



**Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach**

Mgr Paulina Szulc

*Poziom produkcji metanu oraz stopień biouwodorowania
nienasyconych kwasów tłuszczowych w żwaczu jagniąt
otrzymujących dodatki nośników biologicznie aktywnych
substancji*

*Methane production and biohydrogenation of unsaturated fatty
acids in the rumen of lambs feeding additives with biologically
active substances*

Praca doktorska wykonana w Katedrze Żywienia Zwierząt

Promotor: prof. dr hab. Adam Cieślak

Dziedzina: Nauki rolnicze

Dyscyplina: Zootechnika i rybactwo

Poznań 2024

Narodowe Centrum Nauki sfinansowało część badań eksperymentalnych w ramach rozprawy doktorskiej w ramach grantu OPUS (No. **2016/23/B/NZ9/03427**)



Research grant no. 2016/23/B/NZ9/03427

Praca finansowana w ramach projektu badawczego Narodowego Centrum Nauki 2016/23/B/NZ9/03427 oraz ze środków Słowackiej Agencji Badań i Rozwoju (APVV 18-0131, APVV 17-0297) oraz przez Polskie Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach programu: „Regionalna Inicjatywa Doskonałości” w latach 2019-2022, projekt nr 005/RID/2018/19.”

Spis publikacji składających się na rozprawę doktorską

1. P. Szulc, D. Mravčáková, M. Szumacher-Strabel, Z Váradyová, M. Várady, K. Čobanová, L. Syahrulawal, A.K. Patra, A Cieslak. Ruminal fermentation, microbial population and lipid metabolism in gastrointestinal nematode-infected lambs fed a diet supplemented with herbal mixtures. 2020. *PLoS One*, 15(4).

Impact Factor 2-letni = 3.582

Impact Factor 5-letni = 3.272

liczba punktów MNiSW = 100

2. P. Szulc, B. Nowak, M.U. Hassan, D. Lechniak, S. Ślusarczyk, J. Bocianowski, M. Szumacher-Strabel, A.K. Patra, A. Cieslak. Potential of paulownia leaves silage in lamb diet to improve ruminal fermentation and fatty acid profile – an in vitro study. 2024. *Annals of Animal Science*, 24(1).

Impact Factor 2-letni = 2.527

Impact Factor 5-letni = 2.529

liczba punktów MNiSW = 140

Spis treści

Zastosowane skróty.....	6
Streszczenie.....	7
Abstract.....	8
1. Wstęp	9
1.1. Metan	10
1.1.1. Metanogeneza i jej rola w żwaczu	11
1.2. Biouwodorowanie.....	12
1.2.1. Modulowanie procesu biouwodorowania.....	15
1.2.1.1. Kwasy tłuszczowe- wzbogacanie wartości odżywczej mięsa	16
1.3. Wtórne metabolity roślinne	17
1.3.1. Biologicznie aktywne substancje roślinne a liczebność i aktywność mikroorganizmów żwacza.....	17
2. Hipoteza badawcza	20
3. Cel badawczy	21
4. Materiał i metody.....	22
4.1. Doświadczenia w ramach I cyklu badań	23
4.1.1. Materiał doświadczalny.....	23
4.1.2. Układ doświadczenia w ramach I cyklu badań	24
4.1.3. Doświadczenie w warunkach <i>in vivo</i> w ramach I cyklu	27
4.2. Doświadczenie w ramach II cyklu badań	28
4.2.1. Materiał doświadczalny.....	28
4.2.2. Doświadczenie w warunkach <i>in vitro</i> w ramach II cyklu badań - <i>batch culture</i>	31
4.3. Metody analityczne.....	32
4.3.1. Skład podstawowy pasz	32
4.3.2. Określenie składu i zawartości substancji bioaktywnych	33
4.3.3. Wartość pH i koncentracja amoniaku	34
4.3.4. Strawność suchej masy <i>in vitro</i> (IVDMD)	34
4.3.5. Lotne kwasy tłuszczowe.....	34
4.3.6. Długołańcuchowe kwasy tłuszczowe.....	35
4.3.7. Liczebność pierwotniaków, bakterii i metanogenów	36
4.3.8. Analiza DNA bakterii biorących udział w procesie biouwodorowania..	37
4.3.9. Produkcja metanu	38
4.4. Obliczenia	39
4.5. Analiza statystyczna	39
5. Wyniki	40
5.1. Doświadczenie w warunkach <i>in vitro</i> w ramach I cyklu.....	40
5.1.1. Wpływ mieszanek ziołowych i zakażenia <i>Haemonchus contortus</i> na podstawowe parametry żwacza	40
5.1.2. Wpływ mieszanek ziołowych i zakażenia <i>Haemonchus contortus</i> na populację mikroorganizmów bytujących w żwaczu.....	40
5.1.3. Wpływ mieszanek ziołowych i zakażenia <i>Haemonchus contortus</i> na profil wybranych kwasów tłuszczowych w buforowanym płynie żwacza	41

5.2. Doświadczenie w warunkach <i>in vivo</i> w ramach I cyklu badań	45
5.2.1. Wpływ mieszanek zielonych na podstawowe parametry żwacza, populację mikroorganizmów oraz profil wybranych kwasów tłuszczowych w płynie żwacza u jagniąt zainfekowanych pasożytem <i>Haemonchus</i> <i>contortus</i>	45
5.3. Doświadczenie w warunkach <i>in vitro</i> w ramach II cyklu badań	49
5.3.1. Wpływ kiszonki z paulowni na podstawowe parametry żwacza	49
5.3.2. Wpływ kiszonki z paulowni na mikroorganizmy bytujące w żwaczu	49
5.3.3. Wpływ kiszonki z paulowni na profil wybranych kwasów tłuszczowych	50
6. Dyskusja.....	54
7. Wnioski.....	61
8. Bibliografia	62
9. Spis schematów i tabel.....	75

Zastosowane skróty (w porządku alfabetycznym)

ANOVA- jednoczynnikowa analiza wariancji
AOAC- ang. association of official analytical chemists
ASW- antybiotykowe stymulatory wzrostu
ATP- adenozy-no-5'-trifosforan
CLA- izomery kwasu linolowego
CN- grupa kontrolna niezainfekowana
CON- Kontrola zawierająca 100% kiszonki z lucerny
DAPI- 4',6-diamidyno-2-fenylindol
FAME- ang. fatty acids methyl ester
FID- flame ionization detector
FISH- fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*
IVDMD- strawność suchej masy *in vitro*
KT- kwasy tłuszczowe
LKT- lotne kwasy tłuszczowe
MANOVA- wieloczynnikowa analiza wariancji
MCFA- średniołańcuchowe kwasy tłuszczowe
NP- grupa niezainfekowana pasożytem
PBS- bufor fosforanowy
PLS- kisonka z liści paulowni
PUFA- wielonienasycone kwasy tłuszczowe
SFA- nasycone kwasy tłuszczowe
SM- sucha masa
UFA- nienasycone kwasy tłuszczowe
UHRMS- ang. ultra high-resolution mass spectrometry
VFA- ang. volatile fatty acids
ZP- grupa zainfekowana pasożytem

Streszczenie

Temat: Poziom produkcji metanu oraz stopień biouwodorowania nienasyconych kwasów tłuszczowych w żwaczu jagniąt otrzymujących dodatki nośników biologicznie aktywnych substancji

W badaniach do niniejszej pracy doktorskiej wykorzystano dodatek mieszanin ziół (MIX 1 i MIX 2), oraz dodatek kiszonki z paulowni. Celem pracy była ocena możliwości zastosowania dodatku nośników biologicznie aktywnych substancji jako komponentów dawki pokarmowej stosowanej w żywieniu jagniąt, w aspekcie modulowania procesu metanogenezy oraz biouwodorowania nienasyconych kwasów tłuszczowych w żwaczu.

W etapie I badań przeprowadzono zarówno krótkoterminową fermentację *in vitro-batch culture* w celu zbadania wpływu MIX 1 i MIX 2 zarówno na zakażenie pasożytem *Haemonchus contortus*, jak i na podstawowe parametry płynu żwacza. W uzyskanych wynikach nie zaobserwowano istotnych w procesie produkcji metanu, za to zaobserwowano zmiany w koncentracji lotnych kwasów tłuszczowych oraz strawności suchej masy. Na podstawie uzyskanych wyników, przeprowadzono badania *in vivo*. W badaniach tych wykorzystano 24 jagnięta o początkowej średniej masie ciała $11,7 \pm 1,23$ kg. Owce podzielono losowo na 4 grupy (n=6): grupa niezainfekowana kontrolna (CN), grupa zainfekowana pasożytem *H. contortus* żywiona dietą kontrolną oraz dwie grupy niezainfekowane żywione dietą kontrolną z dodatkiem MIX 1 lub MIX 2. Jagnięta żywiono dawką podstawową złożoną z siana łąkowego *ad libitum* i komercyjnej paszy treściwej w ilości 500 g suchej masy. W doświadczeniu *in vitro* i *in vivo* wykorzystano te same pasze oraz dodatki mieszanek ziołowych.

W II cyklu badań przeprowadzono krótkoterminową fermentację *in vitro*, w celu zbadania wpływu kiszonki z paulowni na proces metanogenezy i biouwodorowania nienasyconych kwasów tłuszczowych. Płyn żwacza pobrano od 4 jagniąt, który zbuforowano. Przetestowano 5 grup: grupę kontrolną (100% kiszonki z lucerny), grupę doświadczalną 1 (25% kiszonki z paulowni: 75% kiszonki z lucerny), grupę doświadczalną 2 (50% kiszonki z paulowni: 50% kiszonki z lucerny), grupę doświadczalną 3 (75% kiszonki z paulowni: 25% kiszonki z lucerny), grupę doświadczalną 4 (100% kiszonki z paulowni).

Wyciągnięto następujące wnioski: 1) Kiszonka z liści paulowni wykazała wyraźny potencjał w ograniczaniu populacji metanogenów i redukcji emisji metanu w warunkach *in vitro*. Zawarte w niej polifenole i flawonoidy, takie jak luteolina i acetozid, wykazują zdolność bezpośredniego oddziaływania na mikroflorę żwacza, przyczyniając się do zahamowania procesów metanogenezy. Wyniki te potwierdzają skuteczność biologicznie aktywnych substancji w modulacji procesów fermentacyjnych w żwaczu.

2) Zaobserwowane w badaniach z udziałem kiszonki z paulowni zwiększenie zawartości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA), w tym kwasu α -linolenowego (C18:3 n-3), sugeruje, że biologicznie aktywne substancje mogą modulować procesy biouwodorowania w żwaczu. Mechanizm ten polega prawdopodobnie na hamowaniu aktywności mikroorganizmów odpowiedzialnych za nasycanie nienasyconych wiązań tłuszczowych, co prowadzi do zwiększonej retencji PUFA w środowisku żwacza.

3) W przypadku mieszanek ziołowych (MIX 1 i MIX 2, 100 g SM/ dzień) uzyskane efekty były mniej wyraźne. Choć zaobserwowano zmniejszenie populacji metanogenów, redukcja emisji metanu oraz zmiany w profilu kwasów tłuszczowych były ograniczone. Przyczyną może być zbyt niska dawka bioaktywnych substancji w tych mieszkankach lub ich niewystarczający wpływ na mikroorganizmy zaangażowane w procesy biouwodorowania. Wyniki te wskazują na potrzebę dalszych badań w kierunku optymalizacji składu i dawek mieszanek ziołowych, aby w pełni wykorzystać ich potencjał w zrównoważonej produkcji zwierzęcej.

Słowa kluczowe: mieszanina ziół, kiszonka z liści paulowni, przeżuwacze, mięso, gazy cieplarniane, *in vitro*

Abstract

Title: Methane production and biohydrogenation of unsaturated fatty acids in the rumen of lambs feeding additives with biologically active substances

In the research for this doctoral thesis, herbal mixtures (MIX 1 and MIX 2) and Paulownia silage were used. The work aimed to assess the possibility of adding carriers of biologically active substances as components of the feed ration used in lamb feeding to modulate the methanogenesis and biohydrogenation of unsaturated fatty acids in the rumen.

In the first stage of the research, short-term *in vitro* fermentation batch culture was carried out to examine the effect of MIX 1 and MIX 2 on both the infection with the *Haemonchus contortus* parasite and the basic parameters of the rumen fluid. The results did not show any significant impact on methane production, however, changes in the concentration of volatile fatty acids and dry matter digestibility were observed.

24 lambs with an initial mean body weight of 11.7 ± 1.23 kg were used for the *in vivo* study. The sheep were randomly divided into 4 groups (n=6): a non-infected control group (CN), a group infected with the *H. contortus* parasite fed a control diet, and two non-infected groups fed a control diet with the addition of MIX 1 or MIX 2. The lambs were fed a basic ration consisting of meadow hay *ad libitum* and commercial concentrate feed in the amount of 500 g dry matter. The same feeds and herbal mixtures were used in the *in vitro* and *in vivo* experiments.

In the second stage of the study, short-term *in vitro* fermentation was carried out to examine the effect of Paulownia silage on methanogenesis and biohydrogenation process of unsaturated fatty acids. Rumen fluid from 4 lambs (which were buffered) was used for the *in vitro* study. Five groups were tested: control group (100% alfalfa silage-AS), experimental group 1 (25% paulownia silage-PS: 75% AS), experimental group 2 (50% PS: 50% AS), experimental group 3 (75% PS: 25% AS), experimental group 4 (100% PS).

The following conclusions were drawn:

1) Paulownia leaf silage showed a clear potential in limiting the population of methanogens and reducing methane emissions *in vitro*. The polyphenols and flavonoids, such as luteolin and acetoside, can directly affect the rumen microflora, contributing to the inhibition of methanogenesis processes. These results confirm the effectiveness of biologically active substances in modulating fermentation processes in the rumen.

2) The increase in the content of polyunsaturated fatty acids (PUFA), including α -linolenic acid (C18:3 n-3), observed in studies involving Paulownia silage suggests that biologically active substances can modulate biohydrogenation processes in the rumen. This mechanism probably involves inhibiting the activity of microorganisms responsible for the saturation of unsaturated fatty bonds, which leads to increased PUFA retention in the rumen environment.

3) In the case of herbal mixtures (MIX 1 and MIX 2, 100 g DM/day), the effects obtained were less pronounced. Although a reduction in the methanogen population was observed, the reduction in methane emission and changes in the fatty acid profile were limited. The reason may be that the dose of bioactive substances in these mixtures is too low or that they have an insufficient effect on microorganisms involved in biohydrogenation processes. These results indicate the need for further research to optimize the composition and doses of herbal mixtures to exploit their potential in sustainable animal production fully.

Keywords: herbal mixture, Paulownia leaves silage, ruminants, meat, greenhouse gases, *in vitro*

1. Wstęp

Antybiotykiowe stymulatory wzrostu (ASW) były szeroko stosowane na świecie w celu modulacji procesów zachodzących w układzie pokarmowym zwierząt, w tym przeżuwaczy. Ich stosowanie przyczyniało się do poprawy wyników produkcyjnych oraz redukcji emisji metanu nawet o 25% (Beuchamin i wsp., 2009). W Polsce najczęściej stosowanymi ASW były: awoparcyna, monenzyna, flawofosfolipol, salinomycyna, spiramycyna, tylozyna, wirginiamycyna oraz bacytracyna (Grela i wsp., 2001).

Jednak niewłaściwe stosowanie ASW doprowadziło do rozwoju antybiotykoodporności i wzrostu liczby drobnoustrojów opornych na antybiotyki (Teuber, 2001). Ponadto okazało się, że ASW stosowane w produkcji zwierzęcej nie ulegały degradacji, lecz kumulowały się w tkankach i narządach, a także w produktach pochodzenia zwierzęcego, takich jak mleko, jaja czy miód. W związku z tym, w 2004 roku, na mocy traktatu akcesyjnego podpisanego 16 kwietnia 2003 roku w Atenach, Polska, przystępując do Unii Europejskiej, zobowiązała się do wprowadzenia zakazu stosowania ASW w żywieniu zwierząt.

Po wejściu Polski do UE intensyfikowano badania nad poszukiwaniem naturalnych substancji roślinnych o działaniu antymikrobiologicznym, które mogłyby zastąpić ASW (Drożdżyński i wsp., 2024). Naukowcy wciąż poszukują skutecznych nośników naturalnych, biologicznie aktywnych substancji, które mogłyby na szeroką skalę modulować procesy zachodzące w żwacu, takie jak ograniczanie powstawania metanu czy proces biouwodornienia, który redukuje ilość nasyconych kwasów tłuszczowych w mleku i mięsie (Toral i wsp., 2024; Hodge i wsp., 2024).

Prezentowana praca doktorska jest jedną z prób znalezienia skutecznego nośnika (dodatku paszowego lub komponentu dawki), który mógłby być wykorzystywany w żywieniu małych przeżuwaczy, efektywnie ograniczając proces metanogenezy oraz zmiany długołańcuchowych kwasów tłuszczowych w płynie żwacza. W konsekwencji, miałyby to prowadzić do zwiększenia zawartości nienasyconych kwasów tłuszczowych w mleku i mięsie.

1.1 Metan

Metan (CH_4) jest drugim najważniejszym gazem cieplarnianym (ang. *greenhouse gas*, GHG), zaraz po dwutlenku węgla (CO_2 ; Stocker i wsp., 2013). Źródła metanu mogą mieć charakter antropogeniczny lub naturalny. W ostatniej dekadzie emisja metanu do atmosfery była zdominowana przez emisję z sektora paliw kopalnych, rolnictwa oraz składowania odpadów (Stocker i wsp., 2013).

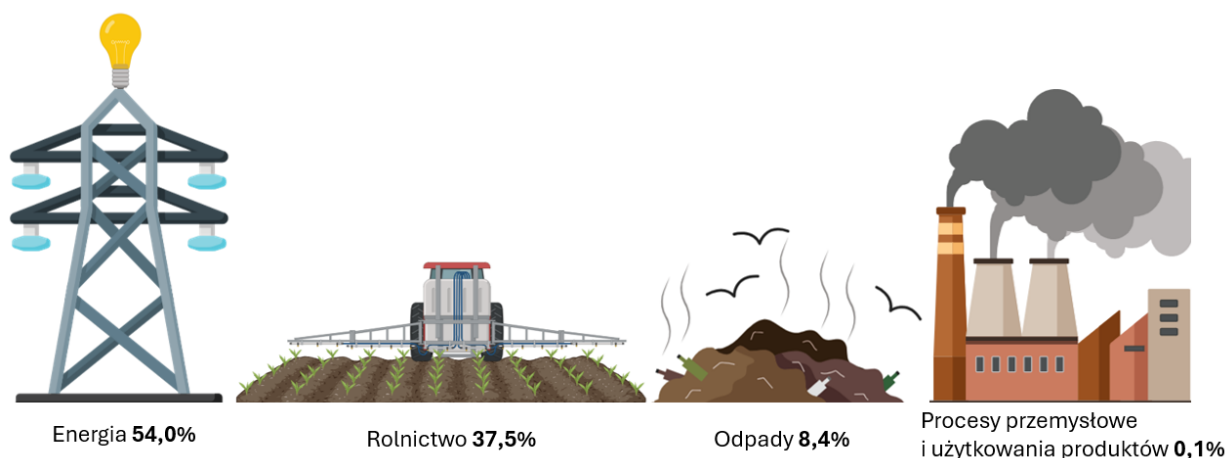
Zgodnie z Konwencją Narodów Zjednoczonych w sprawie zmian klimatu, podpisaną w 1992 roku oraz Protokołem z Kioto, państwa zobowiązały się do zgłaszania swoich rocznych emisji gazów cieplarnianych. W 2021 roku emisja metanu w Polsce wyniosła 42,7 miliona ton ekwiwalentu CO_2 (KOBiZE, 2023). Była ona o 1,1% niższa w porównaniu do roku 2020 (KOBiZE, 2023). Udział emisji metanu w całkowitej krajowej emisji gazów cieplarnianych w 2021 roku wynosił 10,7%.

Główne źródła emisji metanu w Polsce to:

- emisja lotna z paliw (44%),
- rolnictwo (37%),
- spalanie paliw (10%) (KOBiZE, 2023).

W sektorze rolniczym największym źródłem emisji metanu była fermentacja jelitowa, odpowiadająca za 34,2% całkowitej emisji tego gazu.

Poniżej przedstawiono schemat emisji metanu w poszczególnych sektorach gospodarki w Polsce w 2021 roku (Schemat 1).



Schemat 1. Emisja metanu (bez kategorii 4) w 2021 roku, w Polsce, na podstawie Krajowego Raportu Inwentaryzacyjnego (2023).

Dodatkowo, okres półtrwania metanu (CH_4) w atmosferze wynosi średnio 8,6 roku, co oznacza, że w tym czasie 50% CH_4 przekształca się w dwutlenek węgla (CO_2) i parę wodną. Jednocześnie większość CO_2 pozostaje w atmosferze przez kilka stuleci. W związku z tym zmniejszenie poziomu CH_4 w atmosferze może szybko złagodzić skutki globalnego ocieplenia, a nawet częściowo je odwrócić, pod warunkiem jednoczesnego zatrzymania emisji innych gazów cieplarnianych (Mitloehner i wsp., 2020).

Zmiana klimatu, wywołana emisją gazów cieplarnianych, stanowi pilny problem środowiskowy. Warto jednak podkreślić, że bez gazów cieplarnianych całe promieniowanie ciepłe zostałoby odbite, a Ziemia stałaby się zbyt zimna, by podtrzymać życie. Natomiast nadmiar tych gazów prowadzi do ocieplenia planety, co z kolei powoduje występowanie szeregu niebezpiecznych zjawisk pogodowych, takich jak susze czy „błyskawiczne powodzie” (Rising i wsp., 2022; Rahmani i Fattahi, 2024).

Dlatego społeczność międzynarodowa powinna podjąć intensywne działania na rzecz ograniczenia emisji gazów cieplarnianych, w tym również tych pochodzących z sektora rolnictwa (Nsabiyeze i wsp., 2024).

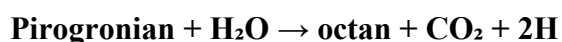
1.1.1 Metanogeneza i jej rola w żwaczu

Unikalnym środowiskiem, które nieustannie przyciąga uwagę badaczy, jest żwacz. Ten przedżołądek charakteryzuje się stosunkowo szybkim tempem pasażu paszy oraz produkcją znacznych ilości CO_2 i H_2 , które ostatecznie przekształcają się w CH_4 . Mikroorganizmy występujące w żwaczu, takie jak bakterie, pierwotniaki, grzyby beztlenowe oraz metanogeny, nie tylko fermentują substraty dostarczone z dawką pokarmową, lecz także biorą udział w tworzeniu CH_4 w procesie metanogenezy (Patra i wsp., 2017).

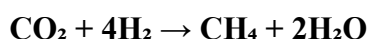
Najważniejszymi mikroorganizmami zaangażowanymi w ten proces są metanogeny, które mogą znajdować się zarówno w treści żwacza, jak i na powierzchni lub wewnątrz komórek pierwotniaków (Morgavi i wsp., 2010). W żwaczu do produkcji metanu wykorzystywane są trzy główne substraty: CO_2 , związki zawierające grupy metylowe oraz octan (Liu i Whitman, 2008). Podczas tworzenia cząsteczek CH_4 metanogeny redukują CO_2 za pomocą H_2 , uzyskując w tym procesie energię, którą wykorzystują do generowania ATP.

Proces metanogenezy odgrywa istotną rolę w utrzymaniu niskiego stężenia H_2 w żwaczu, co pozytywnie wpływa na przemiany węglowodanów oraz funkcjonowanie

innych grup mikroorganizmów prowadzących fermentację. Dzięki aktywności enzymów mikrobiologicznych podczas hydrolizy, cukry proste i złożone są rozkładane do cukrów pięcio- i sześciowęglowych. Następnie są one fermentowane do lotnych kwasów tłuszczowych w wieloetapowych szlakach metabolicznych, co można uprościć do następujących reakcji (Czerkawski, 1986; Moss i wsp., 2000):



W procesie metanogenezy wodór (H_2) jest najpierw przekształcany w formie cząsteczkowej przez enzym hydrogenazę, a następnie konwertowany do CH_4 przez metanogeny. Uproszczona reakcja tego procesu przedstawia się następująco (McAllister i Newbold, 2008):



Produkcja metanu w żwaczu odgrywa kluczową rolę, ponieważ umożliwia usuwanie H_2 , który jest produktem ubocznym fermentacji mikrobiologicznej. Nadmiar H_2 mógłby gromadzić się do poziomów toksycznych, jeśli nie zostałby efektywnie usunięty (Misiukiewicz i wsp., 2021; Króliczewska i wsp., 2023).

Ponadto proces metanogenezy pomaga utrzymać równowagę ekosystemu mikrobiologicznego w żwaczu, co jest niezbędne dla zachowania zdrowia i stabilności całego ekosystemu (Cieślak i wsp., 2013; Króliczewska i wsp., 2023; Thacharodi i wsp., 2024).

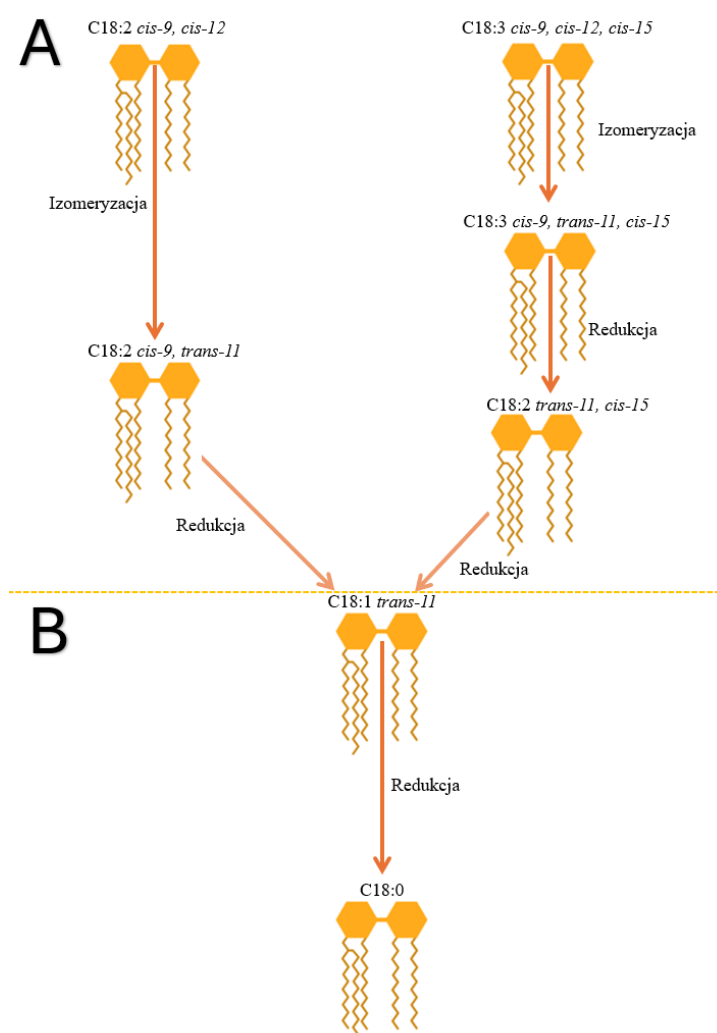
1.2 Biouwodorowanie

W dawkach pokarmowych przeznaczonych dla przeżuwaczy źródłem tłuszczu surowego są zarówno pasze objętościowe, jak i treściwe. W paszach objętościowych dominują galaktolipidy, w których przeważa kwas linolenowy (np. w kiszonce z traw lub lucerny) lub kwas linolowy (np. w kiszonce z kukurydzy). Z kolei w paszach treściwych dominują triglicerydy, w których głównym składnikiem jest kwas linolowy (Hassan i wsp., 2022).

W środowisku żwacza kwasy tłuszczowe ulegają hydrolizie do wolnych kwasów tłuszczowych, glicerolu oraz niewielkich ilości mono- i diglicerydów (Jenkins, 1993; He i wsp., 2023). Po procesie lipolizy nienasycone kwasy tłuszczowe są uwodorniane przez mikroorganizmy bytujące w ekosystemie żwacza. Proces biouwodorowania polega

na przekształcaniu nienasyconych kwasów tłuszczowych w ich nasycone odpowiedniki. Jest to forma detoksykacji, która chroni mikroorganizmy żywca przed toksycznym działaniem nienasyconych kwasów tłuszczowych (Maia i wsp., 2007; Makmur i wsp., 2022).

Badania *in vitro* i *in vivo* pozwoliły na zidentyfikowanie ścieżek procesu biouwodornienia oraz produktów pośrednich i końcowych tego procesu. Wykazano, że kwas C18:3, sprzężony i niesprzężony C18:2 oraz izomery kwasu C18:1 ostatecznie uczestniczą w przemianie kwasu oleinowego w kwas stearynowy (Shingfield i wsp., 2014). Poniżej przedstawiono schemat procesu biouwodornienia kwasów tłuszczowych C18:3 i C18:2 (Schemat 2).



Schemat 2. Poglądowy schemat biouwodornienia kwasu oleinowego do kwasu stearynowego (Shingfield i wsp., 2014). Literami A i B oznaczono grupy bakterii, biorące udział w procesie.

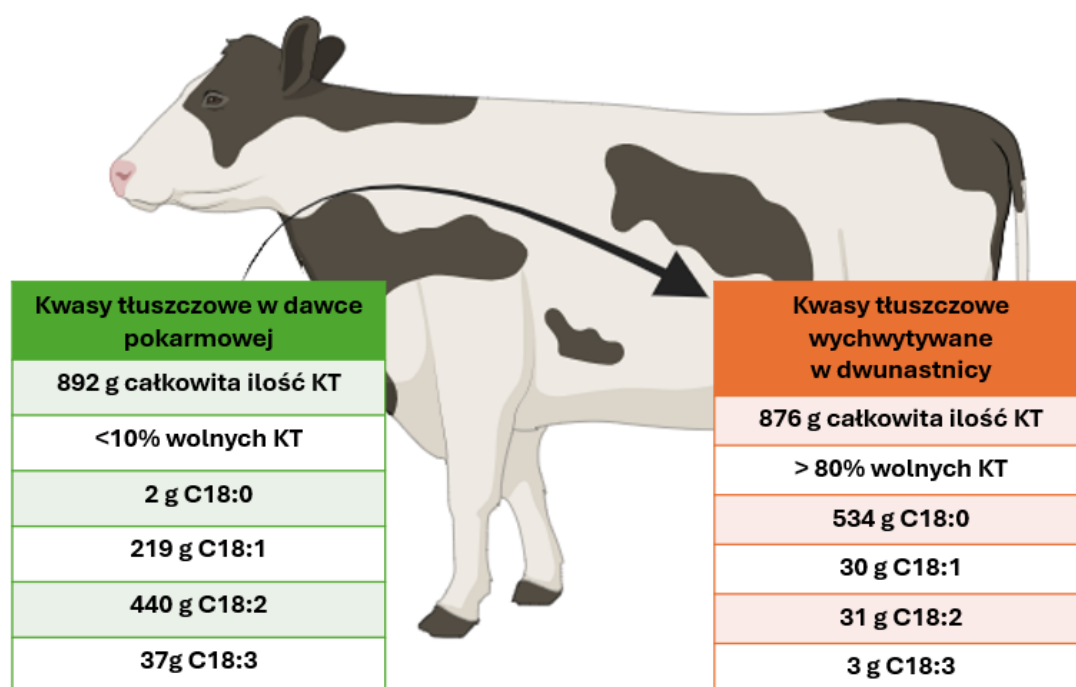
W procesie biouwodorowania kluczową rolę odgrywają mikroorganizmy (Jenkins i wsp., 2008; Bryszak i wsp., 2019). Bakterie zaangażowane w biouwodorowanie zostały podzielone na dwie grupy. Grupa pierwsza (A) obejmuje bakterie, które uwodorowują kwasy tłuszczowe: C18:2 *cis*-9, *cis*-12 oraz C18:3 *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 do C18:1 *trans*-11. Grupa druga (B) prowadzi proces biouwodorowania C18:1 *trans*-11 do C18:0 (Harfoot i wsp., 1997).

Do najważniejszych bakterii uczestniczących w biouwodorowaniu należą: *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Butyrivibrio proteoclasticus* oraz *Cutibacterium acnes* (Moon i wsp., 2008; Dewanckele i wsp., 2020). Należy jednak pamiętać, że ze względu na złożone interakcje pomiędzy mikroorganizmami obecnymi w środowisku żywca trudno jest jednoznacznie przypisać konkretne przemiany kwasów tłuszczowych poszczególnym gatunkom bakterii (Conte i wsp., 2022; Toral i wsp., 2024).

Daghio i wsp. (2021) wykazali również związek między rodzajami mikroorganizmów biorących udział w przemianach kwasów tłuszczowych a rasą zwierząt. Wcześniejsze badania *in vivo* przeprowadzone na bydle mięsnym potwierdziły, że rasa może wpływać na skład mikrobiologiczny treści żywca, a tym samym na końcowy profil kwasów tłuszczowych w produktach, takich jak mięso.

Dodatkowo w procesie biouwodorowania, oprócz bakterii, mogą uczestniczyć inne mikroorganizmy żywca, takie jak pierwotniaki. Mikroorganizmy te charakteryzują się wyższą zawartością nienasyconych kwasów tłuszczowych niż bakterie (Or-Rashid i wsp., 2007). Błona komórkowa pierwotniaków zawiera wysoki poziom C18:1 *trans*-11 oraz C18:2 *cis*-9, *trans*-11. Rola pierwotniaków w procesie biouwodorowania wciąż jest badana.

Ostatnie badania wykazały, że obecność pierwotniaków w żywcu jest związana ze zwiększeniem zawartości prozdrowotnych kwasów tłuszczowych w mięsie jagniąt, co wskazuje na ich istotny udział w procesie biouwodorowania (Francisco i wsp., 2019; Toral i wsp., 2024). Proces biouwodorowania, w którym uczestniczą mikroorganizmy żywca, znacząco zmienia profil kwasów tłuszczowych w produktach, takich jak mleko. Schemat tego procesu został przedstawiony poniżej (Schemat 3).



Schemat 3. Wpływ procesu biouwodorowania na zmianę profilu kwasów tłuszczowych wychwytywanych w dwunastnicy.

1.2.1 Modulowanie procesu biouwodorowania

Produkty pochodzące od przeżuwaczy charakteryzują się wysokim poziomem nasyconych kwasów tłuszczowych (Schemat 3). Wynika to z działania mikroorganizmów żwacza, które przekształcają lipidy pochodzące z paszy w znaczne ilości nasyconych kwasów tłuszczowych. Proces biouwodorowania nienasyconych kwasów tłuszczowych prowadzi do ograniczenia ilości jedno- i wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, które mogą wpływać na prozdrowotne właściwości otrzymywanych produktów (Huang i wsp., 2022; Yanza i wsp., 2022).

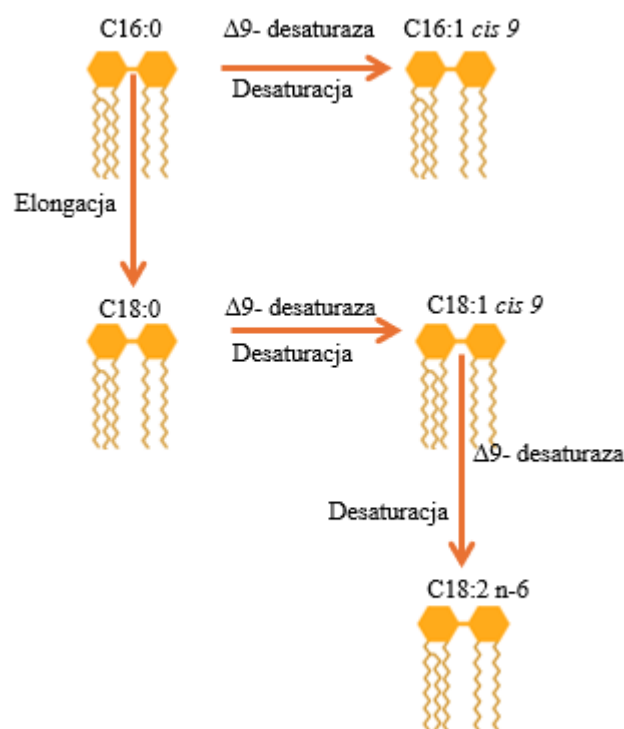
Modulowanie procesu biouwodorowania w żwachu poprzez zmiany w składzie dawki pokarmowej może przyczynić się do poprawy właściwości zdrowotnych tłuszczu zawartego w mleku i mięsie. Zwiększenie stężenia kwasów tłuszczowych takich jak C18:1 *trans*-11, C18:2 *cis*-9, *trans*-11 czy C18:3 *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 może wpłynąć na jakość i wartość odżywczą produktów pochodzenia zwierzęcego (Kozłowska i wsp., 2021; Yanza i wsp., 2022).

1.2.1.1 Kwasy tłuszczowe- wzbogacanie wartości odżywczej mięsa

Tłuszcz mięsa składa się z fosfolipidów i triglicerydów zlokalizowanych w adipocytach (Raes i wsp., 2004). Kwasy tłuszczowe budujące tłuszcz mogą pochodzić z krążących w krwioobiegu wolnych kwasów tłuszczowych lub być syntetyzowane *de novo*. Produkty biouwodorowania mogą zostać przekształcone w triglicerydy, fosfolipidy lub uwodorowane do nasyconych kwasów tłuszczowych (Toral i wsp., 2024).

Proces syntezy kwasów tłuszczowych *de novo* zachodzi w cytozolu komórek mikroorganizmów, szczególnie bakterii i grzybów bytujących u przeżuwaczy. Jest to proces cykliczny, w którym dwuwęglowe jednostki acetylowe są przyłączane do acetylo-CoA. Głównym produktem syntezy *de novo* jest kwas palmitynowy (C16:0), który może być dalej przekształcany w wyniku elongacji lub desaturacji do innych kwasów tłuszczowych (Drackley, 2000).

Jednym z kluczowych enzymów biorących udział w metabolizmie lipidów jest $\Delta 9$ -desaturaza. Enzym ten wprowadza podwójne wiązanie *cis* między węglami 9 i 10 w łańcuchu kwasu tłuszczowego. Substratami tego procesu są kwasy C16:0 i C18:0, które następnie przekształcane są odpowiednio w kwasy C16:1 *cis*-9 i C18:1 *cis*-9. Uproszczoną reakcję tego procesu przedstawiono na rycinie (Schemat 4) poniżej.



Schemat 4. Desaturacja kwasów tłuszczowych.

1.3 Wtórne metabolity roślinne

Coraz większe zainteresowanie badaczy wzbudzają wtórne metabolity roślinne występujące w ziołach, krzewach, drzewach oraz w produktach ubocznych przemysłu rolnego. Metabolity te mają potencjał do modulowania procesu biouwodorowania oraz poprawy jakości produktów pochodzenia zwierzęcego.

Badania nad wtórnymi metabolitami roślinnymi były prowadzone zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo* (Stobiecka i wsp., 2013; Szczechowiak i wsp., 2016; Yanza i wsp., 2022), aby lepiej zrozumieć mechanizmy ich działania oraz efekty, jakie wywierają na procesy takie jak biouwodorowanie i metanogeneza.

Do wtórnych metabolitów roślinnych zaliczają się między innymi olejki eteryczne, taniny, saponiny, flawonoidy, kwasy fenolowe oraz wiele innych związków o różnorodnym działaniu biologicznym.

1.3.1 Biologicznie aktywne substancje roślinne a liczebność i aktywność mikroorganizmów żwacza

Wykazano wielokrotnie, że substancje biologicznie czynne, takie jak garbniki, saponiny i flawonoidy, mogą znacząco wpływać na układ pokarmowy przeżuwaczy, takich jak krowy, owce i kozy (Yanza i wsp., 2022; Ammar i wsp., 2023; Singh i wsp., 2024). Związki te, obecne w wielu gatunkach roślin, mają zdolność modulowania populacji drobnoustrojów w żwaczu, poprawy wykorzystania składników odżywczych oraz zwiększenia wskaźników produktywności zwierząt (Kozłowska i wsp., 2021; Huang i wsp., 2022).

Taniny to grupa związków fenolowych obecnych w wielu roślinach, w tym paszach, krzewach i drzewach. Mają one zarówno pozytywny, jak i negatywny wpływ na żywienie przeżuwaczy (Berça i wsp., 2023). W umiarkowanych ilościach taniny mogą poprawiać wykorzystanie białka i zmniejszać produkcję metanu w żwaczu (Berça i wsp., 2023). Jednak w nadmiarze taniny mogą wiązać się z białkiem ogólnym, zmniejszając jego dostępność dla zwierzęcia. Działają także jako naturalne antybiotyki, modulując populacje mikroorganizmów w żwaczu. Ich wpływ na mikroflorę żwacza zależy od wielu czynników, takich jak rodzaj tanin, ilość spożywanych roślin, kondycja zwierząt oraz skład dawki pokarmowej (Cieślak i wsp., 2008; Reda i wsp., 2016; Majewska i wsp., 2023).

Saponiny, będące grupą glikozydów, występują w licznych gatunkach roślin, zwłaszcza w roślinach bobowatych i paszach. Wykazują one właściwości

przeciwdrobnoustrojowe, przeciwzapalne i stymulujące odporność. W żwaczu saponiny mogą zakłócać integralność błon komórkowych drobnoustrojów, zmieniając ich populację, co prowadzi m.in. do ograniczenia produkcji metanu (Torres i wsp., 2023). Mogą również zwiększać efektywność wykorzystania składników pokarmowych przez zwierzęta (Szczechowiak i wsp., 2016).

Inną grupą biologicznie aktywnych związków są **flawonoidy**, które najczęściej występują w formie glikozydów, dzięki połączeniu aglikonu z cukrem (Crozier i wsp., 2007; Berger i wsp., 2012). Ekstrakty roślinne wzbogacone we flawonoidy od wielu lat zyskują na znaczeniu w doskonaleniu produkcji zwierzęcej (Tedesco i wsp., 2004).

Badania nad flawonoidami wykazały, że ich stosowanie u zwierząt przeżuwających może przynieść wymierne korzyści. Przykładowo, podawanie sylimaryny (10 g/d) przez 25 dni zwiększyło wydajność produkcji mleka. Ponadto, w badaniach Balcells i wsp. (2016) stwierdzono, że ekstrakty roślinne zawierające flawonoidy w stężeniu 300 mg/kg masy ciała zmniejszały częstość występowania kwasicy oraz poprawiały wydajność wzrostu zwierząt, zwłaszcza u bydła otrzymującego dawkę pokarmową o wysokiej zawartości pasz treściwych. Ograniczenie występowania kwasicy przypisywano redukcji liczebności *Streptococcus bovis* i *Selenomonas ruminantium* oraz wzrostowi populacji mikroorganizmów rozkładających mleczany, takich jak *Megasphaera elsdenii*.

Obecnie na rynku dostępne są różne dodatki paszowe bogate we flawonoidy, które mogą skutecznie ograniczać produkcję metanu u przeżuwaczy (Kelly i wsp., 2023; Shilwant i wsp., 2023), głównie poprzez hamowanie wzrostu metanogenów. Jednak wciąż trwają poszukiwania efektywnych, biologicznie aktywnych substancji, które byłyby zdolne do długoterminowego ograniczania produkcji metanu u przeżuwaczy oraz łatwo dostępne w regionach ich stosowania (Shilwant i wsp., 2023).

Obecność związków takich jak glikozydy, fenole, terpenoidy, alkaloidy, olejki eteryczne oraz kwasy organiczne w ekstraktach roślinnych może znacząco wpływać na wyniki produkcyjne u przeżuwaczy (Kelly i wsp., 2023; Shilwant i wsp., 2023). Flawonoidy są uważane za bezpieczne dla zdrowia zwierząt, jednak ich stosowanie w nadmiernych lub nieodpowiednio dobranych dawkach może prowadzić do niekorzystnych skutków ubocznych.

Niektóre badania wskazują, że flawonoidy mogą negatywnie wpływać na strawność składników pokarmowych, co może obniżać wydajność produkcyjną zwierząt (Orzuna-Orzuna i wsp., 2023). Ponadto, niektóre flawonoidy mogą działać

jako inhibitory enzymów trawiennych, wpływając na proces wchłaniania składników odżywczych. Wpływ flawonoidów na mikroorganizmy bytujące w żwaczu może również zmieniać przebieg procesów fermentacyjnych. W efekcie ich działanie - zarówno pozytywne, jak i negatywne - zależy od wielu czynników, takich jak rodzaj i dawka flawonoidu, skład dawki pokarmowej, gatunek przeżuwacza oraz indywidualna tolerancja zwierzęcia (Zhang i wsp., 2018; Orzuna-Orzuna i wsp., 2023).

Badania sugerują, że taniny mogą dawać efekty podobne do tych uzyskiwanych dzięki podawaniu flawonoidów w diecie przeżuwaczy. Taniny mogą skutecznie wpływać na proces biouwodorowania kwasów tłuszczowych. Według badań *in vivo*, podawanie tanin znacząco zmniejszyło wydajność biouwodorowania w żwaczu poprzez hamowanie aktywności bakterii odpowiedzialnych za ten proces (Besharati i wsp., 2022).

2. Hipoteza badawcza

Hipoteza badawcza zakłada, że biologicznie aktywne substancje zawarte w roślinach, poprzez oddziaływanie na populacje mikroorganizmów żwacza, modulują przebieg procesów metanogenezy i biouwodorowania zachodzących w tym środowisku, czyli biologicznie aktywne substancje zawarte w roślinach regulując wykorzystanie wodoru w żwaczu, ograniczają produkcję i emisję metanu oraz zwiększają zawartość niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych w produktach pochodzenia zwierzęcego.

3. Cel badawczy

Celem badań jest ocena możliwości zastosowania dodatków zawierających nośniki biologicznie aktywnych substancji jako komponentów dawki pokarmowej stosowanej w żywieniu jagniąt, ze szczególnym uwzględnieniem ich wpływu na modulowanie procesów metanogenezy oraz biouwodorowania nienasyconych kwasów tłuszczowych w zwaczu w warunkach *in vitro* i *in vivo*.

4. Materiał i metody

W celu weryfikacji postawionej hipotezy badawczej przeprowadzono cykl doświadczeń. Pierwsze badania, opublikowane w czasopiśmie *PLoS One* („Ruminal fermentation, microbial population and lipid metabolism in gastrointestinal nematode-infected lambs fed a diet supplemented with herbal mixtures”), zostały podzielone na dwa etapy: badania *in vitro* oraz *in vivo*.

W doświadczeniach *in vitro* wykorzystano system krótkoterminowej hodowli typu *batch culture*. Natomiast w badaniach *in vivo*, od jagniąt pobrano poubojowo próbki płynu żwacza i mięsa. Badania te przeprowadzono we współpracy z Centrum Nauk Biologicznych Słowackiej Akademii Nauk, Instytutem Fizjologii Zwierząt w Koszycach.

Badania *in vitro*, wchodzące w skład publikacji „The Potential of Paulownia Leaves Silage Utilization Instead of Alfalfa Silage in the Lamb’s Diet for Smart Feedlot Farming and Quality Meat Production,” zostały przeprowadzone w laboratorium Katedry Żywienia Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Poniżej przedstawiono układ doświadczeń (Tabela 1).

Tabela 1. Skrócony schemat badań wykorzystanych w doświadczeniach przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej.

Cykl badań	Materiał badawczy	Doświadczenie
I	Suszone mieszaniny ziół	<i>in vitro</i> - batch culture
		<i>in vivo</i> - jagnięta utrzymywane w warunkach produkcyjnych
II	Liofilizowane liście paulowni (<i>P. tomentosa</i> × <i>P. fortune</i>)	<i>in vitro</i> - batch culture

4.1 Doświadczenia w ramach I cyklu badań

4.1.1 Materiał doświadczalny

Materiał doświadczalny stanowiły mieszaniny ziół (MIX 1 i MIX 2).

Skład i procentowy udział w mieszaninie został przedstawiony w tabelach 2 i 3.

Tabela 2. Kompozycje mieszanin ziół (MIX 1).

Kompozycja mieszaniny ziół 1 (MIX 1)			
Gatunek	Rodzina	Część rośliny	Procentowy udział rośliny (%)
<i>Artemisia absinthium</i> L.	<i>Asteraceae</i>	Łodygi	1
<i>Matricaria chamomilla</i> L.	<i>Asteraceae</i>	Kwiaty	13,4
<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	<i>Apiaceae</i>	Nasiona	5
<i>Fumaria officinalis</i> L.	<i>Papaveraceae</i>	Łodygi	13,4
<i>Hyssopus officinalis</i> L.	<i>Lamiaceae</i>	Łodygi	13,4
<i>Malva sylvestris</i> L.	<i>Malvaceae</i>	Kwiaty	13,4
<i>Melissa officinalis</i> L.	<i>Lamiaceae</i>	Łodygi	13,4
<i>Plantago lanceolata</i> L.	<i>Plantaginaceae</i>	Liście	13,4
<i>Solidago virgaurea</i> L.	<i>Asteraceae</i>	Łodygi	13,4

Tabela 3. Kompozycje mieszanin ziół (MIX 2) .

Kompozycja mieszaniny ziół 2 (MIX 2)			
Gatunek	Rodzina	Część rośliny	Procentowy udział rośliny (%)
<i>Artemisia absinthium</i> L.	<i>Asteraceae</i>	Łodygi	1
<i>Achillea millefolium</i> L.	<i>Asteraceae</i>	Łodygi	12,4
<i>Calendula officinalis</i> L.	<i>Asteraceae</i>	Kwiaty	12,4
<i>Matricaria chamomilla</i> L.	<i>Asteraceae</i>	Kwiaty	12,4
<i>Cichorium intybus</i> L.	<i>Asteraceae</i>	Łodygi	12,4
<i>Fumaria officinalis</i> L.	<i>Papaveraceae</i>	Kwiaty	12,4
<i>Hypericum perforatum</i> L.	<i>Hypericaceae</i>	Łodygi	12,4
<i>Malva sylvestris</i> L.	<i>Malvaceae</i>	Łodygi	12,4
<i>Urtica dioica</i> L.	<i>Urticaceae</i>	Łodygi	12,4

4.1.2 Układ doświadczenia w ramach I cyklu badań

Badania *in vitro* przeprowadzono w systemie hodowli okresowej - *batch culture*. Zioła (MIX 1 i MIX 2) pozyskano ze źródeł komercyjnych: AGROKARPATY, Plavnica, Słowacja i BYLINY Mikeš s.r.o., Čičenice, Czechy. W każdej z mieszanek określono koncentrację substancji biologicznie aktywnych (Tabela 4).

Tabela 4. Zawartość głównych związków bioaktywnych zidentyfikowanych w MIX 1 i MIX 2 analizowanych za pomocą jonizacji ujemnej.

Mieszanina ziół 1 (MIX 1)		
Związek	Wzór chemiczny	Zawartość w przeliczeniu na mg/g S.M
Kwasy fenolowe	-	57,3
Flawonoidy	-	41,5
Alkaloidy	-	1,4
3-O-galaktozyd mirycetyny	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	20,2
kw酸 1,5-dikawoilochinowy	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	15,4
kw酸 3-O-kawoilochinowy	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	11,3
kw酸 dihydrokawoilo-4-kawoilochinowy	C ₂₅ H ₂₆ O ₁₂	9,72
Mieszanina ziół 2 (MIX 2)		
Związek	Wzór chemiczny	Zawartość w przeliczeniu na mg/g S.M
Kwasy fenolowe	-	22,2
Flawonoidy	-	29,5
Alkaloidy	-	1,33
3-O-kawoilochinowy	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	6,91
kw酸 1,5-dikawoilochinowy	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	6,18
rutyna	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	5,73
kw酸 2-O-feruloilohydroksycytrynowy	C ₁₆ H ₁₆ O ₁₁	3,64

Płyn żwacza, wykorzystany do przygotowania buforowanego płynu żwacza w doświadczeniu *in vitro*, został pobrany poubojowo od 6 jagniąt niezainfekowanych pasożytem *Haemonchus contortus* (grupa kontrolna) oraz od 6 owiec zainfekowanych tym pasożytem. Stopień zarażenia pasożytem ustalono na podstawie analizy kału.

Badania przeprowadzono według następującego schematu:

- **Grupy kontrolne:**
 - Zainfekowana
 - Niezainfekowana
- **Grupy doświadczalne:**
 - Zainfekowana przyjmująca MIX 1
 - Zainfekowana przyjmująca MIX 2
 - Niezainfekowana przyjmująca MIX 1
 - Niezainfekowana przyjmująca MIX 2

Pobrany płyn żwacza został przefiltrowany przez czterowarstwową chustę serowarską do dwóch butelek Schott Duran® (Schott North America, Inc., Corporate Office, Elmsford NY 10523, USA) i natychmiast przetransportowany do laboratorium w temperaturze 39–40°C. Następnie płyn żwacza został zbuforowany w stosunku 1:4 zgodnie z procedurą opisaną przez Szumacher-Strabel i wsp. (2011).

Tak przygotowany buforowany płyn żwacza został przeniesiony w warunkach beztlenowych do butelek (penicylinówek) zawierających badane substraty.

Grupy kontrolne, zarówno niezainfekowana, jak i zainfekowana, zawierały po 400 mg substratu, składającego się z 252 mg suchej masy siana i 148 mg suchej masy paszy treściwej. Skład chemiczny oraz profil kwasów tłuszczowych zastosowanych pasz i dodatków mieszanin ziołowych użytych w doświadczeniu przedstawiono w tabeli 5. W grupach doświadczalnych mieszanki ziołowe (MIX 1 i MIX 2) stanowiły 9% dodatkowej ilości analizowanego substratu, co odpowiadało 36 mg na butelkę. Po dodaniu płynu żwacza, butelki nasycono dwutlenkiem węgla, szczelnie zamknięto gumowymi korkami i zakapslowano aluminiowymi zatyczkami. Następnie umieszczono je w inkubatorze (Galaxy 170R, Eppendorf North America Inc., Hauppauge, NY) na 24 godziny w temperaturze 39°C, w warunkach beztlenowych, z okresowym mieszaniem zawartości.

Przed otwarciem butelek zmierzono objętość wytworzonego gazu na podstawie ciśnienia, za pomocą manometru z przetwornikiem (Premagas, Stará Turá, Słowacja). Do analizy stężenia metanu pobrano próbki gazu o objętości 500 µl, które następnie

poddano analizie chromatograficznej przy użyciu gazowego chromatografu PerkinElmer Clarus 500 (Perkin Elmer, Inc., Shelton, CT, USA).

Z każdej butelki pobrano także płyn żwacza do analizy pH, oznaczenia stężenia lotnych kwasów tłuszczowych (LKT), stężenia amoniaku oraz liczebności populacji mikroorganizmów (pierwotniaków, bakterii i metanogenów). Dodatkowo określono strawność suchej masy (IVDMD).

Tabela 5. Skład chemiczny oraz profil kwasów tłuszczowych zastosowanych pasz oraz dodatków mieszanin zielonych.

	Siano łąkowe	Pasza treściwa	MIX 1	MIX 2
Skład chemiczny dawki pokarmowej, g/kg suchej masy				
Białko ogólne	163	309	160	180
aNDF ¹	825	140	500	460
ADF ²	522	90	360	350
Popiół surowy	39	29	110	110
Profil kwasów tłuszczowych, g/100 g KT				
C12:0	1,06	0,11	0,12	0,41
C14:0	0,9	0,34	0,36	1,57
C16:0	18,6	14,0	12,5	25,0
C18:0	5,09	2,26	3,22	8,84
C18:1 <i>cis</i> -9	14,5	19,4	22,3	8,80
C18:2 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12	36,3	55,6	26,9	25,3
C18:2 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 <i>cis</i> -15 (ALA) ³	9,50	2,46	11,9	9,28
C20:3n-6	1,95	0,23	1,04	0,78
C20:5n-3 (EPA) ⁴	0,19	0,05	0,19	0,09
C22:5n-3 (DPA) ⁵	0,35	0,06	0,22	0,42
C22:6n-3 (DHA) ⁶	1,21	0,20	0,30	0,42
Pozostałe kwasy tłuszczowe ⁷	10,3	5,29	20,9	19,1
SFA ⁸	29,4	18,0	17,9	37,8
UFA ⁹	70,6	82,0	82,1	62,2
MUFA ¹⁰	20,7	22,9	41,1	26,0
PUFA ¹¹	49,8	59,2	41,0	36,2
n-6	38,6	56,4	28,4	26,3
n-3	25,9	22,2	12,6	9,84

¹aNDF - neutralne włókno detergentowe oznaczone α -amylazą; ²ADF- włókno detergentowo kwaśne; ³ALA- kwas α -linolenowy; ⁴EPA- kwas eikozapentaenowy;

⁵DPA- kwas dokozapentaenowy; ⁶DHA- kwas dokozaheksaenowy; ⁷C10:0, C14:1, C15:1, C16:1, C18:1 *cis*-11, C20:0, C11:1 n-9, C22:0, C23:0, C24:1; ⁸SFA- nasycone kwasy tłuszczowe; ⁹UFA-nienasycone kwasy tłuszczowe; ¹⁰MUFA-jednonienasycone kwasy tłuszczowe; ¹¹PUFA- wielonienasycone kwasy tłuszczowe.

4.1.3 Doświadczenie w warunkach *in vivo* w ramach I cyklu

Kolejnym krokiem w weryfikacji postawionej hipotezy badawczej było przeprowadzenie doświadczenia *in vivo* z udziałem 24 jagniąt o średniej masie ciała $11,7 \pm 1,23$ kg, w wieku 3–4 miesięcy. Zwierzęta utrzymywano grupowo w boksach przez 15 dni w celu adaptacji do dawki pokarmowej. Po okresie adaptacyjnym jagnięta podzielono losowo na cztery grupy ($n = 6$):

- **Grupa kontrolna niezainfekowana (CN),**
- **Grupa kontrolna zainfekowana pasożytem *Haemonchus contortus*, żywiona dietą kontrolną,**
- **Grupa niezainfekowana, żywiona dietą kontrolną z dodatkiem mieszanki ziołowej 1 (MIX 1),**
- **Grupa niezainfekowana, żywiona dietą kontrolną z dodatkiem mieszanki ziołowej 2 (MIX 2).**

Zakażenie jagniąt przeprowadzono doustnie, podając 5000 larw trzeciego stadium pasożyta *H. contortus*. Jagnięta żywiono dawką podstawową, składającą się z siana łąkowego (*ad libitum*) oraz 500 g suchej masy (SM) komercyjnej paszy treściwej na dzień na jagnię, przy szacowanym tempie wzrostu 150 g/dzień. Skład 1 kg paszy treściwej obejmował:

- 700 g/kg jęczmienia,
- 220 g/kg śruty sojowej,
- 48 g/kg otrębów pszennych,
- 5 g/kg buforu,
- 27 g/kg premiksu mineralno-witaminowego.

W grupach otrzymujących dodatki ziołowe, podawano MIX 1 i MIX 2 w dawce 100 g SM na dzień. Zarówno w doświadczeniach *in vitro*, jak i *in vivo*, wykorzystano te same pasze i mieszanki ziołowe (Tabela 5). Podczas całego doświadczenia jagnięta miały swobodny dostęp do wody pitnej.

4.2 Doświadczenie w ramach II cyklu badań

4.2.1 Materiał doświadczalny

Materiał doświadczalny stanowiły liście paulowni (*P. tomentosa* × *P. fortune hybrid*), zebrane w 2019 roku z czterech różnych plantacji położonych w Polsce. Materiał kontrolny, w postaci lucerny, został zebrany w fazie kwitnienia. Zarówno liście paulowni, jak i lucernę pocięto na kawałki o wielkości około 1,5 cm i zakiszono z dodatkiem mikrobiologicznym do kiszonki (*Agricol Sil*, Microferm Ltd, Wielka Brytania).

Dodatek mikrobiologiczny zawierał szczepy: *Lactobacillus plantarum* DSMZ 16627, *Pediococcus acidilactici* NCIMB 30005 oraz *Lactobacillus paracasei* NCIMB 3015. Przygotowany materiał umieszczono w mikrosilosach o pojemności 4 dm³, zgodnie z protokołem Huang i wsp. (2021). Mikrosilosy przechowywano w zaciemnionym miejscu w temperaturze około 20–25°C. Po 8 tygodniach fermentacji część mikrosilosów otwarto, a pobrane próbki poddano analizie chemicznej.

Aktywne związki bioaktywne, skład chemiczny oraz profil kwasów tłuszczowych zastosowanych dawek pokarmowych przedstawiono w tabelach 6 i 7.

Tabela 6. Zawartość głównych związków bioaktywnych zidentyfikowanych w liściach paulowni.

Wyszczególnienie		
Związek	Wzór chemiczny	Zawartość w przeliczeniu na mg/g S.M
1-O-Kafeoilo-6-O-alfa-ramnopiranozylo-beta-glikopiranozyd	C ₂₁ H ₂₈ O ₁₃	0,50
Kwas dihydroksycynamonowy	C ₉ H ₈ O ₄	0,20
Kwas 2-hydroksy-2-fenylpropionowy	C ₉ H ₁₀ O ₃	0,23
Izomer kamneozydu	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₆	0,14
Izomer kamneozydu	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₆	1,40
ND ¹	-	0,79
4',7-O-diglukuronid luteoliny	C ₂₇ H ₂₆ O ₁₇	0,23
Kampneozyd I	C ₃₀ H ₃₈ O ₁₆	0,14
Izoakteozyd	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	1,49
Akteozyd	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	6,74
Apigenina 7-[ramnozylo-(1->2)-galakturonid]	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₅	0,15
Acetyloakteozyd (tubulozyd B)	C ₃₁ H ₃₈ O ₁₆	0,24
Epimeredinozyd A	C ₃₁ H ₄₀ O ₁₅	0,33
Didehydroksyakteozyd	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₃	0,19
Dihydroksyflawon (luteolina)	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	1,20
Trihydroksyflawon (apigenina)	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	0,41

¹ND- związki nie określone

Tabela 7. Skład chemiczny oraz profil kwasów tłuszczowych kiszonek z lucerny i liści paulowni, siana łąkowego oraz paszy treściwej.

Wyszczególnienie	Kiszonka z lucerny	Kiszonka z paulowni	Siano łąkowe	Koncentrat
Świeża masa, g/kg	268	237	-	-
Sucha masa, g/kg	911	928	914	887
Skład chemiczny paulowni, g/kg SM				
Masa organiczna	911	928	859	828
Białko ogólne	188	172	90	208
Popiół surowy	287	185	376	106
Tłuszcz surowy	29,8	18,1	10,6	34,7
Profil kwasów tłuszczowych, g/100 g KT				
C12:0	0,94	0,24	1,48	0,16
C14:0	0,85	0,70	0,88	0,28
C16:0	20,3	29,3	19,2	11,4
C16:1	1,76	4,45	1,58	1,24
C18:0	4,74	4,45	4,41	2,34
C18:1 <i>cis</i> - 9	4,91	7,39	8,33	45,4
C18:2 <i>cis</i> - 9 <i>cis</i> - 12	19,4	16,2	23,2	25,2
C18:3 <i>cis</i> - 9 <i>cis</i> - 12 <i>cis</i> - 15	39,2	31,2	34,9	4,6
Pozostałe kwasy				
tłuszczowe ¹	4,91	3,63	6,09	8,97
SFA ²	30,3	38,1	26,7	14,7
UFA ³	69,7	61,9	73,3	85,3
MUFA ⁴	7,2	12,5	10,8	55,1
PUFA ⁵	62,5	49,4	62,5	30,2
n-6	21,6	34,4	48,8	50,8
n-3	39,2	31,2	34,9	4,63
n-6/n-3	0,55	1,14	1,40	10,96

¹Pozostałe kwasy tłuszczowe: C8:0, C10:0, C14:1, C18:1c11, C20:0, C20:3n6, C23:0; C24:0, C20:5n3, C24:1, C22:6n3;

²SFA- nasycone kwasy tłuszczowe; ³UFA- nienasycone kwasy tłuszczowe; ⁴MUFA- jednonienasycone kwasy tłuszczowe; ⁵PUFA- wielonienasycone kwasy tłuszczowe.

4.2.2 Doświadczenie w warunkach *in vitro* w ramach II cyklu badań - *batch culture*

W ramach drugiego cyklu badań przeprowadzono doświadczenie *in vitro* z wykorzystaniem systemu *batch culture*. W tej części rozprawy doktorskiej badania ograniczono wyłącznie do warunków *in vitro*.

Płyn żwacza został pobrany od czterech jagniąt (w wieku 8 miesięcy) i transportowany w butelkach w temperaturze 39°C. Po dostarczeniu płynu do laboratorium Katedry Żywienia Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, został on zbuforowany zgodnie z procedurą opisaną przez Bryszak i wsp. (2019). Następnie do wstępnie wygrzanych szklanych buteleczek inkubacyjnych (*Midland Scientific, Omaha, NE*) dodano po 40 ml zbuforowanego płynu żwacza.

Buteleczki podzielono na pięć grup:

- **Grupa kontrolna:** zawierała 100% kiszonki z lucerny,
- **Grupa doświadczalna 1:** zawierała 25% kiszonki z paulowni i 75% kiszonki z lucerny,
- **Grupa doświadczalna 2:** zawierała 50% kiszonki z paulowni i 50% kiszonki z lucerny,
- **Grupa doświadczalna 3:** zawierała 75% kiszonki z paulowni i 25% kiszonki z lucerny,
- **Grupa doświadczalna 4:** zawierała 100% kiszonki z paulowni.

Tabela 8. Składniki dawki pokarmowej i ich proporcje w doświadczeniu *batch culture*.

Składnik pokarmowy, g/kg SM	CON	PLS 25%	PLS 50%	PLS 75%	PLS 100%
Kiszonka z lucerny	429	322	215	107	0
Kiszonka z paulowni	0	107	215	322	429
Siano łąkowe	148	148	148	148	148
Pasza treściwa*	423	423	423	423	423

CON: Kontrola zawierająca 100% kiszonki z lucerny; PLS 25, 50, 75 i 100%: Kiszonka z liści paulowni zmieszana z kiszoną z lucerny w proporcji 75, 50, 25 i 0%. * - pasza treściwa zawierała 21% białka ogólnego.

Każda grupa obejmowała 5 powtórzeń technicznych, realizowanych przez trzy kolejne dni, co łącznie dawało 15 powtórzeń. Po dodaniu zbuforowanego płynu żwacza każdą buteleczkę nasycono dwutlenkiem węgla, szczelnie zamknięto gumowymi korkami i zakapslowano aluminiowymi nakładkami. Tak przygotowane butelki umieszczono w inkubatorze (*Galaxy 170R*, Eppendorf North America, Hauppauge, NY) i wytrząsano w odstępach co około 30 minut.

4.3 Metody analityczne

Wszystkie opisane poniżej metody posłużyły do wykonania analiz w doświadczeniach *in vitro* i *in vivo*, zarówno w pierwszym, jak i drugim etapie badań.

4.3.1 Skład podstawowy pasz

Analizę składu podstawowego pasz w badanych komponentach pokarmowych przeprowadzono według metod AOAC (2007). Przeprowadzono następujące analizy: sucha masa (metoda nr 934.01), popiół surowy (metoda nr 942.05), białko ogólne (Kiel-Foss Automatic 16 210 A/S N. Foss Electric, metoda nr 976.05), tłuszcz surowy (Soxtec System HT, metoda nr 973.18). Analiza neutralnego włókna detergentowego została wykonana zgodnie z metodyką opisaną przez Van Soest i wsp. (1991).

4.3.2 Określenie składu i zawartości substancji bioaktywnych

W doświadczeniach z pierwszego etapu badań, w celu określenia substancji bioaktywnych w mieszkankach MIX 1 i MIX 2, próbki zmielono (1 mm otwory w sicie). Następnie po 7 g każdej mieszanki ekstrahowano w 0,5 M H₂SO₄ w kąpeli ultradźwiękowej w temperaturze 25°C przez 20 minut. Ekstrakcję powtórzono, a połączone przesącze doprowadzono do pH 9–10 za pomocą 1 M NaOH. Kolejno próbki rozdzielono za pomocą CHCl₃, warstwę organiczną zebrano, odparowano do sucha pod ciśnieniem i rozpuszczono w 80% MeOH do dalszej analizy.

Substancje bioaktywne analizowano metodą UHRMS przy użyciu systemu UltiMate 3000RS (Thermo Scientific, Darmstadt, Niemcy) z detektorem aerozolowym sprzężonym z kwadropolowym spektrometrem masowym (Compact, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Niemcy). Całkowitą zawartość substancji bioaktywnych określono jako ekwiwalent chelidoniny (CAS 476–32-4), na podstawie krzywych kalibracyjnych opartych na siedmiu punktach stężenia chelidoniny (od 200 do 1,2 µg/ml). Alkaloidy rozdzielono w tych samych warunkach chromatograficznych, co związki fenolowe, z wyjątkiem zastosowanego gradientu (od 7 do 70% fazy B w fazie A w ciągu 20 minut). Wszystkie analizy przeprowadzono w trzech powtórzeniach.

W doświadczeniach z drugiego cyklu badań próbki liści paulowni trzykrotnie ekstrahowano w 80% metanolu przez 60 minut w temperaturze 40°C. Ekstrakt następnie wysuszono i rozpuszczono w zakwaszonej wodzie Milli-Q. Oczyszczanie przeprowadzono metodą fazy stałej przy użyciu wkładów Oasis HLB 3cc Vac, 60 mg (Waters Corp., Milford, MA, USA). Zanieczyszczenia usunięto przez przemycie wkładów 0,5% i 80% metanolem. Następnie ekstrakty wysuszono ponownie i rozpuszczono w 1 ml zakwaszonego 80% metanolu. Przed analizą spektrometryczną próbki odwirowano przy 23 000 × g przez 5 minut. Próbki przechowywano w temperaturze -20°C zgodnie z metodą Petrič i wsp. (2020). Wszystkie analizy wykonano w trzech powtórzeniach.

4.3.3 Wartość pH i koncentracja amoniaku

W obu cyklach badań pH mierzono bezpośrednio po pobraniu próbek za pomocą pH-metru (typ CP-104, Elmetron, Zabrze, Polska). Stężenie amoniaku określono metodą kolorymetryczną Nesslera, zgodnie z opisem podanym przez Bryszak i wsp. (2019).

Po 24 godzinach inkubacji w buteleczkach (w doświadczeniach typu *batch culture*) pobrano 3,6 ml zbuforowanego płynu żwacza, który następnie wirowano przy 12 000 obrotów na minutę przez 5 minut. Z supernatantu pobrano 100 μ l i przeniesiono do probówek zawierających:

- 200 μ l 1% alkoholu poliwinylowego,
- 200 μ l 2% winianu potasowo-sodowego,
- 200 μ l odczynnika Nesslera,
- 19,3 ml wody dejonizowanej.

Tak przygotowane próbki inkubowano w temperaturze pokojowej przez 10 minut. Następnie przeprowadzono spektrofotometrię, przy czym każdą próbkę analizowano w trzech powtórzeniach. Próbką kontrolną (ślepą) była mieszanina odczynników, w której zamiast płynu żwacza dodano 100 μ l wody dejonizowanej.

4.3.4 Strawność suchej masy *in vitro* (IVDMD)

Aby określić strawność suchej masy *in vitro* (IVDMD), po zakończeniu doświadczeń zawartość buteleczek wirowano przez 10 minut przy 12 000 obrotów/min. Następnie osad przenoszono do uprzednio zważonych tygli. Tygle z próbkami suszono w temperaturze 105°C przez 72 godziny. Strawność obliczono na podstawie ubytku masy organicznej paszy.

4.3.5 Lotne kwasy tłuszczowe

W celu określenia koncentracji lotnych kwasów tłuszczowych (LKT), 3,6 ml płynu żwacza zakonserwowano w 0,4 ml 46 mM HgCl_2 , a następnie przechowywano w temperaturze -20°C. W dniu analizy próbki rozmrażano i wirowano przez 10 minut przy 12 000 obr/min. Uzyskany supernatant przenoszono do szklanych fiolek (2 ml) i umieszczano w autosamplerze chromatografu gazowego Varian CP 8200 (Varian Chrompack CP-3380). Chromatograf był wyposażony w detektor płomieniowo-jonizacyjny FID (*flame ionization detector*), kolumnę kapilarną (30 m $\times$ 0,25 mm; Agilent HP-Innowax, 19091N-133, Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Gazem nośnym

był wodór o przepływie 25 ml/min. Temperatura pieca wynosiła 185°C, temperatura nastrzyku 220°C, a detektora 120°C.

Do analizy wykorzystano standardy kwasów firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA): octowego, propionowego, izomasłowego, masłowego, izowalerianowego oraz walerianowego. Czas trwania analizy wynosił 15 minut. Identyfikację jakościową i ilościową LKT przeprowadzono metodą standardu zewnętrznego, wykorzystując pole powierzchni pików chromatograficznych.

4.3.6 Długołańcuchowe kwasy tłuszczowe

Profil długołańcuchowych kwasów tłuszczowych określono zarówno w próbach z badań *in vitro*, jak i *in vivo* (paszach, komponentach paszowych, płynie żwacza, surowicy, wątrobie, mięśni najdłuższym grzbietu oraz tłuszczu okołonerkowym) zgodnie z zmodyfikowaną metodyką opisaną przez Bryszak i wsp. (2019). Pobrane próbki poddano hydrolizie przez 40 minut w bloku grzejmym w 3 ml 2 M NaOH, w temperaturze 90°C. Metodyka była identyczna dla wszystkich prób, różniła się jedynie ilością materiału użytego do analizy.

W celu obniżenia pH i zwiększenia efektywności ekstrakcji kwasów tłuszczowych, do schłodzonych próbek dodano 2 ml 4 M roztworu HCl. Następnie każdą próbkę wzbogacono o 3,5 ml destylowanego eteru dietylowego. Probki wytrząsano na wytrząsarce (*Vortex-Genie 2*) przez 30 minut, a następnie wirowano przez 1 minutę w wirówce typu MPW 211 (5000 obr/min). Uzyskane fazy organiczne przeniesiono za pomocą szklanych pipet Pasteura do probówek o pojemności 15 ml. Procedurę ekstrakcji powtórzono dwukrotnie. Zebrane fazy organiczne odparowano w atmosferze azotu BIP w temperaturze 30°C, a następnie poddano procesowi derywatyzacji. Do odparowanej frakcji dodano sita molekularne (typ 4A, Chempur) i 2 ml 0,5 M roztworu NaOH w metanolu, a następnie doprowadzono do wrzenia. Po 3 minutach gotowania dodano 3 ml trójfluorku boru (10%, 1,3 M; Fluka) i ponownie gotowano przez 4 minuty. Następnie próbki wzbogacono o 7 ml 0,34 M NaCl oraz 0,5 ml destylowanego heksanu, wytrząsano do uzyskania jednorodnego roztworu, a następnie wirowano (5000 obr/min). Fazę organiczną przeniesiono do fiolek o pojemności 1,5 ml.

Probki poddano analizie za pomocą chromatografu gazowego (GC Bruker 456-GC, USA) wyposażonego w detektor płomieniowo-jonizacyjny (FID). Rozdział długołańcuchowych kwasów tłuszczowych przeprowadzono na kolumnie

kapilarnej Chrompac CP 7420 (Agilent HP) o wymiarach 100 m × 25 mm. Objętość nasytzenia wynosiła 1 µl, a gazem nośnym był wodór o przepływie 1,3 ml/min.

Temperatury w urządzeniu były ustawione następująco:

- dozownik: 200°C,
- detektor: 250°C,
- piec: 120°C przez 7 minut, następnie wzrost do 140°C (7°C/min), a po 10 minutach wzrost do 240°C (4°C/min).

Całkowity czas analizy wynosił 55 minut na próbkę. Kwasy tłuszczowe identyfikowano na podstawie czasów retencji standardów zewnętrznych FAME (*fatty acids methyl ester*; 37 FAME Mix, Supelco, Sigma Aldrich) oraz mieszaniny sprzężonych izomerów kwasu linolowego (CLA methyl esters, Sigma Aldrich), przy użyciu oprogramowania Galaxie Work Station 10.1 (Varian, USA). Zawartość poszczególnych kwasów tłuszczowych wyrażono w g/100 g kwasów tłuszczowych.

4.3.7 Liczebność pierwotniaków, bakterii i metanogenów

Liczebność pierwotniaków w płynach żwacza określono według metody Michałowskiego i wsp. (1986). Płyn żwacza utrwalono w 4% formalinie, a następnie, przy użyciu mikroskopu świetlnego Zeiss Primo Star no. 5 (Zeiss, Jena, Niemcy) pod powiększeniem 100-krotnym, oceniono populację pierwotniaków. Wielkość kropli była zależna od rodzaju liczonej grupy pierwotniaków, zgodnie z metodyką opisaną przez Williams i Colemana (1992). Dla określenia rodzaju *Entodiniomorpha* na szkiełko podstawowe nanoszono 10 µl próbki, natomiast dla rodzaju *Holotricha* - 100 µl. Uzyskane wyniki przeliczano, uwzględniając zastosowane rozcieńczenia.

Populację bakterii i metanogenów określono metodą Fluorescencyjnej Hybrydyzacji In Situ (FISH). Do analizy 50 µl płynu żwacza rozcieńczono w soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (PBS) i naniesiono na filtry poliwęglanowe o średnicy porów 0,22 µm (Frisette K02BP02500), a następnie odessano (Vacuum KNF Vacuport-Neuberg). Filtry przenoszono na krążki celulozowe i odwodniono w roztworach etanolu o różnych stężeniach (50%, 80%, 90%) przez 3 minuty.

Hybrydyzację przeprowadzono w 50 µl buforu hybrydyzacyjnego składającego się z 0,9 M NaCl, 20 mM Tris/HCl (pH 7,2), 0,1 g/l SDS, oraz sond oligonukleotydowych. Użyte sondy obejmowały: S-D-Arch-0915-a-A-20 (wszystkie metanogeny), S-O-Mmic-1200-a-A-21 (*Methanomicrobiales*), oraz S-F-Mbac-0310-a-A-22 (*Methanobacteriales*). Po hybrydyzacji filtry przemywano

w buforze przemywającym (20 mM Tris/HCl, pH 7,2; 0,1 g/l SDS; 5 mM EDTA) przez 20 minut w temperaturze 48°C. Następnie filtry delikatnie płukano w wodzie destylowanej, suszono na powietrzu i montowano na szkiełkach przedmiotowych z użyciem środka przeciw blaknięciu VectaShield (Vector Laboratories nr H-1000) zawierającego DAPI (4',6-diamidyno-2-fenyloindol). Aby odróżnić całkowitą liczbę bakterii (DAPI) od innych metanogenów w płynie żwacza, filtry przechowywano w temperaturze 4°C przez 1 godzinę w ciemności, po czym wizualizowano je za pomocą mikroskopu Axio Imager M2 (Carl Zeiss Iberia, Madryt, Hiszpania). Analiza obrazów została wykonana za pomocą programu ImageJ ver. 1.6.0_24. Użyte sondy zestawiono w Tabeli 9.

Tabela 9. Zestawienie sond użytych w analizie metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH).

Nazwa sondy	Grupa docelowa	Sekwencja 5'-3'
S-D-Arch-0915-a-A- 20	<i>Archaea</i>	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT
S-F-Mbac-0310-a-A- 22	<i>Methanobacteriaceae</i>	CTTGTCTCAGGTTCCATCTCCG
S-O-Mmic-1200-a-A- 21	<i>Methanomicrobiales</i>	CGGATAATTCGGGGCATGCTG

4.3.8 Analiza DNA bakterii biorących udział w procesie biouwodorowania

W celu ilościowego oznaczenia bakterii biorących udział w procesie biouwodorowania (*Butyrivibrio proteoklasticus*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*) wykonano analizę qPCR. DNA wyizolowano za pomocą Mini Bead-Beater (BioSpec, Bartlesville, OK, USA), a następnie oczyszczono (QIAamp DNA Stool Mini Kit; Qiagen, Hilden, Niemcy). Stężenia i jakość DNA mierzono za pomocą spektrofotometru NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). Oznaczone bakterie, jak i listę starterów zamieszczono w Tabeli 10.

Tabela 10. Lista starterów dla bakterii biorących udział w procesie biouwodorowania.

Gatunek	Sekwencja starteru forward 5'-3'	Sekwencja starteru reverse 3'-5'
<i>Butyrivibrio proteoklasticus</i>	CCCTAGTGTAGCGGTGAAATG	TTAGCGACGGCACTGAATGCCTA
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	ACACACCGCCCGTCACA	TCCTTACGGTTGGGTCACAGA
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	CGAACGTAGACTATTTGAGCT	ATGTTATGAGGTATTACC
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	GTTCGGAATTACTGGGCGTAAA	CGCCTGCCCCTGAACTATC
<i>Ruminococcus albus</i>	CCCTAAAAGCAGTCTTAGTTCG	CCTCCTTGCGGTTAGAACA

4.3.9 Produkcja metanu

Po 24 godzinach inkubacji rejestrowano całkowitą objętość gazu oraz mierzono wytwarzanie metanu (CH_4). Całkowitą ilość gazu wytwarzanego podczas fermentacji substratu określano poprzez odjęcie objętości gazu wytwarzanego w butelce bez substratu (próba ślepa) od objętości gazu wytwarzanego w butelkach zawierających substrat i buforowany płyn żwacza. Produkcję CH_4 analizowano, pobierając 500 μl gazu do gazoszczelnej strzykawki (*GASTIGHT® Syringes*, Hamilton Bonaduz AG, Szwajcaria) z przestrzeni nad roztworem w butelkach. Następnie gaz wprowadzano do chromatografu gazowego SRI310 wyposażonego w detektor przewodności cieplnej (TCD) i kolumnę Carboxen (INS.S, SUPELCO). Gazem nośnym był azot o stałym natężeniu przepływu 30 ml/min.

Program temperaturowy pieca był następujący: początkowa temperatura 180°C utrzymywana przez 1,5 minuty, po czym temperatura wzrastała o 20°C na minutę, aż do osiągnięcia 220°C. Zaobserwowane piki identyfikowano, a stężenie CH_4 wyznaczano poprzez porównanie czasów retencji z odpowiednimi standardami gazów (*Mix Gas* 5,63% CO_2 , 5,56% CH_4 , 5,10% H_2 , oraz pozostałości N_2 , Multa S.C. Poland) przy użyciu oprogramowania *PeakSimple* ver. 3.29.

4.4 Obliczenia

Na podstawie profilu kwasów tłuszczowych (KT) obliczono wskaźniki desaturacji, aterogenności oraz trombogenności zgodnie z wytycznymi przedstawionymi w pracach Brogna i wsp. (2011), Chilliard i wsp. (2003) oraz Ulbricht i Southgate (1991). Produkcję metanu i wodoru, a także wykorzystanie wodoru, oszacowano na podstawie obliczeń stechiometrycznych opisanych w pracy Wolin (1960).

4.5 Analiza statystyczna

Wszystkie dane z pierwszego cyklu badań przeanalizowano za pomocą oprogramowania statystycznego SAS (University Edition, wersja 9.4). W eksperymencie 1 (badanie *in vitro*) dane analizowano przy użyciu procedury **PROC MIXED**, stosując modele zawierające grupę niezainfekowaną i zainfekowaną oraz ich interakcje jako czynniki stałe, a każdy kolejny przebieg traktowano jako czynnik losowy.

W eksperymencie 2 (badanie *in vivo*) dane, z wyjątkiem peroksydacji lipidów, analizowano za pomocą jednokierunkowego modelu ANOVA przy użyciu procedury **PROC GLM**. Dwuczynnikową ANOVA (GraphPad Prism, GraphPad Software, Inc., San Diego, USA) zastosowano do analizy utleniania lipidów w surowicy i mięsie w celu zbadania wpływu leczenia dietetycznego, czasu pobrania/przechowywania próbek oraz ich interakcji. Istotne różnice między grupami leczonymi badano za pomocą testu post-hoc Tukeya ($P < 0,05$). Wszystkie wartości przedstawiono jako średnie z połączonymi błędami standardowymi średnich.

W drugim cyklu badań niniejszej dysertacji doktorskiej dane przeanalizowano za pomocą testu normalności Shapiro-Wilka (Shapiro i Wilk, 1965). Przeprowadzono jednokierunkową (grupa/dawka) wieloczynnikową analizę wariancji (MANOVA). Następnie przeprowadzono jednokierunkowe analizy wariancji (ANOVA) w celu określenia głównych efektów grupy na zmienność poszczególnych cech. Obliczono średnie arytmetyczne oraz błędy standardowe średnich. Dodatkowo zastosowano test najmniej znaczących różnic Fishera (LSD) na poziomie istotności $\alpha = 0,05$. Dla wszystkich obserwowanych cech uzyskano kontrasty liniowe i kwadratowe. Do analiz wykorzystano pakiet oprogramowania statystycznego **GenStat v. 22** (VSN International Genstat for Windows, 2022).

5. Wyniki

5.1 Doświadczenie w warunkach *in vitro* w ramach I cyklu

5.1.1 Wpływ mieszanek ziołowych i zakażenia *Haemonchus contortus* na podstawowe parametry żywca

W badaniach *in vitro* zakażenie pasożytem (*Haemonchus contortus*, ZP) spowodowało statystycznie istotne obniżenie pH ($P < 0,01$) z wartości 6,24 w grupie kontrolnej niezainfekowanej pasożytem (NP) do 6,12 w grupie kontrolnej ZP (Tabela 11). Dodatkowo, w grupie otrzymującej dodatek MIX 2, zawierający mieszankę ziół (piołun, krwawnik pospolity, nagietek lekarski, rumianek pospolity, cykoria podróżnik, dymnica pospolita, dziurawiec pospolity, ślaz dziki oraz pokrzywa zwyczajna), również zaobserwowano redukcję pH w porównaniu do grupy kontrolnej NP ($P < 0,01$).

Strawność suchej masy w warunkach *in vitro* uległa statystycznie istotnej poprawie we wszystkich grupach z dodatkiem mieszanek ziołowych (MIX 1 i MIX 2), niezależnie od zakażenia pasożytem *H. contortus* ($P < 0,01$), zwiększając strawność w stosunku do grup kontrolnych.

Produkcja metanu w grupie kontrolnej ZP była mniejsza w porównaniu do grupy kontrolnej NP ($P = 0,03$). Jednak w obu grupach (ZP i NP) nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic w produkcji metanu po zastosowaniu dodatków MIX 1 i MIX 2.

Najniższe, statystycznie istotne stężenie lotnych kwasów tłuszczowych (LKT) ($P < 0,01$) odnotowano w grupie kontrolnej NP w porównaniu do wszystkich grup suplementowanych MIX 1 i MIX 2. W przypadku innych statystycznie istotnych różnic (kwas octowy, izomasłowy, izowalerianowy, walerianowy oraz stosunek kwasu octowego do propionowego) zaobserwowane różnice wynikały głównie z zakażenia *H. contortus*, a nie z zastosowania dodatków MIX 1 lub MIX 2.

Wszystkie powyższe wyniki zestawiono w Tabeli 11.

5.1.2 Wpływ mieszanek ziołowych i zakażenia *Haemonchus contortus* na populację mikroorganizmów bytujących w żywcu.

W populacji mikroorganizmów obecnych w zbuforowanym płynie żywca ogólna liczebność metanogenów w grupach ZP i NP z dodatkami MIX 1 lub MIX 2 była statystycznie istotnie niższa ($P < 0,01$) w porównaniu do grup kontrolnych ZP i NP. Liczba metanogenów w grupie kontrolnej NP wynosiła $1,07 \times 10^7/\text{ml}$, podczas gdy w grupie kontrolnej ZP była niższa i wynosiła $0,86 \times 10^7/\text{ml}$.

Całkowita liczba bakterii w grupie NP z dodatkiem MIX 2 była najniższa spośród wszystkich grup i wynosiła $4,06 \times 10^8/\text{ml}$. Względny poziom transkryptów dla *Ruminococcus albus*, *Fibrobacter succinogenes* oraz *Butyrivibrio proteoclasticus* był wyższy w grupie kontrolnej ZP w porównaniu do grupy kontrolnej NP (odpowiednio $P < 0,08$; $P < 0,01$; $P < 0,01$). W grupach ZP zastosowanie mieszanek ziół (MIX 1 lub MIX 2) spowodowało statystycznie istotną redukcję liczebności większości analizowanych bakterii. Wyjątek stanowiła populacja *B. proteoclasticus*, której liczebność statystycznie istotnie wzrosła po zastosowaniu dodatku MIX 1. Wszystkie uzyskane wyniki zostały zestawione w Tabeli 12.

5.1.3 Wpływ mieszanek ziołowych i zakażenia *Haemonchus contortus* na profil wybranych kwasów tłuszczowych w buforowanym płynie żwacza

Zaobserwowano statystycznie istotne zwiększenie zawartości kwasów tłuszczowych C18:0, C18:1 *trans*-10 oraz C18:1 *trans*-11 w grupie kontrolnej ZP w porównaniu do grupy kontrolnej NP. Odwrotne zależności zaobserwowano dla kwasów C18:1 *cis*-9 oraz C18:2 *cis*-9, *cis*-12 (Tabela 13).

W grupie NP otrzymującej MIX 2 oraz w grupach ZP przyjmujących odpowiednio MIX 1 i MIX 2, zaobserwowano zmniejszenie zawartości kwasu α -linolenowego (ALA) w porównaniu do grup kontrolnych. W grupie NP, w której zastosowano dodatki MIX 1 i MIX 2, odnotowano statystycznie istotnie ($P < 0,01$) wyższe proporcje kwasu C18:1 *trans*-11 oraz nasyconych kwasów tłuszczowych (SFA) w porównaniu do grupy kontrolnej.

W grupie NP z dodatkiem MIX 1 zaobserwowano statystycznie istotne obniżenie zawartości jednonienasyconych (UFA), wielonienasyconych (PUFA) kwasów tłuszczowych oraz kwasów z grupy n-6 w porównaniu do grupy kontrolnej.

Tabela 11. Wpływ mieszanek ziółowych i zakażenia *Haemonchus contortus* na podstawowe parametry żywca w warunkach *in vitro*.

Parametr	Grupy niezainfekowane			Grupy zainfekowane			SEM	P- value		
	Grupa kontrolna	Grupa MIX 1	Grupa MIX 2	Grupa kontrolna	Grupa MIX 1	Grupa MIX 2		Zainfekowane (I)	Grupa (G)	I x G
pH	6,24 ^a	6,21 ^a	6,08 ^b	6,12 ^b	6,04 ^b	6,04 ^b	0,01	<0,01	<0,01	0,01
IVDMD, %	53,9 ^c	62,9 ^a	62,2 ^{ab}	54,1 ^c	63,3 ^b	60,0 ^b	0,70	0,47	<0,01	0,29
NH ₃ , mM	6,06 ^b	7,32 ^a	6,63 ^{ab}	6,09 ^{ab}	6,44 ^{ab}	6,10 ^{ab}	0,13	0,08	0,03	0,29
Gaz wyprodukowany, ml	66,3 ^a	67,9 ^a	67,2 ^a	59,1 ^b	66,9 ^a	66,9 ^a	0,94	0,03	<0,01	0,02
CH ₄ , mM	0,57 ^b	0,80 ^a	0,59 ^{ab}	0,61 ^{ab}	0,46 ^b	0,71 ^{ab}	0,04	0,37	0,70	0,02
CH ₄ / gaz wyprodukowany, mM/ ml	0,008 ^{ab}	0,011 ^a	0,009 ^{ab}	0,010 ^{ab}	0,007 ^b	0,011 ^a	0,001	0,74	0,67	0,03
CH ₄ /IVDMD, mM/ml	2,51 ^{ab}	3,21 ^a	2,74 ^{ab}	2,83 ^{ab}	1,92 ^b	3,13 ^a	0,20	0,52	0,63	0,05
Profil Lotnych Kwasów Tłuszczowych (LKT)										
Koncentracja LKT, mM	52,5 ^c	57,1 ^a	55,7 ^{ab}	53,7 ^{bc}	56,0 ^{ab}	57,9 ^a	0,42	0,23	<0,01	0,17
Kwas octowy (O, %)	63,8 ^a	63,1 ^{ab}	62,9 ^{ab}	61,6 ^b	60,8 ^b	61,2 ^b	0,30	<0,01	0,32	0,88
Kwas propionowy (P, %)	20,4	20,4	20,4	21,3	22,0	21,5	0,29	0,06	0,87	0,88
Kwas izomasłowy (%)	0,28 ^b	0,35 ^{ab}	0,30 ^{ab}	0,30 ^b	0,36 ^a	0,31 ^{ab}	0,01	0,51	<0,01	1,00
Kwas masłowy (%)	13,1	13,6	13,9	13,2	13,0	13,3	0,11	0,09	0,24	0,36
Kwas izowalerianowy (%)	0,79 ^b	0,86 ^{ab}	0,83 ^{ab}	0,88 ^a	0,93 ^a	0,92 ^a	0,01	<0,01	<0,01	0,81
Kwas walerianowy (%)	1,31 ^b	1,41 ^b	1,40 ^b	2,45 ^a	2,56 ^a	2,50 ^a	0,1	<0,01	0,78	0,99
Kwas kapronowy (%)	0,25	0,29	0,28	0,36	0,38	0,37	0,02	<0,01	0,64	0,95
O:P	3,20 ^a	3,14 ^a	3,11 ^a	3,01 ^b	2,85 ^b	2,94 ^b	0,05	0,05	0,64	0,90

Średnie oznaczone małymi literami w indeksie górnym (a–d) wskazują istotne różnice przy P < 0,05; O:P- stosunek kwasu octowego do kwasu propionowego; SEM, błąd standardowy średniej,

Tabela 12. Wpływ mieszanek ziółowych i zakażenia *Haemonchus contortus* na populację mikroorganizmów bytujących w żwaczu w warunkach *in vitro*.

Mikroorganizm	Grupy niezainfekowane			Grupy zainfekowane				P- value		
	Grupa kontrolna	Grupa MIX 1	Grupa MIX 2	Grupa kontrolna	Grupa MIX 1	Grupa MIX 2	SEM	Zainfekowane (I)	Grupa (G)	I x G
Metanogeny, 10 ⁷ /ml	1,07 ^a	0,88 ^b	0,56 ^c	0,86 ^b	0,61 ^c	0,54 ^c	0,05	0,05	<0,01	0,49
Ogólna liczba bakterii	4,94 ^a	4,82 ^a	4,06 ^b	5,56 ^a	5,28 ^a	5,58 ^a	0,15	<0,01	0,47	0,31
<i>R. albus</i> , AU	1,29 ^b	1,0 ^b	0,25 ^b	11,6 ^a	0,64 ^b	bd	1,43	0,08	0,12	0,07
<i>R. flavefaciens</i> , AU	0,09	bd	0,03	0,03	bd	bd	0,03	0,48	0,43	ND
<i>F. succinogenes</i> , AU	0,58 ^c	0,50 ^c	0,19 ^c	2,95 ^a	1,7 ^b	1,38 ^b	0,29	<0,01	0,16	0,42
<i>B. proteoclasticus</i> , AU	0,79 ^c	0,05 ^c	0,13 ^c	2,93 ^b	8,87 ^a	4,26 ^b	0,66	<0,01	<0,01	<0,01
<i>B. fibrisolvens</i> , AU	2,26 ^b	4,07 ^{ab}	0,51 ^{bcd}	1,19 ^c	0,19 ^d	4,54 ^a	0,43	0,61	0,54	<0,01
Ogólna liczba pierwotniaków	67,0	66,9	68,8	71,0	68,3	74,8	0,03	0,11	0,40	0,78
<i>Holotricha</i>	0,71	0,55	0,59	0,51	0,45	0,61	1,15	0,10	0,24	0,23
<i>Entodiniomorpha</i>	66,3	66,3	68,2	70,5	67,9	74,2	1,15	0,10	0,41	0,78

Średnie oznaczone małymi literami w indeksie górnym (a–d) wskazują istotne różnice przy $P < 0,05$; SEM, błąd standardowy średniej;

bd - poniżej detekcji (ang. below detection),

AU - względna liczba kopii genu 16SrRNA wyrażona jako dowolna jednostka względem całkowitej liczebności kopii genu bakteryjnego kontrolnego,

Tabela 13. Wpływ mieszanek ziółowych i zakażenia *Haemonchus contortus* na profil wybranych kwasów tłuszczowych w warunkach *in vitro*.

Kwasy tłuszczowe, g/100 g FA	Grupy niezainfekowane			Grupy zainfekowane			SEM	P- value		
	Grupa kontrolna	Grupa MIX 1	Grupa MIX 2	Grupa kontrolna	Grupa MIX 1	Grupa MIX 2		Zainfekowane (I)	Grupa (G)	I x G
C18:0	27,1 ^b	27,2 ^b	28,6 ^b	32,5 ^a	32,1 ^a	33,4 ^a	0,40	<0,01	0,05	0,75
C18:1 <i>trans</i>-10	0,76 ^c	1,00 ^{bc}	1,09 ^{bc}	1,36 ^{ab}	1,41 ^{ab}	1,70 ^a	0,08	<0,01	0,04	0,72
C18:1 <i>trans</i>-11	2,80 ^c	4,04 ^a	4,11 ^a	3,20 ^b	3,87 ^{ab}	3,70 ^{ab}	0,09	0,70	<0,01	0,04
C18:1 <i>cis</i>-9	11,2 ^a	8,84 ^b	8,81 ^{bc}	8,26 ^{bc}	8,26 ^{bc}	8,08 ^c	0,23	<0,01	<0,01	0,05
C18:2 <i>cis</i>-9 <i>cis</i>-12	8,21 ^a	6,64 ^b	7,05 ^{ab}	6,84 ^b	6,66 ^b	6,18 ^b	0,17	0,03	0,02	0,21
C18:3 <i>cis</i>-9 <i>cis</i>-12 <i>cis</i>-15 (ALA)^a	0,50 ^a	0,45 ^a	0,15 ^b	0,47 ^a	0,16 ^b	0,13 ^b	0,04	0,04	<0,01	0,08
C18:2 <i>cis</i>-9 <i>trans</i>-11 (CLA)^b	0,94	0,84	1,10	0,81	1,00	0,94	0,04	0,50	0,16	0,11
C18:2 <i>trans</i>-10 <i>cis</i>-12	0,23	0,21	0,22	0,24	0,25	0,22	0,01	0,20	0,59	0,44
SFA^c	63,9 ^b	67,3 ^a	67,0 ^a	67,8 ^a	67,4 ^a	67,4 ^a	0,35	0,02	0,05	0,01
UFA^d	35,6 ^a	32,4 ^b	32,8 ^{ab}	31,9 ^b	32,2 ^b	31,9 ^b	0,34	0,01	0,05	0,02
MUFA^e	21,4	20,6	20,8	20,0	20,7	20,6	0,22	0,26	1,00	0,28
PUFA^f	13,7 ^a	11,8 ^b	12,0 ^{ab}	11,9 ^b	11,5 ^b	11,3 ^b	0,2	0,02	0,01	0,19
n6 FA	10,0 ^a	8,3 ^b	8,5 ^{ab}	8,3 ^b	8,2 ^{ab}	7,8 ^b	0,19	0,02	0,04	0,16
n3 FA	2,67	2,67	2,46	2,82	2,45	2,62	0,05	0,76	0,10	0,24
n6/n3 ratio	3,77 ^a	3,56 ^{ab}	3,56 ^{ab}	3,03 ^b	3,47 ^{ab}	3,14 ^{ab}	0,10	0,26	0,69	0,02
MCFA^g	37,7 ^b	40,3 ^a	38,5 ^b	35,8 ^c	35,5 ^{bc}	34,3 ^c	0,32	<0,01	0,08	0,04

Średnie oznaczone małymi literami w indeksie górnym (a–d) wskazują istotne różnice przy $P < 0,05$; SEM, błąd standardowy średniej,

a - Kwas α -linolenowy; b - kwas rumenowy/sprzężony kwas linolowy; c - nasycone kwasy tłuszczowe; d - nienasycone kwasy tłuszczowe; e - jednonienasycone kwasy tłuszczowe; f - wielonienasycone kwasy tłuszczowe; g - średniołańcuchowe kwasy tłuszczowe,

* C8:0, C10:0, C11:0, C12:0, C13:0, C14:0, C14:1, C15:0, C15:1, C16:0, C16:1, C17:0, C17:1, C18:1 *trans*-6-8, C18:1 *trans*-9, C18:1 *cis*-11, C18:1 *cis*-12, C18:1 *cis*-13, C18:1 *cis*-14, C20:0, C20:1, C18:3 n-6, C21:0, C20:2, C22:0, C20:3 n-6, C22:1 n-9, C20:3 n-3, C20:4 n-6, C23:0, C22:2, C24:0, C20:5 n-3, C24:1, C22:5 n-3, C22:6 n-3,

5.2 Doświadczenie w warunkach *in vivo* w ramach I cyklu badań

5.2.1 Wpływ mieszanek ziołowych na podstawowe parametry żywca, populację mikroorganizmów oraz profil wybranych kwasów tłuszczowych w płynie żywca u jagniąt zainfekowanych pasożytem *Haemonchus contortus*

W wyniku badań przeprowadzonych w I cyklu niniejszej pracy doktorskiej nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic ($P > 0,05$) w podstawowych parametrach płynu żywca między grupami zainfekowanymi i niezainfekowanymi pasożytem oraz otrzymującymi dodatki MIX 1 lub MIX 2 (Tabela 14).

Zaobserwowano natomiast istotny wzrost ($P < 0,01$) sumarycznej populacji bakterii u jagniąt zainfekowanych pasożytem, jak również u jagniąt niezainfekowanych, które otrzymywały dodatki MIX 1 lub MIX 2. Ponadto odnotowano statystycznie istotne różnice ($P < 0,01$) w populacji pierwotniaków *Holotricha* w grupie kontrolnej zainfekowanej pasożytem w porównaniu do grup jagniąt niezainfekowanych oraz zainfekowanych otrzymujących MIX 1 lub MIX 2 (Tabela 15).

Profil kwasów tłuszczowych nie uległ znaczącym zmianom. Zaobserwowano jedynie statystycznie istotny wzrost ($P = 0,03$) ilości średniołańcuchowych kwasów tłuszczowych w grupie kontrolnej zainfekowanej pasożytem w porównaniu do grupy otrzymującej dodatek MIX 2 (Tabela 16).

Tabela 14. Wpływ mieszanek ziółowych i zakażenia *Haemonchus contortus* na podstawowe parametry żywca w warunkach *in vivo*.

Parametr	Grupa kontrolna niezainfekowana	Grupa kontrolna zainfekowana	Grupa zainfekowana przyjmująca MIX 1	Grupa zainfekowana przyjmująca MIX 2	SEM	P-value
pH	6,75	6,49	6,62	6,85	0,06	0,17
NH ₃ , mM	9,44	8,40	8,81	8,79	0,22	0,39
CH ₄ , mM	0,39	0,40	0,42	0,40	0,01	0,96
Emisja CH ₄ , mM	19,2	19,6	21,2	19,5	0,69	0,73
Emisja H ₂ , mM	126	137	137	127	4,12	0,71
Rozkład H ₂ mM	114	123	123	114	3,71	0,71
Profil Lotnych Kwasów Tłuszczowych (LKT)						
Koncentracja LKT, mM	63,8	70,2	68,7	64,6	2,06	0,68
Kwas octowy	68,8	64,2	69,8	69,2	0,80	0,06
Kwas propionowy	18,1	20,8	17,0	17,5	0,82	0,43
Kwas izomasłowy	0,44	0,40	0,30	0,43	0,05	0,81
Kwas masłowy	10,5	11,3	10,7	10,4	0,38	0,88
Kwas izowalerianowy	0,80	0,79	0,47	0,69	0,08	0,47
Kwas walerianowy	1,26	2,31	1,69	1,61	0,14	0,08
Kwas kapronowy	0,14	0,28	0,17	0,18	0,03	0,30
A:P	3,97	3,40	4,16	4,13	0,19	0,53

Średnie oznaczone małymi literami w indeksie górnym (a,b) wskazują istotne różnice przy $P < 0,05$; SEM, błąd standardowy średniej,

Tabela 15. Wpływ mieszanek ziółowych i zakażenia *Haemonchus contortus* na mikroorganizmy bytujące w żwaczu w warunkach *in vivo*.

Mikroorganizm	Grupa kontrolna niezainfekowana	Grupa kontrolna zainfekowana	Grupa zainfekowana przyjmująca MIX 1	Grupa zainfekowana przyjmująca MIX 2	SEM	P-value
Metanogeny, 10⁷/ml	1,03	0,96	0,70	0,94	0,07	0,96
Ogólna liczba bakterii 10⁸/ml	4,65 ^b	5,95 ^a	6,06 ^a	5,98 ^a	0,20	<0,01
<i>R. albus</i>, AU*	0,02	0,03	0,05	0,05	0,01	0,10
<i>F. succinogenes</i>, AU*	0,20	0,40	0,45	0,33	0,07	0,64
<i>B. proteoclasticus</i>, AU*	0,06 ^b	0,08 ^b	0,04 ^b	0,57 ^a	0,07	<0,01
<i>B. fibrisolvens</i>, AU*	0,03	0,02	0,01	0,06	0,01	0,08
Ogólna liczba pierwotniaków, 10³/ml	45,7	40,2	66,5	71,0	5,00	0,07
<i>Holotricha</i>	45,3	39,7	66,2	70,6	5,01	0,07
<i>Entodiniomorpha</i>,	0,34 ^b	0,51 ^a	0,29 ^b	0,32 ^b	0,02	<0,01

Średnie oznaczone małymi literami w indeksie górnym (a,b) wskazują istotne różnice przy $P < 0,05$; SEM, błąd standardowy średniej,

*AU względna liczba kopii genu 16SrRNA wyrażona jako dowolna jednostka względem całkowitej liczebności kopii genu kontrolnego

Tabela 16. Wpływ mieszanek ziółowych i zakażenia *Haemonchus contortus* na profil długolącuchowych kwasów tłuszczowych w warunkach *in vivo*.

Kwasy tłuszczowe, g/100 g KT	Grupa kontrolna niezainfekowana	Grupa kontrolna zainfekowana	Grupa zainfekowana przyjmująca MIX 1	Grupa zainfekowana przyjmująca MIX 2	SEM	P-value
C18:0	27,5	30,1	29,7	26,4	1,08	0,62
C18:1 <i>trans</i>-10	0,66	0,71	0,83	0,49	0,68	0,19
C18:1 <i>trans</i>-11	2,96	2,88	3,64	2,77	0,17	0,29
C18:1 <i>cis</i>-9	9,38	9,30	8,01	7,51	0,46	0,42
C18:2 <i>cis</i>-9 <i>cis</i>-12	11,5	11,3	11,8	10,7	0,37	0,78
C18:3 <i>cis</i>-9 <i>cis</i>-12 <i>cis</i>-15 (ALA)^a	0,52	0,10	0,28	1,44	0,21	0,46
C18:2 <i>cis</i>-9 <i>trans</i>-11 (CLA)^b	1,84	3,41	1,73	1,96	0,59	0,72
C18:2 <i>trans</i>-10 <i>cis</i>-12	0,20	0,24	0,19	0,18	0,01	0,36
Pozostale*	45,4	42,0	43,8	48,6	1,37	0,11
SFA^c	61,4	61,2	62,6	63,5	1,27	0,43
UFA^d	38,6	38,8	37,4	36,5	1,27	0,43
MUFA^e	20,3	20,0	19,6	17,7	0,99	0,24
PUFA^f	18,3	18,8	17,8	18,8	0,66	0,96
n6	12,7	12,6	13,3	12,4	0,36	0,86
n3	3,61	2,90	3,06	4,43	0,23	0,07
n6/n3	3,79	4,76	4,38	2,84	0,33	0,19
MCFA^g	34,4 ^{ab}	28,1 ^b	32,8 ^{ab}	37,7 ^a	1,29	0,03

Średnie oznaczone małymi literami w indeksie górnym (a,b) wskazują istotne różnice przy $P < 0,05$; SEM, błąd standardowy średniej,

a - Kwas α -linolenowy; b - kwas rumenowy/sprzężony kwas linolowy; c - nasycone kwasy tłuszczowe; d - nienasycone kwasy tłuszczowe; e - jednonienasycone kwasy tłuszczowe; f - wielonienasycone kwasy tłuszczowe; g - średniołańcuchowe kwasy tłuszczowe,

* C8:0, C10:0, C11:0, C12:0, C13:0, C14:0, C14:1, C15:0, C15:1, C16:0, C16:1, C17:0, C17:1, C18:1 *trans*-6-8, C18:1 *trans*-9, C18:1 *cis*-11, C18:1 *cis*-12, C18:1 *cis*-13, C18:1 *cis*-14, C20:0, C20:1, C18:3 n-6, C21:0, C20:2, C22:0, C20:3 n-6, C22:1 n-9, C20:3 n-3, C20:4 n-6, C23:0, C22:2, C24:0, C20:5 n-3, C24:1, C22:5 n-3, C22:6 n-3,

5.3. Doświadczenie w warunkach *in vitro* w ramach II cyklu badań

5.3.1 Wpływ kiszonki z paulowni na podstawowe parametry żywca

W wyniku badań przeprowadzonych w II cyklu niniejszej pracy doktorskiej, w których oceniano wpływ zwiększenia udziału kiszonki z paulowni w dawce pokarmowej w warunkach *in vitro*, stwierdzono istotne różnice na poziomie zależności liniowej ($P = 0,01$) oraz kwadratowej ($P < 0,001$) dla wartości pH buforowanego płynu żywca (Tabela 17).

Analiza wariancji wykazała statystycznie istotne różnice w strawności suchej masy, której wartości rosły wraz ze wzrostem udziału kiszonki z paulowni w dawce pokarmowej, co zostało potwierdzone zależnościami kwadratowymi ($P < 0,001$). Oprócz wzrostu strawności suchej masy zaobserwowano również kwadratową zależność wzrostu stężenia amoniaku w żywcu ($P = 0,008$).

Produkcja metanu w warunkach *in vitro* uległa redukcji, co zostało potwierdzone zależnościami liniowymi i kwadratowymi zarówno dla metanu wyrażonego w mM, metanu przeliczonego na g suchej masy, jak i dla sumy wyprodukowanych gazów. W przypadku przeliczenia metanu na strawność suchej masy określoną w warunkach *in vitro*, odnotowano statystycznie istotną redukcję, potwierdzoną zarówno w analizie wariancji, jak i zależnościach kwadratowych.

Dodatkowo zwiększenie procentowego udziału kiszonki z paulowni przyczyniło się do wzrostu ogólnej koncentracji lotnych kwasów tłuszczowych, kwasu propionowego oraz kwasu masłowego, co zostało potwierdzone na poziomie analizy wariancji oraz zależności liniowych i kwadratowych (Tabela 17). W przypadku kwasów izomasłowego i izowalerianowego zaobserwowano podobne zależności, jednak prowadzące do zmniejszenia ich stężenia.

5.3.2 Wpływ kiszonki z paulowni na mikroorganizmy bytujące w żywcu

Zwiększenie udziału kiszonki z liści paulowni w dawce pokarmowej spowodowało statystycznie istotne, liniowe i kwadratowe ograniczenie populacji metanogenów oraz ogólnej liczby pierwotniaków ($P < 0,01$). Dodatkowo, w przeprowadzonym układzie doświadczalnym, zaobserwowano liniowe i kwadratowe zmniejszenie ($P < 0,01$) liczby pierwotniaków z rodzin *Ophyrosclecidae* i *Isotrichidae* (Tabela 18). Wszystkie opisane zależności zostały potwierdzone na poziomie wysoce statystycznie istotnym w analizie wariancji.

5.3.3 Wpływ kiszonki z paulowni na profil wybranych kwasów tłuszczowych

Zwiększenie udziału kiszonki z paulowni w dawkach pokarmowych zastosowanych w II cyklu badań niniejszej pracy doktorskiej spowodowało statystycznie istotne ograniczenie zawartości kwasów tłuszczowych C18:0, C18:1 *trans*-10, sumy nasyconych kwasów tłuszczowych (SFA) oraz średniołańcuchowych kwasów tłuszczowych (MCFA) (Tabela 19). Jednocześnie zaobserwowano liniowy i kwadratowy wzrost stężenia kwasu C18:1 *cis*-9 oraz kwasu α -linolenowego ($P < 0,01$). Wraz ze zwiększeniem procentowego udziału kiszonki z paulowni odnotowano również liniowy i kwadratowy wzrost sumy jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (MUFA), wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (UFA) oraz kwasów tłuszczowych z grupy n-3.

Tabela 17. Wpływ kiszonki z paulowni na podstawowe parametry żywacza - *in vitro*.

Parametr	Grupa Kontrolna (kiszonka z lucerny)	Kiszonka z lucerny z 25% dodatkiem liści paulowni	Kiszonka z lucerny z 50% dodatkiem liści paulowni	Kiszonka z lucerny z 75% dodatkiem liści paulowni	100% kiszonki z paulowni	P-ANOVA	SEM	Zależność liniowa	Zależność kwadratowa
pH	6,27	6,27	6,25	6,19	6,19	0,004	0,055	0,010	<0,001
IVDMD, %	57,8	60,7	62,3	65,4	65,5	<0,001	2,509	0,544	<0,001
NH₃, mM	13,9	14,5	14,3	14,8	15,3	0,084	1,075	0,176	0,008
Gaz wyprodukowany, ml/g DM	283	285	285	285	285	0,734	4,872	0,760	0,471
CH₄, mM	0,82	0,77	0,77	0,77	0,70	0,184	0,098	0,016	0,042
CH₄, mM/ g DM	2,05	1,91	1,92	1,93	1,74	0,184	0,244	0,039	0,042
CH₄/gaz produkowany, mM/ L	7,3	6,7	6,7	6,8	6,1	0,092	1,0	0,001	0,021
CH₄/IVDMD, mM/ g	3,56	3,15	3,15	2,97	2,66	<0,001	0,384	0,070	<0,001
Profil Lotnych Kwasów Tłuszczowych (LKT)									
Koncentracja LKT, mM	37,0	37,9	38,2	38,21	41,7	0,004	0,399	0,001	<0,001
Kwas octowy	23,2	23,7	23,8	23,2	24,4	0,678	0,271	0,410	0,383
Kwas propionowy	8,13	8,56	8,84	9,20	10,7	<0,001	0,146	<0,001	<0,001
Kwas izomasłowy	0,41	0,29	0,19	0,15	0,19	0,007	0,026	<0,001	0,008
Kwas masłowy	3,98	4,35	4,32	4,88	5,68	<0,001	0,076	<0,001	<0,001
Kwas izowalerianowy	0,82	0,60	0,65	0,44	0,46	<0,001	0,032	<0,001	<0,001
Kwas walerianowy	0,82	0,60	0,65	0,44	0,46	<0,001	0,032	<0,001	<0,001
A:P	2,86	2,78	2,71	2,54	2,32	<0,001	0,032	<0,001	<0,001

IVDMD - strawność suchej masy *in vitro*; NH₃ - amoniak; CH₄ - metan; A:P - stosunek kwasu octowego do propionowego

Tabela 18. Wpływ kiszonki z paulowni na mikroorganizmy bytujące w żwaczu - *in vitro*.

Mikroorganizm	100% kiszonki z lucerny	Kiszonka z lucerny z 25% dodatkiem liści paulowni	Kiszonka z lucerny z 50% dodatkiem liści paulowni	Kiszonka z lucerny z 75% dodatkiem liści paulowni	100% kiszonki z paulowni	P-ANOVA	SEM	Zależność liniowa	Zależność kwadratowa
<i>Metanogeny</i> , x10 ⁷ /ml	0,33	0,33	0,22	0,18	0,17	<0,001	0,01	<0,001	<0,001
Ogólna liczba bakterii, x10 ⁸ /ml	7,63	7,54	7,61	7,48	8,04	0,854	0,16	0,52	0,40
Ogólna liczba pierwotniaków, x10 ⁵ /ml	5,39	3,50	2,52	1,90	1,95	<0,001	0,191	<0,001	<0,001
<i>Ophyrosclecidae</i> , x10 ⁵ /ml	5,33	3,48	2,51	1,89	1,94	<0,001	0,184	<0,001	<0,001
<i>Isotrichidae</i> , x10 ⁵ /ml	6,44	1,60	1,02	0,93	0,81	<0,001	0,310	<0,001	<0,001

Tabela 19. Wpływ kiszonki z paulowni na profil kwasów tłuszczowych w płynie żwacza - *in vitro*.

Kwasy tłuszczowe, g/100 g FA	Grupa kontrolna (kiszonka z lucerny)	Kiszonka z lucerny z 25% dodatkiem liści paulowni	Kiszonka z lucerny z 50% dodatkiem liści paulowni	Kiszonka z lucerny z 75% dodatkiem liści paulowni	100% kiszonki z paulowni	P-ANOVA	SEM	Zależność liniowa	Zależność kwadratowa
C18:0	25,6	25,7	25,9	24,7	22,7	0,033	0,372	0,008	0,002
C18:1 trans-10	0,92	0,60	0,86	0,62	0,58	0,026	0,044	0,043	0,056
C18:1 trans-11	1,38	1,57	1,54	1,25	1,12	0,126	0,065	0,051	0,020
C18:1 cis-9	14,7	16,9	14,4	16,1	19,9	0,003	0,516	0,008	0,002
C18:2 cis-9 cis-12	8,78	9,58	8,26	9,69	11,4	0,360	0,502	0,142	0,085
C18:3 cis-9 cis-12 cis-15 (ALA)^a	0,92	1,03	1,31	1,31	1,60	0,018	0,069	<0,001	0,001
C18:2 cis-9 trans-11 (CLA)^b	0,13	0,10	0,21	0,19	0,11	0,329	0,019	0,785	0,910
C18:2 trans-10 cis-12	0,34	0,49	0,48	0,49	0,53	0,301	0,027	0,075	0,143
Pozostale*	47,2	44,0	47,0	45,7	42,1	0,081	0,942	0,182	0,234
SFA^c	63,3	58,8	62,4	60,3	55,1	0,009	0,806	0,011	0,006
UFA^d	36,7	41,3	37,7	39,7	44,9	0,009	0,8063	0,011	0,006
MUFA^e	24,6	26,8	25,2	25,6	29,4	0,012	0,483	0,015	0,006
PUFA^f	12,2	14,5	12,5	14,1	15,6	0,416	0,620	0,173	0,153
n6 FA	10,8	12,8	10,5	12,2	13,5	0,434	0,591	0,273	0,224
n3 FA	1,21	1,38	1,62	1,50	1,82	0,045	0,065	0,005	0,008
n6/n3 ratio	9,06	9,19	6,75	8,37	7,81	0,190	0,359	0,219	0,356
MCFA^g	37,8	33,5	37,2	36,8	33,2	0,002	0,497	0,131	0,093

a - Kwas α -linolenowy; b - kwas rumenowy/ sprzężony kwas linolowy; c - nasycone kwasy tłuszczowe; d - nienasycone kwasy tłuszczowe; e - jednonienasycone kwasy tłuszczowe; f - wielonienasycone kwasy tłuszczowe; g - średniołańcuchowe kwasy tłuszczowe; n6/n3 - stosunek kwasów n-6 do n-3,

* C8:0, C10:0, C11:0, C12:0, C13:0, C14:0, C14:1, C15:0, C15:1, C16:0, C16:1, C17:0, C17:1, C18:1 trans-6-8, C18:1 trans-9, C18:1 cis-11, C18:1 cis-12, C18:1 cis-13, C18:1 cis-14, C20:0, C20:1, C18:3 n-6, C21:0, C20:2, C22:0, C20:3 n-6, C22:1 n-9, C20:3 n-3, C20:4 n-6, C23:0, C22:2, C24:0, C20:5 n-3, C24:1, C22:5 n-3, C22:6 n-3,

6. Dyskusja

Wyzwania współczesnej produkcji zwierzęcej polegają nie tylko na maksymalizacji efektów produkcyjnych, ale również na minimalizowaniu negatywnego wpływu na środowisko oraz promowaniu bardziej zrównoważonych systemów chowu, które m.in. poprawiają dobrostan zwierząt. Artykuły naukowe przedstawione w dysertacji doktorskiej, obejmujące badania z I i II cyklu, wskazują na innowacyjne podejścia do realizacji tych celów. Badania te obejmują zastosowanie alternatywnych dodatków paszowych lub komponentów dawki pokarmowej, takich jak kiszonka z liści drzewa paulowni, oraz analizę ich wpływu na proces fermentacji w żwaczu jagniąt. Są one zgodne z szerokimi założeniami zrównoważonej produkcji zwierzęcej, której celem jest wprowadzenie systemów żywienia odpowiedzialnych zarówno wobec środowiska, jak i zdrowia zwierząt.

W pierwszym cyklu badań (Szulc i wsp., 2020) przeanalizowano zastosowanie mieszanek ziołowych (MIX 1 lub MIX 2) bogatych w kwasy fenolowe, flawonoidy i alkaloidy jako dodatków paszowych w dawkach pokarmowych dla jagniąt zainfekowanych nicieniami żołądkowo-jelitowymi *Haemonchus contortus*. Pasożyt ten, należący do rodziny *Haemonchidae*, jest jednym z najgroźniejszych nicieni bytujących w układzie pokarmowym małych przeżuwaczy. Bytuje w trawieńcu oraz jelitach gospodarza, gdzie żywi się krwią, co prowadzi do anemii, a w konsekwencji obniżenia jakości produktów odzwierzęcych, takich jak mleko i mięso. Takie skutki przyczyniają się do znacznych strat ekonomicznych w hodowlach (Flay i wsp., 2022; Carson i wsp., 2023).

Haemonchus contortus jest obiektem zainteresowania badaczy ze względu na narastającą oporność na dotychczas stosowane terapie. W związku z tym naukowcy coraz częściej poszukują alternatywnych, naturalnych metod eliminacji pasożyta z układu pokarmowego małych przeżuwaczy (Kłaviņa i wsp., 2021). Badania te koncentrują się na podwójnych korzyściach stosowania naturalnych dodatków: ich potencjalnych właściwościach przeciwpasożytniczych oraz wpływie na fermentację w żwaczu i populację drobnoustrojów. Wykorzystano w nich zarówno metody *in vitro*, jak i *in vivo*, aby ocenić, jak mieszanki wpływają na produkcję lotnych kwasów tłuszczowych (VFA), emisję metanu oraz metabolizm lipidów.

Doświadczenie przeprowadzone w ramach drugiego cyklu badań, opisanych w dysertacji doktorskiej (Szulc i wsp., 2024), wskazuje na potencjał kiszonki z liści paulowni (PLS) jako alternatywnego komponentu paszowego, mogącego zastąpić

tradycyjną kiszonkę z lucerny w żywieniu jagniąt. Badania wykonane w warunkach *in vitro* podkreślają zalety PLS, takie jak zwiększona wydajność fermentacji w żwaczu, zmniejszona emisja metanu oraz poprawiony profil kwasów tłuszczowych w buforowanym płynie żwacza, w szczególności zwiększenie udziału wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA), takich jak kwas C18:3 n-3. Uzyskane wyniki potwierdzają, że kiszonka z liści paulowni może być postrzegana jako zrównoważona, opłacalna i odporna na zmiany klimatu alternatywa dla kiszonki z lucerny w żywieniu jagniąt.

W pierwszym cyklu badań nie potwierdzono zakładanej hipotezy, że biologicznie aktywne substancje zawarte w zastosowanych dodatkach (MIX 1 i MIX 2) zredukują produkcję metanu u jagniąt żywionych tymi suplementami. Chociaż zaobserwowano statystycznie istotne różnice w populacji metanogenów w grupach zainfekowanych pasożytem (*Haemonchus contortus*, ZP) i niezainfekowanych (NP) z dodatkami MIX 1 lub MIX 2, różnice te nie wpłynęły istotnie na produkcję metanu. Prawdopodobną przyczyną tego wyniku była zbyt niska zawartość bioaktywnych substancji w MIX 1 i MIX 2, które bezpośrednio oddziaływałyby na proces metanogenezy, jak również niewystarczająca dawka zastosowanego dodatku (100 g SM/dzień), co mogło nie być wystarczające do uzyskania spodziewanego efektu (García-González i wsp., 2008; Patra i wsp., 2010; Bodas i wsp., 2012). Nie potwierdzono także różnic w produkcji metanu między grupami jagniąt zainfekowanych i niezainfekowanych pasożytem. Wcześniejsze badania sugerowały, że infekcje pasożytnicze u owiec mogą zwiększać emisję gazów cieplarnianych. Na przykład Houdijk i wsp. (2017) wskazali, że infekcje pasożytnicze mogą zwiększać emisję metanu nawet o 33% w porównaniu do zdrowych jagniąt (Fox i wsp., 2018). W niniejszej pracy doktorskiej tych zależności nie potwierdzono.

W cyklu II, w badaniach przeprowadzonych *in vitro* z użyciem kiszonki z liści paulowni, zaobserwowano istotną redukcję populacji metanogenów, co skutkowało zmniejszeniem produkcji metanu. Wynik ten można przypisać wysokiej zawartości związków bioaktywnych, takich jak acteozyd (6,74 mg/g SM) oraz luteolina (1,20 mg/g SM), obecnych w kiszonych liściach paulowni.

Badania wielu autorów wskazują, że flawonoidy i kwasy fenolowe, do których należą luteolina i acteozyd, mogą znacząco wpływać na mikroflorę żwacza, zmniejszając populację metanogenów i tym samym ograniczając emisję metanu (Huang i wsp., 2022; Kelly i wsp., 2023; Shilwant i wsp., 2023;).

W badaniach *in vitro* z dodatkiem mieszanek ziół zaobserwowano obniżenie wartości pH buforowanego płynu żwacza. Może to wynikać z aktywności związków zawartych w MIX 2, których stężenie było wystarczające, aby wpłynąć na ten parametr poprzez zwiększenie koncentracji lotnych kwasów tłuszczowych (LKT) w badanym płynie żwacza. Zgodnie z literaturą, infekcja pasożytem często prowadzi do podwyższenia pH płynu żwacza (Xiang i wsp., 2022), jednak w przeprowadzonych badaniach (zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*) w I cyklu tej pracy takie zjawisko nie zostało potwierdzone.

W przypadku kiszonki z liści paulowni, badania Huang i wsp. (2022) wykazały, że jej włączenie do diety krów podnosiło pH płynu żwacza, zarówno w badaniach *in vitro*, jak i *in vivo*. Natomiast w niniejszej pracy badania *in vitro* wykazały obniżenie pH wraz ze wzrostem udziału kiszonki z paulowni w dawce pokarmowej, co mogło być bezpośrednio związane ze zwiększoną koncentracją LKT. W obu cyklach badań wzrost koncentracji LKT był spowodowany zwiększoną strawnością suchej masy, która z kolei była wynikiem aktywności bakterii celulolitycznych. Choć nie zostało to potwierdzone statystycznie w badaniach z dodatkami MIX 1 i MIX 2, zaobserwowano liczbowy wzrost populacji *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* oraz *Fibrobacter succinogenes* po ich zastosowaniu.

Warto podkreślić, że wyższe stężenia biologicznie aktywnych substancji mogą zmniejszać populację drobnoustrojów bytujących w żwaczu, co potwierdzają badania Patra (2016) oraz Patra i wsp. (2019). W badaniach z udziałem kiszonki z paulowni również zaobserwowano zwiększoną strawność suchej masy, co było związane ze wzrostem populacji bakterii proteolitycznych, takich jak *Prevotella spp.* i *Butyrivibrio fibrisolvens*. Zjawisko to znalazło odzwierciedlenie w podwyższonym stężeniu amoniaku w buforowanym płynie żwacza. Wyniki te potwierdzają obserwacje przedstawione w pracy Huang i wsp. (2022) i wspierają hipotezę, że biologicznie aktywne substancje mogą wpływać na koncentrację lotnych kwasów tłuszczowych, stężenie amoniaku oraz populację bakterii (Antonius i wsp., 2023; Huang i wsp., 2022; Ku-Vera i wsp., 2020). Badania Sinz i wsp. (2018) wykazały, że biologicznie aktywne substancje, w szczególności luteolina, pozytywnie wpływają na ekosystem żwacza, redukując populację metanogenów, co prowadzi do obniżenia emisji metanu. Drugi polifenol obecny w liściach paulowni, acteozyd, w badaniach Navarrete i wsp. (2016) przyczynił się do modulowania procesów fermentacyjnych w żwaczu poprzez swoje właściwości bakteriobójcze.

Zakażenie *Haemonchus contortus* spowodowało wzrost populacji pierwotniaków w grupie kontrolnej zainfekowanej w porównaniu do grupy niezainfekowanej. Prawdopodobnie wynika to z podatności pierwotniaków z rodzin *Holotricha* i *Entodiniomorpha* na infekcję pasożytem. *H. contortus* wpływa na środowisko żwacza, zmieniając skład i różnorodność mikrobiologiczną, co ułatwia pasożytowi przetrwanie i rozmnażanie (Patra i wsp., 2017; El-Ashram i wsp., 2017). Pierwotniaki pełnią kluczową rolę w ekosystemie żwacza, tworząc mutualistyczną symbiozę z metanogenami (Newbold i wsp., 2015).

Kiszonka z liści paulowni znacząco zmniejszyła populację wybranych grup pierwotniaków (*Ophyrosclecidae*, *Isotrichidae*) oraz całkowitą liczebność pierwotniaków w żwaczu. Redukcja populacji pierwotniaków była powiązana z ograniczeniem liczby metanogenów, co potwierdzono również w wcześniejszych badaniach (Patra i wsp., 2015; Dai i wsp., 2022; Spanghero i wsp., 2022).

Skład dawki pokarmowej przeżuwaczy wpływa na profil kwasów tłuszczowych w produktach odzwierzęcych, takich jak mięso i mleko. Niektóre składniki dawki pokarmowej są bogate w kwasy tłuszczowe z grup n-3 lub n-6. W wyniku procesów biouwodorowania w żwaczu powstają izomery kwasów tłuszczowych, które mogą przechodzić bezpośrednio do mleka i mięsa lub być pośrednio syntetyzowane poprzez elongację i desaturację, zachodzące w tkankach mięśniowych lub gruczole mlekowym. Szczególne znaczenie mają sprzężone izomery kwasu linolowego (CLA) oraz kwasy tłuszczowe z grupy n-3, które wykazują działanie prozdrowotne i odgrywają istotną rolę w utrzymaniu zdrowia człowieka (Yang i wsp., 2015; Oonincx i wsp., 2020). Należy jednak pamiętać, że mięso przeżuwaczy, takie jak jagnięcina czy wołowina, charakteryzuje się niższym stosunkiem wielonienasyconych do nasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA:SFA, 0,11) w porównaniu do wieprzowiny (0,58) i drobiu (0,39–0,97; Milićević i wsp., 2014). Wynika to z procesu biouwodorowania, w którym 70–95% nienasyconych kwasów tłuszczowych jest przekształcanych w żwaczu (Urrutia i wsp., 2020).

Obecnie badacze poszukują alternatywnych źródeł składników paszowych, które pozwoliłyby zmodyfikować profil kwasów tłuszczowych i zwiększyć ich zawartość w produktach odzwierzęcych. Dodatki paszowe, takie jak polisacharydy, taniny, saponiny, fenole czy flawonoidy, mogą modulować proces biouwodorowania, wpływając na populację mikroorganizmów w żwaczu (Vasta i wsp., 2019; Makmur i wsp., 2020).

Taka modulacja może przyczynić się do zwiększenia zawartości korzystnych kwasów tłuszczowych w mięsie i mleku przeżuwaczy.

W badaniach *in vitro* z udziałem mieszanek ziół zaobserwowano, że infekcja *H. contortus* najprawdopodobniej zwiększyła mechanizmy obronne organizmu, co mogło wspomagać walkę z patogenem i przyczynić się do wzrostu populacji mikroorganizmów w żwaczu (Lanier i wsp., 2015; Palkumbura i wsp., 2024). Ponadto wykazano, że stres oksydacyjny (dane przedstawione w publikacji z cyklu I) wywołany infekcją może zmieniać metabolizm tłuszczów, wpływając na proces biouwodorowania kwasów tłuszczowych, przyspieszając ten proces lub zmieniając jego ścieżki. Infekcja pasożytem zwiększa ilość reaktywnych form tlenu, które mogą wpływać na aktywność mikroorganizmów i procesy enzymatyczne zachodzące w poszczególnych szlakach metabolicznych (Alam i wsp., 2020). Mikroorganizmy bytujące w żwaczu, w procesie syntezy nasyconych kwasów tłuszczowych (SFA), usuwają węgiel podczas konwersji końcowych produktów lipogenezy.

Zastosowanie mieszanek ziół MIX 1 lub MIX 2 wywierało różne efekty na profil kwasów tłuszczowych w płynie żwacza w warunkach *in vitro* i *in vivo*, co utrudnia jednoznaczne podsumowanie wpływu biologicznie aktywnych substancji na omawiany wskaźnik. Badania *in vivo* wykazały, że zmiany w profilu kwasów tłuszczowych zachodziły na poziomach innych niż płyn żwacza (np. w surowicy i tkance wątrobowej – dane z publikacji z cyklu I) i nie powodowały bezpośrednich zmian w poszczególnych kwasach tłuszczowych, które mogłyby świadczyć o zahamowaniu lub intensyfikacji procesu biouwodorowania w żwaczu.

W tkance mięśniowej odnotowano statystycznie istotne zmniejszenie ilości średniołańcuchowych kwasów tłuszczowych oraz zwiększenie ilości długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, co jest pozytywnym wynikiem. Zmiany te świadczą o złożoności ścieżek metabolicznych lipidów u przeżuwaczy, gdzie zmiany w profilu kwasów tłuszczowych n-3 obserwowane w wątrobie niekoniecznie przekładają się na podobne zmiany w tkance mięśniowej.

Choć wykazano statystycznie istotne zmiany w ekspresji niektórych genów odpowiedzialnych za metabolizm kwasów tłuszczowych w tkance mięśniowej, jednoznaczna interpretacja uzyskanych wyników pozostaje trudna. Najczęściej zmiany te występowały między grupą kontrolną zainfekowaną a grupą z dodatkiem MIX 2 (np. w przypadku lipazy lipoproteinowej). Ograniczone zmiany mogą wynikać z niewystarczającej ilości zastosowanych dodatków MIX 1 lub MIX 2 (100 g SM/dzień),

co przełożyło się na zbyt niską koncentrację biologicznie aktywnych substancji, aby znacząco wpłynąć na proces biouwodorowania i wywołać głębsze zmiany w profilu kwasów tłuszczowych w tkance mięśniowej

Wyniki uzyskane w II cyklu niniejszej pracy doktorskiej wskazują, że zastosowano efektywny nośnik kwasów tłuszczowych, takich jak C18:2 *cis*-9, *cis*-12 oraz C18:3 *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15. Kiszonka z liści paulowni charakteryzowała się wysokim stężeniem polifenoli oraz flawonoidów. Zaobserwowano, że zwiększenie udziału tej kiszonki w dawce pokarmowej prowadziło do wzrostu koncentracji kwasów tłuszczowych, takich jak kwas α -linolenowy, sprzężony kwas linolowy (CLA), suma nienasyconych kwasów tłuszczowych (UFA), suma jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (MUFA) oraz suma wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA). Jednocześnie odnotowano obniżenie zawartości kwasu stearynowego (C18:0) oraz sumy nasyconych kwasów tłuszczowych (SFA).

Uzyskane wyniki są zgodne z badaniami *in vivo* przeprowadzonymi przez Verę i wsp. (2023), w których wykorzystano ekstrakt z kory sosny bogaty w polifenole i taniny. W badaniach tych również odnotowano wyższe stężenie kwasów tłuszczowych n-3, co potwierdza metaanalizę przeprowadzoną przez Torres i wsp. (2022). Polifenole zawarte w kiszonce z liści paulowni najprawdopodobniej hamowały proces lipolizy lub początkowe etapy biouwodorowania, co skutkowało ograniczeniem lub zahamowaniem wzrostu lub aktywności mikroorganizmów bytujących w żwaczu. Dzięki temu zwiększyła się zawartość kwasu C18:3 *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15.

W ostatniej pracy Toral i wsp., (2024) autorzy stwierdzają, że biologicznie aktywne substancje mogą wpływać na poziom kwasu linolenowego w płynie żwacza poprzez następujące mechanizmy:

- 1) Hamowanie biouwodorowania: Kwas linolenowy jest bardzo podatny na biouwodorowanie w żwaczu, przekształcając się w produkty pośrednie, takie jak sprzężone kwasy linolenowy (CLA), a ostatecznie w kwas stearynowy (C18:0);
- 2) Biologicznie aktywne substancje, takie jak taniny, saponiny lub polifenole, mogą hamować enzymy bakteryjne biorące udział w poszczególnych etapach procesu biouwodorowania. To hamowanie powoduje gromadzenie się kwasu linolenowego lub jego produktów pośrednich w płynie żwaczowym;
- 3) Zmiany mikrobiologiczne: Skład mikrobioty żwacza determinuje szlaki biohydrogenacji kwasu linolenowego. Niektóre dodatki, takie jak probiotyki,

olejki eteryczne lub komponenty dawki pokarmowej, mogą selektywnie hamować mikroorganizmy odpowiedzialne za całkowite wysycenie wiązań nienasyconych lub promować te, które sprzyjają retencji kwasu linolenowego;

- 4) Modulacja wartości pH: pH żywca znacząco wpływa na proces biouwodorowania kwasu linolenowego. Na przykład niższe pH może spowodować ograniczenie omawianego procesu, co prowadzi do zmiany profilu izomerów powstałych w wyniku tego procesu. Stabilizacja wartości pH w żywcu za pomocą buforów lub np. zwiększenia ilości pasz objętościowych w dawkach pokarmowych może promować określone ścieżki, które powodują finalnie zwiększenie ilości kwasu linolenowego;
- 5) Bezpośrednie działanie antymikrobiologiczne: Substancje biologicznie aktywne cechują się istotnymi właściwościami antymikrobiologicznymi mogą w selektywny sposób hamować aktywność grup mikroorganizmów biorących udział w przekształcaniu kwasu linolenowego w nasycone formy kwasów tłuszczowych.

Mechanizmy te pokazują, jak modulacja dawką pokarmową za pomocą substancji biologicznie czynnych może skutecznie zwiększać poziom kwasu linolenowego w płynie żywca, co może przynieść potencjalne korzyści w postaci poprawy wartości funkcjonalnych produktów pochodzących od przeżuwaczy. Działania te, jednak nie zawsze przynoszą spektakularny efekt, a zastosowane strategie żywieniowe muszą być szczegółowo analizowane, aby móc je wprowadzić do praktyk zrównoważonej produkcji zwierzęcej.

7. Wnioski

Uzyskane wyniki badań wpisują się w cele zrównoważonej produkcji zwierzęcej, podkreślając potencjał stosowania naturalnych dodatków paszowych oraz alternatywnych komponentów paszowych w celu redukcji emisji gazów cieplarnianych i poprawy jakości produktów pochodzenia zwierzęcego. Wyniki zarówno badań *in vitro*, jak i *in vivo* wspierają główną ideę hipotezy zakładającą, że biologicznie aktywne substancje modulują procesy zachodzące w żwaczu. Efektywność procesów w dużej mierze zależy od rodzaju dawki oraz stężenia zastosowanych dodatków paszowych. Na podstawie przeprowadzonych badań sformułowano następujące wnioski:

- 1) Kiszonka z liści paulowni ograniczyła populację metanogenów i obniżyła emisję metanu w warunkach *in vitro*. Zawarte w kiszonce polifenole i flawonoidy, takie jak luteolina (6,74 mg/g SM) i acetozid (1,20 mg/g SM), wykazują zdolność bezpośredniego oddziaływania na mikroflorę żwacza, przyczyniając się do zahamowania procesów metanogenezy. Wyniki te potwierdzają skuteczność biologicznie aktywnych substancji w modulacji procesów fermentacyjnych w żwaczu.
- 2) Zwiększenie zawartości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA), w tym kwasu α -linolenowego (C18:3 n-3) w grupach z udziałem kiszonki z paulowni sugeruje, że biologicznie aktywne substancje modulują procesy biouwodorowania w żwaczu. Mechanizm ten polega prawdopodobnie na hamowaniu aktywności mikroorganizmów odpowiedzialnych za nasycanie nienasyconych wiązań tłuszczowych, co prowadzi do zwiększonej retencji PUFA w środowisku żwacza.
- 3) Stwierdzono ograniczenie populacji metanogenów w efekcie stosowania mieszanek ziołowych (MIX 1 i MIX 2, 100 g SM/ dzień), jednak redukcja emisji metanu oraz zmiany w profilu kwasów tłuszczowych były ograniczone. Przyczyną może być zbyt niska dawka bioaktywnych substancji w tych mieszankach i ich niewystarczający wpływ na mikroorganizmy zaangażowane w procesy biouwodorowania. Wyniki wskazują na potrzebę dalszych badań w kierunku optymalizacji składu i dawek mieszanek ziołowych, aby w pełni wykorzystać ich potencjał w zrównoważonej produkcji zwierzę

8. Bibliografia

- Alam, R. T. M., Hassanen, E. A. A., & El-Mandrawy, S. A. M. (2020). Haemonchus Contortus infection in sheep and goats: Alterations in haematological, biochemical, immunological, trace element, and oxidative stress markers. *Journal of Applied Animal Research*, 48(1), 357–364. <https://doi.org/10.1080/09712119.2020.1807314>
- Ammar, H., Kholif, A. E., Missaoui, M., Zoabi, H., Ghzayel, S., de Haro-Martí, M., & Chahine, M. (2023). Seasonal Variation in Chemical Composition, Ruminal Fermentation, and Biological Characteristics of *Paulownia shan tong*: In Vitro Potential Use by Sheep and Goats. *Fermentation*, 9(3), 210.
- Antonius, A., Pazla, R., Putri, E. M., Negara, W., Laia, N., Ridla, M., Suharti, S., Jayanegara, A., Asmairicen, S., Marlina, L., & Marta, Y. (2023). Effectiveness of herbal plants on rumen fermentation, methane gas emissions, in vitro nutrient digestibility, and population of protozoa. *Vet World*, 16(7), 1477–1488. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2023.1477-1488>
- AOAC (2007). W. Horwitz, W. Latimer (Eds.), Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists International (18th ed.), AOAC International, MD, Gaithersburg
- Balcells, J., Aris, A., Serrano, A., Seradj, A. R., Crespo, J., & Devant, M. (2012). Effects of an extract of plant flavonoids (Bioflavex) on rumen fermentation and performance in heifers fed high-concentrate diets. *Journal of Animal Science*, 90(13), 4975–4984.
- Berça, A. S., Tedeschi, L. O., da Silva Cardoso, A., & Reis, R. A. (2023). Meta-analysis of the relationship between dietary condensed tannins and methane emissions by cattle. *Animal Feed Science and Technology*, 298, 115564.
- Berger, L. M., Wein, S., Blank, R., Metges, C. C., & Wolffram, S. (2012). Bioavailability of the flavonol quercetin in cows after intraruminal application of quercetin aglycone and rutin. *Journal of Dairy Science*, 95(9), 5047–5055.

- Besharati, M., Maggiolino, A., Palangi, V., Kaya, A., Jabbar, M., Eseceli, H., De Palo, P., & Lorenzo, J. M. (2022). Tannin in ruminant nutrition: Review. *Molecules*, 27, 8273.
- 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. *Animal Feed Science and Technology*, 176, 78–93.
- Broгна, D. M., Nasri, S., Salem, H. B., Mele, M., Serra, A., Bella, M., ... & Vasta, V. (2011). Effect of dietary saponins from *Quillaja saponaria* L. on fatty acid composition and cholesterol content in muscle *Longissimus dorsi* of lambs. *Animal*, 5(7), 1124-1130.
- Bryszak, M., Szumacher-Strabel, M., El- Sherbiny, M., Stochmal, A., Oleszek, W., Roj, E., Patra, A.K., Cieslak, A. (2019). Effects of berry seed residues on ruminal fermentation, methane concentration, milk production, and fatty acid proportions in the rumen and milk of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 102(2), 1257-1273.
- Carson, A., Reichel, R., Bell, S., Collins, R., Smith, J., & Bartley, D. (2023). *Haemonchus contortus*: an overview. *Veterinary Record*, 192, 26-28.
- Chilliard, Y., Ferlay, A., Rouel, J., & Lamberet, G. (2003). A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. *Journal of Dairy Science*, 86(5), 1751-1770.
- Cieślak, A., Szumacher-Strabel, M., Stochmal, A., & Oleszek, W. (2013). Plant components with specific activities against rumen methanogens. *Animal: an international journal of animal bioscience*, 7, 253-265.
- Cieślak, A., Szumacher-Strabel, Z., & Stochmal, K. (2008). Tannins in plant material – a mixed blessing. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 17(2), 135-160.
- Conte, G., Dimauro, C., Daghighi, M., Serra, A., Mannelli, F., McAmmond, B. M., & Mele, M. (2022). Exploring the relationship between bacterial genera and lipid metabolism in bovine rumen. *Animal*, 16(5), 100520.

- Crozier, A., Jaganath, I. B., & Clifford, M. N. (2007). Phenols, polyphenols and tannins: An overview. In A. Crozier, M. N. Clifford, & H. Ashihara (Eds.), *Plant Secondary Metabolites* (pp. 1–24). Oxford, UK: Blackwell Publishing.
- Czerkawski, J. W. (1986). *An Introduction to Rumen Studies*. Pergamon Press, Oxford, UK.
- Daghio, M., Ciucci, F., Buccioni, A., Cappucci, A., Casarosa, L., Serra, A., & Mele, M. (2021). Correlation of breed, growth performance, and rumen microbiota in two rustic cattle breeds reared under different conditions. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 652031.
- Dai, X., Kalscheur, K. F., Huhtanen, P., & Faciola, A. P. (2022). Effects of ruminal protozoa on methane emissions in ruminants—A meta-analysis. *Journal of Dairy Science*, *105*(9), 7482–7491. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21139>
- Dewanckele, L., Jeyanathan, J., Vlaeminck, B. (2020). Identifying and exploring biohydrogenating rumen bacteria with emphasis on pathways including trans-10 intermediates. *BMC Microbiology*, *20*, 198. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01835-7>
- Drackley, J. K. (2000). Lipid metabolism. In *Farm Animal Metabolism and Nutrition* (pp. 97–119).
- Drożdżyński, P., Rutkowska, N., Rodziewicz, M., & Marchut-Mikołajczyk, O. (2024). Bioactive compounds produced by endophytic bacteria and their plant hosts—An insight into the world of chosen herbaceous ruderal plants in Central Europe. *Molecules*, *29*(18), 4456.
- El-Ashram, S., Al Nasr, I., Abouhajer, F., El-Kemary, M., Huang, G., Dinçel, G., et al. (2017). Microbial community and ovine host response varies with early and late stages of *Haemonchus contortus* infection. *Veterinary Research Communications*, *41*, 263–277. <https://doi.org/10.1007/s11259-017-9769-1>
- Flay, K. J., Hill, F. I., & Muguiro, D. H. (2022). A review: *Haemonchus contortus* infection in pasture-based sheep production systems, with a focus on the

- pathogenesis of anaemia and changes in haematological parameters. *Animals*, 12, 1238. <https://doi.org/10.3390/ani12091238>
- Fox, N. J., Smith, L. A., Houdijk, J. G. M., Athanasiadou, S., & Hutchings, M. R. (2018). Ubiquitous parasites drive a 33% increase in methane yield from livestock. *International Journal for Parasitology*, 48, 1017–1021. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.07.004>
- Francisco, A. E., Santos-Silva, J. M., Portugal, A. P., Alves, S. P., & Bessa, R. J. (2019). Relationship between rumen ciliate protozoa and biohydrogenation fatty acid profile in rumen and meat of lambs. *PLoS One*, 14(9), e0221996. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221996>
- García-González, R., López, S., Fernández, M., Bodas, R., & González, J. S. (2008). Screening the activity of plants and spices for decreasing ruminal methane production in vitro. *Animal Feed Science and Technology*, 147, 36–52. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.06.009>
- Grela, E. R., Lipiec, A., & Pisarski, R. (2001). Dodatki paszowe. W: D. Jamroz & A. Potkański (Eds.), *Żywnienie zwierząt i paszoznawstwo* (pp. 1–24). Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN.
- Hassan, F. U., Nadeem, A., Javed, M., Saif-ur-Rehman, M., Shahzad, M. A., Azhar, J., & Shokrollahi, B. (2022). Nutrigenomic interventions to address metabolic stress and related disorders in transition cows. *BioMed Research International*, 2022, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/4202075>
- He, Q., Chen, Y., Wang, Z., He, H., & Yu, P. (2023). Cellular uptake, metabolism and sensing of long-chain fatty acids. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 28(1), 10. <https://doi.org/10.2741/5000>
- Hodge, I., Quille, P., & O'Connell, S. (2024). A Review of Potential Feed Additives Intended for Carbon Footprint Reduction through Methane Abatement in Dairy Cattle. *Animals*, 14(4), 568.

- Houdijk, J. G. M., Tolkamp, B. J., Rooke, J. A., & Hutchings, M. R. (2017). Animal health and greenhouse gas intensity: The paradox of periparturient parasitism. *International Journal for Parasitology*, 47, 633–641. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.04.002>
- Huang, H., Lechniak, D., Szumacher-Strabel, M., Patra, A. K., Kozłowska, M., Kolodziejski, P., & Cieślak, A. (2022). The effect of ensiled paulownia leaves in a high-forage diet on ruminal fermentation, methane production, fatty acid composition, and milk production performance of dairy cows. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 13(1), 1-19. <https://doi.org/10.1186/s40104-022-00793-0>
- Jenkins, T. C. (1993). Lipid metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science*, 76, 3851–3863. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77660-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77660-3)
- Jenkins, T. C., Wallace, R. J., Moate, P. J., & Mosley, E. E. (2008). BOARD-Invited review: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. *Journal of Animal Science*, 86(2), 397-412. <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0417>
- Kelly, L., & Kebreab, E. (2023). Recent advances in feed additives with the potential to mitigate enteric methane emissions from ruminant livestock. *Journal of Soil and Water Conservation*, 78(2), 111-123.
- Kļaviņa, A., Keidāne, D., Šukele, R., Bandere, D., & Kovaļčuka, L. (2021). Traditional Latvian herbal medicinal plants used to treat parasite infections of small ruminants: A review. *Veterinary World*, 14(6), 1548–1558. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.1548-1558>
- Kozłowska, M., Cieślak, A., Józwick, A., El-Sherbiny, M., Gogulski, M., Lechniak, D., Gao, M., Yanza, Y. R., Vazirigohar, M., & Szumacher-Strabel, M. (2021). Effects of partially replacing grass silage by lucerne silage cultivars in a high-forage diet on ruminal fermentation, methane production, and fatty acid composition in the rumen and milk of dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, 277, 114959. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2021.114959>

- Krajowy Ośrodek Bilansowania i Zarządzania Emisjami (2023) Krajowy Raport Inwentaryzacyjny 2023, Inwentaryzacja emisji i pochłaniania gazów cieplarnianych w Polsce dla lat 1988-2021, MINISTERSTWO KLIMATU I ŚRODOWISKA, Raport syntetyczny, Warszawa, marzec 2023, 1-21
- Króliczewska, B., Pecka-Kiełb, E., & Bujok, J. (2023). Strategies used to reduce methane emissions from ruminants: Controversies and issues. *Agriculture*, 13(3), 602. <https://doi.org/10.3390/agriculture13030602>
- Ku-Vera, J.C., et al. (2020). Role of Secondary Plant Metabolites on Enteric Methane Mitigation in Ruminants. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 584. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00584>
- Lanier, S.J., & Corl, B.A. (2015). Challenges in enriching milk fat with polyunsaturated fatty acids. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 6, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s40104-015-0049-6>
- Liu, Y., & Whitman, W.B. (2008). Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1125(1), 171-189. <https://doi.org/10.1196/annals.1419.039>
- Maia, M.R.G., Wallace, R.J., Chaudhary, L.C., & Figueres, L. (2007). Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. *International Journal of General and Molecular Microbiology*, 91(4), 303-314. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.01061.x>
- Majewska, M. P., Miltko, R., Bełżecki, G., Kędzierska, A., & Kowalik, B. (2023). Rumen protozoa population and carbohydrate-digesting enzymes in sheep fed a diet supplemented with hydrolysable tannins. *Annals of Animal Science*, 23(2), 561-570.
- Makmur, M., Zain, M., Agustin, F., Sriagtula, R., & Putri, E.M. (2020). In vitro rumen biohydrogenation of unsaturated fatty acids in tropical grass-legume rations. *Veterinary World*, 13(4), 661–668. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.661-668>

- Makmur, M., Zain, M., Sholikin, M.M., & Jayanegara, A. (2022). Modulatory effects of dietary tannins on polyunsaturated fatty acid biohydrogenation in the rumen: A meta-analysis. *Helicon*, 8(7), e09828. <https://doi.org/10.1016/j.helicon.2022.e09828>
- McAllister, T.A., & Newbold, C.J. (2008). Redirecting rumen fermentation to reduce methanogenesis. *Animal Production Science*, 48, 7–13. <https://doi.org/10.1071/EA07194>
- Michałowski, T., Harmeyer, J., & Breves, G. (1986). The passage of protozoa from the reticulo-rumen through the omasum of sheep. *British Journal of Nutrition*, 56, 625–634. <https://doi.org/10.1079/BJN19860065>
- Milićević, D., Vranić, D., Mašić, Z., Parunović, N., Trbović, D., Nedeljković-Trailović, J., & Petrović, Z. (2014). The role of total fats, saturated/unsaturated fatty acids and cholesterol content in chicken meat as cardiovascular risk factors. *Lipids in health and disease*, 13, 1-12.
- Misiukiewicz, A., Gao, M., Filipiak, W., Cieślak, A., Patra, A.K., & Szumacher-Strabel, M. (2021). Methanogens and methane production in the digestive systems of nonruminant farm animals. *Animal*, 15(1), 100060. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2020.100060>
- Mitloehner, F., Kebreab, E., & Boccadoro, M. (2020). Methane, cows, and climate change: California dairy's path to climate neutrality. Davis, California. Available: 02-11-2024.
- Moon, C.D., Pacheco, D.M., Kelly, W.J., Leahy, S.C., Li, D., & Kopecny, J. (2008). Reclassification of *Clostridium proteoclasticum* as *Butyrivibrio proteoclasticus* comb. nov., a butyrate-producing ruminal bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, 2041-2045. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65440-0>
- Morgavi, D.P., Forano, E., Martin, C., & Newbold, C.J. (2010). Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal*, 4 (7), 1024–1036. <https://doi.org/10.1017/S1751731109990732>

- Moss, A.R., Jouany, J.-P., & Newbold, J. (2000). Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Annales de Zootechnie*, 49(3), 231–253. <https://doi.org/10.1051/animres:2000119>
- Navarrete, S., Kemp, P. D., Pain, S. J., & Back, P. J. (2016). Bioactive compounds, aucubin and acteoside, in plantain (*Plantago lanceolata* L.) and their effect on in vitro rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*, 222, 158-167.
- Newbold, C.J., De la Fuente, G., Belanche, A., Ramos-Morales, E., McEwan, N.R., (2015). The role of ciliate protozoa in the rumen. *Frontiers in Microbiology* 6, 1313. doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01313>.
- Nsabiyeze, A., Ma, R., Li, J., Luo, H., Zhao, Q., Tomka, J., & Zhang, M. (2024). Tackling climate change in agriculture: A global evaluation of the effectiveness of carbon emission reduction policies. *Journal of Cleaner Production*, 142973. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2024.142973>
- Oonincx, D.G.A.B., Laurent, S., Veenenbos, M.E., & van Loon, J.J.A. (2020). Dietary enrichment of edible insects with omega-3 fatty acids. *Insect Science*, 27, 500-509. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12669>
- Or-Rashid, M.M., Odongo, N.E., & McBride, B.W. (2007). Fatty acid composition of ruminal bacteria and protozoa, with emphasis on conjugated linoleic acid, vaccenic acid, and odd-chain and branched-chain fatty acids. *Journal of Animal Science*, 85(5), 1228-1234. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-537>
- Orzuna-Orzuna, J. F., Dorantes-Iturbide, G., Lara-Bueno, A., Chay-Canul, A. J., Miranda-Romero, L. A., & Mendoza-Martínez, G. D. (2023). Meta-analysis of flavonoids use into beef and dairy cattle diet: Performance, antioxidant status, ruminal fermentation, meat quality, and milk composition. *Frontiers in Veterinary Science*, 10, 142.
- Palkumbura, P.G.A.S., Mahakapuge, T.A.N., Wijesundera, R.R.M.K.K., Wijewardana, V., Kangethe, R.T., & Rajapakse, R.P.V.J. (2024). Mucosal immunity of major gastrointestinal nematode infections in small ruminants can be harnessed to develop

- new prevention strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(3), 1409. <https://doi.org/10.3390/ijms25031409>
- Patra, A., Park, T., Kim, M., & Yu, Z. (2017). Rumen methanogens and mitigation of methane emission by anti-methanogenic compounds and substances. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 8, 1–18. <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0204-5>
- Patra, A.K. (2016). Recent advances in measurement and dietary mitigation of enteric methane emissions in ruminants. *Frontiers in Veterinary Science*, 3, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fvets.2016.00005>
- Patra, A.K., & Saxena, J. (2010). A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry*, 71(11-12), 1198–1222. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.04.003>
- Patra, A.K., & Yu, Z. (2015). Effects of dietary supplementation of condensed tannins and eucalyptus oil on methane emission and microbial diversity in the rumen of beef cattle. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 6(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s40104-015-0046-6>
- Patra, A.K., Park, T., Braun, H.-S., Geiger, S., Pieper, R., Yu, Z., et al. (2019). Dietary bioactive lipid compounds rich in menthol alter interactions among members of ruminal microbiota in sheep. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00118>
- Petrič, D., Mravčáková, D., Kucková, K., Čobanová, K., Kišidayová, S., Cieślak, A., Ślusarczyk, S., & Váradyová, Z. (2020). Effect of dry medicinal plants (wormwood, chamomile, fumitory, and mallow) on in vitro ruminal antioxidant capacity and fermentation patterns of sheep. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 104, 1219–1232. <https://doi.org/10.1111/jpn.13253>
- Raes, K., De Smet, S., & Demeyer, D. (2004). Effect of dietary fatty acids on incorporation of long chain polyunsaturated fatty acids and conjugated linoleic acid in lamb, beef, and pork meat: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 113(1-4), 199–221. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2003.12.005>

- Rahmani, F., & Fattahi, M.H. (2024). Investigation of alterations in droughts and floods patterns induced by climate change. *Acta Geophysica*, 72(1), 405–418. <https://doi.org/10.1007/s11600-024-00825-3>
- Reda, I. M., Ahmed, M. A., & Fadel, M. S. (2016). Tannins and their impact on animal nutrition. *Journal of Agricultural and Veterinary Sciences*, 9(10), 35–43.
- Rising, J., Tedesco, M., Piontek, F., & Stainforth, D. A. (2022). The missing risks of climate change. *Nature*, 610(7933), 643–651.
- Shilwant, S., Hundal, J. S., Singla, M., & Patra, A. K. (2023). Ruminal fermentation and methane production in vitro, milk production, nutrient utilization, blood profile, and immune responses of lactating goats fed polyphenolic and saponin-rich plant extracts. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(4), 10901-10913.
- Shingfield, K. J., & Wallace, R. J. (2014). Synthesis of conjugated linoleic acid in ruminants and humans. In *Conjugated Linoleic Acids and Conjugated Vegetable Oils* (pp. 1–65). The Royal Society of Chemistry.
- Singh, A. S., Wadhwa, M., & Bakshi, M. P. S. (2024). Effect of supplementing herbal feed additives on the fermentation pattern and In vitro methane production by total mixed rations with different roughage to concentrate ratios. *Animal Nutrition and Feed Technology*, 24(1), 77-92.
- Sinz, S., Kunz, C., Liesegang, A., Braun, U., Marquardt, S., Soliva, C.R., Kreuzer, M., (2018). In vitro bioactivity of various pure flavonoids in ruminal fermentation, with special reference to methane formation. *Czech Journal of Animal Science* 63, 293-304. doi:<https://doi.org/10.5167/uzh-152959>.
- Spanghero, M., Braidot, M., Fabro, C., & Romanzin, A. (2022). A meta-analysis on the relationship between rumen fermentation parameters and protozoa counts in in vitro batch experiments. *Animal Feed Science and Technology*, 293, 114605. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2022.114605>
- Stobiecka, M., Król, J., Brodziak, A., Klebaniuk, R., & Kowalczyk-Vasilev, E. (2023). Effects of supplementation with an herbal mixture on the antioxidant capacity of milk. *Animals*, 13(12), 2013.

- Stocker, T. F., Qin, D., Plattner, G.-K., Alexander, L. V., Allen, S. K., Bindoff, N., Bréon, F.-M., Church, J. A., Cubasch, U., Emori, S., Forster, P., Friedlingstein, P., Gillett, N., Gregory, J. M., Hartmann, D. L., Jansen, E., Kirtman, B., Knutti, R., Krishna Kumar, K., Lemke, P., Marotzke, J., Masson-Delmotte, V., Meehl, G. A., Mokhov, I. I., Piao, S., Ramaswamy, V., Randall, D., Rhein, M., Rojas, M., Sabine, C., Shindell, D., Talley, L. D., Vaughan, D. G., & Xie, S.-P. (2013). 12.1 Introduction Technical Summary. In *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (pp. 1–121). Cambridge University Press.
- Szczechowiak, J., Szumacher-Strabel, M., El-Sherbiny, M., Pers-Kamczyc, E., Pawlak, P., & Cieslak, A. (2016). Rumen fermentation, methane concentration and fatty acid proportion in the rumen and milk of dairy cows fed condensed tannin and/or fish-soybean oils blend. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 216, 93–107.
- Szulc, P., Mravčáková, D., Szumacher-Strabel, M., Váradyová, Z., Várady, M., Čobanová, K., ... & Cieslak, A. (2020). Ruminant fermentation, microbial population and lipid metabolism in gastrointestinal nematode-infected lambs fed a diet supplemented with herbal mixtures. *PloS one*, 15(4), e0231516.
- Szulc, P., Nowak, B., Hassan, M. U., Lechniak, D., Ślusarczyk, S., Bocianowski, J., ... & Cieslak, A. (2024). Potential of Paulownia leaves silage in lamb diet to improve ruminal fermentation and fatty acid profile—an study. *Annals of Animal Science*.
- Szumacher-Strabel, M., Zmora, P., Roj, E., Stochmal, A., Pers-Kamczyc, E., Urbańczyk, A., Oleszek, W., Lechniak, D., & Cieślak, A. (2011). The potential of the wild dog rose (*Rosa canina*) to mitigate in vitro rumen methane production. *J. Anim. Feed Sci.*, 20, 285–299.
- Tedesco, D., Tava, A., Galletti, S., et al. (2004). Effects of silymarin, a natural hepatoprotector, in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 87(7), 2239–2247.
- Teuber, M. (2001). Veterinary use and antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol*, 4, 493–499.

- Thacharodi, A., Hassan, S., Ahmed, Z. T., Singh, P., Maqbool, M., Meenatchi, R., & Sharma, A. (2024). The ruminant gut microbiome vs enteric methane emission: The essential microbes may help to mitigate the global methane crisis. *Environmental Research*, 119661.
- Toral, P. G., Hervás, G., & Frutos, P. (2024). INVITED REVIEW: Research on ruminal biohydrogenation: Achievements, gaps in knowledge, and future approaches from the perspective of dairy science. *Journal of Dairy Science*.
- Torres, R. D. N. S., de Melo Coelho, L., Ghedini, C. P., Neto, O. R. M., Chardulo, L. A. L., Torrecilhas, J. A., ... & Almeida, M. T. C. (2023). Potential of nutritional strategies to reduce enteric methane emission in feedlot sheep: A meta-analysis and multivariate analysis. *Small Ruminant Research*, 220, 106919.
- Ulbricht, T. L. V., & Southgate, D. A. T. (1991). Coronary heart disease: Seven dietary factors. *The Lancet*, 338(8773), 985–992.
- Urrutia, O., Mendizabal, J. A., Alfonso, L., Soret, B., Insausti, K., & Arana, A. (2020). Adipose tissue modification through feeding strategies and their implication on adipogenesis and adipose tissue metabolism in ruminants. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9), 3183.
- Van Soest, P. V., Robertson, J. B., & Lewis, B. A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of dairy science*, 74(10), 3583-3597.
- Vasta, V. A. L. E. N. T. I. N. A., Daghighi, M. A. T. T. E. O., Cappucci, A. L. I. C. E., Buccioni, A. R. I. A. N. N. A., Serra, A., Viti, C. A. R. L. O., & Mele, M. A. R. C. E. L. L. O. (2019). Invited review: Plant polyphenols and rumen microbiota responsible for fatty acid biohydrogenation, fiber digestion, and methane emission: Experimental evidence and methodological approaches. *Journal of Dairy Science*, 102(5), 3781-3804.
- Vera, N., Suescun-Ospina, S. T., Allende, R., Gutiérrez-Gómez, C., Junod, T., Williams, P., ... & Ávila-Stagno, J. (2023). A short-term supplementation with a Polyphenol-Rich Extract from Radiata Pine Bark improves fatty acid profiles in finishing lambs. *Animals*, 13(2), 188.

- Williams, A. G., & Coleman, G. S. (1997). The rumen protozoa. In *The Rumen Microbial Ecosystem* (pp. 73–139). Springer, Dordrecht.
- Wolin, M. J. (1960). A theoretical rumen fermentation balance. *Journal of Dairy Science*, 43(10), 1452–1459.
- Xiang, H., Fang, Y., Tan, Z. L., & Zhong, R. Z. (2022). *Haemonchus contortus* infection alters gastrointestinal microbial community composition, protein digestion and amino acid allocations in lambs. *Front. Microbiol.*, 12, 797746. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.797746>
- Yang, B., Chen, H., Stanton, C., Ross, R. P., Zhang, H., Chen, Y. Q., & Chen, W. (2015). Review of the roles of conjugated linoleic acid in health and disease. *Journal of Functional Foods*, 15, 314–325. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.03.050>
- Yanza, Y. R., Szumacher-Strabel, M., Lechniak, D., Ślusarczyk, S., Kolodziejski, P., Patra, A. K., & Cieslak, A. (2022). Dietary *Coleus amboinicus* Lour. decreases ruminal methanogenesis and biohydrogenation, and improves meat quality and fatty acid composition in longissimus thoracis muscle of lambs. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 13(1), 1–19.
- Zhang, N., Wang, C., Wang, R., Liu, J., Ding, X., Bai, Y., & Zhu, W. (2018). Effects of flavonoids on rumen fermentation, nutrient digestibility, ruminal methane production and enteric methane emissions in ruminants. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 9(1), 81.

9. Spis schematów i tabel

Schemat 1. Emisja metanu (bez kategorii 4) w 2021 roku, w Polsce, na podstawie Krajowego Raportu Inwentaryzacyjnego (2023)	10
Schemat 2. Poglądowy schemat biouwodorowania kwasu oleinowego do kwasu stearynowego (Shingfield i wsp., 2014).	13
Schemat 3. Wpływ procesu biouwodorowania na zmianę profilu kwasów tłuszczowych wychwytywanych w dwunastnicy	15
Schemat 4. Desaturacja kwasów tłuszczowych	16
Tabela 1. Skrócony schemat badań wykorzystanych w doświadczeniach przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej	22
Tabela 2. Kompozycje mieszanin ziół (MIX 1).....	23
Tabela 3. Kompozycje mieszanin ziół (MIX 2).....	23
Tabela 4. Zawartość głównych związków bioaktywnych zidentyfikowanych w MIX 1 i MIX 2 analizowanych za pomocą jonizacji ujemnej.....	24
Tabela 5. Skład chemiczny oraz profil kwasów tłuszczowych zastosowanych pasz oraz dodatków mieszanin ziołowych.....	26
Tabela 6. Zawartość głównych związków bioaktywnych zidentyfikowanych w liściach paulowni.....	29
Tabela 7. Skład chemiczny oraz profil kwasów tłuszczowych kiszzonek z lucerny i liści paulowni, siana łąkowego oraz paszy treściwej	30
Tabela 8. Składniki dawki pokarmowej i ich proporcje w doświadczeniu <i>batch culture</i>	32
Tabela 9. Zestawienie sond użytych w analizie metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji <i>in situ</i> (FISH)	37
Tabela 10. Lista starterów dla bakterii biorących udział w procesie biouwodorowania	38
Tabela 11. Wpływ mieszanek ziołowych i zakażenia <i>Haemonchus contortus</i> na podstawowe parametry żywca w warunkach <i>in vitro</i>	42
Tabela 12. Wpływ mieszanek ziołowych i zakażenia <i>Haemonchus contortus</i> na populację mikroorganizmów bytujących w żywcu w warunkach <i>in vitro</i>	43
Tabela 13. Wpływ mieszanek ziołowych i zakażenia <i>Haemonchus contortus</i> na profil wybranych kwasów tłuszczowych w warunkach <i>in vitro</i>	44
Tabela 14. Wpływ mieszanek ziołowych i zakażenia <i>Haemonchus contortus</i> na podstawowe parametry żywca w warunkach <i>in vivo</i>	46

Tabela 15. Wpływ mieszanek ziołowych i zakażenia <i>Haemonchus contortus</i> na mikroorganizmy bytujące w żwaczu w warunkach <i>in vivo</i>	47
Tabela 16. Wpływ mieszanek ziołowych i zakażenia <i>Haemonchus contortus</i> na profil długołańcuchowych kwasów tłuszczowych w warunkach <i>in vivo</i>	48
Tabela 17. Wpływ kiszonki z paulowni na podstawowe parametry żwacza - <i>in vitro</i> ..	51
Tabela 18. Wpływ kiszonki z paulowni na mikroorganizmy bytujące w żwaczu - <i>in vitro</i>	52
Tabela 19. Wpływ kiszonki z paulowni na profil kwasów tłuszczowych w płynie żwacza - <i>in vitro</i>	53



Faculty of Veterinary Medicine
and Animal Science
Department of Animal Nutrition

Statement no. 1

We hereby declare the contributions of Ms. Paulina Szulc to the preparation of the manuscript titled "*Ruminal fermentation, microbial population, and lipid metabolism in gastrointestinal nematode-infected lambs fed a diet supplemented with herbal mixtures*" by P. Szulc, D. Mravčáková, M. Szumacher-Strabel, Z. Váradyová, M. Várady, K. Čobanová, L. Syahrulawal, A.K. Patra, and A. Cieslak, published in *PLoS One* 2020, 15(4), as follows:

1. Initiating the idea for the manuscript.
2. Contributing to the development of the research hypothesis.
3. Conducting in vitro experiments, including:
 - Performing basic chemical analyses,
 - Measuring ruminal pH, ammonia concentration, and volatile fatty acids,
 - Analyzing ruminal total gas production and methane concentration,
 - Determining ruminal protozoa counts,
 - Analyzing the fatty acid profiles of feed, ruminal samples, and meat.
4. Contributing to the discussion and interpretation of the results.
5. Drafting the original manuscript.

Paulina Szulc, M.Sc.,

Paulina Szulc

(Supervisor)

prof. Adam Cieślak

Adam Cieślak

Conceptualization, Investigation, Supervision, Data curation, Formal analysis, Writing - review & editing. Replying to the journal reviewer's concerns

prof. Malgorzata Szumacher

M. Szumacher

Writing - review & editing.

MVDr. Zora Váradyová, PhD.

Z. Váradyová

Conceptualisation, Project administration, Investigation, Supervision, Writing - review & editing

Marián Várady, prof. MVDr., DrSc. Conceptualisation, Project administration, Validation, and Data curation.

M. Várady



Faculty of Veterinary Medicine
and Animal Science
Department of Animal Nutrition

Statement no. 2

We hereby declare the contributions of Ms. Paulina Szulc to the preparation of the manuscript titled "*Potential of paulownia leaves silage in lamb diet to improve ruminal fermentation and fatty acid profile – an in vitro study*" by . **Szulc**, B. Nowak, M.U. Hassan, D. Lechniak, S. Ślusarczyk, J. Bocianowski, M. Szumacher-Strabel, A.K. Patra, A. Cieslak., published in *Annals of Animal Science*, 2024, 24(1), as follows:

1. Initiating the idea for the manuscript.
2. Contributing to the development of the research hypothesis.
3. Conducting in vitro experiments, including:
 - Performing basic chemical analyses,
 - Measuring ruminal pH, ammonia concentration, and volatile fatty acids,
 - Determining ruminal protozoa and methanogens counts,
 - Analyzing the fatty acid profiles of feed and ruminal samples.
4. Contributing to the discussion and interpretation of the results.
5. Drafting the original manuscript.

Paulina Szulc, M.Sc.,

Paulina Szulc

(Supervisor)

prof. Adam Cieślak

Conceptualization, Investigation, Supervision, Data curation, Formal analysis, Writing - review & editing. Replying to the journal reviewer's concerns

Adam Cieślak

inż. Bogumiła Nowak

Analyzing ruminal total gas production and methane concentration, Analyzing the fatty acid profiles of feed and ruminal samples

Bogumiła Nowak

prof Dorota Cieślak

Conceptualisation, Project administration, Investigation, Supervision, Writing - review & editing

D. Cieślak

prof. Malgorzata Szumacher

Writing - review & editing.

M. Szumacher

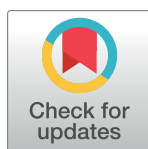
RESEARCH ARTICLE

Ruminal fermentation, microbial population and lipid metabolism in gastrointestinal nematode-infected lambs fed a diet supplemented with herbal mixtures

Paulina Szulc¹, Dominika Mravčáková², Malgorzata Szumacher-Strabel¹, Zora Váradyová², Marián Várady³, Klaudia Čobanová², Linggawastu Syahrulawal¹, Amlan Kumar Patra⁴, Adam Cieslak^{1*}

1 Department of Animal Nutrition, Poznan University of Life Sciences, Poznan, Poland, **2** Institute of Animal Physiology, Centre of Biosciences of Slovak Academy of Sciences, Košice, Slovak Republic, **3** Institute of Parasitology, Slovak Academy of Sciences, Košice, Slovak Republic, **4** Department of Animal Nutrition, West Bengal University of Animal and Fishery Sciences, Kolkata, India

* adam.cieslak@up.poznan.pl



OPEN ACCESS

Citation: Szulc P, Mravčáková D, Szumacher-Strabel M, Váradyová Z, Várady M, Čobanová K, et al. (2020) Ruminal fermentation, microbial population and lipid metabolism in gastrointestinal nematode-infected lambs fed a diet supplemented with herbal mixtures. PLoS ONE 15(4): e0231516. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231516>

Editor: Simon Russell Clegg, University of Lincoln, UNITED KINGDOM

Received: November 21, 2019

Accepted: March 21, 2020

Published: April 16, 2020

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231516>

Copyright: © 2020 Szulc et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effects of medicinal herbal mixtures rich in phenolic, flavonoid and alkaloid compounds on ruminal fermentation and microbial populations, and fatty acid (FA) concentrations and lipid oxidation in tissues of lambs infected with the gastrointestinal nematode (GIN) parasite (*Haemonchus contortus*). Parallel *in vitro* and *in vivo* studies were performed using two different herbal mixtures (Mix1 and Mix2). The *in vitro* study was conducted in a 2 (infection status; non-infected versus infected) × 3 (diets; control, Mix1 and Mix2) factorial design. In the *in vivo* study, 24 lambs were equally divided into four treatments: non-infected lambs fed a control diet, infected lambs fed the control diet, infected lambs fed a diet with Mix1 and infected lambs fed a diet with Mix2. Herbal mixtures (100 g dry matter (DM)/d) were added to the basal diets of meadow hay (*ad libitum*) and a commercial concentrate (500 g DM/d). The experimental period lasted for 70 days. Ruminal fermentation characteristics and methane production were not affected by infection *in vivo* or *in vitro*. Both herbal mixture supplementation increased total volatile fatty acid (VFA) concentrations ($P < 0.01$) and DM digestibility ($P < 0.01$) *in vitro*. *Archaea* population was slightly diminished by both herbal mixtures ($P < 0.05$), but they did not lower methane production *in vitro* or *in vivo* ($P > 0.05$). Infection of *H. contortus* or herbal mixtures modulated FA proportion mainly in the liver, especially the long chain FA proportion. Concentrations of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in serum were significantly higher after 70 days post-infection in the infected lambs. Herbal Mix1 supplementation reduced TBARS concentrations in meat after seven days of storage. In conclusion, supplementing of herbal mixtures to the diets of GIN parasite infected lambs did not affect the basic ruminal fermentation parameters. Herbal mixtures may improve few FA proportions mainly in liver as well as decrease lipid oxidation in meat.

Funding: This study was supported by funds from the Slovak Research and Development Agency (APVV 18-0131, APVV 17-0297) and by the framework of the Ministry of Science and Higher Education, Poland, programme "Regional Initiative Excellence" in years 2019-2022, Project No. 005/RID/2018/19. PSz is a PhD scholarship holder of the grant 2016/23/B/NZ9/03427 funded by National Science Center, Poland. LS has been awarded a full master degree by Ignacy Lukaszewicz scholarship from the Polish National Agency for Academic Exchange (NAWA). AC acknowledges the SAIA, n. o. (Slovak Academy Information Agency) for Academy Mobility Scholarship.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abbreviations: ADF, acid detergent fiber; AU, arbitrary unit; CLA, conjugated linoleic acid; CI, control infected; CN, control non-infected; CP, crude protein; DI, desaturation index; DM, dry matter; ELOVL5, fatty acid elongase 5 (elongase 5); FA, fatty acids; FADS1, fatty acid desaturase 1 ($\Delta 5$ -desaturase); FAME, fatty acids methyl ester; FASN, fatty acid synthase; GIN, gastrointestinal nematode; IVDMD, *in vitro* dry matter digestibility; LA, linoleic acid; LCFA, long chain fatty acids; LPL, lipoprotein lipase; M1I, Mix1 infected; M2I, Mix2 infected; MCFA, medium chain fatty acids; MDA, malondialdehyde; Mix1, infected; Mix1, herbal mixture 1; Mix1N, Mix 1 non-infected; Mix2, herbal mixture 2; Mix2I, Mix 2 infected; Mix2N, Mix2 non-infected; MUFA, monounsaturated fatty acids; NDF, neutral detergent fiber; PCR, polymerase chain reaction; PSM, plant secondary metabolites; PUFA, polyunsaturated fatty acids; RA, rumenic acid; RNA, ribonucleic acid; RT, reverse transcription; SCD, stearoyl-CoA desaturase ($\Delta 9$ -desaturase); SFA, saturated fatty acids; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances; UFA, unsaturated fatty acids; VA, vaccenic acid; VFA, volatile fatty acids.

Introduction

Gastrointestinal parasitic infections is one of the major issues impacting the health of livestock animals, especially by the most pathogenic gastrointestinal nematode (GIN) parasite *Haemonchus contortus*. This GIN sucks abomasum blood and causes anemia, reduces reproductive capacity and animal production, resulting in considerable economic losses [1,2]. Since GIN reduces productivity, infected animals require more resource input to achieve the same level of productive output compared to the non-infected animals. Ovine periparturient parasitism increases greenhouse gas intensity; and therefore gastrointestinal parasite control could improve production efficiency and decrease environmental footprints in sheep production systems [3]. Chemoprophylaxis against *H. contortus* by application of anthelmintics repeatedly poses the risk of development of anthelmintic resistance and residues in food products [4]. Therefore, there is a growing interest in feeding of diets supplemented with plant secondary metabolites (PSM) to GIN infected animals for reducing the transmission of the parasites and the diseases associated with parasites [5,6]. The use of PSM has been beneficial to treat various digestive or parasitic disorders due to their nutraceutical and anthelmintic activities. Many studies favored natural sources of PSM such as *Hypericum perforatum*, *Malva parviflora*, *Prunella vulgaris*, *Juniperus communis*, *Pinus ponderosa*, *Melissa officinalis* and *Nepeta caesarea* as well as mixed medicinal herbs to reduce the burdens of GIN [7,8]. In the earlier studies, PSM that contains phytochemical substances such as flavonoids considers as important bioactive compound as antioxidant and antimicrobial properties in the rumen [9,10]. Another bioactive compound is polyphenol known as highly abundant groups of substances found in plants that can be classified based on a simple structure, for instance, phenolic acids and more complex such as tannins [11]. Polyphenols inhibit the populations and/or activity of microbes responsible for methanogenesis and biohydrogenation by among others changing the rumen environment (pH value) and through the toxic effect on methanogens, consequently lowering methane emission and biohydrogenation rate of UFA in the rumen [12,13,14]. The degree of ruminal fatty acid (FA) saturation affects FA composition in ruminant products such as meat and milk [15,16].

The lambs used in the present study were a part of a comprehensive experiment that investigated the effects of two dry mixtures of medicinal herbs on parasitological, inflammatory, antioxidant, and fecal microbiota composition in lambs experimentally infected with *H. contortus* [17]. In the present study, we hypothesized that the dietary dry medicinal herb mixtures may affect the ruminal methane production, FA concentrations in the liver, blood, subcutaneous fat and *musculus longissimus dorsi* muscle, lipid peroxidation and oxidative stability in meat due to their inhibitory effects on the ruminal methanogens and biohydrogenating microbial population and antioxidant properties. Infections with GIN in animals causes extra endogenous protein loss and increased energy metabolism, which subsequently may alter lipid metabolism and antioxidant status [18]. The influences of GIN on FA profile have not yet been studied in GIN-infected lambs. Therefore, our objective was to assess the supplementation of two medicinal herbal mixtures on ruminal fermentation characteristics, microbial population, methane production and lipid metabolism in GIN-infected lambs.

Material and methods

Animals used and experimental design were approved by the Ethics Committee of the Institute of Parasitology of the Slovak Academy of Sciences, in accordance with European Community guidelines (EU Directive 2010/63/EU for animal experiments). Permission to collect samples and carry out the experiment was granted by the participating sheep farmers. Twenty-four Valachian female lambs with an initial mean body weight of 11.7 ± 1.23 kg and 3–4 months of

age lambs were obtained from the same farm. All animals were humanely killed at the end of the experiment (abattoir of the Centre of Biosciences of SAS, Institute of Animal Physiology, Košice, Slovakia, No. SK U 06018). The carcasses of animals were sent to the Department of Pathological Anatomy and Pathological Physiology, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice in Slovak Republic.

Diet and supplements

This study was a part of a larger study that investigated natural chemotherapeutic alternatives for controlling of haemonchosis in lambs and had been described in more detail previously [17]. Animals were fed a concentrate mixture (500 g dry matter (DM)/d), herbal mixtures (non-commercial mixtures—Mix1 and Mix2; 100 g DM/d) and meadow hay (*ad libitum*). The concentrate mixture was composed of 700 g/kg of barley, 220 g/kg of soybean meal, 48 g/kg of wheat bran, 5 g/kg of bicarbonate and 27 g/kg of mineral-vitamin premix.

Experimental design

In vitro experiment. The *in vitro* study was carried out using a batch culture system according to the modified protocol described previously [19]. Two herbal mixtures (Mix1 and Mix2) were used with 9 different herbs in each mixture. Dry herbs were obtained from commercial sources (AGROKARPATY, Plavnica, Slovak Republic and BYLINY Mikeš s.r.o., Čičenice, Czech Republic). Herbal composition of Mix1: stems of *Artemisia absinthium* L. (1%), *Fumaria officinalis* L. (13.4%), *Hyssopus officinalis* L. (13.4%), *Melissa officinalis* L. (13.4%) and *Solidago virgaurea* L. (13.4%); flowers of *Matricaria chamomilla* L. (13.4%) and *Malva sylvestris* L. (13.4%); leaves of *Plantago lanceolata* L. (13.4%) and seeds of *Foeniculum vulgare* Mill. (5%). The phytochemical substances of Mix1 contained 57.3 g/kg DM of phenolic acids and 41.5 g/kg DM of flavonoids with greater concentrations of myricetin 3-O-galactoside (20.2 g/kg DM), 1,5-dicaffeoylquinic acid (15.4 g/kg DM), 3-O-caffeoylquinic acid (11.3 g/kg DM), and dihydrocaffeoyl-4-caffeoyl quinic acid (9.72 g/kg DM) [17]. Herbal composition of Mix2: stems of *Artemisia absinthium* L. (1%), *Malva sylvestris* L. (12.4%), *Achillea millefolium* L. (12.4%), *Cichorium intybus* L. (12.4%), *Hypericum perforatum* L. (12.4%) and *Urtica dioica* L. (12.4%); flowers of *Matricaria chamomilla* L. (12.4%), *Fumaria officinalis* L. (12.4%) and *Calendula officinalis* L. (12.4%). The phytochemical substances of Mix2 contained 22.2 g/kg DM of phenolic acids and 29.5 g/kg DM of flavonoids with high concentrations of 3-O-caffeoylquinic acid (6.91 g/kg DM), 1,5-Dicaffeoylquinic acid (6.18 g/kg DM), rutin (5.73 g/kg DM) and 2-O-feruloylhydroxycitric acid (3.64 g/kg DM). Protoberberine-type alkaloids were also present in Mix1 (1.4 g/kg DM) and Mix2 (1.33 g/kg DM) [17].

For the *in vitro* study, the ruminal content was collected from the top, bottom and middle of the rumen of each lamb separately. The fresh ruminal content was collected at a slaughter house from six control non-infected (CN) and six control infected (CI) lambs with two CN and two CI at each run. Infection status was identified at autopsy by observing the *H. contortus* worms after the opening of the abomasum. The *in vitro* study was completed in three runs and total 12 lambs were used. The same diet was used as a control in the *in vivo* trial. After slaughtering of lambs, rumen digesta was taken from different parts (top, bottom and middle) of the rumen. The experiment was conducted in a 2 infection status (non-infection and infection) × 3 diets (control, Mix1 and Mix2) factorial arrangement with following 6 treatments: Control diet with non-infection (CN), Mix1 diet with non-infection (Mix1N), and Mix2 diet with non-infection (Mix2N), Control diet with infection (CI), Mix1 diet with infection (Mix1I), and Mix2 diet with infection (Mix2I). Ruminal content was squeezed through a four-layer cheese-cloth into two separate Schott Duran® bottles (SCHOTT North America, Inc. Corporate

Office, Elmsford, NY 10523, USA) and immediately transported to the laboratory in a 39 °C preheated water bath. Two bottles were used for collecting rumen fluid separately for CN and CI. Five replicate bottles in each treatment (6 treatments × 5 bottles) were used in three consecutive runs. The ruminal fluid was diluted with buffer solution at a ratio of 1:4, and buffered fluid was transferred to the bottles with prepared substrates anaerobically. The control groups (CN and CI) contained 400 mg of substrate (252 mg DM of hay and 148 mg DM of the commercial concentrate). For the herbal mixture, 36 mg DM (9% of 400 mg substrate) of Mix1 or Mix2 was further added to the 400 mg substrate. The bottles with buffered ruminal fluid and substrate were filled with CO₂, closed with rubber stoppers and sealed with aluminum cups. Then the bottles were incubated in an incubator (Galaxy 170R, Eppendorf North America Inc., Hauppauge, NY) for 24 h at a temperature of 39 °C in an anaerobic condition with periodical mixing of the contents.

***In vivo* experiment.** Based on the *in vitro* results, the *in vivo* experiment was designed. Twenty-four Improved Valachian female lambs with an initial mean body weight of 11.7 ± 1.23 kg and 3–4 months of age were kept in stalls for 15 d for adaptation to the diet. During the whole experiment, lambs had free access to drinking tap water. After the adaptive period, the lambs were divided into four treatment groups (n = 6): non-infected control group (CN), GIN-infected group fed with the control diet (CI), infected group fed the control diet supplemented with Mix1 (M1I) or Mix2 (M2I). Lambs were infected orally with 5000 third-stage larvae of the MHco1 (strain of *H. contortus*), which is susceptible to all main classes of anthelmintics. Infection increased egg counts in the infected animals as shown previously [17]. Lambs were fed with a basal diet of meadow hay *ad libitum* and a commercial concentrate at 500 g DM/day in the control groups for the growth rate of 150 g/d (Table 1). Commercial concentrate was composed of 700 g/kg of barley, 220 g/kg of soybean meal, 48 g/kg of wheat bran, 5 g/kg of bicarbonate and 27 g/kg of mineral-vitamin premix. In the herbal mixture groups, Mix1 and Mix2 were additionally fed at 100 g dry matter (DM)/day to the M1I and M2I lambs, respectively. The experimental period was 70 days (during summer), and the animals were housed on a sheep farm.

Sample analysis

Chemical composition of feed. Chemical composition of dietary ingredients was analyzed in triplicates by standard procedures [20]. The dry matter (DM) content was determined by drying the samples at 105 °C for 48 h in a hot air oven. The ash content was determined by burning the samples at 550 °C for 12 h (method no. 942.05) in a muffle furnace (Nabertherm, LT 40/12, GmbH, Lilienthal, Germany). Nitrogen (N) content (method no. 968.06) was determined using a FLASH 400 Analyzer (Thermo Fisher Scientific, Cambridge, UK). Crude protein (CP) content was calculated by multiplying the N content by 6.25 (method no. 990.03). The acid-detergent fiber (ADF) and neutral detergent fiber (NDF) contents were determined as described previously [21] by using a FiberCap system (FiberCap™ 2021/2023, FOSS Analytical AB, Höganäs, Sweden). In forages (i.e., meadow hay, Mix1 and Mix2), NDF was assayed without a heat-stable amylase and expressed inclusive of residual ash. In concentrate, NDF was assayed with a heat-stable amylase and expressed inclusive of residual ash. ADF was expressed inclusive of residual ash.

Basic ruminal fermentation. After 24 h of *in vitro* incubation, the volume of accumulated gas released from the batch culture was determined from the recorded pressure or the volume of gas produced after 24 h of fermentation using a mechanical manometer fitted to a transducer (Premagas, Stará Turá, Slovak Republic). Analysis of gas production was carried out by gas chromatography using a PerkinElmer Clarus 500 gas chromatograph (Perkin Elmer, Inc.,

Table 1. Chemical composition and fatty acid profile of the diets.

Item	Meadow hay	Concentrate	Mix1	Mix2
Main chemical composition, g/kg DM				
CP	163	309	160	180
aNDF	825	140	500	460
ADF	500	90	360	350
Ash	39	29	110	110
Fatty acid proportion, g/100 g of FA				
C12:0	1.06	0.11	0.12	0.41
C14:0	0.90	0.34	0.36	1.57
C16:0	18.6	14.0	12.5	25.0
C18:0	5.09	2.26	3.22	8.84
C18:1 <i>cis</i> -9	14.5	19.4	22.3	8.8
C18:2 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12	36.3	55.6	26.9	25.3
C18:3 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 <i>cis</i> -15 (ALA) ^a	9.50	2.46	11.9	9.28
C20:3n-6	1.95	0.23	1.04	0.78
C20:5n-3 (EPA) ^b	0.19	0.05	0.19	0.09
C22:5n-3 (DPA) ^c	0.35	0.06	0.22	0.42
C22:6n-3 (DHA) ^d	1.21	0.20	0.30	0.42
Other FA ^e	10.3	5.29	20.9	19.1
SFA ^f	29.4	18.0	17.9	37.8
UFA ^g	70.6	82.0	82.1	62.2
MUFA ^h	20.7	22.9	41.1	26.0
PUFA ⁱ	49.8	59.2	41.0	36.2
n-6	38.6	56.4	28.4	26.3
n-3	25.9	22.2	12.6	9.84

^a ALA, [α]-Linolenic acid.^b EPA, Eicosapentaenoic acid.^c DPA, Docosapentaenoic acid.^d DHA, Docosahexaenoic acid.^e Other FA, (C10:0, C14:1, C15:1, C16:1, C18:1 *c*11, C20:0, C22:1 *n*-9, C22:0, C23:0, C24:1)^f SFA, Saturated fatty acids.^g UFA, Unsaturated fatty acids.^h MUFA, Monounsaturated fatty acids.ⁱ PUFA, Polyunsaturated fatty acids.<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231516.t001>

Shelton, CT, USA). The ruminal fluid was then collected from each bottle for analysis of pH, volatile fatty acids (VFA) and ammonia concentrations, and ruminal microorganism populations (bacteria, protozoa, and methanogens). For the *in vivo* experiment, ruminal fluid samples were collected immediately after slaughtering the animals. The pH value was measured immediately after sample collection using a pH meter (CP-104; Elmetron, Zabrze, Poland). Methane concentration from *in vitro* samples was determined by gas chromatography on PerkinElmer Clarus 500 gas chromatograph (Perkin Elmer, Inc., Shelton, USA) as described previously [22]. In the *in vivo* study, methane production was calculated measuring the molar proportion of VFA in the rumen as follow: 57.5 mol glucose = 65 mol acetate + 20 mol propionate + 15 mol butyrate + 60 mol CO₂ + 35 mol CH₄ + 25 mol H₂O. [23]. The concentration of ammonia-N was determined in the inocula by the phenol-hypochlorite method [24]. The VFA samples were analyzed by gas chromatography (PerkinElmer Clarus 500 gas chromatograph,

Perkin Elmer, Inc., Shelton, USA) as described previously [22]. The *in vitro* DM digestibility (IVDMD) and volume of accumulated gas were determined as described previously [22].

Rumen microbial quantification. The total protozoa count in collected ruminal fluid was determined according to the previous method [25]. For bacterial quantification, DNA from the ruminal samples were isolated using a Mini Bead-Beater (BioSpec, Bartlesville, OK, USA) for cell lysis, followed by purification (QIAamp DNA Stool Mini Kit; Qiagen, Hilden, Germany) [26]. DNA concentrations and quality were measured with NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). The primers for the targeted species were *Butyrivibrio proteoclasticus* (F: CCTAGTGTAGCGGTGAAATG⁺, R: TTAGCGACGGCACTGAATGCCTA) [27], *Butyrivibrio fibrisolvens* (F: ACACACCGCCCGTCACA, R: TCCTTACGGTTGGGTCACAGA) [28], *Ruminococcus flavefaciens* (F: CGAACGGAGATAA TTTGAGTTTACTTAGG, R: CGGTCTCTGTATGTTATGAGGTATTACC) [29], *Fibrobacter succinogenes*, (F: GTTCGGAATTACTGGGCGTAAA, R: CGCCTGCCCTGAACTATC) [29], and *Ruminococcus albus* (F: CCCTAAAAGCAGTCTTAGTTTCG, R: CCTCCTTGCGGTTAG AACA) [30] for the quantitative PCR method. For the total bacteria, the following primers were used (F: GTGATGCATGGTTGTCGTCA, R: GAGGAAGGTGKGGATGACGT) [31].

Methanogens and total bacteria were quantified by the fluorescence *in situ* hybridization technique [32]. The rumen fluid (50 µl) was diluted in phosphate-buffered saline and pipetted onto 0.22 µm polycarbonate filters (Frisentte K02BP02500) and vacuumed (Vaccum KNF Vacuport-Neuberg). The filters were transferred onto a cellulose disk for dehydration in an ethanol concentration at different level (500, 800, and 900 ml/L) for 3 min. Hybridization was carried out in 50 µl of hybridization buffer (0.9 M NaCl; 20 mM Tris/HCl, pH 7.2; 0.1 g/L of SDS) containing oligonucleotide probes (all methanogens (S-D-Arch-0915-a-A-20) and two order-specific probes: S-O-Mmic-1200-a-A-21) (*Methanomicrobiales*) and S-F-Mbac-0310-a-A-22 (*Methanobacteriales*) [33]. The filters were washed with washing buffer (20 mM Tris/HCl, pH 7.2; 0.1 g/L of SDS; 5 mM EDTA) for 20 minutes at 48 °C. The filters were then rinsed gently in distilled water, air-dried and mounted on object glasses with VectaShield (Vector laboratories nr. H-1000) anti-fading agent containing DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). To distinguish the total count of bacteria (DAPI) from other methanogens in the rumen fluid, filters were maintained at 4 °C for 1 h in the dark until visualization using an Axio Imager M2 microscope (Carl Zeiss Iberia, Madrid, Spain).

Fatty acids extraction and analysis. On the last day of experiment, the lambs were slaughtered and samples from *longissimus dorsi* muscle, subcutaneous fat and liver were collected. The muscle samples (approximately 200 g) were collected from the right side of each carcass and drawn at the level of 13th thoracic rib. Samples of subcutaneous fat and liver were lyophilized by freezing, vacuuming and drying the samples (Epsilon 2-10D LSCplus, CHRIST, Germany). Samples of muscle were lyophilized after removing the epimysium. All collected samples were stored at -80 °C until lipid extraction [34]. The FA concentrations in feeds, liver, muscle, and subcutaneous fat [15], ruminal fluid [13] and blood [35] were determined using standard protocols [15]. FA were identified and quantified based on peaks and retention times by comparing FA sample target with appropriate fatty acids methyl ester (FAME) standards (37 FAME Mix, Sigma-Aldrich) and the concentrations of CLAs were determined using a CLA standard (a mixture of cis 9, trans 11 and trans 10, cis 12-octadecadienoic acid methyl esters; Sigma-Aldrich) using a Galaxie Work Station 10.1 (Varian, CA).

Gene expression with RT-qPCR. Samples of *longissimus dorsi* muscle were collected immediately after slaughter and shock frozen in liquid nitrogen. Relative transcript abundances of five lipogenic genes such as lipoprotein lipase (LPL), fatty acid synthase (FASN), stearoyl-CoA desaturase (SCD), fatty acid desaturase 1 (FADS1), fatty acid elongase 5 (ELOVL5) were measured by real-time PCR method as described previously [10]. The

muscle samples were homogenized in 1 ml TriPure reagent (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) using Tissue Lyser II (Qiagen, USA). Then the RNA isolation was performed following the protocol provided by the manufacturer. Briefly, 200 μ l of chloroform (Sigma Aldrich, Hamburg, Germany) was added into tubes and shaken. After 10 min, samples were centrifuged (15 min) at 12,000 g speed. The clear phase was transferred to a new tube and added with 0.5 ml isopropanol (Sigma Aldrich, Hamburg, Germany). Then probes were centrifuged (15 min) at 12 000 g speed once again. RNA pellets were washed with 750 ml/L of ethanol (POCH, Gliwice, Poland), centrifuged for the third time (10 min at 9000 g) and dried at 40 °C thermoblock (Eppendorf, Hamburg, Germany). The RNA was then resuspended in DEPC treated water (Invitrogen, Carlsbad, USA) for spectrophotometric measurement (Nanodrop c2000, Thermo Scientific, USA) of concentration and purity. A reverse transcription reaction (RT) was performed using a Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) according to the procedures described by the manufacturer. Each sample was adjusted to equal concentrations of RNA. Briefly, RNA (300 ng), random hexamers (60 μ M), oligodT (2.5 mM) and water were mixed and denatured at 65 °C for 10 min. Reverse transcriptase and RNase inhibitor buffer were then added to the RNA mix to a final volume of 20 μ l. The RT conditions were as follows: 25 °C for 5 min, followed by 42 °C for 45 min and 85 °C for 5 min. The gene expression of FA synthase (FASN), lipoprotein lipase (LPL), stearoyl-CoA desaturase (SCD), FA desaturase 1 (FADS1) and FA elongase 5 (ELOVL5) were measured in muscle. Primer pairs for RT-qPCR amplification were designed based on previously published oligonucleotides [36] and synthesized by Sigma-Aldrich (USA). Only standard curves with an efficiency of at least 1.9 were considered optimized for the reaction in particular conditions. RT-qPCR amplification was performed in duplicate on a Light Cycler 480 instrument (Roche Diagnostics, Germany) using Light Cycler Sybr Green 480 I Master (Bio-Rad, USA). The RT-qPCR mix (10 μ l per sample) contained 2 μ l of nuclease-free water, 2 μ l of primers mix, 5 μ l Sybr Green Master mix and 1 μ l of cDNA. The RT-qPCR conditions were as follows: 95 °C, 5 min (pre-incubation); 40 cycles of: 95 °C, 5 s (denaturation); 60 °C, 12 s (primer annealing and elongation); 65–97 °C (PCR product melting). For each RT-qPCR run, a negative control sample (without cDNA) was also added. After each analysis, melting curves were checked to exclude any potential sample contamination. Relative gene expression was evaluated by delta delta CT ($\Delta\Delta$ CT) with Gapdh/beta actin as a reference.

Blood analyses. Blood samples were collected from the jugular vein of each animal on day 22, 37, 51 and 70 into 10-ml serum-separator tubes (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Germany) and centrifuged at 1200 g for 10 min at room temperature. From all collected days, the serum samples were used for lipid peroxidation. For FA analysis, sera from day 70 were used. The sera were stored at—80 °C until analysis.

Lipid oxidation. The left *m. longissimus dorsi* muscle samples were excised within 15 min after the slaughter and were immediately vacuum packed. Meat oxidative stability was monitored in the muscle samples that were stored at 4 °C for 0, 1 or 7 days. The standard curve of malondialdehyde prepared by hydrolysis of 1,1,3,3,-tetraethoxypropane (Sigma-Aldrich) was used to assess the lipid oxidation by the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) method as described previously [37].

Calculations

The desaturase [38], atherogenic [39] and thrombogenic [21] indices were calculated from the FA profile. Methane and hydrogen production, and hydrogen utilization were estimated based on stoichiometry calculations [23].

Statistical analysis. All data were analyzed using SAS statistical software (Univ. Edition, version 9.4) [40]. In experiment 1 (*in vitro* study), data were analyzed using PROC MIXED procedure with models containing treatment group, infection, and their interaction as fixed factors and each consecutive run was considered as a random factor. In experiment 2 (*in vivo* study), data except for the lipid peroxidation were analyzed with one way ANOVA model with PROC GLM procedure. Two-way ANOVA (GraphPad Prism, GraphPad Software, Inc., San Diego, USA) was used for the analysis of lipid oxidation in serum and meat to test the effect of dietary treatment and the time of sampling/storage, as well as their interaction. The significant differences among treatment groups were tested with Tukey post-hoc test ($P < 0.05$). All values are shown as the means with pooled standard errors of means.

Results

In vitro experiment

The pH decreased due to infection ($P < 0.01$), but Mix2N group had also decreased the pH compared to the CN ($P = 0.01$; Table 2). The IVDMD of Mix1N, Mix2N, Mix1I, and Mix2I was improved compared to either the non-infected or infected control ($P < 0.01$). The gas produced in CI decreased compared to CN ($P = 0.03$), but was similar in the infected and non-infected groups supplemented with Mix1 and Mix2 ($P = 0.02$). Mix1N group produced more methane compared to CN and Mix1I ($P < 0.02$). However, methane production in Mix1I was lower than the Mix1N and Mix2I when CH_4 was expressed as CH_4/gas produced and CH_4/IVDMD ($P = 0.03$ and $P = 0.05$, respectively). Concentrations of total VFA were lower in CN group compared with the groups supplemented with Mix1 and Mix2 ($P < 0.01$). The acetic acid proportion decreased in all infected groups compared to the non-infected control ($P < 0.01$), but the iso-valerate and valerate concentrations in all infected groups increased compared to the CN.

Regarding the ruminal microbial activity, the *Archaea* populations of Mix1 and Mix2 in both non-infected and infected animals were lower compared to the CN ($P < 0.01$). Total bacterial abundance in the Mix2N group was lower compared to all groups ($P < 0.05$). The relative abundance of *R. albus* tended to increase in CI compared to the CN ($P < 0.08$). Also, *F. succinogenes* abundance was higher in infected groups ($P < 0.01$) and significantly lower in Mix1N and Mix2N. The relative abundance of *B. proteoclasticus* was higher in the Mix1I compared to the CI or CN and also to other groups. In contrast, the *B. fibrisolvens* of the Mix1I was lower than in CI and CN and also than other groups ($P < 0.01$).

Regarding the FA concentration in the buffered rumen fluid, major changes occurred due to the infection for C16:0, C18:0, C18:1 *trans*-10, C18:1 *trans*-11, C18:2 *cis*-9 *cis*-12; docosapentaenoic acid (DPA), docosahexaenoic acid (DHA), saturated FA (SFA), UFA, PUFA, n6 FA, n6/n3 ratio, medium chain FA (MCFA), and long chain FA (LCFA) (Table 3). The lower proportions of α -linolenic acid (ALA) were found in rumen fluid treated with Mix2N, Mix1I and Mix2I compared to the CN and the CI. Herbal mixtures changed the FA concentration in the ruminal fluid. The C18:1 *trans*-11 and the SFA proportions of all herbal groups with infected and non-infected were higher compared to CN ($P < 0.01$); whereas higher UFA proportions of CN were noted compared to other groups except for the Mix2N ($P = 0.02$).

In vivo experiment

There were no significant differences ($P > 0.05$) among the groups for ruminal fermentation characteristics in lambs (Table 4). The bacteria population (*B. fibrisolvens*, *R. albus* and *F. succinogenes*) of the infected lambs fed with control diet as well as infected lambs treated with Mix1 and Mix2 diets increased ($P < 0.01$); however other bacterial populations did not differ among the treatment groups except *B. proteoclasticus*, which had higher relative abundance in

Table 2. The effect of herbal mixtures and infection on the rumen fermentation and microbial populations *in vitro*.

Parameter ^a	Non-infected			Infected ^b			SEM	P		
	CN	Mix1N	Mix2N	CI	Mix1I	Mix2I		I	G	I×G
pH	6.24 ^a	6.21 ^a	6.08 ^b	6.12 ^b	6.04 ^b	6.04 ^b	0.01	<0.01	<0.01	0.01
IVDMD, %	53.9 ^c	62.9 ^a	62.2 ^{ab}	54.1 ^c	63.3 ^a	60.0 ^b	0.70	0.47	<0.01	0.29
NH ₃ , mM	6.06 ^b	7.32 ^a	6.63 ^{ab}	6.09 ^{ab}	6.44 ^{ab}	6.10 ^{ab}	0.13	0.08	0.03	0.29
Gas produced, ml	66.3 ^a	67.9 ^a	67.2 ^a	59.1 ^b	66.9 ^a	66.9 ^a	0.94	0.03	<0.01	0.02
CH ₄ , mM	0.57 ^b	0.80 ^a	0.59 ^{ab}	0.61 ^{ab}	0.46 ^b	0.71 ^{ab}	0.04	0.37	0.70	0.02
CH ₄ /Gas produced, mM/ml	0.008 ^{ab}	0.011 ^a	0.009 ^{ab}	0.010 ^{ab}	0.007 ^b	0.011 ^a	0.001	0.74	0.67	0.03
CH ₄ /IVDMD, mM/g	2.51 ^{ab}	3.21 ^a	2.74 ^{ab}	2.83 ^{ab}	1.92 ^b	3.13 ^a	0.20	0.52	0.63	0.05
Total VFA, mM	52.5 ^c	57.1 ^a	55.7 ^{ab}	53.7 ^{bc}	56.0 ^{ab}	57.9 ^a	0.42	0.23	<0.01	0.17
Acetate, mol/100 mol	63.8 ^a	63.1 ^{ab}	62.9 ^{ab}	61.6 ^b	60.8 ^b	61.2 ^b	0.30	<0.01	0.32	0.88
Propionate, mol/100 mol	20.4	20.4	20.4	21.3	22.0	21.5	0.29	0.06	0.87	0.88
Isobutyrate, mol/100 mol	0.28 ^b	0.35 ^{ab}	0.30 ^{ab}	0.30 ^b	0.36 ^a	0.31 ^{ab}	0.01	0.51	<0.01	1.00
Butyrate, mol/100 mol	13.1	13.6	13.9	13.2	13.0	13.3	0.11	0.09	0.24	0.36
Isovalerate, mol/100 mol	0.79 ^b	0.86 ^{ab}	0.83 ^{ab}	0.88 ^a	0.93 ^a	0.92 ^a	0.01	<0.01	<0.01	0.81
Valerate, mol/100 mol	1.31 ^b	1.41 ^b	1.40 ^b	2.45 ^a	2.56 ^a	2.50 ^a	0.1	<0.01	0.78	0.99
Caproate, mol/100 mol	0.25	0.29	0.28	0.36	0.38	0.37	0.02	<0.01	0.64	0.95
A:P	3.2 ^a	3.14 ^a	3.11 ^a	3.01 ^b	2.85 ^b	2.94 ^b	0.05	0.05	0.64	0.90
Archaea, 10 ⁷ /ml	1.07 ^a	0.88 ^b	0.56 ^c	0.86 ^b	0.61 ^c	0.54 ^c	0.05	0.05	<0.01	0.49
Total bacteria, 10 ⁸ /ml	4.94 ^a	4.82 ^a	4.06 ^b	5.56 ^a	5.28 ^a	5.58 ^a	0.15	<0.01	0.47	0.31
<i>R. albus</i> , AU ^c	1.29 ^b	1.0 ^b	0.25 ^b	11.63 ^a	0.64 ^b	bd	1.43	0.08	0.12	0.07
<i>R. flavefaciens</i> , AU	0.09	Bd	0.03	0.03	bd	bd	0.03	0.48	0.43	ND
<i>F. succinogenes</i> , AU	0.58 ^c	0.50 ^c	0.19 ^c	2.95 ^a	1.7 ^b	1.38 ^b	0.29	<0.01	0.16	0.42
<i>B. proteoclasticus</i> , AU	0.79 ^c	0.05 ^c	0.13 ^c	2.93 ^b	8.87 ^a	4.26 ^b	0.66	<0.01	<0.01	<0.01
<i>B. fibrisolvens</i> , AU	2.26 ^b	4.07 ^{ab}	0.51 ^{bcd}	1.19 ^c	0.19 ^d	4.54 ^a	0.43	0.61	0.54	<0.01
Total protozoa, 10 ³ /ml	67.0	66.9	68.8	71.0	68.3	74.8	0.03	0.11	0.40	0.78
Holotricha, 10 ³ /ml	0.71	0.55	0.59	0.51	0.45	0.61	1.15	0.10	0.24	0.23
Entodiniomorpha, 10 ³ /ml	66.3	66.3	68.2	70.5	67.9	74.2	1.15	0.10	0.41	0.78

Within each row, means with lower case superscripts (a–d) indicate significant differences at $P < 0.05$; SEM, standard error of the mean.

^aIVDMD, *in vitro* dry matter digestibility; VFA, volatile fatty acids; bd, below detection.

^bControl non-infected (CN); Mix 1 non-infected (Mix1N); Mix2 non-infected (Mix2N); Control infected (CI); Mix1 infected (Mix1I); Mix 2 infected (Mix2I); I, infected; G, group.

^cAU, The relative 16S rRNA gene copy abundance expressed as an arbitrary unit relative the total bacterial gene copy abundance of the control.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231516.t002>

the infected M2I group ($P < 0.01$). The population of *Holotricha* was higher in the CI than other groups ($P < 0.01$).

The FA proportions in the ruminal fluid, blood, as well as in the liver, subcutaneous fat and *m. longissimus dorsi* varied. The proportions of C15:0 and C17:0 in the rumen were higher in M2I lambs compared with the CI lambs whereas the proportions of C14:1 and C17:1 in the rumen were higher in M2I lambs compared with the CI and CN lambs ($P < 0.05$; Table 5). The ruminal MCFA proportion of CI was lower than the M2I ($P = 0.03$). By contrast, ruminal LCFA proportion was higher in the CI lambs than in the M2I lambs ($P = 0.03$).

In the serum from lambs fed Mix2, C15:0, C16:0, C16:1, C18:1 *trans*-6-8, ALA, C18:2 *trans*-10 *cis*-12, and MCFA proportions were higher compared to the CI group (Table 6). The M2I had lower proportions of C18:1 *cis*-11 and C18:2 *cis*-9 *cis*-12 in serum compared to other groups, which led to the lowered PUFA and LCFA proportions. The serum from lambs fed Mix1 and Mix2 had the lowest n6/n3 FA ratio compared to the CI ($P < 0.001$).

Table 3. The effect of herbal mixtures and infection on ruminal fatty acid proportions (g/100 g FA) *in vitro*.

Fatty acids, g/100 g FA	Non-infected			Infected ^a			SEM	P value		
	CN	Mix1N	Mix2N	CI	Mix1I	Mix2I		I	G	I×G
Saturated										
C8:0	0.11 ^{ab}	0.14 ^a	0.11 ^{ab}	0.08 ^b	0.12 ^{ab}	0.10 ^{ab}	0.01	0.14	0.04	0.83
C10:0	0.07 ^{ab}	0.08 ^a	0.06 ^{ab}	0.05 ^b	0.06 ^{ab}	0.04 ^{ab}	0.004	0.01	0.13	0.98
C12:0	1.03 ^{ab}	1.18 ^a	0.89 ^b	1.05 ^{ab}	1.05 ^{ab}	0.84 ^b	0.03	0.42	0.02	0.57
C13:0	8.66 ^{ab}	9.72 ^a	8.91 ^{ab}	7.82 ^b	7.89 ^{ab}	7.47 ^b	0.20	<0.01	0.37	0.50
C14:0	1.59	1.79	1.74	1.77	1.90	1.89	0.04	0.06	0.09	0.90
C15:0	1.39	1.54	1.53	1.46	1.42	1.34	0.03	0.15	0.69	0.11
C16:0	22.7 ^a	23.5 ^a	23.1 ^a	21.2 ^b	21.1 ^b	20.8 ^b	0.18	<0.01	0.50	0.36
C17:0	0.96 ^{ab}	1.06 ^a	1.09 ^a	0.88 ^b	0.89 ^b	0.94 ^{ab}	0.02	<0.01	0.02	0.35
C18:0	27.1 ^b	27.2 ^b	28.6 ^b	32.5 ^a	32.1 ^a	33.4 ^a	0.40	<0.01	0.05	0.75
Monounsaturated										
C14:1	0.58	0.71	0.68	0.71	0.74	0.69	0.02	0.12	0.11	0.23
C15:1	1.04	1.20	1.08	1.10	1.14	1.16	0.02	0.53	0.17	0.44
C16:1	0.61 ^a	0.42 ^b	0.43 ^b	0.47 ^b	0.42 ^b	0.38 ^b	0.02	0.04	<0.01	0.13
C17:1	0.23	0.19	0.17	0.22	0.21	0.27	0.01	0.06	0.61	0.08
C18:1 <i>trans</i> -6-8	0.47	0.51	0.53	0.47	0.45	0.56	0.01	0.64	0.02	0.42
C18:1 <i>trans</i> -9	0.45 ^b	0.46 ^b	0.51 ^{ab}	0.63 ^a	0.54 ^{ab}	0.67 ^a	0.02	<0.01	0.20	0.51
C18:1 <i>trans</i> -10	0.76 ^c	1.00 ^{bc}	1.09 ^{bc}	1.36 ^{ab}	1.41 ^{ab}	1.70 ^a	0.08	<0.01	0.04	0.72
C18:1 <i>trans</i> -11	2.80 ^c	4.04 ^a	4.11 ^a	3.20 ^b	3.87 ^{ab}	3.70 ^{ab}	0.09	0.70	<0.01	0.04
C18:1 <i>cis</i> -9	11.2 ^a	8.84 ^b	8.81 ^{bc}	8.52 ^{bc}	8.26 ^{bc}	8.08 ^c	0.23	<0.01	<0.01	0.05
C18:1 <i>cis</i> -11	1.24 ^c	1.33 ^{abc}	1.41 ^{abc}	1.32 ^{bc}	1.55 ^a	1.44 ^{ab}	0.02	0.01	<0.01	0.17
C18:1 <i>cis</i> -12	0.23 ^b	0.30 ^{ab}	0.35 ^a	0.29 ^{ab}	0.37 ^a	0.35 ^a	0.01	0.01	<0.01	0.18
C18:1 <i>cis</i> -13	0.18	0.18	0.21	0.16	0.19	0.14	0.01	0.03	0.74	0.10
C18:1 <i>cis</i> -14	0.37 ^b	0.39 ^{ab}	0.43 ^{ab}	0.45 ^a	0.47 ^a	0.46 ^a	0.01	<0.01	0.19	0.52
Polyunsaturated										
C18:2 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12	8.21 ^a	6.64 ^b	7.05 ^{ab}	6.84 ^b	6.66 ^b	6.18 ^b	0.17	0.03	0.02	0.21
C18:3 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 <i>cis</i> -15 (ALA) ^b	0.50 ^a	0.45 ^a	0.15 ^b	0.47 ^a	0.16 ^b	0.13 ^b	0.04	0.04	<0.01	0.08
C18:2 <i>cis</i> -9 <i>trans</i> -11 (RA/CLA) ^c	0.94	0.84	1.10	0.81	1.00	0.94	0.04	0.50	0.16	0.11
C18:2 <i>trans</i> -10 <i>cis</i> -12	0.23	0.21	0.22	0.24	0.25	0.22	0.01	0.20	0.59	0.44
C18:3n6	0.17	0.17	0.16	0.14	0.13	0.16	0.01	0.02	0.76	0.43
C20:2	0.06	0.04	0.05	0.06	0.05	0.05	0.01	0.63	0.57	0.94
C20:3n6	1.24 ^a	1.09 ^{ab}	0.87 ^b	0.88 ^b	0.99 ^{ab}	1.04 ^{ab}	0.04	0.21	0.47	0.01
C20:4n6	0.06	0.05	0.07	0.06	0.04	0.05	0.003	0.13	0.15	0.23
C20:5n3 (EPA) ^d	0.16	0.12	0.11	0.10	0.11	0.16	0.01	0.63	0.75	0.04
C22:2	0.06	0.05	0.06	0.05	0.05	0.03	0.003	0.02	0.62	0.28
C22:5n3 (DPA) ^e	0.42 ^a	0.21 ^{ab}	0.23 ^{ab}	0.20 ^b	0.29 ^{ab}	0.33 ^{ab}	0.03	0.88	0.59	0.01
C22:6n3 (DHA) ^f	1.68 ^b	1.91 ^{ab}	2.00 ^{ab}	2.05 ^a	1.84 ^{ab}	2.00 ^{ab}	0.04	0.25	0.42	0.04
SFA ^g	63.9 ^b	67.3 ^a	67.0 ^a	67.8 ^a	67.4 ^a	67.4 ^a	0.35	0.02	0.05	0.01
UFA ^h	35.6 ^a	32.4 ^b	32.8 ^{ab}	31.9 ^b	32.2 ^b	31.9 ^b	0.34	0.01	0.05	0.02
MUFA ⁱ	21.4	20.6	20.8	20.0	20.7	20.6	0.22	0.26	1.00	0.28
PUFA ^j	13.7 ^a	11.8 ^b	12.0 ^{ab}	11.9 ^b	11.5 ^b	11.3 ^b	0.21	0.02	0.01	0.19
n6 FA	10.0 ^a	8.3 ^b	8.5 ^{ab}	8.3 ^b	8.2 ^{ab}	7.8 ^b	0.19	0.02	0.04	0.16
n3 FA	2.67	2.67	2.46	2.82	2.45	2.62	0.05	0.76	0.10	0.24
n6/n3 ratio	3.77 ^a	2.95 ^{ab}	3.56 ^{ab}	3.03 ^b	3.47 ^{ab}	3.14 ^{ab}	0.10	0.26	0.69	0.02
MCFA ^k	37.7 ^b	40.3 ^a	38.5 ^b	35.8 ^c	35.5 ^{bc}	34.3 ^c	0.32	<0.01	0.08	0.04

(Continued)

Table 3. (Continued)

Fatty acids, g/100 g FA	Non-infected			Infected ^a			SEM	P value		
	CN	Mix1N	Mix2N	CI	Mix1I	Mix2I		I	G	I×G
LCFA ^l	61.7 ^{bc}	59.4 ^c	61.3 ^{bc}	64.0 ^a	64.1 ^{ab}	65.0 ^a	0.32	<0.01	0.11	0.11

Within each row, means with lower case superscripts (a–c) indicate significant differences at $P < 0.05$; SEM, standard error of the mean.

^a Control non-infected (CN); Mix 1 non-infected (Mix1N); Mix2 non-infected (Mix2N); Control infected (CI); Mix1 infected (Mix1I); Mix 2 infected (Mix2I); I, infected; G, group.

^b ALA, [α]-Linolenic acid.

^c RA/CLA, Rumenic acid/Conjugated linoleic acid.

^d EPA, Eicosapentaenoic acid.

^e DPA, Docosapentaenoic acid.

^f DHA, Docosahexaenoic acid.

^g SFA, Saturated fatty acids.

^h UFA, Unsaturated fatty acids.

ⁱ MUFA, Monounsaturated fatty acids.

^j PUFA, Polyunsaturated fatty acids.

^k MCFA, Medium chain fatty acids.

^l LCFA, Long chain fatty acids.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231516.t003>

In the liver of animals fed both herbal mixtures, proportions of C16:0, C16:1, and MCFA, and DI (16:1/16) decreased compared to CN and CI (Table 7). However, the increased ALA, n3 FA, LCFA proportions ($P < 0.01$) in M1I and M2I compared to the CI group were observed.

Among the various FA profiles in the *longissimus dorsi* muscle, significant ($P < 0.03$) changes in C16:0 in M2I and C20:5 n-3 in M1I compared to CN were noticed. The MCFA significantly decreased ($P < 0.01$) compared to CN and CI and LCFA significantly increased ($P < 0.02$) in the M1I and M2I compared to CI (Table 8).

The subcutaneous fat from M2I group was characterized by higher proportions of C15:0, C14:1, C18:1 *cis*-12, and C18:1 *cis*-14 compared to the CN and CI (Table 9). The M1I group had higher proportions of C18:0 compared only to the CI ($P < 0.05$). Both herbal mixture groups had higher proportions of C18:1 *cis*-14 and α -linolenic acid (ALA) in the subcutaneous fat. The M2I group had decreased MUFA proportion and CI (MUFA/SFA), and M1I group had decreased n6/n3 ratio compared to the CI group.

The CN and M2I groups had lower relative transcript abundances of LPL compared with the CI group ($P = 0.01$) (Table 10). Lower relative transcript abundances of FASN in the CN lambs compared to the M2I lambs ($P = 0.03$) and lower relative transcript abundances of SCD in the CN lambs compared with the M1I lambs ($P = 0.04$) were observed. Also, lower relative transcript abundances of FADS1 in the M2I group compared to the M1I group ($P < 0.01$) were detected. The gene expression of ELOVL5 was not changed in any group.

The TBARS level in serum was influenced by time ($P < 0.001$), with significantly higher values after 70 days post-infection in the CI lambs compared with the CN lambs (Table 11). The TBARS levels in the meat were also affected by the time of storage ($P < 0.001$) and by the groups, which was higher in the CI group compared to CN and M1I groups ($P < 0.05$).

Discussion

It is well known that gastrointestinal endoparasites increase metabolic and nutritional demand of the host, which is manifested by impaired growth, productivity, reproductive ability and

Table 4. The effect of herbal mixtures on rumen fermentation and microbial populations in lambs with *H. contortus* infection.

Item	CN ^a	CI ^a	M1I ^a	M2I ^a	SEM	P value
pH	6.75	6.49	6.62	6.85	0.06	0.17
NH ₃ , mM	9.44	8.40	8.81	8.79	0.22	0.39
CH ₄ , mM	0.39	0.40	0.42	0.40	0.01	0.96
CH ₄ production, mM	19.2	19.6	21.2	19.5	0.69	0.73
H ₂ production, mM	126	137	137	127	4.12	0.71
H ₂ utilization, mM	114	123	123	114	3.71	0.71
Total VFA, mM	63.8	70.2	68.7	64.6	2.06	0.68
Acetate, mol/100 mol	68.8	64.2	69.8	69.2	0.80	0.06
Propionate, mol/100 mol	18.1	20.8	17.0	17.5	0.82	0.43
Isobutyrate, mol/100 mol	0.44	0.40	0.30	0.43	0.05	0.81
Butyrate, mol/100 mol	10.5	11.3	10.7	10.4	0.38	0.88
Isovalerate, mol/100 mol	0.80	0.79	0.47	0.69	0.08	0.47
Valerate, mol/100 mol	1.26	2.31	1.69	1.61	0.14	0.08
Caproate, mol/100 mol	0.14	0.28	0.17	0.18	0.03	0.30
A:P ratio	3.97	3.40	4.16	4.13	0.19	0.53
Archaea, 10 ⁷ / ml	1.03	0.96	0.70	0.94	0.07	0.96
Total bacteria, 10 ⁸ /ml	4.65 ^b	5.95 ^a	6.06 ^a	5.98 ^a	0.20	<0.01
<i>B. fibrisolvens</i> , AU ^b	0.03	0.02	0.01	0.06	0.01	0.08
<i>B. proteoclasticus</i> , AU	0.06 ^b	0.08 ^b	0.04 ^b	0.57 ^a	0.07	<0.01
<i>R. albus</i> , AU	0.02	0.03	0.05	0.05	0.01	0.10
<i>F. succinogenes</i> , AU	0.20	0.40	0.45	0.33	0.07	0.64
Total protozoa, 10 ⁴ /ml	45.7	40.2	66.5	71.0	5.00	0.07
Entodiniomorpha, 10 ⁴ /ml	45.3	39.7	66.2	70.6	5.01	0.07
Holotricha, 10 ⁴ /ml	0.34 ^b	0.51 ^a	0.29 ^b	0.32 ^b	0.02	<0.01

Within each row, means with lower case superscripts (a,b) indicate significant differences at $P < 0.05$; SEM, standard error of the mean.

^aControl non-infected (CN); Control infected (CI); Mix1 infected (M1I); Mix2 infected (M2I).

^bAU, The relative 16S rRNA gene copy abundance expressed as an arbitrary unit relative the total bacterial gene copy abundance of the control.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231516.t004>

Table 5. The effect of herbal mixtures on fatty acid proportions in ruminal fluid (g/100 g FA) in lambs with *H. contortus* infection.

Fatty acids, g/100 g FA	CN ^a	CI ^a	M1I ^a	M2I ^a	SEM	P value
Saturated						
C8:0	0.05	0.04	0.04	0.05	0.00	0.64
C10:0	0.03	0.03	0.04	0.04	0.01	0.91
C12:0	0.65 ^a	0.43 ^b	0.42 ^b	0.49 ^{ab}	0.03	0.02
C13:0	3.36	2.89	4.64	6.05	0.63	0.18
C14:0	1.10	0.95	0.88	1.06	0.08	0.82
C15:0	1.62 ^{ab}	1.18 ^b	1.70 ^{ab}	2.19 ^a	0.13	0.02
C16:0	24.9	23.0	22.8	24.7	0.86	0.32
C17:0	0.78 ^{ab}	0.74 ^b	0.86 ^{ab}	0.93 ^a	0.03	0.04
C18:0	27.5	30.1	29.7	26.4	1.08	0.62
Monounsaturated						
C14:1	0.94 ^b	0.72 ^b	1.03 ^b	1.39 ^a	0.07	<0.01
C15:1	1.34	1.11	1.05	1.40	0.07	0.22
C16:1	0.45	0.33	0.34	0.40	0.02	0.20
C17:1	0.22 ^b	0.23 ^b	0.24 ^{ab}	0.31 ^a	0.01	0.02

(Continued)

Table 5. (Continued)

Fatty acids, g/100 g FA	CN ^a	CI ^a	M1I ^a	M2I ^a	SEM	P value
C18:1 <i>trans</i> -6-8	0.32	0.55	0.45	0.25	0.08	0.57
C18:1 <i>trans</i> -9	0.38	0.56	0.43	0.30	0.05	0.35
C18:1 <i>trans</i> -10	0.66	0.71	0.83	0.49	0.68	0.19
C18:1 <i>trans</i> -11	2.96	2.88	3.64	2.77	0.17	0.29
C18:1 <i>cis</i> -9	9.38	9.30	8.01	7.51	0.46	0.42
C18:1 <i>cis</i> -11	1.05	1.30	1.04	0.93	0.08	0.36
Polyunsaturated						
C18:2 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12	11.5	11.3	11.8	10.7	0.37	0.78
C18:3 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 <i>cis</i> -15 (ALA) ^a	0.52	0.10	0.28	1.44	0.21	0.46
C18:2 <i>cis</i> -9 <i>trans</i> -11(RA/CLA) ^b	1.84	3.41	1.73	1.96	0.59	0.72
C18:2 <i>trans</i> -10 <i>cis</i> -12	0.20	0.24	0.19	0.18	0.01	0.36
C18:3n6	0.10	0.08	0.06	0.11	0.01	0.32
C20:2	0.21	0.07	0.01	0.14	0.04	0.42
C20:3n6	0.66	0.68	0.83	1.14	0.08	0.15
C20:4n6	0.08	0.09	0.06	0.08	0.01	0.58
C20:5n3 (EPA) ^d	0.08	0.07	0.06	0.03	0.01	0.30
C22:2	0.07	0.05	0.08	0.05	0.00	0.16
C22:5n3 (DPA) ^e	0.19	0.17	0.22	0.15	0.03	0.84
C22:6n3 (DHA) ^f	2.51	2.13	2.19	2.81	0.13	0.21
SFA ^g	61.4	61.2	62.6	63.5	1.27	0.43
UFA ^h	38.6	38.8	37.4	36.5	1.27	0.43
MUFA ⁱ	20.3	20.0	19.6	17.7	0.99	0.24
PUFA ^j	18.3	18.8	17.8	18.8	0.66	0.96
n6 FA	12.7	12.6	13.3	12.4	0.36	0.86
n3 FA	3.61	2.90	3.06	4.43	0.23	0.07
n6/n3	3.79	4.76	4.38	2.84	0.33	0.19
MCFA ^k	34.4 ^{ab}	28.1 ^b	32.8 ^{ab}	37.7 ^a	1.29	0.03
LCFA ^l	65.5 ^{ab}	71.8 ^a	67.1 ^{ab}	62.2 ^b	1.30	0.03

Within each row, means with lower case superscripts (a–c) indicate significant differences at $P < 0.05$; SEM, standard error of the mean.

^a Control non-infected, CN; Control infected, CI; Mix1 infected, M1I; Mix2 infected, M2I.

^b ALA, [α]-Linolenic acid.

^c RA/CLA, Rumenic acid/Conjugated linoleic acid.

^d EPA, Eicosapentaenoic acid.

^e DPA, Docosapentaenoic acid.

^f DHA, Docosahexaenoic acid.

^g SFA, Saturated fatty acids.

^h UFA, Unsaturated fatty acids.

ⁱ MUFA, Monounsaturated fatty acids.

^j PUFA, Polyunsaturated fatty acids.

^k MCFA, Medium chain fatty acids.

^l LCFA, Long chain fatty acids.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231516.t005>

reduction in feed intake up to 20–25% [41]. Limited research is available on the effect of the GIN infection affecting ruminal fermentation and lipid metabolism profile in small ruminants. Also, periparturient parasitism in sheep may increase greenhouse gas emission [3]. A recent study showed that parasite infections in lambs can increase in methane yield (g CH₄/kg) by

Table 6. The effect of herbal mixture on fatty acid proportions (g/100 g FA) in the serum of lambs with *H. contortus* infection.

Fatty acids, g/100 g FA	CN ^a	CI ^a	M1I ^a	M2I ^a	SEM	P value
Saturated						
C8:0	0.11	0.06	0.11	0.22	0.02	0.14
C10:0	0.31	0.35	0.41	0.39	0.04	0.86
C12:0	0.18	0.14	0.37	0.52	0.07	0.18
C14:0	0.49	0.28	0.40	0.65	0.06	0.14
C15:0	0.56 ^{ab}	0.45 ^b	0.69 ^{ab}	1.11 ^a	0.09	0.03
C16:0	13.4 ^b	12.0 ^b	11.0 ^b	17.5 ^a	0.65	<0.01
C17:0	0.59	0.42	0.44	0.85	0.07	0.13
C18:0	12.8	15.3	15.7	13.5	0.66	0.36
Monounsaturated						
C14:1	0.24	0.20	0.39	0.43	0.05	0.28
C15:1	0.19	0.10	0.19	0.34	0.03	0.09
C16:1	1.35 ^{ab}	0.97 ^b	0.39 ^b	1.68 ^a	0.13	<0.01
C17:1	0.52	0.49	0.45	0.58	0.04	0.71
C18:1 <i>trans</i> - 6–8	0.16 ^b	0.10 ^b	0.20 ^b	0.47 ^a	0.04	<0.01
C18:1 <i>trans</i> - 9	0.07	0.09	0.10	0.16	0.01	0.13
C18:1 <i>trans</i> - 10	0.18	0.35	0.24	0.46	0.06	0.45
C18:1 <i>trans</i> - 11	0.48	0.74	0.91	0.92	0.08	0.13
C18:1 <i>cis</i> -9	20.0 ^{ab}	17.6 ^{ab}	15.9 ^b	20.4 ^a	0.64	0.02
C18:1 <i>cis</i> -11	3.26 ^a	3.49 ^a	2.49 ^a	1.17 ^b	0.24	<0.01
C18:1 <i>cis</i> -12	0.58	0.67	0.54	0.35	0.05	0.19
C18:1 <i>cis</i> -13	0.13	0.16	0.13	0.12	0.02	0.95
C18:1 <i>cis</i> -14	0.21	0.17	0.21	0.31	0.03	0.52
Polyunsaturated						
C18:2 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12	31.1 ^a	34.3 ^a	33.1 ^a	22.5 ^b	1.29	<0.01
C18:3 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 <i>cis</i> -15 (ALA) ^b	2.50 ^{bc}	1.95 ^c	3.14 ^{ab}	3.50 ^a	0.17	<0.01
C18:2 <i>cis</i> -9 <i>trans</i> -11(RA/CLA) ^c	0.09	0.10	0.09	0.16	0.01	0.41
C18:2 <i>trans</i> -10 <i>cis</i> -12	0.14 ^{ab}	0.11 ^b	0.20 ^{ab}	0.29 ^a	0.02	0.02
C18:3n6	0.10	0.09	0.11	0.19	0.02	0.05
C20:2	0.17	0.13	0.21	0.12	0.02	0.14
C20:3n6	4.33	4.28	5.41	4.53	0.21	0.15
C20:4n6	0.31	0.14	0.20	0.23	0.05	0.72
C20:5n3 (EPA) ^d	0.29	0.29	0.35	0.25	0.03	0.72
C22:2	0.25	0.15	0.19	0.22	0.03	0.70
C22:5n3 (DPA) ^e	1.06	1.04	1.54	1.35	0.08	0.04
C22:6n3 (DHA) ^f	0.27	0.33	0.29	0.30	0.04	0.98
SFA ^g	30.3	30.4	30.6	36.6	1.04	0.07
UFA ^h	69.7	69.6	69.4	63.4	1.04	0.07
MUFA ⁱ	29.0 ^a	26.7 ^{ab}	24.5 ^b	29.8 ^a	0.68	0.01
PUFA ^j	40.7 ^{ab}	42.9 ^a	44.9 ^a	33.6 ^b	1.32	<0.01
n6 FA	36.7 ^a	39.6 ^a	39.6 ^a	28.0 ^b	1.39	<0.01
n3 FA	4.12 ^{ab}	3.61 ^b	5.32 ^a	5.40 ^a	0.23	<0.01
n6/n3	9.15 ^{ab}	11.2 ^a	7.59 ^{bc}	5.32 ^c	0.57	<0.01
MCFA ^k	16.4 ^b	14.1 ^b	13.4 ^b	22.2 ^a	0.88	<0.01
LCFA ^l	83.2 ^a	85.4 ^a	86.1 ^a	77.2 ^b	0.89	<0.01
Desaturation index						
DI (16:1/16)	0.09 ^a	0.07 ^a	0.03 ^b	0.09 ^a	0.01	<0.01

(Continued)

Table 6. (Continued)

Fatty acids, g/100 g FA	CN ^a	CI ^a	M1I ^a	M2I ^a	SEM	P value
DI (18:1/18)	0.38	0.46	0.50	0.40	0.02	0.03
DI (MUFA/SFA)	0.49	0.47	0.44	0.45	0.01	0.25
DI(20:4n6/20:3n6)	0.06	0.04	0.04	0.05	0.01	0.74
DI (20:4n6/18:3n6)	0.63	0.59	0.62	0.55	0.04	0.90
DI (22:6n3/22:5n3)	0.19	0.23	0.15	0.18	0.02	0.66
Thrombogenic index	0.61	0.64	0.57	0.70	0.03	0.36
Atherogenicity index	0.42	0.41	0.41	0.54	0.02	0.12

Within each row, means with lower case superscripts (a–c) indicate significant differences at $P < 0.05$; SEM, standard error of the mean.

^a Control non-infected, CN; Control infected, CI; Mix1 infected, M1I; Mix2 infected, M2I.

^b ALA, [α]-Linolenic acid.

^c RA/CLA, Rumenic acid/Conjugated linoleic acid.

^d EPA, Eicosapentaenoic acid.

^e DPA, Docosapentaenoic acid.

^f DHA, Docosahexaenoic acid.

^g SFA, Saturated fatty acids.

^h UFA, Unsaturated fatty acids.

ⁱ MUFA, Monounsaturated fatty acids.

^j PUFA, Polyunsaturated fatty acids.

^k MCFA, Medium chain fatty acids.

^l LCFA, Long chain fatty acids.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231516.t006>

Table 7. The effect of herbal mixture on fatty acid proportions (g/100 g FA) in the liver of lambs with *H. contortus* infection.

Fatty acids, g/100 g FA	CN ^a	CI ^a	M1I ^a	M2I ^a	SEM	P value
Saturated						
C8:0	0.06	0.07	0.05	0.05	0.01	0.78
C10:0	0.06	0.11	0.06	0.04	0.01	0.10
C12:0	0.21	0.24	0.17	0.14	0.02	0.45
C13:0	0.16	0.11	0.12	0.13	0.02	0.80
C14:0	0.66 ^a	0.51 ^{ab}	0.33 ^b	0.42 ^{ab}	0.04	0.01
C15:0	0.56	0.43	0.47	0.52	0.03	0.36
C16:0	13.1 ^a	13.6 ^a	11.1 ^b	11.1 ^b	0.34	<0.01
C17:0	1.55	1.45	1.32	1.36	0.05	0.44
C18:0	18.9 ^c	19.3 ^{bc}	21.7 ^{ab}	21.9 ^a	0.43	0.01
Monounsaturated						
C14:1	0.16	0.11	0.15	0.16	0.02	0.62
C15:1	0.17	0.13	0.19	0.19	0.01	0.36
C16:1	1.52 ^a	1.49 ^a	0.39 ^b	0.49 ^b	0.15	<0.01
C17:1	0.78 ^{ab}	0.82 ^a	0.47 ^b	0.51 ^{ab}	0.05	0.01
C18:1 <i>trans</i> -6-8	0.24 ^b	0.39 ^a	0.27 ^{ab}	0.19 ^b	0.02	0.01
C18:1 <i>trans</i> -9	0.29	0.35	0.24	0.24	0.02	0.10
C18:1 <i>trans</i> -10	0.25	1.13	0.42	0.20	0.14	0.05
C18:1 <i>trans</i> -11	0.61	0.70	1.05	0.85	0.08	0.21
C18:1 <i>cis</i> -9	16.6	17.1	13.3	15.0	0.56	0.06
C18:1 <i>cis</i> -11	1.45 ^{ab}	1.67 ^a	1.02 ^b	1.05 ^b	0.08	<0.01
C18:1 <i>cis</i> -12	0.14	0.14	0.17	0.18	0.02	0.82

(Continued)

Table 7. (Continued)

Fatty acids, g/100 g FA	CN ^a	CI ^a	M1I ^a	M2I ^a	SEM	P value
C18:1 <i>cis</i> -13	0.07	0.27	0.06	0.05	0.04	0.14
C18:1 <i>cis</i> -14	0.22	0.25	0.25	0.24	0.02	0.94
Polyunsaturated						
C18:2 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12	10.7	10.1	11.1	9.94	0.27	0.46
C18:3 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 <i>cis</i> -15 (ALA) ^b	1.04 ^{ab}	0.64 ^b	1.26 ^a	1.97 ^a	0.15	0.01
C18:2 <i>cis</i> -9 <i>trans</i> -11(RA/CLA) ^c	0.32	0.25	0.35	0.31	0.02	0.40
C18:2 <i>trans</i> -10 <i>cis</i> -12	0.26 ^a	0.23 ^{ab}	0.17 ^{ab}	0.14 ^b	0.02	0.03
C18:3n6	0.08	0.14	0.09	0.07	0.01	0.22
C20:2	1.88 ^a	1.79 ^{ab}	1.10 ^b	1.32 ^{ab}	0.11	0.03
C20:3n6	8.71	9.02	10.5	9.61	0.27	0.09
C20:4n6	0.50 ^a	0.33 ^{ab}	0.19 ^b	0.19 ^b	0.04	0.02
C20:5n3 (EPA) ^d	1.57	1.84	1.75	1.52	0.07	0.30
C22:2	0.39	0.39	0.22	0.25	0.03	0.06
C22:5n3 (DPA) ^e	4.65	4.28	6.10	5.42	0.30	0.14
C22:6n3 (DHA) ^f	0.14	0.13	0.15	0.18	0.01	0.27
SFA ^g	40.2	39.7	39.6	40.4	0.31	0.83
UFA ^h	59.8	60.3	60.4	59.6	0.31	0.83
MUFA ⁱ	29.6	31.1	27.4	28.7	0.53	0.08
PUFA ^j	30.2	29.2	32.9	30.9	0.61	0.17
n6 FA	20.5	20.1	22.2	20.2	0.43	0.28
n3 FA	7.39 ^{ab}	6.90 ^b	9.25 ^a	9.08 ^a	0.37	0.04
n6/n3	2.84 ^{ab}	3.03 ^a	2.40 ^{ab}	2.26 ^b	0.11	0.03
MCFA ^k	16.5 ^a	16.6 ^a	12.9 ^b	13.2 ^b	0.51	<0.01
LCFA ^l	83.4 ^b	83.2 ^b	87.0 ^a	86.7 ^a	0.51	<0.01
Desaturation index						
DI (16:1/16)	0.10 ^a	0.10 ^a	0.03 ^b	0.04 ^b	0.01	<0.01
DI (18:1/18)	0.54 ^b	0.53 ^b	0.62 ^a	0.59 ^{ab}	0.01	0.01
DI (MUFA/SFA)	0.42	0.44	0.41	0.42	0.01	0.13
DI (20:4n6/20:3n6)	0.64	0.50	0.65	0.73	0.03	0.09
DI (20:4n6/18:3n6)	0.86	0.68	0.70	0.72	0.03	0.23
DI (22:6n3/22:5n3)	0.03	0.03	0.02	0.04	0.00	0.51
Thrombogenic index	0.03	0.02	0.01	0.02	0.00	0.28
Atherogenicity index	0.29 ^a	0.27 ^{ab}	0.22 ^b	0.23 ^{ab}	0.01	0.02

Within each row, means with lower case superscripts (a–c) indicate significant differences at $P < 0.05$; SEM, standard error of the mean.

^a Control non-infected, CN; Control infected, CI; Mix1 infected, M1I; Mix2 infected, M2I.

^b ALA, [α]-Linolenic acid.

^c RA/CLA, Rumenic acid/Conjugated linoleic acid.

^d EPA, Eicosapentaenoic acid.

^e DPA, Docosapentaenoic acid.

^f DHA, Docosahexaenoic acid.

^g SFA, Saturated fatty acids.

^h UFA, Unsaturated fatty acids.

ⁱ MUFA, Monounsaturated fatty acids.

^j PUFA, Polyunsaturated fatty acids.

^k MCFA, Medium chain fatty acids.

^l LCFA, Long chain fatty acids.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231516.t007>

Table 8. The effect of herbal mixture on fatty acid proportions (g/100 g FA) in the *longissimus dorsi* muscle of lambs with *H. contortus* infection.

Fatty acids, g/100 g FA	CN ^a	CI ^a	M1I ^a	M2I ^a	SEM	P value
Saturated						
C8:0	0.10	0.12	0.15	0.25	0.02	0.08
C10:0	0.10	0.19	0.15	0.32	0.04	0.20
C12:0	0.61	0.85	0.65	0.71	0.07	0.64
C13:0	0.26	0.90	0.29	0.78	0.13	0.16
C14:0	1.05	1.00	0.68	0.62	0.09	0.28
C15:0	0.32	0.19	0.18	0.17	0.03	0.22
C16:0	17.7 ^a	16.5 ^{ab}	14.2 ^{ab}	13.7 ^b	0.58	0.03
C17:0	0.87	0.54	0.46	0.43	0.08	0.13
C18:0	18.1	15.5	15.5	14.4	0.76	0.36
Monounsaturated						
C14:1	0.19	0.25	0.12	0.13	0.03	0.31
C15:1	0.98	1.01	1.05	1.58	0.11	0.17
C16:1	1.01	0.97	0.85	0.79	0.05	0.41
C17:1	1.05	0.89	0.93	1.37	0.08	0.16
C18:1 <i>trans</i> -6-8	0.45	0.38	0.40	0.44	0.05	0.95
C18:1 <i>trans</i> -9	0.66	0.76	0.61	0.87	0.06	0.44
C18:1 <i>trans</i> -10	0.76	0.79	0.51	0.53	0.08	0.46
C18:1 <i>trans</i> -11	0.62	0.62	0.66	0.47	0.07	0.81
C18:1 <i>cis</i> -9	24.2	21.4	20.5	22.5	0.86	0.50
C18:1 <i>cis</i> -11	1.49	1.52	1.53	1.44	0.04	0.89
C18:1 <i>cis</i> -12	0.16	0.15	0.19	0.17	0.03	0.97
C18:1 <i>cis</i> -13	0.12	0.10	0.12	0.12	0.01	0.93
C18:1 <i>cis</i> -14	0.13	0.25	0.17	0.16	0.03	0.57
Polyunsaturated						
C18:2c9c12	13.4	13.8	16.3	15.2	0.84	0.63
C18:3 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 <i>cis</i> -15 (ALA) ^b	1.26	1.24	1.47	1.16	0.08	0.67
C18:2 <i>cis</i> -9 <i>trans</i> -11(RA/CLA) ^c	0.11	0.10	0.10	0.11	0.02	0.98
C18:2 <i>trans</i> -10 <i>cis</i> -12	0.25	0.24	0.33	0.25	0.02	0.52
C18:3n6	0.16	0.15	0.09	0.16	0.02	0.36
C20:2	0.43	0.36	0.40	0.69	0.05	0.08
C20:3n6	3.47	3.20	4.42	5.04	0.30	0.09
C20:4n6	0.09	0.09	0.10	0.12	0.01	0.82
C20:5n3 (EPA) ^d	0.59 ^b	0.65 ^{ab}	1.11 ^a	0.98 ^{ab}	0.07	0.02
C22:2	0.13	0.20	0.28	0.28	0.03	0.20
C22:5n3 (DPA) ^e	0.68	1.62	1.52	2.17	0.25	0.18
C22:6n3 (DHA) ^f	0.30	0.42	0.25	0.37	0.03	0.19
SFA ^g	44.7	46.5	43.4	39.7	1.16	0.22
UFA ^h	55.2	53.5	56.6	60.3	1.16	0.22
MUFA ⁱ	34.4	31.4	30.3	33.7	0.86	0.30
PUFA ^j	20.8	22.1	26.4	26.6	1.14	0.18
n6 FA	17.4	17.6	21.4	21.0	1.00	0.36
n3 FA	2.83	3.94	4.35	4.68	0.29	0.09
n6/n3	5.99	5.01	5.12	4.59	0.33	0.52
MCFA ^k	22.1 ^a	21.6 ^a	18.1 ^b	18.5 ^b	0.60	0.01
LCFA ^l	77.7 ^{ab}	78.1 ^b	81.6 ^a	80.9 ^a	0.58	0.02
Desaturation index						

(Continued)

Table 8. (Continued)

Fatty acids, g/100 g FA	CN ^a	CI ^a	M1I ^a	M2I ^a	SEM	P value
DI (16:1/16)	0.06	0.06	0.06	0.05	0.00	1.00
DI (18:1/18)	0.43	0.42	0.43	0.39	0.01	0.70
DI (MUFA/SFA)	0.44	0.40	0.41	0.46	0.01	0.26
DI (20:4 n6/20:3 n6)	0.66	0.75	0.73	0.66	0.03	0.43
DI (20:4 n6/18:3 n6)	0.33 ^b	0.40 ^{ab}	0.58 ^a	0.38 ^b	0.03	0.03
DI (22:6 n3/22:5 n3)	0.45	0.43	0.21	0.20	0.05	0.14
Thrombogenic index	0.15	0.28	0.26	0.19	0.03	0.38
Atherogenicity index	0.69	1.07	0.96	0.72	0.08	0.31

Within each row, means with lower case superscripts (a–c) indicate significant differences at $P < 0.05$; SEM, standard error of the mean.

^a Control non-infected, CN; Control infected, CI; Mix1 infected, M1I; Mix2 infected, M2I.

^b ALA, [α]-Linolenic acid.

^c RA/CLA, Rumenic acid/Conjugated linoleic acid.

^d EPA, Eicosapentaenoic acid.

^e DPA, Docosapentaenoic acid.

^f DHA, Docosahexaenoic acid.

^g SFA, Saturated fatty acids.

^h UFA, Unsaturated fatty acids.

ⁱ MUFA, Monounsaturated fatty acids.

^j PUFA, Polyunsaturated fatty acids.

^k MCFA, Medium chain fatty acids.

^l LCFA, Long chain fatty acids.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231516.t008>

Table 9. Effect of herbal mixture on fatty acid proportions (g/100 g FA) in the subcutaneous fat of lambs with *H. contortus* infection.

Fatty acids, g/100 g FA	CN ^a	CI ^a	M1I ^a	M2I ^a	SEM	P value
Saturated						
C8:0	0.02	0.04	0.03	0.04	0.00	0.25
C10:0	0.02	0.02	0.02	0.02	0.00	0.30
C12:0	0.09	0.12	0.12	0.12	0.01	0.41
C13:0	0.02	0.01	0.03	0.02	0.00	0.33
C14:0	1.48	1.45	1.48	1.75	0.06	0.34
C15:0	0.58 ^b	0.50 ^b	0.61 ^b	0.93 ^a	0.05	0.01
C16:0	17.8	17.7	18.0	18.9	0.25	0.38
C17:0	2.19	2.26	1.97	2.14	0.06	0.48
C18:0	36.9 ^{ab}	33.6 ^b	39.5 ^a	38.7 ^{ab}	0.81	0.05
Monounsaturated						
C14:1	0.33 ^b	0.22 ^b	0.34 ^b	0.46 ^a	0.03	<0.01
C15:1	0.36	0.36	0.42	0.49	0.03	0.30
C16:1	0.70	0.85	0.56	0.54	0.05	0.09
C17:1	0.52	0.58	0.36	0.42	0.03	0.08
C18:1 <i>trans</i> -6-8	0.45	0.44	0.30	0.33	0.03	0.27
C18:1 <i>trans</i> -9	0.50	0.49	0.32	0.33	0.04	0.23
C18:1 <i>trans</i> -10	2.81	3.55	0.73	0.68	0.55	0.16
C18:1 <i>trans</i> -11	2.02	3.82	1.90	2.13	0.32	0.15
C18:1 <i>cis</i> -9	21.6	22.1	22.0	20.0	0.53	0.50
C18:1 <i>cis</i> -11	1.34	1.58	1.21	1.31	0.05	0.10

(Continued)

Table 9. (Continued)

Fatty acids, g/100 g FA	CN ^a	CI ^a	M1I ^a	M2I ^a	SEM	P value
C18:1 <i>cis</i> -12	0.22 ^b	0.22 ^b	0.25 ^{ab}	0.28 ^a	0.01	0.01
C18:1 <i>cis</i> -13	0.03	0.05	0.03	0.03	0.01	0.36
C18:1 <i>cis</i> -14	0.32 ^b	0.30 ^b	0.42 ^a	0.41 ^a	0.02	<0.01
Polyunsaturated						
C18:2 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12	5.66	6.08	5.27	5.27	0.26	0.73
C18:3 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 <i>cis</i> -15 (ALA) ^b	0.84 ^{ab}	0.72 ^b	1.02 ^a	1.00 ^a	0.04	0.04
C18:2 <i>cis</i> -9 <i>trans</i> -11 (RA/CLA) ^c	0.26	0.28	0.28	0.28	0.01	0.94
C18:2 <i>trans</i> -10 <i>cis</i> -12	0.16	0.19	0.12	0.13	0.01	0.13
C18:3n6	0.04	0.04	0.04	0.04	0.00	1.00
C20:2	0.03	0.06	0.05	0.03	0.01	0.27
C20:3n6	0.17	0.32	0.21	0.38	0.04	0.36
C20:4n6	0.03	0.05	0.03	0.04	0.00	0.17
C20:5n3 (EPA) ^d	0.04	0.06	0.05	0.07	0.01	0.66
C22:2	0.13	0.10	0.12	0.16	0.01	0.23
C22:5n3 (DPA) ^e	0.10	0.08	0.14	0.16	0.03	0.78
C22:6n3 (DHA) ^f	0.27	0.28	0.22	0.21	0.02	0.42
SFA ^g	59.8	56.3	62.3	63.3	0.99	0.06
UFA ^h	40.2	43.7	37.7	36.7	0.99	0.06
MUFA ⁱ	32.4 ^{ab}	35.4 ^a	30.2 ^{ab}	28.9 ^b	0.85	0.03
PUFA ^j	7.74	8.27	7.54	7.76	0.31	0.91
n6 FA	6.25	6.81	5.93	6.16	0.27	0.79
n3 FA	1.25	1.15	1.42	1.43	0.06	0.29
n6/n3	5.00 ^{ab}	5.93 ^a	4.14 ^b	4.38 ^{ab}	0.24	0.03
MCFA ^k	21.4	21.3	21.5	23.2	0.32	0.08
LCFA ^l	78.6	78.7	78.4	76.8	0.31	0.07
Desaturation index						
DI (16:1/16)	0.04	0.05	0.03	0.03	0.00	0.07
DI (18:1/18)	0.63	0.60	0.64	0.66	0.01	0.07
DI (MUFA/SFA)	0.35 ^{ab}	0.39 ^a	0.33 ^{ab}	0.31 ^b	0.01	0.03
DI (20:4 n6/20:3 n6)	0.86	0.86	0.84	0.83	0.01	0.77
DI (20:4 n6/18:3 n6)	0.42	0.54	0.40	0.46	0.04	0.64
DI (22:6 n3/22:5 n3)	4.26	3.45	3.52	1.95	0.54	0.51
Thrombogenic index	0.03	0.02	0.02	0.03	0.00	0.84
Atherogenicity index	0.50	0.44	0.51	0.55	0.02	0.27

Within each row, means with lower case superscripts (a–c) indicate significant differences at $P < 0.05$; SEM, standard error of the mean.

^a Control non-infected, CN; Control infected, CI; Mix1 infected, M1I; Mix2 infected, M2I.

^b ALA, [α]-Linolenic acid.

^c RA/CLA, Rumenic acid/Conjugated linoleic acid.

^d EPA, Eicosapentaenoic acid.

^e DPA, Docosapentaenoic acid.

^f DHA, Docosahexaenoic acid.

^g SFA, Saturated fatty acids.

^h UFA, Unsaturated fatty acids.

ⁱ MUFA, Monounsaturated fatty acids.

^j PUFA, Polyunsaturated fatty acids.

^k MCFA, Medium chain fatty acids.

^l LCFA, Long chain fatty acids.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231516.t009>

Table 10. The effect of herbal mixture treatment on expression of five genes (lipoprotein lipase (LPL), fatty acid synthase (FASN), stearyl-CoA desaturase (SCD), fatty acid desaturase 1 (FADS1), fatty acid elongase 5 (ELOVL5), relative transcript abundance) in the *m. longissimus dorsi* of lambs with *H. contortus* infection.

Item	CN ^a	CI ^a	M1I ^a	M2I ^a	SEM	P value
LPL	0.86 ^b	2.39 ^a	1.14 ^{ab}	0.72 ^b	0.21	0.01
FASN	1.15 ^b	2.89 ^{ab}	1.54 ^{ab}	3.10 ^a	0.30	0.03
SCD	1.64 ^b	6.62 ^{ab}	10.3 ^a	1.56 ^b	1.37	0.04
FADS1	3.04 ^{bc}	8.59 ^{ab}	11.7 ^a	0.87 ^c	1.28	<0.01
ELOVL5	6.26	7.93	10.4	5.15	1.04	0.26

Within each row, means with lower case superscripts (a–c) indicate significant differences at $P < 0.05$; SEM, standard error of the mean.

^aControl non-infected, CN; Control infected, CI; Mix1 infected, M1I; Mix2 infected, M2I.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231516.t010>

Table 11. Lipid peroxidation in serum and oxidative stability of meat in lambs with *H. contortus* infection.

Parameter	Day	Dietary treatment group ^a				SEM	P value		
		CN	CI	M1I	M2I		G ^b	Time	G × Time
Serum TBARS ^c (μmol/l)	22	0.24	0.24	0.19	0.27	0.013	0.099	<0.001	0.059
	37	0.28	0.26	0.35	0.35	0.016			
	51	0.30	0.36	0.31	0.33	0.016			
	70	0.22 ^a	0.33 ^b	0.30 ^{ab}	0.28 ^{ab}	0.014			
Muscle TBARS (mg MDA ^d /kg)	0	0.45	0.53	0.48	0.56	0.018	0.037	<0.001	0.770
	1	0.51	0.54	0.52	0.58	0.019			
	7	0.64 ^b	0.83 ^a	0.63 ^b	0.77 ^{ab}	0.043			

Within each row, means with lower case superscripts (a–c) indicate significant differences at $P < 0.05$; SEM, standard error of the mean.

^aControl non-infected, CN; Control infected, CI; Mix1 infected, M1I; Mix2 infected, M2I.

^bG, Group.

^cTBARS, Thiobarbituric acid reactive substances.

^dMDA, Malondialdehyde.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231516.t011>

33% compared to the free-parasites lambs [42]. Thus, parasite control in ewes can improve production efficiency and may decrease the adverse environmental impacts of sheep production systems. In the present study, methane production was not affected by parasitism. *Archaea* plays a crucial role in methanogenesis, but although the *Archaea* population *in vitro* was slightly diminished, it did not affect methane production. No differences were found both *in vitro* and *in vivo* as the effect of Mix1 or Mix2, could be due to the relatively low content of the anti-methanogenic compounds in the herbal mixtures [43,44,45]. The methane production which showed no differences both in *in vitro* and *in vivo* by Mix1 or Mix2 confirmed the results of the previous study, which presented the interaction of *S. officinalis* basic components and phytochemical compounds causing the reduced antimethanogenic activity due to lower availability of substances for microorganisms [46]. The reduction of the *Archaea* population was not noted *in vivo*, suggesting a lower dose of the herbal mixtures or adaptation of the *Archaea* [47]. Total bacteria and *B. proteoclastus* in the M2I group in *in vivo* study increased. This indicates low concentrations of PSM may stimulate some bacterial populations, while high concentrations of PSM are inhibitory to ruminal microbial populations [48,49]. *Holotricha* population of the CI group was higher compared to the CN group. It may be due to higher susceptibility of *Entodinia* to *H. contortus* infection. *H. contortus* infection alters microbial community composition and diversity, which facilitates the parasite survival and reproduction [50]. Variations in ruminal microbiota composition

response and adaptation to anti-methanogenic compounds, fermentation kinetics, and diet composition are among the major factors contributing to the inconsistent efficacy [51]. The concentrations of total VFA increased in the groups supplemented with herbal mixtures *in vitro*, compared to CN and CI. Observed changes were associated with the increased *in vitro* digestibility in the herbal mixture groups. These results indicated that herbal mixtures perhaps affected the ruminal cellulolytic bacterial activity to increased digestibility (*R. albus*, *R. flavefaciens*, and *F. succinogenes*). Lower concentrations of PSM sometimes may be stimulatory to certain bacterial populations increasing digestibility of feeds. However, significant effects of herbal mixtures on pH, ammonia N and VFA have not been observed *in vivo*, neither in this nor other studies [52], perhaps due to the use of a lower dose of herbal mixture allowing metabolic redundancy of the ruminal ecosystem [49].

Results of *in vitro* FA analyses showed that the infection of *H. contortus* and herbal mixes can modulate the ruminal FA proportion. The infection increased the C18:0 proportion in all infected groups. We hypothesized that the infection increased ruminal microbial lipase activity, the main factor for ruminal BH process [53]. On the other hand, the oxidative stress caused by parasitic infection can stimulate the rumen metabolism of the lambs to fight against the pathogens [54] and hence, the rumen microbial population increased leading to more effective BH process. The decreased effectiveness of BH might be the effect of the antimicrobial properties of PSM against biohydrogenating bacteria [13].

The rumen FA proportion measured in the rumen of lambs did not reflect the results obtained in the *in vitro* experiment. The C14:1 and C17:1 proportion of M2I group slightly increased compared to the CN and CI. The C15:0, C17:0 and total MCFA proportion also increased compared to the CI group. Rumen microbes synthesize odd-chain saturated FA by different pathways, which remove the α -carbon through the conversion of end products of *de novo* lipogenesis (C16:0 and C18:0) to a hydroxyl FA, subsequently by decarboxylation to produce C15:0 and C17:0, respectively [55], or elongation of propionate carbon chain [56]. After absorption, FA proportions were modulated and a numerically higher UFA and lower SFA proportions were found in the blood (Table 6) and liver (Table 7). The PUFA and MUFA proportions in serum were higher than in the rumen, which occurs due to desaturation of FA after absorption from the gastrointestinal tract. Previous studies also showed higher proportion of UFA compared to SFA in ruminants' blood [35], however rumen fluid was characterized with a higher content of SFA [13]. The final values of plasma FA proportions are dependent on the dietary FA source, *de novo* FA synthesis in tissues, and bacterial synthesis of FA including FA biohydrogenation in the rumen [57,58].

The MUFA proportion in the serum of infected Mix1 group was lower compared to the CN group. The reduced PUFA proportion of infected Mix2 was caused by lower linoleic acid (LA; C18:2n6) content in serum. Moreover, the C16:0; C16:1, C18:1 *cis*-11, conjugated linoleic acid (CLA; C18:2 *cis*-9 *trans*-11) and C20:4n6 proportions in the liver were reduced, while C18:0 and linolenic acid (ALA; C18:3n3) proportions were improved in the herbal mixtures groups. But, no major effect of infection associated with FA proportion was observed in serum and liver of the CN and CI, which were fed a similar type of diet. Therefore, it seems that the bioactive compounds in both herbal mixtures affected the enzymatic lipolysis process, leading to modulation of FA proportions [59]. The C18:3 *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 can be converted to C20:4n-6 in the liver by desaturases and elongases, however in the present, study we noticed a lower proportion on C20:4n-6 in the liver of lambs fed herbal mixtures, which may suggest the other possible mode of action. In the liver of lambs, the positive effect of M2I was obtained on C18:3 *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15, n3 FA, and n6/n3 ration. On the other hand, herbal mixtures both M1I and M12 groups were able to decrease MCFA and increase LCFA, which are also considered favorable within lipid metabolism.

Several studies indicated that diets strongly affected the deposition of intramuscular fat and the proportion of SFA and PUFA [60], as well as the activity of enzymes involved in fatty acids synthesis such as Δ -9 desaturase (converts SFA into *cis*-9 MUFA), elongase (converts C16:0 into C18:0) and Δ -4, Δ -5 and Δ -6 desaturase (convert C18 PUFA into C20-C22 PUFA) [61–64]. A lower biosynthesis of MUFA in the subcutaneous fat of infected Mix2 group was supported by a lower LPL in the infected Mix2 group and a higher SCD activity in the Mix1 group. The SCD is responsible for biosynthesis of *cis*-9, *trans*-11 CLA from *trans*-vaccenic acid (C18:1 *trans*-11 CLA) [65]. Therefore, lower LPL activity suggests that biosynthesis of MUFA by the insertion of a double bond between carbon C9 and C10 of SFA, such as stearic acid (C18:0) into oleic acid (C18:1 *cis*-9), is low. In addition, preferential oxidation of FA or competition for desaturation and elongation enzymes by ALA and LA could affect conversion of ALA into a product of metabolites [64]. Moreover, catalytic process for *cis* double bonds into hydrocarbon chains for biosynthesis of UFA increases the n-3 long-chain PUFA, i.e. C20:5 n-3 [66]. Therefore, the C20:5 n-3 was higher in the M1I supported by the FADS1 abundance in muscle, but was lower in the M2I group. Although FADS1 gene expressions in the M2I group decreased, it seems that there is a different mode of action between herbal mixtures groups. Therefore, the results of the present study and those of other researchers suggest that varying FA levels, phytochemical compounds in ruminant diets and varying degree of unsaturation of dietary FA could affect the expression of these lipogenic genes in different ways.

The effects of GIN parasite on the meat quality in sheep had received little attention [26]. Infections with GIN alter energy metabolism to cope with the extra energy required for tackling infection and decrease the body weight of animals [41], which may in turn change FA metabolism. However, in this study, infection did not generally induce major changes in the FA profiles in the tissues, which may be associated with energy utilization by the animal itself. The infection also did not decrease body weight gain in lambs [17]. It has been recognized that the nematode infection induces the production of reactive oxygen, causing oxidative stress in the hosts [67,68]. The concentration of TBARS in meat in the present study showed a constant increase during storage, which indicated that secondary products of lipid oxidation were accumulated during storage. The addition of Mix1, but not Mix2, to the diet of infected lambs exhibited antioxidant potential resulting in a decrease in lipid oxidation in meat by reducing the TBARS level on day 7 of storage as compared to the infected animals. Mix2 herbal mixture had lower concentrations of phenolic and flavonoids compounds than in the Mix1, which was not effective to affect lipid peroxidation in meat. Herbs or forages containing PSM with antioxidative properties also improved meat quality such as chemical composition, colour and lipid stability [69,70].

Conclusion

Infection did not elicit major impacts on the ruminal fermentation characteristics and FA profiles in tissues, but it increased TBARS in serum and meat after storage. Herbal mixtures supplementation had no effect on the ruminal fermentation characteristics including the ruminal methane production, but increased total VFA concentrations and DM digestibility *in vitro*. Supplementation of herbal mixtures to the diets of GIN parasite infected-lambs decreased MCFA and increased LCFA in liver and meat, and decreased lipid oxidation in meat due to their inhibitory effects on the ruminal biohydrogenation. From this result and previous results [17], it can be concluded that Mix1 may reduce parasitic burdens as well as improve LCFA proportion and oxidative stability in meat, which may prove win-win situations in ruminant production.

Supporting information

S1 File.
(ZIP)

Acknowledgments

The authors are grateful to Magda Bryszak, Haihao Huang, Yulianri Rizki Yanza and Pawel Kolodziejski for technical assistance.

Author Contributions

Conceptualization: Zora Váradyová, Marián Várady, Adam Cieslak.

Data curation: Zora Váradyová.

Formal analysis: Paulina Szulc, Dominika Mravčáková, Klaudia Čobanová, Linggawastu Syahrulawal.

Funding acquisition: Marián Várady.

Project administration: Marián Várady.

Writing – original draft: Paulina Szulc.

Writing – review & editing: Malgorzata Szumacher-Strabel, Zora Váradyová, Amlan Kumar Patra, Adam Cieslak.

References

1. Selemon M. Review on control of *Haemonchus contortus* in sheep and goat. J. Vet. Med. Res. 2018; 5 (5): 1139. Available from: <http://agris.fao.org/agrissearch/search.do?recordID=US2019V00205>
2. Sinnathamby G, Henderson G, Umair S, Janssen P, Bland R, Simpson H. The bacterial community associated with the sheep gastrointestinal nematode parasite *Haemonchus contortus*. PLoS One. 2018; 13: 1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192164> PMID: 29420571
3. Houdijk JGM, Tolkamp BJ, Rooke JA, Hutchings MR. Animal health and greenhouse gas intensity: the paradox of periparturient parasitism. Int J Parasitol. 2017; 47: 633–641. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.03.006> PMID: 28528874
4. Wolstenholme AJ, Fairweather I, Prichard R, Von Samson-Himmelstjerna G, Sangster NC. Drug resistance in veterinary helminths. Trends Parasitol. 2004; 20: 469–476. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.07.010> PMID: 15363440
5. Hoste H, Torres-Acosta JFJ, Quijada J, Chan-Perez I, Dakheel MM, Kommuru DS, et al. Interactions between nutrition and infections with *Haemonchus contortus* and related gastrointestinal nematodes in small ruminants. Adv Parasitol. 2016; 93:239–351. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.02.025> PMID: 27238007
6. Spiegler V, Liebau E, Hensel A. Medicinal plant extracts and plant-derived polyphenols with anthelmintic activity against intestinal nematodes. Nat Prod Rep. 2017; 34: 627–643. <https://doi.org/10.1039/c6np00126b> PMID: 28426037
7. Hoste H, Torres-Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA, Mueller-Harvey I, Sotiraki S, Louvandini H, et al. Tannin containing legumes as a model for nutraceuticals against digestive parasites in livestock. Vet Parasitol. 2015; 212: 5–17. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.06.026> PMID: 26190131
8. Lans C, Turner N, Khan T, Brauer G, Boepple W. Ethnoveterinary medicines used for ruminants in British Columbia, Canada. J Ethnobiol Ethnomed. 2007; 3: 1–22. <https://doi.org/10.1186/1746-4269-3-1> PMID: 17201916
9. David AVD, Arulmoli R, Parasuraman S. Overviews of biological importance of quercetin: a bioactive flavonoid. Pharmacogn Rev. 2016; 10(20):84–9. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.194044> PMID: 28082789
10. Oskoueian E, Abdullah N, Oskoueian A. Effects of flavonoids on rumen fermentation activity, methane production, and microbial population. BioMed research international. 2013; 2013: 1–8. <https://doi.org/10.1155/2013/349129> PMID: 24175289

11. Pietta P, Minoggio M, Bramati L. Plant polyphenols: Structure, occurrence and bioactivity. In: *Studies in Natural Products Chemistry*. 2003; 28: 257–312. [https://doi.org/10.1016/S1572-5995\(03\)80143-6](https://doi.org/10.1016/S1572-5995(03)80143-6)
12. Wencelová M, Váradyová Z, Mihalíková K, Čobanová K, Plachá I, Pristaš P, et al. Rumen fermentation pattern, lipid metabolism and the microbial community of sheep fed a high-concentrate diet supplemented with a mix of medicinal plants. *Small Rumin Res*. 2015; 125: 64–72. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.01.028>
13. Szczechowiak J, Szumacher-Strabel M, El-Sherbiny M, Pers-Kamczyc E, Pawlak P, Cieslak A. Rumen fermentation, methane concentration and fatty acid proportion in the rumen and milk of dairy cows fed condensed tannin and/or fish-soybean oils blend. *Anim Feed Sci Technol*. 2016; 216: 93–107. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.03.014>
14. Patra AK, Saxena J. Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition. *J Sci Food Agric*. 2011; 91: 24–37. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4152> PMID: 20815041
15. Cieslak A, Stanisław M, Wojtowski J, Pers-Kamczyc E, Szczechowiak J, El-Sherbiny M, et al. Camelina sativa affects the fatty acid contents in M. longissimus muscle of lambs. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2013; 115: 1258–1265. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201200119>
16. Jenkins TC, Wallace RJ, Moate PJ, Mosley EE. Board-Invited Review: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. *J Anim Sci*. 2008; 86: 397–412. <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0588> PMID: 18042812
17. Mravčáková D, Váradyová Z, Kopčáková A, Čobanová K, Grešáková L, Kišidayová S, et al. Natural chemotherapeutic alternatives for controlling of haemonchosis in sheep. *BMC Vet Res*. 2019; 15: 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1758-8> PMID: 30606179
18. Lightbody JH, Stevenson LM, Jackson F, Donaldson K, Jones DG. Comparative aspects of plasma antioxidant status in sheep and goats, and the influence of experimental abomasal nematode infection. *J Comp Pathol*. 2001; 124: 192–199. <https://doi.org/10.1053/jcpa.2000.0453> PMID: 11222017
19. Bryszak M, Szumacher-Strabel M, El-Sherbiny M, Stochmal A, Oleszek W, Roj E, et al. Effects of berry seed residues on ruminal fermentation, methane concentration, milk production, and fatty acid proportions in the rumen and milk of dairy cows. *J Dairy Sci*. 2019; 102: 1257–1273. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15322> PMID: 30580953
20. Horwitz et al. Official methods of analysis. 18th ed. Gaithersburg, MD; 2007.
21. Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci*. 1991; 74: 3583–3597. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2) PMID: 1660498
22. Váradyová Z, Kišidayová S, Čobanová K, Grešáková, Babják M, Königová A, et al. The impact of a mixture of medicinal herbs on ruminal fermentation, parasitological status and hematological parameters of the lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Small Rumin Res*. 2017; 151: 124–132. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.04.023>
23. Wolin MJ. A Theoretical Rumen Fermentation Balance. *J Dairy Sci*. 1960; 43: 1452–1459. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(60\)90348-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(60)90348-9)
24. Broderick GA, Kang JH. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and in vitro media. *J Dairy Sci*. 1980; 63: 64–75. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(80\)82888-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(80)82888-8) PMID: 7372898
25. Michalowski T, Harmeyer J, Breves G. The passage of protozoa from the reticulo-rumen through the omasum of sheep. *Br J Nutr*. 1986; 56: 625–634. <https://doi.org/10.1079/bjn19860143> PMID: 3676237
26. Zhong RZ, Li HY, Fang Y, Sun HX, Zhou DW. Effects of dietary supplementation with green tea polyphenols on digestion and meat quality in lambs infected with *Haemonchus contortus*. *Meat Sci*. 2015; 105: 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.02.003> PMID: 25746574
27. Potu RB, AbuGhazaleh AA, Hastings D, Jones K, Ibrahim SA. The effect of lipid supplements on ruminal bacteria in continuous culture fermenters varies with the fatty acid composition. *J Microbiol*. 2011; 49: 216–223. <https://doi.org/10.1007/s12275-011-0365-1> PMID: 21538241
28. Li M, Penner GB, Hernandez-Sanabria E, Oba M, Guan LL. Effects of sampling location and time, and host animal on assessment of bacterial diversity and fermentation parameters in the bovine rumen. *J Appl Microbiol*. 2009; 107: 1924–1934. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04376.x> PMID: 19508296
29. Denman SE, McSweeney CS. Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. *FEMS Microbiol Ecol*. 2006; 58: 572–582. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00190.x> PMID: 17117998
30. Wang RF, Beggs ML, Erickson BD, Cerniglia CE. DNA microarray analysis of predominant human intestinal bacteria in fecal samples. *Mol Cell Probes*. 2004; 18: 223–234. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2004.03.002> PMID: 15271382

31. Maeda H, Fujimoto C, Haruki Y, Maeda T, Koikeguchi S, Petelin M, et al. Quantitative real-time PCR using TaqMan and SYBR Green for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, tetQ gene and total bacteria. FEMS Immunol Med Microbiol. 2003; 39: 81–86. [https://doi.org/10.1016/S0928-8244\(03\)00224-4](https://doi.org/10.1016/S0928-8244(03)00224-4) PMID: 14557000
32. Józefiak D, Kierończyk B, Juśkiewicz J, Zduńczyk Z, Rawski M, Długosz J, et al. Dietary nisin modulates the gastrointestinal microbial ecology and enhances growth performance of the broiler chickens. PLoS One. 2013; 8: 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085347> PMID: 24376878
33. Soliva CR, Meile L, Cieślak A, Kreuzer M, Machmüller A. Rumen simulation technique study on the interactions of dietary lauric and myristic acid supplementation in suppressing ruminal methanogenesis. Br J Nutr. 2004; 92: 689–700. <https://doi.org/10.1079/bjn20041250> PMID: 15522139
34. Głogowski R, Czauderna M, Rozbicka A, Krajewska KA, Clauss M. Fatty acid profile of hind leg muscle in female and male nutria (*Myocastor coypus* Mol.), fed green forage diet. Meat Sci. 2010; 85: 577–579. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.03.008> PMID: 20416834
35. Szczechowiak J, Szkudelska K, Szumacher-Strabel M, Sadkowski S, Gwozdz K, El-Sherbiny M, et al. Blood hormones, metabolic parameters and fatty acid proportion in dairy cows fed condensed tannins and oils blend. Ann Anim Sci. 2018; 18: 155–166. <https://doi.org/10.1515/aoas-2017-0039>
36. Vahmani P, Glover KE, Fredeen AH. Effects of pasture versus confinement and marine oil supplementation on the expression of genes involved in lipid metabolism in mammary, liver, and adipose tissues of lactating dairy cows. J Dairy Sci. 2014; 97: 4174–4183. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7290> PMID: 24792801
37. Jo C, Ahn DU. Fluorometric Analysis of 2-Thiobarbituric Acid Reactive Substances in Turkey. Poult Sci. 1998; 77: 475–480. <https://doi.org/10.1093/ps/77.3.475> PMID: 9521463
38. Brogna DMR, Nasri S, Salem H Ben, Mele M, Serra A, Bella M, et al. Effect of dietary saponins from *Quillaja saponaria* L. on fatty acid composition and cholesterol content in muscle *Longissimus dorsi* of lambs. Animal. 2011; 5: 1124–1130. <https://doi.org/10.1017/S1751731111000048> PMID: 22440108
39. Chilliard Y, Ferlay A, Rouel J, Lamberet G. A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. J Dairy Sci. 2003; 86: 1751–1770. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73761-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73761-8) PMID: 12778586
40. SAS Institute Inc. SASOnlineDoc Version 9.3. SAS Institute Inc., Cary, NC. 2014.
41. Sykes AR, Coop RL. Intake and utilization of food by growing lambs with parasitic damage to the small intestine caused by daily dosing with *Trichostrongylus colubriformis* larvae. J Agric Sci. 1976; 86: 507–515. <https://doi.org/10.1017/S0021859600061049>
42. Fox NJ, Smith LA, Houdijk JGM, Athanasiadou S, Hutchings MR. Ubiquitous parasites drive a 33% increase in methane yield from livestock. Int J Parasitol. 2018; 48: 1017–1021. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.06.001> PMID: 30107148
43. Bodas R, Prieto N, García-González R, Andrés S, Giráldez FJ, López S. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. Anim Feed Sci Technol. 2012; 176: 78–93. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2012.07.010>
44. García-González R, López S, Fernández M, Bodas R, González JS. Screening the activity of plants and spices for decreasing ruminal methane production in vitro. Anim Feed Sci Technol. 2008; 147: 36–52. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.09.008>
45. Patra AK, Saxena J. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. Phytochemistry. 2010; 71: 1198–1222. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.05.010> PMID: 20570294
46. Cieślak A, Zmora P, Stochmal A, Pecio L, Oleszek W, Pers-Kamczyc E, et al. Rumen antimethanogenic effect of *Saponaria officinalis* L. phytochemicals in vitro. J Agric Sci. 2014; 152: 981–993. <https://doi.org/10.1017/S0021859614000239>
47. Patra AK, Yu Z. 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. 2015; 6: 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00001> PMID: 25653648
48. Patra AK. Recent advances in measurement and dietary mitigation of enteric methane emissions in ruminants. Front Vet Sci. 2016; 3: 1–17. <https://doi.org/10.3389/fvets.2016.00001> PMID: 26858952
49. Patra AK, Park T, Braun H-S, Geiger S, Pieper R, Yu Z, et al. Dietary bioactive lipid compounds rich in menthol alter interactions among members of ruminal microbiota in sheep. Front Microbiol. 2019; 10: 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00001> PMID: 30728808
50. El-Ashram S, Al Nasr I, Abouhajer F, El-Kemary M, Huang G, Dinçel G, et al. Microbial community and ovine host response varies with early and late stages of *Haemonchus contortus* infection. Vet Res Commun. 2017; 41: 263–277. <https://doi.org/10.1007/s11259-017-9698-5> PMID: 29098532

51. Patra A, Park T, Kim M, Yu Z. Rumen methanogens and mitigation of methane emission by anti-methanogenic compounds and substances. *J Anim Sci Biotechnol*. 2017; 8: 1–18. <https://doi.org/10.1186/s40104-016-0130-8> PMID: 28070331
52. Váradyová Z, Mravčáková D, Holodová M, Grešáková L, Pisarčíková J, Barszcz M, et al. Modulation of ruminal and intestinal fermentation by medicinal plants and zinc from different sources. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2018; 102: 1131–1145. <https://doi.org/10.1111/jpn.12940> PMID: 29901842
53. Lanier SJ, Corl BA. Challenges in enriching milk fat with polyunsaturated fatty acids. *J Anim Sci Biotechnol*. 2015; 6: 1–9. <https://doi.org/10.1186/2049-1891-6-1> PMID: 25838897
54. Mcrae KM, Stear MJ, Good B, Keane OM. The host immune response to gastrointestinal nematode infection in sheep. *Parasite Immunol*. 2015; 37: 605–613. <https://doi.org/10.1111/pim.12290> PMID: 26480845
55. Berthelot V, Bas P, Pottier E, Normand J. The effect of maternal linseed supplementation and/or lamb linseed supplementation on muscle and subcutaneous adipose tissue fatty acid composition of indoor lambs. *Meat Sci*. 2012; 90: 548–557. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.09.014> PMID: 22014835
56. Emmanuel B. The relative contribution of propionate, and long-chain even-numbered fatty acids to the production of long-chain odd-numbered fatty acids in rumen bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1978; 528: 239–246. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(78\)90198-4](https://doi.org/10.1016/0005-2760(78)90198-4) PMID: 564207
57. Doreau M, Ferlay A. Digestion and utilisation of fatty acids by ruminants. *Anim Feed Sci Technol*. 1994; 45: 379–396. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(94\)90039-6](https://doi.org/10.1016/0377-8401(94)90039-6)
58. Sinclair LA, Cooper SL, Chikunya S, Wilkinson RG, Hallett KG, Enser M, et al. Biohydrogenation of n-3 polyunsaturated fatty acids in the rumen and their effects on microbial metabolism and plasma fatty acid concentrations in sheep. *Anim Sci*. 2005; 81: 239–248. <https://doi.org/10.1079/ASC50040239>
59. Smith SB, Lunt DK, Chung KY, Choi CB, Tume RK, Zembayashi M. Adiposity, fatty acid composition, and delta-9 desaturase activity during growth in beef cattle. *Anim Sci J*. 2006; 77: 478–486. <https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2006.00375.x>
60. Raes K, De Smet S, Demeyer D. Effect of dietary fatty acids on incorporation of long chain polyunsaturated fatty acids and conjugated linoleic acid in lamb, beef and pork meat: A review. *Anim Feed Sci Technol*. 2004; 113: 199–221. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2003.09.001>
61. Bressan MC, Rossato L V., Rodrigues EC, Alves SP, Bessa RJB, Ramos EM, et al. Genotype × environment interactions for fatty acid profiles in *Bos indicus* and *Bos taurus* finished on pasture or grain. *J Anim Sci*. 2011; 89: 221–232. <https://doi.org/10.2527/jas.2009-2672> PMID: 21178183
62. Malau-Aduli AEO, Siebert BD, Bottema CDK, Pitchford WS. Breed comparison of the fatty acid composition of muscle phospholipids in Jersey and Limousin cattle. *J Anim Sci*. 1998; 76: 766–773. <https://doi.org/10.2527/1998.763766x> PMID: 9535336
63. Warren HE, Scollan ND, Enser M, Hughes SI, Richardson RI, Wood JD. Effects of breed and a concentrate or grass silage diet on beef quality in cattle of 3 ages. I: Animal performance, carcass quality and muscle fatty acid composition. *Meat Sci*. 2008; 78: 256–269. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.06.008> PMID: 22062278
64. Wood JD, Enser M, Fisher A V., Nute GR, Sheard PR, Richardson RI, et al. Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. *Meat Sci*. 2008; 78: 343–358. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.07.019> PMID: 22062452
65. Enoch HG, Catala A, Strittmatter P. Mechanism of rat liver microsomal stearyl-CoA desaturase. Studies of the substrate specificity, enzyme-substrate interactions, and the function of lipid. *J Biol Chem*. 1976; 251: 5095–5103. PMID: 8453
66. Park WJ, Kothapalli KSD, Lawrence P, Tyburczy C, Brenna JT. An alternate pathway to long-chain polyunsaturates: The FADS2 gene product $\Delta 8$ -desaturates 20:2n-6 and 20:3n-3. *J Lipid Res*. 2009; 50: 1195–1202. <https://doi.org/10.1194/jlr.M800630-JLR200> PMID: 19202133
67. Machado V, Da Silva AS, Schafer AS, Aires AR, Tonin AA, Oliveira CB, et al. Relationship between oxidative stress and pathological findings in abomasum of infected lambs by *Haemonchus contortus*. *Pathol Res Pract*. 2014; 210: 812–817. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2014.09.006> PMID: 25446248
68. Váradyová Z, Mravčáková D, Babják M, Bryszak M, Grešáková L, Čobanová K, et al. Effects of herbal nutraceuticals and/or zinc against *Haemonchus contortus* in lambs experimentally infected. *BMC Vet Res*. 2018; 14: 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1323-x> PMID: 29291752
69. Kumar P, Patra AK, Mandal GP, Debnath BC. Carcass characteristics, chemical and fatty acid composition and oxidative stability of meat from broiler chickens fed black cumin (*Nigella sativa*) seeds. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2018; 102: 769–779. <https://doi.org/10.1111/jpn.12880> PMID: 29493013
70. Qwele K, Hugo A, Oyedemi SO, Moyo B, Masika PJ, Muchenje V. Chemical composition, fatty acid content and antioxidant potential of meat from goats supplemented with moringa (*Moringa oleifera*) leaves, sunflower cake and grass hay. *Meat Sci*. 2013; 93: 455–462. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.11.009> PMID: 23273450



POTENTIAL OF PAULOWNIA LEAVES SILAGE IN LAMB DIET TO IMPROVE RUMINAL FERMENTATION AND FATTY ACID PROFILE – AN *IN VITRO* STUDY*

Paulina Szulc¹, Bogumiła Nowak¹, Mahmood Ul Hassan¹, Dorota Lechniak², Sylwester Ślusarczyk³, Jan Bocianowski⁴,
Małgorzata Szumacher-Strabel¹, Amlan Kumar Patra⁵, Adam Cieslak^{1*}

¹Department of Animal Nutrition, Poznań University of Life Sciences, Wołyńska 33, 60-637 Poznań, Poland

²Department of Genetics and Animal Breeding, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Poznań University of Life Sciences, Wołyńska 33, 60-637 Poznań, Poland

³Department of Biology and Biotechnology, Wrocław Medical University, 50-556 Wrocław, Poland

⁴Department of Mathematical and Statistical Methods, Poznań University of Life Sciences, Wojska Polskiego 28, 60-637, Poznań, Poland

⁵American Institute for Goat Research, Langston University, Langston, 73050, USA

*Corresponding author: adam.cieslak@up.poznan.pl

Abstract

Environmental impact, quality, and quantity of food products of ruminant origin (especially beef and mutton) are considered major challenges in meeting the nutritional requirements of the growing human population worldwide. Therefore, we conducted this *in vitro* study to explore the potential of Paulownia leaves silage to reduce the environmental impact of feedlot lamb production and improve ruminal fatty acids (FAs) profile by influencing ruminal biohydrogenation. In the present study, Paulownia leaves silage (PLS) and alfalfa silage (AAS) were mixed in a proportion of 1:0 (Control, PLS 0%), 0.75:0.25 (PLS 25%), 0.5:0.5 (PLS 50%), 0.25:0.75 (PLS 75%) and 0:1 (PLS 100%) on dry matter basis in the lamb diet. The experimental findings demonstrated that 100% replacement of AAS with PLS in the lamb diet significantly improved the ruminal fermentation by increasing the *in vitro* DM degradability ($P < 0.01$), total volatile fatty acid ($P < 0.01$), and propionate production ($P < 0.01$) while reducing the acetate: propionate (A/P) ratio ($P < 0.01$) and CH_4 concentration (mM; L and Q $P < 0.05$) and CH_4 production, mM/g DM (L and Q $P < 0.05$). Meanwhile, 100% PLS inclusion in the diet increased the total mono-unsaturated fatty acids ($P < 0.05$), total unsaturated fatty acids ($P < 0.01$) and total *n*-3 fatty acids ($P < 0.05$) particularly alpha-linolenic acid (ALA; C18:3 *n*-3; $P < 0.05$) in the rumen fluid after incubation. Moreover, the total saturated fatty acids concentration was reduced ($P < 0.01$). These findings suggested that PLS could be a climate-friendly and sustainable alternative to AAS in the lamb feedlot diet for quality meat production.

The demand for foods of animal origin is rising globally due to the extensive growth of the human population (McClements, 2020). To feed 10 billion people by 2050, 59–98% more food will be required (Devendra and Leng, 2011), as a result ruminant population will increase to fulfil these demands globally. Correspondingly, environmental issues i.e., greenhouse gas emissions (GHG) such as enteric methane (CH_4) from ruminant production will become more prominent (Becker et al., 2023). Enteric fermentation from cattle production represents 40% of total GHG emissions, while goat and sheep production is responsible for 5–7 % of total enteric emissions (FAO, 2019). Feeding practices are also responsible for CH_4 , nitrous oxide (N_2O) emissions, and indirect nitrogen (N) excretion (Rapisarda and Abu-Ghannam, 2023). Hence, feed is the backbone of ruminant production, and proper ruminant nutrition is essential for maximiz-

ing output (Mahesh and Mohini, 2014). However, with urbanization and industrialization, inadequate feed supply is a major global constraint in ruminant production due to less arable land for forage production (Röös et al., 2017). Also, the increasing costs of green forages and grains significantly impact ruminant production (Jalal et al., 2023). Therefore, sustainable ruminant production demands cost-effective, climate-smart, alternative plant-based feed resources to cover the nutritional requirements without negatively affecting the production and climate. Recently, there is an increased interest in the utilization of phytogenic feed additives (Al-Marzooqi et al., 2022; Golbotteh et al., 2022) and tree leaves containing plant secondary metabolites (PSM) in ruminant diets to reduce the negative impact of ruminants production on the environment (Huang et al., 2021; Alayón-Gamboa et al., 2023). Human health benefits related to fatty acid

*This study was partially supported by statutory funding from the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Poznań University of Life Sciences, and a grant from the National Science Center, Poland (Grant No. 2016/23/B/NZ9/03427).

composition in ruminant products produced through various nutrition approaches, such as various green forage sources, are also worth to be mentioned (Kawęcka and Radkowska, 2022).

Paulownia is a fast-growing deciduous tree mainly utilized for the timber industry that produces 54 tons of leaves per hectare (Alagawany et al., 2022) and possesses a potential for biofuel production from its cellulose and carbon dioxide (CO₂) sequestration in an agroforestry system (Mazurkiewicz, 2022). Paulownia trees can release more oxygen compared to other trees, purify the air, prevent soil erosion, and control the subsoil water pollution caused by animal waste and chemical-based pollutants (Ammar et al., 2023). Paulownia trees produce a huge mass of leaves rich in nitrogen that can be utilized as fertilizers (green manure) or as a forage source in ruminants' diets (Stewart et al., 2018) for green environmental goals. Paulownia leaves contain a considerable concentration of crude protein (175 g/kg DM), which is close to the nutritional value of alfalfa forage. Paulownia leaves are also a rich source of PSM including phenolic acids (Huang et al., 2021). It was found that the inclusion of PSM in the sheep and goat diets reduced the enteric CH₄ emissions and N excretion into the environment (Waghorn, 2008) while improving the dry matter intake, polyunsaturated fatty acids (PUFA) composition, and softness of lamb meat (Costa et al., 2021). In recent studies, the inclusion of Paulownia leaves (ensiled or fresh) in the dairy cows' diet reduced the methanogens number, CH₄ production and improved the basic ruminal fermentation characteristics (Huang et al., 2021, 2022) as well as PUFA contents in the milk (Huang et al. 2022). Thus, Paulownia tree leaves (PL) also have the potential to improve PUFA composition in lamb meat *via* enhancing their concentration in ruminal fluid.

There is no published study on the effect of the substitution of alfalfa silage (AAS) by Paulownia leaves silage in lambs' diets on the ruminal fatty acid (FA) profile and CH₄ production in *in vitro* conditions. Therefore, we hypothesized that the inclusion of PLS in the lamb's diet minimizes the carbon footprints of lamb meat production by lowering the CH₄ production and improving the *in vitro* ruminal fermentation and PUFA profile in the rumen. The objectives of this *in vitro* study were to explore the effects of the substitution of AAS by PLS on *in vitro* ruminal fermentation and CH₄ production with ruminal fluid collected from rams. The present study will also highlight the potential of PLS as a climate-resilient, sustainable, and cost-effective alternative to conventional fibre sources in lamb feedlot diets.

Material and methods

The study was conducted following the guidelines of the Local Ethical Commission for Investigations on Animals (permit no. 14/2019) and the National Ethical Commission for Animal Research (Ministry of Science and Higher Education, Poland).

Plant material collection and dietary treatments

Fresh leaves of Paulownia (*P. tomentosa* × *P. fortune* hybrid) trees were collected at the end of May 2019 from four different plantations located near Bydgoszcz (2 plantations), Gostyń, and Trzebnica in Poland. Each of the plantations consists of at least 50 trees (2–3 years old). Alfalfa was harvested at about 10% bloom stage. Alfalfa and fresh Paulownia leaves from each plantation were chopped in 1.5 cm size and ensiled with the microbial (10¹⁰ colony forming unit per gram) silage additive (Agricol Sil; Microferm Ltd, UK; contains *Lactobacillus plantarum* DSMZ 16627, *Pediococcus acidilactici* NCIMB 30005 and *Lactobacillus paracasei* NCIMB 3015) in micro silos (4 dm³ size) following the protocol of Huang et al. (2021). The micro silos were kept in a shady area at ambient temperature (20–25°C). After 8 weeks of ensiling, micro silos were opened, and samples were collected for chemical analysis. About 500 g of the ensiled material from each micro silo was stored at –20°C for further analysis. The dietary components and their proportions used in the lamb diet for the *in vitro* study are shown in Table 1.

Chemical analysis of feed

The chemical composition of Paulownia leaves silage and alfalfa silage was analysed following AOAC methods (Latimer, 2007) for the determination of dry matter (DM; method no. 934.01, drying at 103°C for 6 h) and ash (method no. 942.05, burning at 550°C for 3 h). Crude protein (N-content; method no. 976.05, constant factor for CP: 6.25) contents were determined using a Kjeld-Foss Automatic 16210 analyser (Foss Electric, Hillerød, Denmark), and ether extract without acid hydrolysis (EE, method no. 920.39) was determined with a Soxhlet System HT analyser (FOSS, Hillerød, Denmark). Ash subtracted from DM represented the organic matter (OM) content. The neutral detergent fibre (NDF) was determined by using the protocol of Van Soest et al. (1991) with a modified method by adding amylase and sodium sulfite to get residual ash-free NDF (aNDFom).

Table 1. Dietary components and their proportions in the experimental diets

Components (g/kg DM)	CON	PLS 25%	PLS 50%	PLS 75%	PLS 100%
Alfalfa silage	429	322	215	107	0
Paulownia silage	0	107	215	322	429
Meadow hay	148	148	148	148	148
Concentrate (21% of crude protein)	423	423	423	423	423

CON: control diet containing alfalfa silage; PLS 25, 50, 75, and 100%; Paulownia leaves silage replaced alfalfa silage with a proportion of 25, 50, 75, and 100%, respectively.

Determination of total phenolic acid contents

Samples of Paulownia leaves after ensiling were lyophilized, ground and 100 mg were extracted three times with 80% methanol for 60 min at 40°C. The obtained extract was dried by evaporation and dissolved in 2 ml of acidified (0.2% formic acid) Milli-Q water and then purified with Solid Phase Extraction (SPE) using Oasis HLB 3cc Vac Cartridge, 60 mg (Waters Corp., Milford, MA). The carbohydrates and phenolics in the cartridges were removed by washing them with 0.5% methanol and 80% methanol, respectively. Then the extract was dried again and dissolved in 1 mL of acidified 80% methanol. Before spectrometric analysis, samples were centrifuged ($23\,000 \times g$ for 5 min) and stored in a freezer at -20°C until the analysis, as described by Petrič et al. (2020).

The bioactive compounds particularly polyphenols were analysed with ultra-high-resolution mass spectrometry (UHRMS) on a Dionex UltiMate 3000RS (Thermo Scientific, Darmstadt, Germany) system equipped with a charged aerosol detector interfaced with a high-resolution quadrupole time-of-flight mass spectrometer (HR/Q-TOF/MS, Compact, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany). All the procedures for flow rate, operating conditions, chromatography column as previously described, chromatographic separation, collision energy, and spectra processing during polyphenol analysis were performed as described by Petrič et al. (2020). All the analyses were performed in triplicate.

Ruminal fluid collection

The rumen fluid was collected from four cannulated rams (8 months old and mean body weight of 25 ± 2 kg). The donor rams were fed with a similar diet that was used for the control group of *in vitro* study. The rumen fluid was collected before morning feeding and filtered with 2-layer cheesecloth into a 1-litre Schott Duran® bottle with an oxygen-free headspace. The bottles were closed with valves kept in an open position by following the protocol of Joch et al. (2022) to prevent CO₂ accumulation in the flask, which would cause the ruminal fluid's pH to drop and affect the microbial population. Then rumen fluid (inoculum medium) was transported to the laboratory under anaerobic conditions at 39°C.

In vitro batch culture experiment

In vitro experiment was performed using a batch culture system as described by Bryszak et al. (2019). The inoculum medium was collected from four ruminal cannulated rams. The buffer solution containing 292 mg K₂HPO₄, 240 mg KH₂PO₄, 480 mg (NH₄)₂SO₄, 480 mg NaCl, 100 mg MgSO₄·7H₂O, 64 mg CaCl₂·2H₂O, 4 mg Na₂CO₃ and 600 mg of cysteine hydrochloride was prepared in one litre of double distilled water in the 1:4 (v/v) ratio. Then, 40 ml of buffered ruminal fluid (with average initial pH 6.56) was added into pre-warmed 125-mL glass incubation bottles (Midland Scientific, Omaha, NE) containing 400 mg of ground basal substrates (Paulownia leaves silage and alfalfa silage). Gaseous CO₂ was added to each bottle. The incuba-

tion flasks were closed with rubber stoppers and aluminium covers, placed in an incubator (Galaxy 170R, Eppendorf North America, Hauppauge, NY) at 39°C, and periodically mixed. There were five treatment groups: a control group (Control, PLS 0%), containing 100% of alfalfa silage, and four experimental groups in which Paulownia leaves silage (PLS) and alfalfa silage (AAS) were mixed in a proportion of 0.75:0.25 (PLS 25%), 0.5:0.5 (PLS 50%), 0.25:0.75 (PLS 75%) and 0:1 (PLS 100%) on DM basis. The batch culture experiment had five bottles in each group (5 groups × 5 bottles) completed in three consecutive runs (on different days). Fifteen repetitions for each substrate were also tested in this experiment. After 24 h of incubation, CH₄ production and degradability were measured, and buffered ruminal fluid samples were collected for analysis of ammonia, volatile fatty acids (VFA), protozoa, total bacteria, and methanogen populations. For the protozoa counts, 1 mL of the ruminal fluid was preserved with 6 mL of 4/100 formaldehyde solution (w/w). Rumen fluid (1.5 mL) for methanogens analysis was shock-frozen in liquid nitrogen and samples were stored at -80°C until analysis. Samples collected for ammonia and VFA analysis were stored at -20°C.

pH, ruminal ammonia, and volatile fatty acids (VFA)

The pH of the ruminal samples was measured immediately after the collection of samples with a pH meter (Type CP-104, Elmetron, Zabrze, Poland). Ammonia concentration was determined using a colorimetric Nessler's method outlined by Bryszak et al. (2019). After 24 h of incubation, 3.6 ml of buffered ruminal fluid was taken from the incubation flasks and centrifuged at 12000 rpm for 5 min. Then, 100 µl of supernatant was transferred into a tube containing 200 µl of 1/100 polyvinyl alcohol, 200 µl of 20/100 potassium sodium tartrate, 200 µl of Nessler reagent, and 19.3 ml of double distilled water and incubated for 10 min at the room temperature. The spectrophotometry was performed, and samples were compared with blank (without rumen fluid). The VFA concentrations were estimated using gas chromatography (GC Varian CP 3380, Sugarland, TX) equipped with a flame ionization detector following the protocol outlined by Bryszak et al. (2019).

In vitro dry matter degradability, total gas and methane production

The loss in weight of the incubated substrate dry matter after correction for the DM residue in the blank was taken as *in vitro* dry matter degradability (IVDMD). After 24 h of incubation, the total gas volume and methane (CH₄) production were determined following the protocol of Cieslak et al. (2016). Gas production was calculated by measuring the movement of the syringe piston attached to the serum flasks. The total gas produced during substrate fermentation was determined by subtracting the gas produced in a flask without substrate (blank) from the total gas produced in the flasks with substrate and buffered rumen fluid. The CH₄ production was determined by sampling 500 µl gas in a gastight syringe (GASTIGHT® Syringes, Hamilton Bonaduz AG,

Switzerland) from the headspace of incubation flasks and injecting it into SRI310 gas chromatograph containing a thermal conductivity detector (TCD) and Carboxen 1000 column (mesh side 60/80, 15 FT × 1,8 INS.S, SUPELCO). The carrier gas was nitrogen with a steady flow rate of 30 ml/min. The oven was set to preheat at 180°C for 1.5 min before gradually increasing the temperature by 20°C per minute until reaching 220°C. Then, observed peaks were identified and CH₄ concentration was determined by comparing the retention times with appropriate gases standards (mix gases 5.63/100 CO₂, 5.56/100 CH₄, 5.10/100 H₂, and N₂ remains, Multa S.C. Poland) using PeakSimple ver. 3.29.

Protozoa, total bacteria, and methanogens archaea counts

In a drop of rumen fluid with the defined volume, protozoa were counted under the microscope (150×), and *Ophryoscolecidae* and *Isotrichidae* were distinguished. However, the fluorescence *in situ* hybridization technique was used to determine the methanogens and bacterial population outlined by Stahl et al. (1995) with some modifications as described by Pers-Kamczyc et al. (2011). A domain-specific oligonucleotide probe targeting all methanogens (S-S-Arc-0915-a-A-20) was used. The hybridization temperature was kept at 56°C and a domain-specific oligonucleotide probe (S-S-Arc-0915-a-A-20) was utilized to target all the methanogens. The samples were examined using a fluorescence microscope (Zeiss Axiovert, 2000) equipped with AxioIm-Observer Software and a filter specifically for DAPI

(to distinguish the total count of bacteria) and rhodamine (magnification ×100). Video footage was captured with a video camera (AxioCamMRm Rev. 3 FireWire) and methanogens or bacteria were counted manually.

Statistical analysis

The normality of the distribution of the variables was verified with Shapiro–Wilk’s normality test (Shapiro and Wilk, 1965). A one-way (group/doses) multivariate analysis of variance (MANOVA) was performed. Following this, one-way analyses of variance (ANOVA) were carried out to determine the main effects of the group on the variability of the particular traits. The arithmetic means and standard error of the mean were calculated. Moreover, Fisher’s least significant differences (LSDs) were used at a significance level of $\alpha=0.05$. Linear and quadratic contrasts were obtained for all observed traits. The GenStat v. 22 (VSN International Genstat for Windows, 2022) statistical software package was used for the analyses.

Results

Dietary ingredient chemical composition and fatty acids profile

The main dietary ingredients in the feedlot lamb diet used for this *in vitro* experiment were alfalfa silage (AAS), Paulownia leaves silage (PLS), meadow hay, and concentrate. The chemical analysis illustrated that the nutrient profile of PLS was comparable to AAS (Table 2).

Table 2. Chemical composition and fatty acids profile of dietary components

Item	Alfalfa silage	Paulownia leaves silage	Meadow hay	Concentrate
Fresh matter (g/kg)	268	237	—	—
Dry matter (g/kg)	911	928	914	887
Chemical composition (g/kg DM)				
organic matter (om)	911	928	859	828
crude protein (cp)	188	172	90	208
crude fibre (cf)	287	185	376	106
ether extract (ee)	29.8	18.1	10.6	34.7
Fatty acids (g/100 g FA)				
C12:0	0.94	0.24	1.48	0.16
C14:0	0.85	0.70	0.88	0.28
C16:0	20.3	29.3	19.2	11.4
C16:1	1.76	4.45	1.58	1.24
C18:0	4.74	4.45	4.41	2.34
C18:1 <i>cis</i> -9	4.91	7.39	8.33	45.4
C18:2 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12	19.4	16.2	23.2	25.2
C18:3 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 <i>cis</i> -15	39.2	31.2	34.9	4.6
Σ Other FA	4.91	3.63	6.09	8.97
Σ SFA	30.3	38.1	26.7	14.7
Σ UFA	69.7	61.9	73.3	85.3
Σ MUFA	7.2	12.5	10.8	55.1
Σ PUFA	62.5	49.4	62.5	30.2
Σ n-6 FA	21.6	34.4	48.8	50.8
Σ n-3 FA	39.2	31.2	34.9	4.63
n-6/n-3	0.55	1.14	1.40	10.96

*FA, fatty acids; Σ , sum; 1 Σ other FA: C8:0, C10:0, C14:1, C18:1c11, C20:0, C20:3n6, C23:0, C24:0, C20:5n3, C24:1, C22:6n3; SFA, saturated fatty acids; UFA, unsaturated fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids; PUFA, polyunsaturated fatty acids.

Table 3. The main bioactive compounds identified in Paulownia leaves silage

Peak	Rt (min)	$\lambda_{\max}$ (nm)	Molecular ion m/z[M-H] ⁻	MS ² main-ion	MS ² fragments	Formula	Identification	mg/g DM
1	1.8	218 279	461.16	315.11	161, 135	C ₂₀ H ₃₀ O ₁₂	Dicaffeoyllacteoside	0±0.00
2	2.7	326	487.14	179.03	161, 135	C ₂₁ H ₂₈ O ₁₃	1-O-caffeoyl-6-O- α - rhamnopyranosyl- β - glycopyranoside	0.50±0.02
3	5		179.03	135.04		C ₉ H ₈ O ₄	Dihydroxycinnamic acid	0.20±0.03
4	7	327	165.05	147.04	119	C ₉ H ₁₀ O ₃	2-hydroxy-2-phenylpropanoic acid	0.23±0.01
5	8.6	330	639.19	161.02	325, 529 179, 151	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₆	Campneoside isomer	0.14±0.01
6	8.8	330	639.19	161.02	325,529,179 151	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₆	Campneoside isomer	1.40±0.47
7	9.6	323	637.17	475.14	161		ND	0.79±0.47
8	9.7	267, 335	621.11	351.05	269, 193	C ₂₇ H ₂₆ O ₁₇	Luteolin 4',7-O-diglucuronide	0.23±0.01
9	9.8	287, 329	653.21	161.02	179,459,621	C ₃₀ H ₃₈ O ₁₆	Campneoside I	0.14±0.82
10	10.3	222, 330	623.20	461.16	161, 315	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	Isoacteoside	1.49±0.06
11	10.9	222, 330	623.20	461.16	161, 315	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	Acteoside	6.74±2.12
12	11.3	285, 327	591.13	269.04		C ₂₇ H ₂₈ O ₁₅	Apigenin 7-[rhamnosyl-(1->2)- galacturonide]	0.15±0.09
13	11.7	220, 330	665.21	461.16	161, 315	C ₃₁ H ₃₈ O ₁₆	Acetyl acteoside(tubuloside B)	0.24±0.04
14	12.9	220, 329	651.23	475.18	175,193,160 329, 313	C ₃₁ H ₄₀ O ₁₅	Epimeredinoside A	0.33±0.03
15	13.7	220, 329	591.21	429.17	161, 285	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₃	Didehydroxyacteoside	0.19±0.03
16	14	253, 346	285.04	175.01	158 ,173	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	Dihydroxyflavone (luteolin)	1.20±0.02
17	15.8	267, 337	269.04	151.00	225	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	Trihydroxyflavone (apigenin)	0.41±0.01
Total polyphenols								14.35

*ND: not determined.

Total polyphenolic contents of Paulownia leaves silage

The bioactive contents that were present in PLS are listed in Table 3. Total polyphenolic contents in PLS were 14.35 mg/g DM. The main phenolic acids identified in PLS were acetoside, isoacetoside, and dihydroxyflavone (luteolin) in a proportion of 6.74 mg/g DM, 1.49 mg/g DM, and 1.20 mg/g DM, respectively.

In vitro ruminal fermentation, methane production, and microbial counts

After batch culture incubation, ruminal pH value decreased quadratically ($P < 0.01$) while ruminal ammonia (NH₃) concentration increased quadratically ($P = 0.01$), with increasing doses of Paulownia leaves silage (Table 4). The lowest pH was observed at 75% and 100% inclusion of PLS. However, IVDMD increased quadratically ($P < 0.01$) by increasing the proportions of PLS in the diet. The highest IVDMD was observed at 100% replacement of AAS with PLS. In contrast, CH₄ production decreased quadratically in mM/g IVDMD ($P < 0.01$) while a linear decrease was observed in mM/L of total gas ($P = 0.01$).

The results showed a linear and quadratic increase ($P < 0.01$) in the molar proportions of propionic, and

butyric acids, whereas valeric acid and isovaleric acid were found to be decreased linearly and quadratically ($P < 0.01$). The molar proportion of isobutyric acid decreased linearly ($P < 0.01$). However, the molar proportion of total VFA increased quadratically ($P < 0.01$), while the acetate: propionate ratio (A/P) was reduced linearly, and quadratically ($P < 0.01$). Increasing the proportions of PLS in the diet resulted in a linear, and quadratic reduction ($P < 0.01$) in *Ophyroscolecidae*, *Isotrichidae*, total protozoa, and methanogen archaea counts.

In previous studies, diets rich in polyphenols and condensed tannins reduced the environmental impact of sheep production by reducing methane (CH₄) emissions and urinary nitrogen (N) excretion (Torres et al., 2022). Tannins improved dietary protein utilization, body weight gain, milk, and wool production, and health when fed to animals (Piluzza et al., 2014). To our knowledge, there was no published study on the inclusion of Paulownia leaves silage in lamb diets as an alternative and sustainable feeding source to improve ruminal fermentation. Therefore, we hypothesized that the inclusion of PLS as a source of phenolic acids in the lambs' diets could improve ruminal fatty acids profiles and reduce the environmental impact of lamb production.

Table 4. Effects of Paulownia leaves silage (PLS) on *in vitro* ruminal fermentation and microbial counts

Item	CON	PLS 2 5%	PLS 50%	PLS 75%	PLS 100%	P-ANOVA	SEM	Linear	Quadratic
pH	6.27	6.27	6.25	6.19	6.19	0.004	0.055	0.010	<0.001
IVDMD (%)	57.8	60.7	62.3	65.4	65.5	<0.001	2.509	0.544	<0.001
NH ₃ (mM)	13.9	14.5	14.3	14.8	15.3	0.084	1.075	0.176	0.008
Total gas (ml/g DM)	283	285	285	285	285	0.734	4.872	0.760	0.471
CH ₄ (mM)	0.82	0.77	0.77	0.77	0.70	0.184	0.098	0.016	0.042
CH ₄ (mM/g DM)	2.05	1.91	1.92	1.93	1.74	0.184	0.244	0.039	0.042
CH ₄ /total gas (mM/L)	7.3	6.7	6.7	6.8	6.1	0.092	1.0	0.001	0.021
CH ₄ /IVDMD (mM/g)	3.56	3.15	3.15	2.97	2.66	<0.001	0.384	0.070	<0.001
Volatile fatty acids (mM)									
total VFA	37.0	37.9	38.2	38.1	41.7	0.004	0.399	0.001	<0.001
acetate (A)	23.2	23.7	23.8	23.2	24.4	0.678	0.271	0.410	0.383
propionate (P)	8.13	8.56	8.84	9.20	10.7	<0.001	0.146	<0.001	<0.001
isobutyrate	0.41	0.29	0.19	0.15	0.19	0.007	0.026	<0.001	0.008
butyrate	3.98	4.35	4.32	4.88	5.68	<0.001	0.076	<0.001	<0.001
isovalerate	0.45	0.41	0.38	0.30	0.32	<0.001	0.014	<0.001	<0.001
valerate	0.82	0.60	0.65	0.44	0.46	<0.001	0.032	<0.001	<0.001
A/P ratio	2.86	2.78	2.71	2.54	2.32	<0.001	0.032	<0.001	<0.001
Microbial count									
<i>Ophryoscolecidae</i> ($\times 10^5$ /mL)	5.33	3.48	2.51	1.89	1.94	<0.001	0.184	<0.001	<0.001
<i>Isotrichidae</i> ($\times 10^3$ /mL)	6.44	1.60	1.02	0.93	0.81	<0.001	0.310	<0.001	<0.001
total protozoa ($\times 10^5$ /mL)	5.39	3.50	2.52	1.90	1.95	<0.001	0.191	<0.001	<0.001
bacteria ($\times 10^8$ /mL)	7.63	7.54	7.61	7.48	8.04	0.854	0.16	0.52	0.40
archaea ($\times 10^7$ /mL)	0.33	0.33	0.22	0.18	0.17	<0.001	0.01	<0.001	<0.001

CON – alfalfa silage (AAS), PLS 25, 50, 75, and 100%: Paulownia leaves silage replaced alfalfa silage with a proportion of 25, 50, 75, and 100%, respectively.

*IVDMD: *in vitro* dry matter degradability; NH₃: ammonia; CH₄: methane, A/P: acetate to propionate ratio; archaea: methanogen archaea.

Table 5. Effects of Paulownia leaves silage (PLS) on the fatty acids profile of *in vitro* incubated ruminal fluid

Fatty acids g/100 g FA	CON	PLS 25%	PLS 50%	PLS 75%	PLS 100%	P-ANOVA	SEM	Linear	Quadratic
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Saturated									
C12:0	3.33	1.57	2.23	1.76	1.69	<0.001	0.145	0.006	0.036
C14:0	3.29	2.44	3.59	3.25	2.97	0.040	0.125	0.784	0.887
C16:0	30.0	28.0	29.5	30.1	26.9	0.032	0.388	0.166	0.097
C18:0	25.6	25.7	25.9	24.7	22.7	0.033	0.372	0.008	0.002
C21:0	0.33	0.34	0.64	0.17	0.28	0.140	0.060	0.476	0.316
C22:0	0.21	0.21	0.11	0.08	0.15	0.064	0.017	0.046	0.133
C23:0	0.15	0.08	0.15	0.13	0.10	0.334	0.012	0.721	0.712
C24:0	0.40	0.37	0.23	0.13	0.26	0.009	0.026	0.007	0.036
ΣSFA	63.3	58.8	62.4	60.3	55.1	0.009	0.806	0.011	0.006
Monounsaturated									
C14:1	0.48	0.69	1.22	0.86	0.58	0.008	0.072	0.588	0.742
C16:1	0.75	0.74	0.65	0.89	1.02	0.074	0.046	0.028	0.009
C18:1 <i>trans</i> -6-8	1.19	0.87	0.88	0.63	0.79	0.064	0.058	0.020	0.070
C18:1 <i>trans</i> -9	1.26	0.95	0.86	0.81	1.03	0.066	0.051	0.155	0.510
C18:1 <i>trans</i> -10	0.92	0.60	0.86	0.62	0.58	0.026	0.044	0.043	0.056
C18:1 <i>trans</i> -11	1.38	1.57	1.54	1.25	1.12	0.126	0.065	0.051	0.020
C18:1 <i>cis</i> -9	14.7	16.9	14.4	16.1	19.9	0.003	0.516	0.008	0.002

Table 5. – contd.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
C18:1 <i>cis</i> -11	1.61	1.77	1.79	1.79	1.68	0.480	0.036	0.639	0.961
C18:1 <i>cis</i> -12	0.44	0.44	0.45	0.45	0.51	0.959	0.033	0.519	0.461
C18:1 <i>cis</i> -13	0.33	0.56	0.52	0.64	0.37	0.068	0.039	0.728	0.717
C18:1 <i>cis</i> -14	0.36	0.55	0.61	0.37	0.46	0.022	0.029	0.861	0.481
C20:1 <i>trans</i>	0.78	0.72	0.92	0.79	0.86	0.162	0.027	0.250	0.312
C22:1 <i>n</i> -9	0.24	0.13	0.18	0.16	0.17	0.560	0.020	0.532	0.735
C24:1	0.15	0.32	0.28	0.25	0.29	0.112	0.020	0.201	0.410
Σ MUFA	24.6	26.8	25.2	25.6	29.4	0.012	0.483	0.015	0.006
Polyunsaturated									
C18:2 <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12	8.78	9.58	8.26	9.69	11.36	0.360	0.502	0.142	0.085
C18:3 <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15	0.92	1.03	1.31	1.31	1.60	0.018	0.069	<0.001	0.001
C18:2 <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11	0.13	0.10	0.21	0.19	0.11	0.329	0.019	0.785	0.910
C18:2 <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12	0.34	0.49	0.48	0.49	0.53	0.301	0.027	0.075	0.143
C18:3 <i>n</i> -6	0.15	0.17	0.14	0.22	0.16	0.250	0.013	0.414	0.530
C20:2	0.17	0.12	0.16	0.11	0.10	0.599	0.015	0.218	0.220
C20:3 <i>n</i> -6	1.16	2.47	1.44	1.65	1.25	0.063	0.159	0.443	0.245
C20:4 <i>n</i> -6	0.14	0.09	0.09	0.09	0.09	0.442	0.009	0.166	0.311
C20:5 <i>n</i> -3	0.29	0.36	0.32	0.19	0.22	0.208	0.026	0.086	0.068
C22:2	0.12	0.09	0.09	0.12	0.17	0.217	0.012	0.108	0.040
others FA*	4.91	4.50	4.72	4.18	4.44	0.649	0.148	0.273	0.355
Σ PUFA	12.2	14.5	12.5	14.1	15.6	0.416	0.620	0.173	0.153
Fatty acids (%)									
Σ UFA	36.7	41.3	37.7	39.7	44.9	0.009	0.8063	0.011	0.006
<i>n</i> -6	10.8	12.8	10.5	12.2	13.5	0.434	0.591	0.273	0.224
<i>n</i> -3	1.21	1.38	1.62	1.50	1.82	0.045	0.065	0.005	0.008
<i>n</i> -6/ <i>n</i> -3 ratio	9.06	9.19	6.75	8.37	7.81	0.190	0.359	0.219	0.356
Σ PUFA/Σ SFA ratio	0.20	0.25	0.21	0.23	0.29	0.202	0.013	0.108	0.077
LNA/LA ratio*	13.7	9.4	6.9	7.5	7.5	0.134	0.883	0.034	0.112
total C18:1	22.2	24.2	21.9	22.7	26.4	0.013	0.488	0.045	0.016
total <i>trans</i> - C18:1	4.76	3.99	4.14	3.31	3.52	0.011	0.139	0.002	0.006
total <i>cis</i> - C18:1	17.4	20.2	17.8	19.4	22.9	0.002	0.506	0.005	0.002
Σ MCFA	37.8	33.5	37.2	36.8	33.2	0.002	0.497	0.131	0.093
Σ LCFA	62.2	66.6	62.8	63.2	66.8	0.002	0.497	0.131	0.093

CON – alfalfa silage (AAS), PLS 25, 50, 75 and 100%: Paulownia leaves silage replaced alfalfa silage with a proportion of 25, 50, 75 and 100%, respectively.

*Other FA: C4, C6, C10:1, C11:0, C12 iso, C12 anteiso, C13:0, C14 anteiso, C15 anteiso, C16 anteiso, C16 iso, C16:1 *trans*, C17 iso, C17 anteiso, C18:1 *trans*-5, C18:1 *trans*-15, C18:1 *cis*-11, C18:1 *cis*-12, C18:1 *cis*-13, C18:1 *cis*-14, C19:0, C18:1 *cis*-15, C18:2 *cis*-9, *cis*-12, C18:2 *cis*-9, *cis*-15, C20:0, C20:1-*trans*, C18:3 *n*-6 and C20:3 *n*-3.

* LNA: α-linolenic acid; LA: linolenic acid.

Fatty acid profile of *in vitro* incubated ruminal fluid

Dietary Paulownia leaves silage increased the proportion of C16:1 linearly ($P<0.05$) and quadratically ($P<0.01$) but decreased the concentrations of C18:1 t10 ($P<0.05$; Table 5). The results showed a linear and quadratic increase ($P<0.01$) in oleic acid (OA; 18:1 c9). Vaccenic acid (VA; 18:1 t11) concentration increased quadratically ($P<0.05$) by increasing PLS proportions but up to 50% in the diet. There was a linear increase in the concentrations of C18:3 c9c12 c15 fatty acid ($P<0.01$). The

concentrations of C20:2, C20:4 n6, and C22:2 decreased in a quadratic manner. Increasing PLS proportions in the diet increased the Σ MUFA, and Σ UFA quadratically ($P<0.01$) but decreased Σ SFA quadratically ($P<0.01$).

Discussion

In previous studies, diets rich in polyphenols and condensed tannins reduced the environmental impact of sheep production by reducing methane CH₄ emis-

sions and urinary nitrogen (N) excretion (Torres et al., 2022). Tannins improved dietary protein utilization, body weight gain, milk, and wool production, and health when fed to animals (Piluzza et al., 2014). To our knowledge, there was no published study on the inclusion of Paulownia leaves silage in lamb diets as an alternative and sustainable feeding source to improve ruminal fermentation. Therefore, we hypothesized that the inclusion of PLS as a source of phenolic acids in the lambs' diets could improve ruminal fatty acids profiles and reduce the environmental impact of lamb production.

Nutrients composition and total polyphenolic contents

Concerning the nutrient composition, Paulownia leaves are rich in nutrients, primarily crude protein (CP; the most costly nutrient used in livestock feed) and plant secondary metabolites (PSM). In the present study, the average value of CP in PLS was 172 g/kg of DM, which was slightly lower than the previous findings (185 g/kg of DM) of Puchalska et al. (2021). Simultaneously, total polyphenolic contents (14.35 mg/g DM) were also found to be lower than the previous results, i.e., 47 mg/g DM from the study conducted by Huang et al. (2021) and 31.35 mg/g DM in the study of Puchalska et al. (2021). Acetoside, isoacetoside, and luteolin were identified as major polyphenolic bioactive contents in the PLS (Table 3). In the present study, PLS was only analysed for polyphenolic contents. However, a previous study conducted by Huang et al. (2021) showed that PLS also contains flavonoids (13 mg/g DM). The existing differences in mean total polyphenolic contents and CP could be due to soil conditions or agronomic management including variety variance or harvesting time.

In vitro ruminal fermentation, methane production, and microbial population

Various studies have confirmed the potential of phenolic acids and flavonoids to modulate the ruminal fermentation processes by altering the ruminal microbial populations (Patra, 2012; Moate et al., 2020). Paulownia leaves silage inclusion in cow's diet increased the ruminal pH in both *in vitro* and *in vivo* conditions (Huang et al., 2022). In contrast, the current experiment indicated that ruminal pH decreased linearly and quadratically with increasing proportions of PLS. Furthermore, PLS inclusion in the cow's diet considerably increased the IVDMD and population of proteolytic bacteria such as *Prevotella* spp. and *Butyrivibrio fibrisolvens* which resulted in more effective ruminal proteolysis and NH_3 concentration (Huang et al., 2022). Similarly in this study, increasing the proportion of dietary PLS in the control diet resulted in a quadratic increase in IVDMD ($P < 0.01$) and ruminal NH_3 concentration ($P < 0.01$) and these findings were consistent with the Huang et al. (2022) study.

The previous studies on Paulownia leaves and PLS containing high amounts of polyphenols content confirmed the reduction in ruminal methanogen populations

and CH_4 production without any detrimental effects on nutrient degradability (Puchalska et al., 2021; Huang et al., 2022). Similarly, this phenomenon was also confirmed in the present study in which PLS inclusion significantly reduced the methanogen population that resulted in lowering CH_4 production in mM/g IVDMD ($P < 0.01$) quadratically, and mM/ml of total gas ($P < 0.01$) linearly. The lowered CH_4 concentration in this study could be due to the complementary effects of PSM such as acetoside (6.74 mg/g DM) and luteolin (1.20 mg/g DM) that were analysed in the PLS. In literature, these PSM showed the potential for altering the ruminal fermentation. In Sinz et al. (2018) study, luteolin affected the ruminal ecosystem positively by reducing methanogenic activity and CH_4 emission. Furthermore, *in vitro* study by Navarrete et al. (2016) confirmed the potential of acetoside to reduce environmental impact via bactericidal and inhibitory effects on ruminal fermentation.

Protozoa are considered crucial for the protozoa-associated methanogens (Choudhury et al., 2015) usually responsible for up to 37% of CH_4 production (Newbold et al., 2015). However, inclusion of PLS in the control diet reduced the population of *Ophryoscolecidae*, *Isotrichidae*, and total protozoa, which subsequently reduced the methanogens archaea count and CH_4 production. This means that a decline in protozoa count is sometimes accompanied by a decline in the methanogens population (Patra et al., 2015), which was also noted in the current study. On the other hand, when the proportion of PLS in the control diet increased, the molar concentration of propionate also increased while the acetate: propionate (A/P) ratio and CH_4 production decreased. These results were consistent with those of earlier research indicating that hydrogen (substrate for CH_4 production) was used for the synthesis of propionate in the succinate pathway rather than methanogenesis (Ungerfeld, 2020) due to PSM contents present in PLS.

In vitro effects of PLS on the ruminal fluid's fatty acids profile

In ruminants, diet type and nutritional profiles have a direct impact on the fatty acids content of milk and meat. Particularly, conjugated linoleic acid (CLA; 18:2-*c12*, *t10*), and *n-3* fatty acids play a vital role in human health (Mezzomo et al., 2011; Purba et al., 2020; Fernandes et al., 2021). Simultaneously, essential fatty acids (EFAs) such as alpha-linolenic acid (ALA; C18:3 *n-3*), and linoleic acid (LA; C18:2 *n-6*) that are not synthesized by human and farm animals, may be improved by feeding (Kearns et al., 2022). Ruminant-derived foods are considered a major source of CLA (Daley et al., 2010) which has anti-inflammatory, and anticancer properties. However, beef and lamb meat contains a lower polyunsaturated to saturated fatty acids (PUFA: SFA) ratio (0.11) as compared to pork (0.58) and chicken (0.39–0.97) meat (Milićević et al., 2014) because 70–95% of *n-3* and *n-6* PUFA are utilized in the biohydrogenation process in the rumen (Urrutia et al., 2020). Therefore, recently there is

an increased interest to protect the desirable fatty acids such as monounsaturated fatty acids (MUFA) and PUFA from ruminal biohydrogenation to increase their proportion in meat and milk. Various PSM, e.g., condensed tannins (CT) can impair the biohydrogenation process by modulating the ruminal microbial populations (Carreño et al., 2015) and increase the FAs in the milk and meat such as CLA isomer rumenic acid (RA; 18:2-*c9, t11*), and vaccenic acid (VA; 18:1-*t11*) (Vasta et al., 2019) as well other desirable FAs that are considered beneficial for human health.

Paulownia leaves silage contains a valuable proportion of LA (C18:2 *c9c12*), ALA (C18:3 *c9c12c15*), palmitic acid (PA; C16:0), and oleic acid (OA; C18:1 *c9*) as well as polyphenols and flavonoids to modulate the biohydrogenation (Huang et al., 2021) to further increase their concentrations in the ruminal fluid and lamb meat. A higher level of PUFA especially *n-3* in milk and meat is beneficial for human health, so it can be speculated that PLS could also be a valuable source of FAs in the ruminant (lamb) diet. Increasing the proportion of PLS in the control diet increased the concentrations of LA, ALA, CLA, Σ UFA, Σ MUFA, Σ PUFA, RA (the higher level at 50% inclusion), VA and OA concentrations while reduced the Σ SFA in the rumen fluid of lambs. These findings were consistent with the *in vivo* study of Vera et al. (2023) in which radiata pine bark extract rich in polyphenolic compounds (polyphenols, and tannins) was supplemented in an alfalfa hay-based diet of finishing lambs.

In the present study, Σ *n-3* fatty acids concentrations were found to be increased and these findings were similar to the results of the meta-analysis of Torres et al. (2022). An increase in Σ *n-3* (mainly ALA) concentrations indicated that polyphenols or CT in the PLS inhibited lipolysis and/or the first steps of microbial biohydrogenation either by selective reduction or inhibition of rumen microbial populations and these findings were consistent with the Vasta et al. (2019) study. However, a numerical increase in RA concentration could be due to a direct increase in the biohydrogenation of dietary PUFA, and/or could be formed from VA (precursor) in the tissues of animals (Khiaosa-Ard et al., 2009). Rumenic acid is also synthesized by biohydrogenation of LA and then converted to VA and stearic acid subsequently (Frutos et al., 2020). The supplementation of CT has the potential to increase the VA concentration at the expense of stearic acid by reducing the *Butyrivibrio proteoclasticus* populations and inhibiting terminal steps of biohydrogenation (Khiaosa-Ard et al., 2009; Vasta et al., 2010). Incorporation of PLS increased the Σ *n-3* fatty acids that are essential for human health, i.e., neurological development, anti-inflammatory properties, and reduced risk of cardiovascular diseases (Frutos et al., 2020). The current findings indicated that PLS inclusion has the potential to alter the ruminal FAs profile which is considered essential for lamb meat quality as well as beneficial for human health.

Conclusion

The present *in vitro* study findings illustrated that 100% replacement of alfalfa silage with Paulownia leaves silage in the lamb diet (control) is highly effective to enhance the *n-3* essential fatty acids such as alpha-linolenic acid concentration in the ruminal fluid. Additionally, 100% PLS increased the *in vitro* dry matter degradability, and molar concentration of propionate; meanwhile, reduced the climate impact (15% CH₄ mitigation) of feedlot production mainly by reducing the 48% methanogen and 63% protozoa population compared to control diet. Thus, it can be speculated that PLS can influence the lamb ruminal ecosystem and kinetics of fermentation for sustainable and quality meat production. Therefore, PLS in the lamb diet is recommended for future *in vitro* and *in vivo* investigations to uncover its full potential in feedlot production.

References

- Al-Marzooqi W., Sallam S.M., Alqaisi O., El-Zaiat H.M. (2022). Potential of graded doses of neem seed oil on ruminal fermentation characteristics, degradability, and methane formation. *Ann. Animal Sci.*, 22: 993–999.
- Alagawany M., Farag M.R., Sahfi M.E., Elnesr S.S., Alqaisi O., El-Kassas S., Al-Wajeeh A.S., Taha A.E., Abd E-Hack M.E. (2022). Phytochemical characteristics of Paulownia trees wastes and its use as unconventional feedstuff in animal feed. *Anim. Biotech.*, 33: 586–593.
- Alayón-Gamboa J., Albores-Moreno S., Jiménez-Ferrer G., Alarcón-Zúñiga B., Miranda-Romero L., Pérez-Luna E., Canul-Solís J. (2023). Tropical tree foliage supplementation in ruminants improves rumen fermentation and the bacterial profile and decreases methane production. *Anim. Biotech.*, 1–13.
- Ammar H., Kholif A.E., Missaoui M., Zoabi H., Ghzayel S., de Haro-Martí M., de Almeida Teixeira I.A.M., Fkiri S., Khouja M.L., Fahmy M. (2023). Seasonal variation in chemical composition, ruminal fermentation, and biological characteristics of *Paulownia shan tong*: *in vitro* potential use by sheep and goats. *Fermentation*, 9: 210.
- Becker F., Spengler K., Reinicke F., Heider-van Diepen C. (2023). Impact of essential oils on methane emissions, milk yield, and feed efficiency and resulting influence on the carbon footprint of dairy production systems. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 30: 1–13.
- Bryszak M., Szumacher-Strabel M., El-Sherbiny M., Stochmal A., Oleszek W., Roj E., Patra A.K., Cieslak A. (2019). Effects of berry seed residues on ruminal fermentation, methane concentration, milk production, and fatty acid proportions in the rumen and milk of dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 102: 1257–1273.
- Carreño D., Hervás G., Toral P.G., Belenguer A., Frutos P. (2015). Ability of different types and doses of tannin extracts to modulate *in vitro* ruminal biohydrogenation in sheep. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 202: 42–51.
- Choudhury P.K., Salem A.Z.M., Jena R., Kumar S., Singh R., Puniya A.K. (2015). Rumen microbiology: an overview. In: *Rumen microbiology: from evolution to revolution*, Puniya A.K., Singh R., Kamra D.N. (eds). Springer, pp. 3–16.
- Cieslak A., Zmora P., Matkowski A., Nawrot-Hadzik I., Pers-Kamczyc E., El-Sherbiny M., Bryszak M., Szumacher-Strabel M. (2016). Tannins from *Sanguisorba officinalis* affect *in vitro* rumen methane production and fermentation. *J. Anim. Plant Sci.*, 26: 54–62.
- Costa E.d.S., Ribeiro C.D.M., Silva T., Batista A., Vieira J., Barbosa A., da Silva Júnior J., Bezerra L., Pereira E., Oliveira R. (2021). Effect of dietary condensed tannins inclusion from *Acacia mearnsii* extract on the growth performance, carcass traits and meat quality of lambs. *Livest. Sci.*, 253: 104717.

- Daley C.A., Abbott A., Doyle P.S., Nader G.A., Larson S. (2010). A review of fatty acid profiles and antioxidant content in grass-fed and grain-fed beef. *Nutrition J.*, 9: 1–12.
- Devendra C., Leng R. (2011). Feed resources for animals in Asia: issues, strategies for use, intensification and integration for increased productivity. *Asian-Austr. J. Animal Sci.*, 24: 303–321.
- FAO (2019). FAOSTAT (Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division). Statistical Database of the Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2019. Available online: <http://www.fao.org/faostat/en/?#data/GE> (accessed on 8 June 2019).
- Fernandes J., Pereira Filho J., Menezes D., Caldas A.C., Cavalcante I., Oliveira J., Oliveira R., Júnior J.S., Cézar M., Bezerra L. (2021). Carcass and meat quality in lambs receiving natural tannins from *Mimosa tenuiflora* hay. *S. Rumin. Res.*, 198: 106362.
- Frutos P., Hervás G., Natalello A., Luciano G., Fondevila M., Priolo A., Toral P.G. (2020). Ability of tannins to modulate ruminal lipid metabolism and milk and meat fatty acid profiles. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 269: 114623.
- Golbottah M.M., Malecky M., Aliarabi H., Zamani P., Ganjkanlou M. (2022). Dose-response effects of the savory (*Satureja khuzistanic*) essential oil and extract on rumen fermentation characteristics, microbial protein synthesis and methane production *in vitro*. *Ann. Anim. Sci.*, 22: 1001–1014.
- Huang H., Szumacher-Strabel M., Patra A.K., Ślusarczyk S., Lechniak D., Vazirigohar M., Varadyova Z., Kozłowska M., Cieślak A. (2021). Chemical and phytochemical composition, *in vitro* ruminal fermentation, methane production, and nutrient degradability of fresh and ensiled Paulownia hybrid leaves. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 279: 115038.
- Huang H., Lechniak D., Szumacher-Strabel M., Patra A.K., Kozłowska M., Kolodziejewski P., Gao M., Ślusarczyk S., Petrič D., Cieślak A. (2022). The effect of ensiled paulownia leaves in a high-forage diet on ruminal fermentation, methane production, fatty acid composition, and milk production performance of dairy cows. *J. Anim. Sci. Biotech.*, 13: 1–19.
- Jalal H., Giammarco M., Lanzoni L., Akram M.Z., Mammi L.M., Vignola G., Chincari M., Formigoni A., Fusaro I. (2023). Potential of fruits and vegetable by-products as an alternative feed source for sustainable ruminant nutrition and production: a review. *Agriculture*, 13: 286.
- Joch M., Vadroňová M., Výborná A., Jochová K. (2022). Inhibition of *in vitro* rumen methane production by three statins. *Ann. Anim. Sci.*, 22: 271–282.
- Kawęcka A., Radkowska I. (2022). Comparison of the quality of mountain sheep milk obtained from animals kept on a natural and organic mountain pasture. *Ann. Anim. Sci.*, 23: 275–283.
- Kearns M., Ponnampalam E.N., Jacquier J.-C., Grasso S., Boland T.M., Sheridan H., Monahan F.J. (2022). Can botanically-diverse pastures positively impact the nutritional and antioxidant composition of ruminant meat? – Invited review. *Meat Sci.*, 197: 109055.
- Khiaosa-Ard R., Bryner S., Scheeder M., Wettstein H.-R., Leiber F., Kreuzer M., Soliva C. (2009). Evidence for the inhibition of the terminal step of ruminal α -linolenic acid biohydrogenation by condensed tannins. *J. Dairy Sci.*, 92: 177–188.
- Latimer H.A. (2007). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists International (18th ed.), Horwitz W., Latimer W. (eds). AOAC International, MD, Gaithersburg.
- Mahesh M., Mohini M. (2014). Crop residues for sustainable livestock production. *Adv. Dairy Res.*, 2: 1–2.
- Mazurkiewicz J. (2022). The biogas potential of oxytree leaves. *Energies*, 15: 8872.
- McClements D.J. (2020). Future foods: Is it possible to design a healthier and more sustainable food supply? *Nutr. Bull.*, 45: 341–354.
- Mezzomo R., Paulino P., Detmann E., Valadares Filho S., Paulino M., Monnerat J., Duarte M., Silva L., Moura L. (2011). Influence of condensed tannin on intake, digestibility, and efficiency of protein utilization in beef steers fed high concentrate diet. *Livest. Sci.*, 141: 1–11.
- Milićević D., Vranić D., Mašić Z., Parunović N., Trbović D., Nedeljković-Trailović J., Petrović Z. (2014). The role of total fats, saturated/unsaturated fatty acids and cholesterol content in chicken meat as cardiovascular risk factors. *Lip. Health Dis.*, 13: 1–12.
- Moate P., Deighton M., Jacobs J., Ribaux B., Morris G., Hannah M., Mapleson D., Islam M., Wales W., Williams S. (2020). Influence of proportion of wheat in a pasture-based diet on milk yield, methane emissions, methane yield, and ruminal protozoa of dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 103: 2373–2386.
- Navarrete S., Kemp P.D., Pain S.J., Back P.J. (2016). Bioactive compounds, aucubin and acteoside, in plantain (*Plantago lanceolata* L.) and their effect on *in vitro* rumen fermentation. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 222: 158–167.
- Newbold C.J., De la Fuente G., Belanche A., Ramos-Morales E., McEwan N.R. (2015). The role of ciliate protozoa in the rumen. *Front. Microbiol.*, 6: 1313.
- Patra A.K. (2012). An overview of antimicrobial properties of different classes of phytochemicals. *Diet. Phytochem. Microb.*, pp. 1–32.
- 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.
- Pers-Kamczyc E., Zmora P., Cieślak A., Szumacher-Strabel M. (2011). Development of nucleic acid based techniques and possibilities of their application to rumen microbial ecology research. *J. Anim. Feed Sci.*, 20: 315–337.
- Petrič D., Mravčáková D., Kucková K., Čobanová K., Kišidayová S., Cieślak A., Ślusarczyk S., Váradyová Z. (2020). Effect of dry medicinal plants (wormwood, chamomile, fumitory and mallow) on *in vitro* ruminal antioxidant capacity and fermentation patterns of sheep. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 104: 1219–1232.
- Piluzza G., Sulas L., Bullitta S. (2014). Tannins in forage plants and their role in animal husbandry and environmental sustainability: a review. *G. Forage Sci.*, 69: 32–48.
- Puchalska J., Szumacher-Strabel M., Patra A.K., Ślusarczyk S., Gao M., Petrič D., Nabzdyk M., Cieślak A. (2021). The effect of different concentrations of total polyphenols from Paulownia hybrid leaves on ruminal fermentation, methane production and microorganisms. *Animals (Basel)*, 11: 2843.
- Purba R.A.P., Paengkoum P., Paengkoum S. (2020). The links between supplementary tannin levels and conjugated linoleic acid (CLA) formation in ruminants: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 15: e0216187.
- Rapisarda S., Abu-Ghannam N. (2023). Polyphenol characterization and antioxidant capacity of multi-species swards grown in Ireland – environmental sustainability and nutraceutical potential. *Sustainability*, 15: 634.
- Röös E., Bajželj B., Smith P., Patel M., Little D., Garnett T. (2017). Greedy or needy? Land use and climate impacts of food in 2050 under different livestock futures. *G. Environ. Chan.*, 47: 1–12.
- Shapiro S.S., Wilk M.B. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, 52: 591–611.
- Sinz S., Kunz C., Liesegang A., Braun U., Marquardt S., Soliva C.R., Kreuzer M. (2018). *In vitro* bioactivity of various pure flavonoids in ruminal fermentation, with special reference to methane formation. *Czech J. Animal Sci.*, 63: 293–304.
- Stahl D., Amann R., Poulsen L., Raskin L., Capman W. (1995). Use of fluorescent probes for determinative microscopy of methanogenic Archaea. *A. Methano. Laboratory Man.*, pp. 111–121.
- Stewart W.M., Vaidya B.N., Mahapatra A.K., Terrill T.H., Joshee N. (2018). Potential use of multipurpose *Paulownia elongata* tree as an animal feed resource. *American J. Plant Sci.*, 9: 1212.
- Torres R., Ghedini C., Paschoaloto J., da Silva D., Coelho L., Junior G.A., Ezequiel J., Neto O.M., Almeida M. (2022). Effects of tannins supplementation to sheep diets on their performance, carcass parameters and meat fatty acid profile: a meta-analysis study. *S. Rumin. Res.*, 206: 106585.
- Ungerfeld E.M. (2020). Metabolic hydrogen flows in rumen fermentation: principles and possibilities of interventions. *Front. Microbiol.*, 11: 589.
- Urrutia O., Mendizabal J.A., Alfonso L., Soret B., Insausti K., Arana A. (2020). Adipose tissue modification through feeding strategies and their implication on adipogenesis and adipose tissue metabolism in ruminants. *Int. J. Mol. Sci.*, 21: 3183.

- Van Soest P.V., Robertson J.B., Lewis B.A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.*, 74: 3583–3597.
- Vasta V., Yáñez-Ruiz D.R., Mele M., Serra A., Luciano G., Lanza M., Biondi L., Priolo A. (2010). Bacterial and protozoal communities and fatty acid profile in the rumen of sheep fed a diet containing added tannins. *App. Environ. Microbiol.*, 76: 2549–2555.
- Vasta V., Daghighi M., Cappucci A., Buccioni A., Serra A., Viti C., Mele M. (2019). Invited review: Plant polyphenols and rumen microbiota responsible for fatty acid biohydrogenation, fiber digestion, and methane emission: Experimental evidence and methodological approaches. *J. Dairy Sci.*, 102: 3781–3804.
- Vera N., Suescun-Ospina S.T., Allende R., Gutiérrez-Gómez C., Junod T., Williams P., Fuentealba C., Ávila-Stagno J. (2023). A short-term supplementation with a polyphenol-rich extract from radiata pine bark improves fatty acid profiles in finishing lambs. *Animals (Basel)*, 13: 188.
- Waghorn G. (2008). Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production – Progress and challenges. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 147: 116–139.

Received: 16 IV 2023

Accepted: 22 V 2023