

## Naturalne substancje żywieniowe modyfikujące wielkość populacji protistów żwacza u owiec

Aurelia Radzik-Rant<sup>ORCID</sup>, Marta Dąbrowska, Witold Rant<sup>ORCID</sup>

*Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Instytut Nauk o Zwierzętach,  
Katedra Hodowli Zwierząt, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa*

Przeżuwacze, do których należą także owce, są jedną z najbardziej rozpowszechnionych grup zwierząt roślinożernych, liczącą około 200 gatunków (Hackmann i Spain, 2010). Zwierzęta przeżuwające zawdzięczają swój sukces ewolucyjny głównie systemowi trawienia. Specyficzna budowa ich układu pokarmowego umożliwia niespotykaną u innych grup kręgowców ścisłą symbiozę między zwierzęciem a mikroorganizmami zamieszkującymi żwacz. Około 50% biomasy organizmów stanowią w żwaczu bakterie ( $10^{10}$ – $10^{11}$  komórek w 1 g zawartości żwacza), 3–5% archeowce – metanogeny ( $10^9$  komórek w 1 g zawartości żwacza), 40% protisty ( $10^4$ – $10^6$  komórek w 1 g zawartości żwacza), a pozostałą część – grzyby (8% biomasy,  $10^2$ – $10^4$  komórek w 1 g zawartości żwacza) i inne organizmy (np. bakteriofagi) (Kamra, 2005).

W ostatnich latach w centrum zainteresowania badaczy znalazła się ocena zależności między liczebnością oraz składem gatunkowym fauny protistów w żwaczu a efektywnością procesów trawienia. Przyjmuje się, że obecność pierwotniaków jest istotna z punktu widzenia wykorzystania paszy i homeostazy ekosystemu żwacza, ale nie jest kluczowa dla jego prawidłowego funkcjonowania oraz dobrostanu zwierząt (Newbold i in., 2015). Niektóre badania nad eliminacją żwaczowych protistów wykazały, że defaunacja u owiec może przyczynić się do zwiększenia średnich dziennych przyrostów i wzrostu produkcji wełny przy jednoczesnym zmniejszeniu emisji metanu (Hegarty i in., 2008; Nguyen i in., 2016). Newbold i in. (2015) wykazali, że

wyeliminowanie pierwotniaków ze żwacza może zwiększyć podaż białek pochodzących z drobnoustrojów nawet o 30%, przy jednoczesnej redukcji emisji metanu o 11%.

W celu uzyskania pozytywnego działania wynikającego ze znacznego ograniczania fauny protistów w żwaczu niezbędna jest kontrola ich liczebności (Castillo-González i in., 2014). Stosowanie antybiotyków i kokcydiostatyków jako związków ograniczających populację pierwotniaków może być zbyt niebezpieczne dla zwierząt, konsumentów, a także środowiska. Ponadto, środki te mogą jednocześnie negatywnie wpływać na faunę bakterii celulolitycznych. Dlatego też, jako bezpieczniejsze formy zmniejszające liczebność części fauny żwacza uznaje się naturalne substancje bioaktywne występujące w roślinach (Patra i Saxena, 2010; Bodas i in., 2012).

Wykorzystanie tych substancji w diecie daje możliwość korzystnego modulowania składu mikrobiomu żwacza i procesów fermentacji. Jednakże, jak donoszą badania przeprowadzone w ostatnich latach, ograniczenie liczebności protistów w żwaczu może być zależne od rodzaju naturalnych substancji żywieniowych pochodzenia roślinnego.

### Protisty występujące w żwaczu i ich rola w procesie trawienia

Protisty występujące u przeżuwaczy są zróżnicowaną morfologicznie grupą, należącą do dwóch rzędów: *Vestibuliferida* i *Entodiniomorphida*, w skład których wchodzi około 25 rodzajów.

Rząd *Vestibuliferida* składa się z pięciu rodzin, a w każdej występuje szereg gatunków, których charakterystyczną cechą jest posiadanie rzęsek na całym ciele. W składzie rzędu *Entodiniomorpha* sklasyfikowano obecnie trzy podrzędy: *Archistomatina*, *Blepharocorythina* oraz *Entodiniomorpha*, przy czym w składzie ostatniego z nich występuje ponad połowa wszystkich gatunków pierwotniaków bytujących u przeżuwaczy (Kamra, 2005).

W żwaczu owcy domowej stwierdzono obecność ponad 100 gatunków pierwotniaków oraz szeregu podgatunków i innych form morfologicznych, należących do dwóch rzędów, czterech rodzin oraz 17 rodzajów (Cedrola i in., 2016; Gürelli, 2017). Ogromna zmienność pierwotniaków wynika ze zróżnicowania rodzaju i jakości pobieranej paszy w zależności od miejsca bytowania owiec.

Mimo że pierwotniaki mogą stanowić nawet do 40–50% biomasy wszystkich organizmów w żwaczu, ich rola w procesie trawienia jest przedmiotem ciągłych kontrowersji i wciąż daleka od ostatecznych konkluzji. Jak wspomniano wyżej, występujące w żwaczu protisty nie są niezbędne dla przeżycia zwierząt i ich dobrostanu. Nie znaczy to jednak, że ich obecność nie przynosi gospodarzowi szeregu istotnych korzyści, a ich brak może być związany z szeregiem dysfunkcji bądź podatnością na nie.

Protisty pełnią istotną rolę w rozkładzie celulozy poprzez zwiększenie produkcji enzymów, takich jak ksylanaza czy karboksymetylocelulaza (Michałowski i in., 2003). Mają również swój udział w procesie trawienia ziaren skrobi, podczas którego hamując bakteryjną fermentację chronią środowisko żwacza przed nadmiernym spadkiem pH i tym samym możliwością wystąpienia kwasicy, zarówno w formie klinicznej jak i podklinicznej (Bełżecki i Michałowski, 2005). Oprócz tego, protisty metabolizują nadmiar tlenu dostającego się wraz z pokarmem i śliną do żwacza, który jest niewątpliwie toksyczny dla beztlenowców (Williams i Coleman, 1992). Pierwotniaki pełnią także istotną rolę w rozkła-

dzie fito- i mykotoksyn zawartych w paszy oraz ograniczają podatność przeżuwaczy na zatrucia metalami ciężkimi. Poza udziałem protistów w wyżej wskazanych procesach, ich obecność korzystnie wpływa na ilość i jakość lotnych kwasów tłuszczowych produkowanych podczas fermentacji, co ma kluczowe znaczenie dla tempa wzrostu zwierząt (Zeitl i in., 2012).

Ujemną stroną obecności pierwotniaków w żwaczu jest ich przyczynianie się do zmniejszenia ogólnej ilości przyswajanych aminokwasów bakteryjnych w jelicie nawet o 23–30% (Williams i Coleman, 1992; Ivan i in., 2000). Ponadto jak podają Morgavi i in. (2010), procesy życiowe protistów występujących w żwaczu mogą sprzyjać wytwarzaniu niebezpiecznych gazów, takich jak metan i amoniak. Gazy te w znacznie mniejszych ilościach są produkowane także w trakcie innych procesów metabolicznych zachodzących w żwaczu, jak chociażby rozkład kwasu mrówkowego, amin czy metanolu. Niektórzy autorzy uważają, że zmniejszoną produkcję metanu można uzyskać poprzez defaunację żwacza, inni twierdzą, że zmienna produkcja tego gazu jest związana nie tylko ze składem protistfauny, ale również dietą (Newbold i in., 2015; Kittelmann i Janssen, 2011). Jeszcze inni, jak Morgavi i in. (2010) nie potwierdzają związku między ograniczeniem liczby lub wyeliminowaniem ze żwacza protistów a zmniejszeniem ilości emitowanego metanu.

### **Wpływ naturalnych substancji żywieniowych na aktywność protistów w żwaczu owiec**

Do związków ograniczających rozwój protistów w żwaczu poprzez zastosowanie ich w żywieniu przeżuwaczy należą: taniny, saponiny, jak też olejki eteryczne (Patra i Saxena, 2010). Oprócz wymienionych substancji aktywnych pochodzenia roślinnego, istotny wpływ na faunę protistów mogą mieć również tłuszcze (głównie oleje roślinne, nasiona roślin oleistych lub odpady z ich przerobu), mocznik, niektóre sole mineralne oraz drożdże (Castillo-González i in., 2014). Związki te często w selektywny sposób

wpływają na mikrobiom żwacza. Mogą one ograniczać emisję metanu i amoniaku, jak również przyczynić się do lepszego przyswajania związków azotowych, zwłaszcza białka bakteryjnego.

Taniny, jako naturalne związki chemiczne wytwarzane przez rośliny przejawiają dużą różnorodność budowy molekularnej. Są to polifenole z masami cząsteczkowymi wahającymi się w bardzo dużych zakresach – od kilkuset do kilkunastu tysięcy daltonów (Da), co powoduje spore problemy podczas ich izolacji (Schofield i in., 2001). Występowanie tanin stwierdza się w niedojrzałych owocach wielu gatunków roślin, nasionach zbóż, roślin oleistych i strączkowych. Obecność ich nie tylko nadaje roślinom cierpki, nieprzyjemny smak, ale również może mieć działanie toksyczne dla zwierząt (Salem i in., 2010). Związki te charakteryzują się silnym działaniem bakteriobójczym, niekiedy mogą także powodować denaturację białek (Bodas i in., 2012). Mechanizm działania tanin przeciwko bakteriom, archeowcom oraz protistom bytującym w żwaczu polega najprawdopodobniej na tworzeniu przez taniny trwałych kompleksów z białkami występującymi w ścianach komórkowych tych organizmów oraz inaktywacji wydzielanych przez nie enzymów (Smith i in., 2005; Bodas i in., 2012).

Powszechnie uznaje się, że działanie tanin na populację protistów jest negatywne, aczkolwiek ich udział w diecie nie zawsze w sposób jednoznaczny ogranicza rozwój tych mikroorganizmów w żwaczu. W badaniach Makkar i in. (1995) wskazano, że działanie tanin pochodzących z ekstraktu z kebraczo (*Schinopsis lorentzii*) na liczbę protistów w żwaczu krów zależało od ich stężenia i przynależności gatunkowej mikroorganizmów. Zdecydowanie bardziej odporne były protisty z podrzędu *Entodiniomorpha*. Do podobnych wniosków doszli Carulla i in. (2005), podając taniny z *Acacia mearnsii* owcom. Wiele badań przeprowadzonych na owcach potwierdziło ograniczanie liczebności protistów niezależnie od ich przynależności gatunkowej pod wpływem tanin zawartych w akacji nilowej (*Acacia nilotica*), mimozie białej (*Leucaena leucocephala*),

czy liściach bananowca (Abdullah i in., 2018; Tan i in., 2011; Freitas i in., 2017). Z kolei w badaniach Vasta i in. (2010) dodatek tanin do dawki pokarmowej owiec powodował znaczący wzrost zarówno liczebności pierwotniaków, jak i bakterii. Żadnych negatywnych efektów na populację protistów nie zaobserwowano również u owiec karmionych paszą z 6% dodatkiem bogatych w taniny nasion herbaty (Ivan i Entz, 2004). Na podstawie powyższych wyników można stwierdzić, że wpływ tanin na liczebność pierwotniaków może być związany zarówno z ich strukturą taksonomiczną, gatunkiem przeżuwacza, jak i rodzajem paszy.

Saponiny są kolejną grupą związków chemicznych naturalnie wytwarzanych przez ponad 500 gatunków roślin. Substancje te należą do glikozydów o masach cząsteczkowych od 600 do 1500 Da, w których skład wchodzi aglikon – saponigenina (sapogenol) i glikon – sacharyd (cukier). Saponiny występują głównie w roślinach okrytonasiennych, ale została również potwierdzona ich obecność w niektórych gatunkach roślin nagonasiennych z rodzaju *Polypodium*. Charakteryzują się silnym działaniem bakteriobójczym i bakteriostatycznym. Mechanizm działania saponin polega najprawdopodobniej na tworzeniu nieodwracalnych kompleksów z cholesterolem zawartym w ścianie komórkowej, powodując destrukcję i lizę komórki mikroorganizmu (Francis i in., 2002; Bodas i in., 2012).

Saponiny ulegają szybkiemu rozkładowi w płynie żwaczowym, oprócz jednego z aktywnych produktów ich rozpadu, czyli sapogeniny. Ich toksyczność dla żwaczowych protistów rejestrowano zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo* (Koenig i in., 2007). Niemniej jednak, podobnie jak w przypadku tanin skuteczność saponin w ograniczaniu populacji pierwotniaków jest niejednoznaczna i szeroko dyskutowana. Owce żywione bogatymi w saponiny owocami mydlnicy (*Spinadus saponaria*) charakteryzowały się wyraźnie ograniczoną liczebnością protistów w żwaczu (Diaz i in., 1994). Podobne działanie powodował metanolowy ekstrakt z owoców my-

dleńca (*Spinadus rarak*), który ograniczał populację tych mikroorganizmów o 57% (Thalib i in., 1995). Bogate w saponiny liście turi (*Sesbania sesban*) i liście *E. cyclocarpum* wyraźnie hamowały aktywność pierwotniaków w warunkach *in vitro* oraz ograniczały ich liczebność w żwaczu owiec, przy czym te ostatnie znacznie obniżały ogólną strawność (Goel i in., 2008; Koenig i in., 2007). Z kolei, Odenyo i in. (1997) w eksperymentach przeprowadzonych w Etiopii nie stwierdzili żadnego negatywnego efektu skarmiania owiec *S. sesban* na faunę protistów ich żwacza, jednak gdy liście podano bezpośrednio przez przetokę żwaczową, liczba pierwotniaków znacząco malała. Teferedegne i in. (1999) zaobserwowali, że te same izolaty saponin z *S. sesban* skutecznie hamowały rozwój protistów u owiec w Wielkiej Brytanii, natomiast praktycznie nie działały na mikroflorę żwacza u owiec pochodzących z Etiopii. To może wskazywać na pewne mechanizmy wykształcania odporności na działanie saponin w faunie pierwotniaków u zwierząt narażonych na ciągły kontakt z konkretnym rodzajem saponin. Krótki i przemijający efekt ograniczenia populacji protistów u owiec przez saponiny zawarte w liściach guanacaste (*Enterolobium cyclocarpum*) zaobserwowali także w swoich badaniach Ivan i in. (2004). Może to sugerować, że saponiny są w stanie ograniczać liczbę pierwotniaków tylko na początku ich podawania w diecie, po czym mikrobiom żwacza jest w stanie rozkładać niepożądane substancje. Ponadto, zawarte w ślinie enzymy mogą także rozkładać saponiny, co udaremnia ich działanie przeciwko protistom w żwaczu.

Olejki eteryczne są ciekłymi, lotnymi substancjami zapachowymi, występującymi w roślinach z rodziny sosnowatych (*Pinaceae*), jasnotowatych (*Lamiaceae*), mirtowatych (*Myrtaceae*), rutowatych (*Rutaceae*) i selerowatych (*Apiaceae*). Są mieszaniną różnych związków chemicznych, takich jak: aldehydy, alkohole, estry, ketony, laktony, terpeny oraz innych związków organicznych zawierających azot i siarkę (amin i tioli). Właściwości olejków są sil-

nie zależne od ich struktury chemicznej, metody otrzymywania oraz warunków przechowywania. Generalnie, olejki eteryczne charakteryzują się aktywnością bakteriobójczą i/lub bakteriostatyczną, ale szczegółowy mechanizm ich działania nie jest w pełni poznany i prawdopodobnie uzależniony od ich składu i właściwości (Benchaar i Greathead, 2011).

Badania nad wpływem aktywności olejków eterycznych na mikrobiom żwacza wykazywały ich skuteczność w ograniczaniu populacji niektórych bakterii i archeowców, zmniejszaniu emisji metanu, zwiększaniu produkcji kwasu propionowego oraz białka bakteryjnego (Lin i in., 2013). Skuteczność olejków eterycznych w odniesieniu do redukcji populacji lub eliminowania protistów ze żwacza jest niejednoznaczna. Większość prac wskazuje na brak ich wpływu na te mikroorganizmy (Khateri i in., 2017; Mohamadi i in., 2017). Jednakże, Ando i in. (2003) donosili, że dodatek mięty pieprzowej do paszy ograniczał liczebność protistów z rodzajów *Entodinum*, *Isotricha* i *Diplodium*. Cardozzo i in. (2006) również obserwowali wybiórcze działanie aldehydu cynamonowego, eugenolu i anetolu (olejku anyżowego) w stosunku do niektórych pierwotniaków. Talebzadeh i Alipour (2013) wskazywali natomiast na silne działanie olejku z chropawca wonnego (*Carum copticum*) na obniżenie liczebności fauny protistów u owiec.

Niektóre z olejków eterycznych, klasyfikowanych także jako związki siarkoorganiczne, np. wyciągi z czosnku lub też elementy samej rośliny w badaniach *in vitro* ograniczały w zdecydowany sposób populację protistów oraz powodowały wzrost liczby bakterii w żwaczu, a w badaniach *in vivo* silnie ograniczały liczebność metanogenów (Soliva i in., 2011). Patra i Yu (2015) w badaniach prowadzonych *in vitro* stwierdzili, że dodanie do paszy czosnku w znaczący sposób zmniejszyło emisję metanu, jednak nie wpłynęło na populację protistów.

Dodatki paszowe charakteryzujące się wysoką zawartością tłuszczu (nasiona słonecznika, lnu) lub dodatek olejów roślinnych do pa-



szy (rzepakowy, lniany, kokosowy, palmowy) uważane są za tani i skuteczny środek eliminacji lub kontroli liczebności żwaczowych protistów u owiec (Ivan i in., 2004; Váradyová i in., 2007; Slavov i in., 2012). Wencelová i in. (2016) w badaniach na owcach nie stwierdzili negatywnego wpływu skarmiania bogatego w tłuszcz ziarna słonecznika na populację protistów w żwaczu. Váradyová i in. (2007) odnotowali natomiast, że dodatek oleju lnianego do paszy obniżał liczebność populacji protistów w żwaczu owiec, podczas gdy olej rzepakowy nie wpływał na poziom tych organizmów.

Występujące w żwaczu pierwotniaki zawierają proporcjonalnie więcej nienasyconych kwasów tłuszczowych niż bakterie, więc stosowanie w diecie olejów lub nasion roślin oleistych bogatych w nienasycone kwasy tłuszczowe nie ma na nie tak negatywnego działania jak na bakterie, zwłaszcza celuloityczne (Devillard i in., 2006). Pierwotniaki występujące w żwaczu są w stanie dodatkowo wbudować w swój organizm wielonienasycone kwasy tłuszczowe pochodzące z tłuszczu paszowego, które w dalszych etapach trawienia mogą w stanie niezmiennym trafić do tłuszczu mleka czy tłuszczu śródmięśniowego i przyczynić się tym samym do podniesienia wartości zdrowotnych produktów pozyskiwanych od zwierząt przeżuwających (Slavov i in., 2012; Ivan i in., 2004).

Kwasy huminowe są mieszaniną substancji organicznych znajdujących się w glebie, powstałych w procesie mikrobiologicznego rozkładu materii organicznej. Charakteryzuje je wysoka masa cząsteczkowa, wynosząca od 5000 do 10 000 Da. Kwasy te mogą być używane jako naturalne antybiotyki, wpływające korzystnie na wzrost przeżuwaczy. Mają one działanie bakteriostatyczne i bakteriobójcze, a także silną zdolność do wiązania azotu, przez co mogą być wykorzystywane do poprawy syntezy białka bakteryjnego w żwaczu oraz ograniczenia emisji metanu i amoniaku (Váradyová i in., 2009).

Wpływ dodatku kwasów huminowych na liczebność protistów nie jest dokładnie poznany.

W jednych badaniach duże dawki tych kwasów ograniczały ich populację, w innych natomiast powodowały wzrost liczebności pierwotniaków. Dodatek kwasów huminowych w większym stopniu oddziałuje na wzrost aktywności bakterii celuloitycznych, co przekłada się na lepsze wykorzystanie paszy przez zwierzęta przeżuwające (Galip i in., 2010; Váradyová i in., 2009).

Do poprawy aktywności mikrobiomu żwacza mogą przyczyniać się stosowane od lat w żywieniu przeżuwaczy różne szczepy drożdży. Mechanizm ich działania polega głównie na poprawie warunków funkcjonowania organizmów beztlenowych poprzez usuwanie tlenu z płynu żwaczowego (Newbold i in., 1996).

W wielu badaniach prowadzonych na różnych gatunkach przeżuwaczy wskazywano, że drożdże stosowane jako dodatek do dawek pokarmowych bogatych w pasze objętościowe mogą powodować wzrost liczebności protistów. U owiec żywionych paszą z dodatkiem drożdży w ilości 5 g dziennie istotnie wzrastała liczebność *Dasytrichia*, natomiast przy dawce 10 g dziennie istotnie spadała liczebność populacji *Epidinium* (Galip, 2006). Według Arakaki i in. (2000), dodatek drożdży do paszy bydła zebu także powodował spadek liczebności jednych gatunków i wzrost innych gatunków pierwotniaków. Mathieu i in. (1996) u owiec suplementowanych niewielkimi dawkami drożdży obserwowali nieistotny trend wzrostu liczebności protistów, ze szczególnym uwzględnieniem jednego z gatunków, jakim był *Epidinium*. Z kolei Sales (2011) nie stwierdził istotnego wpływu dodatku drożdży do paszy dla owiec na liczebność populacji protistów w żwaczu.

### Podsumowanie

Zastosowanie w diecie owiec naturalnych substancji w postaci tanin, saponin i olejków eterycznych może skutecznie zredukować populację protistów w żwaczu. Zbyt wysoki udział tych związków w dawce pokarmowej może jednak powodować eliminowanie z mikrobiomu żwacza niezbędnych bakterii celuloitycznych.

Nasiona roślin oleistych, oleje roślinne

lub różnego rodzaju produkty uboczne z produkcji tłuszczów roślinnych zastosowane w żywieniu owiec mogą również bardzo skutecznie wyeliminować lub ograniczyć faunę protistów. Należy jednak pamiętać, że zbyt duża ilość tłuszczu w diecie przeżuwaczy może poprzez zmniejszenie liczebności bakterii celuloリティcznych przyczynić się do obniżania strawności.

Dodatki paszowe, takie jak kwasy humusowe czy drożdże, z powodu sprzecznych i niepełnych doniesień dotyczących ich działania redu-

kującego lub eliminującego populację protistów trudno traktować jako rzeczywiste środki powodujące defaunację, chociaż ich zastosowanie nie jest bez znaczenia dla poprawy funkcjonowania żwacza oraz lepszego przyswajania paszy.

Istotny jest fakt, że naturalne substancje ograniczające populację protistów w żwaczu owiec i innych przeżuwaczy, poza poprawą funkcjonowania żwacza, mogą przyczynić się także do zmniejszenia produkcji metanu, co może być ważne z punktu widzenia ochrony środowiska.

### Literatura

- Abdullah M.A.M., Farghaly M.M., Youssef I.M.I. (2018). Effect of feeding *Acacia nilotica* pods to sheep on nutrient digestibility, nitrogen balance, ruminal protozoa and rumen enzymes activity. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 102: 662–669.
- Ando S., Nishida T., Ishida M., Hosoda K., Bayaru B. (2003). Effect of peppermint feeding on the digestibility, ruminal fermentation and protozoa. *Livest. Prod. Sci.*, 82: 245–248.
- Arakaki L.C., Stahringer R.C., Garrett J.E., Dehority B.A. (2000). The effects of feeding monensin and yeast culture, alone or in combination, on the concentration and generic composition of rumen protozoa in steers fed on low-quality pasture supplemented with increasing levels of concentrate. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 84: 121–127.
- Belżeczki G., Michałowski T. (2005). Effect of selected rumen fauna on the digestion of starch and outflow of a-glucose polymers from the reticulo-rumen of sheep. *J. Anim. Feed Sci.*, 14: Suppl., 1: 215–218.
- Benchaar C., Greathead H. (2011). Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 166–167: 338–355.
- Bodas R., Prieto N., García-González R., Andrés S., Giráldez F.J., López S. (2012). Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 176: 78–93.
- Cardozzo P.W., Calsamiglia S., Ferret A., Kamel C. (2006). Effects of alfalfa extract, anise, capsicum and a mixture of cinnamaldehyde and eugenol on ruminal fermentation and protein degradation in beef heifers fed a high-concentrate diet. *J. Anim. Sci.*, 84: 2801–2808.
- Carulla J.E., Kreuzer M., Machmüller A., Hess H.D. (2005). Supplementation of *Acacia mearnsii* tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. *Austral. J. Agric. Res.*, 56: 961–970.
- Castillo-González A.R., Burrola-Barraza M.E., Domínguez-Viveros J., Chávez-Martínez A. (2014). Rumen microorganisms and fermentation. *Arch. Med. Vet.*, 46: 349–361.
- Cedrola F., Martinele I., Dias R.J.P., Fregulia P., D'Agosto M. (2016). Rumen ciliates in Brazilian sheep (*Ovis aries*), with new records and redescription of *Entodinium contractum*. *Zootaxa*, 4088: 292–300.
- Devillard E., McIntosh M.F., Newbold C.J., Wallace R.J. (2006). Rumen ciliate protozoa contain high concentrations of conjugated linoleic acids and vaccenic acid, yet do not hydrogenate linoleic acid or desaturate stearic acid. *Brit. J. Nutr.*, 96: 697–704.
- Diaz A., Avendan O.M., Escobar A. (1994). Evaluation of *Spinadus saponaria* as a defaunating agent and its effects on different ruminal digestion parameters. *Liv. Res. Rural Develop.*, 5: 1–10.
- Francis G., Kerem Z., Makkar H.P.S., Becker K. (2002). The biological action of saponins in animal systems:

- a review. *Brit. J. Nutr.*, 88: 587–605.
- Freitas C.E.S., Duarte E.R., Alves D.D., Martinele I., D’Agosto M., Cedrola F., de Moura Freitas A.A., dos Santos Soares F.D., Beltran M. (2017). Sheep fed with banana leaf hay reduce ruminal protozoa population. *Tropic. Anim. Health Prod.*, 49: 807–812.
- Galip N. (2006). Effect of supplemental yeast culture on ruminal protozoa and blood parameters in rams. *Rev. Méd. Vét.*, 157: 519–524.
- Galip N., Polat U., Biricik H. (2010). Effects of supplemental humic acid on ruminal fermentation and blood variables in rams. *Italian J. Anim. Sci.*, 9: e74.
- Goel G., Makkar H.P.S., Becker K. (2008). Effects of *Sesbania sesban* and *Carduus pycnocephalus* leaves and fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) seed and their extracts on partitioning of nutrients from roughage- and concentrate-based feeds to methane. *Anim. Feed Sci. Techn.*, 147: 72–89.
- Gürelli G. (2017). Rumen ciliate fauna of domestic sheep (*Ovis aries*) in Izmir, Turkey and scanning electron microscopic observations. *Zootaxa*, 4286: 545–554.
- Hackmann T.J., Spain J.N. (2010). Ruminant ecology and evolution: perspectives useful to ruminant livestock research and production. *J. Dairy Sci.*, 93: 1320–1334.
- Hegarty R.S., Bird S.H., Vanselow B.A., Woodgate R. (2008). Effects of the absence of protozoa from birth or from weaning on the growth and methane production of lambs. *Brit. J. Nutr.*, 100: 1220–1227.
- Ivan M., Entz T. (2004). Use of dietary tea seeds to manipulate the rumen ciliate protozoa population in sheep. *Canadian J. Anim. Sci.*, 84: 731–735.
- Ivan M., Neill L., Entz T. (2000). Ruminal fermentation and duodenal flow following progressive inoculations of fauna-free wethers with major individual species of ciliate protozoa or total fauna. *J. Anim. Sci.*, 78: 750–759.
- Ivan M., Mir P.S., Mir Z., Entz T., He M.L., McAllister T.A. (2004). Effects of dietary sunflower seeds on rumen protozoa and growth of lambs. *Brit. J. Nutr.*, 92: 303–310.
- Kamra N.D. (2005). Rumen microbial ecosystem. *Current Sci.*, 89: 124–135.
- Khateri N., Azizi O., Jahani-Azizabadi H. (2017). Effects of a specific blend of essential oils on apparent nutrient digestion, rumen fermentation and rumen microbial populations in sheep fed a 50:50 alfalfa hay: concentrate diet. *Asian-Austr. J. Anim. Sci.*, 30: 370–378.
- Kittelmann S., Janssen P.H. (2011). Characterization of rumen ciliate community composition in domestic sheep, deer, and cattle feeding on varying diets, by means of PCR-DGGE and clone libraries. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 75: 468–481.
- Koenig K.M., Ivan M., Teferedegne B.T., Morgavi D.P., Rode L.M., Ibrahim I.M., Newbold C.J. (2007). Effect of dietary *Enterolobium cyclocarpum* on microbial protein flow and nutrient digestibility in sheep maintained fauna-free, with total mixed fauna or with *Entodinium caudatum* monofauna. *Brit. J. Nutr.*, 98: 504–516.
- Lin B., Lu Y., Salem A.Z.M., Wang F.H., Liang Q., Liu J.X. (2013). Effects of essential oil combinations on sheep ruminal fermentation and digestibility of a diet with fumarate included. *Anim. Feed Sci. Techn.*, 184: 24–32.
- Makkar H.P.S., Becker K., Abel H.J., Szegletti C. (1995). Degradation of condensed tannins by rumen microbes exposed to quebracho tannins (QT) in rumen simulation technique (RUSITEC) and effects of QT on fermentation processes in the RUSITEC. *J. Sci. Food Agric.*, 69: 495–500.
- Mathieu F., Jouany J.P., Senaud J., Bohatier J., Bertin G., Mercier M. (1996). The effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* on fermentations in the rumen of faunated and defaunated sheep; protozoal and probiotic interactions. *Reprod. Nutr. Develop.*, 36: 271–287.
- Michałowski T., Bełżęcki G., Kwiatkowska E., Pająk J.J. (2003). The effects of selected rumen fauna on fibrolytic enzyme activities, bacterial mass, fibre disappearance and fermentation pattern in sheep. *J. Anim. Feed Sci.*, 12: 45–64.

- Mohamadi R., Rahchamani R., Ghanbari F., Farivar F. (2017). Peppermint and pennyroyal essential oil effect on performance, rumen microbial population and some blood parameters of sheep. *Iranian J. Vet. Med.*, 11: 75–84.
- Morgavi D.P., Forano E., Martin C., Newbold C.J. (2010). Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal*, 4: 1024–1036.
- Newbold C.J., Wallace R.J., McIntosh F.M. (1996). Mode of action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants. *Brit. J. Nutr.*, 76: 249–261.
- Newbold C.J., Fuente G. de la, Belanche A., Ramos-Morales E., McEvan N.R. (2015). The role of ciliate Protozoa in the rumen. *Front Microbiol.*, 6 (Suppl. 1): doi.org/10.3389/fmicb.2015.01313.
- Nguyen S.H., Bremner G., Cameron M., Hegarty R.S. (2016). Methane emissions, ruminal characteristics and nitrogen utilisation changes after refaunation of protozoa-free sheep. *Small Rumin. Res.*, 144: 48–55.
- Odenyo A.A., Osuji P.O., Karanfil O. (1997). Effect of multipurpose tree (MPT) supplements on ruminal ciliate protozoa. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 67: 169–180.
- Patra A.K., Saxena J. (2010). A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry*, 71: 1198–1222.
- Patra A.K., Yu Z. (2015). Effects of adaptation of *in vitro* rumen culture to garlic oil, nitrate, and saponin and their combinations on methanogenesis, fermentation, and abundances and diversity of microbial populations. *Front Microbiol.*, 6: 1434.
- Salem A.Z.M., Robinson P.H., López S., Gohar Y.M., Rojo R., Tinoco J.L. (2010). Sensitivity of sheep intestinal lactic acid bacteria to secondary compounds extracted from *Acacia saligna* leaves. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 161: 85–93.
- Sales J. (2011). Effects of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on ruminal parameters, nutrient digestibility and growth in sheep: a meta-analysis. *Small Rumin. Res.*, 100: 19–29.
- Schofield P., Mbugua D.M., Pell A.N. (2001). Analysis of condensed tannins: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 91: 21–40.
- Slavov T., Radev V., Tchobanova S. (2012). Effects of dietary palm oil supplementation on some ruminal parameters and weight development of yearling sheep. *Agric. Sci. Technol.*, 4: 365–367.
- Smith A.H., Zoetendal E., Mackie R.I. (2005). Bacterial mechanisms to overcome inhibitory effects of dietary tannins. *Microb. Ecol.*, 50: 197–205.
- Soliva C.R., Amelchanka S.L., Duval S.M., Kreuzer M. (2011). Ruminal methane inhibition potential of various pure compounds in comparison with garlic oil as determined with a rumen simulation technique (Rusitec), 106: 114–122.
- Talebzadeh R., Alipour D. (2013). The effect of ajowan (*Carum copticum* L.) essential oils on eukaryotic ruminal microorganisms of Mehraban sheep. *Iranian J. Microbiol.*, 5: 418–421.
- Tan H.Y., Sieo C.C., Abdullah N., Liang J.B., Huang X.D., Ho Y.W. (2011). Effects of condensed tannins from *Leucaena* on methane production, rumen fermentation and populations of methanogens and protozoa *in vitro*. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 169: 185–193.
- Teferedegne B., McIntosh F., Osuji P.O., Odenyo A., Wallace R.J., Newbold C.J. (1999). 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.*, 78: 11–20.
- Thalib A., Widiawati Y., Hamid H., Suherman D., Sabrani M. (1995). The effect of saponins from *Spinadus rarak* fruit on rumen microbes and host animal growth. *Annal. de Zoot.*, 44: 161.
- Váradyová Z., Kišidayová S., Siroka P., Jalč D. (2007). Fatty acid profiles of rumen fluid from sheep fed diets supplemented with various oils and effect on the rumen ciliate population. *Czech J. Anim. Sci.*, 52: 399–406.
- Váradyová Z., Kisidayová S., Jalč D. (2009). Effect of humic acid on fermentation and ciliate protozoan population



- in rumen fluid of sheep *in vitro*. J. Sci. Food Agric., 89: 1936–1941.
- Vasta V., Yanez-Ruiz D.R., Mele M., Serra A., Luciano G., Lanza M., Biondi L., Priolo A. (2010). Bacterial and protozoa communities and fatty acid profile in the rumen of sheep feed a diet containing added tannins. Appl. Environ. Microbiol., 76: 2549–2555.
- Wencelová M., Váradyová Z., Pristaš P., Čobanová K., Plachá I., Kišidayová S. (2016). Effects of diet supplementation with herbal blend and sunflower seeds on fermentation parameters, microbial population, and fatty acid profile in rumen of sheep. Czech J. Anim. Sci., 61: 551–559.
- Williams A.G., Coleman G.S. (1992). The rumen protozoa. New York, Springer-Verlag.
- Zeitz J.O., Amelchanka S.L., Michałowski T., Wereszka K., Meile L., Hartnack S., Kreuzer M., Soliva C.R. (2012). Effect of the rumen ciliates *Entodinium caudatum*, *Epidinium ecaudatum* and *Eudiplodinium maggi*, and combinations thereof, on ruminal fermentation and total tract digestion in sheep. Archiv. Anim. Nutr., 66: 180–199.

## NATURAL NUTRITIONAL SUBSTANCES RESTRICTING THE DEVELOPMENT OF PROTISTS IN THE RUMEN OF SHEEP

### Summary

Protozoa represent up to 40–50% of the biomass of all organisms in the rumen of the ruminant. The taxonomic structure of protists is strongly associated with the animal species and type of the diet. Rumen protists are not essential for normal life processes of ruminants but also play an important role in digestion and rumen ecosystem homeostasis. The negative side of the presence of protozoa in the rumen is their effect on reducing the absorption of bacterial protein and promoting the production of methane.

The natural active substances of plant origin like saponins, tannins and essential oils limit the development of protists in the rumen. A significant impact on these microorganisms can be also exerted by fat, humic acids and yeast. The use of these active plant substances and oilseeds or oils in the diet may effectively reduce the population of protists in the rumen of sheep and contribute to reducing the methane emissions while maintaining the proper functioning of rumen bacteriocoenosis. Feed additives such as humic acids or yeast due to the ambiguity of their action in reducing or eliminating the protist population are difficult to treat as real defaunation agents.

**Key words:** sheep, rumen, protists, natural nutritional substances



Owce wrzosówki – *Wrzosówka sheep*  
(fot. Kawęcka)