



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΑΚΡΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«Αγροχημεία –Εφαρμογές στη Ζωική και Φυτική Παραγωγή/Φαρμακευτικά Φυτά»



ΒΑΚΑΛΟΠΟΥΛΟΥ
ΧΡΙΣΤΙΝΑ

*ΤΟ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑ ΤΗΣ ΜΕΓΑΛΗΣ
ΚΟΙΛΙΑΣ ΤΩΝ ΜΗΡΥΚΑΣΤΙΚΩΝ –
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΦΥΤΩΝ*



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΔΙΑΚΡΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«Αγροχημεία – Εφαρμογές στη Ζωική και Φυτική Παραγωγή/Φαρμακευτικά Φυτά»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
***ΤΟ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑ ΤΗΣ ΜΕΓΑΛΗΣ ΚΟΙΛΙΑΣ ΤΩΝ
ΜΗΡΥΚΑΣΤΙΚΩΝ – ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ
ΦΥΤΩΝ***

ΒΑΚΑΛΟΠΟΥΛΟΥ ΧΡΙΣΤΙΝΑ

ΑΕΜ: 0242

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:
ΧΑΤΖΗΛΟΥΚΑΣ ΕΥΣΤΑΘΙΟΣ

Ιωάννινα, Νοέμβριος

2018

Στη μητέρα μου
και
σε όλους όσοι δεν στάθηκαν εμπόδιο
στην προσπάθεια μου να εμπλουτίσω τις γνώσεις μου...

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
SUMMARY	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	10
1.1 Πέψη της τροφής.....	12
1.2 Μικροβιακή ή συμβιωτική πέψη στα μηρυκαστικά ζώα.....	15
1.3 Ανατομία του στομάχου και φυσιολογία της πέψης στα μηρυκαστικά	15
1.4 Μικροοργανισμοί της μεγάλης κοιλίας.....	17
1.5 Μεταβολικές διεργασίες του μικροβιακού πληθυσμού της μεγάλης κοιλίας	21
1.6 Συμβατική ταξινόμηση και περιγραφή των βακτηρίων της μεγάλης κοιλίας.....	22
2. ΕΙΔΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ.....	25
2.1 Αναερόβια Βακτήρια.....	29
2.2 Μη σποριογόνοι οργανισμοί	31
2.3 Μεθανογένεση.....	41
2.4 Cocci.....	53
3. ΠΡΩΤΟΖΩΑ ΜΕΓΑΛΗΣ ΚΟΙΛΙΑΣ.....	59
3.1 Ταξινόμηση	59
3.2 Δραστηριότητες στην μεγάλη κοιλία	60
3.3 Μετακίνηση.....	61
3.4 Επιπτώσεις στην απόδοση των ζώων	62
3.5 Υλικά και μέθοδοι	63
3.6 Δομή των πρωτόζωων	66
3.7 Αποτελέσματα και συζήτηση	67
3.8 Μορφολογικός χαρακτηρισμός των πρωτόζωων με συνεστιακό μικροσκόπιο.....	71
3.9 Δομή του πληθυσμού	72
3.10 Συμπέρασμα	73
3.11 Ο μεταβολικός ρόλος των πρωτόζωων.....	74
4. ΜΥΚΗΤΕΣ.....	76
4.1 Υλικά και μέθοδοι.....	80
4.1.1 Πειραματικές μετρήσεις και εργαστηριακές αναλύσεις.....	80
4.1.2 Συλλογή στομαχικού υγρού.....	81
4.1.3 Συλλογή δείγματος αίματος.....	81

Στην κατηγορία των μηρυκαστικών ζώων συμπεριλαμβάνονται τα βοοειδή, τα πρόβατα, οι αίγες, τα ελάφια και αρκετά ακόμη είδη ζώων. Κοινό χαρακτηριστικό γνώρισμα των μηρυκαστικών ζώων είναι η ικανότητα τους να εξασφαλίζουν θρεπτικά συστατικά από τις χονδροειδέεις ζωοτροφές και γενικότερα από τις κακής ποιότητας ζωοτροφές. Η ικανότητα των μηρυκαστικών, δεν οφείλεται σε κάποια ιδιαιτερότητα του ενζυμικού συστήματος του οργανισμού τους, αλλά σε γενικές γραμμές στη συμβιωτική σχέση μεταξύ του ζώου ξενιστή και του μικροβιακού πληθυσμού που επικοίζει το περιβάλλον της μεγάλης κοιλίας και προκαλεί μια ποικιλία μικροβιακών ζυμώσεων, με τη βοήθεια των οποίων διευκολύνεται η διάσπαση των ζωοτροφών.

Η σημαντικότερη διαφορά μεταξύ των μηρυκαστικών και των μονογαστρικών ζώων είναι η δυνατότητα των πρώτων να αναμασούν την τροφή τους (μηρυκασμός). Η αναμάσηση προκαλεί τον τεμαχισμό και την αύξηση της επιφάνειας της τροφής και διευκολύνει τη δράση των μικροοργανισμών και την αποτελεσματικότερη διάσπαση της. Τα μηρυκαστικά ζώα θεωρούνται ως τα περισσότερο αποτελεσματικά φυτοφάγα ζώα στη διάσπαση των ινωδών ουσιών. Εάν η λειτουργία των προστομάχων επιτελείται απρόσκοπτα, ένα μηρυκαστικό ζώο μπορεί να παράγει μια μεγάλη αναλογία θρεπτικών συστατικών, ικανών να καλύψουν όλες τις ανάγκες του. Ο μικροβιακός πληθυσμός μετατρέπει τις θρεπτικές ουσίες της τροφής σε υψηλής βιολογικής αξίας μικροβιακή Πρωτεΐνη και Πτητικά Λιπαρά Οξέα, τα οποία (προϊόντα) μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τον οργανισμό του μηρυκαστικού για τη κάλυψη των αναγκών του σε πρωτεΐνη και ενέργεια αντίστοιχα (Νικολακάκης Ι., 2014).

Για να διασφαλιστεί η υγεία του μηρυκαστικού και να εξασφαλιστεί η άριστη λειτουργία του πεπτικού σωλήνα χορηγούσαν στα ζώα ζωοτροφές εμπλουτισμένες με αντιβιοτικά με σκοπό την βελτίωση των αποδόσεων. Η χρήση τους όμως έχει απαγορευτεί στην Ε.Ε. από το 2006 λόγω της ανθεκτικότητας των βακτηρίων εξαιτίας της παρατεταμένης χρήσης τους αλλά και των κατάλοιπών τους στα παραγόμενα προϊόντα όπως το γάλα και το κρέας. Ως εκ τούτου καταβλήθηκαν σημαντικές προσπάθειες για την ανάπτυξη εναλλακτικών τρόπων βελτίωσης της αποδοτικότητας και της παραγωγικότητας. Μία τέτοια λύση αποτελούν τα

εκχυλίσματα των φυτών και οι δευτερογενείς μεταβολίτες τους όπως οι τανίνες και οι σαπωνίνες που έχουν αντιμικροβιακές ιδιότητες. Τα αιθέρια έλαια και τα εκχυλίσματα των φυτών επιδρούν σημαντικά στις ζυμώσεις της μεγάλης κοιλία καθώς και στον μικροβιακό πληθυσμό της, με αποτέλεσμα τη βελτίωση των αποδόσεων τους, αλλά μένει ακόμη να προσδιοριστούν οι άριστες ποσότητες των ενεργών συστατικών των αιθέριων ελαίων που πρέπει να προστεθούν αλλά και το είδος του σιτηρεσίου στο οποίο θα έχουν τη δυνατότητα να ασκήσουν τη μέγιστη ωφέλιμη δράση. Τα αιθέρια έλαια, σύμφωνα με *in vitro* κυρίως ερευνητικές εργασίες, είναι δυνατό να αναστείλουν τη δράση ορισμένων βακτηρίων στη μεγάλη κοιλία, που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή μεθανίου και συνεπώς να περιορίσουν τις ενεργειακές απώλειες των σιτηρεσίων. Οι διαπιστώσεις αυτές δεν επαληθεύονται επαρκώς από τον ελάχιστο αριθμό των *in vivo* αντίστοιχων ερευνητικών εργασιών. Η ανακολουθία αυτή πιθανά οφείλεται στους διαφορετικούς τύπους και στις διαφορετικές χορηγούμενες ποσότητες αιθέριων ελαίων ή των συστατικών τους που έχουν χρησιμοποιηθεί στις *in vivo* ερευνητικές εργασίες. Ένας σημαντικός αριθμός ενεργών συστατικών των αιθέριων ελαίων έχει ταυτοποιηθεί. Τα ενεργά αυτά συστατικά των αιθέριων ελαίων θα μπορούσαν να ασκήσουν διαφορετικό τρόπο και εύρος δράσης με την παρουσία τους στη μεγάλη κοιλία (Δολγηρά Ι., 2016).

Γενικά ένα πρόγραμμα διατροφής για τα μηρυκαστικά θεωρείται σωστό και αποτελεσματικό όταν τα μικροβιακά προϊόντα από την διάσπαση των θρεπτικών συστατικών στο περιβάλλον της μεγάλης κοιλία καλύπτουν το μεγαλύτερο μέρος των αναγκών του ζώου, έτσι ώστε να μην υφίσταται ανάγκη προσθήκης επιπλέον θρεπτικών συστατικών στο σιτηρέσιο (Νικολακάκης Ι., 2014).

SUMMARY

The ruminative animals including the cattle, the sheeps, the goats, the deers and enough still not domestic species of animals. The ruminative animals can ensure components from the gross foods and generally from bad quality forages. The capacity of ruminative animals it is owed in the symbiotic relation between the animal host and microbial population which it lives in the environment of the rumen and it is causes a variety of microbial fermentations, with the help whoever is facilitated the split of forages.

The most important difference between the ruminative and monogastrics animals is the ability of the first to ruminating their food. The rumination it causes the chopping and the increase of surface of food so this facilitate the action of microorganisms and their more effective split. The ruminative animals are considered as the more effective vegetarian animals in the split of fibrillose substances. A ruminant can produce a big proportion of nutritious components which are capable to cover all their needs. The microbial population changes the nutrition substances of food in high biological value microbial protein and volatile greasy acids, which can be used by the organism of ruminative for the cover of needs in protein and energy respectively.

To ensure the health of ruminant and to ensure optimum functioning of the digestive system animal feed supplements with antibiotics. The use of antibiotics has been banned in Europe from 2006 because of its resistance and residues in meat and milk. Therefore, alternative ways have been developed to improve efficiency and productivity. Such a solution consists of plant extracts and their secondary metabolites such as tannins and saponins which have antimicrobial properties. The essential oils influence the fermentation in the rumen and in its microbial population. The quantities and the type of wheat must be determined in order to maximize the beneficial effect. Some essential oils can inhibit action of bacteria in their rumen, which are responsible for the production of methane.

Generally a program of diet for ruminant animals is correct and effective when the microorganism products cover the bigger parts of need of animals.

Συντομογραφίες

XZ: Χονδροειδείς Ζωοτροφές

ΠΛΟ: Πεπτά Λιπαρά Οξέα

N-χες: Αζωτούχες Ουσίες

ΙΟ: Ινώδεις ουσίες

ΞΟ: Ξηρά Ουσία

Οι περισσότεροι από τους οργανισμούς στη γη δεν έχουν την ικανότητα να διασπούν την κυτταρίνη. Τα φυτοφάγα ζώα (άλογα, βοοειδή, αιγοπρόβατα) καθώς και οι τερμίτες έχουν την δυνατότητα να διασπούν υψηλά ποσά κυτταρίνης στο πεπτικό τους σύστημα. Παρόλα αυτά ακόμα και αυτά δεν μπορούν να την διασπάσουν από μόνα τους, γιατί δεν έχουν ένζυμα που να διασπούν αυτά τα υλικά. Έτσι η διάσπαση της κυτταρίνης στηρίζεται στους διάφορους τύπους μικροοργανισμών, που υπάρχουν στο στομάχι τους. Ο μισός πληθυσμός των ζωντανών οργανισμών στο εσωτερικό του στομάχου αποτελείται από βακτήρια. Εντούτοις, παίζουν σημαντικό ρόλο στην διάσπαση της κυτταρίνης.

Το στομάχι περιέχει αρκετά είδη μικροβίων, οι μυϊκοί σάκοι είναι η κύρια δομή των στομάχων, ανάμεσα στα χάσματα των οποίων οι μικροοργανισμοί επιτίθενται στην κυτταρίνη και την διασπούν με την βοήθεια των όξινων εκκρίσεων στο έντερο.

Το στομάχι των μηρυκαστικών αποτελείται από 4 χωριστά διαμερίσματα τα οποία ονομάζονται ως εξής μεγάλη κοιλία (rumen or paunch), κεκρύφαλος (reticulum or honeycomb), ο έχινος (omasum or manyplies), ήνυστρο (abomasum or true stomach). Η μεγάλη κοιλία αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος, όπου ζουν τα δισεκατομμύρια των μικροοργανισμών με συμβιωτικό τρόπο.

Στην μεγάλη κοιλία των μηρυκαστικών διαφορετικοί τύποι βακτηρίων υπάρχουν, οι οποίοι ενεργούν στην διάσπαση της κυτταρίνης, του αμύλου, της λιγνίνης, της πρωτεΐνης και ενός μικρού ποσοστού των λιπιδίων.

Κοινά χαρακτηριστικά γνωρίσματα των βακτηρίων της μεγάλης κοιλίας.

- Τα περισσότερα βακτήρια που υπάρχουν είναι Gram θετικά κοκκία και ράβδοι.
- Αναερόβια βακτήρια υπάρχουν στην μεγάλη κοιλία λόγω του μικρού ποσοστού οξυγόνου.
- Το pH κυμαίνεται από 6 – 6,9.
- Για την ανάπτυξη των βακτηρίων κατάλληλη θερμοκρασία είναι 39° C.

Η δεύτερη μεγάλη κατηγορία μικροοργανισμών που ζουν στην μεγάλη κοιλία είναι τα πρωτόζωα. Τα πρωτόζωα είναι οι πρώτοι μικροοργανισμοί που ανακαλύφθηκαν στην μεγάλη κοιλία. Αυτοί οι μονοκύτταροι οργανισμοί που ονομάζονται πρωτόζωα και βακτήρια επιτελούν το μεγαλύτερο μέρος της πέψης. Τα περισσότερα πρωτόζωα της μεγάλης κοιλίας ανήκουν στην κατηγορία των βλεφαροειδών. Ανάλογα με την μορφολογία τους τα πρωτόζωα διακρίνονται σε βλεφαροειδή και τριχοειδή.

Μέσα στην μεγάλη κοιλία υπάρχουν και μύκητες και αυτό επιβεβαιώθηκε από την παρουσία χυτίνης. Αυτοί οι μύκητες έχουν ενεργό δράση στην διάσπαση των ινωδών ουσιών.

Τελευταία κατηγορία αποτελούν τα αρχαία και οι ζύμες. Οι μικροοργανισμοί αυτοί βοηθούν στην διάσπαση των ινωδών ουσιών. Στα αρχαία συγκαταλέγονται τα προκαρυωτικά κύτταρα. Χρησιμοποιούν το O_2 και το CO_2 και παράγουν μεθάνιο. Η μεθανογένεση παίζει σημαντικό ρόλο στην ζύμωση που πραγματοποιείται στη μεγάλη κοιλία. Οι ζύμες σταθεροποιούν το pH και ενισχύουν την διάσπαση των ινωδών ουσιών.

Ο κεκρύφαλος περιλαμβάνει αρκετά είδη από βακτήρια, μύκητες, αρχαία και στελέχη από πρωτόζωα. Ο έχινος είναι ο μεγαλύτερος σάκος μέσα στο στομάχι ο οποίος είναι ο σημαντικότερος χώρος της μικροβιακής επεξεργασίας της διασπώμενης κυτταρίνης, όπου θα ξεκινήσει και η διαδικασία της ζύμωσης. Στο ήνυστρο το pH κυμαίνεται στο 4 για την θανάτωση της χλωρίδας και της πανίδας που υπάρχουν μέσα σε αυτό.

Η πέψη η οποία λαμβάνει χώρα στο στομάχι των μηρυκαστικών είναι μία πολύ σύνθετη διαδικασία, ο κεκρύφαλος είναι το μοναδικό όργανο που υπάρχει για την πέψη και την διάσπαση της κυτταρίνης. Οι υδατάνθρακες παίζουν σημαντικό ρόλο στην διάσπαση της κυτταρίνης με την βοήθεια των μικροβιακών ενζύμων. Η μεταφορά του μικροβιόματος από τους μονοσακχαρίτες θα οδηγήσει στην πέψη της κυτταρίνης στον κεκρύφαλο.

Για την αποκοδόμηση της κυτταρίνης στο πεπτικό σύστημα των μηρυκαστικών σημαντικό ρόλο παίζουν τα βακτήρια *Ruminococcus*. Το είδος της τροφής που δίνεται στο μικροβιακό φορτίο θα επηρεάσει μόνο την διαδικασία. Εκτός από το μικροβιακό φορτίο που παρουσιάζεται στο 70% του πεπτικού συστήματος των μηρυκαστικών ακόμα περισσότερα θα πρέπει να ταυτοποιηθούν από επιστημονικές έρευνες

1.1 Πέψη της τροφής

Η τροφή, για να αποδώσει στον οργανισμό τα θρεπτικά συστατικά που περιέχει, πρέπει να υποστεί ειδική κατεργασία εντός του πεπτικού σωλήνα του ζώου που πραγματοποιείται με τη λειτουργία της πέψης. Πολλά από τα οργανικά συστατικά της τροφής βρίσκονται υπό τη μορφή αδιάλυτων μεγαλομοριακών ενώσεων, που πρέπει να υποστούν διάσπαση σε απλούστερες ενώσεις, πριν μπορέσουν να διέλθουν μέσω του βλεννογόνου του πεπτικού συστήματος στο αίμα και τη λέμφο. Η διαδικασία αυτή της διάσπασης ονομάζεται πέψη, ενώ αυτή της διέλευσης των πεπτών θρεπτικών συστατικών μέσω της μεμβράνης βλεννογόνου του πεπτικού συστήματος ονομάζεται, απορρόφηση.

Η πέψη διακρίνεται σε φυσική ή μηχανική και σε χημική. Η φυσική ή μηχανική πέψη περιλαμβάνει τη μάσηση και τις μυϊκές συσπάσεις του πεπτικού συστήματος και αποβλέπει:

α) στην καταστροφή της υφής της τροφής μέσω της κινητικής δραστηριότητας του στομάχου, καθώς και των φαινομένων διαπότισης και διόγκωσης της τροφής και

β) στην απελευθέρωση των θρεπτικών συστατικών που περιέχονται στην τροφή με διάλυση και εκχύλιση.

Παράλληλα, οι κινήσεις του πεπτικού συστήματος προωθούν την τροφή κατά μήκος αυτού.

Η χημική πέψη περιλαμβάνει τη δράση των ενζύμων τα οποία συμβάλλουν στη διάσπαση των θρεπτικών συστατικών προς απλούστερες ενώσεις. Τα ένζυμα είτε εκκρίνονται από τους αδένες του πεπτικού σωλήνα και τους αδένες που είναι προσαρτημένοι σ' αυτόν (ήπαρ, πάγκρεας) είτε περιέχονται σε ορισμένες ζωοτροφές που δεν έχουν υποστεί κάποιου είδους κατεργασία είτε αποτελούν προϊόντα της βιοχημικής δραστηριότητας των μικροοργανισμών (βακτηρίων, πρωτόζωων και μυκήτων) των ζυμωτικών χώρων (συμβιωτική πέψη). Η συμβιωτική πέψη είναι σημαντική στα μηρυκαστικά ζώα (προστόμαχοι, παχύ έντερο) και περιορισμένη στους χοίρους (κυρίως στο παχύ έντερο) και τα πτηνά (πρόλοβο).

Σε όλα τα ζώα το πεπτικό σύστημα είναι δυνατόν να διακριθεί σε δύο τμήματα. Στο ένα, το οποίο περιλαμβάνει τον στομάχο και το λεπτό έντερο, η τροφή υπόκειται στη συνήθη πέψη, και στο άλλο, το οποίο περιλαμβάνει το τυφλό έντερο και το εγγύς κόλον, στα δε μηρυκαστικά επιπλέον και τους προστομάχους, η τροφή υπόκειται στην επίδραση των μικροοργανισμών που βρίσκονται εκεί μόνιμα

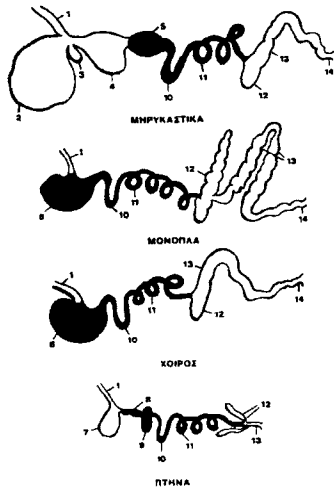
εγκατεστημένοι (ζυμωτικοί χώροι). Η αναλογία μεταξύ των δύο αυτών τμημάτων διαμορφώνει τους διάφορους τύπους πέψης οι οποίοι είναι τρεις: των φυτοφάγων, των παμφάγων και των σαρκοφάγων. Ο πρώτος τύπος χαρακτηρίζεται από μεγάλη αναλογία ζυμωτικών χώρων, ο δεύτερος από μικρή και ο τρίτος από πολύ περιορισμένη ανάπτυξη των ζυμωτικών χώρων (πίνακας 1, σχήμα 1) (Ζέρβας Γ., 2005).

Πίνακας 1: Αναλογία χωρητικότητας ζυμωτικών χώρων στους διάφορους τύπους πέψης από Φυσιολογία Θρέψεως Π. Καλαϊτσάκη, 1981.

ΤΥΠΟΣ ΠΕΨΗΣ	ΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΜΕΑ ΕΙΔΗ ΑΓΡΟΤΙΚΩΝ ΖΩΩΝ	ΖΥΜΩΤΙΚΟΙ ΧΩΡΟΙ %	ΣΤΟΜΑΧΟΣ ΚΑΙ ΛΕΠΤΟ ΕΝΤΕΡΟ %
Φυτοφάγα	Μονογαστρικά (μόνοπλα, κόνικλοι)	61,3	38,7
	Μηρυκαστικά (βοοειδή, πρόβατα, αίγες)	72,1	27,9
Παμφάγα	Χοίροι – Πτηνά	37,3	62,7
Σαρκοφάγα	Νεογένητα ζώα όλων των ειδών	15,9	4,1

Διαγραμματική
παρουσίαση του
πεπτικού
συστήματος των
αγροτικών ζώων.

1. Οισοφάγος
2. Μεγάλη κοιλία
3. Κεκρύφαλος
4. Εχίνος ή βίβλος
5. Ήνυστρο
6. Στόμαχος
7. Πρόλοβος
8. Μembranώδης
στόμαχος
9. Μυώδης
στόμαχος
10. Δωδεκαδάκτυλο
11. Λεπτό έντερο
12. Τυφλό έντερο
13. Κόλον
14. Απευθσμένο



Σχήμα 1: Διαγραμματική παρουσίαση του πεπτικού συστήματος των αγροτικών ζώων
από Φυσιολογία Θρέψεως Π. Καλαϊσάκη, 1981.

1.2 Μικροβιακή ή συμβιωτική πέψη στα μηρυκαστικά ζώα

Οι ζωοτροφές που χρησιμοποιούνται στη διατροφή των μηρυκαστικών ζώων, και ιδιαίτερα οι χονδροειδείς, αποτελούνται κυρίως από πολυσακχαρίτες, όπως είναι για παράδειγμα, η κυτταρίνη, τους οποίους δεν μπορούν να διασπάσουν τα πεπτικά ένζυμα των θηλαστικών ζώων. Τα μηρυκαστικά όμως έχουν αναπτύξει ένα ειδικό σύστημα πέψης στο οποίο εμπλέκεται η μικροβιακή πέψη της τροφής, πριν ακόμα αυτή εκτεθεί στα πεπτικά ένζυμα. Άλλα φυτοφάγα ζώα, πλην των μηρυκαστικών, όπως είναι ο ίππος, έχουν αναπτύξει συστήματα μικροβιακής πέψης που διαφέρουν από εκείνα των μηρυκαστικών (Ζέρβας Γ., 2005).

1.3 Ανατομία του στομάχου και φυσιολογία της πέψης στα μηρυκαστικά

Ο στόμαχος των μηρυκαστικών διαφρείται σε τέσσερα τμήματα. Στα νεογνήτα τα δύο πρώτα τμήματα, η μεγάλη κοιλία και η συνέχεια αυτής που είναι ο κεκρύφαλος, είναι σχετικά μη ανεπτυγμένα. Το γάλα, που φτάνει στον κυρίως στόμαχο, διοχετεύεται μέσω της οισοφαγικής αύλακας κατευθείαν στο τρίτο και τέταρτο τμήμα που είναι η βίβλος και το ήνυστρο, αντίστοιχα. Καθώς τα νεογνά αναπτύσσονται, αρχίζουν να καταναλώνουν στερεά τροφή, οπότε τα δύο πρώτα τμήματα (μεγάλη κοιλία και κεκρύφαλος) εξελίσσονται ανατομοφυσιολογικά και μεγεθύνονται, εις τρόπον ώστε στο ενήλικο πλέον μηρυκαστικό να αποτελούν το 85% περίπου της συνολικής χωρητικότητας του στομάχου. Στα ενήλικα, η οισοφαγική αύλακα δε λειτουργεί κάτω από κανονικές συνθήκες διατροφής, οπότε η τροφή και το νερό περνούν κανονικά πρώτα από τη μεγάλη κοιλία και τον κεκρύφαλο. Όμως, το «αντανάκλαστικό» κλείσιμο της αύλακας και ο σχηματισμός σωλήνα μπορεί να προκληθεί ακόμα και στα ενήλικα μηρυκαστικά, ιδιαίτερα αν αφεθούν να θηλάσουν.

Η τροφή αναμειγνύεται και αραιώνεται με άφθονη ποσότητα σιέλου, πρώτα κατά την πρόσληψή της και μετά πάλι κατά τον μηρυκασμό. Οι συνήθεις ποσότητες σιέλου που παράγονται ημερησίως είναι περί τα 150 λίτρα για τα βοοειδή και περί τα 10 λίτρα για τα αιγοπρόβατα. Το περιεχόμενο της μεγάλης κοιλίας έχει κατά μέσον όρο 85 – 93% νερό, αλλά συνήθως διακρίνονται δύο φάσεις: μία υγρή, στην οποία βρίσκονται τα λεπτότερα τεμάχια της τροφής, και μία συνεκτικότερη, που βρίσκεται

υπεράνω της πρώτης, στην οποία βρίσκονται τα αδρότερα στερεά τεμάχια της τροφής.

Η διάσπαση της τροφής γίνεται εν μέρει με φυσικούς (μηχανικούς) και εν μέρει με χημικούς τρόπους. Το περιεχόμενο της μεγάλης κοιλίας αναμειγνύεται συνεχώς με ρυθμικές συσπάσεις των τοιχωμάτων της και κατά τον μηρυκασμό το αδρότερο υλικό που βρίσκεται στο επάνω μέρος οδηγείται μέσω του οισοφάγου στη στοματική κοιλότητα με τη βοήθεια μια κυματοειδούς σύσπασης. Το υγρό που υπάρχει στο υλικό αυτό υφίσταται έντονη μάσηση, πριν επιστρέψει πάλι στη μεγάλη κοιλία. Ο σημαντικότερος παράγοντας που προτρέπει το ζώο να μηρυκάσει είναι πιθανότατα η απλή διέγερση του επιθηλίου του επάνω μέρους (καρδιακή μοίρα) της μεγάλης κοιλίας. Μερικά σιτηρέσια που περιέχουν μικρό ή ελάχιστο ποσοστό αδρά τεμαχισμένων χονδροειδών ζωοτροφών (ΧΖ) δεν μπορούν να προκαλέσουν ικανή διέγερση για μηρυκασμό.

Ο χρόνος μηρυκασμού εξαρτάται κυρίως από το ποσοστό των ΧΖ και την εν γένει υφή του σιτηρεσίου. Στα βόσκοντα βοοειδή ο μηρυκασμός διαρκεί περί τις 8 ώρες ημερησίως ή περίπου όσο διαρκεί η βόσκηση. Κάθε βλωμός που επανέρχεται στη στοματική κοιλότητα υφίσταται επαρκή μάσηση (40-50 φορές), η οποία είναι πολύ πιο έντονη από εκείνη που υπέστη κατά την πρόσληψη.

Το περιβάλλον της μεγάλης κοιλίας και του κεκρύφαλου εξασφαλίζει ένα σύστημα συνεχούς καλλιέργειας αναερόβιων βακτηρίων, πρωτόζωων και μυκήτων. Η τροφή και το νερό εισέρχονται στη μεγάλη κοιλία όπου η τροφή υφίσταται μερική ζύμωση, από την οποία παράγονται κατά κύριο λόγο πεπτά λιπαρά οξέα (ΠΛΟ), μικροβιακά κύτταρα και αέρια (όπως μεθάνιο- CH_4 και διοξείδιο του άνθρακα CO_2). Τα αέρια αποβάλλονται με την ερυγή και τα ΠΛΟ απορροφώνται κυρίως από τα τοιχώματα της μεγάλης κοιλίας. Τα μικροβιακά κύτταρα, μαζί με τα τεμάχια της τροφής που δεν έχουν υποστεί διάσπαση, περνούν στο ήνυστρο και το λεπτό έντερο. Εκεί υφίστανται ζύμωση από τα ένζυμα που εκκρίνονται από τον ζωικό οργανισμό – ξενιστή και τα προϊόντα της πέψης στη συνέχεια απορροφώνται. Στο παχύ έντερο ακολουθεί μία δεύτερη φάση μικροβιακής πέψης. Τα ΠΛΟ που παράγονται στο παχύ έντερο απορροφώνται, αλλά τα μικροβιακά κύτταρα αποβάλλονται με την κόπρη μαζί με τα μη πεφθέντα ή πεφθέντα αλλά μη απορροφηθέντα συστατικά της τροφής.

Όπως κάθε σύστημα συνεχούς καλλιέργειας, η μεγάλη κοιλία χρειάζεται κάποιους ομοιοστατικούς μηχανισμούς. Τα οξέα που παράγονται κατά τις ζυμώσεις είναι θεωρητικά σε θέση να μειώσουν το pH του υγρού της μεγάλης κοιλίας στο 2.5 –

3.0, αλλά το pH κάτω από φυσιολογικές συνθήκες κυμαίνεται από 5.5 – 6.5. αυτό οφείλεται στα φωσφορικά και διττανθρακικά ιόντα που περιέχονται στο σίελο, τα οποία δρουν ως ρυθμιστικά διαλύματα, αλλά και στην ταχεία απορρόφηση των οξέων. Η ωσμωτική πίεση του περιεχόμενου της μεγάλης κοιλίας διατηρείται σε παραπλήσια επίπεδα με εκείνη του αίματος λόγω ροής ιόντων μεταξύ αυτών. Το οξυγόνο που έρχεται με την τροφή χρησιμοποιείται άμεσα και έτσι διατηρείται το αναερόβιο περιβάλλον. Απουσία οξυγόνου ο άνθρακας ενώνεται με ιόντα υδρογόνου, οπότε σχηματίζεται CH_4 . Η θερμοκρασία του υγρού της μεγάλης κοιλίας παραμένει παραπλήσια εκείνης του σώματος του ζώου ($38^\circ - 42^\circ \text{C}$). Τέλος, τα μη πεφθέντα συστατικά της τροφής, μαζί με τα διαλυτά συστατικά και τα βακτήρια, μετακινούνται από τη μεγάλη κοιλία στον κεκρύφαλο και τη βίβλο μέσω του ανοίγματος που υπάρχει μεταξύ τους.

1.4 Μικροοργανισμοί της μεγάλης κοιλίας

Στους ζυμωτικούς χώρους του πεπτικού συστήματος των ζώων φιλοξενούνται μικροοργανισμοί οι οποίοι ζουν εις βάρος της λαμβανόμενης τροφής ή των υπολειμμάτων της και συμβάλλουν λιγότερο ή περισσότερο στην πέψη των ζωοτροφών, εφόσον η εξέλιξη των συμβιωτικών φαινομένων είναι ομαλή.

Από τη συμβίωση αυτή ωφελούνται κυρίως τα ζώα που διατρέφονται με φυτικές τροφές, γιατί τα πεπτικά υγρά δεν περιέχουν κυτταρινάσες, οι δε κυτταρινάσες των φυτικών κυττάρων είναι ανεπαρκείς για μια αξιόλογη διάσπαση της κυτταρίνης και αποσάθρωση του κυτταρικού τοιχώματος. Η κυτταρινόλυση πραγματοποιείται μηχανικά και χημικά (με το HCL), παρουσία όμως κυτταρινολυτικών μικροοργανισμών γίνεται πληρέστερα και εκτενέστερα. Παράλληλα βέβαια προσβάλλονται από τους μικροοργανισμούς και οι υπόλοιποι υδατάνθρακες της τροφής, καθώς και οι αζωτούχες (N-χες) ουσίες, πλην όμως ο βαθμός προσβολής και το είδος του θρεπτικού συστατικού που προσβάλλεται εξαρτώνται όχι μόνο από το είδος των ζωοτροφών αλλά και από τη θέση του πεπτικού συστήματος στην οποία βρίσκονται οι μικροοργανισμοί, καθώς και από το μέγεθος των ζυμωτικών χώρων. Έτσι, η μικροβιακή πέψη είναι περισσότερο

αξιόλογη στα μηρυκαστικά ζώα, γιατί σ' αυτά οι κύριοι ζυμωτικοί χώροι (προστόμαχοι) προηγούνται του στομάχου.

Μικροοργανισμοί απαντούν επίσης εντός του στομάχου, αλλά η συμβολή τους στο φαινόμενο της πέψης είναι περιορισμένη και εντός του λεπτού εντέρου. Οι τελευταίοι είναι ωφέλιμοι (συνθέτουν βιταμίνες) ή μη ωφέλιμοι μερικές φορές βλαπτικοί (παράγουν τοξικές ουσίες), γιατί στερούν τον οργανισμό – ξενιστή από μέρος των θρεπτικών συστατικών της τροφής (~5%).

Οι μικροοργανισμοί εισέρχονται στο πεπτικό σύστημα του ζώου αμέσως μετά τη γέννησή του, αλλά αναπτύσσονται αξιόλογα μόνο μετά τη λήψη στερεάς τροφής. Άλλωστε η ανάπτυξη και η εξέλιξη του πεπτικού συστήματος του νεογνού είναι συνάρτηση της λήψης στερεάς τροφής (από πλευράς χρόνου, είδους και ποσότητας) και της ανάπτυξης της μικροχλωρίδας. Στα μηρυκαστικά, κατά τη διάρκεια της αποκλειστικής με γάλα διατροφής, το ήνυστρο είναι μεγαλύτερο από τους προστόμαχους και οι λάχνες του βλεννογόνου της μεγάλης κοιλίας παραμένουν υπανάπτυκτες. Η κατάσταση αυτή διατηρείται, εφόσον το ζώο εξακολουθήσει να διατρέφεται μόνο με γάλα. Αντίθετα, μετά τη λήψη στερεάς τροφής, αναπτύσσονται οι προστόμαχοι, με τη μηχανική επίδραση της τροφής και οι λάχνες του βλεννογόνου και αυξάνεται το μέγεθος των παρωτίδων για αυξημένη παραγωγή σέλου.

Στους μικροοργανισμούς των προστόμαχων περιλαμβάνονται κυρίως βακτήρια και δευτερευόντως πρωτόζωα και μύκητες. Τα βακτήρια, πάνω από 200 είδη, αριθμούν $10^9 - 10^{10}$ ανά ml περιεχομένου της μεγάλης κοιλίας. Τα περισσότερα εξ αυτών είναι αναερόβια και δεν σχηματίζουν σπόρια. Ο συνολικός αριθμός βακτηρίων και ο σχετικός πληθυσμός συγκεκριμένων ειδών εξαρτάται από το είδος το σιτηρεσίου. Για παράδειγμα, σιτηρέσια με υψηλή συμμετοχή συμπυκνωμένων ζωοτροφών (ΣΖ) ευνοούν την ανάπτυξη και το πολλαπλασιασμό των γαλακτοβάκκων.

Από τα βακτήρια συναντώνται κυρίως τα παρακάτω γένη:

Βάκυλλοι: *Bacteroides*, *Succicimonas*, *Selenomonas*, *Methanobacterium*, και σε πολύ μικρότερο αριθμό *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Ruminobacterium* και *Eubacterium*.

Κόκκοι: *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus*, *Veilonella*, και *Streptococcus* (*bovi*).

Δονάκια: *Butyrivibrio*, *succinivibrio*.

Τα πρωτόζωα βρίσκονται σε μικρότερους αριθμούς ($10^6/\text{ml}$) σε σχέση με τα βακτήρια, αλλά είναι μεγαλύτερα και ως εκ τούτου η συνολική μάζα τους είναι παρόμοια με εκείνη των βακτηρίων. Στη μεγάλη κοιλία έχουν αναγνωριστεί περισσότερα από 100 είδη, εκ των οποίων τα περισσότερα ανήκουν στα βλεφαριδωτά (*Ciliate*) και τα λιγότερα στα μαστιγοφόρα (*Flagellatae*). Τα βλεφαριδωτά εκπροσωπούνται κυρίως από τα γένη των ολότριχων *Isotricha* και *Dasytricha* και από την οικογένεια των ενδοδιονόμοφων (*Ophryoscolecidae*), που περιλαμβάνει τα γένη *Entodinium*, *Diplodinium*, *Ophryoscolex*, *Caloscolex* και *Opisthotrichum*.

Η κανονική μικροχλωρίδα (βακτήρια) και μικροπανίδα (πρωτόζωα) της μεγάλης κοιλίας εγκαθίσταται νωρίς, στην ηλικία περίπου των 6 εβδομάδων για τα μωσχάρια. Ο πολλαπλασιασμός των πρωτόζων ευνοείται σε $\text{pH}=6-7$ και διακόπτεται σε $\text{pH}\leq 5.5$. Τα επικρατέστερα κάθε φορά είδη πρωτόζων εξαρτώνται από τη σύνθεση του σιτηρέσιου. Έτσι όταν το σιτηρέσιο είναι πλούσιο σε σάκχαρα, επικρατούν περισσότερο τα *Isotricha*, ενώ όταν το σιτηρέσιο έχει πολλές ημικυτταρίνες, επικρατούν τα γένη *Epidinium* και *Ophryoscolex*. Το *Entodinium caudatum* συναντάται συχνότερα στα ζώα, το σιτηρέσιο των οποίων είναι πλούσιο σε άμυλο.

Οι μύκητες που βρίσκονται στη μεγάλη κοιλία είναι ανυπεράσθητοι αναερόβιοι και μόνο μερικά (~12) είδη έχουν μέχρι στιγμής χαρακτηριστεί, τα οποία ανήκουν στο γένος *Neocallimastix*. Οι μύκητες της μεγάλης κοιλίας μπορούν να χρησιμοποιούν τους περισσότερους πολυσακχαρίτες και πολλά από τα διαλυτά σάκχαρα. Υδατάνθρακες, όπως πηκτίνες, πολυγαλακτουρινικό οξύ, αραβινόζη, μαννίνη και γαλακτόζη δεν χρησιμοποιούνται από τους μύκητες. Η συμβολή των μυκήτων στη ζύμωση της τροφής εντός της μεγάλης κοιλίας δεν έχει ακόμη προσδιοριστεί ποσοτικά, αλλά θεωρείται ότι αυτή αυξάνεται, όταν το σιτηρέσιο είναι πλούσιο σε κυτταρικά τοιχώματα ινωδών ουσιών (ΙΟ) και πτωχό σε άμυλο ή νεαρά χλωρά νομή. Οι μύκητες τότε μπορούν να φτάσουν το 10% περίπου της μικροβιακής βιομάζας.

Οι μικροοργανισμοί των προστομάχων θεωρείται ότι λειτουργούν συλλογικά προκειμένου να διασπάσουν τα συστατικά της τροφής. Μελέτες έχουν δείξει ότι το 75% των βακτηρίων βρίσκεται προσκολλημένο στα τεμαχίδια της τροφής. Η μικροβιακή βιομάζα που συντίθεται στη μεγάλη κοιλία αντιπροσωπεύει το 20% των θρεπτικών συστατικών που απορροφά το ζώο – ξενιστής. Η ξηρά ουσία (ΞΟ) των βακτηρίων περιέχει περί τα 100g N/Kg, εκ των οποίων το 80% βρίσκεται υπό μορφή

αμινοξέων και το υπόλοιπο 20% υπό μορφή νουκλεϊνικών οξέων. Οι οικολογικές συνθήκες των προστομάχων είναι ιδανικές για την ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό των μικροοργανισμών, διότι:

α) η θερμοκρασία των 39° C είναι ευνοϊκή,

β) με τον μηρυκασμό προσφέρεται διαρκώς νέα επιφάνεια τροφής και θρεπτικό υπόστρωμα για τους μικροοργανισμούς,

γ) η μεγάλη ποσότητα του σιέλου (10-20 λίτρα / Kg ΞΟ) που εισέρχεται στους προστομάχους με τον μηρυκασμό, αφενός διευκολύνει τη θρέψη των μικροοργανισμών, αφετέρου ρυθμίζει το pH του περιεχομένου των προστομάχων σε ευνοϊκά για τους μικροοργανισμούς όρια (5.8-7.0) με το NaHCO_3 το οποίο περιέχει. Στη ρύθμιση αυτή του pH συμβάλλει επίσης, όπως έχει ήδη αναφερθεί, η ικανότητα του τοιχώματος των προστομάχων να απορροφά μέρος της ζυμωτικής δραστηριότητας των μικροοργανισμών (τα ΠΛΟ),

δ) η ουρία, που περιέχεται στο σιέλο και αυτή που εισέρχεται στους προστομάχους μέσω του ρουμινοπηπτικού κύκλου, συμβάλλει σημαντικά στην N-χο θρέψη των μικροοργανισμών και

ε) το CO_2 που παράγεται, τόσο από τους μικροοργανισμούς όσο και από την αντίδραση του NaHCO_3 του σιέλου με τα παραγόμενα από τους μικροοργανισμούς οξέα, δημιουργεί αναερόβιες συνθήκες εντός των προστομάχων.

Τις τελευταίες δεκαετίες τα φαινόμενα που διεξάγονται στους προστομάχους με τη βοήθεια της βιοχημικής δραστηριότητας των μικροοργανισμών μελετώνται είτε *in vitro* με τη λεγόμενη τεχνητή μεγάλη κοιλία είτε *in vivo* μέσω συριγγίων (*fistula* ή *canoula*) που διανοίγονται στη μεγάλη κοιλία (στον αριστερό κενεώνα του ζώου).

χαρακτηρίζουν το οικοσύστημα της μεγάλης κοιλίας. Έτσι λοιπόν οι μικροοργανισμοί:

1) αλληλεπιδρούν για να βελτιώσουν τη διάσπαση των πολύπλοκων υδατανθράκων, όπως είναι η κυτταρίνη, πέραν του βαθμού διάσπασης που μπορεί να επιφέρουν τα ατομικά είδη,

2) παρέχουν θρεπτικά συστατικά που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών και

3) απομακρύνουν προϊόντα που παρεμποδίζουν την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών και τα αξιοποιούν για δικό τους όφελος.

Σημαντική πρόοδος έχει επιτευχθεί σχετικά με τη μελέτη της χημικής σύνθεσης των ζωοτροφών των μηρυκαστικών, την κατανόηση των ζυμωτικών φαινομένων εντός της μεγάλης κοιλίας, τον ποσοτικό προσδιορισμό των προϊόντων πέψης και απορρόφησης και κυρίως στη χρησιμοποίηση αυτών για την βελτίωση της παραγωγικότητας των ζώων. Κατά την διάρκεια της μικροβιακής ζύμωσης των θρεπτικών συστατικών της τροφής εντός της μεγάλης κοιλίας παράγονται διάφορα ενδιάμεσα μεταβολικά προϊόντα, τα οποία όμως δεν εντοπίζονται λόγω του ότι μεταβολίζονται περαιτέρω, καθόσον ένα τελικό προϊόν ζύμωσης ενός μικροβιακού είδους μπορεί να μεταβολιστεί στη συνέχεια από ένα άλλο μικροβιακό είδος.

1.6 Συμβατική ταξινόμηση και περιγραφή των βακτηρίων της μεγάλης κοιλίας

Τα βακτήρια που έχουν απομονωθεί στο περιεχόμενο της μεγάλης κοιλίας και τα οποία μελετήθηκαν ικανοποιητικά ανήκουν σε πολυάριθμα είδη και στελέχη. Κατά συνέπεια η πληρέστερη μελέτη όλων αυτών των βακτηρίων απαιτεί την ταξινόμησή τους σε διάφορες ομάδες με βάση κάποιο ή κάποια κατάλληλα επιλεγμένα κριτήρια. Μια τέτοια ταξινόμηση π.χ. μπορεί να βασιστεί κυρίως στο είδος ή στην κατηγορία του θρεπτικού συστατικού της τροφής, το οποίο προσβάλλουν τα βακτήρια κάτω από συνθήκες καθαρών καλλιιεργειών στο εργαστήριο, δηλ. *in vitro*, αν και δεν υπάρχει σαφής διαχωριστική γραμμή ως προς το θρεπτικό συστατικό το οποίο προσβάλλουν τα διάφορα βακτήρια. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα είδη *Bacteroides succinogenes* και *Butyrivibrio fibrisolvens*, τα οποία είναι κυτταρινολυτικά και,

παράλληλα, αμυλολυτικά, ενώ το είδος *Bacteroides rumenicola*, προσβάλλει τόσο το άμυλο όσο και τα αμινοξέα.

Οι κύριες κατηγορίες των μικροοργανισμών που επικρατούν εντός της μεγάλης κοιλίας φαίνονται στον πίνακα 2. Οι μικροοργανισμοί αυτοί ταξινομούνται ανάλογα με τη συμβολή τους στα ζυμωτικά φαινόμενα της μεγάλης κοιλίας όπως κυτταρινολυτικοί, αμυλολυτικοί κλπ, με βάση την σχετική τους υπεροχή. Πάντως, από τα 200 και πλέον είδη και μικροβιακά στελέχη που έχουν απομονωθεί στην μεγάλη κοιλία, μόνο μία αντιπροσωπευτική ομάδα μικροοργανισμών δίνεται στον παρακάτω πίνακα. Η ταξινόμηση αυτή σχετικά με τα χαρακτηριστικά του υποστρώματος, τα τελικά προϊόντα και τις θρεπτικές ανάγκες των μικροοργανισμών συμφωνεί με εκείνη του Hungte (1966). Έτσι λουπόν τα διάφορα είδη βακτηρίων κατατάσσονται στις παρακάτω έξι ομάδες:

1. κυτταρινολυτικά, που διασπούν αποκλειστικά την κυτταρίνη,
2. κυτταρινολυτικά - αμυλολυτικά, που διασπούν κατά προτίμηση το άμυλο, ενώ μπορούν, κατά περίπτωση, να διασπάσουν και την κυτταρίνη.,
3. αμυλολυτικά – σακχαρωτικά, που διασπούν τόσο το άμυλο όσο και σάκχαρα
4. βακτήρια, που διασπούν το γαλακτικό οξύ,
5. απαμινωτικά βακτήρια, που προκαλούν απαμίνωση των αμινοξέων, δηλ. απόσπαση την αμινικής ομάδας (-NH) από το μόριο του αμινοξέος, με συνέπεια τη μετατροπή του στο αντίστοιχο μόριο του κετοοξέος και
6. μεθαγόνα βακτήρια, τα οποία παράγουν CH₄ και χρησιμοποιούν μυρμηκικό οξύ, CO₂ και H₂

Πίνακας 2: Οι κύριες κατηγορίες των μικροοργανισμών που επικρατούν εντός της μεγάλης κοιλίας, Baldwin and Allison, 1983.

Μικροβιακή είδη	του συνόλου των που πληθύνουν	Λευκότεχοντα υποστρώματα	Τελικά προϊόντα σε μικτές καλλιέργειες	Θεωρητικές αναγνώσεις μικροοργανισμών
Κυτταρίδινα				
<i>Bacteroides succinogenes</i>	5 έως 9	ST, P	A, P, CO ₂	BFA, V, NH ₃ , βιοτίνη, PAB
<i>Ruminococcus albus</i>	3 έως 5		A, H ₂ , CO ₂	BFA, NH ₃ , βιοτίνη, PAB
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	3 έως 5		A, P, H ₂ , CO ₂	BFA, NH ₃ , βιοτίνη, PAB
Αμυλούρινα και Δεξτρουλινικά				
<i>Bacteroides amylophilus</i>	1 έως 10	P, ST	A, P, CO ₂	NH ₃
<i>Streptococcus bovis</i>	0 έως 20	SS, PR	A, L, CO ₂ (H ₂)	AA, βιοτίνη
<i>Succinimonas amylophila</i>	1 έως 3		A, P, CO ₂	BFA
<i>Succinivibrio dextrinosolvens</i>	1 έως 13	P	A, P, L, CO ₂ (H ₂)	AA
Σακχαρόφιλα				
<i>Bacteroides nimicola</i>	10 έως 19	ST, P, PR	A, L, CO ₂ (H ₂)	BFA
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	8 έως 12	C, ST, PR	A, B, L, CO ₂ (H ₂)	BFA, NH ₃ , AA, βιοτίνη, φυλλικό οξύ, πυριδοξόλη
<i>Megasphaera elsdenii</i>	0 έως 1	L, PR	A, P, B, V, H ₂ , CO ₂	AA
<i>Selenomonas ruminantium</i>	4 έως 12	ST, L	A, P, L, H ₂ , CO ₂	BFA, MET
Χηημοποιητών υδρογόνο				
<i>Methanobrevibacter ruminantium</i>	<1		CH ₄	BFA, NH ₃
<i>Vibrio succinogenes</i>	πολύ μικρό		P, NH ₃	NH ₃
Πρωτόζωα				
<i>Isotricha, Eudinium</i>		ST, SS	A, B, L, H ₂ , CO ₂	
<i>Dasyatis, Diplodinium</i> sp.		ST, SS	A, B, L, H ₂ , CO ₂	(βακτηριακά κύτταρα)
<i>Eudinium</i> sp.		ST	A, P, B, L, CO ₂ (H ₂)	
Σύνολο	40 έως 75			

¹ Ο συμβολισμός για τα υποστρώματα είναι: C = κυτταρίνη + ημικυτταρίνη, ST = άμυλο, SS=διαλυτά σάκχαρα, P=πρωτεΐνη, PR=πρωτεΐνη και L= γαλακτικό οξύ.

² Ο συμβολισμός για τα τελικά προϊόντα είναι: A = οξικό οξύ, P = προπιονικό οξύ, B=βουτυρικό οξύ, V = βαλεριανικό οξύ και μακρές αλυσίδες λιπαρά οξέα και L = γαλακτικό οξύ. Ο συμβολισμός H₂, CO₂ δηλώνει μικροοργανισμούς που παράγουν υδρογόνο και διοξείδιο του άνθρακα, ενώ ο συμβολισμός CO₂ (H₂) δείχνει μικροοργανισμούς που παράγουν μίγματικό οξύ, το οποίο με τη μεσολάβηση άλλων μικροοργανισμών μετατρέπεται σε CO₂ + H₂. Ο συμβολισμός P₂ δηλώνει ηλεκτρικό οξύ, το οποίο με τη μεσολάβηση άλλων μικροοργανισμών μετατρέπεται σε προπιονικό οξύ και CO₂ σε μικτές καλλιέργειες.

³ Ο συμβολισμός για τα θρεπτικά συστατικά είναι: BFA = C₁ - C₃ διακλυδιμενής αλκύου πτητικά λιπαρά οξέα, V= βαλεριανικό οξύ, AA= ημινοξέα, MET = μεθειονίνη και PAB = πυρο-αμινοβενζοϊκό οξύ.

2. ΕΙΔΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Πολλά είδη των αναερόβιων μικροοργανισμών έχουν απομονωθεί από το στομάχι των μηρυκαστικών. Σε αυτούς τους οργανισμούς συμπεριλαμβάνονται τα εξής γένη *Flavobacterium* (φλαβοβακτήρια), *Pseudomonas* (Ψευδομονάδες), *Proteus* (Πρωτοίς), και *Micrococcus* (Μικρόκοκκοι).

***Coliform bacilli* (Βάκιλοι Κολοβακτηριδίου).** Τα κολοβακτηρίδια δεν εμφανίζονται να είναι υψηλής σημασίας στο στομάχι των μηρυκαστικών στις έρευνες που έχουν γίνει. Η περιεκτικότητά τους φτάνει τα 10^3 έως 10^6 ανά ml στομαχικού περιεχομένου, παρόλα αυτά μεγαλύτερη περιεκτικότητα ανευρίσκεται σε ορισμένα βοοειδή από την 1^η έως την 3^η εβδομάδα της ηλικίας τους (Bryant M *et al.*, 1958). Έρευνες απέδειξαν μικρή περιεκτικότητα κολοβακτηριδίων στο περιεχόμενο του στομάχου των αιγοπροβάτων (Heald P *et al.*, 1953) με την μέθοδο του ανοσοφθορισμού αντισωμάτων. Τα κολοβακτηρίδια πιθανόν είναι σημαντικά στην ζύμωση της ξυλόζης στο στομάχι των μηρυκαστικών τα οποία απομονώθηκαν από στομαχικό υγρό παρουσία ξυλόζης την οποία και γρήγορα διέσπασαν (Heald P. *et al.*, 1952). Εντούτοις καμία εκτίμηση του αριθμού τους δεν έγινε. Τα σημαντικότερα είδη που βρέθηκαν στην μεγάλη κοιλία ήταν τα εξής *Escherichia coli*, *Aerobacter aerogenes*, *Aerobacter cloacae* καθώς και ενδιάμεσοι τύποι.

***Bacilli* (βάκιλοι).** Προαιρετικά αναερόβια είδη σπορίων όπως ο *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus* και *Bacillus circulans* έχουν απομονωθεί αλλά σε μικρό αριθμό. Καλλιεργήθηκε ίδιος αριθμός βακίλων από σανά και το στομάχι, αλλά ο αριθμός των σπορίων στο στομάχι ήταν πολύ χαμηλός, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι τα σπόρια προσλαμβάνονται με το σανά (Appleby J., 1955). Αυτοί οι μικροοργανισμοί έχουν ιδιαίτερη σημασία στην διάσπαση των πρωτεϊνών.

***Bacillus subtilis* (Βάκιλος σανού)** είναι ένα Gram-θετικό βακτήριο, σχήματος ράβδου και καταλάξης -θετικό. Όπως και με άλλα μέλη του γένους *Bacillus*, μπορεί να σχηματίσει ενδοσπόρια και να επιβιώσει σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες θερμοκρασίας και αποξήρανσης. Είναι ένα προαιρετικό αναερόβιο υποχρεωτικό αερόβιο. Είναι σε μεγάλο βαθμό μαστιγοφόρο. Αυτό του

δίνει τη δυνατότητα να μετακινείται γρήγορα σε υγρά. Αυτό το είδος βρίσκεται συνήθως στα ανώτερα στρώματα του εδάφους, και υπάρχουν αποδείξεις ότι ο *B subtilis* είναι ένα βακτήριο που ζει συμβιωτικά στο γαστρεντερικό σωλήνα των μηρυκαστικών και των ανθρώπων.

Propionibacteria. Απομονώθηκαν με γαλακτική ζύμωση *Propionibacterium* από την μεγάλη κοιλία των μηρυκαστικών με την χρήση εμπλουτισμένων καλλιεργειών σε γαλακτικό οξύ (Elsden S. *et al.*, 1945). Αργότερα απομονώθηκε ένας μεγάλος αριθμός πρωτεασών, γαλακτικής ζύμωσης, προπιονικού οξέως, παράγοντας βακτήρια από το στομάχι των βοοειδών το σανά και το χόμα (Gutierrez J *et al.*, 1953).

Lactobacilli. Οι συγκεκριμένοι βάκκοι είναι ικανοί να αναπτυχθούν σε αερόβιες συνθήκες και έχουν απομονωθεί από πολλούς μελετητές. Ο Hungate *et al.* παρατήρησαν ότι πληθυσμοί παρόμοιοι με το *Lactobacillus brevis* ήταν πολυάριθμοι στο στομάχι των αιγοπροβάτων 22 ώρες μετά την χορήγηση γλυκόζης σε διατροφή με σανά. Οι οργανισμοί αυτοί δεν ανιχνεύονται μεταξύ των κυρίαρχων βακτηρίων που καλλιεργήθηκαν σε άλλες έρευνες. Οι Mann *et al.*, απομόνωσαν λακτοβάκκους από το στομάχι των βοοειδών και αργότερα οι Mann και Oxford ανίχνευαν *L. brevis* σε αναλογία 1:3.000.000 και 1:10.000 σε διάλυμα στομαχικού περιεχομένου, σε βοοειδή ηλικίας 54 και 32 ημερών αντίστοιχα. Οι Mann και Oxford απομόνωσαν *Lactobacillus fermenti* από ένα 11 ημερών μοσχάρι. Οι Lodge *et al.*, υπολόγισαν περίπου 2,5 εκ. *Lactobacillus* ανά γραμμάριο σε βοοειδή με κανονική διατροφή για παραγωγή γάλακτος. Οι Jensen *et al.*, απομόνωσαν *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. fermenti*, *L. phantarum*, *L. acidophilus* και *L. casei* από βοοειδή με διατροφή πλούσια σε ινώδεις ουσίες. Τα δύο τελευταία είδη ανιχνεύθηκαν σε χαμηλές συγκεντρώσεις της τάξεως των 10^2 έως 10^4 ενώ τα υπόλοιπα σε αναλογία 10^6 έως 10^7 ml/στομαχικού περιεχομένου. Οι Petty and Briggs ανακάλυψαν τους *L. fermenti*, *L. acidophilus*, *L. casei*, και *L. phantarum* στην μεγάλη κοιλία των νεαρών και ώριμων βοοειδών. Ο *L. fermenti* (αναλογία 10^9 ml/στομαχικού περιεχομένου) ήταν ο κυρίαρχος βάκκος σε νεαρά βοοειδή τα οποία διατρέφονταν με συμπυκνώματα. Ο *L. acidophilus* (αναλογία 10^{13} ml/στομαχικού περιεχομένου) ήταν κυρίαρχος σε αγελάδες που διατρέφονταν με συμπύκνωμα και ο *L. casei* (αναλογία 10^{10} ml/στομαχικού περιεχομένου) ήταν κυρίαρχος σε αγελάδες οι οποίες διατρέφονταν με χόρτο.

Οι μελέτες αποδεικνύουν ότι οι λακτοβάκιλλοι λόγω της ικανότητάς τους να αναπτύσσονται σε αερόβιες συνθήκες συμβάλλουν σημαντικά στην λειτουργία της μεγάλης κοιλιά των μηρυκαστικών κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Οι έρευνες των Peppy and Briggs αποδεικνύουν ότι οι γαλακτοβάκιλλοι υπάρχουν στην μεγάλη κοιλιά σε τέτοια νούμερα τα οποία είναι μεταξύ των πιο σημαντικών ειδών ακόμα και στα ζώα που διατρέφονται κυρίως με ινώδεις ουσίες. Οι μέθοδοι που χρησιμοποίησαν οι παραπάνω μελετητές για την απαρίθμηση των βακτηρίων ήταν ακατέργαστη και το γεγονός ότι οι γαλακτοβάκιλλοι ή ο στρεπτόκοκκος παραμένουν αμετάβλητοι κάτω από συνθήκες καλλιέργειας, φαίνεται πως έρχεται σε διαφωνία με τα αποτελέσματα των άμεσων μικροσκοπικών παρατηρήσεων των καλλιιεργειών από άλλους μελετητές. Οι Hobson and Mann χρησιμοποίησαν την μέθοδο ανοσοφθορισμού αντισωμάτων και δεν ανιχνεύτηκαν *L. brevis*, *L. fermenti*, ή *L. acidophilus* στο περιεχόμενο των στομάχων σε βοοειδή ή αιγοπρόβατα ταϊζόμενα με σιτηρέσιο για ενήλικα ζώα. Εντούτοις, *Lactobacillus sp.* ανιχνεύτηκαν σε νεαρά βοοειδή από την 7^η έως την 24^η ημέρα της ηλικίας τους, προσλαμβάνοντας γάλα κατά την διατροφή τους.

Streptococci. Ο προαιρετικά αναερόβιος αμυλολυτικός στρεπτόκοκκος παρόμοιος ή ίδιος με τον στρεπτόκοκκο των βοοειδών αποτελεί την πιο ολοκληρωμένη μελέτη και την πιο συνηθισμένη ομάδα βακτηρίων που απομονώνονται από το περιεχόμενο των στομάχων. Στις πιο πρόσφατες δημοσιεύσεις, συγκρίθηκαν τα χαρακτηριστικά από 27 είδη που απομονώθηκαν από βοοειδή και αιγοπρόβατα και καθορίστηκε ο αριθμός τους στην μεγάλη κοιλιά των βοοειδών τα οποία διατρέφονταν με σανό και μικρές ποσότητες συμπυκνωμένης ζωοτροφής (Hungate *et al.*, 1957). Οι μετρήσεις κυμάνθηκαν από 0.2 έως 140 εκατομμύρια ανά ml με τις περισσότερες να κυμαίνονται από 1 έως 20 εκατομμύρια. Αποδείχτηκε ότι οι προαιρετικά αναερόβιοι, όπως ο *αμυλολυτικός στρεπτόκοκκος*, ο πληθυσμός τους αυξάνεται στην μεγάλη κοιλιά των βοοειδών όταν διατρέφονται εντατικά με σιτάρι (Gutierrez *et al.*, 1958). Στελέχη αυτών των βακτηρίων ήταν παρόμοια με το *S. bovis* εκτός από την μικρή ανοχή τους σε υψηλές θερμοκρασίες, ήταν gram-θετικά μόνο τις 4 με 6 ώρες καλλιέργειάς τους και τέλος ελάττωναν τα νιτρικά άλατα. Αποδείχθηκε επίσης ότι 4 στελέχη του *S. bovis* είχαν την ικανότητα να

υδρολύουν το άμυλο σιταριού. Άλλα στελέχη δεν είχαν αυτήν την ιδιότητα (Hungate R. *et al.*, 1957).

Επιβεβαιώθηκε ότι η γλοιώδης ουσία που παραγόταν από την σακχαρόζη του *S. bonis* επικρατούσε σε πολλές πηγές, ήταν γλυκώδη, περιείχε πολυσακχαρίτες και αποδείχθηκε ότι το CO₂ ήταν απαραίτητο για την παραγωγή του, όταν οι οργανισμοί αναπτύσσονταν σε αερόβιες συνθήκες (Dain *et al.*, 1956). Το στέλεχος *Tween 80* θα μπορούσε να αντικαταστήσει το CO₂ σε αναερόβιες συνθήκες. Χρησιμοποιώντας την παραπάνω ουσία, την διάσπαση της μαννιτόλης σε άγαρ αίματος αλόγου ταυτοποιήθηκαν τρία είδη των *S. bonis*. Οι πολυσακχαρίτες αποδείχθηκε ότι ήταν δεξτρόζη (Baily *et al.*, 1958). Επιβεβαιώθηκε ότι η παρουσία CO₂ ήταν απαραίτητη για την παραγωγή της δεξτρόζης σε υγρή καλλιέργεια, και ότι κατά την παραγωγή της συσσωρεύτηκαν φρουκτόζη και ένας αναγωγικός δισακχαρίτης που περιείχε φρουκτόζη.

Κανένα από τα 26 στελέχη δεν απαιτούσε βιταμίνες της ομάδας Β κατά την ανάπτυξή τους σε αναερόβιες συνθήκες, ενώ η θειαμίνη τόνωνε την ανάπτυξη 5 στελεχών. Όταν αναπτύσσονται σε αερόβιες συνθήκες κάποια στελέχη απαιτούν την παρουσία νικοτινικού οξέος, βιοτίνης ή (και) θειαμίνης.

Οι Higginbottom *et al.*, (1954) επιβεβαίωσαν τα αποτελέσματα των Van der Wath (1948) που υποδείκνυαν ότι ορισμένα αμυλολυτικά στελέχη του στρεπτόκοκκου εμφανίζονταν στην μεγάλη κοιλία παρήγαγαν ενδοκυτταρικό υλικό χρώσης ιωδίου από το άμυλο και ταυτοποιήθηκαν τα στελέχη ως *S. bonis*. Μελετήθηκαν οι παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή πολυσακχαρίτη και αποδείχθηκε επίσης ότι θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν φθορίζοντα αντισώματα κατά του ειδικού αντιγόνου στο έλκτρο που χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση του *S. bonis* επί τόπου (Hobson *et al.*, 1955).

Ο *S. bonis* αναμφισβήτητα περιλαμβάνεται στη διάσπαση του άμυλου καθώς και άλλων υδατανθράκων κατά την πέψη στην μεγάλη κοιλία. Φαίνεται πιθανό ότι κάτω από ορισμένες συνθήκες είδη μη σπορογόνων αναερόβιων βακτηρίων έχουν υψηλότερη σημασία. Οι μελέτες των Hungate *et al.*, (1958) απέδειξαν ότι ο *S. bonis* εμπλεκόταν στην έναρξη των όξινων συνθηκών που προκαλούνται από την ταχεία κατάποση των σιτηρών. Επίσης ο *S. bonis* εμπλέκεται στο φούσκωμα των μηρυκαστικών (Gutierrez *et al.*, 1958). Η παραγωγή βλέννας από τον *S. bonis* είναι υπεύθυνη για την παραγωγή αφρού στην μεγάλη κοιλία και το φούσκωμα. Ανακαλύφθηκε επίσης ότι μικρός αριθμός στρεπτόκοκκων αναπτύσσονται σε

αερόβιες συνθήκες σε βοοειδή που καταναλώνουν τριφύλλι. Προαιρετικοί αναερόβιοι στρεπτόκοκκοι εκτός από τους αμυλολιτικούς οργανισμούς παρόμοιοι ή ίδιοι με τον *S. bovis* δεν φαίνεται να είναι υψηλής σημασίας στην μεγάλη κοιλία. Μικρός αριθμός από τους *Streptococcus liquefaciens*, *Streptococcus faecalis* και μη ταυτοποιημένα στελέχη έχουν απομονωθεί, ενώ τα 2/3 που απομονώθηκαν από βοοειδή 5 εβδομάδων δεν ήταν αμυλολιτικά (Mann *et al.*, 1955). Οι Bryant and Burkey (1953) ανακάλυψαν ότι 11 από τα 155 στελέχη που απομονώθηκαν από αγελάδες που διατρέφονταν με συμπυκνώματα ήταν αυστηρά αναερόβια στρεπτόκοκκοι και το ένα το στέλεχος ήταν ο *S. bovis*. Τα υπόλοιπα που ήταν μακριές αλυσίδες μη αιμολυτικά και μη αμυλολυτικά.

Λίγοι προαιρετικά αναερόβιοι κόκκοι εκτός από τους στρεπτόκοκκους φαίνεται να συμπεριλαμβάνονταν στην διαδικασία της διάσπασης στην μεγάλη κοιλία. Οι Bauman and Foster (1956) ανακάλυψαν οργανισμούς ίδιους σε χαρακτηριστικά με το γένος *Pedococcus* σε αναλογία 10^9 και 10^{10} σε αραιωμένο δείγμα στομαχικού περιεχομένου από βοοειδή που διατρέφονταν με υψηλής αξίας σιτηρέσια. Ένα gram-αρνητικό κύτταρο παρατηρήθηκε από τους μελετητές κατά την μικροσκοπική εξέταση των δειγμάτων και απομονώθηκε σε μικρή ποσότητα από την μεγάλη κοιλία των αιγοπροβάτων (Head *et al.*, 1953). Οι Mann *et al.*, (1954), ανακάλυψαν ότι ήταν προαιρετικά αναερόβια, θετική για καταλάση, τα οποία διασπούν την γλυκόζη και αναπτύσσονται ικανοποιητικά σε πεπτόνη. Ονομάστηκε *Sarcina bakeri*. Μπορεί να ταυτοποιηθεί σε στομαχικό υγρό με ανοσοοφθορίζοντα αντιγόνα (Hobson *et al.*, 1957).

2.1 Αναερόβια Βακτήρια

Sporeforming rods: παλαιότερες έρευνες στα σποριογόνα αναερόβια βακτήρια απέδειξαν ότι η παρουσία τους δεν ήταν σημαντική στην ζύμωση των στομάχων (Hungate R. E., 1950). Αναφέρθηκε ότι οι σπορογόνοι αναερόβιοι οργανισμοί ήταν ασήμαντοι στην μεγάλη κοιλία (Doetsch R. *et al.*, 1953). Οι Lodge *et al.*, (1956) ανέφεραν υψηλό αριθμό σπορογόνων αναερόβιων οργανισμών (1.3 με 1.7 εκατομμύρια ανά γραμμάριο, ξηράς ουσίας) σε στομαχικό περιεχόμενο από αγελάδες. Εντούτοις, ούτε μετρήσεις στην προσλαμβανόμενη τροφή ούτε απομονώσεις έγιναν. Φαίνεται ότι αυτά τα βακτήρια δεν αναπτύσσονται στο στομάχι.

Οι Bullen *et al.*, (1953) ανακάλυψαν ότι το *Clostridium perfringens* καταστράφηκε όταν το εισήγαγαν στο στομάχι υγιών προβάτων. Νεότερα στοιχεία κυρίως από μελέτες στα επικρατέστερα βακτήρια του στομάχου, αποδεικνύουν ότι οι σπορογόνοι αναερόβιοι οργανισμοί είναι σχετικά ασήμαντοι στην πέψη συγκρινόμενα με τα μη σπορογόνα αναερόβια βακτήρια. Εντούτοις, ορισμένα είδη έχουν χαρακτηριστεί ιδιαίτερης σημασίας.

Ο Hungate (1957) απομόνωσε το *Clostridium lochheadii* από μια ομάδα αγελάδων. Αυτοί οι οργανισμοί αντιπροσώπευαν ένα ιδιαίτερο ποσοστό των κυτταρινολυτικών βακτηρίων που απαριθμήθηκαν. Παρόλα αυτά ο συνολικός αριθμός των κυτταρινολυτικών βακτηρίων ήταν σχετικά χαμηλός, κατά μέσο όρο 0.26 έως 4.8 εκατομμύρια ανά ml. Ο μικροοργανισμός βρέθηκε επίσης σε αποξηραμένο δείγμα στομαχικού περιεχομένου και σε αγελάδες του Μισισσιππή. Έχει την δυνατότητα να αναπτύσσεται σε ποικιλία υποστρωμάτων αλλά ακόμα δεν έχει καταμετρηθεί από κανέναν ερευνητή που έχει απομονώσει κυτταρινολυτικά αναερόβια κύτταρα από υψηλές αραιώσεις στομαχικού περιεχομένου (Hungate R. E., 1950), φαίνεται ότι πιθανόν υπερέχουν αριθμητικά από τα μη σπορογόνα κυτταρινολυτικά αναερόβια βακτήρια.

Σε μια μικροσκοπική έρευνα παρατηρήθηκαν σπορογόνα ραβδία παρόμοια με το *Clostridium butyricum* να είναι τα κυρίαρχα στο στομάχι των αιγοπροβάτων με ημερήσιο δελτίο διατροφής αποτελούμενο από νιφάδες αραβοσίτου. Το *Clostridium butyricum* απομονώθηκε αλλά ο αριθμός τους δεν δόθηκε. Σε έρευνα για πρωτεολυτικά βακτήρια στην μεγάλη κούλια των αιγοπροβάτων που διατρέφονταν με υψηλής αξίας συμπυκνωμένη ζωοτροφή, απομονώθηκε το *Clostridium sporogenes* αλλά ο πληθυσμός τους αφήνει αμφιβολίες για το εάν λειτουργούσε ο οργανισμός στο στομάχι. Ο Gray απομόνωσε παρόμοιους οργανισμούς με τα *Clostridium kluyveri* από το στομάχι των προβάτων σε αριθμούς που ποικίλλουν από 0 έως 2 εκατομμύρια ανά ml.

2.2 Μη σποριογόνοι οργανισμοί

Lactobacilli: αρκετοί μελετητές απομόνωσαν αναερόβιους ομοζυμωτικούς λακτοβάκιλλους από το στομάχι αλλά λίγοι μόνο έχουν χαρακτηριστεί. Ο οργανισμός 123, ένα στέλεχος που παράγει γαλακτικό οξύ, βρέθηκε σε ποσότητα ενός εκατομμυρίου ανά ml στομαχικού περιεχομένου σε ένα 33 ημερών βοοειδές (Mann S. *et al.*, 1954). Θεωρείται ότι είναι ένα αυστηρά αναερόβιο στέλεχος του *Lactobacillus lactis*. Βρέθηκε ο ίδιος μικροοργανισμός μεταξύ των κυρίαρχων βακτηρίων σε 3 βοοειδή νεαρά ηλικίας 3 – 6 εβδομάδων αλλά δεν βρέθηκε σε νεότερα ή γηραιότερα-ώριμα ζώα (Bryant *et al.*, 1958). Οι τελευταίοι ερευνητές απομόνωσαν ένα αναερόβιο είδος το οποίο παρήγαγε γαλακτικό οξύ, οριζόμενο στην ομάδα +R3, από βοοειδή ηλικίας 6 – 13 εβδομάδων. Φαίνεται να διαφέρουν από κάθε είδος που περιγράφηκε προηγουμένως. Αδημοσίευτα αποτελέσματα μελετητών απέδειξαν ότι αναερόβιοι λακτοβάκιλλοι ήταν οι επικρατέστεροι των βακτηρίων της μεγάλης κοιλίας δύο αγελάδων που διατρέφονταν με χλωρά μηδική. Μια λεπτομερής μελέτη των χαρακτηριστικών δύο στελεχών χρησιμοποιώντας την μέθοδο των Bryant *et al.*, ανέφεραν ότι ήταν ταυτόσημοι με την +R3 ομάδα από βοοειδή εκτός από το γεγονός ότι η λακτόζη δεν είχε υποστεί ζύμωση, η οξύτητα του γάλακτος ήταν 0.24 %, και η ανάπτυξη δεν συνέβη στους 22° C.

Άλλες απομονώσεις βακτηρίων που εμφανίζονται να είναι αυστηρά αναερόβιες, ομοζυμωτικοί λακτοβάκιλλοι δεν έχουν χαρακτηριστεί. Αδημοσίευτα δεδομένα των Bryant, Barrentine, Shawner Williams για κυρίαρχα βακτήρια που καλλιεργήθηκαν από το στομάχι έξι βοοειδών που έβοσκαν τριφύλλι έρπον, υποδεικνύει ότι αναερόβιοι λακτοβάκιλλοι παρόμοιοι με αυτούς απομονώθηκαν από μοσχάρια τα οποία διατρέφονταν από φρέσκια χλωρή μηδική, όπως σημειώθηκε παραπάνω, αντυπροσώπευαν το 2 με 15 % των συνολικών απομονώσεων. Βρέθηκαν πέντε διαφορετικές ομάδες ομοζυμωτικών λακτοβάκιλλων μεταξύ των κυρίαρχων βακτηρίων που καλλιεργήθηκαν κυρίως από μοσχάρια ή ώριμα μηρυκαστικά τα οποία διατρέφονταν με γρασίδι (Huhtanen C *et al.*, 1953). Η ομάδα L2 βρέθηκε μεταξύ των κυρίαρχων βακτηρίων στις αγελάδες που διατρέφονταν με πίτουρα και σπόρους, εμφανίζονται αυστηρά αναερόβια και ομοζυμωτικά γαλακτοβάκιλλοι (Maki *et al.*, 1957).

Αυστηρά αναερόβιοι οργανισμοί παρόμοιοι με το *Lactobacillus bifidus* απομονώθηκαν από αρκετούς μελετητές. Καλλιεργήθηκε οργανισμός που παρήγαγε

ουρέαση από χαμηλές συγκεντρώσεις στομαχικού περιεχομένου και ονομάστηκε *L. bifidus* var *ureolyticus* (Gibbons R., 1958). Ο οργανισμός απαιτούσε διοξειδίο του άνθρακα για την ανάπτυξη και παρήγαγε κυρίως γαλακτικό, ακετονικό και φορμικό οξύ κατά την διάσπαση της γλυκόζης. Το γαλακτικό οξύ αντιπροσώπευε το 69-85% των συνολικών παραγόμενων οξέων. Η οπτική περιστροφή του παραγόμενου γαλακτικού οξέος δεν έχει προσδιοριστεί. Οι Wasserman *et al.*, (1953) απομόνωσαν έναν αναερόβιο, ανενεργό στην παραγωγή γαλακτικού οξέος, *Lactobacillus* σε μεγάλο αριθμό σε βοοειδή τα οποία διατρέφονταν με σανό με ουρία και μελάσα. Οι Bauman and Foster (1956) απομόνωσαν οργανισμούς παρόμοιους με το *L. bifidus* σε μεγάλο αριθμό από βοοειδή που διατρέφονταν με σανό μηδικής. Αυτοί οι οργανισμοί παρήγαγαν ακετονικό και γαλακτικό οξύ σε αναλογία 2:1.

Ο οργανισμός 123, τον οποίο οι Mann and Oxford πίστευαν ότι είναι αναερόβιο στέλεχος του *L. lactis* παρήγαγε μικρή ποσότητα αερίου σε άγαρ γλυκόζης. Άλλα χαρακτηριστικά υποδεικνύουν ότι είναι ομοζυμωτικός οργανισμός.

Ramibacteria: απομονώθηκαν δυο προφανώς νέα είδη βακτηρίων gram – θετικά, ραβδοειδή με διακλαδώσεις τα οποία εμφανίζονται να ανήκουν στο γένος *Ramibacterium prevot*. Η ομάδα +R1 βρέθηκε μεταξύ των κυρίαρχων βακτηρίων που απομονώθηκαν από βοοειδή ηλικίας 1 εβδομάδας. Παρήγαγε μια μεγάλη ποσότητα ηλεκτρικού οξέος και μικρές ποσότητες οξικού, μηρμυκικού και γαλακτικού οξέος και καθόλου αέρια σε μέσο γλυκόζης. Οι οργανισμοί εμφάνισαν μερικές ομοιότητες με το στέλεχος *L. bifidus* που μελετήθηκαν από τους Pine and Howell (1956) στην παραγωγή ηλεκτρικού και μηρμυκικού οξέος και στην απαραίτητη παρουσία του διττανθρακικού ασβεστίου για την σωστή ανάπτυξη. Ωστόσο η σχετικά μεγάλη παραγωγή ηλεκτρικού και η μικρή παραγωγή γαλακτικού οξέος από τους οργανισμούς +R1 φαίνεται να τους διαχωρίζει από του *L. bifidus*.

Τα άλλα είδη από τα βακτήρια *Ruminobacterium* που απομονώθηκαν ήταν αυστηρά αναερόβια και ανιχνεύθηκαν σε νεαρά βοοειδή (Bryant *et al.*, 1958). Αυτοί οι οργανισμοί παρήγαγαν γαλακτικό, ακετονικό και φορμικό οξύ σε μέσο γλυκόζης αλλά απομονώθηκαν χρησιμοποιώντας γαλακτικό άγαρ και βρέθηκε ότι διασπούν την λακτόζη όπως υποδεικνύεται από την παραγωγή των πτητικών λιπαρών οξέων. Τα επιμέρους οξέα που παράγονται κατά την γαλακτική ζύμωση δεν προσδιορίστηκαν.

Eubacteria: Σε προμελετημένες έρευνες ενός μεγάλου αριθμού στελεχών κυρίαρχων βακτηρίων από την μεγάλη κοιλία των βοοειδών, οι Bryant et Burrey (1953) απομόνωσαν δύο ομάδες αναερόβιων gram – θετικών ραβδίων. Η +SR-gGXXG ομάδα μελετήθηκε λεπτομερώς και τοποθετήθηκε στο γένος *Eubacteria prevot* (Breed et al., 1957). Αυτός ο οργανισμός παρήγαγε αέριο συμπεριλαμβανομένου και του υδρογόνου, οξικού, μηρμυκικό και γαλακτικό οξύ σε ίδια ποσοστά σε μέσο γλυκόζης καθώς και υγροποιούσε ταχέως την ζελατίνη. Διέφερε με άλλα είδη *Eubacterium* στο ότι δεν παρήγαγε προπιονικό ή βουτυρικό οξύ ή αμμωνία και από άλλα όπως το *E. biforme* ή *E.aerofarias* (Breed et al., 1957) στην διάσπαση των υδατανθράκων, στην υγροποίηση της ζελατίνης και στην παραγωγή ενός μεγάλου ποσοστού πτητικού οξέος (Pederson C.S., 1945). Αυτά τα είδη ποτέ δεν μετρήθηκαν σε ποσοστό 3% από το σύνολο των βακτηρίων που απομονώθηκαν από την μεγάλη κοιλία (Bryant et al., 1953).

Το στέλεχος ±CR-GXC των Bryand and Burrey (1953) μελετήθηκε λεπτομερώς. Οι μέθοδοι απομόνωσης και μελέτης περιγράφονται παρακάτω (Bryant et al., 1953). Είκοσι στελέχη συλλέχθηκαν για μελέτη και απομονώθηκαν από οχτώ διαφορετικές αγελάδες και πέντε διαφορετικούς τρόπους διατροφής ως εξής:

- Δύο ζώα διατρέφονταν με φρέσκο τριφύλλι και απέδωσαν τέσσερα στελέχη
- Δύο ζώα διατρέφονταν με σανό μηδικής και απέδωσαν έντεκα στελέχη
- Ένα ζώο διατρεφόταν με σανό μηδικής και μείγμα χόρτου και απέδωσε δύο στελέχη
- Δύο ζώα διατρέφονταν με σανό μηδικής, ενσίρωμα καλαμποκιού και σιτηρά και απέδωσαν ένα στέλεχος
- Τέλος ένα ζώο διατρεφόταν με σόγια και σιτηρά και απέδωσε δύο στελέχη

Όλα τα στελέχη ήταν μη κινητικά, μικρά κοντά ραβδοειδή (0.4 -0.7μ έως 0.7 – 1.5μ) με πολλά κύτταρα σχεδόν κοκκοειδή. Ήταν τοποθετημένα κυρίως μεμονωμένα, σε ζευγάρια και σε μικρές αλυσίδες με περιστασιακά μακρύτερες των 20 ή με περισσότερα κύτταρα. Ήταν gram – θετικά μετά από 16 ώρες καλλιέργειας με πολλά κύτταρα να μην διατηρούν την ιωδί κρυσταλλική χρωστική. Παλαιότερες καλλιέργειες ήταν gram – αρνητικές. Δεν είχε παρατηρηθεί καμία ιωδί χρωστική. Μικρή διακύμανση σημειώθηκε στην μορφολογία εκτός από το ότι λίγα στελέχη έτειναν να είναι περισσότερο κοκκοειδή από τα υπόλοιπα.

Αποικίες στην μεγάλη κουλία σε άγαρ υγρό – γλυκόζης – κελοβιόζης ήταν ολόκληρες λείες, ελαφρά κυρτές, ημιδιαφανή και στιλβωμένα. Είχαν διάμετρο 2 – 4mm 3 μέρες μετά την επώαση. Βαθιές αποικίες ήταν φακοειδής.

Αναπτυσσόμενα σε μέσο με υγρή γλυκόζη ήταν ομοιόμορφα θολά μετά από 16 -18 ώρες καλλιέργειας.

Ήταν σημαντικά πιο ορατή η ανάπτυξη σε στομαχικό υγρό και μέσο γλυκόζης από ότι στο ίδιο μέσο από υγρό της μεγάλης κουλία με 0.5% εκχύλισμα ζύμης και 1.5% προστιθέμενη τρυπτικήαση.

Κανένα από τα στελέχη δεν αναπτύσσεται στους 22° ή 50° C όλα αναπτύσσονται από 30° – 37° C αλλά μόνο τρία στους 45° C. όλα ήταν αυστηρά αναερόβια.

Το τελικό pH σε ελαφρά ρυθμισμένο μέσο γλυκόζης κυμαινόταν από 5.0 – 5.5.

Κανένα από τα στελέχη δεν παρήγαγε καταλάση, ινδόλη ή υδρόθειο ενώ είχε μειωμένη παραγωγή νιτρικού, υγροποίηση ζελατίνης, υδρόλυση κυτταρίνης ή αμύλου, διάσπαση αραβικής κόμμις, γλυκερόλης, μανιτόλης, ινσουλίνης ή λακτόζης.

Όλα τα στελέχη διασπούν την γλυκόζη, κελοβιόζη και φρουκτόζη. Τα 18 από τα 20 στελέχη ζύμωναν την D- xylose, την L-arabinose και την λακτόζη, 11 στελέχη την μαλτόζη, δεξτρόζη και σουκρόζη, 9 στελέχη την ξυλάνη, 7 στελέχη την σαλικίνη και 5 στελέχη την εσκούλίνη.

Όλα τα στελέχη που μελετήθηκαν παρήγαγαν γαλακτικό, φορμικό, ακετονικό και βουτυρικό οξύ. Όλα τα στελέχη επανεξετάστηκαν για την παραγωγή αερίων σε άγαρ γλυκόζης σε σωλήνα και παραγωγή υδρογόνου σε υγρό μέσο γλυκόζης. Κανένα από αυτά δεν προκαλούσε παραγωγή αερίων στο άγαρ ούτε και παραγωγή υδρογόνου ανιχνεύθηκε. Φαίνεται πολύ πιθανό ότι το υδρογόνο ανιχνεύθηκε σε γνήσιες καλλιέργειες στελεχών *BIC23* λόγω μόλυνσης ενώ η μικροσκοπική εξέταση των καλλιεργειών και η ομοιότητα των ανακτηθέντων προϊόντων ήταν διαφορετική από άλλα στελέχη. Κανένα από τα πέντε στελέχη δεν παρήγαγε αμμωνία.

Πίνακας 3: Ορισμένα προϊόντα διάσπασης από το είδος *Eubacterium* από υγρό της μεγάλης κοιλίας όταν αναπτύσσεται σε μέσο υγρό-γλυκόζης, Marvin P. Bryant, 1959.

ΣΤΕΛΕΧΗ					
ΠΑΡΑΓΩΓΗ	B ₄	B ₁ C ₂₆	GA ₁₉₅	B ₁ 34	B ₁ C ₂₃
MMOLES/100ML MEDIUM					
ΥΔΡΟΓΟΝΟ	0	0	0	0	0.20
ΔΙΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΑΝΘΡΑΚΑ	0	0	0.33	0	0.15
ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ	3.22	2.67	0.71	0.12	0.88
ΦΟΡΜΙΚΟ ΟΞΥ	3.52	2.84	0.93	1.96	0.72
ΟΞΙΚΟ ΟΞΥ	0.6	0.48	0.17	1.32	0.15
ΒΟΥΤΥΡΙΚΟ ΟΞΥ	1.30	1.18	0.71	0.41	0.47

Επειδή η ομάδα αυτή περιλαμβάνει βακτήρια gram – θετικά, αυστηρά αναερόβια, μη κινητικά, μη διακλαδιζόμενα, σε σχήμα ράβδου που διασπούν υδρογονάνθρακες με ταυτόχρονη παραγωγή γαλακτικού, φορμικού, βουτυρικού και ακετονικού οξέος, ανήκουν στην κατηγορία *Eubacterium Prevot* (Breed *et al.*, 1957). Διαφέρουν από όλα τα γνωστά είδη του γένους σε αρκετά χαρακτηριστικά. Διαφέρουν ως προς την αδυναμία τους στην παραγωγή άφθονου αερίου αμμωνίας και αιθανόλης, στην αδυναμία τους υγροποίησης της ζελατίνης και στην παραγωγή υδρόθειου ή προπιονικού οξέος, όπως συμβαίνει στις περισσότερες διασπάσεις των υδατανθράκων.

Έχουν μερικές ομοιότητες με το *Corynebacterium avidum prevot* στο ότι είναι gram-θετικά, αναερόβια και παράγουν γαλακτικό και βουτυρικό οξύ αλλά διαφέρουν ως προς την αδυναμία υγροποίησης της ζελατίνης, στη μη παραγωγή υδρόθειου, στην διάσπαση της αραβινόσης και όχι της γλυκερόλης και επίσης μορφολογικά. Είναι παρόμοια με τα *Butyribacterium rettgeri* σε αρκετά χαρακτηριστικά αλλά διαφέρουν

στην παραγωγή φορμικού και γαλακτικού οξέος, επιπλέον στην παραγωγή ακετονικού και βουτυρικού οξέος, στην αδυναμία τους να διασπάσουν την λακτόζη και στην ικανότητά τους να διασπούν αρκετούς υδατάνθρακες.

Το όνομα *Eubacterium ruminantium* n. sp. είναι προτεινόμενο για όλα τα στελέχη που έχουν τα χαρακτηριστικά που περιγράφηκαν παραπάνω. 13 από τα 20 στελέχη ταιριάζουν σε δύο βιότυπους βάσει των μεταβλητών χαρακτηριστικών τους. Τα 13 αυτά στελέχη διασπούν την D- ξυλόζη, L-αραμπινόση και την λακτόζη. 8 από αυτά (βιότυπος 1) διασπούν την μαλτόζη, την δεξτρόζη και την ξυλάνη ενώ αδυνατούν να διασπάσουν την σουκρόζη, την σαλικίνη ή εσκουλίνη. Τα αντίστροφα ισχύουν για τα άλλα 5 στελέχη (βιότυπος 2). Κανένα από τα υπόλοιπα 7 στελέχη δεν τοποθετείται στον παραπάνω βιότυπο γιατί δεν ταυτοποιούνται τα χαρακτηριστικά τους.

Στελέχη του βιότυπου 2 απομονώθηκαν μόνο από ζώα που διατρέφονταν με σανό μηδικής. Στελέχη του βιότυπου 1 απομονώθηκαν από ζώα όλων των κατηγοριών που περιγράφηκαν παραπάνω, ενώ 7 στελέχη δεν τοποθετήθηκαν σε κανένα βιότυπο και αντιπροσωπεύουν απομονώσεις από όλες της κατηγορίες ζώων εκτός από αυτά που διατρέφονταν με σόγια και σιτηρά.

Το αποτέλεσμα αυτής της έρευνας υποθέτει ότι τα περισσότερα αν όχι όλα τα στελέχη που προηγουμένως τοποθετήθηκαν στην R-GXC ομάδα, ανήκουν στο είδος *E. ruminantium*. Η ομάδα αντιπροσωπεύει το 3.3% με 7.3% των συνολικών απομονώσεων από ζώα που διατρέφονταν με σανό μηδικής, ενσίρωμα μηδικής, φρέσκια μηδική, σανό μηδικής και σιτάρι ή χόρτο λειμώνα και σιτηρά. Κανένα στέλεχος δεν απομονώθηκε από ζώα που διατρέφονταν με άχυρο σιταριού, φρέσκο ladino τριφύλλι ή μείγμα δημητριακών. Αυτό δείχνει ότι ο *E. ruminantium* είναι ένας σημαντικός στομαχικός οργανισμός για τα βοοειδή που διατρέφονται με χονδροαλεσμένα σιτηρέσια.

Οι Maki and Foster (1957) μελέτησαν έναν αναερόβιο, gram – θετικό ραβδοειδές το οποίο παρήγαγε κυρίως προπιονικό, οξικό και γαλακτικό οξύ από την γλυκόζη. Ο οργανισμός ήταν το κυρίαρχο βακτήριο που απομονώθηκε από τα βοοειδή που διατρέφονταν με σανό. Άλλα χαρακτηριστικά δεν προσδιορίστηκαν. Αυτός ο οργανισμός αντιπροσωπεύει ένα είδος του γένους *Eubacterium*.

Methanobacteria: από τις πιο χαρακτηριστικές γνωστές αντιδράσεις που πραγματοποιούνται στο στομάχι των μηρυκαστικών είναι η παραγωγή μεθανίου.

Καλλιέργειες από *Methanosarcinae*, *Methanobacterium formicicum*, *Methanobacterium sohngei* (Opertmann *et al.*, 1957) λαμβάνονται από καθαρές καλλιέργειες οι οποίες εμπλουτίζονται με μεγάλες ποσότητες από στομαχικό υγρό. Είναι αμφίβολο αν τα είδη αυτά έχουν ιδιαίτερη λειτουργική σημασία στον προστόμαχο.

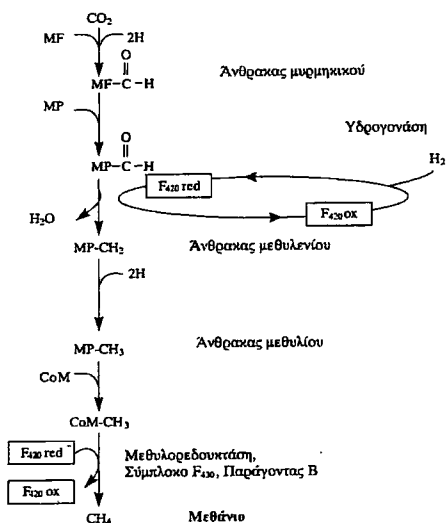
Πρόσφατα οι Smith and Hungate (1958) καλλιέργησαν έναν αναερόβιο, gram – θετικό, μη κινητικό, μεθανογόνο, μικρό και ραβδοειδές από το περιεχόμενο των στομάχων των βοοειδών και των προβάτων από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές. Απέδειξαν ότι ο αριθμός τους φτάνει τα 1×10^6 έως 2×10^8 ανά ml. Η καθαρότητα του στελέχους ήταν καθορισμένη και αποδείχθηκε ότι χρησιμοποιήθηκε υδρογόνο και φορμικό οξύ και όχι άλλα υποστρώματα για την παραγωγή του μεθανίου. Οι οργανισμοί αυτοί ονομάστηκαν *Methanobacterium ruminantium*.

Το H_2 και το CO_2 καταλαμβάνουν κύρια θέση μεταξύ των πρωτογενών μεταβολικών προϊόντων. Το CO_2 βρίσκεται πάντοτε σε περίσσεια στη μεγάλη κοιλία δεδομένου ότι ένα σημαντικό μέρος του παράγεται κατά την αντίδραση των διττανθρακικών αλάτων του σιέλου με τα οργανικά οξέα που παράγονται κατά τη ζύμωση. Φαίνεται ότι το CO_2 είναι απαραίτητο για τη αύξηση πάρα πολλών βακτηριακών ειδών της μεγάλης κοιλίας. Έχει διαπιστωθεί ότι το CO_2 συμμετέχει στην παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος, όπως επίσης και ότι δεσμεύεται σε κυτταρικά συστατικά, όπως για παράδειγμα στις καρβοξυλικές ομάδες των αμινοξέων. Αλλά το πιο σημαντικό ίσως μέρος του CO_2 αντιδρά με το H_2 προς παραγωγή μεθανίου. Η αντίδραση αυτή φαίνεται ότι αποτελεί την κύρια πηγή του μεθανίου που συναντάται στη μεγάλη κοιλία. Στην αντίδραση αυτή έχει βρεθεί ότι συμμετέχουν κυρίως δύο βακτήρια, το *Methanobacterium ruminantium*, ένας Gram-θετικός κοκκοβάκυλλος και το *Methanobacterium mobilis*, ένα Gram-αρνητικό μαστιγοφόρο βραχύ, σχεδόν σαν κόκκος, ραβδί. Και τα δύο αυτά βακτήρια χρησιμοποιούν μόνο H_2 και CO_2 ή μυρμηκικό οξύ και για την απομόνωσή τους απαιτούνται έντονα αναγωγικές συνθήκες.

Οι μεθανογόνοι μικροοργανισμοί αποτελούν μία σημαντική από βιοχημικής απόψεως ομάδα βακτηρίων. Είναι αυστηρά αναερόβιοι. Αναπτύσσονται και δρουν μόνον σε έντονο αναερόβιο περιβάλλον (απουσία οξυγόνου), όπου το δυναμικό οξειδοαναγωγής βρίσκεται μεταξύ των -350 και -450mV. Έχουν την ικανότητα να χρησιμοποιούν το CO_2 ως δέκτη ηλεκτρονίων, το οποίο ανάγουν χρησιμοποιώντας H_2 που παράγεται κατά την πορεία της ζύμωσης.

Από πλευράς φυσιολογίας τα μεθανογόνα βακτήρια περιορίζονται σε ένα μάλλον μικρό αριθμό συστατικών που μπορούν να χρησιμοποιήσουν ως θρεπτικά υποστρώματα. Όταν αναπτύσσονται αυτοτροφικά, οι ανάγκες τους σε άνθρακα καλύπτονται από το CO_2 . Τα είδη εκείνα που έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν οργανικές ενώσεις προς μεθάνιο χρησιμοποιούν ενδιάμεσα προϊόντα που παράγονται κατά την καταβολική πορεία ως πρόδρομες βιοσυνθετικές ενώσεις. Η αύξηση όλων σχεδόν των μεθανογόνων βακτηρίων ευνοείται από την παρουσία οξικού οξέος, ενώ μερικά είδη ευνοούνται επίσης από την παρουσία ορισμένων αμινοξέων. Πολλά μεθανογόνα για να καλλιεργηθούν χρειάζονται πολύπλοκα θρεπτικά μέσα, όπως εκχύλισμα ζύμης ή προϊόντα πέψης καζέινης, ενώ ορισμένα είδη της μεγάλης κοιλίας απαιτούν μείγματα λιπαρών οξέων. Ορισμένα είδη έχουν ανάγκες σε βιταμίνες, οι συνηθέστερες των οποίων είναι η ριβοφλαβίνη, το παντοθενικό οξύ, η θειαμίνη, η βιοτίνη και π-αμινοβενζοϊκό οξύ. Όλα τα μεθανογόνα βακτήρια χρησιμοποιούν ως πηγή αζώτου το αμμωνιακό ιόν (NH_4^+), ενώ ορισμένα έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν μοριακό άζωτο. Επίσης, όλα τα μεθανογόνα βακτήρια έχουν ανάγκες στα ιχνοστοιχεία νικέλιο, σίδηρο και κοβάλτιο. Το υπόστρωμα μεθανογένεσης σε όλες σχεδόν τις ομάδες των μεθανογόνων βακτηρίων είναι το CO_2 , ενώ οι ανάγκες σε ηλεκτρόνια καλύπτονται από το μοριακό υδρογόνο (H_2).

Ο μηχανισμός της μεθανογένεσης δεν έχει απολύτως διευκρινιστεί. Γνωρίζουμε όμως ότι η μεταφορά ηλεκτρονίων προς το CO_2 γίνεται μέσω μιας πλειάδας εξειδικευμένων συνενζύμων, μοναδικών στα μεθανογόνα βακτήρια. Καταρχάς, το CO_2 ενεργοποιείται μέσω του μεθανοφουρανίου σ' ένα πρώτο επίπεδο αναγωγής (του μυρμηκικού) και ανάγεται περαιτέρω ακολουθώντας μία αλληλουχία C-1 ενώσεων προς μεθυλένιο, μεθύλιο και τελικά προς μεθάνιο μέσω του συστήματος της μεθυλορεδουκτάσης.

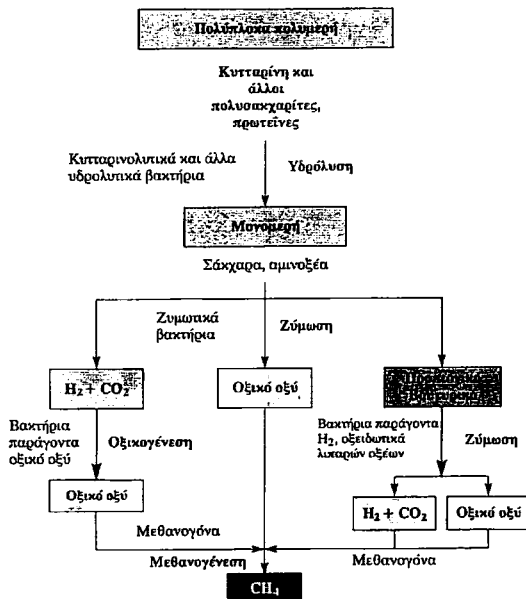


Σχήμα 3: Πορεία μεθανογένεσης από διοξείδιο του άνθρακα.

MF=Μεθανοφουράνιο, MP= Τετρανδρομεθανοπερόνη, CoM = Συνένζυμο M,

F₄₂₀ = Συνένζυμο F₄₂₀, F₄₃₀ = Συνένζυμο F₄₃₀, red = ανηγμένη μορφή του συνενζύμου, ox = οξειδωμένη μορφή του συνενζύμου (Jones et al., 1985)

Ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους, όπως πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες και λίπη, μετατρέπονται σε μεθάνιο μέσω της συνεργατικής δράσης αρκετών διαφορετικών στη φυσιολογία τους ομάδων βακτηρίων. Σε πολλά αναερόβια περιβάλλοντα οι άμεσοι πρόδρομοι του μεθανίου είναι το H₂ και το CO₂ που παράγονται από τη ζυμωτική δράση αναερόβιων μικροοργανισμών. Για την μετατροπή ενός τυπικού πολυσακχαρίτου, όπως της κυτταρίνης σε μεθάνιο, συμμετέχουν στην όλη διαδικασία πέντε ομάδες βακτηρίων.



Σχήμα 4: Γενικευμένη πορεία αναερόβιας αποδόμησης όπου φαίνεται ο τρόπος τον οποίο συμμετέχουν συλλογικά οι διάφορες ομάδες αναερόβιων ζυμωτικών βακτηρίων για την μετατροπή πολύπλοκων οργανικών ενώσεων σε μεθάνιο και διοξείδιο του άνθρακα, (Κανδύλης Κ., 2006).

Τα κυτταρινολυτικά βακτήρια διασπούν το μεγάλο μοριακού βάρους μόριο της κυτταρίνης σε κελλοβιόζη και ελεύθερη γλυκόζη. Από την παραγόμενη γλυκόζη και με τη δράση αναερόβιων ζυμωτικών βακτηρίων παράγονται ποικίλα προϊόντα ζύμωσης μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται: οξικό, προπιονικό και βουτυρικό οξύ, H_2 και CO_2 . Οι ποσότητες H_2 που παράγονται κατά την πορεία των πρωταρχικών ζυμωτικών διαδικασιών χρησιμοποιούνται κατόπιν από τα μεθανογόνα βακτήρια.

Σημαντικό ρόλο στη μετατροπή πολύπλοκων ενώσεων σε CH_4 παίζουν τα βακτήρια εκείνα που παράγουν H_2 οξειδώνοντας λιπαρά οξέα. Οι μικροοργανισμοί αυτοί χρησιμοποιούν λιπαρά οξέα ή αλκοόλες ως πηγές ενέργειας, αλλά δεν αναπτύσσονται ή η ανάπτυξή τους είναι φτωχή, όταν καλλιεργούνται μόνοι τους, σε

καθαρή καλλιέργεια, στα συστατικά αυτά. Όμως, όταν αναπτύσσονται μαζί, συντροφικά, με μικροοργανισμούς που καταναλίσκουν H_2 , τα H_2 - παράγοντα βακτήρια εμφανίζουν πλούσια ανάπτυξη.

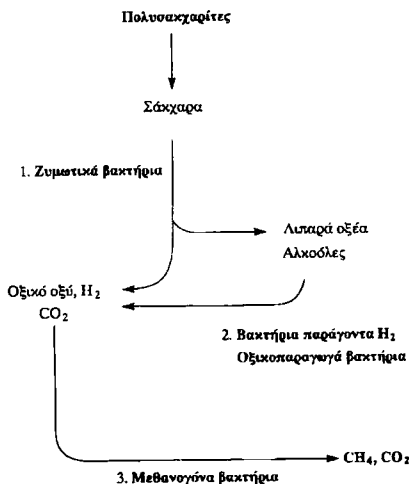
Στα H_2 - παράγοντα βακτήρια περιλαμβάνονται είδη των γενών *Syntrophomonas* και *Syntrophobacter*. Το *Syntrophomonas* οξειδώνει C_4 μέχρι C_7 λιπαρά οξέα προς οξικό οξύ, CO_2 (εάν το λιπαρό οξύ περιέχει περιττό αριθμό ατόμων άνθρακα) και H_2 . Το *Syntrophobacter* είναι εξειδικευμένα στην οξείδωση του προπιονικού οξέος και παράγουν οξικό οξύ, CO_2 και H_2 .

2.3 Μεθανογένεση

Υπάρχουν 3 ομάδες μικροοργανισμών που συμμετέχουν στην πορεία της μεθανογένεσης και οι οποίοι απαντούν σε χώρους εναπόθεσης αποβλήτων καθώς και σε διάφορα φυσικά συστήματα: 1) τα ζυμωτικά βακτήρια, τα οποία παράγουν οξικό οξύ, H_2 , CO_2 , μυρμηκικό οξύ (το οποίο μετατρέπεται ευκόλως σε $CO_2 + H_2$ από έναν αριθμό μικροοργανισμών) και άλλα προϊόντα που περιλαμβάνουν μακρύτερης αλύσου πτητικά λιπαρά οξέα και ο ρόλος αυτών των βακτηρίων έχει ήδη σχολιαστεί, 2) τα οξικοπαραγωγά βακτήρια, τα οποία διασπούν τα τελευταία προϊόντα σε οξικό οξύ, CO_2 και H_2 είναι σημαντικά στη ζύμωση των αποβλήτων, όχι όμως και για τη μεγάλη κοιλία όπου παίζουν δευτερεύοντα ρόλο, διότι ο ρυθμός ανάπτυξης αυτών των βακτηρίων είναι πολύ βραδύς, γεγονός που δεν επιτρέπει τη διατήρηση ενός σημαντικού πληθυσμού τους εντός της μεγάλης κοιλίας και 3) τα μεθανογόνα βακτήρια, τα οποία είναι σημαντικοί μικροοργανισμοί και για τη μεγάλη κοιλία καθώς και για την ζύμωση των αποβλήτων. Όμως, ο ρυθμός μετατροπής του οξικού οξέος σε $CH_4 + CO_2$ στη μεγάλη κοιλία είναι χαμηλός και αυτό λόγω του ταχέος ρυθμού ροής του περιεχομένου της μεγάλης κοιλίας. Έτσι, οι σημαντικές ομάδες μικροοργανισμών που λαμβάνουν μέρος στη μεθανογένεση εντός της μεγάλης κοιλίας είναι τα ζυμωτικά και μεθανογόνα βακτήρια, τα οποία μετατρέπουν το CO_2 και H_2 σε CH_4 .

Τα μεθανογόνα βακτήρια αποτελούν μία μοναδική κατηγορία μικροοργανισμών με παρόμοιο ενεργειακό μεταβολισμό. Η θερμοδυναμική της αναγωγής του CO_2 από το υδρογόνο χαρακτηρίζεται από αρκετά υψηλή μεταβολή της

ελεύθερης ενέργειας ($\Delta G^\circ = -32.4 \text{ kcal/αντίδραση}$), με αποτέλεσμα την παραγωγή ATP. Για αυτό το λόγο τα μεθανογόνα βακτήρια, τα οποία αναπτύσσονται σε αυτά τα υποστρώματα μπορούν να παράγουν μία ποσότητα ATP. Ο ακριβής μηχανισμός παραγωγής του ATP δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί. Υπάρχουν 3 συνένζυμα που δεν απαντούν σε άλλα βακτήρια και έχουν εντοπιστεί στα μεθανογόνα βακτήρια: 1) το συνένζυμο F_{420} , το οποίο λαμβάνει μέρος στη μεταφορά ηλεκτρονίων και προφανώς παίζει ένα ρόλο παρόμοιο με αυτό της φερρεδοξίνης σε άλλα είδη, 2) το συνένζυμο M, το οποίο συμμετέχει στη μεταφορά μεθυλομάδων στην αντίδραση παραγωγής του μεθανίου και 3) ο παράγοντας B, ο οποίος λαμβάνει μέρος στην παραγωγή του μεθανίου από το μεθυλο-συνένζυμο M.



Σχήμα 5: Η πορεία της μεθανογένεσης, Baldwin Allison, 1983.

Ο σχηματισμός μεθανίου δια αναγωγής του CO_2 μέσω μικροοργανισμών που χρησιμοποιούν το H_2 ως πηγή ενέργειας (δότης ηλεκτρονίων) θα μπορούσε να θεωρηθεί ως ένας τύπος «αναερόβιου αναπνοής», όπου ως γνωστόν το CO_2 χρησιμεύει ως δέκτης ηλεκτρονίων. Όμως, από σχετικές μελέτες έχει διαπιστωθεί ότι η δέσμευση του CO_2 δεν πραγματοποιείται μέσω του κύκλου του Calvin, όπως στα

συνήθη αυτότροφα είδη μικροοργανισμών. Το γνωστό σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων μέσω κυτοχρωμάτων και κινονών απουσιάζει παντελώς από τα μεθανογόνα βακτήρια που αναπτύσσονται σε H_2 και CO_2 . Στα μεθανογόνα βακτήρια η μεταφορά ηλεκτρονίων προς το CO_2 γίνεται μέσω φορέων διαφορετικών από αυτούς που απαντούν σε άλλες αναερόβιες μεταβολικές οδούς, όπως της αναγωγής των νιτρικών και των θειικών ιόντων.

***Lachnospirae*:** Μόνο δύο είδη αναερόβια, μη σπορογόνα, κινητικά, gram-θετικά ραβδοειδή απομονώθηκαν από περιεχόμενο της μεγάλης κοιλίας και μόνο ένα από αυτά βρέθηκε πιο τακτικά. Οι Bryant and Small (1956) περιέγραψαν το γένος *Lachnospira* σαν έναν αναερόβιο, μη σπορογόνο, μονότριχο, gram-θετικό, κυρτό ραβδοειδές που διασπά την γλυκόζη παράγοντας ταυτόχρονα υψηλά ποσοστά από αιθανόλη, γαλακτικό, φορμικό και οξικό οξύ. Το απλό είδος τοποθετήθηκε στο γένος *L. multiparus*, διατάσσονται σε αλυσίδες και αναπτύσσονται υπό μορφής νηματίων στο στερεό θρεπτικό υλικό σχηματίζοντας αποικίες βαμβακώδους υφής, ένα χαρακτηριστικό τύπο αποικίας, που με εξαίρεσης ορισμένα στελέχη πολύ λίγα άλλα βακτήρια την μεγάλης κοιλίας σχηματίζουν. Ορισμένα κύτταρα οργανώνονται σε μακριές καμπυλωτές αλυσίδες. Αυτό το χαρακτηριστικό και επιπρόσθετα η gram αντίδραση προϋποθέτει μία σχέση με το βακτήριο *Actinomycetales Buchanan*. Το γένος τοποθετήθηκε στο είδος *Spirilleae* και στην οικογένεια των *Pseudomonadaceae*, δίνοντας έμφαση στο χαρακτηριστικό κυρτό ελικοειδές, μονότριχο με πολικό μαστίγιο κύτταρο.

Παλαιότερες έρευνες απέδειξαν ότι τα βακτήρια *Lachnospirae* ποτέ δεν αντιπροσώπευαν το μεγαλύτερο μέρος των στελεχών που απομονώνονταν από το περιεχόμενο της μεγάλης κοιλίας. Αποτελούσαν περίπου το 1 με 3% των συνολικών απομονώσεων από ζώα που διατρέφονταν με ποικιλία σιτηρεσίων. Παρόλα αυτά πρόσφατε έρευνες απέδειξαν ότι το γένος αυτό αποτελεί το 16 με 31% των συνολικών απομονώσεων από έξι ζώα που διατρέφονταν με τριφύλλι το οποίο προκαλεί φούσκωμα του στομάχου (Marston H. W., 1958).

Cillobacteria: αποτελεί έναν αναερόβιο, περίτριχο, gram-θετικό ραβδοειδές βακτήριο. Ένα απλό του στέλεχος απομονώθηκε από στομαχικό περιεχόμενο αγελάδας η οποία έβασκε τριφύλλι και τοποθετήθηκε στο γένος *Cillobacterium Prevot* και ονομάστηκε *C. Cellulosolvens* (Bryant *et al.*, 1958). Διαφέρει από τα άλλα είδη του γένους στο ότι δεν παράγει αέριο, στην παραγωγή γαλακτικού οξέος, και στην ικανότητά του να διασπά την κυτταρίνη. Το γεγονός ότι άλλα στελέχη του είδους αυτού δεν έχουν απομονωθεί και ερευνηθεί αποδεικνύει ότι δεν είναι σημαντικό στομαχικό είδος.

Succinic acid – producing Bacteroides: Αυστηρά αναερόβιο, μη κινητικό, gram-αρνητικό το οποίο παράγει μεγάλες ποσότητες ηλεκτρικού οξέος κατά την διάσπαση των υδατανθράκων και εμφανίζεται να είναι από τα πιο σημαντικά βακτήρια της μεγάλης κοιλίας. Η μεγάλη παραγωγή προπιονικού οξέως αλλά και άλλων συναφών οξέων όπως το ηλεκτρικό οξύ προϋποθέτει την παρουσία και την δράση αυτών των βακτηρίων. Το ηλεκτρικό οξύ είναι συνδυασμένο με την πέψη – διάσπαση αρκετών υδατανθράκων, συμπεριλαμβανομένου μεγάλης ποσότητας σημαντικών πολυσακχαριτών όπως η σελουλόζη, η ξυλάνη και το άμυλο τα οποία εμφανίζονται να έχουν σχέση και με την αποδόμηση πρωτεϊνών.

Τρία είδη αυτής της ομάδας έχουν ονομασθεί *Bacteroides succinogenes* (Hungate *et al.*, 1957), τα *B.amylophilus* και τα *B. ruminicola* (Bryant *et al.*, 1953). Καθώς τα δεδομένα συσσωρεύονται στα πρόσθετα χαρακτηριστικά και στα επιπλέον στελέχη, το πρόβλημα της οριοθέτησης των ειδών γίνεται όλο και πιο δύσκολο.

Παρόλα αυτά παρατηρείται μια σημαντική διακύμανση στην μορφολογία και στην παραγωγή χρωστικής ουσίας, όλα τα κυτταρολυτικά στελέχη της ομάδας που έχουν μελετηθεί εμφανίζονται να παρουσιάζουν ένα καλά καθορισμένο είδος, *B. succinogenes*, με βάση τα φυσιολογικά χαρακτηριστικά και την καλλιέργεια (Hungate *et al.*, 1947). Επίσης, διατροφικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε επιλεγμένα στελέχη με βάση το διαφορετικό σχήμα του κυττάρου και το μέγεθος, την χρωστική ουσία και μικρές διαφορές ως προς την διάσπαση υδατανθράκων, έδειξαν ότι όλα τα στελέχη απαιτούσαν πηκτικά λιπαρά οξέα για την ανάπτυξή τους και ότι οι βιταμίνες B και το άζωτο ήταν το ίδιο απαραίτητα (Chu *et al.*, 1958).

Το *B. amylophilus* είναι διαφοροποιημένο από τα βακτήρια που παράγουν ηλεκτρικό οξύ στο ότι διασπούν μόνο το άμυλο και την μαλτόζη. Όλα τα άλλα βακτήρια διασπούν την γλυκόζη και αρκετούς άλλους υδατάνθρακες.

Τα *B. ruminicola* (Bryant *et al.*, 1958) συμπεριλαμβάνουν τα βακτήρια που παράγουν ηλεκτρικό οξύ τα οποία συνήθως διασπούν την γλυκόζη, το άμυλο και την ξυλόζη αλλά όχι την κυταρίνη. Αυτά τα είδη περιλαμβάνουν στελέχη που ποικίλουν σημαντικά στα χαρακτηριστικά αλλά αυτά τα χαρακτηριστικά δεν συνεργάστηκαν αρκετά για να δικαιολογήσουν την ταξινόμησή τους σε περισσότερα από ένα είδος από τα βασικά που υπάρχουν έως σήμερα. Τα είδη διαιρέθηκαν σε δύο υποκατηγορίες. *B. ruminicola* υποκατηγορία *ruminicola* που περιλαμβάνει οχτώ βιότυπους τα οποία διαφέρουν στην παραγωγή θειικού οξέος, στην υγροποίηση της ζελατίνης και την διάσπαση των υδατανθράκων. *Bruminiela subsp brevis* περιλαμβάνει τρεις βιότυπους που διαφέρουν στην παραγωγή θειικού οξέος και στην διάσπαση λίγων υδατανθράκων και διαφέρουν από την πρώτη υποκατηγορία στο ότι είναι περισσότερο κοκκοειδή και στο γεγονός ότι αναπτύσσονται σε μέσο με τρυπτικάση και εκχύλισμα ζύμης που προστέθηκαν σε στομαχικό υγρό από την μεγάλη κοιλία. Η ομάδα D από τις πιο πολυάριθμες που απομονώθηκαν από την μεγάλη κοιλία των προβάτων ήταν πανομοιότυπα με το *B ruminicola subsp. brevis*.

Σε έρευνες στα επικρατέστερα βακτήρια στα νεαρά βοοειδή (Bryant *et al.*, 1958) απομονώθηκαν στελέχη σχετικά με το είδος *B. succinogenes* και *B. ruminicola*. Από βοοειδή ηλικίας 1 και 3 εβδομάδων η ομάδα R1 διέφερε από τα προγενέστερα στο ότι αυτά αναπτύσσονταν στους 22°C, παρήγαν ινδόλη και λίγο προπιονικό οξύ. Η ομάδα R1 διαχωρίστηκε σε τρεις υποκατηγορίες με βάση την παραγωγή αμμωνίας, την νιτροποίηση και την διάσπαση υδατανθράκων. Η ομάδα R1-a εμφανίστηκε να σχετίζεται πιο πολύ με τα *B. amylophilus* επειδή διασπούσε μόνο άμυλο και υδρολυτικά προϊόντα. Η *B. amylophilus* δεν διασπά την γλυκόζη. Οι ομάδες R1-b και c ταυτοποιούνται πιο πολύ με τα *B. ruminicol*.

***Butyric acid-producing Bacteroides*:** Οι Bryant *et al* (1958) απομόνωσαν από την μεγάλη κοιλία νεαρών βοοειδών έναν αναερόβιο, που διασπά την λακτόζη, gram – αρνητικό, μη κινητικό πολεομορφικό ραβδοειδές το οποίο παρήγαγε αέριο, συμπεριλαμβανομένου του υδρογόνου, βουτυρικό και ακετονικό οξύ και μία μικρή ποσότητα προπιονικού οξέος σε μέσο γλυκόζης. Αυτός ο οργανισμός τοποθετήθηκε στο γένος των *Bacteroides* (Breed *et al.*, 1957). Θα μπορούσε να ανήκει στο γένος *Sphaerophorus Prevot* αλλά δεν υπάρχει κανένας λόγος να μην θεωρηθεί ότι το γένος αυτό ανήκει στο *Bacteroides* με βάση τα γνωστά χαρακτηριστικά των δύο ομάδων. Η

μόνη διαφορά μεταξύ αυτών των ομάδων είναι ότι τα *Sphaerophorus spp.* εμφανίζουν πολεομορφισμό.

Είναι δύσκολο να συγκριθούν τα χαρακτηριστικά της ομάδας R2 με αυτά των αναγνωρισμένων ειδών των δύο γενεών, γιατί στις περισσότερες περιπτώσεις τα παραγόμενα προϊόντα δεν έχουν καθοριστεί. Διαφέρουν από τα άλλα είδη σε αρκετά χαρακτηριστικά. Σε ορισμένα είδη *Sphaerophorus* εμφανίζονται ομοιότητες ως προς την παραγωγή του βουτυρικού οξέος και ως προς την παραγωγή γαλακτικού οξέος και από τα μεμονωμένα είδη σε αρκετά χαρακτηριστικά. Είναι ο μοναδικός οργανισμός από αυτές τις τρεις ομάδες που είναι γνωστό ότι διασπούν την λακτόζη αλλά αυτό δεν έχει καθοριστεί για τα περισσότερα είδη.

Κατά την διάσπαση της ξυλόζης περιγράφηκε ένα αναερόβιο, gram-αρνητικό, κινητικό κύτταρο το οποίο παρήγαγε βουτυρικό και οξικό οξύ και μικρή ποσότητα προπιονικού και γαλακτικού οξέος. Ο οργανισμός κατατάχθηκε στο γένος *Bacteroides* B. και ονομάστηκε *amylogens*. Το κυρτό σχήμα του κυττάρου υπέθετε μια σχέση με το γένος *Desulfovibrio* αλλά η απουσία μαστίγιου και η αδυναμία μείωσης των θειικών ουσιών απέτρεψαν αυτήν την εκτίμηση. Τα περισσότερα χαρακτηριστικά των οργανισμών υπέθεταν μια στενή σχέση με το είδος *Butyrivibrio fibrisolvens* (Bryant *et al.*, 1956). Τέλος το τελευταίο είδος είναι κινητικό, με μαστίγιο και αδημοσίευτα δεδομένα αναφέρουν ότι δεν παράγει ιωδί χρωστική σε αντίθεση με τα *Bacteroides amylogenes* που το κάνουν.

Fusobacteria: απομονώθηκε μια ομάδα gram – αρνητικά, αναερόβια ραβδία με μυτερά άκρα από σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις περιεχομένου της μεγάλης κοιλίας (Huhtanen *et al.*, 1953). Αυτοί οι οργανισμοί παρήγαγαν οξέα εκτός από το γαλακτικό οξύ, αέρια και μία αποκρουστική μυρωδιά σε ενισχυμένο μέσο με γλυκόζη. Τα λιγοστά αυτά χαρακτηριστικά που έχουν μελετηθεί υποδεικνύουν ότι οι οργανισμοί αυτοί ανήκουν στο γένος *Fusobaeterium* Knorr χωρίς συγκεκριμένο προσδιορισμό.

Οι Bryant *et al* (1958) απομόνωσαν ένα εμφανώς μη κινητικό είδος του γένους *Fusobacterium* από το στομάχι νεαρών βοοειδών ηλικίας 1 έως 3 εβδομάδων αλλά δεν βρήκαν παρόμοιους οργανισμούς σε μεγαλύτερα ζώα. Ορισμένα στελέχη παρουσίαζαν μία ποικιλία από φυσιολογικά χαρακτηριστικά όπως η παραγωγή ινδόλης, η υγροποίηση της ζελατίνης, η υδρόλυση του αμύλου, η ζύμωση της τρεαλόζης και μανιτόλης, η ανάπτυξη στους 22° με 45° βαθμούς C, με μορφολογικά

και άλλα φυσιολογικά χαρακτηριστικά που περιλάμβαναν και τα προϊόντα της ζύμωσης και ήταν παρόμοια, υποδεικνύοντας μία ομάδα πολύ στενά συγγενικών οργανισμών.

Αυτή η ομάδα ήταν παρόμοια με στελέχη που αναπτύσσονται στην στοματική κοιλότητα του γένους *Fusobacteria*, *Fusobacterium fusiforme*, σε αυτούς τους μικροοργανισμούς ήταν σημαντική η παραγωγή γαλακτικού οξέος από την διάσπαση των προϊόντων, το βουτυρικό δεν ανιχνεύτηκε ενώ το μέγεθος και το σχήμα των κυττάρων ήταν παρόμοια. Παρόλα αυτά, διέφεραν από τους μικροοργανισμούς αυτούς σε αρκετά χαρακτηριστικά, όπως η παραγωγή αμμωνίας, και διέφεραν από τα στελέχη της στοματικής κοιλότητας αφού παρήγαγαν αέριο συμπεριλαμβανομένου και του υδρογόνου. Ήταν παρόμοια σε αρκετά χαρακτηριστικά όπως η παραγωγή αερίων αλλά διέφεραν ως προς το μέγεθος αφού ήταν μακρύτερα και μεγαλύτερα καθώς και στην παραγωγή γαλακτικού και όχι προπιονικού οξέος (Breed *et al.*, 1957).

***Butyrivibrio*:** σε μελέτες που έγιναν κατά την διάσπαση της κυτταρίνης σε αναερόβιο περιβάλλον στην μεγάλη κοιλία απομονώθηκε ένα βακτήριο μικρό, gram – αρνητικό, ραβδοειδές το οποίο διασπά ένα ευρύ φάσμα υδατανθράκων και παράγει διοξειδίο του άνθρακα, υδροξειδίο, βουτυρικό και φορμικό οξύ, ενώ δεσμεύει ακετονικό οξύ κατά την ζύμωση της κυτταρίνης (Hungate R. E., 1950). Οι Bryant and Small (1956) μελέτησαν τα χαρακτηριστικά ενός μεγάλου αριθμού στελεχών από παρόμοιους οργανισμούς τα οποία απομόνωσαν από βοοειδή που διατρέφονταν με ποικιλία ζωοτροφών. Το γένος *Butyrivibrio* καθιερώθηκε με τον τύπο είδους *B. fibrisolvens*. Το γένος αυτό περιλάμβανε κύτταρο αναερόβιο, μη σπορογόνο, μονότριχο, gram – αρνητικό, ραβδοειδούς σχήματος το οποίο διασπά την γλυκόζη παράγοντας βουτυρικό οξύ. Μερικά μεμονωμένα στελέχη διέφεραν σημαντικά ως προς τα χαρακτηριστικά αλλά οι περισσότερες παραλλαγές ήταν μικρές και δεν σχετιζόνταν, έτσι ώστε τοποθετήθηκαν τα περισσότερα στελέχη σε ένα είδος. Μόνο 3 από τα 48 στελέχη που μελετήθηκαν μπορούσα να διασπάσουν την κυτταρίνη αλλά πολλά από τα στελέχη μπορούσαν να υδrolύσουν το άμυλο και να διασπάσουν την ξυλάνη, την ινουλίνη, την σαλικίνη, την εσκουλίνη, και πολλούς μόνο και δυσαχαρίτες. Είναι εύλογο να αναφερθούμε σε μέλη του γένους αυτού, τα οποία δεσμεύουν υδρογονάνθρακες οι οποίοι είναι σημαντικοί στην φυσιολογία της θρέψης. Αυτό το γένος εμφανίζεται να είναι σημαντικό στην αποικοδόμηση της πρωτεΐνης,

όπως αποδεικνύεται από την πέψη της καζεΐνης και της ζελατίνης από ορισμένα στελέχη.

Οι Gill and King (1958) μελετώντας ένα στέλεχος του *Butyrivibrio* απέδειξαν ότι η παραγωγή βουτυρικού οξέος ήταν σημαντικά μειωμένη και η παραγωγή γαλακτικού οξέος ήταν σημαντικά αυξημένη όταν τα προϊόντα διάσπασης παράγονταν από την γλυκόζη και τα οποία προσδιορίστηκαν σε συνθετικό μέσο σε σύγκριση με το μέσο που περιέχει υγρό από την μεγάλη κοιλία. Ανεξάρτητα αν το παραπάνω ισχύει σε άλλα μέσα που δεν περιέχουν υγρό από την μεγάλη κοιλία ή για άλλα στελέχη που δεν είναι γνωστά, αποτελεί σημείο μελέτης για τον εντοπισμό στελεχών άλλων βακτηρίων τα οποία θα παράγουν λίγο ή καθόλου βουτυρικό οξύ. Επιπλέον, οι ερευνητές ανακάλυψαν ότι το διοξειδίο του άνθρακα ήταν απαραίτητο για την ανάπτυξη των βακτηρίων σε συνθετικό μέσο όταν τα στελέχη των Bryant and Small (1958) δεν απαιτούσαν προσθήκη διοξειδίου του άνθρακα σε μέσο με στομαχικό υγρό από την μεγάλη κοιλία.

Επιπρόσθετα η απομόνωση του γένους *Butyrivibrio* που απαριθμούνται παραπάνω, άλλοι μελετητές έχουν απομονώσει στελέχη από βακτήρια της μεγάλης κοιλίας τα οποία ανήκουν στο γένος, παρόλα αυτά πολύ λίγα χαρακτηριστικά προσδιορίστηκαν. Αυτά περιλαμβάνουν τους τύπος RO-H τα οποία περιγράφονται από τους Huntanen and Gall (1953) και την ομάδα B-I που περιγράφονται από τους Maki and Foster (1957). Τέλος καθώς είναι γνωστό, μέλη του γένους *Butyrivibrio* δεν έχουν απομονωθεί από άλλη πηγή παρά μόνο από την μεγάλη κοιλία.

***Succinivibrio*:** το γένος *Succinivibrio* είναι αναερόβιο, μη σπορογόνο, gram – αρνητικό, ραβδοειδές, μονότριχο με πολικό μαστίγιο (Bryant *et al.*, 1958). Παράγουν μεγάλη ποσότητα σουξινικού οξέως κατά την ζύμωση της γλυκόζης. Οι Bryant and Small (1957) μελέτησαν επτά στελέχη από νεαρά βοοειδή και τα τοποθέτησαν όλα σε ένα είδος το *S. dextrinosolven*. Τα στελέχη είχαν ίδια χαρακτηριστικά εκτός από τις αλλαγές κατά την διάσπαση ορισμένων υδατανθράκων. Ένα στέλεχος έχασε το ελικοειδές σχήμα του και διατηρήθηκε μετά από αυτό στο εργαστήριο για ορισμένο χρόνο.

Βακτήρια της ομάδας B ζύμωσης υδατανθράκων απομονώθηκαν από την μεγάλη κοιλία των προβάτων και ανήκουν σε αυτό το είδος. Ήταν πανομοιότυπα στην ζύμωση των υδατανθράκων με το στέλεχος B158 εκτός από το γεγονός ότι και το άμυλο είχε υποστεί διάσπαση.

Αυτό το είδος παρήγαγε σουξινικό και ακετονικό οξύ κυρίως κατά την ζύμωση της γλυκόζης, ίσως παρήγαγαν λίγο φορμικό και γαλακτικό οξύ ενώ έκαναν πρόσληψη διοξειδίου του άνθρακα. Δεν εμφανίζονταν ενεργά στον καταβολισμό των πρωτεϊνών αλλά κυρίως στην ζύμωση αρκετών υδατανθράκων. Το είδος των ζώων στο οποίο εμφανίζονταν αυτοί οι μικροοργανισμοί σε μεγάλο αριθμό ήταν εκείνα τα οποία διατρέφονταν με ζωοτροφές υψηλής περιεκτικότητας σε κόκκους, συν το γεγονός ότι η μαλτόζη και η δεξτρόζη είχαν υποστεί ζύμωση, αποδεικνύουν ότι αυτό το είδος είχε μεγάλη σημασία στην μεγάλη κοιλία των οργανισμών σαν ζυμωτήρας των υδρολυτικών προϊόντων του αμύλου.

***Desulfovibrio*:** κατά την διάρκεια μελέτης της γαλακτικής ζύμωσης από βακτήρια της μεγάλης κοιλίας νεαρών βοοειδών, ο Gutierrez (1953) απομόνωσε μικρά, gram – αρνητικά, κυρτά ραβδοειδή βακτήρια τα οποία παρήγαγαν μαύρες αποικίες κατά την παρουσία θεικού σιδήρου. Εκτός από την γαλακτική ζύμωση τα στελέχη αυτά μετείχαν και στην δέσμευση του μηλικού οξέος. Ο αριθμός των μικροοργανισμών αυτών ήταν σχετικά μικρός από 50.000 έως 100.000 ανά ml, σημειώνοντας ότι ήταν γενικά ασήμαντος κάτω από τις συγκεκριμένες συνθήκες της μελέτης.

***Selenomonas*:** *Selenomonas ruminantium* ήταν από τα πρώτα βακτήρια που μελετήθηκαν και ονοματίστηκαν (Certes *et al.*, 1889, Wenyon *et al.*, 1926). Αναγνωρίστηκαν από το σχήμα μισοφέγγαρου που έχουν αλλά και από τον τρόπο σύνδεσης των μαστιγίων τους στην κοίλη πλευρά του κυττάρου στην εσωτερική δομή.

Τα δέκα στελέχη του *Selenomonas* που μελετήθηκαν έδειξαν ότι είναι αυστηρά αναερόβια και ότι ζυμώνουν μια μεγάλη ποικιλία υδατανθράκων και παράγουν σε μέσο γλυκόζης χαμηλό pH από 4.3 έως 4.5 σε σχέση με άλλα βακτήρια αναερόβια της μεγάλης κοιλίας με εξαίρεση τα βακτήρια της γαλακτικής ζύμωσης. Τα περισσότερα προϊόντα αντιπροσωπεύονταν κατά την ζύμωση της γλυκόζης, του γαλακτικού, του ακετονικού και προπιονικού οξέος. Στελέχη κυμαίνονται μεταξύ αυτών που παράγουν γαλακτικό οξύ και αυτών που παράγουν προπιονικό και ακετονικό οξύ. Αδημοσίευτες έρευνες για δύο στελέχη αναφέρουν ότι το γαλακτικό οξύ είναι οπτικά ανενεργό. Ανιχνεύθηκε ποσότητα διοξειδίου του άνθρακα. Τρία στελέχη ζύμωσαν γαλακτικό οξύ με ταυτόχρονη παραγωγή προπιονικού και

ακετονικού οξέος, παρόμοια με τα *Propionibacteria*. Αν και παραλλαγές εμφανίστηκαν μεταξύ στελεχών ως προς την μορφολογία, τα χαρακτηριστικά και την ζύμωση ορισμένων υδατανθράκων, διαφορές όμως που δεν φαίνεται να είναι αρκετά μεγάλες έτσι ώστε να δημιουργηθούν νέα στελέχη. Καθώς η γαλακτική ζύμωση έχει ιδιαίτερη σημασία για την μεγάλη κοιλία τα στελέχη που συμμετέχουν σε αυτή ονομάστηκαν *S. Ruminantium* var *lactilytica*.

Τρία είδη του γένους αναγνωρίστηκαν, πρωτίστως στο φυσικό περιβάλλον, και προτάθηκε ότι όταν θα υπάρχουν διαθέσιμα στοιχεία θα μπορεί να διαπιστωθεί αν ανήκουν στο ίδιο είδος. *Selenomonas palpitans*, έχει παρατηρηθεί στο τυφλό και στο έντερο των τρωκτικών και των φυτοφάγων, δεν έχει μελετηθεί σε καθαρές καλλιέργειες. *Selenomonas sputigena*, το είδος της στοματικής κοιλότητας που έχει απομονωθεί και μελετηθεί από πολλούς ερευνητές. Ο Macdonald (1953) επανεξέτασε τον οργανισμό και μελέτησε τα χαρακτηριστικά των επιπλέον στελεχών. Αν και τα προϊόντα της ζύμωσης δεν έχουν προσδιοριστεί η ζύμωση ορισμένων υδρογονανθράκων έχει καταγραφεί, τα είδη εμφανίζονται πανομοιότυπα με το *S. ruminantium* εκτός από την ικανότητα του τελευταίου οργανισμού να παράγει υδρόθειο. Αποδείχθηκε ότι τα στελέχη της στοματικής κοιλότητας δεν παρήγαγαν υδρόθειο ακόμα και όταν αναπτύσσονταν σε μέσο που παρασκευάστηκε στο εργαστήριο, ενώ τα στελέχη της μεγάλης κοιλίας το παρήγαγαν δυναμικά. Ωστόσο ένα στέλεχος από *Selenomonas* που δεν παρήγαγε υδρόθειο απομονώθηκε από την μεγάλη κοιλία ενός νεαρού βοοειδούς. Οι διαθέσιμες πληροφορίες δείχνουν ότι τα στελέχη *S. ruminantium* και *S. sputigena* δεν είναι αρκετά διακριτές για να θεωρηθούν ξεχωριστά είδη. Φαίνεται καλύτερα, ωστόσο, ότι για να θεωρηθούν στελέχη από διαφορετικό περιβάλλον ως ξεχωριστά ήδη έως ότου τα στελέχη, *S. palpitans*, απομονωθούν και τα χαρακτηριστικά τους συγκριθούν με άλλα είδη.

Other motile, curved rods Άλλα κεκαμμένα ραβδία με ικανότητα κίνησης: Κατά την διάρκεια μελέτης στελεχών σε οργανισμούς παρόμοιους σε σχήμα με τα *selenomonads*, το στέλεχος B385, απομονώθηκε από νεαρό βοοειδές, διέφερε σημαντικά στην φυσιολογία και στα χαρακτηριστικά από το *Selenomonas ruminantium*. Τα χαρακτηριστικά ήταν τα εξής:

- αδυναμία παραγωγής υδρόθειου
- υψηλότερο τελικό pH ανάπτυξης,

- αδυναμία ζύμωσης σαλικίνης και εσουλίνης,
- ζύμωση ξυλάσης,
- παραγωγή βουτυρικού οξέως, γαλακτικού, φορμικού και οξικού οξέως για την χρήση κατά την ζύμωση της γλυκόζης.

Τα κύτταρα είχαν την τάση να είναι λιγότερο καμπυλωτά από τα στελέχη *Selenomonas* και εμφάνιζαν μαστίγια σε τούφες τα οποία συνδέονταν τυχαία στην επιφάνεια των κυττάρων και όχι κατά κύριο λόγο στην κοίλη πλευρά. Αυτοί οι οργανισμοί ήταν παρόμοιοι με το *Butyrivibrio fibrisolvens* εκτός από το γεγονός ότι ο τελευταίος μικροοργανισμός είναι μικρότερος, μονοτριχοειδής και συνήθως έχουν την δυνατότητα ζύμωσης της εσουλίνης και της σαλικίνης.

Με βάση το σχήμα και τον τύπο των μαστιγίων, το στέλεχος B385 ανήκει στην οικογένεια *Spirillaceae* Migula και ταιριάζει στο γένος *Spirillum* εκτός από το γεγονός ότι το γένος αυτό δεν συμπεριλαμβάνεται στα αυστηρά αναερόβια. Φαίνεται να αντιπροσωπεύουν ένα νέο γένος βακτηρίων.

Παρόμοιοι μικροοργανισμοί έχουν ανακαλυφθεί μεταξύ των κυρίαρχων βακτηρίων της μεγάλης κοιλία των νεαρών βοοειδών τα οποία διατρέφονταν με τριφύλλα έρπων (*Trifolium repens*). Έξι στελέχη που μελετήθηκαν ήταν πανομοιότυπα και παρόμοια με το στέλεχος B385 εκτός από το γεγονός ότι ζυμώνουν την εσουλίνη και την σαλικίνη ενώ αδυνατούν να ζυμώσουν την ξυλόζη και την ξυλάνη και τα μαστίγια ήταν συνήθως προσαρμοσμένα στις άκρες των κυττάρων. Παρόλα αυτά τα προϊόντα της ζύμωσης δεν έχουν ακόμα προσδιοριστεί.

Borrelia: Μικροί ελικοειδής οργανισμοί μπορούν να παρατηρηθούν κάτω από το μικροσκόπιο σε περιεχόμενο από την μεγάλη κοιλία. Στην απομόνωση κυτταριολυτικών βακτηρίων, δυσκολία συναντάς στην απελευθέρωσή τους από τόσο μικρούς ελικοειδής οργανισμούς. Ο Bryant (1952) απομόνωσε αρκετά στελέχη από την μεγάλη κοιλία των βοοειδών και των προβάτων και μελέτησε τα φυσιολογικά χαρακτηριστικά από ένα στέλεχος. Αυτός ο οργανισμός ήταν μικρός, ακανόνιστα κουλουριασμένος σπειροειδής σε χρωστική ανιλλίνης. Αυτή η ιδιότητα το κατατάσσει στο γένος *Borrelia*. Ο οργανισμός ήταν αναερόβιος και απαιτούνταν άγνωστες ουσίες από το στομαχικό υγρό για την ανάπτυξη και σε μεγάλο βαθμό διεγείρετε από τις ζυμώσεις των υδατανθράκων, πολλά από τα οποία χρησιμοποιήθηκαν. Η ζύμωση της

γλυκόζης είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή μεγάλης ποσότητας από ηλεκτρικό οξύ, οξικού οξύ και μικρής ποσότητας από γαλακτικό οξύ, φορμικό, αιθανόλη και διοξειδίο του άνθρακα.

Με βάση τη μορφολογία και τον τύπο αποικιών, τα περισσότερα σπειροειδή που απομονώθηκαν εμφανίστηκαν παρόμοια με το *Borellia*, μετά από λεπτομερή μελέτη, ενώ ένα είδος που απομονώθηκε από ένα βοοειδές και ένα άλλο από πρόβατο ήταν πιο χαλαρά τυλιγμένο (Bryant 1952). Περαιτέρω έρευνα είναι απαραίτητη για να αποσαφηνίσει εάν υπάρχουν περισσότερα από ένα είδος στην μεγάλη κοιλία. Η έλλειψη τεχνογνωσίας στην φυσιολογία των σπειροειδών δημιουργεί δυσκολίες στον καθορισμό των σχέσεων μεταξύ του *Borellia* της μεγάλης κοιλίας και αυτού από άλλες πηγές. Ωστόσο όσον αφορά την μορφολογία και τις απαιτήσεις των αναερόβιων συνθηκών ανάπτυξης της στομαχικής *Borellia* είναι παρόμοιες με αυτές του στοματικού στελέχους που ονομάζεται *Borellia vincentii*.

***Succinimonas*:** Πρόσφατα περιγράφηκε ένα νέο γένος και είδος αναερόβιου βακτηρίου που έχει την δυνατότητα υδρόλυσης του αμύλου και παραγωγής ηλεκτρικού οξέος. Είναι gram-αρνητικό, μονότριχο και ραβδοειδές (Bryant *et al.*, 1958). Απομονώθηκαν από το στομάχι των βοοειδών τα οποία καθημερινά διατρέφονταν με σιτηρέσιο αποτελούμενο από μείγμα δημητριακών, αν και ο αριθμός τους ήταν μικρότερος από άλλα βακτήρια που έχουν την δυνατότητα υδρόλυσης του άμυλου.

2.4 Cocci

α) *Peptostreptococci*: πολυάριθμα, εμφανώς διαφορετικά είδη από αναερόβια κοκκία έχουν απομονωθεί από το περιεχόμενο της μεγάλης κοιλίας, πολλά από τα οποία δεν έχουν εμφανώς περιγραφθεί. Τα περισσότερα από αυτά τα βακτήρια τοποθετούνται στο γένος *Peptostreptococcus* από τους Klyver and Van Niel ενώ τροποποιήθηκαν από τον Smith (1957) με βάση την ύπαρξή τους ως gram – θετικά και εμφανίζονται σε ζευγάρια ή αλυσίδες. Η τρέχουσα κατάσταση της ταξινόμησης των αναερόβιων κόκκων είναι φτωχή λόγω των ανεπαρκών περιγραφών των ειδών. Το ελαϊκό οξύ και ηθειογλυκόζη χρησιμοποιούνται για την μορφολογική και την φυσιολογική τους ταξινόμηση.

O Hare (1952) και οι συνεργάτες του ήταν ικανοί να διαχωρίσουν πολλά στελέχη των αναερόβιων κοκκίων από ανθρώπινες πηγές σε μόνο εννέα διαφορετικές ομάδες. Είναι προφανές ότι το μέλλον θα συμπεριλάβει μελέτες όσον αφορά την φυσιολογία και την μορφολογία των ειδών *Veillonella*, *Peptococcus* και *Peptostreptococcus*.

Αρκετές ομάδες από κόκκους του στομάχου που ανήκουν στο γένος *Peptostreptococcus* και εμφανίζουν την δυνατότητα να ομογενοποιούν τα βακτήρια που παράγουν γαλακτικό οξύ έχουν περιγραφεί. Τα είδη *RO-SCC* και *RO-LCC* των Huhtanen and Gall (1953) καθώς και η ομάδα L1 των Maki and Foster (1957) δεν μπορούν να συγκριθούν με τα αναγνωρισμένα είδη γιατί δεν έχουν περιγραφεί λεπτομερώς. Η ομάδα C3 των Bryant *et al* (1958) απομονώθηκε από νεαρά βοοειδή και εμφάνιζε να μοιάζει πιο πολύ με το ανθρώπινο στέλεχος *P. intermedius*. Το στέλεχος C3 διαφέρει από αυτούς τους οργανισμούς σε αρκετά χαρακτηριστικά συμπεριλαμβανομένου και της τάσης του να σχηματίζει μυτερά άκρα. Το στέλεχος *P. intermedius* παράγει εκτός από γαλακτικό, προπιονικό και μυρμηκικό οξύ ενώ ο οργανισμός C3 παράγει κυρίως γαλακτικό και μικρές ποσότητες από ακετονικό και μυρμηκικό οξύ.

Οι Maki and Foster (1957) απομόνωσαν και εν συντομία περιέγραψαν ένα στέλεχος αναερόβιο, gram- θετικό το οποίο σχηματίζει μακριές αλυσίδες και παράγει κυρίως προπιονικό και γαλακτικό οξύ κατά την ζύμωση της γλυκόζης. Αυτά τα χαρακτηριστικά υποθέτουν μια σχέση με το στέλεχος *P. Intermedius* και άλλα παρόμοια στελέχη.

Η ομάδα C1 που απομονώθηκε από μιας εβδομάδας ηλικίας βοοειδή τοποθετήθηκε στο γένος *Peptostreptococcus* αλλά δεν ταυτοποιήθηκε με άλλα γνωστά είδη. Ήταν παρόμοια με ορισμένα είδη που παρήγαγαν αέριο και αμμωνία αλλά διέφερε ως προς την αδυναμία παραγωγής εύφλεκτου αερίου, αναπτυσσόταν σε ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασίας και διασπούσε μια ευρύτερη ποικιλία υδατανθράκων. Τα όξινα τελικά προϊόντα κυρίως το ακετονικό, το γαλακτικό, το σουξινικό επίσης διαφέρουν από αυτά των είδη αναγνωρισμένων ειδών. Η ομάδα C1 εμφανίζεται να είναι πανομοιότυπη στα μορφολογικά χαρακτηριστικά και στην ζύμωση των υδατανθράκων με τους αναερόβιους στρεπτόκοκκους που απομονώθηκαν από γαλοπούλες από τους Harrison and Hansen (1950) άλλα χαρακτηριστικά δεν καθορίστηκαν.

Οι Elsdén *et al.*, (1951) και Lewis (1953) απομόνωσαν από στομαχικό υγρό των προβάτων ένα αναερόβιο, gram- αρνητικό κόκκο που διασπούσε το γαλακτικό οξύ και αρκετούς άλλους υδατάνθρακες με ταυτόχρονη παραγωγή λιπαρών πτητικών οξέων συμπεριλαμβανομένου του βαλερικού και καπροικού οξέος. Ο σχηματισμός των λιπαρών οξέων και η διάσπαση ορισμένων αμινοξέων και ακριλικών οξέων από τον LC κόκκο έχουν μελετηθεί λεπτομερώς. Οι Huhtanen and Gall (1953) ανακάλυψαν παρόμοιους μικροοργανισμούς την RO-C8 ομάδα, που παράγει βουτυρικό οξύ και σχηματίζει μακριές αλυσίδες πτητικών λιπαρών οξέων από το στομάχι των μοσχάρων και ενήλικων μηρυκαστικών τα οποία διατρέφονταν με σιτηρέσιο υψηλής διατροφικής αξίας, αλλά λεπτομερές μελέτες δεν έγιναν. Αυτοί οι οργανισμοί περιγράφηκαν ως gram- θετικοί. Οι Elsdén *et al.*, (1951) αργότερα απομόνωσαν περισσότερα στελέχη από τους LC κόκκους και πραγματοποίησαν μια συστηματική λεπτομερή μελέτη με τα χαρακτηριστικά τους.

Πρόσφατα, οργανισμοί παρόμοιοι με τους LC κόκκους απομονώθηκαν σε μεγάλα μεγέθη από μοσχάρια ώριμα και νεαρά τα οποία διατρέφονταν με σιτηρέσιο που τους προκαλούσε τυμπανισμό. Οι οργανισμοί ήταν πανομοιότυποι με τους LC εκτός από το γεγονός ότι διασπούσαν την σουκρόζη και κάποια στελέχη ζύμωναν την γλυκερόλη και αναπτυσσόταν στους 45° C. Οι απομονώσεις από τα βοοειδή απέτυχαν να διασπάσουν την σορβιτόλη, ενώ ήταν μεταβλητοί στην γλυκερόλη και στην ανάπτυξη τους στους 45° C. Οι Hobson *et al.*, (1958) ανακάλυψαν τρεις ξεχωριστές ορολογικές ομάδες σε 211 στελέχη από βοοειδή. Παρόλα αυτά τα στελέχη ήταν κυρίως gram- αρνητικά, ορισμένα είχαν την τάση να είναι gram – θετικά και κάποια κύτταρα εμφανίζονταν gram- θετικά. Οι οργανισμοί αυτοί τοποθετήθηκαν στο γένος

Peptostreptococcus λόγω της μορφολογίας και των προϊόντων παραγωγής κατά την διάσπαση.

β) **Ruminococci**: μεταξύ των πρώτων ομάδων των βακτηρίων που αποδείχθηκε ότι είναι σημαντικά στη διάσπαση της κυτταρίνης στο στομάχι ήταν οι αναερόβιοι κυτταρολυτικοί κόκκοι Έρευνες για αυτούς τους οργανισμούς και άλλα στομαχικά κυτταρολυτικά βακτήρια έχουν αναφερθεί από τους Sijpesteijn (1948) and Hungate (1950). Από τότε που οι μελετητές απομόνωναν αυτά τα στελέχη των βακτηρίων πολλοί άλλοι έχουν απομονώσει αυτά τα βακτήρια από υψηλές αραιώσεις από το περιεχόμενο των στομάχων από βοοειδή, πρόβατα και από τα κόπρανα από τα κουνέλια. Ο Sijpesteijn (1948) καθιέρωσε το γένος *Ruminococcus* gram- θετικό, μη κινητικό, μη σπορογόνο, αναερόβιο που διασπά την κυτταρίνη με παραγωγή μεγάλης ποσότητας σουζινικού οξέος. Τα τρία στελέχη που μελετήθηκαν τοποθετήθηκαν στο είδος *R. flavefaciens*. Ούτε το είδος, ούτε το γένος συμπεριλάμβανε στελέχη που περιγράφηκαν, γιατί αυτά τα στελέχη παρήγαγαν μικρή ή μηδαμινή ποσότητα σουζινικού οξέος και κάποια ήταν gram- αρνητικά. Βάσει μελέτης για περισσότερα στελέχη από κυτταρολυτικά κοκκία που απομονώθηκαν από βοοειδή και πρόβατα ο Hungate (1950) επέκτεινε την περιγραφή του γένους για να συμπεριλάβει gram- αρνητικά ή μεταβλητά κοκκία που διασπούν τους υδατάνθρακες σχηματίζοντας οξικό εστέρα, ίχνη υδρογόνου και διάφορους συνδυασμούς από αιθανόλη, φορμικό, γαλακτικό και σουζινικό οξύ. Δεκατέσσερα στελέχη απομονώθηκαν από βοοειδή από τους Bryant *et al.*, ταυριάζοντας την περιγραφή του γένους *Ruminococcus* εκτός από την έλλειψη παραγωγής υδρογόνου ή οποιουδήποτε άλλου αερίου σε οχτώ από αυτά τα στελέχη.

Ο Sijpesteijn, ακολουθώντας την ταξινόμια των Kluyver and Van Niel, απέδειξε ότι τα κυτταρολυτικά κοκκία θα μπορούσαν να συμπεριλαμβάνονται στην φυλή *Streptococcus* αλλά τ' αναγνώριζε αυτά σαν ένα νέο γένος γιατί δεν ήταν αληθινά βακτήρια γαλακτικού οξέος που θα μπορούσαν να συμπεριληφθούν στο γένος *Streptococcus* ή *Betacoccus* και επειδή δεν διασπούν πρωτεΐνες που θα μπορούσαν να συμπεριληφθούν στο γένος *Peptostreptococcus*. Ο Smith διεύρυνε το τελευταίο γεγονός ώστε να συμπεριλάβει όλους τους gram- θετικούς αναερόβιους κόκκους που εμφανίζονται ζευγάρια ή σε αλυσίδες. Αυτό θα περιλάμβανε το είδος *Ruminococcus*. Παρόλα αυτά στο γένος *Peptostreptococcus* ο Smith τοποθέτησε είδη

με ποικιλία φυσιολογικών χαρακτηριστικών ώστε να είναι προφανές ότι στο μέλλον ορισμένα είδη θα συμπεριληφθούν σε διαφορετικά γένη.

Στο είδος *R. flavefaciens* ο Sijpesteijn συμπεριλαμβάνει τους κόκκους που παράγουν ηλεκτρικό οξύ, που προσδίδουν κίτρινο χρώμα στην κυτταρίνη, που διασπούν την κυτταρίνη, την γλυκόζη αλλά δεν διασπούν αρκετά από τα υπόλοιπα σάκχαρα. Με βάση τα χαρακτηριστικά των περισσότερων στελεχών που τοποθετούνται στα είδη είναι προφανές ότι μπορεί να παρατηρηθεί σημαντική διακύμανση μεταξύ των στελεχών. Τα στελέχη ποικίλουν στη παραγωγή της κίτρινης χρωστικής, στην ικανότητα να διασπούν ορισμένους υδατάνθρακες, στην ανάπτυξη τους στους 45°C, στην παραγωγή υδρογόνου, διοξειδίου του άνθρακα και αιθανόλης. Τα στελέχη εμφανίζονται να είναι σταθερά ιωδοφιλά, να αναπτύσσονται στους 30°-32°C και 37°-39°C αλλά όχι στους 22°C ή 48°C, να μην παράγουν ινδόλη ή υδρόθειο, να μην είναι αναγωγικά ή υγροποιημένα, να παράγουν αναγωγικά σάκχαρα όταν αναπτύσσονται σε περίσσεια κυτταρίνης, να παράγουν ηλεκτρικό και ακετονικό οξύ και τέλος να εμφανίζουν ίχνη φορμικού και γαλακτικού οξέος από τους υδατάνθρακες και σε περίπτωση αποτυχίας να διασπούν πολλούς υδατάνθρακες. Στελέχη που μελετήθηκαν από τον Hungate παράγουν ίχνη υδρογόνου αλλά αυτό το αέριο δεν μπορεί να ανιχνευθεί σε κανένα από τα στελέχη του Bryant *et al.*, (1957). Οι τελευταίοι μελετητές ανακάλυψαν ότι όλα τα στελέχη σχηματίζουν αλυσίδες κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες και όλα διασπούν την ξυλάνη εκτός από την κυτταρίνη.

Ένα δεύτερο είδος, *Ruminococcus albus*, δημοσιεύτηκε για να συμπεριλάβει τα στελέχη των κόκκων τα οποία δεν παράγουν ηλεκτρικό οξύ. Τα χαρακτηριστικά αυτού του είδους ήταν αρκετά μεταβλητά, όσον αφορά την παραγωγή λιγοστής ή και καθόλου χρωστικής κίτρινης, τα κύτταρα συνήθως ήταν μεμονωμένα ή σε ζευγάρια, ήταν gram-αρνητικά και συνήθως μη ιωδοφιλά. Τα προϊόντα της διάσπασης συμπεριλάμβαναν υδρογόνο, διοξείδιο του άνθρακα, αιθανόλη, ακετονικό οξύ, φορμαικό και γαλακτικό οξύ. Συνήθως περισσότερο υδρογόνο και διοξείδιο του άνθρακα παράγονταν από το στέλεχος *R. flavefaciens*. Εφτά από τα δεκατέσσερα στελέχη που μελετήθηκαν από τους Bryant *et al* σχημάτισαν μια ξεχωριστή ομάδα που διέφερε από *R. flavefaciens* στην παραγωγή ηλεκτρικού οξέος, στην μεγάλη ποσότητα αιθανόλης και εκτός από ένα στέλεχος στην παραγωγή αερίου συμπεριλαμβανομένου του υδρογόνου. Επίσης ήταν συνήθως μεμονωμένα και σε ζευγάρια και σπάνια σε αλυσίδες. Ανήκουν στο είδος *R. albus*. Έτειναν να διαφέρουν από τα στελέχη του Hungate επειδή μερικά παρήγαγαν κίτρινη χρωστική, ήταν

ιωδοφιλικά, δεν παρήγαγαν μεγάλες ποσότητες από γαλακτικό οξύ και κάποια στελέχη διασπούσαν την γλυκόζη. Τα περισσότερα ζύμωναν την ξυλόζη.

Παρόλες τις παραπάνω περιγραφές και την ποικιλία των χαρακτηριστικών των δύο ειδών των κόκκων, ορισμένα στελέχη δεν κατατάσσονται σε κανένα από τα παραπάνω είδη.

Ο Hungate απέδειξε ότι η πέψη της κυτταρίνης δεν πρέπει να θεωρηθεί ως χαρακτηριστικό γνώρισμα των *Ruminococcus*. Οι Bryant and Burkey απομόνωσαν κάποια στελέχη τα οποία εμφανίζουν πανομοιότυπα χαρακτηριστικά με τους κυτταρινολυτικούς κόκκους, εκτός από το ότι η κυτταρίνη δεν ήταν ορατή. Αργότερα μη κυτταρινολυτικά κοκκία με χαρακτηριστικά όπως το *R. albus* απομονώθηκαν από το στομαχικό περιεχόμενο νεαρών βοοειδών και ώριμων αγελάδων. Διαφέρουν από τα κυτταρολυτικά στελέχη των ειδών μόνο ως προς την διάσπαση ενός μεγάλου αριθμού υδατανθράκων από τα περισσότερα κυτταρολυτικά στελέχη. Η μανιτόλη ήταν η μόνη ουσία που είχε υποστεί ζύμωση από ορισμένα στελέχη κάτι που δεν είχε αποδειχθεί από άλλα.

Μια μελέτη των διατροφικών απαιτήσεων από δύο στελέχη *R. albus* και τρία στελέχη *R. lavelacensis* υπέδειξε μία στενή σχέση στο ότι όλα τα απαιτούμενα ή διεγέρθηκαν πολύ από πτητικά οξέα από το στομαχικό υγρό και από το ισοβαλερικό οξύ όταν αναπτύσσονταν σε μέσο με περιεχόμενο B-vitamine, μέταλλα, καζεΐνη, γαλακτωματοποιητή (tween 80), διασαχαρίτη Cellulobiose και κυστεΐνη. Η ανάπτυξη του στελέχους *R. albus* που ερευνήθηκε από τον Fletcher δεν διεγέρθηκε από πτητικά λιπαρά οξέα αλλά απαιτούσε παράγοντες από το ρευστό της περιττωματικής στομαχικής κοιλότητας το οποίο να είναι κίτρινου χρώματος, μη πτητικό, καρβοξυλικό οξύ με ισοδύναμο εξουδετέρωσης. Αυτό το αποτέλεσμα αποδεικνύει ότι τα επιμέρους στελέχη του *R. albus* έχουν διαφορετικές απαιτήσεις ανάπτυξης.

Veillonellae: χρησιμοποιώντας γαλακτικό μέσο απομονώθηκε η *Veillonellae alcalescens* από την στομαχική κοιλότητα των προβάτων. Κυμαίνονταν από 1 έως $7,4 \times 10^6$ / ml, υποθέτοντας ότι ο οργανισμός αυτός ήταν μείζονος σημασίας στο στομάχι των προβάτων τα οποία διατρέφονταν με χειμερινό γρassιδι. Ο Johns απέδειξε ότι αυτοί οι οργανισμοί πιθανόν να έπαιζαν ρόλο στη λειτουργία της γαλακτικής ζύμωσης και ταυτόχρονα εμφανίζονταν στην αποκαρβοξυλίωση του ηλεκτρικού σε προπιονικό και διοξείδιο του άνθρακα. Το βέλτιστο pH αυτής της αντίδρασης των

κυττάρων *Veillonellae* ήταν παρόμοιο με αυτό των πλυμένων βακτηριακών κυττάρων από το στομαχικό υγρό. Ο Gutierrez απομόνωσε αυτά τα βακτήρια από την στομαχική κοιλότητα των προβάτων σε ποσότητα $1,8-5,5 \times 10^5/\text{ml}$ και από τα βοοειδή σε πληθυσμό 60-2000/ml.

Είναι προφανές ότι η μεγάλη κοιλία περιλαμβάνει μια μεγάλη ποικιλία από είδη βακτηρίων, αρκετά από τα οποία εμφανίζονται σε μεγάλες ποσότητες σε ζώα που διατηρούνται κάτω από ένα σύνολο συνθηκών. Οι περισσότερες σημαντικές ομάδες έχουν απομονωθεί.

3. ΠΡΩΤΟΖΩΑ ΜΕΓΑΛΗΣ ΚΟΙΛΙΑΣ

Καθώς μια αγελάδα περιτριγυρίζει και βόσκει, λεγεώνες από άλλα «ζώα» διατρέφονται και αναπτύσσονται στην μεγάλη κοιλία του πεπτικού της σωλήνα. Εκατομμύρια πρωτόζωα κολυμπούν σ' έναν ενιαίο χώρο περιεκτικότητας 20 γαλονιών, συγκρουόμενων μεταξύ τους και μεταξύ των θρεπτικών συστατικών και βακτηρίων. Τ' όνομα πρωτόζωα σημαίνει «πρώτο ζώο», αντικατοπτρίζοντας το ζώο, σαν χαρακτηριστικό αυτών των μικροβίων. Αυτοί οι μικροοργανισμοί συμβάλλουν σημαντικά στην διαδικασία της πέψης και έχουν θετικές και αρνητικές επιπτώσεις στην απόδοση των ζώων.

Τα πρωτόζωα αποτελούν το 0,01% ή και λιγότερο του συνόλου των μικροοργανισμών της μεγάλης κοιλίας. Τα βακτήρια αποτελούν το 98% των κυττάρων, τέλος οι μύκητες και τα μεθανιογόνα αποτελούν τον υπόλοιπο ποσοστό (Lin, Raskin and Stahl 1997). Αν και ελάχιστα σε αριθμό, τα πρωτόζωα είναι σχετικά μεγάλα, και κατά συνέπεια αποτελούν το 5-50% της μάζας του συνόλου των μικροβίων της μεγάλης κοιλίας (Sylvester *et al.*, 2005, Williams and Coleman 1992). Τέλος τα πρωτόζωα είναι αρκετά μεγάλα ώστε να μπορεί να τα δει κανείς με γυμνό μάτι.

3.1 Ταξινόμηση

Εκατοντάδες είδη πρωτόζωων έχουν ταυτοποιηθεί (Williams and Coleman 1997), αλλά τα περισσότερα ταξινομούνται σε δύο τύπους. Ο ένας τύπος (*isotrichid*) είναι καλυμμένος με τρίχες- σαν βλεφαρίδες οι οποίες βοηθούν τα πρωτόζωα στην μετακίνησή τους (τριχόμορφες δομές). Αυτός ο τύπος πρωτόζωων τα βλεφαριδοφόρα (*Cillioophora*) καταναλώνει κυρίως σάκχαρα και άλλους διαλυτούς υδατάνθρακες (Williams and Coleman 1992). Δεν απορροφά θρεπτικά συστατικά, αλλά μπορεί να τα δεσμεύσει για την μετατροπή τους σε υδατάνθρακες. Μπορεί να δεσμεύει λιγότερα βακτήρια από δεύτερο τύπο των πρωτόζωων (Belanche *et al.*, 2012). Επίσης έχουν περιορισμένη ικανότητα όσον αφορά την διάσπαση των ινωδών ουσιών (Williams and Coleman 1992).

Ο δεύτερος τύπος πρωτόζων (*Entodiniomorphid*) έχει και αυτός βλεφαρίδες αλλά διάσπαρτες. Αυτός ο τύπος έχει βλεφαρίδες που βρίσκονται γύρω από το στόμα. Επιτρέποντας του να προσλαμβάνει τα θρεπτικά συστατικά μαζί και τα βακτήρια. Διασπούν τις ινώδεις ουσίες, το άμυλο και τις πρωτεΐνες (Williams and Coleman 1992, Belanche *et al.*, 2012).

Υπάρχει ένας ακόμα τύπος πρωτόζων τα μαστιγοφόρα (*flagellate*) (Ogimoto and Imai 1981), τα οποία είναι λιγότερο σημαντικά από τους δύο προηγούμενους τύπους λόγω του μικρότερου μεγέθους του. Δεν έχει βλεφαρίδες, ενώ κινείται με μαστιγοφόρες ελαστικές ουρές, τα μυνήματα.

3.2 Δραστηριότητες στην μεγάλη κοιλία

Μετά το τάισμα τα πρωτόζωα αποθηκεύουν μεγάλες ποσότητες αμύλου οι οποίες είναι σημαντικές τόσο για την αγελάδα όσο και για τα ίδια τα πρωτόζωα. Έχουν την δυνατότητα να αποθηκεύουν κόκκους αμύλου κατευθείαν από την τροφή ή μπορούν να σχηματίσουν άμυλο – όπως υδατάνθρακες από διαλυτούς υδατάνθρακες. Τα ισότριχα είναι έμπειρα στον σχηματισμό αυτών των αποθεμάτων από διαλυτούς υδατάνθρακες, αποθηκεύοντας αρκετά ώστε να γίνουν αδιαφανή. Η αποθήκευση του αμύλου είναι σημαντική για τα βοοειδή επειδή ορισμένη ποσότητα αμύλου διαφεύγει και γίνεται διαθέσιμη για απορρόφησή του από το έντερο. Ωστόσο δίνει ένα πλεονέκτημα στα πρωτόζωα σε σχέση με τα βακτήρια γιατί απομονώνουν τους υδατάνθρακες από αυτά (βακτήρια). Αυτός ο διαχωρισμός εξηγεί γιατί τα πρωτόζωα παραμένουν στην μεγάλη κοιλία, ακόμα και αν είναι φανερό η γρήγορη ανάπτυξη των βακτηρίων κάτω από συνθήκες εργαστηρίου (Denton *et al.*, 2015).

Τα πρωτόζωα ενσωματώνουν ορισμένες πρωτεΐνες από εγκλωβισμένα βακτήρια στα κύτταρά τους, αλλά και διασπούν πρωτεΐνες σε πεπτίδια, αμινοξέα και αμμωνία το οποία και απελευθερώνουν στην μεγάλη κοιλία (Juan y 1996). Αυτό μειώνει την παροχή των μικροβιακών πρωτεϊνών στην αγελάδα (William and Coleman 1992).

Συχνά τα πρωτόζωα είναι υπεύθυνα για την αύξηση των εκπομπών μεθανίου από τα βοοειδή. Τα μεθανιογόνα (αρχαιοβακτήρια) όχι τα πρωτόζωα είναι οι

οργανισμοί που παράγουν μεθάνιο, αλλά τα *methanogens* λυμνάζουν στις κυτταρικές επιφάνειές τους και μέσα στα κύτταρά τους (Stumm, ggGijzen and Voyels 1982: New Bold, Lassalas and Jouany 1995; Finlay *et al.*, 1994). Κατά την διάρκεια της ζύμωσης τα πρωτόζωα παράγουν υδρογόνο, το οποίο τα μεταλλάσσει σε *methanogens* για παραγωγή μεθανίου. Η σχετική επίδραση των πρωτόζωων έναντι άλλων μικροβίων δεν είναι σαφής.

Τα περισσότερα μικρόβια της μεγάλης κοιλίας πεθαίνουν παρουσία οξυγόνου. Τα πρωτόζωα ενεργούν στην απομάκρυνση του οξυγόνου από την μεγάλη κοιλία (Williams and Coleman 1992). Η μεγάλη κοιλία είναι κυρίως κενή από οξυγόνο, παρόλα αυτά ποσότητα οξυγόνου εισέρχεται δια μέσου της τροφής και του νερού και του τοιχώματος της κοιλίας. Τα ισότριχα μπορούν να ανεχθούν το οξυγόνο σε μικρές συγκεντρώσεις και να αναπνέουν με αυτό. Η αναπνοή αφαιρεί το οξυγόνο, αποτοξινώνει το περιβάλλον της μεγάλης κοιλίας από τα ισότριχα πρωτόζωα και άλλα μικρόβια. Σε αντίθεση με τα πρωτόζωα που αναπτύσσονται στο στομάχι του ανθρώπου τα ισοτριχοειδή και συγγενικοί μικροοργανισμοί δεν παράγουν ενέργεια (ATP) από το αναπνεόμενο οξυγόνο (Ellis *et al.*, 1991, Muller *et al.*, 2012). Έτσι ο λόγος της πρωτοζωικής αναπνοής είναι η αποτοξίνωση του περιβάλλοντος της μεγάλης κοιλίας και όχι η παραγωγή ενέργειας.

3.3 Μετακίνηση

Τα πρωτόζωα δεν είναι απαραίτητα στα ζώα. Μπορούν να αφαιρεθούν από την μεγάλη κοιλία με ασιτία και πλύσιμο με αντιπρωτοζωικούς παράγοντες (Williams and Coleman 1992). Η μέθοδος αυτή είναι σκληρή και επιβλαβής για την υγεία των ζώων. Είναι επίσης πολύ εύκολο να ανατραπεί ο πληθυσμός τους από αναπολλαπλασιασμό από πρωτόζωα από άλλα ζώα. Παρόλα αυτά η απομάκρυνσή τους δεν είναι πρακτική για τα σημερινά εμπορικά συστήματα εκτροφής ζώων, αλλά ρίχνει φώς στην συμβολή των πρωτόζωων σε σχέση με εκείνη άλλων μικροβίων όσον αφορά την πέψη των μηρυκαστικών και την απόδοση τους.

Η απομάκρυνση των πρωτόζωων μπορεί να είναι επωφελής αλλά και επιζήμια. Επειδή τα πρωτόζωα διασπούν τις πρωτεΐνες και δεσμεύουν τα βακτήρια

που είναι επίσης πλούσια σε πρωτεΐνες, η απομάκρυνσή τους προκαλεί συσσώρευση μεταβολιζόμενης πρωτεΐνης στο ζώο. Ως αποτέλεσμα η απομάκρυνσή τους προκαλεί γρήγορη ανάπτυξη όταν τα ζώα διατρέφονται με σιτηρέσια περιορισμένα σε πρωτεΐνη. Η ανάπτυξη του μαλλιού στα αιγοπρόβατα οφείλεται σε έναν παρόμοιο λόγο (Williams and Coleman 1992). Επειδή τα πρωτόζωα βοηθούν στην μετατροπή του υδρογόνου σε μεθάνιο, η μετακίνησή τους μειώνει την μεθανογένεση, αν και η απάντηση είναι μεταβλητή (Heparty 1998).

Η αφαίρεση τους μειώνει την αφομοίωση των ινών, ωστόσο, επειδή τα βακτήρια δεν μπορούν ν' αντισταθμίσουν την απώλεια της πρωτοζωικής δραστηριότητας, αυτό προκαλεί την μείωση της πεπτικότητας των ινών. Αυτό μειώνει την διαθεσιμότητα της ενέργειας με αποτέλεσμα να επιβραδύνεται η ανάπτυξη των ζώων όταν τα σιτηρέσιά τους είναι φτωχά σε ενέργεια (Williams and Coleman 1992).

3.4 Επιπτώσεις στην απόδοση των ζώων

Διάφορες πειραματικές προσεγγίσεις αλλά και η απομάκρυνση των πρωτόζωων οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η παρουσία τους έχει θετικές και αρνητικές επιπτώσεις στην πέψη και την απόδοση των ζώων. Οι επιπτώσεις ποικίλουν ανάλογα με τις συνθήκες διατροφής. Η επίδραση θα είναι αρνητική στην ανάπτυξη των ζώων με ένα ενεργειακά- φτωχό σιτηρέσιο, αλλά θα είναι θετική σε ένα πλούσιο με πρωτεΐνες σιτηρέσιο. Τα αποτελέσματα στα θηλάζοντα ζώα δεν έχουν αποδειχτεί, αλλά πιθανόν θα είναι τα ίδια με τα παραπάνω.

Επειδή τα αντιπρωτοζωικά είναι σκληρά για τον οργανισμό των ζώων, έχουν χρησιμοποιηθεί εναλλακτικά προϊόντα όπως τα λιπίδια, η χρήση των οποίων μειώνει την συγκέντρωση των πρωτόζωων όταν τα ζώα διατρέφονται με σιτηρέσια πλούσια σε λιπαρά οξέα. Παρόλα αυτά τα λιπαρά είναι ακριβά και μπορεί να προκαλέσουν αρνητικές επιπτώσεις. Μελλοντικές έρευνες πρέπει να βελτιώσουν την χρήση των λιπαρών ουσιών ή να ανακαλύψουν νέα αντιπρωτοζωικά προϊόντα.

Αφού τα πρωτόζωα δεν είναι απαραίτητα και κάποιες φορές χειροτερεύουν τις αποδόσεις των ζώων, γιατί συμβιώνουν στην μεγάλη κοιλία των μηρυκαστικών; Η

έρευνα για την ζύμωση στην μεγάλη κοιλία ξεκίνησε πριν από 40 εκατομμύρια χρόνια κάτω από πολύ διαφορετικές συνθήκες εκτροφής σε σχέση με τις σημερινές (Hackmann and Spain 2010). Ίσως τα πρωτόζωα προσέφεραν όφελος στο μηρυκαστικό το προγονικό που με τα πειράματά μας σήμερα δεν μπορούμε να αποκαλύψουμε, ή σύμφωνα με τον επιστήμονα Burk Dehority τα πρωτόζωα είναι απλά επειδή απλά είναι. Περισσότερο από 150 χρόνια μετά την ανακάλυψή τους στην μεγάλη κοιλία, αυτά τα « πρώτα ζώα» συνεχίζουν να μας συναρπάζουν και ν' αποτελούν μυστήριο για εμάς.

Βασιζόμενοι στο παραπάνω συμπέρασμα η έρευνα που ακολουθεί θα μπορέσει να μας δώσει τεκμηριωμένα συμπεράσματα όσον αφορά την μορφολογία των πληθυσμών των πρωτόζωων που συμβιώνουν με άλλους μικροοργανισμούς στην μεγάλη κοιλία των μηρυκαστικών. Σύμφωνα με την συγγραφέα Laura Cristina Stefanut *et al.*, η μεγάλη κοιλία, είναι ένα πολύπλοκο οικοσύστημα όπου οι τροφές υποβάλλονται σε πέψη από συμβιωτικούς μικροοργανισμούς. Τ' αποτελέσματα της ζύμωσης σ' αυτό το επίπεδο είναι τα πτητικά λιπαρά οξέα και η μικροβιακή βιομάζα, τα οποία χρησιμοποιούνται από τον ξενιστή ως θρεπτικό υπόστρωμα. Μεταξύ των μικροοργανισμών την μεγάλης κοιλίας (βακτήριο, πρωτόζωα και μύκητες) και των ξενιστών υπάρχουν ποικίλες αλληλεπιδράσεις (ικανότητα προσαρμογής – συμβίωση) οι οποίες παρέχουν πλεονεκτήματα στην ικανότητα πέψης των μηρυκαστικών και στην ικανότητα να χρησιμοποιούν σιτηρέσια πλούσια σε ινώδεις ουσίες και φτωχές σε πρωτεΐνες.

Ο κύριος σκοπός αυτής της μελέτης ήταν : η ανάπτυξη νέων μεθόδων καθορισμού, χρώσης και ταυτοποίησης των πρωτόζωων της μεγάλης κοιλίας, μορφολογικά χαρακτηριστικά των πρωτόζωων, υποοικογένεια και γένος, έρευνα της δομής των πληθυσμών των πρωτόζωων της μεγάλης κοιλίας των οικόσιτων μηρυκαστικών.

3.5 Υλικά και μέθοδοι

Η έρευνα διεξήχθη μεταξύ του Νοέμβριου του 2012 έως τον Μάρτιο του 2013 στην σχολή κτηνιατρικής Clus Napoca στο εργαστήριο φυσιολογίας των ζώων, στην

ιατρική κλινική και το νοσοκομείο μικρών ζώων στην Ρουμανία. Για την έρευνα χρησιμοποιήθηκαν τρεις ομάδες ζώων αποτελούμενες από 5 αγελάδες, 5 πρόβατα και 5 κατσίκες. Τα ζώα συντηρούνταν στο νοσοκομείο της κτηνιατρικής σχολής. Κατά την διάρκεια της έρευνας τα ζώα διατρέφονταν με συμπυκνώματα και καλής ποιότητας σανό.

Συλλογή βιολογικού δείγματος: στομαχικό περιεχόμενο από την μεγάλη κοιλία συλλέχθηκε μεμονωμένα με ακροφύσια. Από κάθε ζώο παραλείφθηκαν πέντε δείγματα. Τα πρωτόζωα είναι ευαίσθητα στην θερμοκρασία (Peterson 1999) για αυτό το λόγο τα δείγματα συλλέχθηκαν και μεταφέρθηκαν σε θερμικά μονωμένο δοχείο.

Ο καθορισμός του δείγματος του περιεχομένου της μεγάλης κοιλίας διατηρήθηκε σε φορμαλίνη (9,5%) και MFS (methyl green-formalin-sodium chlorate). Η εξέταση του δείγματος πραγματοποιήθηκε με την εκτέλεση της φυσικής μεθόδου και των χρωματισμένων παρασκευασμάτων και κατόπιν μελετήθηκαν στο μικροσκόπιο (οπτικό και συνεστιακό). Η ποσοτική μέτρηση των πρωτόζωων την μεγάλης κοιλίας πραγματοποιήθηκε με κυτταρομετρικές μεθόδους χρησιμοποιώντας τον θάλαμο Fuchs Rosenthal.

Εξέταση των δειγμάτων: για την εξέταση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε οπτικό μικροσκόπιο Olympus Bx51, φακοί μεγέθυνσης 10x, 20x, 40x και 100x, αντίθετη φάση μικροσκοπία και εικόνες λήφθηκαν με μηχανή Olympus SP 350 DIGITAL κάμερα και επεξεργάστηκαν με Olympus Cell λογισμικό. Χρησιμοποιήθηκε επίσης συνεστιακό μικροσκόπιο με λέιζερ Zeis LSM 710 και μικροσκόπιο Zeis Ax10 Observer Z1. Ο συνδυασμός, η επεξεργασία και η ανάλυση των εικόνων πραγματοποιήθηκαν με το πρόγραμμα ανάλυσης ZEN. Χρησιμοποιήθηκαν δύο κανάλια φθορισμού : CH1:547-629nm (543nm Henelaser) CH2:667-757nm (633nm Henelaser). Εικόνες συνεστιακές ελήφθησαν με το Plan Achromat 63x μηχανήμα του Zeis.

Ταυτοποίηση των πρωτόζωων την μεγάλης κοιλίας: για την ταυτοποίηση των πρωτόζωων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος καθορισμού αποθήκευσης και χρώσης MFS. Η μέθοδος Methyl green-formaline-sodium chlorate αποτελεί συντηρητικό και χρωστικό, έχει την ικανότητα να χρωματίζει τον πυρήνα των κυττάρων (το σχήμα και η θέση του πυρήνα είναι ένα από τα κριτήρια που χρησιμοποιείται στην ταξινόμηση των πρωτόζωων. Η ταυτοποίηση των πρωτόζωων μπορεί να γίνει σε επίπεδο υποοικογένειας/γένους ή είδους (Makkar and Mcsweeney 2005). Για κάθε γένος ταυτοποιήθηκαν μεταξύ 10 και 50 δείγματα πρωτόζωων.

Γενικότερα, χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω κριτήρια (Makkar and Mesweeney 2005, Dehority 1993, Williams and Coleman 1992), για να ταξινομηθούν και να ταυτοποιηθούν τα πρωτόζωα:

- Η παρουσία βλεφαρίδων σ' όλη την επιφάνεια των κυττάρων ή σε μία ή περισσότερες ξεχωριστές περιοχές
- Ο αριθμός και η τοποθεσία των βλεφαριδωτών περιοχών
- Συνολικά το σχήμα των κυττάρων και οι διαστάσεις τους συμπεριλαμβανομένου του μήκους/πλάτους (L/l)
- Ο αριθμός και η τοποθεσία της συστολικής κενотоπία
- παρουσία τερματικών σπονδύλων

Πίνακας 4: Χαρακτηριστικά των πρωτόζων της μεγάλης κοιλίας των μηρυκαστικών, Makkar and McSweeney, 2005.

α/α	Κριτήρια Ταυτοποίησης	Υποοικογένεια/γένος
	Βλεφαρίδες σε όλο το σώμα	<i>Genus Isotricha</i> , <i>Genus Dasytricha</i>
	Βλεφαρίδες στο εμπρόσθιο άκρο	<i>Genus Entodinium</i>
	Βλεφαρίδες στο εμπρόσθιο άκρο του κυττάρου και σε δεύτερη διαφορετική περιοχή	<i>Genus Diplodiniinae</i>
	Διατεταγμένες διαμήκεις σειρές βλεφαρίδων παράλληλες προς τον μακρύ άξονα του κυττάρου, μήκος κυττάρου 100nm	<i>Genus Isotricha</i>
	Διατεταγμένες διαμήκεις σειρές βλεφαρίδων σαν σπινάλι γύρω από τον μακρύ άξονα του κυττάρου, μήκος κυττάρου 50-75nm	<i>Genus Dasytricha</i>
	Οι βλεφαρίδες είναι γύρω από την στοματική κοιλότητα στο εμπρόσθιο τμήμα του κυττάρου,	<i>Genus Entodinium</i>

	ένα κενοτόπιο, ο μακροπυρήνας είναι κοντά στο ραχιαίο τμήμα, ο μικροπυρήνας είναι στην κοιλιακή περιοχή του μακροπυρήνα	
	Μια δεύτερη περιοχή με βλεφαρίδες στο εγκάρσιο τμήμα του κυττάρου, δύο κενοτόπια, μέγεθος 50-350μm, ο μικροπυρήνας τοποθετημένος μεταξύ του μακροπυρήνα και του ραχιαίου τοιχώματος, παρουσία σκελετικών πλακών	<i>Genus Diplodiniinae</i>
	Μια ραχιαία επιφάνεια με βλεφαρίδες με την μορφή μικρών ταινιών, στο οπίσθιο τμήμα του κυττάρου	<i>Genus Epidinium</i>
	Η ραχιαία περιοχή με βλεφαρίδες είναι μια ζώνη που περιβάλλει τρεις έως τέσσερις φορές το σώμα μέχρι το ένα τρίτο του οπίσθιου άκρου του κυττάρου	<i>Genus Ophryoscolex</i>

3.6 Δομή των πρωτόζων

Για τον καθορισμό της δομής του πληθυσμού των πρωτόζων της μεγάλης κοιλίας έχουν τηρηθεί τα ίδια κριτήρια της ταυτοποίησης. Για κάθε είδος ταυτοποιήθηκαν 100 δείγματα από πρωτόζωα. Η εκτίμηση των αποτελεσμάτων εκφράστηκε σε ποσοστιαία κατανομή.

Πίνακας 5: Ποσότητα των πρωτόζωων στα εξεταζόμενα ζώα ($\text{nx}10^6/\text{ml}$) Laura Cristina Stefanut et al., 2015.

α/α	βοειδή	πρόβατα	Κατσίκια
1	4,78	0,98	9,28
2	4,89	2,72	7,13
3	3,12	0,75	5,12
4	6,78	3,98	6,45
5	5,32	0,64	8,97

3.7 Αποτελέσματα και συζήτηση

Ποσοτικοποίηση των πρωτόζωων της μεγάλης κοιλία.

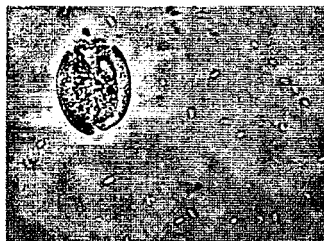
Από την άποψη του αριθμού των πρωτόζωων αποκαλύφθηκαν σημαντικές διαφορές ανάλογα με το είδος των μηρυκαστικών. Οι διαφορές μεταξύ των τριών ειδών μηρυκαστικών οφείλεται στις ιδιαιτερότητες της δομής της διαδικασίας ζύμωσης της τροφής αλλά και της έντασης της πέψης.

Μορφολογικά χαρακτηριστικά των πρωτόζωων της μεγάλης κοιλίας με οπτικό μικροσκόπιο. Η ταυτοποίηση των πρωτόζωων από τα βοοειδή, τα πρόβατα και τα κατσίκια περιλάμβανε τα παρακάτω γένη: *Isotricha*, *Dasytricha*, *Entodinium*, *Epidinium*, *Ophryoscolex*, και της εξής υποοικογένειας *Diplodiniinae* μαζί με τα γένη *Diplodinium*, *Eudiplodinium*, *Poliplastron*.

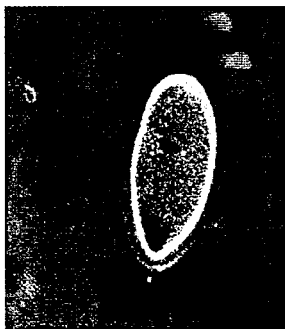
Η ταυτοποίηση και η διαφοροποίηση των βλεφαροειδών πρωτόζωων αποκάλυψε ποικιλία μορφολογικών χαρακτηριστικών για κάθε γένος:



Εικόνα 1: *Genus Isotricha*: βλεφαρίδες σε όλο το σώμα του κυττάρου, μήκος 122,93 μm , πλάτος 58,23 μm , εμβαδό 3735,58 μm^2 , Laura Cristina Stefanut et al., 2015.

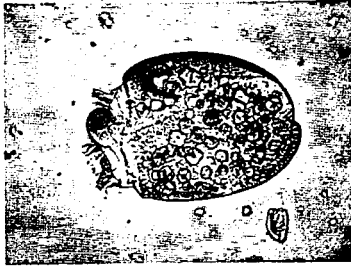


Εικόνα 2: *Genus Dasytricha*: βλεφαρίδες σε όλο το σώμα του κυττάρου, μήκος 74.93 μm , πλάτος 44.73 μm , εμβαδό 2728.85 μm^2 , Laura Cristina Stefanut et al., 2015.



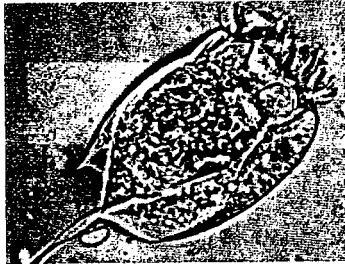
Εικόνα 3: *Genus Entodinium*: μία περιοχή με βλεφαρίδες γύρω από την στοματική κοιλότητα, παρουσία ουράς στο οπίσθιο τμήμα, μήκος 36,67 μm , πλάτος 20,56 μm , εμβαδό 515,03 μm^2 , Laura Cristina Stefanut et al., 2015.

Diplodinium (40x, MFS).



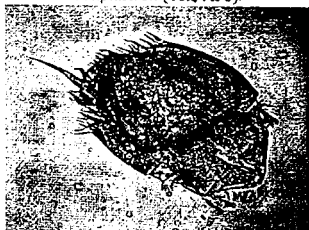
Εικόνα 4: Genus *Diplodinium*: βλεφαρίδες στο πρόσθιο άκρο του κυττάρου και μία δεύτερη περιοχή στο ραχιαίο τμήμα του κυττάρου, μήκος 52,05 μm , πλάτος 47,93 μm , εμβαδό 987 μm^2 , Laura Cristina Stefanut et al., 2015.

Eudiplodinium (40x, MFS).



Εικόνα 5: Genus *Eudiplodinium*: βλεφαρίδες στο πρόσθιο άκρο του κυττάρου και μία δεύτερη περιοχή στο ραχιαίο τμήμα του κυττάρου, μήκος 65,37 μm , πλάτος 40,85 μm , εμβαδό 1833,8 μm^2 , Laura Cristina Stefanut et al., 2015.

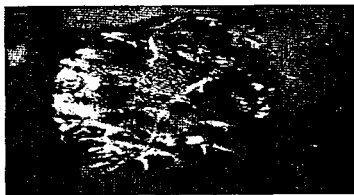
Poliplastron (40x MFS)



Εικόνα 6: Genus *Poliplastron*: βλεφαρίδες στο πρόσθιο άκρο του κυττάρου και μία δεύτερη περιοχή στο ραχιαίο τμήμα του κυττάρου, 5 στενές σκελετικές πλάκες, μήκος 102,87 μm , πλάτος 61,09 μm , εμβαδό 3978,35 μm^2 , Laura Cristina Stefanut et al., 2015.



Εικόνα 7: Genus *Epidinium*: βλεφαρίδες στο πρόσθιο άκρο του κυττάρου και μία δεύτερη περιοχή με στενές λωρίδες στο κέντρο ή στο οπίσθιο τμήμα του κυττάρου, μήκος 65,37 μm , πλάτος 40,85 μm , εμβαδό 1833,8 μm^2 , Laura Cristina Stefanut et al., 2015.



Εικόνα 8: Genus *Ophryoscolex*: βλεφαρίδες στο πρόσθιο άκρο του κυττάρου και μία δεύτερη περιοχή σε σχήμα ελικοειδές στο οπίσθιο τμήμα του κυττάρου, μήκος 123,74 μm , πλάτος 78,35 μm , εμβαδό 7695,02 μm^2 , Laura Cristina Stefanut et al., 2015.

3.8 Μορφολογικός χαρακτηρισμός των πρωτόζωων με συνεστιακό μικροσκόπιο.

Κατά την εξέταση με συνεστιακό μικροσκόπιο ανακαλύφθηκε αυτοφθορισμός των πρωτόζωων. Αυτή η τεχνική αποκάλυψε πολύ καλά το σχήμα, το μέγεθος και την τοποθεσία του πυρήνα των κυττάρων, παρατηρήθηκαν τα κενοτόπια και οι βλεφαρίδες.

Με αυτή την μέθοδο διερεύνησης παρατηρήθηκαν οι παρακάτω πτυχές :

1) *Genus Entodinium*: ο πυρήνας ήταν τοποθετημένος στο οπίσθιο τμήμα του κυττάρου το οποίο καταλαμβάνει το ένα τρίτο το μήκους του κυττάρου. Το σχήμα του κυττάρου ήταν οβάλ και επίσης παρατηρήθηκε η παρουσία της οπίσθιας ουράς.

2) υποοικογένεια *Diplodiniinae*: επιμηκυμένο κύτταρο στα δυο άκρα του, υπήρχαν βλεφαρίδες σε δύο ξεχωριστές περιοχές. Ο πυρήνας ελαφρά κυρτός ήταν τοποθετημένος στην ραχιαία περιοχή του κυττάρου και καταλάμβανε όλο το μήκος του κυττάρου. Ο μικροπυρήνας ήταν τοποθετημένος κοιλιακά του μακροπυρήνα έχοντας οβάλ σχήμα. Στο κυτόπλασμα ανακαλύφθηκαν κενοτόπια.

3) *Genus Epidinium*: επιμηκυμένο κύτταρο, παρατηρήθηκε ουρά στο ουριαίο τμήμα. Οι βλεφαρίδες ήταν σε δύο ξεχωριστές περιοχές στο στόμα και στο ραχιαίο τμήμα. Ο μακροπυρήνας ήταν στο ραχιαίο τμήμα του κυττάρου, είχε οβάλ επίμηκες σχήμα και καταλάμβανε περίπου το μισό μήκος του κυττάρου. Στο κυτόπλασμα ταυτοποιήθηκαν κενοτόπια.

4) *Genus Isotricha*: ο μακροπυρήνας είχε δισκοειδή σχήμα και ήταν τοποθετημένος στο πρόσθιο τρίτο του κυττάρου. Ο μικροπυρήνας ήταν δίπλα στο μακροπυρήνα, παρατηρήθηκε το οβάλ σχήμα του και η παρουσία βλεφαρίδων σε όλο το σώμα του κυττάρου.

3.9 Δομή του πληθυσμού

Ο πληθυσμός των πρωτόζωων της μεγάλης κοιλίας ποικίλει ανάλογα με πολλούς παράγοντες που επιδρούν στα ζώα. Ο πληθυσμός των πρωτόζωων ήταν διαφορετικός ανάλογα με το είδος τους ζώου από όπου συλλέχθηκε στο στομαχικό περιεχόμενο. Η εποχή της συλλογής των δειγμάτων και το είδος διατροφής επηρέαζαν τον πληθυσμό των πρωτόζωων. Έτσι η δομή του πληθυσμού ήταν διαφορετική στα ζώα που διατρέφονταν με χλωρά χορτονομή από εκείνα που διατρέφονταν με ινώδεις ζωοτροφές. Ένας σημαντικός παράγοντας που επηρέασε την δομή του πληθυσμού ήταν η διατροφή και η εποχή. Η δομή ήταν διαφορετική σε σύγκριση με τη προ-διαιτητική και την μετά-γευματική κατάσταση (Ognean *et al.*, 2004, Ognean and Cernea 2011).

Στην περίπτωση των βοοειδών στην δομή του πληθυσμού των πρωτόζωων κυριαρχούσαν τα γένη *Entodinium* (28%) και *Diplodinium* (26%). Τα δείγματα που εξετάσθηκαν επισημάνθηκαν για τα πρωτόζωα του γένους *Endiplodinium*.

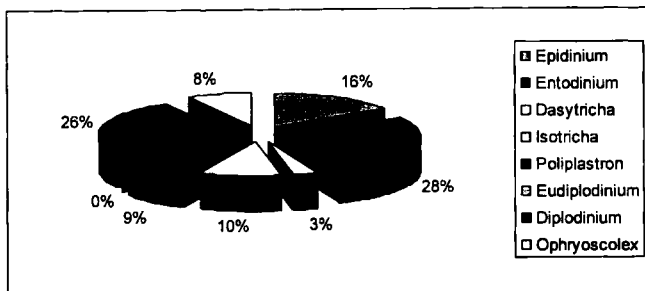
Στο στομαχικό δείγμα που συλλέχθηκε από τα πρόβατα δεν παρατηρήθηκαν πρωτόζωα του γένους *Dasytricha* και *Ophryoscolex*, η δομή του πληθυσμού περιλάμβανε κυρίως τα γένη *Entodinium* (35%) και *Epidinium* (43%).

Στις κατσίκες ανιχνεύθηκαν και τα 8 γένη, τα υψηλότερα επίπεδα καταλάμβαναν τα *Epidinium* (33%) και *Entodinium* (28%).

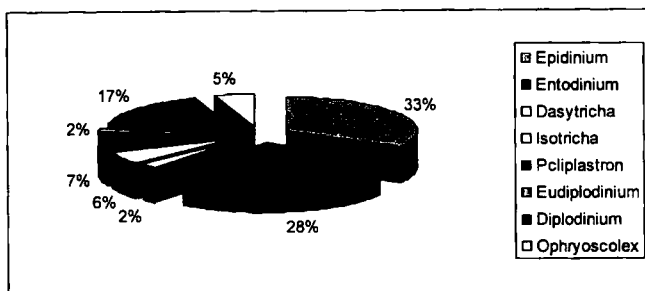
Ανεξάρτητα από το είδος των μηρυκαστικών που εξετάσθηκαν, παρατηρήθηκε απουσία ή παρουσία μικρών επιπέσων βλεφαριδοφόρων πρωτόζωων του γένους *Dasytricha* και *Endiplodinium*, μεσαίου μεγέθους ήταν η παρουσία των γένων *Isotricha*, *Ophryoscolex* και *Poliplastron*. Γενικότερα, κυρίαρχα ήταν τα γένη *Entodinium*, *Epidinium* και *Diplodinium*. Οι παράγοντες που επηρέασαν την δομή των πρωτόζωων ήταν η μέθοδος συλλογής του στομαχικού περιεχομένου και η περιοχή από όπου συλλέχθηκε.

3.10 Συμπέρασμα

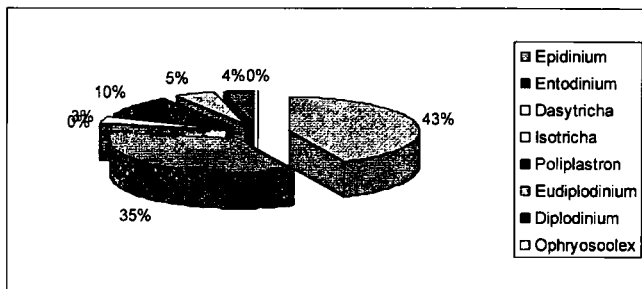
Διαφορετικές μέσες τιμές βλεφαροειδών πρωτόζωων ανιχνεύθηκαν στα τρία είδη των μηρυκαστικών, με τα υψηλότερα ποσοστά στις κατσίκες, έπειτα στα βοοειδή και τα χαμηλότερα επίπεδα στα πρόβατα.



Σχήμα 6: Η % κατανομή των πρωτόζωων στη μεγάλη κοιλία των βοοειδών, *Laura Cristina Stefanut et al., 2015.*



Σχήμα 7: Η % κατανομή των πρωτόζωων στη μεγάλη κοιλία των αιγών, *Laura Cristina Stefanut et al., 2015.*



Σχήμα 8: Η % κατανομή των πρωτόζωων στη μεγάλη κοιλία των προβάτων, *Laura Cristina Stefanut et al., 2015.*

3.11 Ο μεταβολικός ρόλος των πρωτόζωων

Τα πρωτόζωα αποικίζουν τους προστομάχους σε όλα τα είδη των μηρυκαστικών. Μολονότι τα πρωτόζωα δεν είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη και την επιβίωση του ζώου, οι μεταβολικές τους δραστηριότητες στο οικοσύστημα της μεγάλης κοιλίας ασκούν σημαντική επίδραση στη θρέψη του οργανισμού κι κατ' επέκταση στην παραγωγικότητα του ζώου. Τα βλεφαριδωτά πρωτόζωα, και κυρίως τα ενδοδινιόμορφα και ολότριχα, είναι καλά προσαρμοσμένα στο περιβάλλον της μεγάλης κοιλίας και είναι ικανά να διασπούν και να μεταβολίζουν τα κύρια συστατικά των ζωοτροφών των μηρυκαστικών. Εκτός από αυτή την απευθείας συμμετοχή των πρωτόζωων στην παραγωγή μεταβολιτών, η παρουσία τους προκαλεί και μεταβολές στο περιβάλλον της μεγάλης κοιλίας και ιδιαίτερα στο βακτηριακό πληθυσμό, με αποτέλεσμα την άμεση επίδρασή τους στο ρυθμό και το μέγεθος διεξαγωγής των ζυμωτικών φαινομένων.

Ο μεταβολικός ρόλος των πρωτόζωων στο περιβάλλον της μεγάλης κοιλίας, που σε πολλά σημεία είναι ανάλογος με αυτόν των βακτηρίων. Στον πίνακα 6 δίνονται τα κυριότερα ένζυμα των βλεφαριδωτών πρωτόζωων της μεγάλης κοιλίας που δρουν επί των υδατανθράκων, πρωτεϊνών και λιπιδίων των ζωοτροφών.

Πίνακας 6: Τα κυριότερα ένζυμα των βλεφαριδωτών πρωτόζωων της μεγάλης κοιλία που αποδομούν τα σημαντικότερα θρεπτικά συστατικά των ζωοτροφών, Δρ Ι. Νικολακάκης, 2014.

ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΕΣ	ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ	ΛΙΠΙΔΙΑ
Λυασίνη πηκτίνης	Γιρωτεάση	Λιπάσες
Πολυγαλακτουροδινάση	Πεπτιδάση	Κινάσες
Εστεράση πηκτίνης	Αμιδάση	
Κυτταρινάση	Αμινοτρανσφεράση	
Ημικυτταρινάση	Απανιμάση	
Αμυλάση	τρανσαμινάση	
α-γλυκάνο φωσφορυλάση		
α-γλυκοζιδάση		
β-γλυκοζιδάση		
Μαλτάση		
Ισομαλτάση		
Φωσφορυλάση μαλτάσης		
Ινβερτάση		
Κελλοβιάση		
Ξυλοβιάση		
α-L-αραβινοφουρανοσιδάση		
α-γαλακτοζιδάση		
β-γαλακτοζιδάση		
β-γλυκουρονιδάση		
Όξινη φωσφατάση		

4. ΜΥΚΗΤΕΣ

Οι αναερόβιοι μύκητες, ως συστατικά του μικροβιακού πληθυσμού της μεγάλης κοιλίας, ανακαλύφθηκαν το 1975 από τον Collin Oripa. Πριν την ανακάλυψη οι μύκητες είχαν ταυτοποιηθεί ως μαστιγοφόρα πρωτόζωα. Από την ανακάλυψη και μετά, αναερόβιοι μύκητες απομονώθηκαν από το περιεχόμενο του εντέρου από διάφορα είδη ζώων.

Η σύγχρονη ταξινομική κατάταξη των μυκήτων: Σύμφωνα με έναν υπολογισμό του Hawksworth (1991), ο αριθμός διαφορετικών ειδών που περιλαμβάνονται στο βασίλειο των μυκήτων μπορεί να ανέρχεται σε περίπου 1,5 εκατομμύρια, μολονότι έως σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί μόλις περίπου 69.000 είδη. Παρά την πρόοδο των μοριακών τεχνικών ταξινόμησης, εξακολουθούν να υφίστανται αποκλίσεις μεταξύ διαφορετικών ταξινομικών συστημάτων. Έτσι, σύμφωνα με τους Alexopoulos C.J. *et al.*, (1996) οι κατώτεροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί που προηγουμένως κατατάσσονταν στο βασίλειο των μυκήτων, σήμερα έχουν διασπαρεί σε τρία διαφορετικά βασίλεια:

Στο βασίλειο των αληθινών Μυκήτων (*Fungi*),

Στο βασίλειο των Πρωτίστων (*Protista*) και

Στο βασίλειο των Στραμενόπλων (*Stramenopila*).

Αναλυτικότερα:

I) Βασίλειο: *Fungi*

Φύλα: *Chytridiomycota* (Χυτρομύκητες)

Zygomycota (Ζυγομύκητες)

Ascomycota (Ασκομύκητες) και

Basidiomycota (Βασιδιομύκητες)

Στο βασίλειο των στραμενόπλων κατατάσσονται πλέον τα ακόλουθα φύλα:

II) Βασίλειο: *Stramenopila*

Φύλα: *Oomycota* (Οομύκητες)

Labyrinthulomycota (Λαβυρινθουλομύκητες) και

Hyphochytriomycota (Υφοχυτρομύκητες)

Στο βασίλειο των Πρωτίστων συμπεριλαμβάνονται πλέον τα ακόλουθα φύλα, τα οποία προηγουμένως αποτελούσαν τμήμα του βασιλείου των μυκήτων:

III) Βασίλειο: *Protista*

Φύλα: *Myxomycota* (Μυξομύκητες)

Dictyosteliomycota (Δικτυοστελιομύκητες)

Acrasiomycota (Ακρασιομύκητες) και

Plasmodiophoromycota (Πλασμοδιοφορομύκητες)

Λειτουργικά οι μύκητες στην μεγάλη κοιλία είναι ευρέως ταξινομημένοι σε δύο ομάδες. Η πρώτη περιλαμβάνει μύκητες που είναι προαιρετικά αναερόβιοι ή αερόβιοι, είναι παροδικοί και δεν συνεισφέρουν στην πέψη της τροφής στην μεγάλη κοιλία. Η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει τους αναερόβιους μύκητες που είναι αυτόχθονες στην μεγάλη κοιλία και συμμετέχουν στην πέψη. Οι μύκητες εμφανίζονται σε συγκεντρώσεις από 10^2 έως 10^3 ανά gr στομαχικού περιεχομένου και γενικότερα πιστεύεται ότι είναι παροδικός πληθυσμός και δεν έχουν καμία σημαντική συμβολή στην διαδικασία της πέψης. Παρόλα αυτά η αύξηση του αριθμού των μυκήτων στην μεγάλη κοιλία των ζώων είναι τοξική με ταυτόχρονη συσσώρευση γαλακτικού οξέος. Η αύξηση είναι προφανής λόγω της υψηλής διαθεσιμότητας των σακχάρων κατά την διαδικασία της ζύμωσης. Οι πιο σημαντικοί μύκητες αναφέρονται ως *Chytridiomycetes* και περιλαμβάνουν μύκητες που αναπαράγονται με σπόρια. Μέχρι τώρα πέντε γένη και αρκετά είδη έχουν ταυτοποιηθεί στην μεγάλη κοιλία και σε περιοχές του εντέρου των βοοειδών και άλλων μηρυκαστικών. Τα γένη αναγνωρίζονται με βάση τον τύπο σπορογονίας, την ανάπτυξη, την ριζοματοειδή ανάπτυξη και τον αριθμό των μαστιγίων.

Κύκλος ζωής: ο κύκλος ζωής των *Chytridiomycetes* στην μεγάλη κοιλία περιλαμβάνει δύο στάδια ένα κινητικό μαστιγοφόρο σπόρο στο στομαχικό υγρό και ένα μη κινητικό, αναφερόμενο ως θαλλός (ομάδα μυκήτων, πολυκύτταρος μη κινούμενος οργανισμός όπου δεν υπάρχει οργάνωση των ιστών σε όργανα) το οποίο σχετίζεται με στερεά σωματίδια τροφοδοσίας. Τα σπόρια που επιπλέουν ελεύθερα στο στομαχικό υγρό το οποίο είναι πλούσιο σε φυτικά συστατικά, με χημειοτακτική απόκριση επιτίθενται και δεσμεύονται από τα διαλυτά θρεπτικά συστατικά. Τα εγκλωβισμένα σπόρια βλασταίνουν σχηματίζοντας βλαστούς, τα οποία αναπτύσσονται και διακλαδίζονται σε ριζοειδή σωλήνα ή θαλλό σε *Anaeromyces*,

Orpinomyces, *Neocallimastix*, και *Piromyces* ή σε ένα σφαιρικό σώμα που ονομάζεται *Caecomyces*. Την ίδια στιγμή τα εγκλωβισμένα σπόρια αναπτύσσονται σε σποριαγγεία, δομή σαν σάκος. Ο πυρήνας στο σποριαγγείο διαφείται με μίτωση, κάθε πυρήνας περικλείεται από κυτταρόπλασμα μέσα στο οποίο θα εξελιχθεί σε σπόριο. Το σποριαγγείο στην συνέχεια σπάει για να απελευθερωθούν τα σπόρια και ο κύκλος επαναλαμβάνεται. Βασιζόμενοι στον παραπάνω τύπο ανάπτυξης, οι μύκητες των μηρυκαστικών μπορεί να είναι μονοκεντρικοί (μεμονωμένοι σπόροι) ή πολυκεντρικοί (πολλαπλά σπόρια τύπου θαλλού). Στους μονοκεντρικούς μύκητες *Neocallimastix*, *Piromyces*, ο πυρήνας διατηρείται στο σπόριο το οποίο αναπτύσσεται σε σποριαγγείο, ενδογενές ή εξωγενές, από όπου ο πυρήνας μεταναστεύει έξω από τον μύκητα και το σποριαγγείο αποκτά σωληνοειδή ή σφαιροειδή δομή. Στους μονοκεντρικούς μύκητες, το μικκύλιο είναι χωρίς πυρήνα. Στους πολυκεντρικούς μύκητες *Anaromyces*, *Caecomyces*, *Orpinomyces*, ο πυρήνας από τα σπόρια όπου είναι εγκλωβισμένος μεταναστεύει στο μικκύλιο όπου υφίσταται μιτωτική διαίρεση και μετατρέπεται σε πολυνουκλεοτίδιο. Τα σποριαγγεία μετατρέπονται σε σποριαγγειοφόρα μεμονωμένα ή σε ομάδες μέχρι έξι.

Συνεισφορά στην πέψη: η συνεισφορά των μυκήτων στην μικροβιακή φάση είναι δύσκολο να εκτιμηθεί λόγω των δύο κύκλων ζωής και της εκτεταμένης ανάπτυξης της θάλλης μέσα στα θραύσματα των φυτών. Οι μετρήσεις των σπόρων (10^3 - 10^4 /ml) και των σποριαγγείων στα σωματίδια των ζωοτροφών δεν αντιστοιχούν στην μυκητιακή μάζα. Χρησιμοποιώντας χιτίνη σαν χρωματίνη, εκτιμήθηκε ότι οι μύκητες αντιπροσωπεύουν το 10% της συνολικής μικροβιακής μάζας στην μεγάλη κοιλία. Η σχετική συνεισφορά των μυκήτων στην πέψη δεν είναι γνωστή. Πειράματα στα οποία μύκητες εξαλείφθηκαν ή μειώθηκαν αρκετά, απέδειξαν την συμβολή τους στην πέψη και την ζύμωση των υδατανθράκων. Οι μύκητες της μεγάλης κοιλίας παράγουν τα υδρολυτικά ένζυμα που απαιτούνται για την διάσπαση των κυριότερων συστατικών της φυτικής βιομάζας. Τα ένζυμα περιλαμβάνουν κυτταρινάση, ημικυτταρινάση, πηκτινάση, αμυλάση και πρωτεάση. Οι μύκητες μπορούν να διασπάσουν την πηκτίνη, δεν είναι όμως ικανοί να χρησιμοποιήσουν τα υποβαθμισμένα προϊόντα. Ακόμα, οι μύκητες παράγουν εστέρες φαινόλης (P-coumaroyl και ferylolyl) που μπορούν να διασπάσουν τους δεσμούς μεταξύ των ημικυτταρινασών και της λιγνίνης. Η ριζοειδής ανάπτυξη του θαλλού είναι ικανή να διεισδύει στο φυτικό ιστό καλύτερα από τα βακτήρια και τα πρωτόζωα, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε μεγαλύτερη υποβάθμιση των ζωοτροφών. Οι μύκητες της

μεγάλης κοιλίας είναι ικανοί να χρησιμοποιούν ένα ευρύ φάσμα από δι και μονοσακχαρίτες. Όλα τα είδη μυκήτων μπορούν να χρησιμοποιούν γλυκόζη, σελοβιόζη και λακτόζη αλλά όχι την αραβινόζη. Πολλοί λίγοι μύκητες είναι ικανοί να χρησιμοποιούν την μαλτόζη, την γαλακτόζη, την μανόζη, την ριβόζη, την τρεχαλόζη και μελιζιτόση. Είναι έκπληκτο το ότι αρκετοί μύκητες δεν μπορούν να χρησιμοποιήσουν τα σάκχαρα όπως την αραβινόση, την γαλακτόζη, την μανόση και την ριβόζη, τα οποία είναι κοινά συστατικά των φυτικών υδατανθράκων. Βασίζόμενοι σε λίγες έρευνες οι μύκητες όπως τα βακτήρια έχουν μικτή όξινη ζύμωση. Μπορούν να μεταβολίζουν την εξόζη ή την πεντόζη για να παράγουν ακετόνη, φορμάτιο, γαλακτικό οξύ, αιθανόλη CO_2 και H_2 . Επειδή οι μύκητες παράγουν τα κύρια συστατικά του μεθανίου (το φορμάτιο και το H_2) τι προφίλ της ζύμωσης μεταβάλλεται παρουσία μεθανογόνων. Η μετατόπιση των προϊόντων ζύμωσης, ως αποτέλεσμα μεταφοράς H_2 μεταξύ των ειδών, οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή ATP, η οποία αυξάνει την μικροβιακή μάζα, την παραγωγή ενζύμων, την ταχύτητα και την έκταση της χρήσης του υποστρώματος.

Είναι γενικά αναγνωρισμένο με ζωοτροφές – βασική διατροφή, ιδιαίτερα χαμηλής ποιότητας φυτικής βιομάζας, το στομαχικό υγρό έχει υψηλή περιεκτικότητα σε σπόρια και μέρος των φυτικών θραυσμάτων αποκλειώνονται με τους μύκητες. Αυτές οι παρατηρήσεις οδήγησαν στην υπόθεση ότι οι μύκητες συνεισφέρουν σε μεγαλύτερο βαθμό στην διάσπαση των ινωδών ουσιών. *In vitro* έρευνες με καλλιέργειες μυκήτων από το στομαχικό περιεχόμενο, ανάλογα με τις ζωοτροφές, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η αποικοδόμηση άγγιζε το 75 – 90% των κυτταρικών τοιχωμάτων.

Σύμφωνα με επιστημονικό άρθρο που εκδόθηκε από την Elsevier και πραγματοποιήθηκε από τους P.K.Hesornsart *et al.*, (2010), στην Ταϊλάνδη και στην σχολή κτηνιατρικής στην Αγγλία υπάρχει ποικιλία αναερόβιων μυκήτων στην μεγάλη κοιλία στα βουβάλια, τα μοσχάρια τα οποία διατρέφονταν με διαφορετικά σιτηρέσια.

4.1 Υλικά και μέθοδοι

Τέσσερα βοοειδή (βάρους $434 \pm 48\text{Kg}$) και τέσσερα βουβάλια (βάρους $369 \pm 28\text{Kg}$) χρησιμοποιήθηκαν στην έρευνα. Το πειραματικό σχέδιο ήταν τετράγωνο κελιά διαστάσεων 4×4 , διάρκειας 21 ημερών για τέσσερις περιόδους. Τα ζώα στεγάστηκαν μεμονωμένα και ταΐστηκαν με τα πειραματικά σιτηρέσια, συμπυκνώματα και ακατέργαστα υλικά ξεχωριστά, δύο φορές την ημέρα από τις 8:00π.μ. έως 16:00μ.μ.. τα συμπυκνώματα χορηγούνταν σε ποσοστό 0,3% του βάρους τους με τα πίτουρα να χορηγούνται κατά βούληση. Κατά τις πρώτες 14 ημέρες του πειράματος τα ζώα στεγάζονταν σε στάβλο, κατά την διάρκεια των τελευταίων επτά ημερών μεταφέρονταν στα πειραματικά κελιά όπου γινόταν η πλήρης συλλογή των περιττωμάτων. Κάθε ζώο ακολουθούσε τυχαία μία από τις τέσσερις θεραπείες κατά τις οποίες καμία δεν ήταν ίδια. Οι διατροφικές θεραπείες ήταν οι ακόλουθες:

- Άχυρο ρυζιού +0% ουρία στο συμπύκνωμα (RS+0U),
- Άχυρο ρυζιού +4% ουρία σε συμπύκνωμα (RS+4U),
- Ουρία-άσβεστος άχυρο ρυζιού + 0% ουρία (ULTS+0U),
- Ουρία-άσβεστος άχυρο ρυζιού +4% ουρία (ULTS+4U).

Το ULRS παρασκευάστηκε με την προσθήκη 2 Kg ουρίας και 2 Kg άσβεστου σε 100 Kg νερό, το οποίο στην συνέχεια χύθηκε σε μία στοιβα 100Kg άχυρου ρυζιού, σκεπάστηκε με πλαστικό σεντόνι για το τουλάχιστον 10 μέρες πριν το τάισμα (Wanapat *et al*, 2009). Καθαρό φρέσκο νερό και ορυκτές πλάκες λείξεως ήταν διαθέσιμα σε όλη την διάρκεια του πειράματος.

4.1.1 Πειραματικές μετρήσεις και εργαστηριακές αναλύσεις

Τα ζώα ζυγίστηκαν πριν την έναρξη του πειράματος και κατά το τέλος. Αντιπροσωπευτικά δείγματα τροφής ελήφθησαν κατά την έναρξη του πειράματος και στην συνέχεια λαμβάνονταν δείγματα δύο φορές το μήνα για ανάλυση όσον αφορά την περιεκτικότητα σε θρεπτικά συστατικά. Πλήθος πειραματικών διατροφών καταγράφονταν καθημερινά. Δείγματα της τροφής ξηράνθηκαν στους 60°C με αέρα, για πάνω από 48 ώρες και υπολογίστηκαν σε ποσοστό επί της ξηράς ουσίας. Ξηρά δείγματα αλέστηκαν σε μύλο Wiley. Τα δείγματα αναλύθηκαν ως προς την ξηρά ουσία, την οργανική ύλη, την τέφρα, εκχύλισμα αιθέρα και αιθέρα αζώτου με την

μέθοδο AOAC (1990). Ινώδεις ουσίες προσδιορίστηκαν με την μέθοδο Van Soest *et al.*, (1991).

4.1.2 Συλλογή στομαχικού υγρού

Την τελευταία μέρα κάθε περιόδου δείγμα στομαχικού περιεχομένου συλλέχθηκε από κάθε ζώο. Το υγρό παραλαμβάνονταν με σύριγγα των 60ml από το μέσο τμήμα του στομάχου. Το pH και η θερμοκρασία καταγράφονταν χρησιμοποιώντας κινητό πεχάμετρο και θερμόμετρο. Το στομαχικό περιεχόμενο χωριζόταν σε δύο δείγματα. Το πρώτο των 20ml συντηρούνταν σε πλαστικό μπουκάλι και στο ψυγείο σε θερμοκρασία -20°C για την εξαγωγή του DNA. Στο δεύτερο δείγμα εμβαπτίστηκαν κομμάτια υφάσματος. Στην συνέχεια το δείγμα αναδεύθηκε με 5ml H_2SO_4 για παύση της μικροβιακής δραστηριότητας και οδηγήθηκε στην φυγόκεντρο στις 3000 στροφές για 10 λεπτά και παραλείφθηκε το υπερκείμενο υγρό(10ml). Το υπερκείμενο υγρό καταψύχθηκε στους -20°C σε πλαστικό μπουκάλι με 5ml H_2SO_4 για περαιτέρω αναλύσεις. Με την μέθοδο micro-kjeldahl και VFA στο υπερκείμενο υγρό έγιναν αναλύσεις για παρουσία $\text{NH}_3\text{-N}$.

4.1.3 Συλλογή δείγματος αίματος

Το αίμα συλλέχθηκε από την σφαγίτιδα φλέβα την τελευταία μέρα κάθε περιόδου. Δείγματα αίματος (10ml) συλλέχθηκαν για ανάλυση – ουρία – αζώτου- τα οποία ελήφθησαν σε σωληνάκια των 6ml χωρίς αντπηκτικό. Τα δείγματα καταψύχθηκαν για 1 ώρα και στην συνέχεια τοποθετήθηκαν στην φυγόκεντρο στις 5000 για 10 λεπτά.

Εξαγωγή γονιδιώματος DNA και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο.

Το στομαχικό περιεχόμενο χωρίστηκε για την εξαγωγή του γονιδιώματος DNA με την μέθοδο RBB+C (Yu and Morrison, 2004). Το γονιδίωμα υποβλήθηκε σε επεξεργασία με RNAαση A και πρωτεΐναση K, με την μέθοδο QIAGEN, Valencia.

Τα στοχευόμενα βακτήρια ήταν, τα τρία κυρίαρχα κυτταρολυτικά βακτήρια *F.succinogenes*, *R albus*, and *R flavefaciens* και οι αναερόβιοι μύκητες. Χρησιμοποιήθηκαν οι εξής ειδικοί εκκινητές για το βακτήριο *F succinogenes*, Fs219f και Fs654r, για τον *R albus* οι Ea1281f και Ra1439r και για τον *R flavefaciens* οι

εκκινητές Rf154f και Rf425r. Οι παραπάνω εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν και σε άλλες έρευνες (Koike and Kabayashi, 2001). Ειδικοί εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν για τους μύκητες του εντέρου όπως περιγράφηκαν από τους Dennem και Mcsweeney 2006. Οι συνθήκες για την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης για το *F.succinogenes* ήταν οι ακόλουθες: 30s στους 94⁰C για μετουσίωση, 30s στους 60⁰C για ανόπτηση και 30s στους 72⁰C για επέκταση (48 κύκλους), εκτός από τα 9 λεπτά μετουσίωσης στον πρώτο κύκλο και 10 λεπτά επέκτασης στον τελευταίο κύκλο. Η ενίσχυση των 16s του RDNA για το *R albus* και *R flabefaciens* διεξήχθησαν όπως τα παραπάνω εκτός της θερμοκρασίας ανόπτησης που ήταν στους 55⁰C. Οι συνθήκες για τις αλυσιδωτές αντιδράσεις της πολυμεράσης για τους μύκητες του εντέρου ήταν οι ακόλουθες: 30s στους 94⁰C για την μετουσίωση, 30s στους 58⁰C για την ανόπτηση και 90s στους 72⁰C για την επέκταση (35 κύκλοι).

4.1.4 Μικροβιακός πληθυσμός και ποικιλία

Τα αποτελέσματα αποκάλυψαν ότι το σύνολο των βακτηρίων αναερόβιων μυκήτων και των *F succinogenes* ήταν υψηλότερα στα βουβάλια απ' ότι στα μοσχάρια. Αυτό επιβεβαιώνουν τα αποτελέσματα των Wanarat *et al.*, 2000, υψηλή περιεκτικότητα σε βακτήρια, χαμηλή σε πρωτόζωα και υψηλή σε μύκητες στα βουβάλια όταν συγκρίθηκαν με τα αποτελέσματα των βοοειδών. Μια άλλη δοκιμή από τους Wora any *et al.*, (2000), επίσης ανακάλυψε κυτταρολυτικά, πρωτεολυτικά και αμυλωτικά βακτήρια στα βουβάλια σε υψηλότερη περιεκτικότητα από ότι στα βοοειδή που διατρέφονταν με τα ίδια σιτηρέσια. Ο μικροβιακός πληθυσμός αυξήθηκε από 0-4 ώρες μετά το τάισμα και στα δύο είδη ζώων τα αποτελέσματα απέδειξαν μια αύξηση των αναερόβιων μυκήτων *R albus* και *F succinogenes* μεταξύ 0-4 ώρες μετά το τάισμα, ενώ τα *R flabefaciens* βρέθηκαν χωρίς καμία αλλαγή. Τα ζώα που διατρέφονταν με το σιτηρέσιο ULTS είχαν υψηλότερο βακτηριακό πληθυσμό από εκείνα που μετείχαν στην ομάδα με RS σιτηρέσια. Οι Koike και Kabayashi (2001) και οι Kongmun *et al.*, (2010) ανακάλυψαν ότι τα *F succinogenes* ήταν περισσότερα απ' ότι τα *R albus* και *R flabefaciens* στα πρόβατα και βουβάλια. Οι παραλλαγές μεταξύ των βοοειδών και των βουβαλιών σε ποσοστό και αριθμό σε βακτήρια και μύκητες επηρεάζεται από τις διαφορές στην πρόσληψη της τροφής και την πέψη.

5. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ-ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΦΥΤΩΝ ΩΣ ΠΡΟΣΘΕΤΟ ΣΤΗ ΖΩΟΤΡΟΦΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΩΝ ΜΗΡΥΚΑΣΤΙΚΩΝ

5.1 Αρωματικά φυτά

Τα αρωματικά φυτά γνωστά και ως βότανα χρησιμοποιούνταν στην Μέση Ανατολή περίπου από το 5000πΧ. για τις θεραπευτικές τους ιδιότητες αλλά και για την ενίσχυση του αρώματος και της γεύσης στην μαγειρική (Li, 2006). Η χρήση των αιθέριων ελαίων συνεχίζεται αδιαλείπτως ακόμα και σήμερα και σύμφωνα με τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας το 80% της παγκόσμιας παραγωγής τους χρησιμοποιείται στην φαρμακοβιομηχανία με σκοπό την θεραπεία διαφόρων νοσημάτων (Guribfä Kim, 2006), ταυτόχρονα η χρήση τους εξαπλώνεται και στην παραγωγή αρωμάτων, καλλυντικών στην βιομηχανία τροφίμων, στην σαπωνοποιία, στην ποτοποιία, στην ζαχαροπλαστική και σε πολλές άλλες εφαρμογές (Σκουμπής, 1985). Ωστόσο αξίζει να αναφέρουμε ότι όλα τα αρωματικά φυτά είναι φαρμακευτικά όμως όλα δεν είναι αρωματικά όπως η μελεντόνα, το βαλσαμόχορτο κλπ. Τα αρωματικά φυτά μπορούν να συμπεριληφθούν στην διατροφή των μηρυκαστικών για την βελτίωση τόσο της παραγωγικότητας όσο και της ποιότητας των παραγόμενων προϊόντων. Λόγω αυτών των φυσικών πρόσθετων τα αρωματικά φυτά, τα εκχυλίσματά τους και τα αιθέρια έλαια τους έχουν μελετηθεί ως προς τα πλεονεκτήματά τους σε σχέση με τα αντιβιοτικά ως αυξητικοί παράγοντες. Γενικότερα είναι ελεύθερα καταλοίπων και γενικά αναγνωρίζονται ως ασφαλή (Brenes and Roura, 2010).

Τα αρωματικά φυτά καλλιεργούνται κυρίως για τα αιθέρια έλαια ή τις ξηρές δρόγες (Σκουμπής, 1985), συναντώνται είτε αυτοφυή είτε σε εντατικές καλλιέργειες όπως το δενδρολίβανο, η ρίγανη, το φασκόμηλο το θυμάρι κλπ (Negi, 2012). Ορισμένες βιοδραστικές ενώσεις παρουσιάζουν θεραπευτικές ιδιότητες, αντιοξειδωτικές και αντισηπτικές (Li, 2006), μειώνουν τον κίνδυνο καρκίνου ή καρδιαγγειακών παθήσεων και βοηθούν στη θεραπεία ευρέου φάσματος ασθενειών όπως αναπνευστικές, στομαχικές ή επιληπτικές διαταραχές (Kadri *et al*, 2011). Οι βιοδραστικές ενώσεις των αρωματικών φυτών έχουν την ικανότητα να προστατεύουν

το σώμα από βλάβες που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες όπως το οξειδωτικό στρες (Couladis *et al*, 2003).

Πίνακας 7: Συνηθισμένα αρωματικά φυτά, τα κύρια συστατικά και οι δράσεις τους, Frankic *et al.*, 2009.

Αρωματικό φυτό	Χρησιμοποιούμενο φυτικό μέρος	Κύριο ενεργό συστατικό	Δράσεις
Μοσχοκάρυδο	Σπέρματα	Σαβινένιο	Διεγερτικό πέψης, αντιμετώπιση διαρροιών
Κανέλλα	Φλοιός	Κιναμάλδευδη	Διεγερτικό όρεξης και πέψης Αντισηπτικό
Γαρίφαλλο	Άνθη	Ευγενόλη	Διεγερτικό όρεξης και πέψης Αντισηπτικό
Κάρδαμο	Σπέρματα	Κινεόλη	Διεγερτικό όρεξης και πέψης
Κόλιανδρο	Σπέρματα, Φύλλα	Λιναλοόλη	Διεγερτικό πέψης
Κύμινο	Σπέρματα	Κυμιναλδεύδη	Διεγερτικό πέψης Μείωση τυμπανισμού
Γλυκάνισο	Καρπός	Ανηθόλη	Διεγερτικό πέψης
Σέλινο	Καρπός, Φύλλα	Φθαλίδη	Διεγερτικό όρεξης και πέψης
Μαϊτανός	Φύλλα	Απιόλη	Διεγερτικό όρεξης και πέψης, αντισηπτικό
Κόκκινο πιπέρι	Καρπός	Καψαΐνη	Διεγερτικό πέψης
Πιπέρι	Καρπός	Πιτερίνη	Διεγερτικό πέψης
Πιπερόριζα	Ρίζες	Τζιντζερόνη	Διέγερση στομάχου
Σκόρδο	Βολβός	Αλλισίνη, Αλλυλικά δισφουλφίδια και τρισφουλφίδια, Διαλλυλικά δισφουλφίδια και τρισφουλφίδια	Διεγερτικό πέψης, Αντισηπτικό
Δενδρολίβανο	Φύλλα	Κινεόλη	Διεγερτικό πέψης, Αντισηπτικό
Θυμάρι	Όλα τα μέρη	Θυμόλη	Διεγερτικό πέψης, Αντισηπτικό, Αντιοξειδωτικό
Φασκόμηλο	Φύλλα	Κινεόλη	Διεγερτικό πέψης, Αντισηπτικό, Αντιοξειδωτικό
Δάφνη	Φύλλα	Κινεόλη	Διεγερτικό όρεξης και πέψης, Αντισηπτικό

Η ήπειρος, στην οποία και παράγονται τα περισσότερα αρωματικά φυτά είναι η Ασία. Στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης ευδοκimoύν περίπου 200 είδη αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών. Η Ελλάδα, όπως και οι υπόλοιπες χώρες στη λεκάνη της Μεσογείου, έχει μεγάλη ποικιλία αρωματικών και φαρμακευτικών ειδών και επιπλέον, ιδανικές κλιματολογικές και εδαφολογικές συνθήκες για την καλλιέργεια των περισσότερων από αυτά. Ωστόσο, ο αριθμός των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών που καλλιεργούνται στη χώρα μας, θεωρείται εξαιρετικά περιορισμένος, με αποτέλεσμα πολλά από αυτά να εισάγονται.

Ειδικότερα, σύμφωνα με στοιχεία του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων (2007), οι καλλιεργούμενες εκτάσεις (16.000-21.000 στρέμματα) με αρωματικά φυτά στην Ελλάδα αντιστοιχούν στο 2,26 %, των συνολικά καλλιεργούμενων εκτάσεων και η ετήσια παραγωγή εκτιμάται σε 1.500-1.800 τόνους. Οι κυριότερες περιοχές καλλιέργειας αρωματικών φυτών στη χώρα μας είναι η περιοχή της Μακεδονίας, της Θεσσαλίας, της Θράκης, της Βοιωτίας, την Εύβοιας, της Λέσβου και της Κρήτης.

Πίνακας 8: Κύρια Α/Φ φυτά που καλλιεργούνται ή συλλέγονται από αυτοφυείς πληθυσμούς της Ελλάδας, Δρ. Ελένη Μαλούπα *et al.*, Καλλιέργεια, Μεταποίηση και διασφάλιση ποιότητας των Ελληνικών αρωματικών φυτών.

Επιστημονική ονομασία	Κοινή ονομασία
<i>Coriandrum sativum</i> (Καλλιεργούμενο)	Κόλιανδρο
<i>Crocus sativus</i> (Καλλιεργούμενο)	Ζαφορά, κρίκος
<i>Cuminum cyminum</i> (Καλλιεργούμενο)	Κίμινο
<i>Foeniculum vulgare</i> (Καλλιεργούμενο)	Μάραθο
<i>Humulus lupulus</i> (Καλλιεργούμενο)	Λυκίσκος
<i>Laurus nobilis</i> (Αυτοφύες)	Δάφνη
<i>Lavandula angustifolia</i> (Καλλιεργούμενο)	Λεβάντα
<i>Matricaria recutita</i> (Καλ/νο, αυτοφύες)	Χαμομήλι
<i>Melissa officinalis</i> (Καλλιεργούμενο)	Μέλισσα φαρμακευτική
<i>Mentha spp.</i> (Καλλιεργούμενο, αυτοφύες)	Μέντα, δυόσμος
<i>Ocimum basilicum</i> (Καλλιεργούμενο)	Βασιλικός
<i>Origanum dictamnus</i> (Καλ/νο, αυτοφύες)	Δίκταμος
<i>Origanum vulgare</i> (Καλ/νο, αυτοφύες)	Ρίγανη
<i>Pimpinella anisum</i> (Καλλιεργούμενο)	Γλυκάνισο
<i>Pistacia lentiscus</i> (Καλλιεργούμενο)	Μαστίχα
<i>Salvia fruticosa</i> (αυτοφύες)	Φασκόμηλο
<i>Sideritis spp.</i> (Καλλιεργούμενο, αυτοφύες)	Τσάι του βουνού
<i>Thymus capitatus</i> (αυτοφύες)	Θυμάρι

Τις τελευταίες δεκαετίες, παρατηρείται ένα διεθνές ενδιαφέρον για τα αρωματικά φυτά και τα βότανα, στα πλαίσια μιας γενικότερης μεταστροφής των καταναλωτών για κατανάλωση περισσότερο φυσικών προϊόντων, χωρίς φυτοφάρμακα, συντηρητικά, αντιβιοτικά και ορμόνες. Είναι γεγονός ότι, τα αρωματικά φυτά είναι πολύ ανθεκτικά στις ασθένειες, καλά προσαρμοσμένα στις ιδιαίτερες ξηροθερμικές συνθήκες της πατρίδας μας και έχουν ελάχιστες απαιτήσεις σε θρεπτικά συστατικά και νερό. Αυτό σημαίνει ότι μπορούν να καλλιεργηθούν σε ορεινές και ημιορεινές περιοχές, σε εδάφη με υφάλμυρα νερά ή εξαντλημένα από την υπερβολική χρήση, αντικαθιστώντας προβληματικές καλλιέργειες, όπως είναι ο καπνός. Επιπλέον, πέραν της ανθρώπινης χρήσης, τμήματα των αρωματικών φυτών μπορούν να χρησιμοποιηθούν και στην διατροφή των αγροτικών ζώων, όπως αποδεικνύεται από ένα σχετικά ικανό αριθμό ερευνητικών εργασιών.

Τα αρωματικά φυτά χρησιμοποιήθηκαν από την αρχαιότητα για την αντιμετώπιση ασθενειών, αλλά και για την βελτίωση των οργανοληπτικών ιδιοτήτων των τροφών και την επιμήκυνση της περιόδου συντήρησης τους (Shahidi *et al.*,

1992). Τα εκχυλίσματα πολλών αρωματικών φυτών εμφανίζουν αποδεδειγμένα σημαντικές αντιβακτηριακές (Cutter, 2000), αντιμυκητιακές (Sivropoulou *et al.*, 1996) και αντιοξειδωτικές (Economou *et al.*, 1991; Man and Jaswir, 2000; Botsoglou *et al.*, 2003) ιδιότητες και διεγείρουν το ενδοκρινολογικό και ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού των ανθρώπων και των ζώων, επιταχύνοντας το ρυθμό μεταβολισμού.

Στην κατηγορία των αρωματικών φυτών συμπεριλαμβάνονται το θυμάρι, η κανέλα, η δάφνη, το γαρύφαλλο, το πικραμύγδαλο, το αρωματικό πιπέρι, η μαντζουράνα,, η αγγελική, το μοσχοκάρυδο, το σκόρδο, η δάφνη, το φασκόμηλο, το δενδρολίβανο, η ρίγανη κ.α.

5.2 Αιθέρια έλαια

Τα αιθέρια έλαια, χρησιμοποιούνται κυρίως από την βιομηχανία τροφίμων και έπειτα από τις φαρμακοβιομηχανίες (Urdang, 1948). Οι αρωματικές ενώσεις από τις οποίες αποτελείται είναι σε μεγάλο βαθμό πτητικές, συνήθως εξάγοντα με απόσταξη με ατμό ή με εκχύλιση με διαλύτη (Greatehead, 2003). Έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερα από 30.000 αιθέρια έλαια, εκ των οποίων χρησιμοποιούνται μόνο τα 300 για εμπορικούς λόγους. Τα αιθέρια έλαια εξάγονται από αρκετά μέρη του φυτού, συμπεριλαμβανομένων των φύλλων, των ανθών, των στελεχών, των σπόρων, των ριζών και των βλαστών. Η σύνθεση του ελαίου μπορεί να ποικίλει μεταξύ των διαφορετικών τμημάτων του ίδιου φυτού (Dortman and Deans, 2000). Για παράδειγμα, το αιθέριο έλαιο που λαμβάνεται από τους σπόρους του κόλιανδρου έχει διαφορετική σύνθεση από το αιθέριο έλαιο του κόλιανδρου που λαμβάνεται από τα φύλλα του ίδιου φυτού (Dalaquis *et al.*, 2002). Χημικές διαφορές μεταξύ των αιθέριων ελαίων που προέρχονται από μεμονωμένα φυτά ή από διαφορετικές ποικιλίες φυτών υπάρχουν και αποδίδονται σε γενετικά καθορισμένες ιδιότητες (Cosentino *et al.*, 1999). Η χημική σύσταση των αιθέριων ελαίων αλλά και η παραγόμενη ποσότητα επηρεάζονται από τους εξής παράγοντες:

- 1) Το είδος και το υποείδος του αρωματικού φυτού,
- 2) Τα γεωγραφικά χαρακτηριστικά της τοποθεσίας,
- 3) Οι εποχικές διακυμάνσεις,

- 4) Οι κλιματικές συνθήκες,
- 5) Η εποχή και το στάδιο ανάπτυξης του φυτού κατά την συλλογή,
- 6) Το φυτικό μέρος, και τέλος
- 7) Η μέθοδο παραλαβής (Cosentino *et al*, 1999).

Η περιεκτικότητα σε αιθέριο έλαιο είναι μέγιστη στην αρχή της άνθησης και κατά την διάρκεια της (Marino *et al*, 1999)

Τα αιθέρια έλαια αποτελούν τους δευτερογενείς μεταβολίτες των αρωματικών φυτών (Patra and Saxena, 2010). Κατατάσσονται σε δύο κατηγορίες τα τερπένια και φαινυλ-προπένιου. Τα τερπένια αποτελούνται από μονάδες ισοπρενίου με χημικό τύπο $(C_5H_8)_n$ όπου n ο αριθμός των μονάδων ισοπρενίου. Για $n=2$ ονομάζεται μονοτερπένιο, για $n=3$ ονομάζεται σεσκιτερπένιο, ενώ για μεγαλύτερες τιμές το αιθέριο έλαιο ονομάζεται πολυτερπένιο.

Τα τερπενοειδή, απαντώνται σε μεγάλη αφθονία σε πλήθος αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών (Gershenzon and Croteau, 1991). Μεταξύ των τερπενοειδών, τα συχνότερο στα αιθέρια έλαια των φυτών ανήκουν στα monoterpenoids (μονοτερπένια) και στα sesquiterpenoids (σεσκιτερπενοειδή) (Gershenzon and Croteau, 1991; Calsamiglia *et al.*, 2007).

Τα φαινυλοπροπανοειδή διαθέτουν μια πλευρική αλυσίδα με 3 άτομα άνθρακα, τα οποία δεσμεύονται σε έναν αρωματικό δακτύλιο των C_6 (Calsamiglia *et al.*, 2007) και απαντούν κατά κανόνα λιγότερο συχνά στην φύση λόγω χάρη η trans-anethole στο γλυκάνισο και η κινναμαλδεύδη στην κανέλα, σε σύγκριση με τα τερπενοειδή.

Η κανέλα, η μέντα, η δάφνη και το κάρδαμο έχει αποδειχθεί ότι διεγείρουν την όρεξη (Loo and Richard, 1992). Σε διάφορα πεπράματα που έχουν πραγματοποιηθεί έχει αποδειχθεί ότι τα ζώα παρουσιάζουν προτιμήσεις σε διάφορα αιθέρια έλαια. Προκειμένου να αυξηθεί η κατανάλωση της τροφής και οι αγωνιστικές αποδόσεις των αγωνιστικών αλόγων εμπλουτίζεται το σιτηρέσιό τους με έλαιο σκόρδου.

Τα αιθέρια έλαια αλλά και τα αρωματικά φυτά παρουσιάζουν διάφορες ιδιότητες μερικές από τις οποίες είναι οι εξής:

1) αντιμικροβιακή δράση:

Τα αρωματικά φυτά χαρακτηρίζονται ως μικροβιοκτόνα ορισμένων παθογόνων μικροοργανισμών όπως *Pasteurella multocida*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, κ.α.. Η δράση τους εξαρτάται από την χημική σύσταση του αιθέριου ελαίου. Τα Gram + βακτήρια είναι πιο ευαίσθητα από τα Gram - (Lambert *et al.*, 2009). Αυτό οφείλεται στο ότι η κυτταρική μεμβράνη των Gram - έχει μικρότερο μέγεθος, είναι υδρόφιλη και χαρακτηρίζεται από μικρότερη διαπερατότητα στα αιθέρια έλαια (Calsamiglia *et al.*, 2007). Τα αιθέρια έλαια έχουν τη δυνατότητα να αποσυνθέτουν τις δομές των κυτταρικών μεμβρανών και έτσι να απελευθερώνονται ιόντα του κυτταροπλάσματος με αποτέλεσμα την λύση του παθογόνου βακτηρίου (Windisch W. *et al*, 2008).

Άλλοι ερευνητές απέδειξαν ότι η αντιμικροβιακή δράση των αιθέριων ελαίων οφείλεται στην αλληλεπίδραση των φαινολικών ομάδων με το κυτταρικό μικροβιακό φορτίο (Lahlou, 2004). Τέτοια παραδείγματα αποτελούν η καρβακρόλη, η θυμόλη και η ευγενόλη.

Τα αιθέρια έλαια έχουν την δυνατότητα να επηρεάσουν την διαπερατότητα και άλλων βιολογικών μεμβρανών πχ των μιτοχονδρίων και να προκαλέσουν απώλεια μεταβολιτών, πήξη του μικροβιακού κυτταροπλάσματος, να προκαλέσουν βλάβες σε πρωτεΐνες και λιπίδια και τελικά να προκαλέσουν λύση του βακτηριακού κυττάρου (Bakkari *et al*, 2008). Η τοξικότητα των αιθέριων ελαίων στα κύτταρα των θηλαστικών προκαλείται από πρόκληση απόπτωσης ή νέκρωσης (Bakkari *et al.*, 2008).

Τα αιθέρια έλαια μπορούν να ενσωματωθούν σε ζωικά προϊόντα λόγω του ευρέους αντιμικροβιακού φάσματος, προκειμένου να μειώσουν το μικροβιακό φορτίο και να καταστείλουν την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών.

2) Αντιμυκητιακή δράση:

Τα αιθέρια έλαια χαρακτηρίζονται από μυκητοκτόνο δράση (Ahmet *et al.*, 2005) και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την θεραπεία ασθενειών που προκαλούνται από μύκητες τόσο σε φυτά (Hossain *et al.*, 2008) όσο και σε ζώα και ανθρώπους (Cavaleiro *et al.*, 2006)

Τα αιθέρια έλαια αναστέλλουν την διαπνοή των μυκητιακών κυττάρων (Carson *et al.*, 2006) και προκαλούν αλλαγές στην ρευστότητα και την διαπερατότητα

της κυτταρικής μεμβράνης (Hammer *et al.*, 2004). Προκαλούν αποκόλληση της κυτταρικής μεμβράνης από το κυτταρικό τοίχωμα, αποδιοργάνωση των ενδοκυτταρικών οργανιδίων, απώλεια κυτταροπλάσματος, πλήρη αποδόμηση των υφών (Tolouee *et al.*, 2010) και αναστολή της σύνθεσης εργοστερόλης από τους μύκητες (Pauli, 2006).

3) Αντικτική δράση:

Τα αιθέρια έλαια χαρακτηρίζονται από αντικτικές δράσεις τέτοια είναι τα έλαια που προέρχονται από το μάραθο, το θυμάρι, η μέντα, το δενδρολίβανο κα (Reichling *et al.*, 2009). Οι ελεύθεροι ιοί είναι ευαίσθητοι στα αιθέρια έλαια τα οποία τροποποιούν τον ιικό φάκελο ή καλύπτουν τα ιικά συστατικά τα οποία είναι απαραίτητα για την προσκόλληση και απορρόφηση στα κύτταρα στόχους.

4) Αντιπρωτοζωική δράση:

Σε πείραμα παρατηρήθηκε ανασταλτική δράση του πρωτόζωου *Leishmania infantum* (Machado *et al.*, 2010). Μπορούν να χρησιμοποιηθούν για νέους θεραπευτικούς παράγοντες κατά των ασθενειών που προκαλούνται από τα πρωτόζωα.

5) Αντιοξειδωτική δράση:

Τα αιθέρια έλαια αντιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες και μέσω της ενεργοποίησης των αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως η δεσμουτάση του υπεροξειδίου, η καταλάση, η υπεροξειδάση και η ρεδοκτάση δρουν αντιοξειδωτικά (Frankic *et al.*, 2009). Τα φαινολικά τερπένια είναι αυτά στα οποία τα αιθέρια έλαια οφείλουν τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Η ρίγανη, το θυμάρι, το φασκόμηλο, το δενδρολίβανο, το χαμομήλι και το πράσινο τσάι είναι μερικά από τα αρωματικά φυτά που είναι πλούσια σε φαινολικά τερπένια, με τις περισσότερες μελέτες να έχουν πραγματοποιηθεί στο δενδρολίβανο (Yanishlieva *et al.*, 2006). Τα τελευταία χρόνια πραγματοποιούνται μελέτες στο φασκόμηλο και την ρίγανη για την αντιοξειδωτική τους δράση.

Ενώσεις όπως τα φλαβονοειδή, υδροδιαλυτές ταννίνες, προανθοκυανιδίνες, φαινολικά οξέα και βιταμίνες έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Frankic *et al.*, 2009).

Τα αρωματικά φυτά λόγω των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων μπορούν να ενσωματωθούν σε τρόφιμα προκειμένου να τα προστατεύσουν κατά την αποθήκευσή τους και κυρίως τα λιπίδια τα οποία όταν οξειδωθούν δίνουν ανεπιθύμητες οσμές και γεύσεις στα προϊόντα (Yanishlieva *et al.*, 2006). Τα φυτά τα οποία χρησιμοποιούνται

στις μέρες μας είναι το δενδρολίβανο (*Rosmarinus officinali*), ο βασιλικός (*Ocimum basilicum*) και το θυμάρι (*Thymus vulgaris*) (Seung-Joo *et al.*, 2005).

6) Αντιφλεγμονώδης δράση:

Τα αιθέρια έλαια με αντιφλεγμονώδη δράση είναι τα τερπένια και οφείλουν αυτήν την ιδιότητα στην λιπόφιλη φύση τους. Ενσωματώνονται στην κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος που παράγουν ισταμίνη μπλοκάροντας με αυτό τον τρόπο τις λειτουργικές πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα την καταστολή τους (Lahlou, 2004). Τα αιθέρια έλαια μειώνουν την παραγωγή προσταγλαδινών που σχετίζονται με τις φλεγμονές (Sirivasan, 2005, Santos and Rao, 2000).

7) Εντομοαπωθητική, εντομοκτόνος δράση, εντομοελκυστική δράση:

Έχει βρεθεί ότι η καρβακρόλη και η θυμόλη έχουν την πιο ισχυρή τοξική δράση απέναντι σε προνύμφες και ενήλικα έντομα, όπως το *Culex pipiens molestus* (Traboulsi A. F. *et al.*, 2002).

8) Αντικαρκινική δράση

Τα αιθέρια έλαια χαρακτηρίζονται από αντικαρκινική δράση. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω αναστολής της αγγειογένεσης η οποία αποδίδεται στην αναστολή της δράσης των μεταλλοπρωτεϊνών (Chen *et al.*, 2010). Ένα πολύτιμο φυσικό αντικαρκινικό συστατικό αποτελεί το λεμονένιο (Grabman, 2005). Όμως η χορήγηση αιθέριων ελαίων πρέπει να αποφεύγεται κατά την κυοφορία αφού κατά την ανάπτυξη του ενδομητρίου και του πλακούντα η αγγειογένεση είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες (Rowe *et al.*, 2004).

Άλλος μηχανισμός δράσης της αντικαρκινικής ιδιότητας είναι η πρόκληση απόπτωσης στα καρκινικά κύτταρα (Lai *et al.*, 2004). Αξίζει να αναφέρουμε ότι η θυμόλη και η καρβακρόλη προστατεύουν την δράση στο DNA απέναντι σε μεταλλαξιογόνους παράγοντες (Vicuna *et al.*, 2009). Τα αιθέρια έλαια δεν προκαλούν μεταλλάξεις σε κανένα είδος εντόμου, βακτηρίου ή μύκητα (Bakkali *et al.*, 2008).

Η μεθυλική ευγενόλη του φυτού *Laurus nobilis* και *Melaleuca leucadendron* (Burkey *et al.*, 2000), η εστραγόλη που εντοπίζεται στο αιθέριο έλαιο του βασιλικού

και της αρτεμισίας (Antithony *et al.*, 1987) η πολυγόνη της μέντας, η μεθυλική τσαβικόλη και το D-λεμονένιο χαρακτηρίζονται από καρκινική δράση μετά από μακροχρόνια κατανάλωσή τους.

9) Αντιπαρασιτική δράση:

Έχει αποδειχθεί ότι τα αιθέρια έλαια έχουν ανθελμινθικές ιδιότητες. Το αιθέριο έλαιο του φυτού *Lippia sidoides* προκαλεί υψηλή θνησιμότητα των νηματωδών σκωλήκων στα πρόβατα (Camurca-Vasconelos *et al.*, 2008). Η ολόένα και αυξανόμενη ανθεκτικότητα των νηματωδών σκωλήκων στα φαρμακευτικά σκευάσματα λόγω της αλόγιστης χρήσης τους απαιτεί την χρήση των αιθέριων ελαίων για την αντιμετώπισή τους (Melo *et al.*, 2003).

10) Ακαρεοκτόνος δράση

Το αιθέριο έλαιο της ρίγανης, του θυμαριού, της λεβάντας και της μέντας προκαλούν πλήρη θνησιμότητα του *Tetranychus cinnabarinus* σε συγκεντρώσεις που δεν είναι τοξικές για το φυτό ξενιστή (Sertaya *et al.*, 2010).

11) Αυξητική δράση

Τα αιθέρια έλαια του σκόρδου και του μοσχοκάρυδου ευνοούν την ανάπτυξη του ενώ ταυτόχρονα αυξάνουν την ικανότητα του μικροοργανισμού να ζυμώνει τη γλυκόζη (Nes and Skejelkvale, 1982). Η αυξητική αυτή δράση μπορεί να χρησιμοποιηθεί προκειμένου να τροποποιηθούν τα ζυμωτικά φαινόμενα των προστομάχων των μηρυκαστικών όπως λόγου χάρη ενισχύουν την ανάπτυξη των βακτηρίων που διασπούν τις ινώδεις ουσίες του σιτηρεσίου (Greathead, 2003).

Τέλος έχουν αναφερθεί μεταξύ των χαρακτηριστικών των αιθέριων ελαίων και τα εξής: αναλγητικές δράσεις, αντιαλλεργικές, ανοσοδιεγερτικές και νευρολογικές.

5.3 Σαπωνίνες

Οι σαπωνίνες είναι από τις πιο σημαντικές δραστικές ουσίες που βρίσκονται στα φυτικά εκχυλίσματα. Η απορρυπαντική δράση των σαπωνίνων σκοτώνει τα πρωτόζωα της μεγάλης κοιλίας. Αυτή η ευαισθησία των μαστιγοφόρων πρωτόζωων

έναντι των σαπωνίνων πιθανότατα αναμενόταν λόγω της παρουσίας της χοληστερόλης στα ευκαρυωτικά κύτταρα, αλλά όχι στα προκαρυωτικά βακτηριακά κύτταρα, καθώς οι σαπωνίνες εμφανίζουν συγγένεια με την χοληστερόλη (KLita *et al.*, 1996). Η καταστολή των πρωτόζων μπορεί να ενισχύσει την ροή των μικροβιακών πρωτεϊνών από την μεγάλη κοιλία, να αυξήσει την αποτελεσματικότητα της χρήσης της τροφής και να αυξήσει την διατροφή των ζώων, υπό την προϋπόθεση ότι η απώλεια των πρωτόζων δεν θα επηρεάζει τη διάσπαση των φυτικών ινών (Newbold *et al.*, 1997). Η τελική επίδραση των σαπωνίνων που περιέχονται στα φυτικά συστατικά αυξάνει την ζωική παραγωγή όπως παρατηρήθηκε έναντι της χορήγησης αντιβιοτικών ή άλλων χημικών ουσιών (Sultana *et al.*, 2012). Τα αποτελέσματα ερευνών αποδεικνύουν ότι οι σαπωνίνες έχουν ισχυρές αντιπρωτοζωικές ιδιότητες και πιθανόν αποτελούν έναν εναλλακτικό τρόπο αντί των αντιβιοτικών ή των αυξητικών ορμονών που χρησιμοποιούνται στην διατροφή των μηρυκαστικών.

Οι σαπωνίνες είναι μια ομάδα φυσικών ενώσεων που έχουν ιδιότητες παρόμοιες με τα σαπούνια και τα απορρυπαντικά. Είναι πολύπλοκα και χημικής διαφορετικές ενώσεις, κυρίως φυτικής προέλευσης, που μπορούν επίσης να εντοπιστούν και σε ζώα. Τα φυσιολογικά τους χαρακτηριστικά είναι τόσο διαφορετικά όσο οι χημικές τους δομές και ιδιότητες. Έχουν ένα μεγάλο αριθμό φυσιολογικών χαρακτηριστικών ιδιοτήτων που περιλαμβάνουν πικρή γεύση, σχηματισμό αφρού σε υδατικό διάλυμα, αιμόλυση των ερυθρών αιμοσφαιρίων και είναι τοξικά για τα ψάρια, τα σαλιγκάρια και τα έντομα. Τέλος αλληλεπιδρούν με χολικά οξέα την χοληστερόλη σε υδατικό ή αλκοολικό διάλυμα για το σχηματισμό μυκυλίων (Cheeke, 1995).

5.5 Αιθέρια έλαια στη μεγάλη κοιλία

Στη δεκαετία του '60 για πρώτη φορά δίνεται η δυνατότητα χρησιμοποίησης των αιθέριων ελαίων στο σιτηρέσιο των μηρυκαστικών (Borchers 1965; Oh *et al.*, 1967 & 1968; Nagy and Tendergy, 1968). Στις αρχές της δεκαετίας του '70, εγκρίνεται η χρησιμοποίηση των αντιβιοτικών στο σιτηρέσιο των ζώων, με αποτέλεσμα λίγοι μόνο επιστήμονες να ασχοληθούν ερευνητικά με το θέμα αυτό (Broderick and Balthrop, 1979). Μετά την απαγόρευση της χρησιμοποίησης των αντιβιοτικών η χρησιμοποίηση των αιθέριων ελαίων επανέκτησε και πάλι ερευνητικό

ενδιαφέρον με σκοπό την μετατροπή της πορείας των μικροβιακών ζυμώσεων στο περιβάλλον των προστομάχων των μηρυκαστικών.

Απώλειες ενέργειας και αζώτου παρατηρούνται κατά την διάρκεια των ζυμώσεων των εξοζών και των αμινοξέων στη μεγάλη κοιλία. Στην πραγματικότητα ένα ποσοστό 8-12% της πεπτής ενέργειας χάνεται στα μηρυκαστικά ζώα με τη μορφή μεθανίου, ενώ το 75-85% της συνολικού αζώτου που καταναλώνεται από τις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής, αποβάλλεται με τα κόπρανα και τα ούρα (Tamminga, 1992).

Η χρησιμοποίηση διαφόρων προσθετικών ουσιών, όπως είναι τα αντιβιοτικά, για την τροποποίηση της μικροβιακής ζύμωσης στη μεγάλη κοιλία με αντικειμενικό σκοπό τη μείωση της παραγωγής μεθανίου και αμμωνιακού αζώτου, έφερε θετικά αποτελέσματα στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής (McGuffey *et al.*, 2001). Παρόλα αυτά, η παρουσία καταλοίπων στο γάλα από την ευρεία χρήση των αντιβιοτικών ως προσθετικές ουσίες στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής απαγορεύτηκε στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Russel and Houlihan, 2003).

Εξαιτίας του γεγονότος αυτού, υπάρχει αυξημένο ενδιαφέρον για τη χρησιμοποίηση εναλλακτικών φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών, όπως είναι τα εκχυλίσματα των φυτών, τα οποία σε γενικές γραμμές θεωρούνται ως ασφαλείς τροφές για ανθρώπινη κατανάλωση (FDA, 2004) με σκοπό την τροποποίηση της διαδικασίας των μικροβιακών ζυμώσεων που λαμβάνουν χώρα στο περιβάλλον της μεγάλης κοιλίας.

Η δυσάρεστη γεύση των αιθέριων ελαίων ορισμένων φυτών με αποτέλεσμα την μη κατανάλωσή τους από τα μηρυκαστικά ζώα στάθηκε η αφορμή για τις πρώτες ερευνητικές εργασίες σχετικά με τις επιδράσεις των αιθέριων ελαίων στο περιβάλλον της μεγάλης κοιλίας (Oh *et al.*, 1968).

Η απαγόρευση της χρήσης των αντιβιοτικών ουσιών ως αυξητικών παραγόντων στη διατροφή των ζώων, τις τελευταίες δεκαετίες και ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια, οδήγησε τις έρευνες να επικεντρωθούν στις δυνατότητες ενσωμάτωσης των αρωματικών ελαίων ως προσθετικών ουσιών στο σιτηρέσιο, έτσι ώστε να αξιοποιηθούν οι αποδεδειγμένες ισχυρές αντιμικροβιακές τους ιδιότητες.

5.6 Επιδράσεις αιθέριων ελαίων επί των βακτηρίων της μεγάλης κοιλίας

Η εξειδικευμένη δράση ορισμένων κατηγοριών βακτηρίων, περιορίζεται ή και αναστέλλεται σημαντικά από την παρουσία των αιθέριων ελαίων στο περιβάλλον της μεγάλης κοιλίας, με αποτέλεσμα τον περιορισμό της διαδικασίας απαμίνωσης των αμινοξέων και φυσικά, σημαντικό όφελος για τον οργανισμό του μηρυκαστικού ζώου (Wallace, 2004; Patra and Saxena, 2009b).

Οι McInotch *et al.*, (2003), παρατήρησαν ότι η προσθήκη μίγματος αιθέριων ελαίων στο σιτηρέσιο των μηρυκαστικών ανέστειλε σημαντικά την ανάπτυξη των βακτηρίων *Clostridium sticklandii* και *Peptostreptococcus anaerobius*, των οποίων η δράση σχετίζεται με την υπέρ- παραγωγή αμμωνίας στο περιβάλλον της μεγάλης κοιλίας, ενώ δεν κατάφερε να περιορίσει την δραστηριότητα άλλων κατηγοριών βακτηρίων όπως για παράδειγμα των *Clostridium aminophilus*.

Με βάση παρόμοια αποτελέσματα το είδος και η σύνθεση της τροφής επιδρούν σημαντικά στην ικανότητα επίδρασης των αιθέριων ελαίων στην ανάπτυξη και τη δραστηριότητα των βακτηρίων παραγωγής αμμωνίας στο περιβάλλον της μεγάλης κοιλίας. Έτσι, ο Wallace (2004) παρατήρησε ότι, η προσθήκη αιθέριων ελαίων (100mg/ημέρα) στο σιτηρέσιο προβάτων χαμηλής περιεκτικότητας σε ολικές πρωτεΐνες, περιορίζει σημαντικά (77%) τον αριθμό των βακτηρίων της μεγάλης κοιλίας με υψηλή παραγωγή αμμωνίας, αλλά η επίδραση αυτή δεν επιβεβαιώθηκε όταν το σιτηρέσιο χαμηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη υποκαταστάθηκε από σιτηρέσιο με υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη.

Είναι γενικά αποδεκτό ότι, η επίδραση επί των μικροβίων της μεγάλης κοιλίας είναι διαφορετική στις περιπτώσεις προσθήκης μεμονωμένων αιθέριων ελαίων σε σύγκριση με την προσθήκη μιγμάτων αιθέριων ελαίων. Οι μονοτερπνοειδείς υδρογονάνθρακες κατά κανόνα εμφανίζουν περιορισμένη τοξική δράση εναντίον των βακτηρίων της μεγάλης κοιλίας και σε ορισμένες περιπτώσεις η επίδραση τους καθίσταται διεγερτική, σε αντίθεση με τις αντίστοιχες οξυγονούχες ενώσεις, τις μονοτερπνοειδείς αλκοόλες και τις αλδεύδες (Oh *et al.*, 1967, 1968).

Τα βακτήρια της μεγάλης κοιλίας, των οποίων η δραστηριότητα συνδέεται με την παραγωγή υψηλών ποσοτήτων αμμωνίας, εμφανίζουν υψηλή ικανότητα παραγωγής αμμωνίας από την διάσπαση των αμινοξέων (Wallace *et al.*, 2002). Τα αιθέρια έλαια μπορούν επιλεκτικά να αναστείλουν τη δραστηριότητα των βακτηρίων με υψηλή ικανότητα παραγωγής αμμωνίας (ευαίσθητα στη δράση αιθέριων ελαίων),

χωρίς να επηρεάζουν τη δραστηριότητα των υπολοίπων βακτηρίων της μεγάλης κοιλίας, στις περιπτώσεις που η συγκέντρωσή τους στο περιβάλλον της μεγάλης κοιλίας είναι μικρή.

Πράγματι, οι Evans and Martin (2000) ανέφεραν ότι, η παρουσία της θυμόλης σε μικρές συγκεντρώσεις (90mg/λίτρο περιεχομένου) στο περιβάλλον της μεγάλης κοιλίας ανέστειλε επιλεκτικά την ανάπτυξη του βακτηρίου υψηλής παραγωγής αμμωνίας *Selenomonas ruminantium* αλλά όχι και των βακτηρίων *S. bovis*, αλλά όταν η συγκέντρωση της θυμόλης στη μεγάλη κοιλία ήταν υψηλή (400mg/λίτρο περιεχομένου), αναστάλθηκε ή έτεινε να ανασταλεί η δράση όλων των συμβιούντων μικροοργανισμών της μεγάλης κοιλίας.

Η παρουσία των αιθέρων ελαίων στη μεγάλη κοιλία είναι δυνατό να περιορίσει τη διάσπαση εύκολα αφομοιώσιμων θρεπτικών συστατικών της τροφής από τα αμυλολυτικά και πρωτεολυτικά βακτήρια, αλλά όχι και την διάσπαση των ινωδών ουσιών από τα κυτταρινολυτικά βακτήρια της μεγάλης κοιλίας (Wallace *et al.*, 2002), αν και σε ορισμένες ερευνητικές εργασίες (Patra *et al.*, 2010), διαπιστώθηκε ότι η παρουσία εκχυλισμάτων γαρίφαλου και μάραθου στο περιβάλλον της μεγάλης κοιλίας, περιόρισε σημαντικά την ενεργητικότητα των ενζύμων καρβοξυμεθυλο-κυτταρινάση και ξυλανάση και συνεπώς και τη διάσπαση των ινωδών ουσιών του σιτηρεσίου, πιθανά εξαιτίας της υψηλής συγκέντρωσης σε αιθέρια έλαια των εκχυλισμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στις εργασίες αυτές.

5.7 Επιδράσεις των αιθέρων ελαίων επί των πρωτόζωων της μεγάλης κοιλίας

Τα συμπεράσματα των ερευνητικών εργασιών σχετικά με τη δράση των αιθέρων ελαίων στη δραστηριότητα των πρωτόζωων της μεγάλης κοιλίας είναι αντιφατικά. Οι McInotch *et al.*, (2003) ανέφεραν μετά από έρευνες ότι, η προσθήκη μίγματος αιθέρων ελαίων (1g/ημέρα) στο σιτηρέσιο αγελάδων γαλακτοπαραγωγής, δεν επηρέασε σημαντικά τη δραστηριότητα του βλεφαριδοτού *Bacteriolytic* πρωτόζωου στο περιβάλλον της μεγάλης κοιλίας.

Ομοίως οι Newbold *et al.*, (2004) και Benchaar *et al.*, (2007a) ανέφεραν ότι, η δραστηριότητα των πρωτόζωων στο περιβάλλον της μεγάλης κοιλίας δεν επηρεάστηκε από την προσθήκη μίγματος αιθέρων ελαίων στο σιτηρέσιο προβάτων (110mg/ημέρα) και αγελάδων γαλακτοπαραγωγής (750mg/ημέρα).

Ανάλογα οι Fraser *et al.*, (2007) παρατήρησαν ότι η συγκέντρωση 0,5g κινναμυλοξιδίου ανά λίτρο υγρού περιεχομένου της μεγάλης κοιλίας αγελάδων γαλακτοπαραγωγής δεν είχε καμία επίδραση στον αριθμό των βλεφαριδωτών πρωτόζωων. Επίσης οι Patra *et al.*, (2010), προσθέτοντας στο σιτηρέσιο αγελάδων γαλακτοπαραγωγής εκχυλίσμα μάραθου, δεν διαπίστωσαν καμία σημαντική επίδραση στην εν γένει δραστηριότητα των πρωτόζωων της μεγάλης κοιλίας.

Αντίθετα ήταν τα αποτελέσματα των ερευνητικών εργασιών των Ando *et al.*, (2003), οι οποίοι παρατήρησαν ότι ο συνολικός αριθμός των πρωτόζωων και ο αριθμός των *Entodinium*, *Isotricha* και *Diplodinium* πρωτόζωων περιορίστηκε σημαντικά από την προσθήκη 200g/ημέρα μέντας (*Mentha piperita* L.) στο σιτηρέσιο αγελάδων Holstein. Επιπλέον παρατηρήθηκε ότι, η προσθήκη εκχυλίσματος γαρυφαλλίου στο σιτηρέσιο των αγελάδων είχε ως αποτέλεσμα τον περιορισμό του συνολικού αριθμού πρωτόζωων και του αριθμού των μικρών *entodiniomorphs* και *holotrichs* πρωτόζωων, αλλά δεν επηρέασε σημαντικά τον αριθμό των μεγάλων *entodiniomorphs* πρωτόζωων (Patra *et al.*, 2010).

Οι Cardozo *et al.*, (2006), παρατήρησαν μια σημαντική αύξηση στον αριθμό των *holotrichs* πρωτόζωων της μεγάλης κοιλίας, αλλά δεν παρατήρησαν καμία επίδραση στον αριθμό των *entodiniomorphs* πρωτόζωων κατά την χορήγηση κινναμυλοξιδίου (180mg/ημέρα) και ευγενόλης (90mg/ημέρα) στο σιτηρέσιο αγελάδων. Ωστόσο, παρόμοιες επιδράσεις στον αριθμό των συμβιούντων πρωτόζωων της μεγάλης κοιλίας, δεν παρατηρήθηκαν στις περυστώσεις αυξημένων ημερήσιων χορηγήσεων κινναμυλοξιδίου 600mg/ημέρα) και ευγενόλης (300mg/ημέρα).

Οι Yang *et al.*, (2010b), διαπίστωσαν επιπλέον ότι ο συνολικός αριθμός πρωτόζωων όπως επίσης και ο αριθμός των *Isotricha*, *Dasytricha* και *Entodinium sp* πρωτόζωων δεν επηρεάστηκε από την χορήγηση της κινναμυλοξιδίου σε υψηλές συγκεντρώσεις (0,4-1,6g/ημέρα) στο σιτηρέσιο βοοειδών. Αντίθετα, ο αριθμός των *holotrichs* και *entodiniomorphs* πρωτόζωων περιορίστηκε σημαντικά κατά την ημερήσια χορήγηση 2g εκχυλίσματος γλυκάνισου (περιέχει 100g/ kg ανεθόλη) στο σιτηρέσιο αγελάδων (Cardozo *et al.*, 2006).

Από το σύνολο των εργαστηριακών αναφορών προκύπτει αβίαστα το συμπέρασμα ότι η προσθήκη αιθέριων ελαίων στο σιτηρέσιο μηρυκαστικών ζώων δεν ασκεί καμία σημαντική επίδραση στον αριθμό και τη δραστηριότητα των βλεφαριδωτών πρωτόζωων στο περιβάλλον της μεγάλης κοιλίας.

5.8 Αιθέρια έλαια και πέψη στη μεγάλη κοιλία

Σε γενικές γραμμές θα μπορούσαμε να ισχυριστούμε ότι η παρουσία των αιθέριων ελαίων στο περιβάλλον της μεγάλης κοιλίας, συνδέεται με τον περιορισμό της διαδικασίας πέψης των πρωτεϊνών και του αμύλου και την αναστολή της αποικοδόμησης των αμινοξάνων, γεγονός το οποίο οφείλεται στην επιλεκτική δράση των αιθέριων ελαίων σε ορισμένες κατηγορίες συμβιωόντων βακτηρίων (Hart *et al.*, 2008).

Η δυνατότητα προσβολής των εύπεπτων υποστρωμάτων αμύλου από τους μικροοργανισμούς παρεμποδίζεται από την παρουσία αιθέριων ελαίων στην μεγάλη κοιλία των μηρυκαστικών αλλά και ταυτόχρονα η παρουσία τους αναστέλλει τη δράση σημαντικού αριθμού βακτηρίων, όπως τα βακτήρια τα οποία παράγουν υψηλές ποσότητες αμμωνίας, γεγονός το οποίο όπως ήδη αναφέρθηκε συμβάλλει στον περιορισμένο βαθμό απαμίνωσης των αμινοξάνων.

Σε πολλές έρευνες προέκυψε ότι η ύπαρξη των αιθέριων ελαίων στο περιβάλλον της μεγάλης κοιλίας των μηρυκαστικών δεν συνδέεται με τον περιορισμό της πεπτικότητας των θρεπτικών συστατικών της τροφής (Meyer *et al.*, 2009; Malecky *et al.* 2009; Santos *et al.*, 2010).

Οι Yang *et al.*, (2007) ανέφεραν ότι, η πεπτικότητα της ξηρής ουσίας του σιτηρεσίου στο περιβάλλον της μεγάλης κοιλίας αγελάδων γαλακτοπαραγωγής ήταν υψηλότερη (κατά 13%), όταν το σιτηρέσιο τους εμπλουτιζόταν με αιθέρια έλαια από *juniper berry* (2g/ημέρα) σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Η προσθήκη αυτή των αιθέριων ελαίων δεν επηρέασε την συνολική πεπτικότητα της ξηρής ουσίας στον πεπτικό σωλήνα, της οργανικής ουσίας, των ινωδών ουσιών και του αμύλου. Οι εν λόγω ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι, η βελτίωση στην πεπτικότητα της ξηρής ουσίας στη μεγάλη κοιλία, οφειλόνταν στη βελτίωση της πεπτικότητας των πρωτεϊνών (κατά 11%) σε σύγκριση με τους μάρτυρες.

Οι Malecky *et al.*, (2009) ανέφεραν ότι, η προσθήκη μίγματος μονοτερπενοειδών (45,2% linalool, 36,7% p-cymene, 16,0% α-pinene και 2.2% β-pinene) στο σιτηρέσιο αιγών γαλακτοπαραγωγής, δεν επηρέασε την πεπτικότητα των θρεπτικών ουσιών του σιτηρεσίου στο περιβάλλον της μεγάλης κοιλίας.

Οι Kozelov *et al.*, (2001), πρόσθεσαν ημερήσια ποσότητα 500mg από το εμπορικό προϊόν *ropadiar* (αιθέρια έλαια μαντζουράνας) στο σιτηρέσιο προβάτων και παρατήρησαν ότι η προσθήκη αυτή είχε ως αποτέλεσμα την υψηλότερη

συγκέντρωση πρωτεΐνης στο υγρό περιεχόμενο της μεγάλης κοιλίας, αλλά δεν επηρέασε σημαντικά την πεπτικότητα των υπολοίπων θρεπτικών συστατικών. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις αιθέριων ελαίων περιορίζουν την πεπτικότητα της ξηρής ουσίας και των ινωδών ουσιών στο περιβάλλον της μεγάλης κοιλίας (Beauchemin και McGinn, 2006; Yang *et al.*, 2010b).

5.9 Πτητικά λιπαρά οξέα

Η παρουσία των αιθέριων ελαίων γενικότερα ελάχιστα επηρεάζει τις συγκεντρώσεις των συνολικών πτητικών λιπαρών οξέων (ΠΛΟ) στο περιβάλλον της μεγάλης κοιλίας. (Chaves *et al.*, 2008a; Malecky *et al.*, 2009; Patra *et al.*, 2010) είτε μειώνονται (Macheboeuf *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2009), ειδικότερα σε υψηλότερες συγκεντρώσεις αιθέριων ελαίων.

Σε ορισμένες ερευνητικές εργασίες η προσθήκη cinnamaldehyde (0,2g/kg κατανάλωσης ξηρής ουσίας) (Chaves *et al.*, 2008b) είτε εκχυλίσματος ρίγανης (0,25g/kg κατανάλωσης ξηρής ουσίας) (Wang *et al.*, 2009), είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης των ΠΛΟ στο περιβάλλον της μεγάλης κοιλίας. Οι Castillejos *et al.*, (2005) παρατήρησαν σε εργαστηριακές συνθήκες ότι αυξήθηκε η συγκέντρωση των ΠΛΟ στο περιβάλλον της μεγάλης κοιλίας μετά τη προσθήκη μίγματος αιθέριων ελαίων (1,5mg/λίτρο περιεχομένου μεγάλης κοιλίας), χωρίς να επηρεαστεί ο μεταβολισμός του αζώτου.

Από το είδος του σιτηρεσίου των μηρυκαστικών εξαρτώνται οι επιδράσεις των αιθέριων ελαίων στη συνολική συγκέντρωση ΠΛΟ της μεγάλης κοιλίας. Έτσι, η συγκέντρωση ΠΛΟ φαίνεται ότι δεν επηρεάζεται όταν οι αγελάδες γαλακτοπαραγωγής καταναλώνουν σιτηρέσιο με βάση το ενσίρωμα μηδικής, αλλά περιορίζεται σημαντικά όταν οι αγελάδες διατρέφονται με σιτηρέσιο με βάση το ενσίρωμα αραβόσιτου, εκτός και εάν στο τελευταίο σιτηρέσιο γίνει προσθήκη μίγματος αιθέριων ελαίων (0,75g/ημέρα) (Benchaa *et al.*, 2007a).

Οι αναλογίες οξικού προς προπιονικό οξύ αυξάνονται (Benchaa *et al.*, 2007b; Macheboeuf *et al.*, 2008; Agarwal *et al.*, 2009), είτε σε ορισμένες περυπτώσεις παραμένουν αναλλοίωτες (Wang *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2009). Η αναστολή της παραγωγής μεθανίου στη μεγάλη κοιλία, η οποία επιτυγχάνεται με την μεθοδευμένη

αναστολή της μεθανογένεσης, συνήθως συνδέεται με τη μείωση της αναλογίας οξικού: προπιονικού οξέος.

Ωστόσο, διατυπώθηκε πρόσφατα η άποψη ότι η αναλογία οξικού: προπιονικού οξέος αυξάνεται παράλληλα με την αναστολή παραγωγής του μεθανίου εξαιτίας της επίδρασης των αιθέριων ελαίων στο περιβάλλον της μεγάλης κοιλίας, γεγονός το οποίο θα έχει δυσμενή επίδραση στην αποτελεσματική αξιοποίηση της ενέργειας του σιτηρεσίου.

Το μέγεθος των επιδράσεων των αιθέριων ελαίων φαίνεται ότι επηρεάζεται από την τιμή του pH στο υγρό περιεχόμενο της μεγάλης κοιλίας. Οι Cardozo *et al.*, (2005) παρατήρησαν ότι, ορισμένα καθαρά αιθέρια έλαια ασκούν εντονότερη επίδραση όσον αφορά την αναλογία των παραγόμενων ΠΛΟ, όταν οι τιμές pH στο περιβάλλον της μεγάλης κοιλίας είναι χαμηλές και διατύπωσαν την άποψη ότι η κατάσταση των μορίων των αιθέριων ελαίων εξαρτάται από την τιμή του pH που επικρατεί στο περιβάλλον της μεγάλης κοιλίας. Ομοίως, οι Spanghero *et al.*, (2008), παρατήρησαν ότι η παρουσία μίγματος αιθέριων ελαίων στο περιβάλλον της μεγάλης κοιλίας, είναι δυνατό να τροποποιήσει τη φυσιολογική διαδικασία των μικροβιακών ζυμώσεων και να μειώσει την αναλογία οξικού:προπιονικού οξέος, αλλά σε περιπτώσεις μόνο που στο υγρό περιβάλλον της μεγάλης κοιλίας επικρατούν χαμηλότερες τιμές pH.

5.10 Αμμωνία

Οι συγκεντρώσεις της αμμωνίας και ορισμένων σημαντικών ενζύμων (*deaminase*) περιορίζονται σημαντικά, καθώς η παρουσία των αιθέριων ελαίων αναστέλλει τη δράση των βακτηρίων που παράγουν μεγάλες ποσότητες μεθανίου. Τα βακτήρια τα οποία παράγουν μεγάλες ποσότητες μεθανίου, αποτελούν μόνο το 1% περίπου του συνολικού αριθμού των βακτηρίων της μεγάλης κοιλίας, αλλά αναπτύσσουν μια εξαιρετικά σημαντική διαδικασία απαμίνωσης (Russell *et al.*, 1988; Wallace, 2004).

Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να μειώσει το ρυθμό παραγωγής αμμωνίας και να έχει ευνοϊκή επίδραση στο βαθμό αξιοποίησης της πρωτεΐνης στο περιβάλλον της

μεγάλης κοιλίας (Wallace *et al.*, 2002). Οι Newbold *et al.*, (2004) διαπίστωσαν *in vitro* μια μείωση κατά 25% της δραστηριότητας απαμίνωσης. Οι συγκεντρώσεις αμμωνίας *in vitro* μειώθηκαν με την προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης σε συγκεντρώσεις 30 και 300mg/λίτρο, ελαίου κανέλας σε συγκεντρώσεις 0,3-300mg/λίτρο (pH 7,0; Cardozo *et al.*, 2005), και με κινναμολδεΐδη σε συγκεντρώσεις 3000mg/λίτρο (Busquet *et al.*, 2006). Ωστόσο παρόμοιες επιδράσεις δεν παρατηρήθηκαν σε άλλες *in vitro* ερευνητικές εργασίες στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν ανηθόλη σε συγκεντρώσεις έως 3000mg/λίτρο, καρβακρόλη και καρβόνη σε συγκεντρώσεις έως 300mg/λίτρο (Busquet *et al.*, 2006) και σε *in vivo* ερευνητικές εργασίες (Castillejos *et al.*, 2005; Benchaa *et al.*, 2007a).

Ορισμένα ενεργά συστατικά των αιθέριων ελαίων περιορίζουν περισσότερο αποτελεσματικά τις συγκεντρώσεις της αμμωνίας σε σύγκριση με ορισμένα άλλα. Η *Guaiacol* για παράδειγμα περιορίζει τις συγκεντρώσεις της αμμωνίας σε συγκεντρώσεις 5mg/λίτρο, ενώ οι λιμονένιο και θυμόλη σε συγκεντρώσεις έως 50 mg/λίτρο και οι βανιλίνη και ευγενόλη σε συγκεντρώσεις έως 500mg/λίτρο δεν επηρέαζαν σημαντικά τις συγκεντρώσεις της αμμωνίας στη μεγάλη κοιλία (Castillejos *et al.*, 2006). Το γεγονός αυτό δημιουργεί την ανάγκη επακριβούς καθορισμού της άριστης ποσότητας που πρέπει να χρησιμοποιηθεί κάθε ενεργό συστατικό των αιθέριων ελαίων.

Το μέγεθος των επιδράσεων των ενεργών συστατικών των αιθέριων ελαίων επιπλέον είναι δυνατό να καθορίζεται από το είδος της πρωτεϊνικής πηγής του σιτηρεσίου. Οι Wallace *et al.*, (2002) ερεύνησαν τον ρυθμό αποικοδόμησης των πρωτεϊνών διαφόρων σιτηρεσίων με την επώαση των ζωοτροφών μέσα σε νάylon σακούλες στο περιβάλλον της μεγάλης κοιλίας, παρουσία αιθέριων ελαίων. Η παρουσία των αιθέριων ελαίων ασκούσε σημαντική επίδραση μόνο στις περυπτώσεις της διάσπασης των πρωτεϊνών του αλεύρου των κτηνοτροφικών ψυχανθών, του πλέον ταχύτερα διασπώμενου αλεύρου, από όλα τα είδη των πρωτεϊνικών πηγών που μελετήθηκαν.

Οι συγκεντρώσεις των βακτηριακών πρωτεϊνών και αμυλασών σε συνδυασμό με το είδος της πρωτεϊνικής τροφής (μπιζέλι, κράμβη, κλπ) έτειναν να είναι χαμηλότερες στα σιτηρέσια στα οποία έγινε προσθήκη αιθέριων ελαίων, αλλά οι επιδράσεις αυτές δεν ήταν εμφανείς όταν η πρωτεϊνική πηγή του σιτηρεσίου ήταν το ιχθυάλευρο. Ο μικροβιακός ποικτισμός στο δείγμα με το σανό χόρτου που τοποθετήθηκε στη μεγάλη κοιλία βοοειδών περιοριζόταν από την παρουσία των

αιθέριων ελαίων, αλλά ο αντίστοιχος επουικισμός για τα δείγματα λιγότερο πεπτών ινωδών υποστρωμάτων όπως είναι το ενσιρωμένο χόρτο και το άχυρο κριθαριού δεν επηρεάστηκε.

Το γεγονός αυτό καταδεικνύει την άποψη ότι με την παρουσία των αιθέριων ελαίων είναι δυνατή η αναστολή της διαδικασίας της πέψης εύπεπτων υποστρωμάτων του σιτηρεσίου, εξαιτίας της αντίστοιχης αναστολής της δράσης των πρωτεολυτικών και αμυλολυτικών βακτηρίων της μεγάλης κοιλίας, αλλά όχι και η αναστολή της διαδικασίας της πέψης των ινωδών ουσιών (Wallace *et al.*, 2002). Μια ενδεχόμενη έλλειψη επίδρασης των αιθέριων ελαίων στις ζυμωτικές διεργασίες της μεγάλης κοιλίας, ιδιαίτερα για *in vivo* ερευνητικές εργασίες είναι δυνατό να οφείλεται στην ικανότητα προσαρμογής των συμβιούντων μικροοργανισμών της μεγάλης κοιλίας με αποτέλεσμα την ταχύτατη διάσπαση των μορίων των αιθέριων ελαίων, σε άλλες λιγότερο ενεργές μορφές.

5.11 Παραγωγή μεθανίου

Ορισμένα ενεργά συστατικά των αιθέριων ελαίων ερευνήθηκαν για ενδεχόμενες ανασταλτικές επιδράσεις τους στις μικροβιακές διαδικασίες παραγωγής μεθανίου της μεγάλης κοιλίας. Τα αποτελέσματα ορισμένων ερευνητικών εργασιών φαίνονται στον Πίνακα 9 που ακολουθεί.

Για παράδειγμα, οι Evans και Martin (2000) παρατήρησαν ότι η θυμόλη (0,4g/λίτρο), ένα κύριο συστατικό των αιθέριων ελαίων που προέρχονται από το θυμάρι και τα φυτά της ρίγανης, είναι ισχυρός αναστολέας παραγωγής μεθανίου *in vitro*, αλλά παράλληλα περιορίζει σημαντικά τις συγκεντρώσεις του οξικού και προπιονικού οξέος. Σε μια άλλη ερευνητική εργασία το αιθέριο έλαιο το οποίο προέρχονταν από το φυτό ρίγανης της ποικιλίας *Origanum vulgare* και το κύριο ενεργό συστατικό του η θυμόλη σε συγκεντρώσεις 6mM, προκάλεσαν αναστολή της παραγωγής του μεθανίου σε ποσοστό 99% (Macheboeuf *et al.*, 2008). Η ανηθόλη σε συγκεντρώσεις 20mg/λίτρο προκάλεσε *in vitro* αναστολή παραγωγής μεθανίου (Chaves *et al.*, 2008c).

Σε ορισμένες *in vitro* ερευνητικές εργασίες διαπιστώνονται ανασταλτικές ιδιότητες των μιγμάτων αιθέριων ελαίων ή εκχυλίσμάτων διαφόρων φυτών. Το αιθέριο έλαιο κανέλας, μέντας (Chaves *et al.*, 2008c) και δυόσμου (Tatsouka *et al.*, 2008; Agarwal *et al.*, 2009), αποδείχθηκε ότι ασκούν ισχυρή ανασταλτική επίδραση στη μεθανογένεση. Το δραστικό συστατικό του αιθέριου ελαίου της κανέλας, η κυναμαλδεΐδη σε συγκεντρώσεις 5mM προκάλεσε καταστολή της παραγωγής μεθανίου κατά 94% (Macheboeuf *et al.*, 2008).

Το έλαιο μέντας περιέχει τις δραστικές ουσίες μεθανόλη, μενθόνη και τον εστέρα μενθύλιο, τα οποία έχουν αποδειχθεί ότι διαθέτουν ισχυρές αντιμικροβιακές ιδιότητες (McKay και Blumberg, 2006). Η μεθανόλη και η αιθανόλη, ενεργά συστατικά στα εκχυλίσματα των σπόρων μάραθου και άνθους γαρύφαλλου, διαπιστώθηκε ότι αναστέλλουν *in vitro* την παραγωγή μεθανίου (Patra *et al.*, 2010). Το αιθέριο έλαιο ευκαλύπτου σε συγκεντρώσεις 1,66mL/λίτρο & 2mL/λίτρο αναστέλλει την παραγωγή μεθανίου έως 58% (Kumar *et al.*, 2009) και έως 90,3% (Sallam *et al.*, 2009) αντίστοιχα, ενώ σε συγκεντρώσεις 0,33g α-κυκλοδεξτρίνη του ελαίου ευκαλύπτου αναστέλλεται η παραγωγή μεθανίου κατά 70% (Tatsouka *et al.*, 2008).

Πίνακας 9. Επιδράσεις ορισμένων αιθέριων ελαίων ή φυτών με υψηλή περιεκτικότητα σε αιθέρια έλαια στην *in vitro* παραγωγή μεθανίου σε συνδυασμό με την τροποποίηση των ζυμωτικών διεργασιών στο περιβάλλον της μεγάλης κοιλίας, *Patra and Saxena, 2010*.

Αιθέριο έλαιο	Ποσότητα	Περιορισμός παραγωγής μεθανίου (%)	Επιδράσεις	Βιβλιογραφική πηγή
Ανηθόλη	20mg/l	13,3	Συνολικά ΠΛΟ & αναλογία οξικού:προπιονικό ανεπηρέαστες	Chaves <i>et al</i> (2008a)
Καρβακρόλ η	1,5-5mM	-8,4-88,9	ΠΛΟ μειώνονται γραμμικά, αναλογία οξικού:προπιονικό αυξάνεται	Macheboeuf <i>et al</i> (2008)
Σιναμαλδεΰ δη	1,0-5mM	0.93- 89,3	ΠΛΟ μειώνονται γραμμικά, αναλογία οξικού:προπιονικό αυξάνεται	Macheboeuf <i>et al</i> (2008)
Αιθέριο έλαιο ρίγανης	250mg/ημέρ α	17,4	ΠΛΟ ανεπηρέαστα, αναλογία οξικού:προπιονικό αυξάνεται	Wang <i>et al</i> (2009)

Τα διάφορα ενεργά συστατικά τα οποία απαντούν στο αιθέριο έλαιο ευκαλύπτου, όπως είναι η cineol, η terpinenol, το α-pinene, το p-cymene, η aromadendrene και η α-phelladrene έχουν ταυτοποιηθεί (Bhatti *et al.*, 2007). Η p-cymene σε συγκέντρωση 20 mg/λίτρο περιόρισε σημαντικά την παραγωγή μεθανίου κατά 29% (Chaves *et al.*, 2008c), ενώ η α-cyclodextrin cineole σε συγκεντρώσεις 0,33g/λίτρο δεν την επηρέασε (Tatsouka *et al.*, 2008). Σε μια *in vivo* ερευνητική εργασία (Wang *et al.*, 2009), αποδείχθηκε ότι η προσθήκη για περίοδο 15 ημερών 0,25g ημέρα στο σιτηρέσιο των προβάτων ενός μίγματος αιθέριων ελαίων προερχόμενο από διάφορες ποικιλίες φυτών ρίγανης περιόρισε σημαντικά την παραγωγή μεθανίου.

Ωστόσο, σε *in vivo* ερευνητικές εργασίες (Beauchemin & McGinn, 2006) στις οποίες χορηγήθηκε (1g/ημέρα) μίγμα αιθέριων ελαίων στο σιτηρέσιο παχυνόμενων βοοειδών για χρονική περίοδο 21 ημερών, δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση όσον αφορά την παραγωγή του μεθανίου στο περιβάλλον της μεγάλης κούλιας. Ομοίως, από την χρησιμοποίηση αιθέριων ελαίων του φυτού *Pinus mugos*, του οποίου η περιεκτικότητα σε ενεργά συστατικά *pinene*, *limonellen*, *ω3-carene* και *β-phellandren* κυμαίνεται σε 35%, 12%, 25% και 14%, αντίστοιχα, δεν αποδείχθηκε καμία σημαντική επίδραση στην παραγωγή μεθανίου, πιθανά εξαιτίας της χρησιμοποίησης περιορισμένης ποσότητας (8 mg/λίτρο) (Soliva *et al.*, 2008).

Τα αιθέρια έλαια εμφανίζουν διαφορετική επίδραση στη διαδικασία παραγωγής μεθανίου, η οποία εξαρτάται από τον τύπο του αιθέριου ελαίου. Οι Macheboeuf *et al.*, (2008) μελέτησαν λεπτομερώς τις αλληλεπιδράσεις διαφόρων ποσοτήτων και διαφόρων αιθέριων ελαίων στην παραγωγή του μεθανίου και των ΠΛΟ. Το μείγμα αιθέριων ελαίων το οποίο λαμβάνονταν από άνηθο (*Anethum graveolens*- 32% *limonene*), περιόριζε σημαντικά και γραμμικά την παραγωγή μεθανίου. Η κινναμλδεύδη και ένα εκχύλισμα από το είδος *Cinnamomum verum* το οποίο περιείχε κινναμλδεύδη, περιόριζε σημαντικά την παραγωγή μεθανίου μέχρι του επιπέδου ελάχιστης χορήγησης 3mM, με τη μορφή μιας αρνητικής σιγμοειδούς καμπύλης. Κάτω από το όριο αυτό ελάχιστης χορήγησης η παραγωγή του μεθανίου και των ΠΛΟ δεν επηρεάζονταν. Στο σημείο καμπής (επίπεδο χορήγησης 4mM) της σιγμοειδούς καμπύλης, η παραγωγή τόσο του μεθανίου όσο και των ΠΛΟ, αναστέλλονταν πλήρως. Η καρβακρόλη, η θυμόλη, τα εκχυλίσματα αιθέριων ελαίων από τα είδη *Origanum vulgare* (20% και 35% *thymol*) και *Thymus vulgare* (20% *p-cymene*) εμφάνιζαν επίσης μια αρνητική επίδραση με τη μορφή αρνητικής σιγμοειδούς καμπύλης, αλλά σε χαμηλότερες χορηγήσεις (όριο <2 mM). Οι χορηγήσεις πάνω από το όριο αυτό περιόριζαν σημαντικά τις ζυμωτικές διεργασίες και την παραγωγή του μεθανίου.

5.12 Επιδράσεις των αιθέριων ελαίων στα παραγωγικά χαρακτηριστικά των μηρυκαστικών

5.12.1 Μέγεθος κατανάλωσης τροφής και ρυθμός ανάπτυξης

Υπάρχει ποικιλία στις παρατηρήσεις αναφορικά με τις επιδράσεις του τύπου αιθέριου ελαίου και της χορηγούμενης ποσότητας στο μέγεθος κατανάλωσης της τροφής και στο ρυθμό ανάπτυξης των μηρυκαστικών ζώων.

Η χορήγηση στο σιτηρέσιο προβάτων 250mg/ημέρα αιθέριων ελαίων από φυτά ρίγανης (Wang *et al.*, 2009), είτε στις αγελάδες ημερήσια ποσότητα 2g αιθέριων ελαίων από το είδος juniper berry (περιέχει 35% α-pinene) (Yang *et al.*, 2007), είτε σε βοοειδή γαλακτοπαραγωγής 0,75-2g μίγματος αιθέριων ελαίων (Benchaar *et al.*, 2006a, 2007a) και 0,043g ή 0,43g/kg σε αίγες γαλακτοπαραγωγής (Malicky *et al.*, 2009), δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση στο μέγεθος κατανάλωσης της τροφής.

Ωστόσο, ένα μείγμα αιθέριων ελαίων κτιναμαλδεύδης (180mg/ημέρα) και ευγενόλης (90mg/ημέρα) σε βοοειδή κρεοπαραγωγής (Cardozo *et al.*, 2006) και υψηλές δόσεις κτιναμαλδεύδης (500mg/ημέρα) σε αγελάδες γαλακτοπαραγωγής (Busquet *et al.*, 2003 αναφέρεται από τους Calsamiglia *et al.*, 2007), περιορίσε σημαντικά το μέγεθος κατανάλωσης τροφής. Η περιορισμένη κατανάλωση τροφής είναι πολύ πιθανό να οφείλεται σε προβλήματα γευστικότητας, γεγονός το οποίο σημαίνει ότι για να περιοριστούν τα προβλήματα αυτά τα ενεργά συστατικά θα πρέπει να χορηγούνται με τη μορφή κάψουλας.

Σε αντίθεση, η προσθήκη αιθέριου ελαίου κόκκινου πιπεριού (1g/ημέρα εκχυλίσματος περιέχει 15% capsaicin) σε ένα σιτηρέσιο με βάση τις συμπυκνωμένες ζωοτροφές βοοειδών κρεοπαραγωγής αύξησε το μέγεθος κατανάλωσης τροφής και διέγειρε τις ζυμωτικές διεργασίες στο περιβάλλον της μεγάλης κοιλίας (Cardozo *et al.*, 2006).

Οι Estell *et al.*, (1998), μελέτησαν στα πρόβατα την επίδραση ορισμένων πτητικών συστατικών (camphor, limonene, cis-jasmone, β-καρυοφυλλένιο, borneol και α-pinene) στο μέγεθος της κατανάλωσης συμπίκτων (pellets) σανού μηδικής. Τα συστατικά camphor, α-pinene και borneol περιορίσαν σημαντικά την κατανάλωση των συμπίκτων του σανού μηδικής, ενώ τα υπόλοιπα συστατικά δεν εμφάνισαν καμία σημαντική επίδραση αναφορικά με το μέγεθος της κατανάλωσης τροφής.

Η ενδεδειγμένη ημερήσια ποσότητα αιθέριων ελαίων στην περίπτωση των μηρυκαστικών ζώων θεωρείται σημαντική, διότι η χορήγηση περιορισμένης ποσότητας είναι δυνατό να διεγείρει την κατανάλωση της τροφής, ενώ η χορήγηση μεγαλύτερης ποσότητας να την περιορίσει. Οι Yang *et al.*, (2010a), απέδειξαν επαρκώς ότι η κινναμυλοβενζοϊκή βελτιώνει το μέγεθος κατανάλωσης τροφής όταν χορηγείται στα βοοειδή σε μικρές ποσότητες (0,4g/ημέρα), ενώ όταν χορηγείται σε μεγαλύτερες ποσότητες (1,6g/ημέρα) δε φαίνεται να ασκεί καμία παρόμοια επίδραση.

Υπάρχει πολύ περιορισμένος αριθμός ερευνητικών εργασιών, ο οποίος αναφέρεται στις επιδράσεις των αιθέριων ελαίων ή των ενεργών συστατικών τους στα παραγωγικά χαρακτηριστικά των μηρυκαστικών. Οι Bampidis *et al.*, (2005), δεν παρατήρησαν καμία επίδραση στο ρυθμό ανάπτυξης και την εκμετάλλευση της τροφής αμνών, στον οποίων το σιτηρέσιο προστέθηκαν αποξηραμένα φύλλα ρίγανης (*Origanum vulgare* L.), τα οποία περιείχαν 144- 288mg αιθέριου ελαίου (850mg/g καρβακρόλη) ανά κιλό ξηρής ουσίας σιτηρεσίου.

Οι Benchaar *et al.*, (2006b), δεν παρατήρησαν καμία αλλαγή στο ρυθμό ανάπτυξης παχυνόμενων βοοειδών, το σιτηρέσιο των οποίων βασίζονταν στην κατανάλωση ενσιρώματος και ενισχύονταν ημερήσια με 2-4g μίγματος αιθέριων ελαίων, το οποίο περιείχε θυμόλη, ευγενόλη, βανιλίνη και λιμονένιο. Το μίγμα αιθέριων ελαίων δεν φάνηκε να ασκεί καμία επίδραση στην εκμετάλλευση της τροφής, με την ημερήσια χορηγούμενη ποσότητα των 2g να βελτιώνει την εκμετάλλευση τροφής σε σύγκριση με την ημερήσια χορηγούμενη ποσότητα των 4g.

Οι Chaves *et al.*, (2008a), επιπλέον ανέφεραν ότι η καρβακρόλη ή η κινναμυλοβενζοϊκή (0,2g/kg) δεν ασκούν καμία επίδραση στο ρυθμό ανάπτυξης των προβάτων, το σιτηρέσιο των οποίων καταρτίζεται με βάση είτε τον καρπό αραβοσίτου είτε τον καρπό κριθαριού για χρονική περίοδο 11 εβδομάδων, αν και αριθμητικά ο ημερήσιος ρυθμός ανάπτυξης ήταν μεγαλύτερος για την ομάδα προβάτων που κατανάλωναν το σιτηρέσιο με βάση τον καρπό κριθαριού σε σύγκριση με το μάρτυρα (288 έναντι 310g/ημέρα). Ωστόσο στις εργασίες αυτές, υψηλότερος μέσος ημερήσιος ρυθμός ανάπτυξης (250 ή 254 g/ημέρα έναντι 217g/ημέρα), προέκυπτε από την χορήγηση (0,2g/ kg Ξ O σιτηρεσίου) κινναμυλοβενζοϊκής ή αιθέριων ελαίων από το είδος *juniper berry* στο σιτηρέσιο των προβάτων με βάση τον καρπό κριθής. Έτσι, προκύπτει ως συμπέρασμα ότι η επίδραση των αιθέριων ελαίων στο ρυθμό ανάπτυξης εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από το είδος του σιτηρεσίου.

5.12.2 Η παραγωγή γάλακτος και η σύνθεση

Η επίδραση των αιθέριων ελαίων στο μέγεθος της γαλακτοπαραγωγής, δεν έχει τεκμηριωθεί επαρκώς. Οι Santos *et al.*, (2010) παρατήρησαν ότι, η προσθήκη μίγματος αιθέριων ελαίων (eugenol, geranyl acetate και έλαιο coriander) στο σιτηρέσιο ζώων γαλακτοπαραγωγής, βελτίωσε σημαντικά την περιεκτικότητα του γάλακτος σε λίπος ή το συνολικό ποσοστό περιεχομένου λίπους στο γάλα, αλλά δεν ασκούσε καμία επίδραση στο μέγεθος της συνολικής παραγωγή γάλακτος και των υπολοίπων συστατικών του γάλακτος.

Η αυξημένη λιποπεριεκτικότητα του γάλακτος στις εργασίες αυτές ως αποτέλεσμα της προσθήκης των αιθέριων ελαίων, είναι δυνατό να οφείλεται στην αυξημένη παραγωγή οξικού οξέος και/ή την αύξηση της αναλογία οξικού: προπιονικού οξέος στο περιβάλλον της μεγάλης κοιλίας (Benchaa *et al.*, 2007b; Agarwal *et al.*, 2009) ή από τη διαφορετική αξιοποίηση του πλεονάσματος ενέργειας με σκοπό την αύξηση του λίπους του γάλακτος και όχι την αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης (Santos *et al.*, 2010).

Επιπλέον, η συμμετοχή των αιθέριων ελαίων στο σιτηρέσιο των μηρυκαστικών ενώ φαίνεται ότι δημιουργεί μια τάση για μειωμένη κατανάλωση τροφής δεν ασκεί καμία επίδραση στο μέγεθος της γαλακτοπαραγωγής, γεγονός το οποίο πιθανά υποδηλώνει τη βελτίωση της εκμετάλλευσης των θρεπτικών συστατικών της τροφής (Santos *et al.*, 2010). Παρά το γεγονός ότι, οι αποδόσεις σε ποσότητα γάλακτος και λιποπεριεκτικότητας γάλακτος των αγελάδων γαλακτοπαραγωγής δεν επηρεάζονται από τη χρησιμοποίηση των αιθέριων ελαίων στην ερευνητική εργασία των Tassoul & Shaver (2009), η εκμετάλλευση των θρεπτικών συστατικών για την παραγωγή γάλακτος βελτιώνεται σημαντικά. Αντίθετα, οι Kung *et al* (2008), παρατήρησαν ότι η προσθήκη μίγματος αιθέριων ελαίων στο σιτηρέσιο βελτιώνει το μέγεθος της γαλακτοπαραγωγής των αγελάδων.

Σε ορισμένες ερευνητικές εργασίες καταδεικνύεται η τροποποίηση της φυσιολογικής πορείας διάσπασης (bio-hydrogenation) των λιπών στο περιβάλλον της μεγάλης κοιλίας, εξαιτίας της παρουσίας αιθέριων ελαίων στο σιτηρέσιο των μηρυκαστικών ζώων. Η κινამεδεύδη, ενεργό συστατικό των αιθέριων ελαίων, αποδείχθηκε εργαστηριακά ότι σε συγκεντρώσεις 500mg/λίτρο επηρεάζει σημαντικά

τη διαδικασία της bio-hydrogenation των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (Lourenco *et al.*, 2008). Η παρουσία κιναμαλδεύδης στις εργασίες των ερευνητών αυτών, ανέστειλε τη διάσπαση του C18: 2 (λινελαϊκό οξύ) και του C18: 3 (λινολενικό οξύ), γεγονός το οποίο καταδείχθηκε από την αυξημένη συσσώρευση ενδιάμεσων μεταβολικών προϊόντων της πορείας της bio-hydrogenation, όπως είναι τα trans-10 C18: 1, trans-10, cis- 12 C18: 2 και trans-11, cis-15 C18: 2.

Ενώ, σε *in vitro* ερευνητικές εργασίες η προσθήκη κιναμαλδεύδη συνδέεται με την μετατροπή της σύνθεσης των λιπαρών οξέων στο περιβάλλον της μεγάλης κοιλιάς, η αντίστοιχη αναμενόμενη επίδραση στη σύνθεση των λιπαρών οξέων του γάλακτος δεν παρατηρήθηκε, τόσο από την προσθήκη κιναμαλδεύδης (1g/ημέρα) στο σιτηρέσιο αγελάδων γαλακτοπαραγωγής (Benchaa & Chouinard, 2009) όσο και από την προσθήκη ενός μίγματος monoterpene (0,43g/ kg σιτηρεσίου), το οποίο περιείχε τα ενεργά συστατικά linalool, p-cymene, α-pinene και β-pinene (45,2, 36,7, 16,0 και 2,2mol/100mol, αντίστοιχα) στο σιτηρέσιο αιγών γαλακτοπαραγωγής (Malecky *et al.*, 2009). Παρομοίως, δεν παρατηρήθηκε τροποποίηση στη σύνθεση των λιπαρών οξέων του γάλακτος αγελάδων γαλακτοπαραγωγής, στο σιτηρέσιο των οποίων προσθέτονταν ημερήσια 750mg μίγματος αιθέριων ελαίων (Benchaa *et al.*, 2007a). Ωστόσο, όταν η ημερήσια χορήγηση του μίγματος των αιθέριων ελαίων αυξήθηκε από τα 750mg στα 2g, παρατηρήθηκε μια σημαντική αύξηση του συζευγμένου λινελαϊκού οξέως (cis-9, trans-11 18: 2) στο λίπος του γάλακτος (Benchaa *et al.*, 2006a).

Τα αιθέρια έλαια ή τα προϊόντα του μεταβολισμού τους είναι δυνατά να ανιχνευτούν στο γάλα και στα προϊόντα του κρέατος, εάν στο σιτηρέσιο του ζώου από το οποίο προέκυψαν προστέθηκαν αιθέρια έλαια. Για παράδειγμα, η προσθήκη σπόρων κύμινου και χαμομηλιού στο σιτηρέσιο αιγών γαλακτοπαραγωγής είχε ως αποτέλεσμα την ανίχνευση λιμονένιου και κιναμαλδεύδης (τα κύρια συστατικά του αιθέριου ελαίου από σπόρους κύμινου) στο γάλα. Ωστόσο τα ενεργά συστατικά από το χαμομήλι δεν ανιχνεύθηκαν στο γάλα (Molnar *et al.*, 1997).

Διάφορα μονοτερπένια όπως α-pinene, b-pinene, b-mircene, sabinene, camphene, d3-carene και limonene ανιχνεύθηκαν στο γάλα αγελάδων που κατανάλωναν βοσκήσιμη ύλη πλούσια σε δικτυλήδονα φυτά, τα οποία θεωρούνται κυρίαρχα ήδη φυτών στους βοσκοτόπους της οροσειράς των Άλπεων (Noni & Battelli, 2008; Chion *et al.*, 2010). Ως εκ τούτου, η παρουσία των αιθέριων ελαίων ή των μεταβολικών προϊόντων τους θα μπορούσε να ενισχύσει συγκεκριμένες

οργανοληπτικές και θρεπτικές ιδιότητες των γαλακτοκομικών προϊόντων, βελτιώνοντας σημαντικά την προστιθέμενη αξία τους (Chion *et al.*, 2010).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Adugna T. livestock feed supply situation in Ethiopia: Commercialization of livestock agriculture in Ethiopia. 16th : 2009 : Addis Ababa, Ethiopia.

Agarwal, N., C. Shekhar, K. Kumar, L.C. Chaudhary and D.N. Kamra, 2009. Effect of peppermint (*Mentha piperita*) oil on *in vitro* methanogenesis and fermentation of feed with buffalo rumen liquor. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 148: 321-327.

Ahmet C., Saban K., Hamdullah K., Ercan K., (2005). Antifungal properties of essential oil and crude extracts of *Hypericum linarioides* Bosse, *Biochem. Syst. Ecol.* 33: 245-256.

Alemu S, *et al.* study on small ruminant lungworms in northeastern Ethiopia *Vet Parasitol* 2006;142:330-335.

Alison MJ, *et al.* *synergistes jonesii*, gen. nov., sp.nov.: A rumen bacterium that degrades toxic pyridinediols. *Systematic and applied microbiology.* 1992;15:522-529.

Amann R and Ludwig W Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. 2000;24:555-565.

Ando S., Nishida T., Ishida M., Hosoda K., Bayara E., (2003). Effect of peppermint feeding on the digestibility, ruminal fermentation and protozoa. *Livest. Prod. Sci.*, 82: 245-248.

Anthony A., Caldwell G., Hutt A.G., Smith R.L., (1987). Metabolism of estragole in rat and mouse and influence of dose size on excretion of the proximate carcinogen 1-hydroxyestragole. *Food Chem. Toxicol.* 25: 799-806.

Appleby, J.C. 1955 The isolation and classification of proteolytic bacteria from the rumen of the sheep. *J. Gen. Microbiol.*, 12, 526-533.

Taylor MA, *et al.* Veterinary parasitology. Blackwell Publishing Ltd. 2007.

Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M., (2008). Biological effects of essential oils –A review. *Food and chemical toxicology* 46 (2008) 446-475.

Bampidis, V.A., V. Christodoulou, P. Florou-Paneri, E. Christaki, A.B. Spais and P.S. Chatzopoulou, 2005. Effect of dietary dried oregano leaves supplementation on performance and carcass characteristics of growing lambs. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 121: 285-295.

Bauman, H.E. and Foster, E.M. 1956 Characteristics of organisms isolated from the rumen of cows fed high and low roughage rations. *J. Bacteriol.*, 71, 333-338.

Beauchemin, K.A. and S.M. McGinn, 2006. Methane emissions from beef cattle: Effects of fumaric acid, essential oil and canola oil. *J. Anim. Sci.* 84, 1489-1496.

Belanche, A., G. de la fuente, J. M. Moorby, and C.J. Newbold. 2012. Bacterial protein degradation by different rumen protozoal groups. *J. Anim. Sci.* 90: 4495-4504.

Benchaar C., Calsamiglia S., Chaves A.V., Fraser G.R., Colombatto D., McAllister T.A. and Beauchemin K.A. 2008. A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145, 209-228.

Benchaar C., Hristov A.N. and Greathead H. 2009. Essential oils as feed additives in ruminant nutrition. Pp 111-146 *in* phytochemicals in animal nutrition. T. Steiner, Ed. Nottingham University Press, Nottingham, UK.

Benchaar, C., H.V. Petit, R. Berthiaume, D.R. Ouellet, J. Chiquette and P.V. Chouinard, 2007. Effects of essential oils on digestion, ruminal fermentation, ruminal microbial populations, milk production and milk composition in dairy cows fed alfalfa silage or corn silage. *J. Dairy Sci.*, 90: 886-897.

Bhatti, H.Q., Z. Iqbal, S.A.S. Chatha and I.H. Bukhari, 2007. Variations in oil potential and chemical composition of *Eucalyptus crebra* among different districts of Punjab-Pakistan. *Int. J. Agric. Biol.*, 9: 136-138.

Bladen IIA, *et al.* a study of bacterial species from the rumen which produce ammonia from protein hydrolyzate. *Appl Microbiol.* 1961;9:175-180.

Breed, R.S., Murray, E.G.D., and Smith, N.R. 1957 *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 7th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.

Brenes A., Roura E., (2010). Essential oils in poultry nutrition: main effects and modes of action. *Animal Feed Science and Technology*. 158, 1-14.

Bryant, M.P. and Burkey, L.A. 1953 Cultural methods and some characteristics of some of the more numerous groups of bacteria in the bovine rumen. *J. Dairy Sci.*, 36, 205-217.

Bryant, M.P. and Burkey, L.A. 1953 Numbers and some predominant groups of bacteria in the rumen of cows fed different rations. *J. Dairy Sci.*, 36, 218-224.

Bryant, M.P., Small, N., Bouma, C., and Robinson, I.M. 1958 The characteristics of ruminal anaerobic cellulolytic cocci and *Cillobacterium cellulosolvens* n. sp. *J. Bacteriol.*, 76, 529-537.

Bryant, M.P., Small, N., Bouma, C., and Roinson, I.M. 1958 Studies on the composition of the ruminal flora and fauna of young calves. *J. Dairy Sci.*, 41, 1747-1767.

Burkey J.L., Sauer J.M., McQueen C.A., Sipes I.G., (2000). Cytotoxicity and and genotoxicity of methyleugenol and related congeners- a meechanism of activation for methyleugenol. *Mutat Res.* 453: 25-33.

Busquet M., Calsamiglia S., and Kammel C. 2006. Plant extracts affect *in vitro* rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.*, 89: 761-771.

Busquet M., Calsamiglia S., ferret A., Carro M.D. and Kamel C. 2005. Effect of garlic oil and four of its compounds on rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* 88, 4393-4404.

Busquet, M., H. Greathead, S. Calsamiglia, A. Ferret and C. Kamel, 2003. Efecto del extracto de ajo y el cinemaldehido sobre la produccion, composicion y residuos en leche en vacas de alta produccion. *ITEA*, 24: 756-758.

Busquet, M., S. Calsamiglia, A. Ferret and C. Kamel, 2006. Plant extracts affect *in vitro* rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* 89, 761-771.

Calsamiglia S., Busquet M., Cardozo P.W., Castillejos L., Perret A., (2007). Invited review: Essential oils as modifiers of rumen fermentation. *J. Dairy Sci.*, 90: 2580-2595.

Cardozo P.W., Calsamiglia S., Ferret A. and Kammel C. 2004. Effect of natural plants extracts on ruminal protein degradation abd fermentation profiles in continuous culture. *J. Anim. Sci.* 82, 3230-3236.

Cardozo P.W., Calsamiglia S., Ferret A., Kamel C., (2005a). Effects of alfalfaextract, anise, capsicum and a mixture of cinnamaldehyde and eugenol on ruminal fermentation and protein degradation in beef heifers fed a high concentrate diet. *J. Anim. Sci.*, 84: 2801-2808.

Cardozo P.W., Calsamiglia S., Ferret A., Kamel C., (2005b). Screening for the effects of natural plant extracts at different pH on *in vitro* rumen microbial fermentation of a high-concentrate diet for beef cattle. *J. Dairy Sci.*, 83: 2572-2579.

Carson C.E., Hammer K.A., Riley T.V., (2006). *McLaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin – Microbiol Res* 19: 50-62.

Castillejos, L., S. Calsamiglia and A. Ferret, 2006. Effect of essential oil active compounds on rumen microbial fermentation and nutrient flow in *in vitro* systems. *J. Dairy Sci.*, 89: 2649-2658.

Castillejos, L., S. Calsamiglia, A. Ferret and R. Losa, 2005. Effects of a specific blend of essential oil compounds and the type of diet on rumen microbial fermentation and nutrient flow from a continuous culture system. *Anim. Feed Sci. Technol.* 119, 29-41.

Cavaleiro C., Pinto E., Goncalves M.J., Salgueiro L., (2006). Antifungal activity of Juniperus essential oils against dermatophyte, *Aspergillus* and *Candida* strains. *Journal of Applied Microbiology* 100: 1333-1338.

Central Statistical Agency. Federal Democratic Republic of Ethiopia Central Statistical Agency, Agricultural Sample Survey 2011/12. report on livestock and livestock characteristics, 2012.

Chao S.C., Young D.G. and Oberg C.J. 2000. Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. *J. Essent. Oil Res.* 12, 1914-1920.

Chaves, A.V., K. Stanford, L.L. Gibson, T.A. McAllister and C. Benchaar, 2008. Effects of carvacrol and cinnamaldehyde on intake, rumen fermentation, growth performance and carcass characteristics of growing lambs. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 145: 396-408.

Chaves, A.V., K. Stanford, M.E.R. Dugan, L.L. Gibson, T.A. McAllister, F. van Herk and C. Benchaar, 2008. Effects of cinnamaldehyde, garlic and juniper berry essential oils on rumen fermentation, blood metabolites, growth performance and carcass characteristics of growing lambs. *Livest. Sci.*, 117: 215-224

Chaves, A.V., M.L. He, W.Z. Yang, A.N. Hristov, T.A. McAllister and C. Benchaar, 2008. Effects of essential oils on proteolytic, deaminative and methanogenic activities of mixed ruminal bacteria. *Can. J. Anim. Sci.*, 89: 97-104.

Cheeke P.R. 1995. Toxicants of plant origin glycosides. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.

Chen W., Lu Y., Gao m., Wu J., Wang A., Shi R., (2010). Anti-angiogenesis effect of essential oil from *Curcuma zedoaria* *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Ethnopharmacology*

Chion, A.R., E. Tabacco, D. Giaccone, P.G. Peiretti, G. Battelli and G. Borreani, 2010. Variation of fatty acid and terpene profiles in mountain milk and Toma piemontese cheese as affected by diet composition in different seasons. *Food Chem.*, 121: 393-399.

Christaki E., Bonos E. Giannenas I and Florou-Paneri. 2012. A review: aromatic plants as a source of bioactive compounds. *Agric.* 2, 228-243.

Chu, H. and Bryant, M.P. 1958 The B-vitamin and nitrogen requirements of *Bacteroides succinogenes*, an important ruminal cellulolytic bacterium. *U. S. Dept. Agr.,ARS* 44-22.

Cosentino S., Tuberoso C.I.G., Pisano B., Satta M., Mascia V., Arzedei E. and Palmas F. 1999. *In vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian thymus essential oil. *Lett. Appl. Microbiol.* 29, 130-135.

- Couladis S., Tzakou O., Verykokidou E. and Harvala C. 2003. Screening of some greek aromatic plants for antioxidant activity. *Phytother. Res.* 17, 194-195.
- Dain, J.P., Neal, A.L., and Seeley, H.W. 1956 The effect of carbon dioxide on polysaccharide production by *Streptococcus bovis*. *J Bacteriol.*, 72, 209-213.
- Davidson P.M. and Naidu A.S. 2000. Phyto-phenols. Pp. 265-293 in *Natural Food Antimicrobial Systems*. A.S. Naidu, Ed. CRC Press, Boca Raton FL.
- Dehority B A. 1993. Laboratory manual for classification and morphology of rumen ciliate protozoa. Nottingham University, Nottingham, 15-30, 45-68, 80-103.
- Delaquis R.J., Stanich K., Girard B. and Massa G. 2002. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cillantro, coriander and eucalyptous essential oils. *Int. J. Food Microbiol.* 74, 101-109.
- Denton, B. L., D.E. Diese, J.L. Firkins, and T.J. Haqckmann. 2015. Accumulation of reserve carbohydrates by protozoa and bacteria in competition for glucose. *Appl. Environ. Microbial.* 81:1832-1838.
- Doetsch, R.N. and Robinson, R.Q. 1953 The bacteriology of the bovine rumen : a review. *J. Dairy Sci.*, 36, 115-142.
- Domke AV, *et al.* prevalence of gastrointestinal helminths, lungworms and liver fluke in sheep and goats in Norway. *Vet parasitology.* 2013;194:40-48
- Dong G.Z., Wang X.J., Liu Z.B., and Wang F. 2010) Effects of phytogenic products on *in vitro* rumen fermentation and methane ammision in goats. *J. Anim. Food Sci.* 19, 218-229.
- Dorman H.J.D. and Deans S.G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbial.* 88, 308-316.
- Egan AR. Principles of supplements of poor quality roughages with nitrogen. In: Dixon R M (Edn) *Ruminant feeding systems utilizing fibrous agricultural residues* 1985. IDP (International Development Programme of Australian Universities and Cilleges Ltd.), Canberra, Australia. 1985;49-58.
- Elgayyar M., Draughon F.A., Golden D.A. and Mount J.R. 2001. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. *J. Food Prot.* 64, 1019-1024.
- Ellis, J.E., P.S. McIntyre, M Saleh, A.G. Williams, and D Lloyd. 1991. Influence of CO₂ on fermentative metabolism of the rumen ciliate *Dasytricha ruminantium*. *J. Gen. microblal.* 137: 1409-1417.
- Elsden, S.R. 1945 The fermentation of carbohydrates in the rumen of the sheep. *J. Exptl. Biol.*, 22, 51-62.
- Elsden, S.R., Gilchrist, F. M C., Lewis, D., and Volcani, B.E. 1951 The formation of fatty acids by a gram negative coccus. *Biochem. J.*, 49, lxi-xxx.
- Estell, R.E., E.L. Fredrikson, M.R. Tellez, K.M. Havstad, W.L. Shupe, D.M. Anderson and M.D. Remmenga, 1998. Effects of volatile compounds on consumption of alfalfa pellets by sheep. *J. Anim. Sci.*, 76: 228-232.
- Evans, J.D. and S.A. Martin, 2000. Effects of thymol on ruminal microorganisms. *Curr. Microbiol.* 41, 336-340.
- Falca C-tin, Mircean M, Mot T, Braslasu C M, Giurgiu G, Vlagoiu C, Pop C, Papuc I, Solcan G, Vulpe V. 2011. *Medicina interna a animalelor vol. i. eurostampa*, Timisoara, 67-88.
- Fernandez M., Serrano E., Frutos P., Giraldez F.J., Mantecon A.R. and Liach J.R. 1997. Effect of crina HC supplement upon the rumen degradative activity in sheep. *Info. Technol. Econ. Agric.* 18, 160-162.

Finlay, B.J., G. Estebana, K.J. Clarke, A.G. Williams, T.M. Embley, and R. Hirt. 1994. Some rumen ciliates have endosymbiotic methanogens. *FEMS Microbiol. Lett.* 117: 157-161.

Poreyt WJ. Veterinary parasitology reference manual Owa State University Press, Blackwell Publishing, USA. 2001.

Frankic T., Voljc M., Salobir J., Rezar V., (2009). Use of herbs and spices and their extracts in animal nutrition. *Acta agriculturae Slovenica*, 94/2:95-102.

Garcia-Gonzales R., Lopez S., Fernandez M., and Gonzalez J.S. 2008. Dose-response effects of *Rheum officinale* root and *Frangula alnus* bark on ruminal methane production *in vitro*. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145, 319-334.

Gibbons, R.J. 1958 *Lactobacillus bifidus* var. *ureolyticus*; an obligately anaerobic urea-hydrolyzing bacterium. Ph. D. Thesis, University of Maryland, College Park.

Greathead H. 2003. Plant and plant extract for improving animal productivity. *Proc. Nutr. Soc.* 62, 279-290.

Gurib-Fakim A. 2006. Medicinal plants: tradition of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol. Aspec. Med.* 27, 1-93.

Gutierrez, J. 1953 Numbers and characteristics of lactate utilizing organisms in the rumen of cattle. *J. Bacteriol.*, 66, 123-128.

Gutierrez, J., Davis, R.E., Lindahl, I.L., and Warwick, E.J. 1958 Bacterial changes in the rumen during the onset of feedlot bloat of cattle. *Appl. Microbiol.*, 7, 16-22.

Hackmann, T.J., and J.N. Spain. 2010. Invited review: Ruminant ecology and evolution: Perspectives useful to ruminant livestock research and production. *J. Dairy Sci.* 93: 1320-1334.

Hackstein Johannes. 2010. Endosymbiotic methanogenic archaea. Springer, London, 25-35.

Hart, K.J., D.R. Yanez-Ruiz, S.M. Duval, N.R. McEwan and C.J. Newbold, 2008. Plant extracts to manipulate rumen fermentation. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 147: 8-35.

Heald, P.J. 1952 The fermentation of pentoses and uronic acids by bacteria from the rumen contents of sheep. *Biochem. J.*, 50, 503-508.

Heald, P.J., Krogh, N., Mann, S.O., Appleby, J.C., Masson, F.M., and Oxford, A.E. 1953 A method for direct viable counts of the facultatively anaerobic microflora in the rumen of a sheep maintained on a hay diet. *J. Gen. Microbiol.*, 9, 207-215.

Hegarty, R.S. 1998. Reducing rumen methane emissions through elimination of rumen protozoa. *Aust. J. Agric. Res.* 50: 1321-1328.

Higginbottom, C. and Wheeler, D.W.F. 1954 The incidence of *Streptococcus bovis* in cattle. *J. Agr. Sci.*, 44, 434-442.

Hobson, P.N. and Mann, S.O. 1955 Some factors influencing the formation of iodophilic polysaccharide in group *D streptococci* from the rumen. *J. Gen. Microbiol.*, 13, 420-435.

Hobson, P.N. and Mann, S.O. 1957 Some studies on the identification of rumen bacteria with fluorescent antibodies. *J. Gen. Microbiol.*, 16, 463-471.

Hofmann E.M., Muetzel S. and Becker K. 2003. Effects of *Moringa oleifera* seed extract on rumen fermentation *in vitro*. *Arch. Anim. Nutr.* 57, 65-81.

Hofmann R.R. Evolutionary steps of ecophysiological and diversification of ruminants: a comparative view of their digestive system. *Oecologia*. 1989;78:443-457.

Hossain M.A., Ismail Z., Rahman A., Kang S.C., (2008). Chemical composition and anti-fungal properties of *Orthosiphon stamineus* Benth. *Industrial Crops and Products* 27: 328-334.

Hristov A.N., Mcallister T.A., Van Herk F.H., Cheng K.J., Newbold C.J. and Cheek P.R. 1999. Effect of *Yucca schidigera* on ruminal fermentation and nutrient digestion in heifers. *J. Anim. Sci.* 77, 2554-2563.

Hristov, A.N., and J.P. Jouany. 2005. Factors affecting the efficiency of nitrogen utilization in the rumen, p. 117-166.

Huhtanen, C.N. and Gall, L.S. 1953 Rumen organisms. II. Two lactate utilizers and six miscellaneous types. *J. Bacteriol.*, 65, 554-559.

Hungate, R.E. 1947 Studies on cellulose fermentation. III. The culture and isolation of cellulose-decomposing bacteria from the rumen of cattle. *J. Bacteriol.*, 53, 631-645.

Hungate, R.E. 1950 The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacterial. Revs.*, 14, 1-49.

Hungate, R.E. 1957 Microorganisms in the rumen of cattle fed a constant ration. *Can. J. Microbiol.*, 3, 289-311.

Hungate, R.E., Dougherty, R.W., Bryant, M.P., and Cello, R.M. 1952 Microbiological and physiological changes associated with acute indigestion in sheep. *cornel Vet.* 42, 423-449.

In Pfeffer, E., and A. Hristov (ed.), Nitrogen and phosphorus nutrition of cattle: Reducing the Environmental Impact of Cattle operations. Wallingford, UK: CABI.

Jensen, R.G., Smith, K.L., Edmondson, J.E., and Merilan, C.P. 1956 The characteristics of some rumen *lactobacilli*. *J. Bacteriol.*, 72, 253-258.

Jouany, J.P. 1996. Effect of rumen protozoa on nitrogen utilization by ruminants. *J. Nutr.* 126: 1335s-1346s.

Kadri A., Zarai Z., Chobba I.B., Bekir A., Gharsallah N., Damak M. and Gdoura R. 2011. Chemical constituents and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis*. Essential oil cultivated from south-western Tunisia. *J. Med. Plants Res.* 5, 5999-6004.

Kebede S, *et al.* on farm and abattoir study of lungworm infection of small ruminants in selected areas of Dale district, Southern Ethiopia. *Int J Curr Microbial App Sci.* 2014;3:1139-1152.

Klita P.T., Mathison G.W., Fenton T.W. and Hardin R.T. 1996. Effects of alfalfa root saponins on digestive function in sheep. *J. Anim. Sci.* 74, 1144-1156.

Kozelov, L., F. Tliev, J. Profirov, I.V.S. Nikolov, G. Ganey, T. Modeva and M. Krasteva, 2001. The effect of supplementing sheep with *Ropadiar* on digestibility and fermentation in the rumen. *Zhivotnov. Dni. Nuki.*, 3: 152-154.

Kumar, R., D.N. Kamra, N. Agrawal and L.C. Chaudhary, 2009. Effect of eucalyptus (*Eucalyptus globules*) oil on *in vitro* methanogenesis and fermentation of feed with buffalo rumen liquor. *Anim. Nutr. Feed Technol.*, 9: 237-243.

Lahlou M., (2004). Essential oils and fragrance compounds: bioactivity and mechanisms of action. *Flavour Fragr. J.*, 19:159-165

Lai E.Y., Chyuau C.C., Mau J.L., Chen C.C., Lai Y.J., Shih C.F., Lin L.L., (2004). Antimicrobial activity and cytotoxicity of the essential oil of *Curcuma zedoaria*. *The American Journal of Chinese Medicine* 32: 281-290.

Lambert R.J., W., Scandamis P.N., Coote P.J., Nychas G.J.E. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. appl. Microbial.* 91, 453-3462.

Laura Cristina Stefanut, Laurentiu Ognean, Serban, Niculescu, Pompei Bolfa. 2015. Morphological particularities of population of rumen protozoa in domestic ruminants. Department of animal physiology. University of agricultural sciences and veterinary medicine of Cluj-Napoca, Romania. Bulletin UASVM Vet. Med. 72 (1)/2015 68-73.

Lee S.C., Lee H.J. and Oh Y.K. 2000. Methane production from enteric fermentation in ruminants. Asian-australian J. Anim. Sci. 13, 171-181.

Li T.S.C. 2006. The range of medicinal herbs and spices. Pp.113-125. In Handbook of herbs and spices. K.V. Peter, Ed. Woodhead publishing limited: Cambridge, UK.

Lin, C., L. Raskin, and D.A. Stahl. 1997. Microbial community structure in gastrointestinal tracts of domestic animals: Comparative analysis using rRNA-targeted nucleotide probes. FEMS Microbiol. Ecol. 22: 281-294.

Lodge, J.R., Miles, J.T., Jacobson, N.L., and Quinn, L.Y. 1956 Influence of chlortetracycline on in-vitro cellulose digestion by bovine rumen microorganisms. J. Dairy Sci., 38, 303-311.

Loo A., Richard H., (1992). Nature, origine et propriétés des épices et des aromates bruts. In: Épices et Aromates. Richard H., (ed.), Paris, Lavoisier: 18-22

Lorenzi V., Muselli A., Bernardini A.F., Berti L., Pages J.M., Amaral L. and Bolla J.M. 2009. Geraniol restores antibiotic activities multidrug-resistant isolates from gram-negative species. Anti-microb. Agents. Chemother. 53, 2209-2211.

M. Tajodini, P. Moghbeli, H.R. Saeedi and M. Effati. 2013 The effect of medicinal plants as a feed additive in ruminant nutrition. Iranian Journal of Applied Animal Science 4(4), 681-686.

Machado M., Santoro G., Sousa C., Salgueiro L., Cavaleiro C., (2010). Activity of essential oils on the growth of *Leishmania infantum* promastigotes. Flavour Fragr J 25:156-160.

Macheboeuf, D., D.P. Morgavi, Y. Papon, J.L. Mousset and M. Arturo-Schaan, 2008. Dose-response effects of essential oils on *in vitro* fermentation activity of the rumen microbial population. Anim. Feed Sci. Technol., 145: 335-350.

Maki, L.R. and Foster, E.M. 1957 Effect of roughage in the bovine ration on types of bacteria in the rumen. J. Dairy Sci., 40, 905-913.

Makkar H, McSweeney C S. 2005. Methods in gut microbial ecology for ruminants. Springer, Dordrecht, 67-80.

Makkar H.P.S., Sen S., Blummel M. and Bekker K. 1998. Effects of fractions containing saponins from *Yucca schidigera*, *Quillaja saponaria* and *Acacia auriculiformis* on rumen fermentation. J. Agric. Food Chem. 46, 4324-4328.

Malecky, M., L.P. Broudiscou and P. Schmidely, 2009. Effects of two levels of monoterpene blend on rumen fermentation, terpene and nutrient flows in the duodenum and milk production in dairy goats. Anim. Feed Sci. Technol., 154: 24-35.

Mann, S.O. and Oxford, A.E. 1954 Studies of some presumptive *Lactobacilli* isolated from the rumens of young calves. J. Gen. Microbiol., 11, 83-90.

Mann, S.O. and Oxford, A.E. 1955 Relationships between viable saccharolytic bacteria in rumen and abomasums of the young calf and kid. J. Gen. Microbiol., 12, 140-146.

Mann, S.O., Masson, F.M., and Oxford, A.E. 1954 Effect of feeding Aureomycin to calves upon the establishment of their normal rumen microflora and microfauna. Brit. J. Nutrition, 8, 246-252.

Marino M., Bersani C., Comi G., (1999). Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L., measured using a bioimpedometric method. *J Food Protect*, 62: 1017-1023

Marston, H.W. 1958 Report on conference on rumen function. U. S. Dept. Agr., Washington, D. C.

Martinez S., Madrid J., Hernandez F., Megias M.D., Sotomayor J.A. and Jordan M.J. 2006. Effect of thyme essential oils and monensin on *in vitro* ruminal degradation and volatile fatty acid production. *J. Agric. Food Chem.* 54, 6598-6602.

Marvin P. Bryant. Bacterial species of the rumen. 1959.

McKay, D.L. and J.B. Blumberg, 2006. A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). *Phytother Res.*, 20: 519-530.

Melo A.C.F.L., Reis I.F., Bevilacqua C.M.L., Vieira L.S., Echevarria F.A.M., Melo L.M., (2003). Nematodeos resistentes a anti-helminticos em rebanhos de ovinos e caprinos do estado do Ceara, Brazil, *Cienc. Rur*, 33, 339-344.

Meyer, N.F., G.E. Erickson, T.J. Klopfenstein, M.A. Greenquist, M.K. Luebke, P. Williams and M.A. Engstrom, 2009. Effect of essential oils, tylosin and monensin on finishing steer performance, carcass characteristics, liver abscesses, ruminal fermentation and digestibility. *J. Anim. Sci.*, 87: 2346-2354.

Molnar, A., E. Lemberkovics and S. Spiller, 1997. Detection of caraway and chamomile components in goat milk. *Tcjqazdasq*, 57: 22-27.

Mugle K., 2016 Aspects and asserts of rumen microbiology. *Journal of veterinary sciences*. Pp 38-40.

Muller, M., M. Mentel, J.J. van Hellemond, K. Henze, C. Woehle, S.B. Gould, R.Y. Yu, M. Van der Giezen, A.G. Tielens, and W.F. Martin. 2012. Biochemistry and evolution of anaerobic energy metabolism in eukaryotes. *Microbial. Mol. Boil. Rev.*, 76: 444-495.

Nagy G.J., Tengerdy R.P. 1968. Antibacterial action of essential oils of *Artemisia* as an ecological factor. II. Antibacterial action of the volatile oils of *Artemisia tridentata* on bacteria from the rumen of mulc deer. *Appl. Microbial*. 16, 441-444.

Nes I.F., Skjelkvale R., (1982). Effect of natural spices and oreoresins on *Lactobacillus plantarum* in the fermentation of dry sausage. *Journal of food Science*, 47: 1618-1625.

Newbold, C.J, F.M. McIntosh, P. Williams, R. Losa and R.J. Wallace, 2004. Effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. *Anim. Feed Sci. technol.* 114, 105-112.

Newbold, C.J., B Lassalas, and J.P. Jouany. 1995. The importance of methanogens associated with ciliate protozoa in ruminal methane production *in vitro*. *Lett. Appl. Microbial*. 21: 230-234.

Noni, I.D. and G. Battelli, 2008. Terpenes and fatty acid profiles of milk fat and Bitto cheese as affected by transhumance of cows on different mountain pastures. *Food Chem.*, 109: 299-309.

Ogimoto, K., and S. Imai. 1981. Atlas of rumen microbiology. Tokyo, Japan: Japan Scientific Societies Press.

Ognean L, Cernea Laura Cristina. 2011. Aplicatii practice in fiziologia animalelor. AcademicPres, Cluj-Napoca, 184-187.

Ognean L, Dojana N, Rosioru Corina. 2004. Fiziologia animalelor vol. i. Presa universitara clujeana, Cluj- Napoca, 102-118.

Oh H.K., Sakai T., Jones M.B. and Longhurst W.M. 1967. Effect of various essential oils isolated from Douglas fir needles upon sheep and deer rumen microbial activity. *Appl. Microbiol.* 15, 777-784.

Opperman, R.A., Nelson, W.O., and Brown, R.E. 1957 *In vitro* studies on methanogenic rumen bacteria. *J. Dairy Sci.*, 40, 779-788.

Orwa C, *et al.* agroforestry database: a tree reference and selection guide version 4.0. 2009.

Ozturk H., Demirtas A., Salgirli Y., Pekman M., Emre B. and Fidanci U.R. 2012. Effects of olive leaf extracts on rumen microbial fermentation in *in vitro* semi-continuous culture system. *Ankara Univ. Vet. Fak. Derg.* 59, 17-21.

Pamo TE, *et al.* nutritive values of some basic grasses and leguminous tree foliage of the centre region of Africa. *J. Anim. Feed Sci. Technol.* 2007;135:273-282.

Panayota-Pencheva MS and Alexandrov MT. Some pathological features of lungs from domestic and wild ruminants with single and mixed protostrongylid infections. *Vet. Med. Int.* 2010;74:1062.

Panayota-Pencheva MS. Species composition and morphology of protostrongylids (Nematoda: Protostrongylidae) in ruminants from Bulgaria. *Parasitol. Res.* 2011;109:1015-1020.

Patra A.K., Kamra D.N. and Agarwal N. 2005. Effect of spices on rumen fermentation, methanogenesis and protozoa counts in *in vitro* gas production test. Pp. 115-118 in *Proc. 2nd Int. Conf. Greenhouse Gases Anim. Agric.* ETH Zurich, Zurich, Switzerland.

Patra, A.K. and J. Saxena, 2010. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in ruminants. *Phytochemistry*, 71: 1198-1222.

Pauli, A., (2006). α -bisabolol from chamomile—a specific ergosterol biosynthesis inhibitor? *International Journal of Aromatherapy* 16, 21–25

Pederson, C.S. 1945 The fermentation of glucose by certain gram-positive, non-sporeforming, anaerobic bacteria. *J. Bacteriol.*, 475-479.

Perry, K.D. and Briggs, C.A.E. 1957 The normal flora of the bovine rumen. IV. Qualitative studies of *Lactobacilli* from cows and calves. *J. Appl. Bacteriol.*, 20, 119-123.

Peterson D. 1999. Rumen ciliates. *Alaska science consortium, Great Northern science handbook*, 1-13.

Pine, L. and Howell, A. 1956 Comparison of physiological and biochemical characteristics of *Actinomyces* spp. with those of *Lactobacillus bifidus*. *J. Gen. Microbiol.*, 15, 428-445.

Prins AR, Stewart CS. 1994. Micro-organism in ruminant nutrition. Nottingham university, Nottingham, 125-153, 174-198.

Regassa A, *et al.* lungworm infection in small ruminants: Prevalence and associated risk factors in Dessie and Kombolcha districts. Northeastern Ethiopia. *Veterinary Parasitology*. 2010;169:144-148.

Reichling J., Schnitzler P., Suschke U., Saller R., (2009). Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral and cytotoxic properties—an overview. *Forsch. Komplementmed* 16:79-90.

Rowe A.J., Wulff C., Fraser H.M., (2004). Angiogenesis and microvascular development in the marmoset (*Callithrix jacchus*) endometrium during early pregnancy. *Reproduction* 128: 107-116

Rusell, J.B., H.J. Strobel and G. Chen, 1988. Enrichment and isolation of a ruminal bacterium with a very high specific activity of ammonia production. Appl. Microbiol. 54 (4) : 872-877.

Sallam, S.M.A., I.C.S. Bueno, P. Brigide, P.B. Godoy, D.M.S.S. Vitti and A.L. Abdalla, 2009. Efficacy of eucalyptus oil on *in vitro* rumen fermentation and methane production. Options Mediterraneennes, 85: 267-272.

Santos F.A., Rao V.S.N., (2000). Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. Phytother. res. 14: 240-244.

Santos, M.B., P.H. Robinson, P. Williams and R. Losa, 2010. Effects of addition of an essential oil complex to the diet of lactating dairy cows on whole tract digestion of nutrients and productive performance. Anim. Feed Sci. Technol., 157: 64-71.

Sertkaya E., Kaya K., Soylu S., (2010). Acaricidal activities of the essential oils from several medicinal plants against the carmine spider mite (*Tetranychus cinnabarinus* Bois.) (Acarina: Tetranychidae). Industrial Crops and Products 31: 107-112.

Seung-Joo L., Umamo K., Shibamoto T., Kwang-Geun L., (2005). Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. Food Chemistry 91: 131-137.

Smith, P.H. and Hungate, R.E. 1958 Isolation and characterization of *Methanobacterium ruminantium*, n. sp. J. Bacteriol., 75, 713-718.

Soliva, C.R., S. Widmer and M. Kreuzer, 2008. Ruminal fermentation of mixed diets supplemented with St. Johns Wort (*Hypericum perforatum*) flowers and pine (*Pinus mugo*) oil or mixtures containing these preparations. J. Anim. Feed Sci., 17: 352-362.

Soloranzo-Santos F. and Miranda-Novales M.G. 2012. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. Curr. Opin. Biotechnol. 23, 136-141.

Stumm, C.K., H.J. Gijzen, and G.D. Vogels. 1982. Association of methanogenic bacteria with ovine rumen ciliates. Br. J. nutr. 47: 95-99.

Sultana N. Huque K.S. and Alimon A.R. 2012 Effects of Sapidismukorossi as herbal feed additive for ruminants. Mal. J. Anim. Sci. 15, 37-44.

Sylvester, J.T., S.K. Kaqmati, Z. Yu, C.J. Newbold, and J.L. Firkins. 2005. Evaluation of a real time PCR assay quantifying the ruminal pool size and duodenal flow of protozoal nitrogen. J. Dairy Sci. 88: 2083-2095.

Taylor MA, *et al.* Veterinary Parasitology (3rd and.) Blackwell Publishing Ltd. 2007.

Tassoul, M.D. and R.D. Shaver, 2009. Effect of a mixture of supplemental dietary plant essential oils on performance of periparturient and early lactation dairy cows. J. Dairy Sci., 92: 1734-1740.

Tatsouka, N., K. Hara, K. Mlkuni, K. Hara, H. Hashimoto and H. Itabashi, 2008. Effects of the essential oil cyclodextrin complexes on ruminal methane production *in vitro*. Anim. Sci. J., 79: 68-75.

Teferi *et al.* Management and utilization of browse species as livestock feed in semi-arid Woreda of North Ethiopia. 2008. Volume 20, Article #86. Retrieved November 12, 2017.

Terefe Y, *et al.* prevalence of lungworm infection in small ruminants in North Gondar zone, Amhara National Regional State, Ethiopia. J Parasitol Vector Biol 2013;5:40-45.

- Thrusfield M veterinary epidemiology (3rd edn.) Blakwell Science, UK 2005.
- Tolouee M., Alinezhad S., Saberi R., Eslamifard A., Javad Zad S., Jaimand K., Taeb J., Rezaee M., Kawachi M., Ghahfarokhi M., Razzaghi-Abyaneh M., (2010). Effect of 170Matricaria chamomilla L. flower essential oil on the growth and ultrastructure of *Aspergillus niger* van Tieghem. International Journal of Food Microbiology 139: 127–133.
- Urdang G., (1948). The origin and development of the essential oil industry. In the essential oils pp 3-13 Ed E Guenther. Van Nostrand Reinhold Company, New York.
- Van Der Wath, J.G. 1948 Studies on the alimentary tract of Merino sheep in South Africa. XI. Digestion and synthesis of starch by ruminal bacteria. Onderstepoort J. Vet. Sci. Animal Ind., 23, 367-384.
- Van Soest P.J. Nutritional ecology of the ruminant. O and B books, Corvallis, Oregon, USA. 1982.
- Vicuna G.C., Stashenko E.E., Fuentes J.L., (2009). Chemical composition of the *Lippia origanoides* essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage. Fitoterapia.
- Walked-Brown SW and Kahn LP. Nutritional modulation of resistance and resilience to gastrointestinal nematode infection: a review. Asian-Aust J anim. Sci. 2002;15:912-924.
- Wallace, R.J., 2004. Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. Proc. Nutr. Soc. 63, 621-629.
- Wallace, R.J., N.R. McEwan, F.M. McInotuch, B. Teferedegne and C.J. Newbold, 2002. Natural products as manipulators of rumen fermentation. Asian Aust. J. Anim. Sci., 10: 1458-1468.
- Wang C.J., S.P. Wang and H. Zhou, 2009. Influences of flavomycin, ropadiar and saponin on nutrient digestibility, rumen fermentation and methane emission from sheep. Anim. Feed Sci. Technol., 148: 157-166.
- Wenk C. 2000. Why all discussion about herbs? Biotechn in the feed industry. Pp. 79-96 in Proc. 16th Ann. Symp. Technol. Publ. Nottingham Univ. Press. Nicholasville, KY.
- Weimer P. 1996. Ruminal cellulolytic bacteria. Academic Press, New York, 18.
- Williams AG, Coleman GS. 1992. The rumen protozoa. Springer, London, 23-50, 81-89, 112-170, 225-280.
- Williams, A.G., and G.S. Coleman. 1992. The rumen protozoa. New York: Springer-Verlag.
- Williams, A.G., and G.S. Coleman. 1997. The rumen protozoa, p. 73-139. In hobson, P.N., and C.S. Stewart (ed.), The rumen microbial ecosystem, 2nd ed. New York: Blackie Academic & Professional.
- Yang W.Z., Ametaj B.N., Benchaar C., He M.L., Beauchemin K.A., (2010). Cinnamaldehyde in feedlot cattle diets: intake, growth performance, carcass characteristics and blood metabolites. J. Anim. Sci., 88: 1082-1092.
- Yang, W.Z., C. Benchaar, B.N. Ametaj, A.V. Chaves, M.L. He and T.A. McAllister, 2007. Effects of garlic and juniper berry essential oils on ruminal fermentation and on the site and extent of digestion in lactating cows. J.Dairy Sci., 90:5671-5681.
- Yanishlieva N., Marinova E., Pokorny J (2006). Natural antioxidants from herbs and spices. Eur.J.Lipid. Sci.Technol. 108: 776-793

Δολγηρά Ιωάννα. Effects of Essential Oils on rumen and Ruminant Production. 2016. Pp. 17-35.

Δρ Ι. Νικολακάκης. Εφαρμοσμένη διατροφή μηρυκαστικών ζώων. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης. 2014.

Ζέρβας Π. Γεώργιος. Φυσιολογία θρέψης παραγωγικών ζώων. 2005

Κανδύλης Κωνσταντίνος. Πέψη και Μεταβολισμός στα μηρυκαστικά. 2006. Σελ. 90-92, 97-101, 113-114, 123-124.

Σκουμπής Γ.Β., (1985). Αρωματικά φυτά και αιθέρια έλαια. Εκτύπωση

Σκουμπής Γ.Β., (1998). Αρωματικά, φαρμακευτικά και μελισσοτροφικά φυτά της Ελλάδας. Εκδόσεις Αγρότυπος, Αθήνα.

Παρασκευάκης Κ.Νικόλαος, 2014. Επίδραση των αιθέριων ελαίων της ρίγανης στα ζυμωτικά φαινόμενα και στην γαλακτοπαραγωγή αιγών. Σελ. 14-29.