eterycznych na proces metanogenezy w żwaczu. Informacje dotyczące wpływu olejków eterycznych na proces metanogenezy są niejednoznaczne (116). Wczesne badania i doniesienia literaturowe wskazują, że 40 ppm olejków eterycznych nie wpłynęło negatywnie na populację *Methanobrevibacter smithii* (55). W kolejnych badaniach wykazano jednak, że wzrastający udział olejków eterycznych jest bezpośrednią przyczyną redukcji populacji *Methanobrevibacter smithii* PS (ATCC 35061; 102). Potwierdziły to również badania M c I n t o s h i in. (86), w których stwierdzono, że ograniczenie liczebności *Methanobrevibacter smithii* nastąpiło dopiero przy zastosowaniu dodatku 1000 ppm komercyjnej mieszaniny olejków eterycznych. Wzrastająca ilość limonenu (40 i 400 mg · l⁻¹), głównego składnika olejku z jodły (*Abies alba*), spowodowała ograniczenie (średnio o 25%) ogólnej populacji metanogenów (32). Natomiast zastosowanie 4 mg · l⁻¹ limonenu nie miało wpływu na omawianą populację mikroorganizmów. Autorzy stwierdzają, że nie tylko najwyższe, ale także pośrednie ilości zastosowanego czynnika doświadczalnego mogą modulować populację metanogenów w środowisku żwacza. Podobne wnioski zostały wysunięte na podstawie badań przeprowadzonych przez A g a r w a l i in. (1). W doświadczeniu tym analizowano olejek z mięty pieprzowej (*Mentha piperita*; 0,33 μl · l⁻¹), który spowodował dwukrotny wzrost liczebności metanogenów, przy 20% ograniczeniu produkcji metanu. Natomiast dodatek zarówno 1, jak i 2 μl · l⁻¹ olejku z mięty pieprzowej zredukował proces metanogenezy poprzez ograniczenie średnio o 82% liczebności metanogenów. Na podstawie tych badań można wysunąć wniosek, że niższe dawki olejków eterycznych mogą zwiększać liczebność tych grup metanogenów, które są mniej aktywne w procesie powstawania metanu. Podobne zależności wykazały badania wykonane przez O h e n e - A d j e i in. (110), w których negatywne oddziaływanie olejków eterycznych nie tylko zależało od ich źródła i ilości, ale także od rodzaju szczepów metanogenów oraz ich powiązania z pierwotniakami. Stąd wniosek, że wykorzystanie olejków eterycznych w żywieniu zwierząt przeżuwających w aspekcie ograniczania procesu metanogenezy może być niejednoznaczne (110).

Wpływ olejków eterycznych na biouwodorowanie nienasyconych kwasów tłuszczowych w żwaczu i skład tłuszczu mleka. Działanie antymikrobiologiczne olejków eterycznych i zawartych w nich związków biologicznie aktywnych skierowane jest przeciw bakteriom gram-ujemnym i gram-dodatnim. W proces biouwodoro-

wania nienasyconych kwasów tłuszczowych w żywcu zaangażowanych jest kilka grup bakterii gram-dodatnich (48), stąd sugestia, iż dodatek olejków eterycznych może potencjalnie modulować proces biouwodorowania. Proces ten zachodzi jako forma ochrony mikroorganizmów przed niekorzystnymi nienasyconymi kwasami tłuszczowymi pobieranymi przez zwierzę wraz z roślinami zielonymi bądź innymi dodatkami paszowymi. Mikroorganizmy, dla których tłuszcz nie stanowi źródła energii, przeprowadzają nienasycone formy kwasów tłuszczowych w mniej szkodliwe – nasycone. Biouwodorowanie zachodzi w kilku etapach, a powstające, między innymi, w wyniku izomeryzacji sprzężone izomery nienasyconych kwasów tłuszczowych wykazują działanie prozdrowotne. Modulowanie procesu biouwodorowania polega na hamowaniu działania przeprowadzających go bakterii, a tym samym zwiększeniu koncentracji powstających nienasyconych kwasów tłuszczowych. Powstałe, jako produkty pośrednie procesu biouwodorowania, nienasycone kwasy tłuszczowe (w tym sprzężone izomery), przechodząc do mleka modyfikują jego skład w kierunku pożądanym przez konsumentów. Opublikowane dotychczas wyniki badań wskazują na niewielkie oddziaływanie olejków eterycznych na proces biouwodorowania. W doświadczeniu przeprowadzonym przez B e n c h a a r i in. (10) suplementacja dawek dla krów mlecznych dodatkiem 750 mg mieszaniny olejków eterycznych nie miała wpływu na zmianę składu kwasów tłuszczowych mleka, natomiast dodatek 2 gramów podobnej mieszaniny dziennie zwiększył koncentrację sprzężonego kwasu linolowego.

Wpływ olejków eterycznych na wskaźniki produkcyjne przeżuwaczy. Nie wiele badań przeprowadzono dotychczas nad określeniem wpływu olejków eterycznych na wskaźniki produkcyjne zwierząt przeżuwających, w tym na produkcję i skład mleka i mięsa. W badaniach B e n c h a a r i in. (10, 11) nie stwierdzono zmian w pobraniu suchej masy paszy, produkcji mleka i jego składzie w efekcie zastosowania dodatku 750 mg lub 2 g mieszaniny olejków eterycznych.

Dane dotyczące wpływu olejków eterycznych na wskaźniki produkcyjne bydła mięsnego są niejednoznaczne. W badaniach B e n c h a a r i in. (8) wykazano, że dodatek komercyjnej mieszaniny olejków eterycznych (Vertan®, IDENA, Sautron, Francja), w której skład wchodziły między innymi tymol, eugenol, wanilina i limonen nie miał wpływu na pobranie paszy i średnie przyrosty masy ciała. Stwierdzono jednak zmianę stosunku przyrostów do pobrania suchej masy dawki pokarmowej, co w efekcie pozwala na zwiększenie efektywności wykorzystania składników pokarmowych dawki. S p a n g h e r o i in. (132) analizowali wpływ zwiększonych ilości mikrokap-sułkowanej mieszaniny olejków eterycznych RumaXol Feed (Soda Feed Ingredients, MC 98000, Monako) na produktywność krów mlecznych w pierwszej laktacji. Podane olejki eteryczne nie miały wpływu na pobranie suchej masy paszy i wody oraz zawartość suchej masy w odchodach; podobnie strawność składników pokarmowych nie została zmieniona pod wpływem zastosowanego czynnika doświadczalnego. Nie stwierdzono również wpływu na wydajność mleka i jego składników, jakkolwiek zawartość białka w mleku wzrosła w efekcie zastosowania średnich poziomów dodanych fito-czynników. Niejednoznaczność uzyskiwanych dotychczas wyników potwierdzają badania przeprowadzone przez S a n t o s i in. (127) na 310 sztukach krów mlecznych

we wczesnej laktacji, w których analizowano wpływ mieszaniny handlowej olejków eterycznych Agolin Ruminant (AGOLIN S.A., Bière, Szwajcaria), zawierającej w swym składzie głównie eugenol, octan geranylu i olejek z kolendry siewnej (*Coriandrum sativum*) na wskaźniki produkcyjne. Suplementacja dawek olejkami eterycznymi spowodowała obniżenie pobrania suchej masy paszy, spadek koncentracji tłuszczu w mleku (wyrażone w $g \cdot d^{-1}$ oraz w $g \cdot kg^{-1}$), przy niezmienionej produkcji mleka. Dodatek olejków eterycznych spowodował także obniżenie kondycji krów (BCS; *Body Condition Score*). Uzyskane wyniki wskazują na negatywny wpływ olejków eterycznych na syntezę tłuszczu mleka, prawdopodobnie w efekcie obniżonej produkcji kwasu octowego i zmienionej proporcji kwasu octowego do propionowego w żwacu.

Przeprowadzono kilka doświadczeń nad określeniem wpływu olejków eterycznych na wskaźniki produkcyjne młodego bydła opasowego. Meyer i in. (89) nie stwierdzili znaczącego wpływu badanych czynników (mieszanina tymolu, eugenolu, waniliny, gwajakolu i limonenu) na analizowane parametry, w tym na średnie dzienne przyrosty. Natomiast Yang i in. (161) badali wpływ czystego składnika (aldehydu cynamonowego) na wskaźniki wzrostu bydła opasowego i wykorzystanie paszy. Uzyskane rezultaty wskazują, że suplementacja paszy dla bydła opasowego niewielkimi dawkami aldehydu cynamonowego poprawia pobranie paszy w ciągu pierwszych 30 dni badań (łącznie 112 dni), lecz ma minimalny wpływ na dzienne przyrosty masy ciała, wykorzystanie paszy i podstawowe cechy tusz w czasie trwania doświadczenia. Podsumowując badania stwierdzono, że dodatek aldehydu cynamonowego w pierwszym okresie odchowu może poprawić pobranie paszy przez zwierzęta i obniżyć wpływ stresu.

Wpływ olejków eterycznych na patogeny zasiedlające przewód pokarmowy zwierząt przeżuwających. Olejki eteryczne wykazujące silne działanie antymikrobiologiczne są również aktywne wobec patogenów zasiedlających przewód pokarmowy. W niektórych przypadkach olejki eteryczne mogą zwiększać wrażliwość bakterii na patogeny (121). Badania przeprowadzone przez Oueh and in. (113) potwierdzają wrażliwość bakterii z rodzaju *Clostridium perfringens* na działanie $500 \text{ mg} \cdot l^{-1}$ związków biologicznie aktywnych zawartych w olejkach eterycznych (wtórnych metabolitów roślinnych), między innymi, karwakrolu, aldehydu cynamonowego, limonenu i tymolu. Bakterie *Escherichia coli* były również wrażliwe na wymienione związki podawane w koncentracji wynoszącej 5 i $50 \text{ mg} \cdot l^{-1}$. W przytoczonych badaniach testowano także bakterie z grupy *Bifidobacterium*, które wykazały jednak znacznie mniejszą wrażliwość na zastosowane fitocząynniki. Badania te potwierdzają specyficzność oddziaływania związków biologicznie aktywnych w stosunku do czynników patogennych. Vidal i in. (146) wykazali aktywność olejków eterycznych pochodzących z mięty pieprzowej (*Mentha piperita*) w stosunku do *Giardia duodenalis*, pierwotniaka pasożytniczego w jelitach bydła. Benchaar i in. (7) sugerują, że olejki eteryczne i ich aktywne czynniki mogą oddziaływać na szereg innych pierwotniaków pasożytniczych, np. *Cryptosporidium*, kokcydiów lub też nicieni. Według tych autorów efekt działania olejków eterycznych w przewodzie pokarmowym będzie zależał od ich aktywności w poszczególnych jego odcinkach.

Wpływ olejków eterycznych na wskaźniki odchowu cieląt. Niewiele badań przeprowadzono dotychczas nad wpływem olejków eterycznych na wskaźniki odchowu młodych przeżuwaczy. S o l t a n (131) określił wpływ mieszaniny, w której skład wchodziły następujące olejki: eukaliptusowy, mentolowy i miętowy na wskaźniki odchowu dwóch grup cieląt – przed i po odsadzeniu od matek. W pierwszej grupie cieląt mieszaninę olejków dodawano do preparatu mlekozastępczego, natomiast w drugiej bezpośrednio do wody. W grupie cieląt przed odsadzeniem, jako rezultat stosowania olejków eterycznych, stwierdzono obniżenie pobrania suchej masy paszy, a w efekcie redukcji pobrania paszy treściwej, poprawę strawności składników pokarmowych, a także obniżenie częstotliwości występowania biegunek. Grupa cieląt po odsadzeniu, otrzymujących zwiększone dawki mieszaniny olejków bezpośrednio do wody, wykazała się lepszymi przyrostami masy ciała, zredukowanym pobraniem paszy przy jednoczesnym zwiększeniu jej wykorzystania. Najkorzystniejsze efekty uzyskano przy średnich dawkach dodanych olejków, sugerując, że wyższe ich koncentracje nie są uzasadnione efektywnością działania i wskaźnikami ekonomicznymi.

Saponiny

Pochodzenie i klasyfikacja. Z chemicznego punktu widzenia saponiny to wysoko cząsteczkowe glikozydy produkowane przez wiele gatunków roślin okrytozalążkowych, ale także przez niższe morskie zwierzęta i niektóre bakterie (122, 162). Saponiny występują w różnych częściach roślin, np. korzeniach, bulwach, korze, liściach, nasionach i owocach. Właściwością odróżniającą je od pozostałych glikozydów jest zdolność obniżania napięcia powierzchniowego (133). Nazwa „saponina” pochodzi od łacińskiego słowa *sapo*, co oznacza mydło. Saponiny są substancjami rozpuszczalnymi w wodzie, mającymi zdolność tworzenia piany i zmydlania się (111). Właściwości te wynikają z ich budowy. Saponiny zbudowane są z hydrofobowej sapogeniny, czyli aglikonu i hydrofilowej części cukrowej – glikonu, który najczęściej stanowią: glukoza, arabinoza, ksyloza i galaktoza. Saponiny klasyfikuje się na podstawie budowy aglikonu na dwie grupy: saponiny steroidowe (sterydowe, C27), pochodne spirostanu lub furostanu; saponiny triterpenowe (trójterpenowe, C30), mające aglikon o charakterze triterpenu (133). O rozległym i różnorodnym potencjale biologicznym saponin decyduje liczba łańcuchów cukrowych, rodzaj występujących cukrów i stereochemia aglikonu (116). J u n g i in. (73) stwierdzili, że ramnoza wykazuje dużo większą aktywność cytotoksyczną w porównaniu z glukozą.

Biologiczne własności i mechanizmy działania. Rośliny zawierające saponiny już przed wiekami zyskały uznanie w medycynie, ziołolecznictwie, farmakologii i kosmetyce. Stosowano je jako detergenty, między innymi korzeń mydlnicy lekarskiej (*Saponaria officinalis* L.), a dzięki medycynie chińskiej na całym świecie znane są właściwości saponin zawartych w korzeniu żeń-szenia (*Panax ginseng* C. A. Mey). Saponiny są substancjami, które chronią rośliny przed infekcjami bakteryjnymi i grzybiczymi (137).

Saponiny zmieniając strukturę błon komórkowych, tym samym nabłonków, czynią je bardziej przepuszczalnymi dla składników organicznych. Mając zdolności lityczne mogą powodować całkowitą dezintegrację erytrocytów, a ta właściwość pomocna jest w ich detekcji i kwantyfikacji (40). Zdolności hemolityczne są efektem powinowactwa aglikonu do zawartych w membranach steroli, szczególnie cholesterolu (41). Saponiny wykazują właściwości przeciwbakteryjne, pierwotniakobójcze, przeciwgrzybicze, a także przeciwwirusowe. Niektóre mają zdolność wiązania toksyn i metabolitów. Na właściwości saponin duży wpływ ma wielkość zastosowanej dawki. W przypadku przedawkowania wykazują niekorzystny wpływ na organizm poprzez działanie: hemolityczne, nefrotoksyczne, hepatotoksyczne, kardiotoxyczne i antyżywniowe, polegające na inhibowaniu aktywnego transportu składników pokarmowych oraz zmniejszeniu smakowości paszy.

Biologiczny efekt działania saponin zachodzi w przewodzie pokarmowym zwierząt, głównie w żwaczu, ze względu na fakt, że saponiny są słabo wchłaniane (29). Jednak obserwowany w niektórych przypadkach brak wpływu saponin na mikroorganizmy bytujące w żwaczu jest wynikiem ich możliwej degradacji (49). Całkowitą degradację saponin pochodzących z mydłodziela (kwilaja właściwa, *Quillaja saponaria*) stwierdzili M a k k a r i B e c k e r (82), natomiast M i l e s i in. (90) zaobserwowali hydrolizę saponin pochodzących z buzdyganka ziemnego (*Tribulus terrestris*) w żwaczu. Niejednoznaczne wyniki badań skłaniają do poszukiwań mechanizmu działania i oddziaływania mikroorganizmów żwaczowych na saponiny. Niektóre mikroorganizmy są zdolne do obniżania antymikrobiologicznych własności saponin, np. poprzez ich deglikozylację w żwaczu (140). Natomiast O d e n y o i in. (107), na podstawie badań wykonanych z wykorzystaniem tropikalnej rośliny sesban popolity (*Sesbania sesban*), stwierdzili, że efekt oddziaływania na mikroorganizmy, głównie pierwotniaki, będzie zależał od sposobu podania czynnika doświadczalnego. W przeprowadzonym doświadczeniu 300 g *Sesbania sesban* wprowadzone bezpośrednio do żwacza pozostało toksyczne dla pierwotniaków, podczas gdy dodane do paszy nie wykazywało tych właściwości. Autorzy sugerują, że czynnikiem detoksykującym była w tym przypadku amylaza znajdująca się w ślinie zwierzęcia.

Saponiny w żywieniu zwierząt przeżuwających. Efekty stosowania roślinnych metabolitów wtórnych, w tym saponin, w żywieniu zwierząt przeżuwających to zagadnienie, które jest coraz intensywniej analizowane, pomimo że rośliny będące nośnikiem saponin były i są powszechnie stosowane w praktycznym żywieniu tej grupy zwierząt. Właściwości saponin były znane już przed wiekami i wykorzystywane w medycynie człowieka, jednak obecnie znaczenie saponin nabiera innego charakteru. Są one uznawane za potencjalny czynnik zmieniający fermentację w żwaczu (60). W żywieniu zwierząt przeżuwających najczęściej stosowanymi źródłami saponin są ekstrakty z jukki (*Yucca schidigera*), rośliny stanowiącej źródło saponin steroidowych i mydłodziela (kwilaja właściwa, *Quillaja saponaria*), a przede wszystkim z lucerny siewnej (*Medicago sativa*) zawierającej saponiny triterpenowe (36, 59, 149, 152).

Należy mieć świadomość, że stosowana powszechnie w żywieniu przeżuwaczy lucerna siewna była do tej pory rozpatrywana jako nośnik białka, a nie zawartych w niej wtórnych metabolitów roślinnych. Jednak jej dostępność skłania do badań nad możliwością wykorzystania zawartych w niej saponin, jako czynników modulujących procesy fermentacji w żwaczu, a w efekcie produktywność zwierząt.

Wpływ saponin na proces metanogenezy w żwaczu. Oddziaływanie saponin zawartych w roślinach na proces metanogenezy zachodzący w żwaczu zwierząt przeżuwających, jak również na mikroorganizmy bezpośrednio z nim związane, nie jest jednoznaczny. Wiele badań wskazuje na to, iż dodatek saponin pochodzących z jukki (*Yucca schidigera*), mydleńca właściwego (*Sapindus saponaria*), czy rosnącej w tropikalnym klimacie *Sapindus rarak* do dawki pokarmowej dla zwierząt przeżuwających może zmniejszać produkcję metanu (52, 53, 104, 135, 136, 150). Badania przeprowadzone przez H e s s i n. (52) oraz L i l a i n. (80, 81) wskazują zarówno w doświadczeniach *in vitro*, jak i *in vivo* na zależność pomiędzy redukcją populacji pierwotniaków, produkcją metanu a dodatkiem saponin pochodzących z różnych źródeł. B e n c h a r i n. (12) potwierdzają, że wtórne metabolity roślinne (m.in. saponiny) wykazują antymikrobiologiczne oddziaływanie, stanowiąc tym samym potencjalny modulator przemian zachodzących w żwaczu. W a l l a c e i n. (149) sugerują, że saponiny mogą być stosowane jako czynnik eliminujący całkowicie populację pierwotniaków ze środowiska żwacza. Oddziaływanie saponin na pierwotniaki uczestniczące pośrednio w procesie metanogenezy w żwaczu może zależeć od budowy chemicznej saponin, która pozwala na interakcje z cholesterolem obecnym w błonach komórek eukariotycznych, prowadząc do destrukcji komórki (30, 155). Badania, w których analizowano wpływ saponin pochodzących z jukki (*Yucca schidigera*) potwierdzają tę tezę. Na przykład doświadczenia przeprowadzone w warunkach *in vitro* (118), jak i *in vivo* (59) wykazały redukcję liczebności pierwotniaków po zastosowaniu ekstraktu z *Yucca schidigera*. Natomiast badania innych autorów, przeprowadzone w warunkach *in vitro* i *in vivo*, nie wykazały takiej zależności (6, 7, 58). Przyczyną różnic może być ilość zastosowanych saponin (7, 57), stopień degradacji komórek bakteryjnych (100) oraz zaburzenia w produkcji śliny (139). G o e l i n. (42) wskazują dodatkowo, że różnice w składzie dawki mogą stanowić czynnik różnicujący oddziaływanie saponin na proces metanogenezy. Skarmiając dawkę pokarmową z przewagą pasz treściwych proces metanogenezy może być efektywniej hamowany, w porównaniu z dawką, w której przeważa pasza objętościowa. Problem związany z wykorzystaniem ekstraktów saponin lub roślin zawierających saponiny może wiązać się również z przemijającym działaniem antypierwotniaczym, które bezpośrednio zależy od czasu oddziaływania w/w substancji na proces powstawania metanu w żwaczu (100, 140). Pierwotniaki nie są odporne na saponiny (100), jednak substancje te mogą być poddane procesowi detoksyfikacji przez bakterie w płynie żwacza, a czas w którym się to dzieje jest ważnym elementem tego procesu (139, 140). Kolejnym aspektem, na który należy zwrócić uwagę jest fakt, że choć niekiedy populacja mikroorganizmów związanych z procesem metanogenezy zostanie zredukowana, nie jest to równoznaczne z ograniczeniem samej produkcji metanu. Na przykład badania

przeprowadzone przez H e s s a i in. (53) wykazały, że dodatek saponiny z mydłańca właściwego (*Sapindus saponaria*) w ilości $100 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ suchej masy redukuje metanogenezę o około 20%, bez wpływu na populację metanogenów w warunkach *in vitro*. Ograniczenie metanogenezę bez zmniejszenia liczebności metanogenów zaobserwowali również inni badacze, stosując saponiny z nasion herbaty (60, 84). Nie wykazano ponadto negatywnego oddziaływania saponin pochodzących z herbaty na czyste kultury metanogenów dominujących w płynie żwacza (*Methanobrevibacter ruminantium*; 46). Inhibowanie metanogenezę przez saponiny pochodzące z *Sapindus saponaria* było efektywniejsze u zwierząt zdefaunowanych (29%) niż u zwierząt z naturalnie liczną mikroflorą żwacza (14%); (54). Wykazano dodatkowo, że zmniejszenie produkcji metanu nie jest wyłącznie efektem ograniczenia liczebności pierwotniaków. Należy mieć jednak na uwadze, że sama krótko-, jak i długoterminowa defaunacja ogranicza emisję metanu o około 20% (95). Kolejne badania wykazały, że bezpośredni inhibujący wpływ saponin na metanogeny zależy od składu dawki pokarmowej i poziomu zawartości saponin w paszy. Saponiny z owoców *Sapindus rarak* zmniejszają stężenie RNA metanogenów przy najwyższej koncentracji w dawce ($4 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$), natomiast niższe stężenia nie mają wpływu na populację tych mikroorganizmów (155).

Wpływ saponin na procesy fermentacji w żwaczu i liczebność mikroorganizmów. W żwaczu, jak już wcześniej wspomniano, saponiny najefektywniej oddziałują na populację pierwotniaków, co spowodowane jest obecnością steroli w błonach komórkowych tych mikroorganizmów, w przeciwieństwie do błon bakteryjnych (153). W 1 ml płynu żwacza występuje około 10^4 - 10^6 pierwotniaków, należących głównie do typu *Ciliata*. Pierwotniaki pełnią istotną rolę dla organizmu, poprzez wpływ na aktywność bakterii, warunki panujące w żwaczu i dostarczając gospodarzowi niezbędnych metabolitów (75). Pierwotniaki odżywiają się bakteriami, zwiększają wykorzystanie azotu mikrobiologicznego w żwaczu, co redukuje pulę aminokwasów docierających do dwunastnicy (65). Z tych powodów istnieje przypuszczenie, że usunięcie pierwotniaków (tzw. defaunacja) spowoduje lepsze wykorzystanie azotu przez organizm, a także poprawi wydajność przemian metabolicznych zwierzęcia (63, 128, 153). Obecnie trudno uzyskać stan całkowitej defaunacji i nie jest dostępny żaden komercyjny czynnik wywołujący skutecznie i bezpiecznie taki proces (65, 139). Najefektywniejszym poznanym czynnikiem (naturalnie występującym w roślinach) pozwalającym na ograniczenie liczebności pierwotniaków w żwaczu są saponiny. Zdaniem M o a t e (93) nawet ograniczenie liczebności fauny w żwaczu może być korzystne, ze względu na możliwy wzrost wydajności mlecznej oraz zmianę stosunku zawartości białka do tłuszczu w mleku krów, stąd sugestia, że całkowita defaunacja może być jednak niekorzystna (64).

Jedne z pierwszych doniesień na temat wpływu saponin na populację mikroorganizmów w żwaczu pochodzą z 1986 roku, kiedy to V a l d e z i in. (144) stwierdzili obniżenie liczebności pierwotniaków (przy jednoczesnym wzroście liczebności bakterii) w efekcie dodania jukki (*Yucca schidigera*) do dawki pokarmowej dla krów mlecznych. Zgodnie z koncepcją podaną w literaturze przez O d e n y o i in. (107) obserwu-

jemy wpływ podanych saponin, pochodzących np. z jukki (*Yucca schidigera*), na populację pierwotniaków w warunkach *in vitro* (80, 149), co w warunkach praktycznych byłoby jednoznaczne z podaniem saponin bezpośrednio do żywca, podczas gdy nie obserwuje się oczekiwanych wyników w doświadczeniach przeprowadzonych w warunkach *in vivo* (36).

Badania przeprowadzone przez L e n g i in. (78) wskazują, że zastosowanie saponin jako środka defaunującego jest efektywne jedynie w trakcie ich podawania. W trwających tydzień doświadczeniach stwierdzono obniżenie liczebności pierwotniaków w żywcu owiec i kóz, podając dodatki zawierające saponiny. Jednak po zaprzestaniu suplementacji liczebność pierwotniaków powróciła do stanu wyjściowego. Podobną tendencję stwierdzili w swoich badaniach I v a n i in. (64) oraz T e f e r e d e g n e i in. (140). Obserwuje się ponadto różnice w oddziaływaniu saponin pochodzących z różnych roślin na populację pierwotniaków u zwierząt żyjących w różnych szerokościach geograficznych. O d e n y o i in. (107) nie stwierdzili oddziaływania saponin zawartych w *Sesbania sesban* u owiec żyjących w Etiopii, które standardowo pobierały tę roślinę w dziennej dawce, natomiast liczebność pierwotniaków zamieszkujących żywca owiec żyjących w Wielkiej Brytanii obniżyła się w efekcie zastosowania tego samego dodatku (*Sesbania sesban*; 100). Wpływ saponin na populację pierwotniaków jest niejednoznaczny i, poza wymienionymi czynnikami, zależy również od rodzaju pierwotniaków, a reakcja wielu ich grup nie została dotąd poznana (116).

Saponiny, podobnie jak olejki eteryczne, mogą oddziaływać na procesy fermentacji zachodzące w żywcu poprzez zmianę koncentracji sumy lotnych kwasów tłuszczowych, a także ich molarnych proporcji. Kierunek zmian jest jednak uzależniony od rodzaju skarmianej dawki pokarmowej. Stwierdzono wzrost produkcji kwasu propionowego, kosztem kwasu octowego i masłowego, ale głównie w przypadku dodatku saponin do dawki bogatej w węglowodany niestrukturalne (skrobię; 80), w przeciwieństwie do dawek bogatych w strukturalne pasze objętościowe (włókno surowe; 53).

Efekt oddziaływania saponin na koncentrację azotu amonowego i przemiany białka w żywcu jest bezpośrednio związany z interakcjami pierwotniak – bakteria i zmniejszonym wypływem azotu pochodzenia bakteryjnego ze żywca. Ponadto jest on zależny od rodzaju skarmianych saponin. Pomimo że saponiny wykazują potencjał (często nieudowodniony statystycznie) do wpływu na przemiany białka w żywcu (100), jednak inne badania nie potwierdzają tej hipotezy (59).

W dostępnej literaturze nie ma wielu informacji na temat wpływu saponin na populację bakterii w żywcu. Występują różnice w reakcji na czynnik doświadczalny w zależności od powinowactwa bakterii do substratu oraz rodzaju zastosowanego źródła saponin. Bakterie amyloliczne wydają się być bardziej wrażliwe na działanie saponin, podczas gdy celulolityczne nie wykazują tak dużej wrażliwości (151, 152). W a n g i in. (152) wskazują również na obniżanie aktywności celulolitycznych badanych grup bakterii, a potwierdzeniem jej zależności są wyniki badań W i n a i in. (154).

Badania z wykorzystaniem czystych kultur bakteryjnych wskazują, że dodatek ekstraktu z jukki (*Yucca schidigera*) zahamował wzrost powszechnych w żwaczu *Butyrivibrio fibrisolvens* i *Streptococcus bovis*, pozytywnie stymulował liczebność *Prevotella ruminicola*, natomiast nie miał wpływu na *Selenomonas ruminantium* Z108 (149). W badaniach przeprowadzonych przez G o e l i in. (43) nad wpływem wielu źródeł saponin na bakterie żwaczowe wykazano wzrost populacji *Fibrobacter succinogenes* w efekcie działania kozieradki pospolitej (*Trigonella foenum-graecum*) i *Sesbana sesban*, natomiast oset (*Carduus*) i kozieradka pospolita (*Trigonella foenum-graecum*) spowodowały wzrost populacji *Ruminococcus flavefaciens*, a saponiny świerzbnicy (*Knautia*) zwiększyły liczebność populacji bakterii z rodzaju *Ruminococcus*.

Autorzy ci badali także wpływ saponin na populację grzybów żwaczowych. Zarówno dodatek kozieradki pospolitej (*Trigonella foenum-graecum*), jak i *Sesbana sesban* obniżyły sumę grzybów beztlenowych bytujących w żwaczu. Efekt oddziaływania zależy nie tylko od źródła saponin, ale również od ich koncentracji. W badaniach przeprowadzonych w warunkach *in vitro* z dodatkiem saponin pochodzących z *Sapindus rarak* stwierdzono obniżenie liczebności *Chytridiomycetes* przy wyższej dawce ($4 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$), w przeciwieństwie do dawki z dodatkiem 1 i $2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. W badaniach w warunkach *in vivo* stwierdzono z kolei wzrost populacji grzybów żwaczowych: *Enterolobium cyclocarpium* (99) i *Chytridiomycetes* (154).

Taniny

Pochodzenie i klasyfikacja. Taniny to rozpuszczalne w wodzie związki polifenolowe o wysokiej masie cząsteczkowej mające zdolności do strącania białek. Są rozpowszechnione w wielu, istotnych z punktu widzenia żywienia zwierząt, roślinach. Taniny dzielą się na dwie grupy:

- taniny hydrolizujące, będące pochodnymi kwasu galusowego;
- niehydrolizujące (skondensowane).

Taniny hydrolizujące to galotaniny, do których należy kwas galusowy ($\text{C}_{76}\text{H}_{52}\text{O}_{46}$) i elangotaniny. Taniny niehydrolizujące są pochodnymi flawonoidów, nie zawierają części cukrowej.

Biologiczne własności i mechanizmy działania. Taniny wykazują zdolności antymikrobiologiczne, jednak mechanizm działania zależy z jednej strony od ich budowy chemicznej, a z drugiej od grupy mikroorganizmów, na które oddziałuje. Działanie ograniczające liczebność i aktywność bakterii wynika ze zdolności tanin do formowania kompleksów z elementami ścian i błon komórkowych, powodując zmiany morfologiczne w ich budowie oraz hamowanie wydzielania enzymów komórkowych (116, 130). Odmienny mechanizm stwierdzono w oddziaływaniu w stosunku do grzybów żwaczowych. Do możliwych sposobów działania należy hamowanie celuloazy oraz ograniczanie kolonizowania fragmentów celulozy przez zoospory (np. u *Neocallimastix frontalis*; 97).

Taniny w żywieniu zwierząt przeżuwających. Taniny wykazują działanie antyżywniowe, które związane jest z ich zdolnością do tworzenia kompleksów z białkami i cukrami. Skompleksowanie powoduje obniżenie strawności zawartych w paszy białek oraz węglowodanów, a w konsekwencji obniżenie wykorzystania składników pokarmowych dawki pokarmowej, czyli straty ekonomiczne.

Działanie antyżywniowe zależy od ilości podanych tanin, a graniczna wartość decydująca o ich szkodliwości zależy od wielu czynników, w tym głównie od budowy chemicznej tanin. Koncentracja tanin w paszy przekraczająca poziom $60 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ nadaje jej gorzki smak, pogarszając smakowość i zmniejszając spożycie paszy (76). Paul i in. (117) wskazują, że koncentracja do $20 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ płynu żwacza kwasu taninowego nie ma wpływu na wzrost i rozwój grzybów żwaczowych. Wysoka koncentracja tanin w dawce pokarmowej, w większości przypadków, negatywnie wpływa na populację drobnoustrojów żyjących w żwaczu, a co się z tym wiąże – obniża również zdolności trawienne przeżuwaczy. Jednak mikroorganizmy żwaczowe wykształciły szereg mechanizmów obronnych, a niektóre z nich potrafiły nawet przystosować się do obecności tanin w środowisku ich występowania i w ten sposób zapobiegają antyżywniowemu wpływowi tych substancji. Do mechanizmów, dzięki którym mikroorganizmy mogą przezwyciężyć hamujący wpływ tanin zalicza się: biodegradację tanin (79), dysocjację kompleksu taniny–substrat (białka, węglowodany), odporność bakterii na taniny oraz wytwarzanie enzymu biorącego udział w rozkładzie tanin – tanazy, czyli acylohydrolazy tanin (EC. 3.1.1.20), syntetyzowanej przez wiele organizmów należących do grzybów nitkowatych, drożdży, jak i bakterii (13). Najważniejszym i najlepiej poznanym źródłem tego enzymu są grzyby strzępkowate. Po raz pierwszy w 1913 r. Kundson opisał rolę tanazy obecnej u *Aspergillus niger*. Od tego czasu aktywność enzymu wykryto również u przedstawicieli rodzajów: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Fusarium* i *Ascochyta* (119). Ponadto Odeno i Osuji (106) opisali 3 szczepy bakterii *Selenomonas* sp. odpornej na działanie tanin. Jeden ze szczepów EAT2 hydrolizował kwas taninowy do kwasu galusowego i następnie do pirogalolu, podczas gdy 2 pozostałe (ES3 i EG19) były zdolne do rozkładu kwasu taninowego tylko do kwasu galusowego. Z badań wynika, że szczep EAT2 wykazuje aktywność dekarboksylazy galusowej, jednak mechanizm ten nie jest do końca poznany.

Wpływ tanin na proces metanogenezy w żwaczu. Produkcja i emisja metanu przez zwierzęta przeżuwające zależy od wielu czynników, między innymi, od ilości i rodzaju pobranego pokarmu, typu węglowodanów w dawce pokarmowej, a także zmian zachodzących w mikroflorze żwacza (71). Puchła i in. (120) wykazali, że zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*, jednym z czynników mogących ograniczać rozmiar metanogenezy w środowisku żwacza jest dodatek tanin do dawek pokarmowych dla zwierząt przeżuwających. Doświadczenia przeprowadzone przez Min i in. (91, 92) na młodych wołach wykazują, że w warunkach *in vitro* taniny pochodzące z quebracho, w ilości 1 i 2% na kg suchej masy dawki, ograniczają produkcję gazów w żwaczu, w tym także metanu. Zawarte w paszach objętościowych taniny mogą również w istotny sposób wpływać na rozmiar metanogenezy w żwaczu w warunkach *in vitro*. Analiza pasz objętościowych z roślin motylkowatych – *Cal-*

liandra calothyrsus, esparcety siewnej (*Onobrychis viciifolia*) oraz topoli deltoidalnej (*Populus deltoides*) – wykazała wpływ tanin pochodzących z tych pasz na obniżenie poziomu produkcji metanu (87, 115). Podobne tendencje zaobserwowano u krów żywionych dawką z udziałem siekiernicy włoskiej (*Hedysarum coronarium*), u których stwierdzono niższą produkcję metanu w przeliczeniu zarówno na kg suchej masy pobranej dawki pokarmowej, jak i na kg wyprodukowanego mleka (157). Zbliżone tendencje zaobserwowano u owiec żywionych kiszoną z komonicą zwyczajną (*Lotus corniculatus*) (158), natomiast u jagniąt żywionych paszą objętościową z *Lotus pedunculatus* stwierdzono 16% redukcję emisji metanu (147). Porównywalne zależności wykazano u owiec żywionych dawką pokarmową, której podstawę stanowiła pasza objętościowa z jednej z odmian akacji australijskiej (*Acacia mearnsii*) (24). A n i m u t i in. (4) oraz M c M a h o n i in. (87) stwierdzili, że rozmiar ograniczenia produkcji i emisji metanu od zwierząt przeżuwających skorelowany jest liniowo z ilością tanin w dawce. Według niektórych badaczy obniżenie poziomu produkcji metanu przez zwierzęta przeżuwające może wiązać się ze zdolnością do zahamowania aktywności enzymów trawiennych zwierzęcia oraz modyfikacją aktywności mikroorganizmów żwacza w wyniku zastosowania tanin (2 g · kg⁻¹ suchej masy; 135). Rozmiar metanogenezy może być zredukowany w wyniku oddziaływania tanin w sposób pośredni – poprzez obniżenie produkcji H₂, jak i w sposób bezpośredni – poprzez hamowanie populacji metanogenów (14, 138). W badaniach przeprowadzonych z udziałem powszechnie występujących w środowisku żwacza metanogenów (*Methanobrevibacter ruminantium*, szczep YLM-1 i DSM1093) wykazano dezaktywację tych mikroorganizmów powiązaną z redukcją produkowanego metanu (138). T a v e n d a l e i in. (138) wykazali, że redukujące oddziaływanie tanin na populację metanogenów może zależeć od struktury chemicznej tanin. W swoich badaniach wykorzystali skondensowane taniny. W innych doświadczeniach zwrócono uwagę na pasze zawierające w swym składzie zarówno taniny hydrolizujące, jak i skondensowane, które wykazują większy potencjał do ograniczania metanogenezy niż pasze zawierające jedynie taniny hydrolizujące (14).

Podobnie jak w przypadku saponin, nie ma jednoznaczności w oddziaływaniu tanin na populację innych niż metanogeny mikroorganizmów uczestniczących w procesie metanogenezy. S a l a w u i in. (125) stwierdzili, że taniny redukują aktywność celulazy i ksylazy, natomiast nie redukują aktywności bakterii celulolitycznych (4). Poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za antymikrobiologiczne działanie tanin może spowodować lepsze gospodarowanie paszami, które posiadają w swym składzie taniny, a tym samym ułatwi ich stosowanie w praktyce (130). K a m r a i in. (74) dodatkowo podkreślają wysoką specyfikę substancji pochodzenia roślinnego (w tym tanin), które w dużym stopniu mogą oddziaływać na jakościowy i ilościowy skład ekosystemu żwacza, a tym samym wybiórczo hamować lub stymulować wzrost niektórych mikroorganizmów tam bytujących.

Wpływ tanin na procesy fermentacji w żwaczu, w tym na liczebność mikroorganizmów. Taniny hamują wzrost i aktywność enzymatyczną wielu bakterii żwaczowych. J o n e s i in. (72) wykazali, że proantocyjanidyny z esparcety siewnej

(*Onobrychis viciifolia*) wiążą się z polimerami płaszczą komórkowego u następujących grup bakterii: *Streptococcus bovis*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Prevotella ruminicola* i *Ruminobacter amylophilus*. Jednak nieprawidłowy wzrost oraz podział zaobserwowali wyłącznie u *Streptococcus bovis* i *Butyrivibrio fibrisolvens*. Natomiast szczep *Prevotella ruminicola* był odporny na skondensowane działanie taniny w ilości niższej niż $600 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Taniny mogą ponadto ograniczać liczebność pierwotniaków (88), jakkolwiek dane literaturowe na ten temat są niejednoznaczne (116). W przypadku oddziaływania tanin na populację pierwotniaków obiektem wielu badań z tego zakresu są taniny pochodzące z quebracho. Z jednej strony wykazano, że omawiane taniny redukują ogólną populację pierwotniaków w żwaczu, w tym głównie *Holotricha* i w mniejszym stopniu *Entodiniomorpha*, powodując zwiększenie syntezy białka mikrobiologicznego (83). Natomiast inne badania nie wykazały zmniejszenia liczebności orzęsków żwacza u krów żywionych dawką, w której znajdowało się 105 g tanin quebracho (7). Należy jednak podkreślić, że w większości danych literaturowych badacze wykazują negatywne oddziaływanie tanin na populację orzęsków żwacza (4, 114, 125). Dostępne są również doniesienia naukowe, w których wykazano wzrost populacji orzęsków w żwaczu owiec żywionych sianem z lucerny (*Medicago sativa*) z wzrastającym udziałem akacji (*Acacia cyanophylla*), która zawiera w swym składzie 4,5% skondensowanych tanin. Powyższe dane, podobnie jak w przypadku saponin, wskazują, że należy dogłębnie przeanalizować omawiane zagadnienia, aby móc zidentyfikować potencjalne czynniki mające wpływ na brak jednoznaczności uzyskanych wyników. W tym celu prowadzone są badania, w których wykonuje się analizę wielu pasz mogących stanowić dobre źródło tanin w żywieniu zwierząt przeżuwających. Przykładem takich analiz są badania wykonane przez M o n f o r t e - B r i c e n o i in. (94). Badacze przeanalizowali 15 roślin – nośników tanin – w aspekcie działania antypierwotniaczego. Jednak tylko trzy rośliny okazały się efektywne. Ponadto R u i z i in. (123) w swoich badaniach stwierdzili obniżenie liczebności pierwotniaków w wyniku zastosowania dawek pokarmowych wzbogaconych w taniny pochodzące z lucerny (*Medicago sativa*) jedynie w przypadku inokulum pochodzącego od owiec. Natomiast w inokulum pochodzącym od kóz nie zanotowano różnic. Autorzy tłumaczą to większą wrażliwością owiec na taniny niż kóz.

Podsumowanie

Reasumując przedstawione wyniki badań, należy zwrócić uwagę na kilka czynników, których analiza wydaje się być konieczna, aby opisane wtórne metabolity roślinne mogły znaleźć zastosowanie w praktycznym żywieniu zwierząt na dużą skalę i aby za ich pośrednictwem modulować procesy fermentacji zachodzące w żwaczu. Do tych czynników należy zaliczyć:

- zdolności adaptacyjne mikroorganizmów i patogenów występujących w przewodzie pokarmowym zwierząt przeżuwających w stosunku do zastosowanych

fitoczynników (konieczne wydaje się wydłużenie czasu przeprowadzanych doświadczeń);

- mechanizmy oddziaływania fitoczynników na poszczególne grupy organizmów bytujących w przewodzie pokarmowym;
- rodzaj dawki pokarmowej, ze szczególnym uwzględnieniem poziomu białka i energii, w tym rodzaju węglowodanów (strukturalne, niestrukturalne);
- przeprowadzanie doświadczeń w warunkach produkcyjnych, co pozwoli na uwzględnienie wpływu gatunku, rasy i wieku zwierzęcia oraz typu produkcji i stanu fizjologicznego.

Literatura

1. Agarwal N., Shekhar C., Kumar R., Chaudhary L. C., Kamra D. N.: Effect of peppermint (*Mentha piperita*) oil on *in vitro* methanogenesis and fermentation of feed with buffalo rumen liquor. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2009, **148**: 321-327.
2. Amann R. I., Ludwig W., Schleifer K. H.: Phylogenic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, 1995, **59**: 143-149.
3. Ando S., Nishida T., Ishida M., Hosoda K., Bayaru E.: Effect of peppermint feeding on the digestibility, ruminal fermentation and protozoa. *Livest. Prod. Sci.*, 2003, **82**: 245-248.
4. Animut G., Goetsch A. L., Puchala R., Patra A. K., Sahlu T., Varel V. H., Wells J.: Methane emission by goats consuming different sources of condensed tannins. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2008, **144**: 228-241.
5. Attwood G. T., Reilly K.: Identification of proteolytic rumen bacteria isolated from New Zealand cattle. *J. Appl. Bacteriol.*, 1995, **79**: 22-29.
6. Baah J., Ivan M., Hristov A. N., Koenig K. M., Rode L. M., McAllister T. A.: Effects of potential dietary antiprotozoal supplements on rumen fermentation and digestibility in heifers. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2007, **137**: 126-137.
7. Benchaar C., Calsamiglia S., Chaves A. V., Fraser G. R., Colombatto D., McAllister T. A., Beauchemin K. A.: A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2008, **145**: 209-228.
8. Benchaar C., Duynisveld J. L., Charmley E.: Effects of monensin and increasing dose levels of a mixture of essential oil compounds on intake, digestion and growth performance of beef cattle. *Can. J. Anim. Sci.*, 2006, **86**: 91-96.
9. Benchaar C., Petit H. V., Berthiaume R., Ouellet D. R., Chiquette J.: Effects of essential oil supplements on ruminal fermentation, rumen microbial populations and *in sacco* degradation of dry matter and nitrogen in the rumen of lactating dairy cows. *Can. J. Anim. Sci.*, 2003, **83**: 637-638.
10. Benchaar C., Petit H. V., Berthiaume R., Ouellet D. R., Chiquette J., Chouinard P. Y.: Effects of essential oils on digestion, ruminal fermentation, rumen microbial populations, milk production, and milk composition in dairy cows fed alfalfa silage or corn silage. *J. Dairy Sci.*, 2007, **90**: 886-897.
11. Benchaar C., Petit H. V., Berthiaume R., Whyte T. D., Chouinard P. Y.: Effects of addition of essential oils and monensin premix on digestion, ruminal fermentation, milk production and milk composition in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 2006, **89**: 4352-4364.
12. Benchaar C., Wang Y., Chaves A. V., McAllister T. A., Beauchemin K. A.: Use of plant extracts in ruminant nutrition. Pages 465-489 in *Advanced in Medicinal Plant Research*. S. N. Acharya and J. E. Thomas, ed. Research Signpost, Kerala, India, 2007.

13. Bhat T.K., Singh B., Sharma O.P.: Microbial degradation of tannins a current perspective. *Biodegradation*, 1998, **9**: 373-457.
14. Bhatta R., Uyeno Y., Tajima K., Takenaka A., Yabumoto Y., Nonaka I., Enishi O., Kurihara M.: Difference in the nature of tannins on *in vitro* ruminal methane and volatile fatty acid production and on methanogenic archaea and protozoal populations. *J. Dairy Sci.*, 2009, **92**: 5512-5522.
15. Borchers R.: Proteolytic activity of rumen fluid *in vitro*. *J. Anim. Sci.*, 1965, **24**: 1033-1038.
16. Briskin D.P.: Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. *Plant Physiol.*, 2000, **124**: 507-514.
17. Broderick G.A., Balthrop J.E.: Chemical inhibition of amino acid deamination by ruminal microbes *in vitro*. *J. Anim. Sci.*, 1979, **49**: 1101-1111.
18. Busquet M., Calsamiglia S., Ferret A., Kamel C.: Plant extracts affect *in vitro* rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.*, 2006, **89**: 761-771.
19. Busquet M., Calsamiglia S., Ferret S., Cardozo P.W., Kamel C.: Effects of cinnamaldehyde and garlic oil on rumen microbial fermentation in a dual flow continuous culture. *J. Dairy Sci.*, 2005, **88**: 2508-2516.
20. Busquet M., Calsamiglia S., Ferret S., Kamel C.: Screening for the effects of natural plant extracts and secondary plant metabolites on rumen microbial fermentation in continuous culture. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2005, **123**: 597-613.
21. Calsamiglia S., Busquet M., Cardozo P.W., Castillejos L., Ferret A.: Invited Review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.*, 2007, **90**: 2580-2595.
22. Cardozo P.W., Calsamiglia S., Ferret A., Kamel C.: Effects of natural plant extracts on ruminal protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. *J. Anim. Sci.*, 2004, **82**: 3230-3236.
23. Cardozo P.W., Calsamiglia S., Ferret A., Kamel C.: Screening for the effects of natural plant extracts at different pH on *in vitro* rumen microbial fermentation of a high-concentrate diet for beef cattle. *J. Anim. Sci.*, 2005, **83**: 2572-2597.
24. Carulla J.E., Kreuzer M., Machmüller A., Hess H.D.: Supplementation of *Acacia mearnsii* tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. *Aust. J. Agric. Res.*, 2005, **56**: 961-970.
25. Castillejos L., Calsamiglia S., Ferret A.: Effect of essential oils active compounds on rumen microbial fermentation and nutrient flow in *in vitro* systems. *J. Dairy Sci.*, 2006, **89**: 2649-2658.
26. Castillejos L., Calsamiglia S., Ferret A., Losa R.: Effects of a specific blend of essential oil compounds and the type of diet on rumen microbial fermentation and nutrient flow from a continuous culture system. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2005, **119**: 29-41.
27. Castillejos L., Calsamiglia S., Ferret A., Losa R.: Effects of dose and adaptation time of a specific blend of essential oils compounds on rumen fermentation. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2007, **132**: 186-201.
28. Chao S.C., Young D.G.: Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. *J. Essent. Oil Res.*, 2000, **12**: 639-649.
29. Cheeke P.R.: Biological effects of feed and forage saponins and their impact on animal production. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1996, **405**: 377-385.
30. Cheeke P.R.: Actual and potential application of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* saponins in human and animal nutrition. *Proc. Am. Soc. Anim. Sci.*, 1999, 1-10.
31. Chizzola R., Hochsteiner W., Hajek S.: GC analysis of essential oils in the rumen fluid after incubation of *Thuja orientalis* twigs in the Rusitec system. *Res. Vet. Sci.*, 2004, **76**: 77-82.
32. Cieślak A., Zmora P., Nowakowska A., Szumacher-Strabel M.: Limonene affect rumen methanogenesis. *Acta Bioch. Pol.*, 2009, **56 (Suppl. 2)**: 59-60.

33. Cosentino S., Tuberoso C.I.G., Pisano B., Satta M., Mascia V., Arzedi E., Palmas F.: *In vitro* antimicrobial activity and chemical composition of *Sardinian thymus* essential oil. *Lett. Appl. Microbiol.*, 1999, **29**: 130-135.
34. Cox S.D., Mann C.M., Markam J.L.: Interaction between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J. Appl. Microbiol.*, 2001, **91**: 492-497.
35. Dorman H.J.D., Deans S.G.: Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.*, 2000, **88**: 308-316.
36. Eryavuz A., Dehority B.A.: Effect of *Yucca schidigera* extract on the concentration of rumen microorganisms in sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2004, **117**: 215-222.
37. European Commission: Regulation (EC) No. 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on Additives for Use in Animal Nutrition. *Off. J. Eur.*, 2003, Union L: L268/29-L268/43.
38. Evans J.D., Martin S.A.: Effects of thymol on ruminal microorganisms. *Curr. Microbiol.*, 2000, **41**: 336-340.
39. Flythe M., Kagan I.: Antimicrobial effect of red clover (*Trifolium pratense*) phenolic extract on the ruminal hyper ammonia-producing bacterium *Clostridium sticklandii*. *Curr. Microbiol.*, 2010, Doi: 10.1007/s00284-010-9586-5.
40. Francis G., Kerem Z., Makkar H.P.S., Becker K.: The biological action of saponins in animal systems: a review. *Brit. J. Nutr.*, 2002, **88**: 587-605.
41. Glaupert A.M., Dingle J.T., Lucy J.A.: Action of saponin on biological membranes. *Nature*, 1962, **196**: 953-955.
42. Goel G., Makkar H.P.S., Becker K.: Changes in microbial community, structure, methanogenesis and rumen fermentation in response to saponin-rich fractions from different plant materials. *J. Appl. Microbiol.*, 2008, **105**: 770-777.
43. Goel G., Makkar H.P.S., Becker K.: Effect of *Sesbania sesban* and *Carduus pycnocephalus* leaves and fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) seeds and their extracts on partitioning of nutrient from roughage and concentrate based feeds to methane. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2008, **147**: 72-89.
44. Greathhead H.: Plants and plant extracts for improving animal productivity. *Proc. Nutr. Soc.*, 2003, **62**: 279-290.
45. Griffin S.G., Wyllie S.G., Markham J.L., Leach D.N.: The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flav. Fragr. J.*, 1999, **14**: 322-332.
46. Guo Y.Q., Liu J.X., Lu Y., Zhu W.Y., Denman S.E., McSweeney C.S.: Effect of tea saponin on methanogenesis, microbial community structure and expression of mcrA gene, in cultures of rumen microorganisms. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2008, **47**: 421-426.
47. Gustafson R.H., Bowen R.E.: Antibiotic use in animal agriculture. *J. Appl. Microbiol.*, 1997, **83**: 531-541.
48. Harfoot C.G., Hazlewood G.P.: Lipid metabolism in the rumen. *Rumen Microbial Ecosystem*. 2nd ed. P.N. Hobson and C.S. Stewart, ed. Blackie Academic & Professional, New York, 1988, 285-322.
49. Hart K.J., Yáñez-Ruiz D.R., Duval S.M., McEvan N.R., Newbold C.J.: Plant extracts to manipulate rumen fermentation. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2008, **147**: 8-35.
50. Heath I.B., Bauchop T., Skipp R.A.: Assignment of the rumen anaerobe *Neocallimastix frontalis* to the *Spizellomycetales* (*Chytridiomycetes*) on the basis on its polyflagellate zoospore ultrastructure. *Can. J. Bot.*, 1983, **61**: 295-307.
51. Helander I.M., Alakomi H., Latva-Kala K., Mattila-Sandholm T., Pol I., Smid E.J., Gorris L.G.M., Wright A.: Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. *J. Agric. Food Chem.*, 1998, **46**: 3590-3595.
52. Hess H.D., Beuret R.A., Lotscher M., Hindrichsen K.I., Machmüller A., Carulla J.E., Lascano C.E., Kreuzer I.: Ruminal fermentation, methanogenesis and nitrogen utilization of sheep receiving tropical grass hay-concentrate diet offered with *Sapindus saponaria* fruits and *Cratylia argentea* foliage. *Anim. Sci.*, 2004, **79**: 177-189.

53. Hess H. D., Kreuzer M., Diaz T. E., Lascano C. E., Carulla J. E., Soliva C. R., Machmüller A.: Saponin rich tropical fruits affect fermentation and methanogenesis in faunated and defaunated rumen fluid. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2003, **109**: 79-94.
54. Hess H. D., Monsalve L. M., Lascano C. E., Carulla J. E., Diaz T. E., Kreuzer M.: Supplementation of a tropical grass diet with forage legumes and *Sapindus saponaria* fruits: effects on *in vitro* ruminal nitrogen turnover and methanogenesis. *Aust. J. Agric. Res.*, 2003a, **54**: 703-713.
55. Hobson P. N.: Rumen bacteria. J. R. Norris, D. W. Ribbons, (Eds.), *Methods in Microbiology*, Academic Press Ltd., London, 1969, **(3B)**: 133-149.
56. Hoffman C., Evans C. A.: The use of spices as preservatives. *J. Ind. Eng. Chem.*, 1911, **3**: 835-838.
57. Hristov A. N., Grandeen K. L., Ropp J., Greer D.: Effect of *Yucca schidigera*-based surfactant on ammonia utilization *in vitro*, and *in situ* degradability of corn grain. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2004, **115**: 341-355.
58. Hristov A. N., Ivan M., Neill L., McAllister T. A.: A survey of potential bioactive agents for reducing protozoal activity *in vitro*. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2003, **105**: 163-184.
59. Hristov N. A., McAllister T. A., Van Herk F. H., Cheng K. J., Newbold C. J., Cheeke P. R.: Effect of *Yucca schidigera* on ruminal fermentation and nutrient digestion in heifers. *J. Anim. Sci.*, 1999, **77**: 554-2563.
60. Hu W. L., Liu J. X., Ye J. A., Wu Y. M., Guo Y. Q.: Effect of tea saponin on rumen fermentation *in vitro*. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2005, **120**: 333-339.
61. Hungate R. E.: Hydrogen as an intermediate in the rumen fermentation. *Arch. Microbiol.*, 1967, **40**: 952-958.
62. Islam M. R., Begum J.: Short review of global methane situation and of facilities to reduce in ruminants in third world countries. *AJAS*, 1997, **10**: 157-163.
63. Ivan M., Dayrell M. D., Mahadevan S., Hidiroglou M.: Effect of bentonite on wool growth and nitrogen metabolism in fauna-free and faunated sheep. *J. Anim. Sci.*, 1992, **70**: 3194-3202.
64. Ivan M., Koenig K. M., Teferedenge B., Newbold C. J., Entz T., Rode L. M., Ibrahim M.: Effects of the dietary *Enterolobium cyclocarpum* foliage on the population dynamics of rumen ciliate protozoa in sheep. *Small Rum. Res.*, 2004, **52**: 81-91.
65. Ivan M., Mir P. S., Mir Z., Koenig K. M., Newbold C. J., Entz T., Rode L. M., Ibrahim M.: Use of dietary saponins or vegetable oil to control protozoal populations in the rumen of sheep. 6th International ICABR Conference Ravello, Italy, 2001, 1-12.
66. Ivan M., Neill L., Forster R., Alimon R., Rode L. M., Entz T.: Effects of *Isotricha*, *Dasytricha*, *Entodinium*, and total fauna on ruminal fermentation and duodenal flow in wethers fed different diets. *J. Dairy Sci.*, 2000, **83**: 776-787.
67. Janssen P. H., Kirs M.: Structure of the archeal community of the rumen. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2008, **74**: 3619-3625.
68. Jensen B. B.: Methanogenesis in monogastric animals. *Environmental Monitoring and Assessment*, 1996, **42**: 99-112. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
69. Johnson D. E., Hill T. M., Ward G. M., Johnson K. A., Branine M. E., Carmean B. R., Lodman D. W.: Ruminants and other animals. M. A. K. Khalil ed. *Atmospheric methane: sources, sink, and role in global change*. Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg, 1993, 199-229.
70. Johnson D. E., Ward G. M.: Estimates of animal methane emissions. *Environmental Monitoring and Assessment*, 1996, **42**: 133-141. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
71. Johnson K. A., Johnson D. E.: Methane emissions from cattle. *J. Anim. Sci.*, 1995, **73**: 2483-2492.
72. Jones G. A., McAllister T. A., Muir A. D., Cheng K. J.: Effects of saifonin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) condensed tannins on growth and proteolysis by four strains of ruminal bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, **60**: 1374-1378.

73. Jung H. J., Lee C. O., Lee K. T., Choi J., Park H. J.: Structure-activity relationship of oleanane disaccharides isolated from *Akebia quinata* versus cytotoxicity against cancer cells and NO inhibition. *Biol. Pharm. Bull.*, 2004, **27**: 744-747.
74. Kamra D. N., Agarwal N., Chaudhary L. C.: Inhibition of ruminal methanogenesis by tropical plants containing secondary compounds. *Inter. Cong. Ser.*, 2006, **1293**: 156-163.
75. Kišidayová S., Váradyová Z., Michałowski T., Newbold C. J.: Regeneration of cryoresistance of *in vitro* rumen ciliate cultures. *Cryobiol.*, 2005, **51**: 76-84.
76. Kowalik B., Pająk J. J., Skomiał J.: Wpływ tanin na procesy zachodzące w żwaczu. *Post. Nauk Rol.*, 2009, **1**: 91-102.
77. Lapierre H., Berthiaume R., Ragio R., Thivierge M. C., Doepel M. C., Pacheco L., Debreuil P., Lobley G. E.: The route of absorbed nitrogen into milk protein. *Anim. Sci.*, 2005, **80**: 11-22.
78. Leng R. A., Bird S. H., Klieve A., Choo B. S., Ball F. M., Asefa G., Brumby P., Mudgal V. D., Chaudhry U. B., Haryono S. U., Hendrato N.: The potential for tree forage supplements to manipulate rumen protozoa to enhance protein to energy ratios in ruminants fed on poor quality forages. In: *Legume trees and other fodder trees as protein sources for livestock*. Rome, 1992.
79. Li M., Yao K., He Q., Jia D.: Biodegradation of gallotannins and ellagitannins. *J. Basic Microbiol.*, 2006, **46**: 68-84.
80. Lila Z. A., Mohammed N., Kanda S., Kamada T., Itabashi H.: Effect of sarsaponin on ruminal fermentation with particular reference to methane production *in vitro*. *J. Dairy Sci.*, 2003, **86**: 3330-3336.
81. Lila Z. A., Mohammed N., Kanda S., Kurihara M., Itabashi H.: Sarsaponin effects on ruminal fermentation and microbes, methane production, digestibility and blood metabolites in steers. *Asian-Aust. J. Anim.*, 2005, **12**: 1746.
82. Makkar H. P. S., Becker K.: Degradation of *Quillaja saponins* by mixed culture of rumen microbes. *Lett. Appl. Microbiol.*, 1997, **25**: 243-245.
83. Makkar H. P. S., Blummel M., Becker K.: *In vitro* effects and interaction between tannins and saponins and fate of tannins in the rumen. *J. Sci. Food Agric.*, 1995, **69**: 481-493.
84. Mao H. L., Wang J. K., Zhou Y. Y., Liu J. X.: Effects of addition of tea saponins and soybean oil on methane production, fermentation and microbial population in the rumen of growing lambs. *Livest. Sci.*, 2010, **129**: 56-62.
85. Marriott B. M.: Functional foods: an ecologic perspective. *A. J. Clin. Nutr.*, 2000, **71**: 1728-1734.
86. McIntosh F. M., Williams P., Losa R., Wallace R. J., Beever D. A., Newbold C. J.: Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, **69**: 5011-5014.
87. McMahon L. R., Majak W., McAllister T. A., Hall J. W., Jones G. A., Popp J. D., Cheng K. J.: Effect of sainfoin on *in vitro* digestion of fresh alfalfa and bloat in steers. *Can. J. Anim. Sci.*, 1999, **79**: 203-212.
88. McSweeney C. S., Palmer B., McNeill D. M., Krause D. O.: Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2001, **91**: 83-93.
89. Meyer N. F., Erickson G. E., Klopfenstein T. J., Greenquist M. A., Luebbe M. K., Williams P., Engstrom M. A.: Effect of essential oils, tylosin, and monensin on finishing steer performance, carcass characteristics, liver abscesses, ruminal fermentation, and digestibility. *J. Anim. Sci.*, 2009, **87**: 2346-2354.
90. Miles C. O., Wilkins A. L., Munday S. C., Holland P. T., Smith B. L., Lancaster M. J., Embling P. P.: Identification of the calcium salt of epismilagenin beta-D-glucuronide in the bile crystals of sheep affected by *Panicum-dichotomiflorum* and *Panicum-schinzii toxicoses*. *J. Agric. Food Chem.*, 1992, **40**: 1606-1609.

91. Min B. R., Pinchak W. E., Andersen R. C., Fulford J. D., Puchala R.: Effects of condensed tannins supplementation level on weight gain and *in vitro* and *in vivo* bloat precursors in steers grazing winter wheat. *J. Anim. Sci.*, 2006, **84**: 2546-2554.
92. Min B. R., Pinchak W. E., Fulford J. D., Puchala R.: Wheat pasture bloat dynamic, *in vitro* ruminal gas production, and potential bloat mitigation with condensed tannins. *J. Anim. Sci.*, 2005, **83**: 1322-1331.
93. M o a t e P. J.: Defaunation increases milk yield of dairy cows. University of New England Printery, Armidale, NSW, Australia, 1989.
94. Monforte-Briceno G. E., Sandoval-Castro C. A., Ramirez-Aviles L., Capetillo-Leal C. M.: Defaunating capacity of tropical fodder trees: effects of polyethylene glycol and its relationship to *in vitro* gas production. *Anim. Feed. Sci. Technol.*, 2005, **123-124**: 313-327.
95. Morgavi D. P., Jouany J. P., Martin C.: Changes in methane emission and rumen fermentation parameters induced by refaunation in sheep. *Aust. J. Exp. Agric.*, 2008, **48**: 69-72.
96. Moss A. R., Deaville E. R., Givens D. I.: Effect of supplementing grass silage with sugar beet feed on methane production by sheep. *Proc. Brit. Soc. Anim. Prod. Paper*, 1994, 53.
97. Muhammed S., Stewart C. S., Acamovic T.: Effects of tannic acid, ellagic acid, gallic acid and catchin on cellulose degradation by the rumen fungus *Neocallimastix frontalis* strain RE1. *Anim. Sci.*, 1995, **60**: 550A.
98. Nagy J. G., Tengerdy R. P.: Antibacterial action of essential oils of *Artemisia* as an ecological factor. II. Antibacterial action of the volatile oils of *Artemisia tridentata* (Big sagebrush) on bacteria from the rumen of mule deer. *Appl. Microbiol.*, 1968, **16**: 441-444.
99. Navas-Camacho A., Laredo M. A., Cuesta A., Ortega O., Romero M.: Evaluation of tropical tree with high or medium saponins content as dietary alternative to eliminate protozoa from the rumen. *Proc. Soc. Nutr. Physiol.*, 1994, **3**: 204.
100. Newbold C. J., ElHassan S. M., Wang J., Ortega M. E., Wallace R. J.: Influence of foliage from *African multipurpose* trees on activity of rumen protozoa and bacteria. *Br. J. Nutr.*, 1997, **78**: 237-249.
101. Newbold C. J., McIntosh F. M., Williams P., Losa R., Wallace R. J.: Effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2004, **114**: 105-112.
102. Newbold C. J., Wallace R. J., Watt N. D., Richardson A. J.: The effect of the novel ionophore tetronasin (ICI 139603) on ruminal microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1988, **54**: 544-547.
103. Newman D. J., Cragg G. M., Snader K. M.: The influence of natural products upon drug discovery. *Nat. Prod. Rep.*, 2000, **17**: 215-234.
104. Ningrat R. W. S., Garnsworthy P. C., Newbold C. J.: Saponin fractions in *Sapindus rarak*: effects on rumen microbes. *Reprod. Nutr. Dev.*, 2002, **42**: 82.
105. O'Gara E. A., Hill D. J., Maslin D. J.: Activities of garlic oil, garlic powder, and their diallyl constituents against *Helicobacter pylori*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, **66**: 2269-2273.
106. Odenyo A. A., Osuji P. O.: Tannin-tolerant ruminal bacteria from East African ruminants. *Can. J. Microbiol.*, 1998, **44**: 905-909.
107. Odenyo A. A., Osuji P. O., Karanfil O.: Effect of multipurpose tree (MPT) supplements on ruminal ciliate protozoa. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 1997, **67**: 169-180.
108. Oh H. K., Jones M. B., Longhurst W. M.: Comparison of rumen microbial inhibition resulting from various essential oils isolated from relative unpalatable plant species. *Appl. Microbiol.*, 1968, **16**: 39-44.
109. Oh H. K., Sakai T., Jones M. B., Longhurst W. M.: Effect of various essential oils isolated from Douglas Fir Needles upon sheep and deer rumen microbial activity. *Appl. Microbiol.*, 1967, **15**: 777-784.

110. Ohene-Adjei S., Chaves A. V., McAllister T. A., Benchaar C., Teather R. M., Forster R. J.: Evidence of increased diversity of methanogenic archaea with plant extract supplementation. *Microbiol. Ecol.*, 2008, **56**: 234-242.
111. Oleszek W. A.: Chromatographic determination of plant saponins. *J. Chromatogr.*, 2002, **A967**: 147-162.
112. Uttara B., Simard R. E., Holley R. A., Piette G. J. P., Bégin A.: Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage microorganisms. *Int. J. Food Microbiol.*, 1997, **37**: 155-162.
113. Ouwehand A. C., Tiihonen K., Kettunen H., Peuranen S., Schulze H., Rautonen N.: *In vitro* effects of essential oils on potential pathogens and beneficial members of the normal microbiota. *Vet. Med.*, 2010, **55**: 71-78.
114. Patra A. K., Kamra D. N., Agarwal N.: Effect of plant extracts on *in vitro* methanogenesis, enzyme activities and fermentation of feed in rumen liquor of buffalo. *Anim. Feed. Sci. Technol.*, 2006, **128**: 276-291.
115. Patra A. K., Kamra D. N., Agarwal N.: Effect of extracts of leaves on rumen methanogenesis, enzyme activities and fermentation in *in vitro* gas production test. *Indian J. Anim. Sci.*, 2008, **78**: 91-96.
116. Patra A. K., Saxena J.: Dietary phytochemicals as rumen modifiers: a review of the effects on microbial populations. *Anton. Leeuwen.*, 2009, **96**: 369-375.
117. Paul S. S., Karma D. N., Sastry V. R. B., Sahu N. P., Kumar A.: Effect of phenolic monomers on biomass and hydrolytic enzyme activities of an anaerobic fungus isolated from wild nilgai (*Baselophus tragocamelus*). *Lett. Appl. Microbiol.*, 2003, **36**: 377-381.
118. Pen B., Sar C., Mwenya B., Kuwaki K., Morikawa R., Takahashi J.: Effects of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* extracts on *in vitro* ruminal fermentation and methane emission. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2006, **129**: 175-186.
119. Pleszczyńska M., Szczodra J.: Taniny i ich rozkład enzymatyczny. *Biotechnologia*, 2005, **168**: 152-165.
120. Puchala R., Min B. R., Goetsch A. L., Sahlu T.: The effect of a condensed tannin-containing forage on methane emission by goats. *J. Anim. Sci.*, 2005, **83**: 182-186.
121. Rafii F., Shahverdi A. R.: Comparison of essential oils from three plants for enhancement of antimicrobial activity of nitrofurantion against enterobacteria. *Chemotherapy*, 2007, **53**: 21-25.
122. Riguera R.: Isolating bioactive compounds from marine organisms. *J. Mar. Biotechnol.*, 1997, **5**: 187-193.
123. Ruiz D. R. J., Moumen A., Garcia A. I. M., Alcaide E. M.: Ruminal fermentation and degradation pattern, protozoa population, and urinary purine derivatives excretion in goats and wethers fed diet bases on two-stage olive cake: Effect of PEG supply. *J. Anim. Sci.*, 2004, **82**: 2023-2032.
124. Russell J. B., Strobel H. J., Chen G.: Enrichment and isolation of a ruminal bacterium with a very high specific activity of ammonia production. *App. Environ. Microbiol.*, 1988, **54**: 872-877.
125. Salawu M. B., Acamovic T., Stewart C. S., Hovell F. D., De B.: Effects of feeding quebracho tannin diets, with or without a dietary modifier, on rumen function in sheep. *Anim. Sci.*, 1999, **69**: 265-274.
126. Sangwan N. S., Farooqi A. H. A., Shabih F., Sangwan R. S.: Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth. Reg.*, 2001, **34**: 3-21.
127. Santos M. B., Robinson P. H., Williams P., Losa R.: Effects of addition of an essential oil complex to the diet of lactating dairy cows on whole tract digestion of nutrients and productive performance. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2010, doi:10.1016/j.anifeedsci.2010.02.001.
128. Santra A., Karim S. A.: Influence of ciliate protozoa on biochemical changes and hydrolytic enzyme profile in the rumen ecosystem. *J. Appl. Microbiol.*, 2000, **92**: 801-811.

129. Skillman L. C., Evans P. N., Naylor G. E., Morvan B., Jarvis G. N., Joblin K. N.: 16S ribosomal DNA-directed PCR primers for ruminal methanogens and identification of methanogens colonising young lambs. *Anaerobe*, 2004, **10**: 277-285.
130. Smith A. H., Zoetendal E. G., Mackie R. I.: Bacterial mechanisms to overcome inhibitory effects of dietary tannins. *Microb. Ecol.*, 2005, **50**: 197-205.
131. Soltan M. A.: Effect of essential oils supplementation on growth performance, nutrient digestibility, health condition of Holstein male calves during pre- and post-weaning periods. *Pak. J. Nutr.*, 2009, **8**: 642-652.
132. Spanghero M., Robinson P. H., Zanfi C., Fabbro E.: Effect of increasing doses of a microencapsulated blend of essential oils on performance of lactating primiparous dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2009, **153**: 153-157.
133. Sparg S. G., Light M. E., van Staden J.: Biological activities and distribution of plant saponins. *J. Ethnopharmacol.*, 2004, **94**: 219-243.
134. Stewart C. S., Flint H. J., Bryant M. P.: The rumen bacteria. In: *The Rumen Microbial Ecosystem*. Hobson P. N. and Stewart C. S. Published by Blackie Academic and Professional, London, UK, 1997, 10-55.
135. Śliwiński B. J., Soliva C. R., Machmüller A.: Efficacy of plant rich in secondary constituents to modify rumen fermentation. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2002, **101**: 101-114.
136. Śliwiński B., Kreuzer M., Wettstein H. R., Machmüller A.: Rumen fermentation and nitrogen balance of lambs fed diets containing plant extracts rich in tannins and saponins, and associated emission of nitrogen and methane. *Arch. Anim. Nutr.*, 2002, **56**: 379-392.
137. Śpiewak R., Szostak W., Jurzysta M., Biały Z., Maleszka R., Rzepicka B., Mazurek M.: Wpływ lucerny na wzrost *Trichophyton mentagrophytes* w mikrohodowli. *Wiad. Parazyt.*, 2001, **47**: 839-844.
138. Tavendale M. H., Meagher L. P., Pacheco D., Walter N., Attwood G. T., Sivakumaran S.: Methane production from *in vitro* rumen incubations with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa*, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2005, **123-124**: 403-419.
139. Teferedegne B.: New perspectives on the use of tropical plants to improve ruminant nutrition. *Proc. Nutr. Soc.*, 2000, **59**: 209-214.
140. Teferedegne B., McIntosh F., Osuji P. O., Odenyo A., Wallace R. J., Newbold C. J.: Influence of foliage from different accessions of the sub-tropical leguminous tree, *Sesbania sesban*, on ruminal protozoa in Ethiopian and Scottish sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 1999, **78**: 11-20.
141. Tyler V. E.: Phytomedicines: back to the future. *J. Nat. Prod.*, 1999, **62**: 1589-1592.
142. Ultee A., Kets E. P., Smid E. J.: Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, **65**: 4606-4610.
143. Ushida K., Jouany J. P.: Methane production associated with rumen-ciliated protozoa and its effect on protozoan activity. *Lett. Appl. Microbiol.*, 1996, **23**: 129-132.
144. Valdez F. R., Bush L. J., Goetsch A. L., Owens F. N.: Effect of steroidal saponins on rumen fermentation and on production of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 1986, **69**: 1568-1575.
145. Van Nevel C. J., Demeyer D. I.: Manipulation of rumen fermentation. In: *The Rumen Microbial Ecosystem*. P. N. Hobson, ed. Elsevier Applied Science, New York, NY, 1988, 387-433.
146. Vidal F., Vidal J. C., Gadelha A. P. R., Lopes C. S., Coelho M. G. P., Monteiro-Leal L. H.: *Giardia lamblia*: the effect of extracts and fractions from *Mentha x piperita* Lin. (*Labiatae*) on trophozoites. *Exp. Parasitol.*, 2007, **115**: 25-31.
147. Waghorn G. C., Tavendale M. H., Woodfield D. R.: Methanogenesis from forages fed to sheep. *Proc. N.Z. Grass. Assoc.*, 2002, **64**: 167-171.
148. Wallace R. J.: Symposium on plants as animal foods: a case of catch 22? Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. *Proc. Nutr. Soc.*, 2004, **63**: 621-629.

149. Wallace R. J., Arthaud L., Newbold C. J.: Influence of *Yucca schidigera* extract on ruminal ammonia concentrations and ruminal microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, **60**: 1762-1767.
150. Wang C. J., Wang S. P., Zhou H.: Influences of flavomycin, ropadiar, and saponin on nutrient digestibility, rumen fermentation, and methane emission from sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2009, **148**: 157-166.
151. Wang Y. X., McAllister T. A., Newbold C. J., Rode L. M., Cheeke K. J.: Effects of *Yucca schidigera* extract on fermentation and degradation of steroidal saponins in the rumen simulation technique (RUSITEC). *Anim. Feed Sci. Technol.*, 1998, **74**: 143-153.
152. Wang Y. X., McAllister T. A., Yanke L. J., Xu Z. J., Cheeke P. R., Cheng K. J.: *In vitro* effects of steroidal saponins from *Yucca schidigera* extract on rumen microbial protein synthesis and ruminal fermentation. *J. Sci. Food Agric.*, 2000, **80**: 2114-2122.
153. Williams A. G., Coleman G. S.: The rumen protozoa. Springer-Verlag, London, 1992.
154. Wina E., Muetzel S., Becker K.: The dynamics of major fibrolytic microbes and enzyme activity in the rumen in response to short- and long-term feeding of *Sapindus rarak* saponins. *J. Appl. Microbiol.*, 2006, **100**: 114-122.
155. Wina E., Muetzel S., Hoffmann E., Makkar H. P. S., Becker K.: Saponins containing methanol extract of *Sapindus rarak* affect microbial fermentation, microbial activity and microbial community structure *in vitro*. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2005, **121**: 159-174.
156. Wolin M. J., Miller T. L.: Microbe-microbe interaction. In: The Rumen Microbial Ecosystem. Ed. by P. N. Hobson, Elsevier Applied Science, London, 1988, 343-459.
157. Woodward S. L., Waghorn G. C., Lassey K. R., Laboyrie P. G.: Does feeding sulla (*Hedysarum coronarium*) reduce methane emission from dairy cows? *Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod.*, 2002, **62**: 227-230.
158. Woodward S. L., Waghorn G. C., Ulyatt M. J., Lassey K. R.: Early indications that feeding *Lotus* will reduce methane emission from ruminants. *Proc. N.Z. Anim. Prod.*, 2001, **61**: 23-26.
159. Wu Z., Huber J. T.: Relationship between dietary fat supplementation and milk protein concentration in lactating cows. *A Rev. Livest. Prod. Sci.*, 1994, **39**: 141-155.
160. Wuebbles D. J., Hayhoe K.: Atmospheric methane and global change. *Earth-Sci. Rev.*, 2002, **57**: 117-210.
161. Yang W. Z., Ametaj B. N., Benchaar C., He M. L., Beauchemin K. A.: Cinnamaldehyde in feedlot cattle diets: intake, growth performance, carcass characteristics, and blood metabolites. *J. Anim. Feed Sci.*, 2010, **88**: 1082-1092.
162. Yoshiki Y., Kudou S., Okubo K.: Relationship between chemical structures and biological activities of triterpenoid saponins from soybean. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1998, **62**: 2291-2299.

Adres do korespondencji:

dr hab. Małgorzata Szumacher-Strabel, prof. UP
Katedra Żywności Zwierząt i Gospodarki Paszowej
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
ul. Wołyńska 33
60-637 Poznań
tel.: (61) 848 72 28
e-mail: mstrabel@jay.up.poznan.pl

