

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Renata KOCBEK

**VPLIV IONOFORNEGA ANTIBIOTIKA  
MONENZINA NA NEKATERE FENOTIPSKE  
ZNAČILNOSTI IZBRANIH BAKTERIJSKIH SEVOV  
IZ VAMPA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2007

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Renata KOCBEK

**VPLIV IONOFORNEGA ANTIBIOTIKA MONENZINA NA  
NEKATERE FENOTIPSKE ZNAČILNOSTI IZBRANIH  
BAKTERIJSKIH SEVOV IZ VAMPA**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**THE EFFECT OF IONOPHORE ANTIBIOTIC MONENSIN ON  
SOME PHENOTYPIC CHARACTERISTICS OF SELECTED  
RUMEN BACTERIAL STRAINS**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2007

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija kmetijstvo - zootehniko. Opravljeno je bilo v laboratorijih Katedre za mikrobiologijo in mikrobeno biotehnologijo na Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za dodiplomski študij Oddelka za zootehniko je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Gorazda Avguština.

Recenzent: prof. dr. Janez SALOBIR

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:                   prof. dr. Jurij POHAR  
                                       Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član:                           prof. dr. Janez SALOBIR  
                                       Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član:                           prof. dr. Gorazd AVGUŠTIN  
                                       Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Renata Kocbek

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579(043.2)=163.6
KG	mikrobiologija/vamp/bakterije/bakterijski sevi/antibiotiki/monenzin/fenotipske lastnosti
KK	AGRIS /
AV	KOCBEK, Renata
SA	AVGUŠTIN, Gorazd (mentor)
KZ	SI-1230 Domžale, Groblje 3
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
LI	2007
IN	VPLIV IONOFORNEGA ANTIBIOTIKA MONENZINA NA NEKATERE FENOTIPSKE ZNAČILNOSTI IZBRANIH BAKTERIJSKIH SEVOV IZ VAMPA
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	X, 69 str., 10 pregl., 21 sl., 1 pril., 152 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Diplomska naloga je bila vključena v širšo raziskavo, v kateri smo primerjali vpliv ionofornega antibiotika monenzina in treh rastlinskih izvlečkov kot nadomestnih snovi za monenzin na izbrane vampne bakterijske vrste. Monenzin, katerega uporaba je v EU od leta 2006 prepovedana, je v raziskavi služil kot referenca. V okviru pričajoče diplomske naloge smo s spremeljanjem optične gostote, pH vrednosti, koncentracije skupnih celičnih proteinov ter produkcije kratkoverižnih maščobnih kislin in vodika poskušali ugotoviti, kako monenzin vpliva na metabolizem, hitrost in obseg rasti šestih bakterijskih sevov. Te smo gojili v prisotnosti dveh ( <i>Prevotella bryantii</i> B <sub>1</sub> 4 <sup>T</sup> , <i>Prevotella ruminicola</i> 23 <sup>T</sup> , <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> 3071 <sup>T</sup> in <i>Fibrobacter succinogenes</i> S85) oziroma treh ( <i>Ruminococcus albus</i> 20455, <i>Ruminococcus flavefaciens</i> 007 S/6) koncentracij monenzina. Rezultati so pokazali, da je monenzin v koncentracijah 1,25 µM in 12,5 µM precej ( <i>P. ruminicola</i> 23 <sup>T</sup> ) oziroma popolnoma ( <i>B. fibrisolvens</i> 3071 <sup>T</sup> in <i>F. succinogenes</i> S85) inhibiral rast in tvorbo fermentacijskih produktov pri vseh preučevanih sevih. Rast <i>P. bryantii</i> B <sub>1</sub> 4 <sup>T</sup> pa je bila tudi pod vplivom monenzina v 12,5 µM koncentraciji le delno inhibirana. Seva <i>R. flavefaciens</i> 007 S/6 in <i>R. albus</i> 20455 smo izpostavljali nižjim koncentracijam monenzina (0,25 µM, 0,125 µM in 0,025 µM) in pri tem se je izkazalo, da monenzin v koncentraciji 0,025 µM skoraj ni vplival na preučevane parametre pri obeh ruminokokih. Pri <i>R. flavefaciens</i> 007 S/6 sta 0,25 µM in 0,125 µM koncentraciji monenzina inhibirali rast in aktivnosti delno, pri <i>R. albus</i> 20455 pa močno. Izkazalo se je, da je monenzin v vseh koncentracijah stimuliral produkcijo vodika pri <i>R. albus</i> 20455, za kar lahko vzrok najdemo v odcepu vodika iz raztopine monenzina v etanolu ali močno spremenjenem metabolizmu organizma v prisotnosti antibiotika monenzina.

#### KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDC 579(043.2)=163.6  
CX microbiology/rumen/bacteria/bacterial strains/antibiotics/monensin/phenotypic characteristics  
CC AGRIS /  
AU KOCBEK, Renata  
AA AVGUŠTIN, Gorazd (supervisor)  
PP SI-1230 Domžale, Groblje 3  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Zootechnical Department  
PY 2007  
TI THE EFFECTS OF IONOPHORE ANTIBIOTIC MONENSIN ON SOME PHENOTYPIC CHARACTERISTICS OF SELECTED RUMEN BACTERIAL STRAINS  
DT Graduation Thesis (University studies)  
NO X, 69 p., 10 tab., 21 fig., 1 ann., 152 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB Graduation thesis presents a part of a wider research project, where the effect of ionophore antibiotic monensin and three plant extracts as alternatives to feed antibiotics on selected rumen bacterial strains was studied. Monensin, which has been banned in EU since 2006, has served as a reference in this research. We focused on the effects of monensin on some phenotypic characteristics of six selected rumen bacterial strains. During the experiment we observed how monensin influenced the rate and extent of growth of strains, by optical density measurement, measurement of pH, total cell protein concentration, production of short chain fatty acids and hydrogen production. The selected bacterial strains were exposed to two (*Prevotella bryantii* B<sub>14</sub><sup>T</sup>, *Prevotella ruminicola* 23<sup>T</sup>, *Butyrivibrio fibrisolvens* 3071<sup>T</sup> in *Fibrobacter succinogenes* S85) or three (*Ruminococcus albus* 20455, *Ruminococcus flavefaciens* 007 S/6) concentrations of monensin, respectively. The results have shown that monensin in concentrations 1.25 µM and 12.5 µM significantly (*P. ruminicola* 23<sup>T</sup>) or completely (*B. fibrisolvens* 3071<sup>T</sup> and *F. succinogenes* S85, respectively) inhibited growth and fermentation process. Growth of *P. bryantii* B<sub>14</sub><sup>T</sup> was only partly inhibited by 12.5 µM concentration of monensin. Strains *R. flavefaciens* 007 S/6 and *R. albus* 20455 were exposed to lower concentrations of monensin (0.25 µM, 0.125 µM and 0.025 µM). We concluded that monensin in 0.025 µM concentration had no effects on observed parameters. Monensin in concentrations 0.25 µM and 0.125 µM partly inhibited growth of *R. flavefaciens* 007 S/6, but the same concentrations significantly inhibited growth of *R. albus* 20455. Monensin stimulated hydrogen production of *R. albus* 20455 in all concentrations, the possible reason is hydrogen separation from the solution of monensin in ethanol, or metabolic shift of the organism in the presence of antibiotic monensin.

## KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	IX
Kazalo prilog	X
Okrajšave in simboli	X
<b>1 UVOD</b>	1
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	2
2.1 PREŽVEKOVALCI	2
<b>2.1.1 Pomen prežvekovalcev</b>	2
<b>2.1.2 Anatomija in fiziologija prebavil prežvekovalcev</b>	2
2.2 VAMPNI MIKROBNI EKOSISTEM	4
<b>2.2.1 Vampne bakterije</b>	4
2.2.1.1 Bakterije iz rodu <i>Prevotella</i>	5
2.2.1.2 Vrsta <i>Fibrobacter succinogenes</i>	6
2.2.1.3 Vrste iz rodu <i>Ruminococcus</i>	6
2.2.1.4 Vrsta <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	7
<b>2.2.2 Vampne arheje</b>	7
<b>2.2.3 Vampne praživali in glive</b>	8
<b>2.2.4 Dinamika vampnega ekosistema</b>	8
<b>2.2.5 Producija plinov</b>	9
2.3 MANIPULACIJA VAMPNIH FERMENTACIJ	10
<b>2.3.1 Cilji manipulacije vampnih fermentacij</b>	11
<b>2.3.2 Manipulacija vampnih fermentacij</b>	12
2.3.2.1 Posegi na nivoju krme	12
2.3.2.2 Posegi na nivoju fiziologije prežvekovalcev	13
2.3.2.3 Posegi na nivoju mikrobnih simbiontov	13
2.4 VAMPNI MODIFIKATORJI	14
<b>2.4.1 Ionoftorni antibiotiki</b>	14

2.4.1.1	Razvrstitev ionoforov	15
2.4.1.2	Učinki ionofornih antibiotikov	16
2.4.1.3	Antimikrobnna aktivnost ionoforov	18
2.4.1.4	Odpornost bakterij na antibiotike	19
2.4.1.5	Monenzin	20
<b>2.4.2</b>	<b>Neionoforni antibiotiki</b>	23
<b>2.4.3</b>	<b>Nevtralizirajoči agensi – pufri</b>	24
<b>2.4.4</b>	<b>Inhibitorji proteolize, peptidolize in deaminacije</b>	24
<b>2.4.5</b>	<b>Metanski inhibitorji</b>	25
<b>2.4.6</b>	<b>Rastni dejavniki</b>	25
<b>2.4.7</b>	<b>Maščobe</b>	25
<b>2.4.8</b>	<b>Mikrobeni prehranski dodatki in encimi</b>	25
<b>2.4.9</b>	<b>Rastlinski izvlečki</b>	26
<b>3</b>	<b>MATERIALI IN METODE</b>	27
3.1	MATERIALI	27
3.1.1	Bakterijski sevi	27
3.1.2	Gojišče M2	27
3.1.3	Raztopine in pufri	29
3.2	METODE	29
3.2.1	Gojenje čistih bakterijskih kultur	29
3.2.2	Barvanje po Gramu	29
3.2.3	Merjenje optične gostote tekočih kultur	30
3.2.4	Merjenje pH vrednosti	31
3.2.5	Ugotavljanje koncentracije celičnih proteinov po Lowry-ju	31
3.2.6	Etrska ekstrakcija kratkoverižnih maščobnih kislin	33
3.2.7	Plinska kromatografija plinov ( $H_2$ in $CO_2$ ) in ekstrahiranih KMK	33
3.2.8	Statistična analiza – Studentov t- test	34
3.2.9	Shema eksperimenta	35
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b>	40
4.1	RASTNE KRIVULJE	40
4.2	MERJENJE OPTIČNE GOSTOTE ZA VSAK SEV POSEBEJ	41
4.3	MERJENJE pH VREDNOSTI ZA VSAK SEV POSEBEJ	43

4.4	UGOTAVLJANJE KONCENTRACIJE CELIČNIH PROTEINOV PO RASTI VAMPNIH BAKTERIJSKIH SEVOV V GOJIŠČU Z IN BREZ MONENZINA	45
4.5	UGOTAVLJANJE KONCENTRACIJE KMK PO RASTI V PRISOTNOSTI MONENZINA	47
4.6	UGOTAVLJANJE KONCENTRACIJE VODIKA PO RASTI <i>R. albus</i> 20455 V PRISOTNOSTI MONENZINA	50
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	51
5.1	RAZPRAVA	51
5.1.1	Spremljanje rasti bakterijskih sevov s pomočjo OD vrednosti	51
5.1.2	Spremljanje rasti bakterijskih sevov s pomočjo pH vrednosti	52
5.1.3	Spremljanje rasti bakterijskih sevov s pomočjo ugotavljanja koncentracije celičnih proteinov	53
5.1.4	Spremljanje rasti bakterijskih sevov s pomočjo ekstrakcije KMK	54
5.1.5	Spremljanje rasti bakterijskih sevov s pomočjo produkcije vodika	54
5.2	SKLEPI	55
<b>6</b>	<b>POVZETEK</b>	58
<b>7</b>	<b>VIRI</b>	60
	<b>ZAHVALA</b>	
	<b>PRILOGE</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Bakterijski sevi in njihove značilnosti	27
Preglednica 2: Sestavine za pripravo gojišča M2	28
Preglednica 3: Sestavine za pripravo mineralnih raztopin	28
Preglednica 4: Raztopine in pufri, uporabljeni v poskusu	29
Preglednica 5: Umeritvena krivulja standardnih koncentracij BSA	32
Preglednica 6: Sestava kalibracijske raztopine za umeritev plinskega kromatografa pri določanju KMK	34
Preglednica 7: Studentova porazdelitev t	35
Preglednica 8: Določanje točk v fazi rasti, v katerih smo opravljali meritve	36
Preglednica 9: Inokulacija tekočih gojišč z izbranimi sevi	37
Preglednica 10: Koncentracije KMK, deleži posameznih KMK in OD vrednosti	47

## KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Sestava prebavil ter pot krme skozi prebavila prežvekovalcev	3
Slika 2: Celična stena Gram pozitivne in Gram negativne bakterije	5
Slika 3: Sestava izrighanih plinov	10
Slika 4: Fermentacija v prebavilih	11
Slika 5: Tipi ionofornih antibiotikov glede na način transporta	14
Slika 6: Mobilni prenašalci in kanali kot hidrofilne pore za prehod ionoforov	16
Slika 7: Možni učinki ionoforov v vampu	16
Slika 8: Kemijska zgradba monenzina	20
Slika 9: $\text{Na}^+/\text{K}^+$ črpalka v celici	21
Slika 10: Možni učinki ionofornega antibiotika (I) na ionski tok čez membrano celice	22
Slika 11: Shema poskusa	38
Slika 12: Rastne krivulje za vseh šest sevov	40
Slika 13: Merjenje OD vrednosti za seve <b>A</b> <i>P. ruminicola</i> 23 <sup>T</sup> , <b>B</b> <i>P. bryantii</i> B <sub>1</sub> 4 <sup>T</sup> , <b>C</b> <i>B. fibrisolvens</i> 3071 <sup>T</sup> in <b>D</b> <i>F. succinogenes</i> S85	41
Slika 14: Merjenje OD vrednosti za seva <b>A</b> <i>R. flavefaciens</i> 007 S/6 in <b>B</b> <i>R. albus</i> 20455	42
Slika 15: Merjenje pH vrednosti za seve <b>A</b> <i>P. ruminicola</i> 23 <sup>T</sup> , <b>B</b> <i>P. bryantii</i> B <sub>1</sub> 4 <sup>T</sup> , <b>C</b> <i>B. fibrisolvens</i> 3071 <sup>T</sup> in <b>D</b> <i>F. succinogenes</i> S85	43
Slika 16: Merjenje pH vrednosti za seva <b>A</b> <i>R. flavefaciens</i> 007 S/6 in <b>B</b> <i>R. albus</i> 20455	44
Slika 17: Koncentracija celičnih proteinov glede na OD vrednost za seva <b>A</b> <i>P. ruminicola</i> 23 <sup>T</sup> in <b>B</b> <i>P. bryantii</i> B <sub>1</sub> 4 <sup>T</sup>	45
Slika 18: Koncentracija celičnih proteinov glede na OD vrednost za seva <b>A</b> <i>R. flavefaciens</i> 007 S/6 in <b>B</b> <i>R. albus</i> 20455	46
Slika 19: Koncentracija ekstrahiranih KMK za seva <b>A</b> <i>P. ruminicola</i> 23 <sup>T</sup> in <b>B</b> <i>P. bryantii</i> B <sub>1</sub> 4 <sup>T</sup>	48
Slika 20: Koncentracija ekstrahiranih KMK za sev <i>R. albus</i> 20455	49
Slika 21: Koncentracija vodika in OD vrednost za sev <i>R. albus</i> 20455	50

## KAZALO PRILOG

Priloga A: Preglednica OD (654 nm) za rastne krivulje

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	absorbanca
AK	aminokislina
ATP	adenozin trifosfat
BSA	goveji serumski albumin; angl. <i>bovine serum albumin</i>
CHO	ogljikovi hidrati; angl. <i>carbohydrates</i>
Da	Dalton
DAP	dipeptidil aminopeptidaza
KMK	kratkoverižna maščobna kislina; angl. <i>short chain fatty acid (SCFA)</i>
LPS	lipopolisaharidni sloj
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
ml	mililiter
mM	milimol
mV	milivolt
MON	monenzin
nm	nanometer
NPN	neproteinski dušik; angl. <i>non-protein nitrogen</i>
OD	optična gostota; angl. <i>optical density</i>
OD <sub>max</sub>	maksimalna optična gostota
PBS	fosfatno zapufrana slana raztopina; angl. <i>phosphate-buffered saline</i>
rpm	rotations per minute (število obratov v minuti)
T	transmitanca
ut. %	utežni odstotek [w/v]
V	volumen [L]
vol. %	volumski odstotek [v/v]
λ	valovna dolžina [nm]
µl	mikroliter
µm	mikrometer
µM	mikromol

## 1 UVOD

Krma prežvekovalcev vsebuje polisaharide rastlinskih celičnih sten, ki jih sami prežvekovalci brez hidrolitičnih encimov mikrobnih simbiontov ne morejo razgraditi (McDonald in sod., 1995). Izmed vseh rastlinojedov so prav prežvekovalci tisti, katerim simbioza z vampnimi mikroorganizmi omogoča najučinkovitejše pretvarjanje prehransko manj kakovostne in z beljakovinami revne krme v prehransko bogat proizvod. Mikroorganizmi, ki naseljujejo vamp in so izjemnega pomena za gostitelja, so bakterije, arheje, glive, praživali in virusi. Njihova simbioza v prvi vrsti omogoča preživetje, določa pa tudi stopnjo produktivnosti živali, na katero rejci lahko vplivajo na različne načine: (i) na nivoju krme z različnimi postopki obdelave (vpliv na hranilno vrednost krme in mesto razgradnje); (ii) na nivoju fiziologije prežvekovalcev – prežvekovanje, slinjenje, izrigavanje, regulacija apetita; in (iii) na nivoju vampnih mikroorganizmov – s krmnimi dodatki, z manipulacijo fermentacije s pomočjo vampnih modifikatorjev v krmi. Tako lahko modificiramo mikrobeno populacijo v smislu zatiranja neželenih procesov (npr. produkcije metana, ki predstavlja energijsko in snovno izgubo) ali pa stimuliramo željene procese (npr. mikrobeno sintezo beljakovin). S tem pripomoremo k boljšemu izkoristku krme, kar vodi v izboljšano produktivnost živali (večja mlečnost in mesnatost, več volne), zmanjšamo pa tudi stroške reje. Spreminjanje obstoječe mikrobenne populacije z dodajanjem prehranskih antibiotikov se je izkazalo za učinkovito, vendar je njihova uporaba v EU s 01.01.2006 prepovedana zaradi možnosti razvoja bakterijskih rezistenc na uporabljene antibiotike in horizontalnega prenosa genov za rezistenco na patogene seve ter zaradi nevarnosti kopijenja antibiotikov v mesu in mleku. Na področju manipulacije vampne mikroflore v zadnjem času intenzivno preučujemo ugodne vplive probiotikov, prebiotikov in rastlinskih izvlečkov kot alternative krmnim antibiotikom.

Namen te diplomske naloge je bil s klasičnimi mikrobiološkimi in biokemijskimi metodami preučiti vpliv ionofornega antibiotika monenzina na nekatere fenotipske značilnosti šestih izbranih sevov vampnih bakterij (*Prevotella bryantii* B<sub>14</sub><sup>T</sup>, *Prevotella ruminicola* 23<sup>T</sup>, *Ruminococcus albus* 20455, *Ruminococcus flavefaciens* 007 S/6, *Butyrivibrio fibrisolvens* 3071<sup>T</sup> in *Fibrobacter succinogenes* S85), gojenih v čistih kulturah. Naš cilj je bil ugotoviti, kako monenzin vpliva na rast, vsebnost proteinov, produkcijo vodika (prekursor za produkcijo metana) in kratkoverižnih maščobnih kislin pri posameznem sevu. V poskusu je monenzin služil kot referenca, na podlagi katere smo oziroma bomo lahko ocenjevali učinkovitost uporabe rastlinskih izvlečkov in drugih krmnih dodatkov.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 PREŽVEKOVALCI

#### 2.1.1 Pomen prežvekovalcev

Govedo sodi v družino *Bovidae*, ki je ena izmed štirih družin podreda *Ruminantia* (prežvekovalci). So rastlinojadi in sodijo v red sodoprstih kopitarjev (*Artiodactyla*). Za podred prežvekovalcev je značilno, da imajo vse pripadajoče živalske vrste štiridelni želodec (tri predželodci in pravi želodec) in da prežvekujejo (Žgajnar, 1990). Njeni predstavniki so govedo, koze, ovce, antilope in drugi. Prežvekovalci so zanimivi predvsem zaradi prilagoditve na izkoriščanje krme, bogate s celulozo (simbioza z vampni simbionti), kar jim daje selektivno prednost pred drugimi rastlinojadi, ki manj učinkovito izkoriščajo tovrstno krmo (Ramšak, 2000).

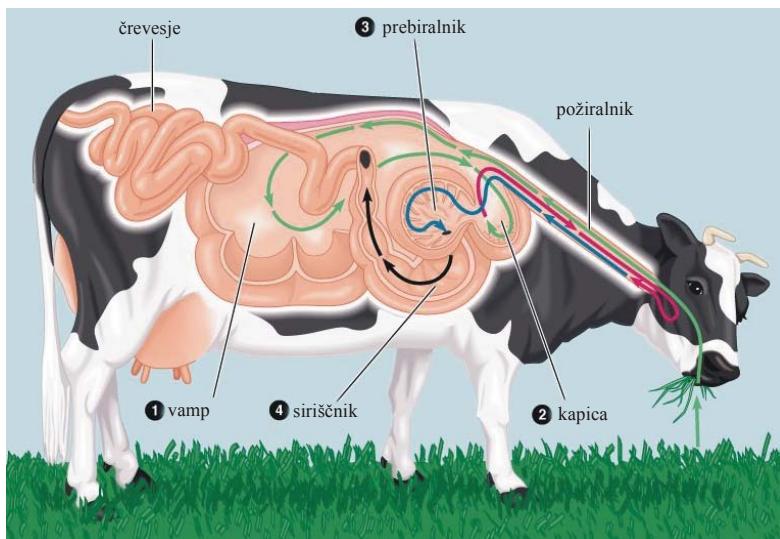
#### 2.1.2 Anatomija in fiziologija prebavil prežvekovalcev

Prežvekovalci imajo svojevrstno sestavo prebavil, ki so zgrajena iz treh predželodcev (vamp (*rumen*), kapica (*reticulum*) in prebiralnik (*omasum*)) ter pravega želodca (siriščnik (*abomasum*)) (slika 1). Pri prežvekovalcih poteka fermentacija v predželodcih, po čemer se razlikujejo od monogastričnih organizmov, pri katerih je fermentacija krme poželodčna (slepo in debelo črevo). Daljše zadrževanje krme v predželodcih je vzrok za boljšo prebavljuivost krme in s tem večji izkoristek energije (Janis, 1976).

Vamp je največji predželodec, katerega prostornina zavzema od 100 do 150 l pri govedu oziroma 6 do 10 l pri ovkah, kar znaša okoli 50 % prostornine vseh prebavil. Sestavlja ga posamezne vampove vreče, razdeljene na dorzalne in ventralne. Sistem predželodcev je zgrajen tako, da je sposoben močnih kontrakcij in mešanja vampne vsebine. Notranjo površino vampa in s tem absorpcijo povečujejo listaste, nitaste in kijasto oblikovane papile. Kapica je deloma ločena od vampa z dorzalno in ventralno retikularno gubo. Kar zadeva prebavo, sestavljata z vampom precej enoten prostor, imenovan *retikulo-rumen*. V tej komori se odvija konstantno mešanje, odvajanje plinov in absorpcija. Od tu potujejo metaboliti v nižje dele prebavnega trakta, prav tako ostanki hrane in mikroorganizmi. Prebiralnik je tretji predželodec, ki leži med kapico in siriščnikom. V notranjosti se vrstijo ploščam podobne gube, ki so pokrite s keratiniziranimi papilami. V prebiralniku se absorbira odvečna tekočina. Sluznica vseh predželodcev je kutana, zato ne izloča prebavnih encimov in kislin (Žgajnar, 1990).

Siriščnik, kot pravi želodec, je cevast organ, ki povezuje prebiralnik in tanko črevo. Njegove stene so nagubane v podolgovate brazde. Epitel pokrivajo sekretorne celice, ki izločajo enake sekrete kot želodci monogastričnih organizmov (Žgajnar, 1990).

Prebava krme se začne v gobcu, kjer se bolus navlaži s slino, od tod potuje slabo prežvečen grižlaj krme po požiralniku preko kapice v vamp, kjer se krma zadržuje 9 do 12 ur. Tu se zaradi ritmičnih vampnih kontrakcij prispeli bolus pomeša z ostalo vampno vsebino, v kateri se nahajajo tudi vampni mikroorganizmi, ki v tej fazi inokulirajo delce krme. Kontrakcije v retikulo-rumnu morajo biti sinhronizirane, sicer plini ne morejo izhajati, kar vodi v napenjanje in končno v pegin živali. Po hranjenju prežvekovalci predhodno slabo prežvečeno krmo s pomočjo regurgitacije potisnejo v gobec, kjer jo navlaženo s slino ponovno prežvečijo ter jo še drugič pošljejo v vamp. Bolus prežvečene krme, ki ne vsebuje velikih delcev krme, potuje mimo kapice, preko prebiralnika in se ustavi v siriščniku (slika 1). Pravi želodec je mesto, kjer se z izločanjem prebavnih sokov (kislina, pepsin) začnejo odvijati pravi prebavni procesi. Sledi še pasaža skozi tanko in debelo črevo (Žgajnar, 1990).



Slika 1: Sestava prebavil ter pot krme skozi prebavila prežvekovalcev (Carr, 2005)

Vamp sestavlja tri faze vampove vsebine: (i) tekoča faza, katere pH je zaradi velike količine alkalne sline sorazmerno nespremenljiv, (ii) trdna faza, ki jo sestavlja povečini še nerazgrajena krma ter (iii) na vrhu plinasta faza, ki zavzema okoli tretjino vampne prostornine. V stabilni atmosferi vampa je več kot 60 %  $\text{CO}_2$ , 25 %  $\text{CH}_4$ , 7 %  $\text{N}_2$ , v sledovih pa tudi  $\text{H}_2$  in  $\text{O}_2$ . Oksidacijsko – reduksijski potencial tekoče faze v retikulo-rumnu znaša okoli 350 mV. To kaže na izjemno reducirane razmere (močno stabilno stanje), anaerobno okolje. Alkalna slina, ki je gostitelj v enem dnevu izloči med 150 in 200 l, se izloča iz treh žlez. Je bikarbonatni fosfatni pufer (pH = 8,2), ki kljub tvorbi kislin v procesu fermentacije zagotavlja konstantno pH vrednost v vampu (med 5,8 in 6,8). Vamp nudi poleg konstantne pH vrednosti, anaerobnega okolja in dobrega mešanja vsebine tudi konstantno temperaturo, ki znaša 39°C (Žgajnar, 1990).

## 2.2 VAMPNI MIKROBNI EKOSISTEM

Mikrobna populacija v vampu je kompleksna, gosta in mešana združba bakterij, arhej, bičkastih in migetalkastih praživali, anaerobnih gliv in bakteriofagov, ki tvori raznovrsten ekosistem, kjer vlada prehranska sinergija. Nekateri vampni mikroorganizmi naseljujejo delce krme, drugi prosto plavajo v tekoči fazi vampne vsebine, redki pa so pritrjeni na vampno steno (Hobson, 1997).

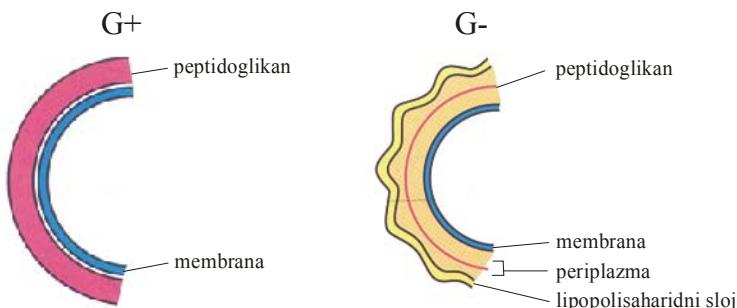
Vampne arheje, glive in praživali so striktni anaerobi, vampne bakterije pa so lahko striktni ali pa fakultativni anaerobi. Slednji porabljajo kisik, ki prihaja v vamp z zauživanjem krme in s tem vzdržujejo anaerobno okolje, ki je nujno za preživetje večine vampnih mikrobov. Med vsemi vampnimi mikroorganizmi so najpogosteje zastopane bakterije, saj so v vampu odkrili že čez 200 bakterijskih vrst (Mackie in sod., 2001). Sprememba krmnega obroka spremeni vrstno in številčno zastopanost vampnih simbiontov. Preko živali, ki jo krmimo, posledično hranimo tudi vampne simbionte, ki se na takšne spremembe odzivajo počasi, zato temu primerno postopno uvajamo spremembe v krmni obrok (Madigan in sod., 2000).

Med procesom mikrobne razgradnje organskih snovi se večina rastlinskih polisaharidov pretvori v kratkoverižne maščobne kisline, ki prehajajo skozi vampno steno v krvni obtok in jih žival porabi kot glavni snovni in energijski vir. Nastala mikrobna biomasa gostitelju zagotavlja vir proteinov po razgradnji mikrobov v siriščniku, vampni mikroorganizmi pa so pomembni tudi iz stališča produkcije vitaminov (Mackie in sod., 2001). V nasprotju ostali fermentacijski produkti, kot so toplota, metan in amoniak, predstavljajo izgubo energije, ogljika in dušika iz živali v okolje (Owens in Goetsch, 1988).

### 2.2.1 Vampne bakterije

V vampu je ogromno število bakterij ( $10^{10}$  do  $10^{11}$ /ml vampnega soka), ki so morfološko, fiziološko, taksonomsko in filogenetsko precej raznolike. Različne vampne bakterije hidrolizirajo polimere (npr. celulozo) do monomerov, te pa fermentirajo do kratkoverižnih maščobnih kislin (KMK; angl. SCFA – *short chain fatty acids*). *Fibrobacter succinogenes* in *Ruminococcus albus* sta dva izmed najbolj celulolitičnih vampnih anaerobov. *Fibrobacter* je Gram negativna vrsta, ki vsebuje periplazmatsko celulazo. Zato bakterija med razgradnjo celuloze ostane pritrjena na substrat. *Ruminococcus* je Gram pozitivna vrsta, ki celulazo izloča v vampno vsebino, zato razgradnja celuloze poteka zunaj same celulolitične bakterijske celice. V obeh primerih je rezultat enak, t. j. prosta glukoza, ki je dostopna za anaerobno fermentacijo (Stewart in sod., 1997).

Kadar prežvekovalec krmimo povečini z vlakninasto krmo (seno, paša, prilast), v njihovem vampu prevladujejo Gram negativne vrste bakterij (rodovi *Prevotella*, *Ruminobacter*, *Fibrobacter*, *Succinivibrio*, ...). Pri pokladanju koncentrirane krme (močna krma - krmne mešanice) pa se v vampu poveča število Gram pozitivnih vrst (rodovi *Ruminococcus*, *Streptococcus*, *Clostridium*, ...). Nekatere vrste pa je težko opredeliti kot Gram pozitivne ali Gram negativne, ker je njihova celična stena zgrajena neznačilno. Celična stena Gram negativnih bakterij je večplastna in precej kompleksna struktura, medtem ko je celična stena Gram pozitivnih bakterij v osnovi sestavljena iz enega tipa molekule in je pogosto debelejša (Madigan in sod., 2000). Celično steno Gram pozitivnih bakterij sestavlja peptidoglikan, pri Gram negativnih bakterijah pa je celična stena sestavljena iz tanke plasti peptidoglikana (10 %) ostalo pa so lipopolisaharidi (90 %) (Madigan in sod., 2000) (slika 2).



Slika 2: Celična stena Gram pozitivne in Gram negativne bakterije  
(Madigan in sod., 2000)

Peptidoglikan ali murein je rigidna plast in daje trdnost celični steni. Sestavljata ga derivata sladkorjev, N-acetylglukozamin in N-acetilmuraminska kislina ter nekatere aminokisline. Lipopolisaharidni sloj (LPS) Gram negativnih bakterij vsebuje lipoproteine, lipopolisaharide in druge lipide, ki predstavljajo bariero za vstop mnogih snovi, katere lažje prehajajo celično steno Gram pozitivnih bakterij. Bakterije razgrajujejo za svojo vrsto značilne substrate, ki se nahajajo v krmi. Tako poznamo na primer celulolitične (celuloza), saharolitične (saharoza), amilolitične (škrob), lipolitične (lipidi) in proteolitične (proteini) vrste, katerih vloga je odločilnega pomena v prebavnih procesih prežvekovalcev. Nekateri fermentacijski produkti saharolitičnih vampnih bakterij predstavljajo vir energije za ostale vampne bakterije. Bakterijske vrste so lahko prehranski specialisti (npr. *Fibrobacter succinogenes*) ali pa generalisti (npr. *Butyrivibrio fibrisolvens*), kadar lahko razgrajujejo več različnih substratov. Nekatere vrste pa imajo slabo izraženo sposobnost hidrolize za večino polimerov, lahko pa izkoriščajo širok spekter hidrolitičnih produktov, ki so jih ustvarili generalisti in specialisti (Stewart in sod., 1997).

#### 2.2.1.1 Bakterije iz rodu *Prevotella*

Bakterije iz rodu *Prevotella* so ena izmed največjih skupin vampnih bakterij in naseljujejo vamp različno krmljenih prežvekovalcev. So striktni anaerobi, po Gramu negativni kokobacili. Glede na njihovo anaerobiozo lahko sklepamo, da niso pritrjeni na vampno steno, saj je tam majhna količina kisika vendarle prisotna, prav tako ne naseljujejo delcev rastlinskega materiala, ker nimajo celulaznih encimov, ampak živijo v samem vampnem soku. V vamu razgrajujejo in izkoriščajo škrob ter polisaharide rastlinskih celičnih sten (ksilani, pektini), vendar ne celuloze. Znani so po razgradnji proteinov in fermentaciji peptidov (Wallace in sod., 1993). Njihovi najpomembnejši fermentacijski produkti so ocetna, jantarna in propionska kislina. V poskus smo vključili dva seva iz rodu *Prevotella*, in sicer *Prevotella bryantii* B<sub>1</sub>4<sup>T</sup> in *Prevotella ruminicola* 23<sup>T</sup>. *P. ruminicola* je verjetno najbolj številčna proteolitična bakterija in je edina vrsta bakterij z dipeptidil aminopeptidazno aktivnostjo (DAP1) (McKain in sod., 1992). Vampne prevotele so v splošnem občutljive na monenzin (Stewart in sod., 1997), vendar pa sta Callaway in Russell (1999) pri preučevanju seva *P. bryantii* B<sub>1</sub>4 ugotovila, da naj bi se 10 % izvorne populacije pri višjih koncentracijah monenzina ohranilo in predstavljalno na monenzin ultrarezistentno subpopulacijo seva, ki uspešno raste tudi pri precej višjih koncentracijah monenzina kot izvorna populacija. Seva *P. ruminicola* 23<sup>T</sup> in *P. bryantii* B<sub>1</sub>4<sup>T</sup> smo vključili v poskus zaradi njune dobre preučenosti, pomembne metabolne vloge in številčne zastopanosti v vampu (sev *P. ruminicola* 23<sup>T</sup>), možnosti razvoja ultrarezistence na monenzin (sev *P. bryantii* B<sub>1</sub>4<sup>T</sup>) ter zgradbe celične stene (Gram negativna), ki naj bi določala stopnjo občutljivosti oziroma rezistence na monenzin in verjetno tudi na ostale rastne inhibitorje kot so rastlinski izvlečki, bakteriocini in kemijski inhibitorji.

#### 2.2.1.2 Vrsta *Fibrobacter succinogenes*

*Fibrobacter succinogenes* je ena izmed najbolj celulolitičnih anaerobnih bakterijskih vrst v vampu (Varel in Dehority, 1989). Je Gram negativna vrsta s periplazmatsko celulazo (Madigan in sod., 2000). Večina celic se pojavlja samostojno, možne pa so tudi kratkoverižne oblike (Stewart in sod., 1997). Glavna fermentacijska produkta te vrste sta ocetna in jantarna kislina. Med celulolitičnimi bakterijami naj bi bila vrsta *F. succinogenes* relativno odporna na prehranske antibiotike (Stewart in Duncan, 1985). V poskus smo vključili sev *F. succinogenes* S85.

#### 2.2.1.3 Vrste iz rodu *Ruminococcus*

Bakterije iz vrste *Ruminococcus flavefaciens* so po Gramu pozitivne, lahko pa se po Gramu barvajo variabilno (Kaars-Sijpesteijn, 1951). Pojavljajo se kot dolge verige celic in tvorijo značilno rumeno barvilo, še posebno, kadar je njihov substrat celuloza, ki jo razgrajujejo z ekstracelularno celulazo. Bakterije iz vrste *R. albus* so po Gramu pozitivne, ne tvorijo rumenega pigmenta in se pogosto pojavljajo v obliki diplokokov,

glavni fermentacijski produkt je ocetna kislina (Hungate, 1957). Njih energijski vir predstavlja celobioza (Thurston in sod., 1993).

V vampu je *R. albus* številčnejša vrsta kot *R. flavefaciens* (Varel in Dehority, 1989). Večina sevov *R. flavefaciens* je sposobna razgraditi tudi težko razgradljive oblike celuloze (Stewart in sod., 1990), nekateri sevi *R. albus* pa sploh niso celulolitični (Morris in Cole, 1987). *R. albus* je zmožen proizvajati poleg ocetne kisline in vodika tudi etanol, zlasti v čisti kulturi. *R. flavefaciens* poleg ocetne kisline, kot glavnega fermentacijskega produkta, tvori jantarno kislino, v nekaterih primerih pa tudi mlečno kislino in vodik. V nasprotju z bakterijami vrste *F. succinogenes* naj bi bili ruminokoki zelo občutljivi na monenzin (Bryant, 1986). Prav tako so občutljivi na padec pH vrednosti v vampu; v kontinuirani kulturi pride do popolne inhibicije njihove rasti že pri pH vrednosti, nižji od 6,1 (Russell in Dombrowski, 1980). Seva *R. albus* 20455 in *R. flavefaciens* 007 S/6 smo vključili v poskus zaradi Gram pozitivne strukture njune celične stene, da bi lahko primerjali občutljivost različnih bakterijskih sevov na monenzin v odvisnosti od zgradbe njihove celične stene. Sev *R. albus* 20455 pa smo izbrali tudi zato, ker je znan producent vodika, ki je prekurzor metanske sinteze v vampu. Dodajanje monenzina h krmi zmanjša produkcijo metana pri prežvekovalcih in morda je za to odgovoren tudi *R. albus* (Stewart in sod., 1997).

#### 2.2.1.4 Vrsta *Butyrivibrio fibrisolvens*

Celice *B. fibrisolvens* kažejo Gram pozitivno ultrastrukturo celične stene, čeprav se po Gramu barvajo negativno. Večina *in vitro* gojenih sevov vrste *B. fibrisolvens* razgrajuje in izkorišča ksilane (Hespell in sod., 1987; Sewell in sod., 1988). So striktno anaerobne ukrivljene paličaste bakterije in glavni producenti maslene kisline v vampu. Slednja predstavlja 16 % vseh prisotnih kratkoverižnih maščobnih kislin (Stewart in sod., 1997). Celice se pojavljajo posamezno, v parih ali verigah. So med prevladujočimi bakterijami v vampu različno krmljenega goveda. Sevi vrste *B. fibrisolvens* so tudi amilolitični (Cotta, 1988) in jim nekateri avtorji pripisujejo pomembno vlogo v razgradnji škroba iz zrnja žit (McAllister in sod., 1990). Vrsta *B. fibrisolvens* naj bi imela pomembno vlogo tudi v vampni proteolizi (Stewart in sod., 1997). Sev *B. fibrisolvens* 3071<sup>T</sup> smo vključili v poskus zaradi produkcije vodika, ker je pomemben ksilanolit ter zaradi tega, ker je fiziološko Gram pozitivna vrsta, morfološko pa se barva kot Gram negativna vrsta.

#### 2.2.2 Vampne arheje

Metanogene arheje so verjetno najbolj striktni poznani anaerobi, ki zahtevajo ne le kisika proste pogoje, ampak tudi redoks potencial, nižji od 330 mV. Študije na teh organizmih zato potekajo s pomočjo posebnih tehnik gojenja. Za svoj obstoj porabljajo omejeno število bakterijskih fermentativnih produktov - H<sub>2</sub> in CO<sub>2</sub> ali pa alternativne vire, npr. mravljična in ocetna kislina in iz njih tvorijo metan (Mackie in sod., 2001). Posledično

so v večini habitatov metanogene arheje odvisne od ostalih sodelujočih anaerobov, ki pretvarjajo kompleksno organsko snov do substratov za metanogenezo (Mackie in sod., 2001).

Kljud tvorbi toplogrednih plinov so vampne arheje zelo pomembne zaradi prenosa vodika med vrstami, saj vzdržujejo nizek parcialni tlak vodika v vamu, ki bi sicer zaviral rast drugih mikroorganizmov (Wolin in sod., 1997). Večina metanogenih arhej uporablja CO<sub>2</sub> kot končni akceptor elektronov v anaerobnem dihanju, ki ga reducira do metana z vodikom. Tudi mravljična kislina lahko služi kot substrat za vampno metanogenezo, vendar je Hungate ugotovil, da se večina mravljične kisline v vamu pretvori v vodik in ogljikov dioksid (Hungate in sod., 1970).

### **2.2.3 Vampne praživali in glive**

V vamu je značilna praživalska fauna (okoli 10<sup>6</sup>/ml), ki zavzema kar 50 % mikrobne mase in je sestavljena skoraj izključno iz mitotkarjev (Madigan in sod., 2000). So evkariontski enocelični mikroorganizmi brez celične stene. Vampne praživali so obligatni anaerobi - to je lastnost, ki je redka med evkarionti. Kljud temu, da praživali niso neobhodno potrebne za vampno fermentacijo, pa zagotovo sodelujejo pri celotnem procesu. Nekatere hidrolizirajo celulozo in škrob, fermentirajo glukozo in tvorijo enake organske kisline kot bakterije. Njihova pomembna vloga v vamu je predatorstvo (požirajo bakterije), saj tako zelo povečajo hitrost metabolnega kroženja bakterijskih proteinov v vamu, s tem pa uravnava tudi gostoto in ravnotežje med različnimi bakterijskimi vrstami (Madigan in sod., 2000).

Anaerobne glive imajo celično steno in sodelujejo v vamnih razgradnih procesih. To so striktno anaerobne filamentozne glive (Mackie in sod., 2001). Študije na čistih kulturah so pokazale, da so sposobne razgrajevati številne rastlinske strukturne polisaharide, pomembne pa so tudi zaradi sinteze nekaterih vitaminov (Madigan in sod., 2000).

### **2.2.4 Dinamika vampnega ekosistema**

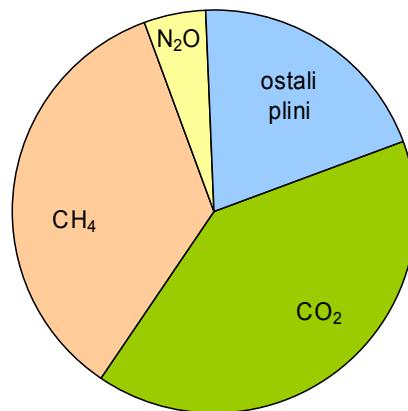
Poglavitna značilnost vampnega ekosistema je dinamično ravnotežje. Študije na različnih vrstah prežvekovcev po svetu kažejo, da večina živali vsebuje enake glavne vampne bakterijske vrste, katerih delež pa variira odvisno od zaužite krme, zdravja, starosti in drugih dejavnikov. Različne vrste prežvekovcev imajo relativno konstantno naravo in deleže KMK ter volumske deleže vamnih plinov CO<sub>2</sub> in CH<sub>4</sub>. Nenadne spremembe v vampni mikrobi združbi povzročijo bolezen ali celo smrt gostitelja. To pa prvenstveno pomeni, da morajo biti spremembe v krmnih obrokih prežvekovcev počasne in postopne (Madigan in sod., 2000).

## 2.2.5 Producija plinov

Proces prebave vključuje tudi nastanek plinov v retikulo–rumnu. Pri dobro krmljeni kravi jih nastane okoli 30 l na uro (Žgajnar, 1990), od tega več kot 12 l metana (Thornton in Owens, 1981). Plini izhajajo iz vampa z izrigavanjem (eruktacijo), ki je natančno časovno usklajen mehanizem, povezan s kontrakcijami posameznih delov retikulo-rumna (Žgajnar, 1990). Predstavljajo 5 do 15 % izgubo energije, pridobljene iz zaužite krme, in prispevajo 15 do 25 % h globalni emisiji toplogrednih plinov. Metan absorbira 21-krat več toplotne kot ogljikov dioksid in s tem prispeva največ k poviševanju temperature oziroma h globalnemu segrevanju, kot je poročala okoljevarstvena agencija EPA (Environmental Protection Agency). Metan ostane v atmosferi 9 do 15 let (EPA – Ruminant Livestock, 2006).

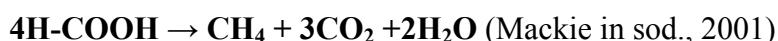
Odrasla krava predstavlja z 80 do 110 kg metana/leto sicer majhen vir tega plina, toda 1,3 milijarde krav svetovne populacije (Faostat, 2006), predstavljajo enega največjih virov metana (EPA – Ruminant Livestock, 2006). Brez toplogrednih plinov, ki absorbirajo sončno toploto in tako ogrevajo planet, življenje, kot ga poznamo, ne bi moglo obstajati. Toda v zadnjih 200 letih je človekova aktivnost, ki vključuje intenzivno živinorejo, povečala toplogredni učinek (Intergovernmental Panel on Climate Change, 2001). Atmosferske koncentracije metana so se v zadnjih dveh stoletjih več kot podvojile. Pri tem igra pomembno vlogo tudi kmetijstvo, kajti v zadnjih 40 letih se je globalna populacija goveda povečala za 40 % (Faostat, 2006). Vampna fermentacija prispeva 33-39 %  $\text{CH}_4$  k emisiji plinov iz agrarnih virov (Tedeschi in sod, 2003).

Na obseg produkcije plinov vpliva veliko dejavnikov, med katerimi lahko omenimo fizikalne in kemijske lastnosti krme, vrsto krme, prehranske dodatke ter aktivnost in zdravstveno stanje živali (Wood in Knipmeyer, 1998). Ogljikov dioksid se kot stranski produkt sprošča pri razgradnji ogljikovih hidratov in dekarboksilaciji aminokislin. Večina fermentacijskih procesov Gram pozitivnih bakterij je povezanih z nastankom metana. Če v vampu prevladuje Gram negativna skupina bakterij, se tvori manj metana, predvsem zaradi manjše produkcije vodika in mravljične kisline (Bergen in Bates, 1984). Med izriganimi plini je največ ogljikovega dioksida ( $\text{CO}_2$ , okoli 40 %), metana ( $\text{CH}_4$ , 30 – 40 %) in dušikovega oksida ( $\text{N}_2\text{O}$ , 5 %), nekaj amoniaka, kisik, vodik in žveplovodik se tvorijo v sledovih (Žgajnar, 1990) (slika 3).



Slika 3: Sestava izrignanih plinov (prirejeno po: Žgajnar, 1990)

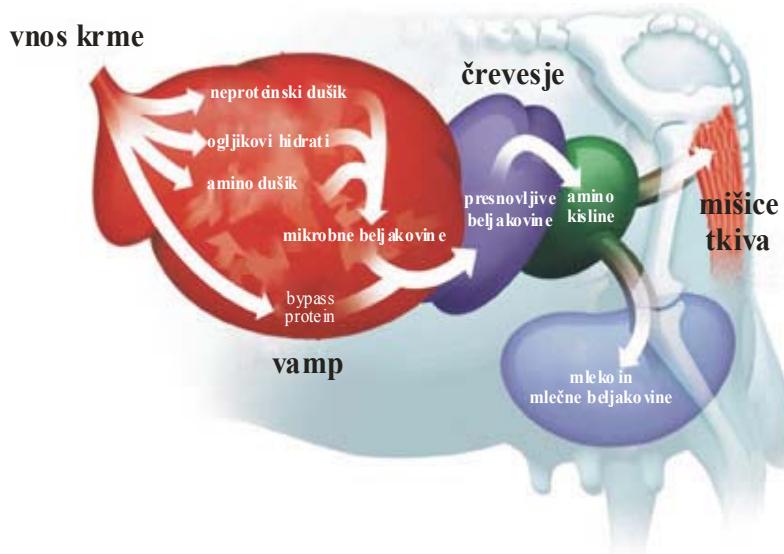
Možne poti sinteze metana so naslednje:



Zmanjševanje časa zadrževanja krme v vampu lahko prav tako zmanjša produkcijo metana. Okine in sod. (1989) so opazili 30 % upad v nastanku metana, če se je stopnja vampne pasaže povečala za 50 % ali več.

### 2.3 MANIPULACIJA VAMPNE FERMENTACIJE

Prežvekovalci imajo dva metabolna sistema, in sicer mikrobnii metabolizem v vampu ter presnovo v tkivih. Maksimalna ali optimalna produktivnost prežvekovalca zahtevata tudi pravilno ravnotežje med mikrobnim fermentacijom in žlezno prebavo. Idealno bi bilo, da bi večino komponent krme razgradila, absorbirala in izkoristila tkiva v največji možni meri. Dejansko je razgradnja komponent krme pri prežvekovalcih nepopolna. Vnešena hrana najprej fermentirajo mikroorganizmi, šele potem so izpostavljena prebavnim žlezam gostitelja (slika 4). Mikrobnia fermentativna razgradnja je neobhodna pri substratih, ki jih gostiteljevi encimi ne morejo razgraditi, po drugi strani pa je zaradi izgub energije in dušika neučinkovita pri razgradnji sicer za prebavne izločke prebavljenih proteinov, amino kislin in sladkorjev. Iz tega sledi, da mora biti za doseženo optimalno produktivnost vzpostavljeno pravo ravnotežje med mikrobnim in žlezno prebavo (Nagaraja in sod., 1997).



Slika 4: Fermentacija v prebavilih  
(Rumen Fermentation Enhancers, 2004)

Komponente krme (ogljikovi hidrati (CHO; angl. *carbohydrates*), dušične substance in lipidi) v različnih obsegih razgradijo vampni mikrobni simbionti. Glavni končni produkti, ki pri tem nastanejo, so KMK, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> in NH<sub>3</sub> ter mikrobna masa. V anaerobnem sistemu vampa se večina energije, nastale pri fermentaciji organske snovi, zadrži v končnih produktih fermentacije in se v glavnem porabi za biosintezo celičnih sestavin (CHO, dušične substance, lipidi, nukleinske kisline), za vzdrževanje funkcij mikrobnih celic in za povečanje biomase (mikrobna rast). Nekaj te energije se izgubi v obliki metana in toplice. Vmesne komponente fermentacije organske snovi služijo kot monomeri za sintezo mikrobnih celic (Nagaraja in sod., 1997). Iz tega sledi, da obstaja obratna zveza med produkcijo fermentacijskih produktov (KMK) in sintezo mikrobnih celic (Leng, 1982). Kvantitativno lahko vampni metabolizem oziroma mikrobne fermentacije opišemo (i) s količino fermentirane organske snovi, (ii) s koncentracijami in relativnimi deleži fermentacijskih produktov ter (iii) s količino in z učinkovitostjo sinteze mikrobnih proteinov (Nagaraja in sod., 1997).

### 2.3.1 Cilji manipulacije vampne fermentacije

Osnovni cilji manipulacije mikrobnih fermentacij v vampu so povečati učinkovitost izkoristka krme in tako povečati produktivnost prežvekovcev v smislu povečanja prikeje mleka, mesa ali volne. Z vampno manipulacijo želimo: (i) povečati ugodne procese in (ii) zmanjšati, spremeniti ali inhibirati neučinkovite ali škodljive procese. To lahko storimo tako, da (i) pospešimo razgradnjo rastlinskih struktturnih polisaharidov in pretvorbo neproteinskega dušika (NPN; angl. *non-protein nitrogen*) v mikrobne proteine, (ii) inhibiramo tvorbo metana, fermentacijo proteinov, peptidov in aminokislín ter absorpcijo amoniaka skozi vampno steno, in seveda (iii) inhibiramo ali spremenimo

procese, ki škodljivo vplivajo na prežvekovalca (napihovanje, acidoza, ketoza). Pri vsem tem je potrebno upoštevati dejstvo, da so mikrobne fermentacije v vampu kompleksen proces, sestavljen iz prepletajočih se reakcij (Van Nevel in Demeyer, 1988).

### 2.3.2 Manipulacija vampne fermentacije

Današnji rejci živali so ubrali zelo intenzivno pot, pri čemer jih zanima čim boljše izkoriščanje krme, čim manj snovnih in energijskih izgub ter seveda s tem povezani dobiček. Z različnimi načini manipulacije delujemo na vampne mikroorganizme oziroma na vampni ekosistem, ki deluje vzajemno z gostiteljem, zato takšna manipulacija prinese tako prednosti kot slabosti. Na mikrobne procese v vampu lahko vplivamo na treh nivojih (Nagaraja in sod., 1997):

- krma,
- gostitelj (fiziologija prebave),
- mikrobeni simbionti.

S prvima dvema načinoma vplivamo na vampno fermentacijo posredno. Direktno pa vplivamo na mikrobeni ekosistem tako, da spremenimo vzorec vampnih fermentacij z dodajanjem mikro- ali makrokompontent, ki delujejo na mikrobe (Nagaraja in sod., 1997).

#### 2.3.2.1 Posegi na nivoju krme

S posegi na nivoju krme želimo vplivati na hranilno vrednost, količino zaužite krme in na večjo prebavljivost in/ali okusnost. Toplotna in kemična obdelava sta verjetno najbolj preučeni in široko uporabljeni metodi za povečanje hitrosti in obsega razgradnje rastlinskih strukturnih polisaharidov ter za zmanjšanje razgradnje proteinov iz krme v vampu. Ob pretvorbi krmnih proteinov v mikrobenne celične proteine v vampu namreč pride do energijskih izgub, zato je energijsko ugodnejše, če črevo doseže večja količina proteinov iz krme nerazgrajenih. Možnosti obdelave krme je več, na primer: (i) s toplotno obdelavo povzročimo nastanek prečnih vezi (neencimska Maillardova reakcija), pri čemer proteini postanejo odpornejši na encimatsko hidrolizo v vampu (Schwab, 1995), (ii) z dodajanjem kemičnih snovi, kot so aldehydi, tanini, alkoholi, kisline in drugi zmanjšamo razgradljivost proteinov v vampu. V večini primerov kemična obdelava ustvari modifikacije, odvisne od pH vrednosti, ki zmanjšajo razgradljivost v vampu, v kislem pH siriščnika pa se proces obrne (Broderick in sod., 1991; Schwab, 1995). Poleg fizikalnih, kemičnih ali bioloških procesov za spremiščanje fermentabilnosti krme obstaja metoda, ko s strategijo prehranjevanja (pogostnost in zaporednost obrokov) vplivamo na vampno okolje in s tem na mikrobeno aktivnost. Z zagotavljanjem stabilnih pogojev v vampu s pomočjo zmanjšanja nihanj v strategiji krmljenja, postanejo vampne fermentacije bolj učinkovite. V zadnjem času so se raziskovalci osredotočili tudi na

biotehniološki pristop s transgenimi rastlinami, da bi povečali hranilno vrednost krme (Altenbach in Townsend, 1995).

### 2.3.2.2 Posegi na nivoju fiziologije prežvekovcev

Prežvekovec z vnosom krme nudi substrate mikrobom, hkrati pa vpliva na sestavo in aktivnost vampne združbe s fiziološkimi procesi (žvečenje, prežvekovanje, slinjenje, gibanje retikulo–rumna, izrigavanje in vsrkavanje fermentacijskih produktov). S tem pristopom ciljamo na doseganje sprememb vampne fermentacije, kar vključuje: (i) povečan vnos krme (zaradi stimulacije apetita, izboljšanega okusa krme), (ii) povečano tvorbo sline (kar vpliva na aktivnost vampnih simbiontov in dostopnost substratov za razgradnjo) ter (iii) vpliv na funkcionalno aktivnost prebavil (retikulo–ruminalno gibanje ter metabolno in absorptivno funkcijo vampnega epitela) (Nagaraja in sod., 1997).

Pri živalih je vnos krme ponavadi pod njihovimi fiziološkimi in metabolnimi sposobnostmi, zato se raziskave usmerjajo v razumevanje regulacije apetita in v razvoj metod, ki prispevajo k večjemu zaužitju krme pri prežvekovalcih. Trajno povečanje vnosa krme, ki ni povezano z zmanjšano prebavljenostjo in presnovljivostjo, poveča produktivnost živali. Na osnovne fiziolške procese prežvekovcev je težko vplivati. Kontrola apetita pri prežvekovalcih je kompleksna in odvisna od krme, podnebja in fiziološkega stanja živali (Della-Fera in Baile, 1984).

### 2.3.2.3 Posegi na nivoju mikrobnih simbiontov

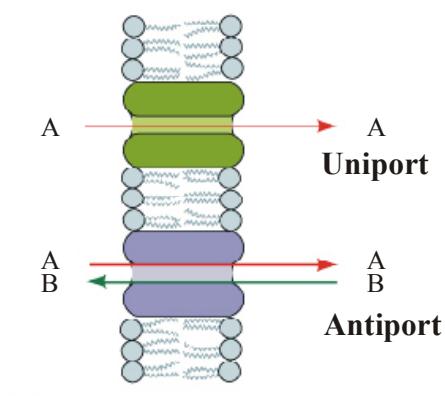
Pred 40 leti so potekale intenzivne raziskave spreminjanja vampne mikrobine populacije z direktnimi posegi z uporabo antibiotikov v prehrani. Tudi ostale kemijske komponente, v splošnem imenovane vampni modifikatorji, so bile testirane z namenom, da povečajo učinkovitost produkcije zaradi sprememb v vzorcu vampnih fermentacij. Uporaba takih metod je potekala vzporedno z napredkom v razumevanju fiziologije in biokemije vampnih mikroorganizmov (Nagaraja in sod., 1997). Številne komponente imajo sposobnost modifikacije vampne fermentacije (Chalupa, 1984; Demeyer in Van Nevel, 1987; Van Nevel in Demeyer, 1988; Van Nevel, 1991). Večina vampnih modifikatorjev ni specifičnih in hkrati spreminjajo različna mesta vampne fermentacije. Nekateri opisi temeljijo na **mestu ali načinu delovanja modifikatorjev** (neutralizirajoči agensi ( $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$ , bentonit), metanski inhibitorji (amikloral, kloral hidrat), inhibitorji proteolize, peptidolize, deaminacije, rastni faktorji (vitamini, maščobne kisline idr.) in agensi proti penjenju v vampu) in drugi na njihovih **sestavinah** (ionoformni (monenzin) in neionoformni antibiotiki (avoparcin, tilozin idr.), maščobe, mikrobeni krmni dodatki in encimi) (Nagaraja in sod., 1997).

## 2.4 VAMPNI MODIFIKATORJI

Manipulacija vampnega metabolizma je pomembna iz vidika izboljševanja produktivnosti živali in s tem učinkovitosti reje živali. Dosežemo jo lahko z vampnimi modifikatorji v obliki prehranskih dodatkov (angl. *feed additives*), ki so opisani v naslednjih podpoglavljih.

### 2.4.1 Ionoformi antibiotiki

Ionofori (generični termin IOP) so zelo lipofilne substance, katerih zunanjost je hidrofobna, notranjost pa hidrofilna. Njihovo ime izvira iz njihove funkcije, ki je prenašanje ionov. Spadajo v veliko in rastočo skupino sestavin, ki so sposobne tvorbe lipidotopnih kompleksov s kationi in njihovega transporta preko lipidnega dvosloja celične membrane (Pressman, 1968). Toksični so za številne bakterije, praživali, glive in višje organizme, zato ustrezajo klasični definiciji antibiotikov (Pressman, 1976). Toksičnost IOP izhaja iz njihove sposobnosti penetracije skozi biološke membrane in posledično spreminjanja toka ionov preko biološke membrane v celico in iz nje. Na zunanji površini membrane IOP zmotijo tok ionov tako, da oblikujejo ciklične ion – IOP komplekse, ki delujejo kot ion – selektivni mobilni prenašalci (monenzin) (Bergen in Bates, 1984; Russel in Strobel, 1989). Ko se kovinski ion sprosti, se karboksilna skupina poveže s protonom in ga premakne v nasprotni smeri. Lahko pa ustvarijo pore, ki pospešujejo manj specifični vtok in iztok ionov (gramicidin). IOP iz skupine prehranskih dodatkov so selektivni za specifične katione. Molekulska teža ionofornih antibiotikov je nizka in se giblje med 500 in 2000 Da. To jim omogoča absorpcijo skozi steno prebavil. Nekateri ionoforni antibiotiki vežejo le en kation (uniporterji), ostali so sposobni vezave z več kot enim kationom (antiporterji) (slika 5) (Fellner in sod., 1997).



Slika 5: Tipi ionofornih antibiotikov glede na način transporta  
(Bell, 2006)

Zaradi številnih cikličnih etrov v njihovi strukturi, jih imenujemo tudi polietrski antibiotiki. **Monenzin**, kot najbolj raziskan in najširše uporabljan ionoforni antibiotik, je bil registriran v Združenih Državah Amerike 16. decembra 1975 s komercialnim imenom Rumenzin (Elanco, 1978). V različnih državah po svetu so ga odobrili kot prehranski dodatek (Bagg, 1997) z namenom izboljševanja izkoriščanja krme, mlečne produkcije in imunskega odziva pri kravah molznicah. Po odobritvi uporabe monenzina v komercialne namene so v poznih 1970-ih na trg lansirali še različne druge ionoforne antibiotike (lasalocid, narazin, laidlomicin, tетronazin, salinomicin), ki so v ZDA v uporabi še danes, čeprav so bila opozorila o nevarnosti možnih stranskih učinkov sprožena tudi tam (Ipharraguez in Clark, 2003).

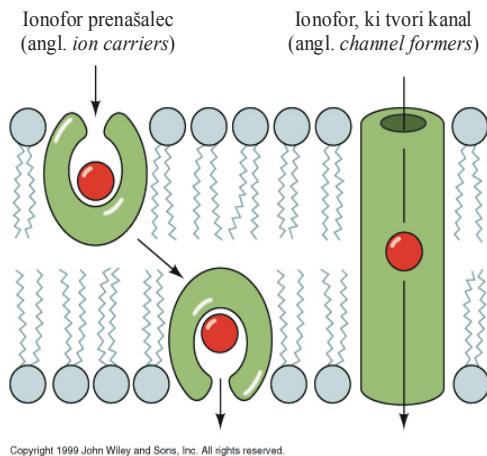
Na osnovi previdnostnega ukrepa je Evropska unija na področju reje živali leta 1997 izdala prepoved uporabe antibiotika avoparcina, čeprav brez dokazov o škodljivih vplivih Znanstvenega komiteja za prehrano živali (SCAN, 1998). Dve leti pozneje je EU prepovedala uporabo bacitracina, spiramicina, tilozina in virginiamicina (Casewell in sod., 2002) kot rastnih dejavnikov, prav tako v nasprotju z mnenjem SCAN-a (Acar in sod., 2000), vendar zaradi strahu pred razvojem rezistenc proti antibiotikom preko prehranske verige. Ta prepoved ni vključevala IOP (monenzin, salinomicin, avilamicin in flavofosfolipol) kot prehranskih dodatkov. Monenzin je biorazgradljiv v živalskem gnoju in zemlji ter ni toksičen za poljščine (Donoho, 1984), vendar pa so zaradi suma pojava ostankov ionofornih antibiotikov v mleku in mesu za človeško prehrano v EU januarja 2006 prepovedali uporabo le-teh kot krmnih dodatkov. Bakterijski geni za antibiotične rezistence imajo pomembno vlogo v širjenju rezistenc, ker se lahko horizontalno prenašajo med mikroorganizmi iz različnih vrst (Shoemaker in sod., 2001). Predvsem bojazen javnosti, da bi se antibiotiki akumulirali v mleku in mesu ter da bi se pojavile rezistence proti antibiotikom, ki bi se lahko prenesle tudi na patogene bakterijske vrste, je narekovala prepoved uporabe antibiotikov kot krmnih dodatkov v intenzivnih rejah živali v Evropi. Evropski rejci živali se morajo zato spopadati z višjimi stroški reje in niso več konkurenčni ostalim rejcem po svetu. Zaradi tega industrija išče nove vzporednice antibiotikom, med drugim v obliki rastlinskih izvlečkov, ki bi s svojo učinkovitostjo lahko konkurirali antibiotikom.

#### 2.4.1.1 Razvrstitev ionoforov

Ionofore delimo na:

- Mobilni ionski prenašalci (angl. *mobile ion carriers*) so majhne molekule, ki so zunaj hidrofobne, znotraj hidrofilne, zato lahko prenašajo točno določene ione skozi hidrofobno sestavo membrane (le ionofori, ki se obnašajo kot mobilni prenašalci (monenzin) so v uporabi kot prehranski dodatki (Russell in Strobel, 1989)).

- Ionski kanali (angl. *channel formers, ion channels*) so zunaj hidrofobni, zato se sploh lahko vgradijo v membrane in s tvorbo hidrofilnih por v membrani omogočajo ionom prehod brez kontakta z membransko hidrofobno notranjostjo (slika 6).

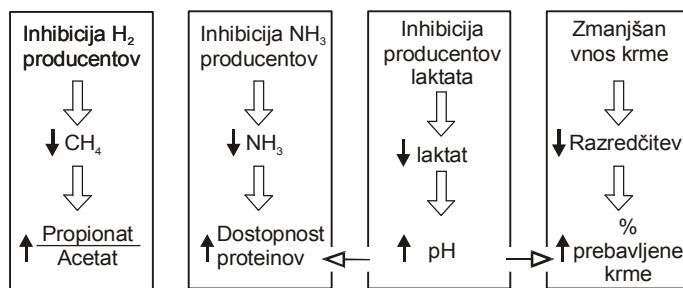


Slika 6: Mobilni prenašalci in kanali kot hidrofilne pore za prehod ionoforov  
(Bell, 2006)

#### 2.4.1.2 Učinki ionofornih antibiotikov

Bergen in Bates sta leta 1984 spremembe vamnih fermentacij, povezane s prehranskimi ionofori, razvrstila v tri glavna področja:

- povečajo nastanek propionske kisline in zmanjšajo nastanek metana, kar se kaže v večji učinkovitosti presnove energije;
- zmanjšajo razgradnjo proteinov, peptidov in deaminacijo aminokislin, zato je dušični metabolizem izboljšan;
- zmanjšajo tvorbo mlečne kisline in penjenja v vampu, zato se zmanjša pogostnost pojavov bolezni (slika 7) (Bergen in Bates, 1984).



Slika 7: Možni učinki ionoforov v vamu (Russell in Strobel, 1989)

### Več propionske kisline in manj metana

Povečanje koncentracije propionske kisline v vampu poteka sočasno z zmanjšanim nastajanjem metana v vampu (Fuller in Johnson, 1981). Vodik, ki v vampu nastaja kot fermentacijski produkt, se lahko porabi med sintezo KMK in mikrobnih organskih snovi, višek vodika iz NADH<sup>+</sup> pa primarno porablja metanogene arheje in ga pretvorijo v metan (Baker, 1999). Stehiometrično ravnotežje KMK, ogljikovega dioksida in metana kaže, da ocetna in maslena kislina vzpodbuju nastajanje metana, medtem ko tvorba propionske kisline vpliva na manjšo sintezo vodika, pri tem pa se zmanjšuje tudi produkcija metana (Wolin, 1960). Ionofori *in vitro* kot *in vivo* znižajo produkcijo metana za 30 % (Schelling, 1984; Wedegaertner in Johnson, 1983) zaradi sprememb v strukturi v mikrobeni združbi v vampu od Gram pozitivnih h Gram negativnih bakterijam. To povzroči premike v fermentacijskih končnih produktih k višjemu deležu propionske kisline glede na ocetno (Slyter, 1979; O'Kelly in Spiers, 1992). Zmanjšanje ocetne kisline v razmerju do propionske je ob dodatku monenzina v krmo 65 do 72 % (Rogers in sod., 1997).

Ionoftorni antibiotiki ne inhibirajo metanogenih arhej in metanogeneze direktno (Chen in Wolin, 1979), pač pa posredno preko zmanjšanja produkcije vodika in mravljične kisline, ki sta prekurzorja za nastanek metana in se najverjetneje preusmerita v tvorbo propionske kisline (Van Nevel in Demeyer, 1977).

### Izboljšan dušični metabolizem

Vampni mikroorganizmi razgradijo pomembno količino krmnih proteinov in nastale amino kisline fermentirajo do amoniaka, CO<sub>2</sub> in KMK (Nolan, 1975). Nekatere Gram pozitivne bakterijske vrste, ki so v splošnem bolj občutljive na monenzin kot Gram negativne vrste, izkazujejo večjo specifično aktivnost za produkcijo amoniaka, kot na monenzin odporne vrste, ker namesto ogljikovih hidratov kot energetski vir porablja peptide in amino kisline (Russell in sod., 1988; Yang in Russell, 1993c). Producija vampskega amoniaka pogosto preseže zmogljivost bakterijskih vrst, ki amonik izkoriščajo, zato se le-ta lahko kopiči v vampu. Odvečna količina amoniaka se absorbira skozi vampske stene in se v jetrih pretvori v sečnino. Nekaj sečnine se preko slino reciklira nazaj v vamp (hepatoruminalno kroženje dušika), toda večina se je izgubi sečem (Nagaraja in sod., 1997).

IOP zavirajo ureazno aktivnost vampske bakterije (Starnes in sod., 1984), zmanjšujejo aktivnosti proteolitičnih bakterij (proteoliza) in tistih, ki fermentirajo amino kisline (Russell, 1996), zmanjšujejo razgradnjo peptidov in deaminacijo amino kislin v vampu (Yang in Russell, 1993a,b). Posledično lahko koncentracija amoniaka v vampu upade (Dinius, 1976) zaradi zmanjšanja nepotrebne razgradnje proteinov in amino kislin iz krme, kar se kaže kot učinek varčevanja s proteinimi (Nagaraja in sod., 1997) (slika 7).

Ionofori zmanjšujejo razgradnjo peptidov in deaminacijo amino kislin v vampu v večjem obsegu kot proteolizo (Newbold in sod., 1990). To poveča količino dostopnih proteinov krme, ki uidejo mikrobní razgradnji v vampu in pridejo intaktni v tanko črevo prežvekovalcev. Večina proteolitičnih bakterij je odporna na ionofore (Chen in Wolin, 1979). Skupni učinek ionoforov na dušični metabolizem je odvisen od krme. Največji odziv je pričakovati, kadar proteinov v krmi primanjkuje in se jih dodaja v topni obliki, zato se zelo verjetno hitro razgradijo in fermentirajo do amoniaka v vampu (Hanson in Klopfenstein, 1979). Vir dušika v krmi predstavlja NPN v obliki sečnine. Ker torej hidroliza sečnine do amoniaka poteka hitreje kot njegovo nastajanje, ima zmanjšana ureazna aktivnost ugoden vpliv na izkoriščanje sečnine pri prežvekovalcih (Nagaraja in sod., 1997).

#### Manj pogosta vampna bolezenska stanja

Spremenjen vzorec vampne fermentacije, ki je posledica dodajanja prehranskih ionoforov, deluje zaščitno proti prebavnim motnjam pri prežvekovalcih, kot so acidoza, napihovanje, akutni bovini pljučni edem in ostali. Ionoforni antibiotiki imajo zaradi svoje selektivnosti za Gram pozitivne bakterije potencialno sposobnost preprečevanja nastajanja mlečne kisline v vampu (je veliko močnejša kislina v primerjavi s tipičnimi KMK), saj zavirajo poglavite producente laktata (*Streptococcus bovis* in *Lactobacillus spp.*) (Newbold in Wallace, 1988).

Krmne mešanice vsebujejo veliko količino žitnega zrnja, ki lahko povzroči drastičen padec sicer nevtralnega pH v vampu (Slyter, 1976). Monenzin zmanjša nastajanje mlečne kisline *in vitro* (Dennis in sod., 1981). Tudi govedo, tretirano z monenzinom, ima v vampu nižjo koncentracijo laktata in višjo vrednost pH (Nagaraja in sod., 1982) (slika 7). Vampne celulolitične bakterije so zelo občutljive na padec vrednosti pH (Stewart in sod., 1997), razgradnja celuloze lahko v večjem obsegu poteka le ob nižji koncentraciji laktata in posledično višji pH vrednosti vampnega soka.

#### 2.4.1.3 Antimikrobná aktivnost ionoforov

Razlike v občutljivosti bakterij, ki temeljijo na gramskem barvanju, kažejo na to, da igra pomembno vlogo v dovetnosti bakterij za ionofore struktura celične stene. Lipopolisaharidni sloj (LPS sloj) Gram negativnih bakterij (rodovi *Prevotella*, *Fibrobacter*, *Succinivibrio* in drugi) se obnaša kot lipidna bariera in tako zadrži ionofore, preden bi dosegli membrano celice (Russell in Strobel, 1989). Gram pozitivne bakterije (rodovi *Lactobacillus*, *Streptococcus* in drugi) nimajo LPS sloja, zato so veliko bolj dovetne za delovanje ionoforov (Russell, 1996). Vendar prisotnost LPS sloja ni absolutni kriterij za odpornost, kajti nekatere Gram negativne bakterije so vendarle dovetne za višje koncentracije ionoforov (Nagaraja in Taylor, 1987). Zaradi nekaterih prednostnih nalog, ki jih imajo občutljivi mikrobi (razgradnja celuloze z ruminokoki), se

izboljšave na sami živali navezujejo na sposobnost odpornih mikrobov, da zavzamejo enake ali podobne niše (razgradnja celuloze s *F. succinogenes*). Ker sestava krme lahko vpliva na koncentracijo in razmerje kationov v vamnem soku, je učinkovitost ionoforov odvisna tudi od zaužite krme. Ionoforni antibiotiki prav tako zavirajo rast bakterij, ki se sicer barvajo Gram negativno ali variabilno, vendar pa imajo v resnici Gram pozitivno strukturo celične stene (npr. rodoval *Butyrivibrio* in *Selenomonas*). Vampne bakterije, ki proizvajajo mlečno, masleno ali mravljično kislino ter vodik ali amoniak, so v splošnem dovezetne za ionofore. Bakterije, katerih fermentacijska produkta sta jantarna ali propionska kislina, pa so v splošnem na ionofore odporne (Russel in Strobel, 1989; Russell, 1996).

Delovanje ionofornih antibiotikov je v glavnem bakteristatično in ne baktericidno (Nagaraya in Taylor, 1987). Njihova učinkovitost se izraža z minimalno inhibitorno koncentracijo (MIK). To je najnižja koncentracija IOP, ki še preprečuje rast občutljivih bakterij. Razmerje ionofor/bakterijska masa je, poleg absolutne koncentracije, ključno za učinkovitost ionofora (Chow in sod., 1994). Pokazalo pa se je, da lahko odpornost določenih Gram negativnih bakterij na posamezni ionofor povzroči večjo odpornost tudi na druge ionofore (Newbold in sod., 1993). Pomemben vpliv na aktivnost ionoforov proti vamnim bakterijam ima pH in koncentracija kationov v mediju. Bakterije, rezistentne na ionofore, so navzoče v večjem številu v vamužuživali, ki so krmljene s krmo z dodatkom krmnega antibiotika (Olumeyan in sod., 1986). Velik delež ionofornih antibiotikov se lahko absorbira iz prebavil (monenzin do 50 %) (Donoho, 1984). Precejšen delež monenzina pa preide črevesje intakten, kar lahko privede do pomembnih sekundarnih učinkov (angl. *post – ruminal effects*). Mednje bi lahko uvrstili mikrobno fermentacijo v debelem črevesu ter vpliv na celične membrane evkariontskih celic in mitohondrije, zato vpliv ionoforov na absorpcijo hranilnih snovi in tkivni metabolizem živali ne more biti popolnoma izvzet (Nagaraja in sod., 1997).

#### 2.4.1.4 Odpornost bakterij na antibiotike

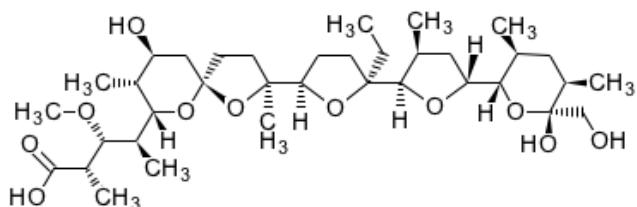
Kmalu potem, ko so antibiotiki postali komercialno dostopni, so se pojavile tudi na antibiotike odporne bakterije. Odpornost je praviloma posledica enega od treh mehanizmov: (i) sinteza encimov, ki razgradijo antibiotik, (ii) sprememba celične komponente, ki je tarča za delovanje antibiotika in (iii) sprememba celične permeabilnosti za antibiotik. Ker se geni, ki kodirajo rezistenco, pogosto horizontalno prenašajo med bakterijskimi sevi ali vrstami, se učinkovitost velikega števila antibiotikov hitro zmanjšuje. O prvih dveh mehanizmih ni znanega veliko, bolje pa je preučen tretji mehanizem nastajanja odpornosti na ionoforne antibiotike pri vamnih bakterijah.

Producenci jantarne in propionske kisline so v splošnem odporni na ionofore (Chen in Wolin, 1979). Na podlagi tega sta Bergen in Bates (1984) opazila, da je rezistenza povezana z encimom fumaratna reduktaza, ki ga vsebujejo celice Gram negativnih vrst in je potreben pri pretvorbi fumarične kisline v jantarno ter vpliva na povečano produkcijo propionske kisline iz jantarne. To je pomemben integralni membranski protein pri vrstah, odpornih na monenzin. Omenjeni encim naj bi imel sposobnost prenašanja protonov čez membrano in bi tako preprečeval ionski tok, ki ga povzroča ionoforni antibiotik. V svojih raziskavah sta Morehead in Dawson (1992) opazila, da na monenzin odporni sevi vrste *P. ruminicola* producira več propionske kisline in kaže, da imajo več encimov fumaratne reduktaze, kot tisti, ki so bili na monenzin občutljivi. Hipotezi, ki sta jo razvila Bergen in Bates (1984), je nasprotovala velika občutljivost vampnega simbionta *R. flavefaciens*, ki tudi ima encim fumaratna reduktaza (Chen in Wolin, 1979) in je producent velikih količin jantarne kisline (Hungate, 1966). Danes vemo, da je rezistenza na ionofore povezana s strukturo celične stene (Russell in Strobel, 1988; Newbold in sod., 1992).

Zunanja membrana Gram negativnih bakterij je neprepustna za veliko število makromolekul in njihov prehod je posredovan s porini. Slednji oblikujejo hidrofilne kanale skozi hidrofobno zunanjo membrano z omejitvijo na približno 600 Da (Nikaido in Nakae, 1979). Ker so ionofori ekstremno hidrofobni in z molekulskimi masami, večjimi od 500 Da, jim LPS sloj predstavlja oviro za prehajanje. Iz tega razloga so Gram negativne bakterije v splošnem bolj odporne kot Gram pozitivne vrste, toda tretiranje z EDTA običajno poveča prepustnost LPS sloja za ionofore (Booth in sod., 1979). Poleg Gram pozitivnih bakterij so iz istega razloga na ionoforne antibiotike občutljive še vampne praživali in glice (Dennis in sod., 1986; Stewart in sod., 1987). Nekatere bakterije, ki se barvajo po Gramu negativno ali variabilno, vendar imajo dejansko Gram pozitivno strukturo celične stene (*B. fibrisolvens* (Cheng in Costerton, 1977) in ruminokoki (Hungate, 1966)), so prav tako občutljivi na ionofore.

#### 2.4.1.5 Monenzin

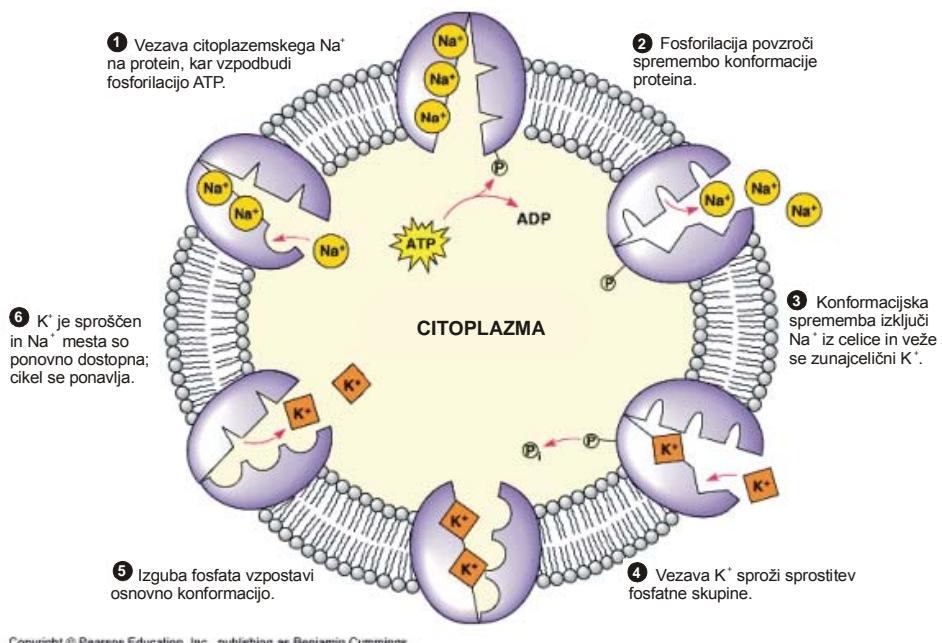
Monenzin (slika 8) je ionoforni antibiotik s komercialnim imenom Rumenzin, ki je bil registriran in dovoljen za uporabo kot prehranski dodatek za krmo živali (Feed Additive Compendium, 2002).



Slika 8: Kemijska zgradba monenzina (DBGET, 2007)

Prvotno so ga tržili kot metanski inhibitor, vendar ima sposobnost spreminjanja številnih aspektov vampnih fermentacij. Monenzin je karboksilen polietrski antibiotik z molekulsko maso 671 Da, ki ga sintetizira bakterija *Streptomyces cinnamonensis* (Pressman, 1976; Westley, 1983). Izkazuje zmerno aktivnost *in vitro* predvsem proti različnim Gram pozitivnim bakterijam (Haney in Hoehn, 1967).

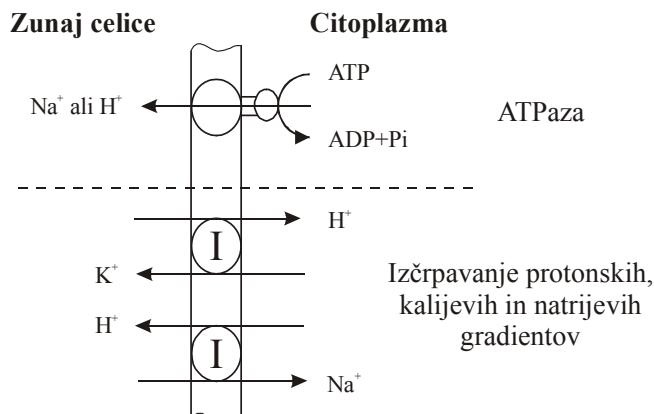
Slika 9 prikazuje vzdrževanje normalnega ionskega ravnotesja celice, ki za ta aktivni transport proti naraščajočemu koncentracijskemu gradientu potrebuje ATP energijo. Kemiosmotska teorija, ki jo je razvil Mitchell (1961) razlaga, da bakterije uporabljajo membransko vezane encime ATP-aze ali elektronski transportni sistem za prenos protonov čez celično membrano.



Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Slika 9: Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> črpalka v celici (Jeanneret-Gris, 2004)

Proces na zgornji sliki je normalen proces v celici, ki ga pa dodatek monenzina pospeši in tako povzroči izčrpavanje ATP zalog celice.



Slika 10: Možni učinki ionoformega antibiotika (I) na ionski tok čez membrano celice (Russell, 2002)

Sposobnost ionoformega antibiotika monenzina, da prenaša protone ( $H^+$ ), kalijeve ( $K^+$ ) in natrijeve ( $Na^+$ ) ione preko celične membrane na monenzin občutljivih bakterij, in da pospešuje ATPazno aktivnost, je prikazana na sliki 10.

Monenzin je kovinski/protonski antiporter, ki je sposoben menjave  $H^+$  za  $Na^+$  ali za  $K^+$  ione (Pressman, 1976; Russell in Strobel, 1989) in ta značilnost se uporablja kot pokazatelj občutljivosti na monenzin (Lana in Russell, 1996). Koncentracija vampnega kalija je običajno štiri do petkrat nižja od koncentracije  $Na^+$ , vendar je  $K^+$  prevladujoči znotrajcelični kation pri mikroorganizmih, katerega koncentracija lahko znaša 600 mM (Russell, 1987). V vampu je  $Na^+$  prevladujoči zunajcelični kation (90 do 150 mM; Durand in Kawashimi, 1980). Ko se vgradi v membrano celice, monenzin izmenjava znotrajcelične kalijeve ione za zunajcelične protone ( $H^+$ ) ali zunajcelični natrij za znotrajcelične protone ( $H^+$ ) (Russell, 1987) (slika 10). Kalijev gradient je večji od natrijevega, zato se protoni nalagajo v bakterijski celici (Chow in sod., 1994). Citoplazma celice se zakisa, bakterija pa na tako stanje reagira z aktivacijo reverzibilne ATPaze, z namenom, da izčrpa protone ( $H^+$ ) iz celice (Booth, 1985). Aktivirajo se ostale ATP osnovne črpalke, ki porabljajo ATP za odstranitev  $Na^+$  in vnos  $K^+$ , z namenom ponovne vzpostavitev ionskih gradientov. Iz tega sledi, da ATP hidroliza ne služi več za rast in reprodukcijo in s tem se zmanjšajo znotrajcelične zaloge ATP, kar vodi v celično smrt (Russell, 1987; Russell in Strobel, 1989).

Živali monenzin absorbirajo, vendar se ga veliko vrne v prebavila z žolčem preko hepatoruminalnega kroženja. Monenzin inhibira producente vodika, ki je prekurzor za sintezo metana. Hungate in sod. (1970) pa so ocenili, da okoli 18 % vampnega metana nastane iz mravljične kisline, zato monenzin nikoli popolnoma ne zavre produkcije metana (Russell in Strobel, 1989).

Raziskave so tudi pokazale, (i) da monenzin inhibira metanogenezo iz mravljične kislina (Dellinger in Ferry, 1984), (ii) da metanska inhibicija deloma rezultira v inhibiciji privzema niklja pri metanogenih arhejah (Jarrell in Sprott, 1983), in (iii) da je možna delna adaptacija metanogeneze na monenzin, na kar kažejo nekateri dalj časa trajajoči *in vivo* poskusi (Johnson in sod., 1991).

Pokazalo se je, da monenzin spremeni razmerje med ocetno in propionsko kislino tudi v mešanih kulturah, ki ne generirajo metana, iz česar sklepamo, da je del povečanega nastanka propionske kislino neodvisen od metanske produkcije (Slyter, 1979).

Monenzin lahko poveča prebavljivost suhe snovi pri prežvekovalcih (Kahn in sod., 2006). Pripisujejo mu tudi vazodilatorno (širi žile) in antihipertenzivno (niža povišan krvni tlak) delovanje (CHRISP Thesaurus, 1999).

Monenzin vpliva na fermentacijo vampnega metabolizma na več nivojih:

- metabolizem ogljikovih hidratov v vamu: višja produkcija vampne propionske kislino rezultira v učinku varčevanja s proteini, saj v takih okoliščinah žival porabi manj amino kislin za glukoneogenezo (Schelling, 1984); opazili so manjše deleže ocetne in maslene kislino, pri tem je koncentracija skupnih KMK ostala nespremenjena oziroma se je rahlo znižala; višji deleži propionske kislino so ponavadi povezani z zmanjšano metanogenezo.
- metabolizem dušika v vamu: *in vitro* inkubacija s kazeinom kot edinim substratom in uporabo inokuluma iz netretirane in z monenzinom tretirane živali, je pokazala značilno zmanjšanje razgradnje proteinov po dodatku monenzina (Whetstone in sod., 1981); monenzin inhibira razgradnjo proteinov krme v vamu in tako spremeni končno mesto proteinske razgradnje v prebavilih živali, kar je zaradi energetskih in snovnih izgub, ki nastanejo pri sintezi vampnih mikrobnih proteinov, za gostiteljsko žival bolj ugodno (Chen in Russell, 1989; Russell in sod., 1988; Van Nevel in Demeyer, 1977).
- vampni mikrobi: monenzin spreminja vampno mikrofloro (Kahn in sod., 2006), kar zavira rast mlečnokislinskih bakterij in producentov vodika, promovira pa producente propionske in jantarne kislino.

#### 2.4.2 Neionoformni antibiotiki

Uporaba neionoformnih antibiotikov (npr. avoparcin, flavomicin, virginiamycin in tilozin) (Nagaraja in sod., 1997), kot prehranskih dodatkov za vzpodbujanje rasti pri govedu v komercialne namene, je aktualna dobrih 40 let. Z njimi zmanjšamo stroške živalske produkcije in preprečujemo pojavnost subkliničnih obolenj. Kot dodatek h krmi prežvekovalcev predstavlja raznoliko skupino, z razlikami v kemijski zgradbi, bakterijskem spektru delovanja, molekulsko maso in sposobnostjo absorpcije iz prebavil.

Neinofori, ki jih dodajamo v nizkih dozah in se iz prebavil ne vskrkajo v velikih količinah ali pa sploh ne, so bolj sprejemljivi kot prehranski dodatki, saj se posledično ne nalagajo v mleku in mesu (Hudd, 1983).

#### **2.4.3 Nevtralizirajoči agensi – pufrji**

Uporabljamo jih za nevtralizacijo presežka kislin, kadar je delovanje naravnih pufrskih sistemov (slina) za stabiliziranje vampne pH vrednosti nezadostno: kislina se pojavlja v krmi (silaža) ali pa se tvori med fermentacijo krme, bogate s topnimi ogljikovimi hidrati (škrob). Funkcija pufrov je uravnati pH vrednost, poveča pa se tudi osmolarnost v vampu, s čimer se poveča hitrost pretoka mikrobne vsebine v vampu. V uporabi so  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$ , bentonit in nekateri drugi (Tucker in sod., 1992).

#### **2.4.4 Inhibitorji proteolize, peptidolize in deaminacije**

Mikrobnata razgradnja prehranskih proteinov v vampu v peptide, aminokisline in posledično v amoniak je nezaželen proces za gostitelja (Hobson in Wallace, 1982). Uporaba inhibitorjev razgradnje krmnih proteinov je smiselna takrat, ko so proteini v krmi omejujoč dejavnik. Prevladujoče proteolitične reakcije (začetna razgradnja proteinov) so v vampu zelo raznolike (Wallace in Cotta, 1988), zato proteolitično aktivnost težko inhibiramo le s spremenjanjem same mikrobne populacije, temveč bi se morali usmeriti tudi v inhibicijo samih proteolitičnih encimov. Kot najbolj učinkovita metoda inhibicije proteolize v vampu še vedno ostaja toplotna in kemična obdelava krme oziroma prehranskih proteinov, ki postanejo zato bolj odporni na mikrobno razgradnjo v vampu (Broderick in sod., 1991; Schwab, 1995).

Peptidi so pomembni intermediati v razgradnji proteinov v vampu. Prevladujoč mehanizem peptidne razgradnje v vampu obsega cepitev polipeptidne verige na dipeptide z encimom dipeptidil aminopeptidaza (DAP), dipeptidi pa se nato razgradijo v amino kisline. Aktivnost DAP se nanaša izključno na vrsto *P. ruminicola*, ki ima osrednjo vlogo v hidrolizi peptidov in je s tem tarča manipulacije z inhibitorji DAP (Maidera in sod., 1995). Deaminacijo amino kislin izvaja veliko različnih vampnih mikroorganizmov, vsi z nizko aktivnostjo. Nasprotno pa imajo druge vrste bakterij (*Peptostreptococcus anaerobius*, *Clostridium sticklandii* in *Clostridium aminophilum*) kljub redki zastopanosti v vampu, visoko deaminazno aktivnost (Paster in sod., 1993). Ta druga populacija še ni povsem raziskana, vendar pa je znano, da so te bakterije občutljive na monenzin, kar vpliva na zmanjšanje produkcije amoniaka (Yang in Russell, 1993a,b).

#### **2.4.5 Metanski inhibitorji**

Producija metana predstavlja izgubo energije za žival in prispeva k emisiji toplogrednih plinov v okolje (Moss, 1993). Specifični inhibitorji produkcije metana amikloral, kloral hidrat (v vampu se pretvorji v kloroform) in drugi so neprimerni za uporabo, saj posledice njihovega dolgotrajnega delovanja vodijo v okvaro jeter (Lanigan in sod., 1978).

#### **2.4.6 Rastni dejavniki**

Rastni dejavniki so organske (amino kisline, vitamini, maščobne kisline, hemin, purini in pirimidini) in anorganske snovi (ogljikov dioksid in elektroliti), potrebne za rast, ki jih ne sintetizirajo mikroorganizmi sami. V vampu so prisotni v zadostnih količinah, njihov izvor pa je krma ali pa so dosegljivi po sintezi *de novo*. Žival jih lahko izkoristi tudi po navzkrižnem hranjenju vampnih simbiontov ali recikliranju mikrobne snovi v vampu. V primeru prehranskega stresa je lahko oskrba z rastnimi dejavniki omejena. Celo v primeru krme, uravnotežene z energijo in proteini, lahko pomanjkanje rastnih dejavnikov zavre mikrobno rast. V omenjenih primerih oskrba z rastnimi dejavniki pozitivno vpliva na žival. K rastnim dejavnikom prištevamo vitamine (vitamini B kompleksa, vitamin K), minerale (Ca, Cl, K, Mg, P, S, in drugi ) in KMK (4-C in 5-C KMK) (Nagaraja in sod., 1997).

#### **2.4.7 Maščobe**

Maščobe s svojo visoko kalorično gostoto lahko zadostijo zahtevam po velikih količinah energije v intenzivnih sistemih reje živali. Genetski potencial živali za produktivnost običajno presega njihovo sposobnost pridobivanja energije iz običajne krme, kar se dejansko dogaja pri kravah molznicah v zgodnji laktaciji (Palmquist, 1994). Dodane maščobe se neposredno vgradijo v mlečne maščobe in s tem se poveča učinkovitost mlečne proizvodnje. Maščobe, predvsem v obliki dolgoverižnih maščobnih kislin, so v uporabi kot modifikatorji vampne fermentacije (inhibitorji metanske produkcije), saj spremenijo prebavo in absorpcijo hranil (Demeyer in sod., 1969).

#### **2.4.8 Mikrobeni prehranski dodatki in encimi**

Bakterijski dodatki so v uporabi kot stimulanti razvoja vampa (probiotiki) pri mladih prežvekovalcih. To so prehranski dodatki, ki temeljijo na živih mikroorganizmih in morajo tudi preživeti v prebavilih živali. Predlagani mehanizmi za izboljšanje kondicije živali, krmljene z mikrobnim dodatkom, so: (i) produkcija antibakterijskih snovi (kisline, bakteriocini, antibiotiki), (ii) kompeticija z neželenimi organizmi za kolonizacijo prostora in/ali hranil, (iii) produkcija in/ali stimulacija encimov, (iv) stimulacija imunskega odziva pri gostitelju ter (v) presnova in detoksifikacija neželenih snovi

(Fuller, 1989). Med najpogosteje uporabljenimi so *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* in *Bacillus subtilis*. Vampni metabolizem lahko manipuliramo tudi s kulturo kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*, ki pomaga pri nalaganju telesne mase pri rastočih živalih, pri kravah molznicah pa povzroča večjo mlečno produkcijo (Fiems, 1994) in poveča sintezo KMK (Gray in Ryan, 1989).

Glivni encimi ugodno vplivajo na vampno fermentacijo, saj izboljšajo izkoriščanje krme, hkrati pa so v interakciji z vampnimi mikroorganizmi. Prebiotiki, kot neprebavljeni ogljikovi hidrati, so sestavine krme, ki selektivno vzpodbujajo rast koristnih mikroorganizmov ali njihovo encimsko aktivnost. Najpogosteje krmljeni encimi mikroorganizmov pri prežvekovalcih so proteaze (*Aspergillus* spp., *Bacillus* spp.), celulaze, hemicelulaze, pektinaze (*Aspergillus* spp., *Trichoderma longibrachiatum*) in amilaze (*Aspergillus* spp., *Bacillus* spp.) (Treacher in Hunt, 1996; Beauchemin in Rode, 1996). Poznamo pa tudi različne druge spojine z antimikrobnou aktivnostjo (npr. alkil amini, sorbitol, malična kislina in sarsaponini). Nekateri zgoraj omenjeni vampni modifikatorji stimulirajo bakterijsko rast, drugi spreminjajo mikrobeno aktivnost, lahko pa delujejo fungicidno, antiprotozojsko in antibakterijsko. Zavirajo širok spekter bakterij, hkrati pa so varnejši za uporabo v primerjavi z antibiotiki (Baldwin in sod., 1982).

#### 2.4.9 Rastlinski izvlečki

Rastline imajo skoraj neomejeno sposobnost sintetiziranja aromatičnih substanc – sekundarnih metabolitov (v visokih koncentracijah), med katerimi prevladujejo fenoli oziroma njihovi derivati, tanini, terpenoidi, alkaloidi, flavonoidi, esencialna olja in sarsaponini (*Yucca schidigera*) (Chesson in sod., 1982; Wallace in sod., 1994; Kamel, 2001). Mnoge od teh snovi vplivajo na mikrobeno aktivnost. Večina je sekundarnih metabolitov z različnimi bioaktivnimi lastnostmi (Dano in Bogh, 1999). Cowan (1999) je objavil, da je 60 % derivatov iz esencialnih olj inhibitornih za glice in 30 % za bakterije. Mehanizem, s katerim večina esencialnih olj deluje antibakterijsko, je uničenje celične membrane zaradi lipofilnega značaja olja. To vpliva na transport elektronov, ionski gradient, premeščanje proteinov, fosforilacijo in druge encimske reakcije, ki povzročijo pri napadenih bakterijah izgubo kemiosmotskega nadzora (Cox in sod., 2000).

Velika raznolikost sekundarnih metabolitov zmanjšuje možnost, da bi rastlinojede živali in patogeni mikroorganizmi razvili rezistenco na vse ali večino teh snovi ali pa onemogoča prilagoditev na njih (Briskin, 2000). Kljub temu, da te spojine večinoma še niso bile podrobneje raziskane, pa vemo, da lahko rastlinski izvlečki vplivajo podobno na količino zaužite krme, presnova in tudi na populacijske premike v vampsnjem ekosistemu (inhibicija ali stimulacija vampnih mikroorganizmov) kot prehranski antibiotiki (Wallace in sod., 1994; Greathead, 2003).

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 Bakterijski sevi

Preglednica 1: Bakterijski sevi in njihove značilnosti

Bakterijski sev	Glavni fermentacijski produkti	Producija plinov	Barvanje po Gramu
<i>Prevotella bryantii</i> B <sub>1</sub> 4 <sup>T</sup>	ocetna, jantarna, propionska kislina		Gram -
<i>Prevotella ruminicola</i> 23 <sup>T</sup>	ocetna, jantarna, propionska kislina		Gram -
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> 3071 <sup>T</sup>	mravljična, maslena, acetna kislina	H <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub>	Gram - (struktura celične stene po Gramu +)
<i>Fibrobacter succinogenes</i> S85	acetna, jantarna kislina		Gram -
<i>Ruminococcus albus</i> 20455	acetna kislina	H <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub>	Gram +
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> 007 S/6	acetna, jantarna kislina	CO <sub>2</sub>	Gram +

##### Razlogi za vključitev izbranih šestih sevov v poskus:

- pomembna metabolna vloga v vampu (razgradnja celuloze, ksilanov, ...)
- tvorba vodika (*R. albus* 20455 in *B. fibrisolvens* 3071<sup>T</sup> producenta vodika, zato sta zanimiva iz vidika posredne inhibicije metanogeneze v vampu)
- trije sevi so Gram negativne vrste (*P. ruminicola* 23<sup>T</sup>, *P. bryantii* B<sub>1</sub>4<sup>T</sup>, *F. succinogenes* S85), dva sta Gram pozitivna (*R. albus*, *R. flavefaciens*), en (*B. fibrisolvens* 3071<sup>T</sup>) pa ima Gram pozitivno strukturo celične stene, čeprav se obarva Gram negativno
- o njih je veliko znanega
- sevi *Prevotella bryantii* naj bi se bili sposobni prilagoditi in razviti t.i. ultrarezistenco na monenzin (Callaway in Russell, 1999).

##### 3.1.2 Gojišče M2

Bakterijske seve smo gojili po Bryantovi modifikaciji Hungatove tehnike (Bryant, 1972) v modificiranem (poltrdem/tekočem) anaerobnem gojišču M2 (Hobson, 1969), ki je osnovna rastna podlaga za vampne bakterije.

Preglednica 2: Sestavine za pripravo gojišča M2

Sestavina	Koncentracija (ut. %)
NaHCO <sub>3</sub>	0,4
bakto tripton	1,0
kvasni izvleček	0,25
glukoza	0,2
celobioza	0,2
topni škrob	0,2
resazurin	0,001
L-cistein HCl	0,1
mineralna raztopina I	15,0 (vol. %)
mineralna raztopina II	15,0 (vol. %)
vampni sok	30,0 (vol. %)
deionizirana voda	40,0 (vol. %)

Preglednica 3: Sestavine za pripravo mineralnih raztopin

mineralna raztopina I	g/1000ml H <sub>2</sub> O
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,0
mineralna raztopina II	g/1000ml H <sub>2</sub> O
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6,0
NaCl	6,0
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	1,3
CaCl <sub>2</sub>	0,47

Vampni sok goveda smo po odvzemu centrifugirali 30 minut pri 10.000 rpm in 15°C (centrifuga RC5C Sorvall instruments, Nemčija). Po centrifugiranju smo supernatant avtoklavirali in ga do uporabe shranili v hladilniku pri 4°C. Pred uporabo smo vampni sok dodatno centrifugirali pri enakih pogojih, da smo odstranili še preostale večje delce, ki bi lahko motili kasnejše meritve OD tekočih kultur tekom poskusa.

M2 poltrdo gojišče smo uporabljali za shranjevanje (pri -20°C) bakterijskih sevov. Sestavinam, ki smo jih vključili pri tekočem gojišču, smo dodali 0,7 ut. % agarja.

Sestavine iz preglednice 2, razen L-cisteina HCl (deluje kot dodatni reducent, ki omogoča pripravo gojišča z ustrezno nizkim redoks potencialom), smo ob mešanju segrevali. V gojišče smo dodali tudi raztopino resazurina, ki deluje kot indikator prisotnosti kisika v gojišču. Redukcijo oziroma odstranitev kisika iz gojišča smo dosegli: (i) s segrevanjem (gojišče smo zavreli), (ii) s prepohovanjem s CO<sub>2</sub> (po zavretju smo gojišče prenehali segrevati ter ga začeli prepohovati s CO<sub>2</sub> brez primesi kisika, ki je bil speljan čez kolono z reduciranimi bakrovimi opilki, segretimi na 350°C) in (iii) z dodatkom cisteina (ko smo gojišče začeli prepohovati s CO<sub>2</sub>, smo v gojišče dodali še dodatni kemijski reducent, t. j. L-cistein HCl; po dodatku cisteina smo gojišče

prepihovali še 10 minut oziroma toliko časa, da je gojišče spremenilo barvo (modro vijolična v rdečo, nato v rožnato in končno v rumeno rjavo), kar je pomenilo da je gojišče ustrezno reducirano za gojenje striktnih anaerobov). Sledilo je razlivanje gojišča v steklene Hungatove epruvete (po 8 ml) (Bellco Glass, USA) ob prepihovanju s CO<sub>2</sub> in neprodušno zapiranje z zamaški iz butilne gume. V naslednjem koraku smo gojišča avtoklavirali po programu za avtoklaviranje gojišč (15 minut, 121°C, 1.1 bar) v avtoklavu A-21CA (Kambič laboratorijska oprema, Slovenija) in jih do uporabe shranili na sobni temperaturi.

### 3.1.3 Raztopine in pufri

Preglednica 4: Raztopine in pufri, uporabljeni v poskusu

Ime pufra / raztopine	Sestava
Lowry A	5 % Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
Lowry B	0,1% NaK tartrat + 0,5 % CuSO <sub>4</sub> * 5H <sub>2</sub> O, pH = 7
Folin-Ciocalteu reagent	57,5 % H <sub>2</sub> O 15 % Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 10 % Na tungstat dihidrat 10 % HCl (25 %) 85 ut. % H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 2,5 % Molibdenova kislina Na dihidrat
1 M Na fosfatni pufer, pH = 6,5	1 M Na hidrogen fosfat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) + 1 M Na dihidrogenfosfat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) (odgovarjajoče razmerje)
2 mM monenzin	Monensin Sodium Salt (Sigma M5273, MW = 692 g/mol) v etanolu

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Gojenje čistih bakterijskih kultur

Čiste bakterijske kulture šestih vampnih sevov, shranjene v poltrdem poldefiniranem agarskem M2 gojišču, smo anaerobno gojili pri 37°C po modificirani (Bryant, 1972) Hungatovi tehniki za anaerobno gojenje bakterijskih kultur. Čeznočne tekoče kulture so bile vir inokuluma za poskus.

Pred poskusom smo za vsak izbrani sev pripravili rastno krivuljo, da smo dobili vpogled v hitrost rasti preučevanih sevov v gojišču brez monenzina. Glede na rastne krivulje smo s po dvema sevoma hkrati začeli poskus, kjer smo glede na fazo rasti štirikrat opravili določene meritve (glej poglavje 3.2.2).

### 3.2.2 Barvanje po Gramu

Na začetku poskusa smo z barvanjem po Gramu ugotavljali čistost bakterijskih kultur. Gramsko barvanje uvrščamo med sestavljenata, diferencialna (razlikovalna) barvanja, kjer

zaporedno uporabljamo več barvil. To je najpomembnejše barvanje v bakteriologiji. Po Gramskem barvanju se bakterije obarvajo modro do temno vijolično (G+) ali rdeče (G-).

Protokol barvanja po Gramu:

1. fiksacija preparata v plamenu
2. preparat s kristal vijoličnim barvilom barvamo 1 minuto
3. speremo z vodovodno vodo
4. preparat prelijemo z lugolom, slednjega odlijemo in preparat ponovno prelijemo z lugolom – barvamo 1 minuto
5. speremo z vodovodno vodo
6. preparat razbarvamo z mešanico etanola (90 %) in acetona (10 %)
7. speremo z vodovodno vodo
8. preparat obarvamo s safraninom – barvamo 1 minuto
9. speremo z vodovodno vodo, posušimo in pogledamo pod mikroskopom.

### 3.2.3 Merjenje optične gostote tekočih kultur

Število oziroma koncentracijo mikrobnih celic v vzorcu je mogoče ugotavljati na več načinov. Med drugim lahko povečevanje števila celic oziroma rast bakterijske kulture indirektno merimo kot funkcijo povečevanja motnosti (naraščanje celične gostote oziroma optične gostote OD; angl. *optical density*) tekočega gojišča. Celice in komponente v gojišču svetlobe absorbirajo in odbijejo. Bakterijsko kulturo izpostavimo vpadni svetlobi določene valovne dolžine in s spektrofotometrom izmerimo intenziteto izhodne svetlobe, ki doseže detektor.

Transmitanca ( $T$ ), ki se nanaša na matematično količino, je frakcija vpadne svetlobe pri določeni valovni dolžini, ki preide vzorec:

$$T = \frac{P_{tr}}{P_0} \quad \dots (1)$$

Absorpcija se nanaša na fizikalni proces absorbiranja svetlobe, medtem ko absorbanca pomeni matematično količino, ki je funkcija absorbirane svetlobe pri določeni valovni dolžini vpadne svetlobe:

$$A = -\log\left(\frac{P_{abs}}{P_0}\right) = -\log\left(\frac{P_0 - P_{tr}}{P_0}\right) = -\log\left(1 - \frac{P_{tr}}{P_0}\right) = \log\left(\frac{P_0}{P_{tr}}\right) \quad \dots (2)$$

Absorbanco predstavlja desetiški logaritem obratne vrednosti transmitance:

$$A = \log\left(\frac{1}{T}\right) \quad \dots (3)$$

Optična gostota je absorbanca ( $A$ ) optičnega elementa pri določeni valovni dolžini ( $\lambda$ ) na enoto razdalje ( $l$ ):

$$OD = \frac{A}{l} = \frac{1}{l} \log\left(\frac{1}{T}\right) = \frac{1}{l} \log\left(\frac{P_0}{P_{tr}}\right) \quad \dots (4)$$

kjer je:

$l$  = razdalja, ki jo svetloba prepotuje skozi vzorec [cm]

$A$  = absorbanca pri valovni dolžini  $\lambda$

$T$  = transmitanca

$P_0$  = intenziteta vpadnega svetlobnega žarka, ki je prešla vzorec

$P_{tr}$  = intenziteta prepuščenega svetlobnega žarka

$P_{abs}$  = intenziteta absorbiranega svetlobnega žarka

(Sheppard in sod., 1985)

Rast bakterijskih kultur v našem poskusu smo spremljali z merjenjem optične gostote s spektrofotometrom (SP Novaspec II, Švedska) pri valovni dolžini 654 nm. Aparat smo umerili s samim gojiščem M2, katerega OD vrednost smo odšteli od OD vrednosti bakterijskih kultur. Kulture smo pred merjenjem standardizirano premešali ter izmerili absorbanco. Glede na vrednost OD smo ugotavliali, v kateri fazi rasti se nahajajo celice.

### 3.2.4 Merjenje pH vrednosti

Vrednost pH je logaritemska mera koncentracije vodikovih ( $H^+$ ) ionov (protonov) v vodni raztopini. Numerično je to negativni desetiški logaritem koncentracije vodikovih ( $H^+$ ) ionov:

$$pH = -\log_{10}[H^+] \quad \dots (5)$$

(Senese, 2007).

Poimenovanje pH izhaja iz latinske besedne zveze *pondus hydrogenii* (Maass, 2001). Rast izbranih vampnih sevov smo sledili tudi z merjenjem pH vrednosti v bakterijskih kulturah. Fermentacijski produkti, ki se tvorijo ob rasti anaerobnih bakterij (KMK,  $H_2$ , idr.), se sproščajo v gojišče, kar se pokaže kot padec pH vrednosti. Tekoče kulture v Hungatovih epruvetah smo centrifugirali 30 minut pri 3.000 rpm in 25°C (centrifuga Janetzki TM23, Nemčija). Tvorili sta se dve fazи, zgornja tekoča (supernatant) in spodnja trdna (pelet). Supernatant smo prelili v primerno posodo (čašo) in s pH elektrodo (Orion 520A, ZDA) takoj izmerili pH. Merjenje pH vrednosti z lističi lakmusovega papirja na pol ali eno enoto natančno je bilo za naš poskus premalo natančno, zato smo merili pH s pH metrom (Orion 520A, ZDA) in z elektrodo (pH Elektrode Sen Tix 62 Plus). Izmerili smo tudi pH sterilnega gojišča, da smo poznali pH kulture na začetku poskusa.

### 3.2.5 Ugotavljanje koncentracije celičnih proteinov po Lowry-ju

Povečevanje števila celic v bakterijski kulturi se v normalnih razmerah odraža tudi na povečevanju koncentracije celičnih proteinov. Z biokemijsko metodo za ugotavljanje

celotne koncentracije proteinov v vzorcu hkrati posredno ugotavljamo rast mikroorganizmov (Lowry in sod., 1951), kajti večja kot je izmerjena koncentracija celičnih proteinov, več bakterijskih celic je zraslo v gojišču. Celične pelete smo po centrifugiranju (Hettich Mikro200R, Nemčija; 10 minut, 12.000g, 4°C) tekočih bakterijskih kultur v mikrocentrifugirkah do poskusa hrаниli pri -20°C. Odtaljene vzorce smo sprali z 1 ml 50 mM Na-fosfatnega pufra (Na PB; pH = 6,5), da smo odstranili komponente gojišča. Po ponovnem centrifugiranju smo pelete resuspendirali v 1 ml Na PB ter jih ustrezno redčili (20x in 100x) v dveh paralelkah, da smo zmanjšali eksperimentalno napako ter uporabili po spodnjem, nekoliko spremenjenem protokolu (Eppendorf mikrocentrifugirkam in mikrotitrskim ploščam primerni volumni uporabljenih sestavin). Bakterijskim suspenzijam (40 µl) smo dodali 40 µl 1M NaOH, ki je hidroliziral celice, da so popokale, in denaturiral proteine. Vzorce v zaprtih mikrocentrifugirkah smo prenesli v vodno kopel, kjer so se kuhalili 5 minut pri 100°C za popolno denaturacijo proteinov, ki so se sprostili iz celic. Vzorce iz vodne kopeli smo po kuhanju ohladili na sobni temperaturi. Slednjim smo dodali 80 µl biuretnega ali OD reagenta, ki je sestavljen iz komponent Lowry A in Lowry B v razmerju 50:1 in premešali s pipeto. Potem smo v vsak vzorec odpipetirali še 16 µl Folin-Ciocalteu reagenta (Folin-Ciocalteu : destilirana H<sub>2</sub>O = 1 : 1), premešali s pipeto in glede na koncentracijo proteinov se je razvila barvna reakcija. Funkcija OD reagenta je vezava na določene značilne komponente proteinov in večja kot je koncentracija proteinov, temnejša barva se razvije. Sledilo je prenašanje vzorcev in BSA standarda z multikanalsko pipeto na mikrotitrsko ploščo in po 30 minutah inkubacije v končni fazi merjenje absorbance v spektrofotometru (Elx 808 Bio-Tek instruments, ZDA) pri 650 nm valovne dolžine. Enako kot vzorce smo pripravili tudi standardne koncentracije govejega serumskega albumina (BSA; angl. *bovine serum albumin*) (preglednica 5), da smo lahko pripravili umeritveno krivuljo, ki omogoča izračun koncentracije proteinov v proučevanih vzorcih.

Preglednica 5: Umeritvena krivulja standardnih koncentracij BSA

Koncentracije BSA (mg/ml)
0,40
0,32
0,24
0,16
0,08
0,00
dH <sub>2</sub> O

dH<sub>2</sub>O – destilirana voda

Pripravili smo redčene (20x in 100x) in neredčene bakterijske kulture, zrasle v gojiščih brez in z dodatkom monenzina v različnih koncentracijah. Redčitve v primernem območju umeritvene krivulje smo uporabili pri rezultatih. Absorbanco obdelanih vzorcev

smo izmerili s spektrofotometrom (Elx 808 Bio-Tek instruments, ZDA), z računalniškim programom KC Junior pa smo izračunali koncentracije proteinov v preučevanih vzorcih.

### **3.2.6 Etrska ekstrakcija kratkoverižnih maščobnih kislin**

Po četrti meritvi smo v vzorcu vseh preučevanih sevov in kontrolnih gojišč etrsko ekstrahirali kratkoverižne maščobne kisline. Med samim delom je bilo potrebno epruvete zapirati, da ni prihajalo do izhlapevanja etra, samo ekstrakcijo pa smo izvajali v digestoriju. Odvzeli smo 1 ml vzorca – tekoče kulture preučevanih bakterijskih sevov. V Hachove epruvete smo dali 0,4 g NaCl, ki je vezal vodo v vzorcih in dodali 1 ml vzorca, ki smo jih zakisali z 200 µl 50 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Potem smo dodali 100 µl krotonske kisline (1 g/100 ml) – internega standarda (IS). S pasteurjevo pipeto smo dodali 1 ml dietil etra (dietileter; Merck, Nemčija) in epruvete dobro zaprli. Sledilo je mešanje sestavin z 20 – kratnim obračanjem in kratko centrifugiranje do 2.000 rpm (Janetzki TM23, Nemčija). Po centrifugiranju smo v drugo serijo Hachovih epruvet previdno odpipetirali zgornjo etrsko fazo z ekstrahiranimi KMK, ki se je med centrifugiranjem ustvarila na vrhu. V prvo serijo epruvet smo k preostali vodni fazi ponovno dodali 1 ml etra, jih dobro zaprli, 20 - kрат premešali z obračanjem ter centrifugirali do 2.000 rpm. S pasteurjevo pipeto smo ponovno odpipetirali zgornjo etrsko fazo in jo združili s prvo. Dodali smo še 1 spatulo CaCl<sub>2</sub> granulata in epruvete dobro zaprli. Tako pripravljene vzorce smo do analize v plinskem kromatografu skladiščili v hladilniku največ 2 do 3 tedne.

### **3.2.7 Plinska kromatografija plinov (H<sub>2</sub> in CO<sub>2</sub>) in ekstrahiranih KMK**

Plinska kromatografija je tehnika analizne kemije za ločevanje plinov na posamezne komponente in zaznavo njihovih deležev v plinskem vzorcu. Vzorci so izparevali v injektorju na začetku kapilarne kromatografske kolone, ki je bila polnjena s polnilom POROPACK Q. Proses ekstrahiranja vzorca poteka z inertno plinsko mobilno fazo, katere glavna funkcija je prenos vzorca skozi kolono. Obstajata dve vrsti plinske kromatografije: plinska – trdna kromatografija (*angl. gas – solid chromatography; GSC*) in plinska - tekočinska kromatografija (*angl. gas – liquid chromatography; GLC*). Ime zadnje se v širši rabi na vseh področjih znanosti uporablja kot plinska kromatografija (*angl. gas chromatography; GC*). Temelji na delitvi vzorca na plinsko mobilno fazo in tekočo fazo, ki se ulovi na površino inertne trdne faze. Analiza plinov je potekala v atmosferi nad tekočo kulturo preučevanega seva v plinskem kromatografu (Shimadzu GC 14-A, Japonska) s TCD detektorjem (thermal conductivity detector), ki je bil segret na 80°C. Na začetku smo vbrizgali plinski standard iz znane mešanice plinov (N<sub>2</sub> 20,29 vol. %; H<sub>2</sub> 14,92 vol. %; CH<sub>4</sub> 20,12 vol. %; CO<sub>2</sub> 44,67 vol. %), zato da smo kalibrirali kromatograf. Termična prevodnost plina, ki obdaja žico detektorja je odvisna od količine in vrste plina. Sprememba v prevodnosti se je pretvorila v električni signal, ki se je s pomočjo tiskalnika izpisoval kot kromatogram s posameznimi vrhovi. Vsak plin prihaja

od vbrizgavanja do detektorja z določeno hitrostjo. Čas, potreben za to pot, se imenuje retenzijski čas. Nižja kot je molska masa plina, prej ga detektor zazna. Za plinski standard je tiskalnik izrisal vrhove in dodal retenzijske čase. Slednji so povedali, kateri vrh pripada določenemu plinu. Iz višine vrhov smo določili delež plina v skupni plinski zmesi. Naša vzorca sta bila čisti kulti bakterijskih sevov *R. albus* 20455 in *B. fibrisolvens* 3071<sup>T</sup>, ki proizvajata vodik, katerega koncentracijo smo želeli izmeriti in tako ugotoviti učinek monenzina na produkcijo vodika in s tem na produkcijo metana. V našem poskusu smo kot nosilni plin uporabili argon, saj smo želeli visoko občutljivost za H<sub>2</sub>. Za analizo vzorcev smo v poskusu vbrizgali plinske vzorce s plinotesno brizgalko in sicer 50 µl atmosfere posameznega seva ter glede na retenzijske čase in višine vrhov določili pline in njihove volumske deleže.

Za analizo ekstrahiranih kratkoverižnih maščobnih kislin smo uporabili plinski kromatograf Hewlett Packard 5890 A (Hewlett Packard, ZDA). Cilj pri tej metodi je bil določiti predvsem količine ocetne, (n - in izo -) propionske ter (n - in izo -) maslene kisline, ki so glavni fermentacijski produkti preučevanih sevov. Aparat smo kalibrirali s kalibracijsko raztopino, ki je bila sestavljena iz znanih količin znanih KMK (preglednica 6). V kromatograf s FID detektorjem (flame ionization detector), ki je bil ogret na temperaturo 290°C, smo injicirali 1 µl etrskega ekstrakta iz Hachove epruvete. Kapilarna kolona FID detektorja je bila prazna, nosilni plin je bil argon. Sprememba električnega signala je posledica načina izgrevanja organskih snovi, kar omogoča detektorju zaznavo komponent vzorca. Plinsko kromatografijo za pline in KMK smo delali le za 28 ur stare kulture, ker so nas zanimali končni volumski deleži produciranih plinov in koncentracija ekstrahiranih KMK.

Preglednica 6: Sestava kalibracijske raztopine za umeritev plinskega kromatografa pri določanju KMK

Kislina	Količina na 100 ml	Masna koncentracija (g/l)	Molarna koncentracija (mM)
ocetna	100 µl	1,05	17,485
propionska	100 µl	0,99	13,364
izo-maslena	100 µl	0,95	10,782
n-maslena	100 µl	0,96	10,895
izo-valerianska	100 µl	0,93	9,109
n-valerianska	100 µl	0,94	9,207
krotonska (IS)	100 µl	1,00	dodali pri ekstrakciji
n-kapronska	100 µl	0,93	8,003

### 3.2.8 Statistična analiza – Studentov t- test

Studentova porazdelitev (t porazdelitev) je verjetnostna porazdelitev za manjše vzorce in je modifikacija standardizirane normalne porazdelitve. Podatke iz plinske kromatografije smo zbrali in naredili Studentov t-test za primerjavo vrednosti kontrolnih vzorcev in vzorcev z dodanim monenzinom s 95 % verjetnostjo. Studentov test primerja dejansko razliko med dvema vrednostima oziroma povprečjema v odnosu z variabilnostjo samih

podatkov (izraženo kot standardna deviacija razlike dveh vrednosti) za majhne vzorce ( $n_1 + n_2 < 30$ ). Število ponovitev za kontrolne vzorce ( $n_{CTR} = 2$ ) je enako številu ponovitev za vzorce z dodanim monenzinom ( $n_{MON} = 2$ ), ker smo imeli dve paralelki za vsako meritev. t-tabela (tabela vrednosti za Studentovo t-porazdelitev z  $n$  stopinjam prostosti) pri ( $n_{CTR} + n_{MON} - 2$ ) stopinjah prostosti (to je 2) s 95 % verjetnostjo nam da t-vrednost  $\pm 4,3$  (preglednica 9). Če izračunana t-vrednost presega tabelirano t-vrednost, potem lahko predpostavimo, da je med vrednostmi statistično značilna razlika. Statistični testi ne morejo dokazati ali ovreči ničesar, vendar lahko z njihovo pomočjo sprejmemo zaključke z določeno mero zaupanja.

Preglednica 7: Studentova porazdelitev t (Bronstein in sod., 1997)

Število stopinj prostosti $m$	Dvojna verjetnost $\alpha$					
	0,10	0,05	0,02	0,01	0,002	0,001
1	6,31	12,7	31,82	63,7	318,3	637,0
2	2,92	<b>4,3</b>	6,97	9,92	22,33	31,6
3	2,35	3,18	4,54	5,84	10,22	12,9
4	2,13	2,78	3,75	4,60	7,17	8,61
5	2,01	2,57	3,37	4,03	5,89	6,86

Za izračun t vrednosti uporabimo spodnjo enačbo.

$$t = \frac{(x_{CTR} - x_{MON})}{S} \quad \dots (6)$$

kjer je:

$x_{CTR}$  = povprečje paralelk pri kontrolnem vzorcu

$x_{MON}$  = povprečje paralelk pri vzorcu z dodanim monenzinom

$S$  = standardna deviacija

### 3.2.9 Shema eksperimenta

Diplomska naloga je bila vključena v širšo raziskavo, kjer smo poleg vampnega modifikatorja – antibiotika monenzina preučevali še vpliv treh rastlinskih izvlečkov. Odločili smo se za dve različni koncentraciji pri vsakem modifikatorju in pri vsaki koncentraciji za dve paralelki. Na podlagi že opravljenega poskusa (Busquet Solé, 2005), v katerem so avtorji preučevali vpliv monenzina na metabolizem vampnih simbiontov v kontinuiranih tekočih kulturah, smo se odločili za izbiro enakih koncentracij monenzina, kot so jih uporabili v omenjenem poskusu (1,25  $\mu\text{M}$  in 12,5  $\mu\text{M}$  koncentracija monenzina). Rastne krivulje (slika 12) so nam služile za določitev štirih faz rasti (preglednica 8), v katerih smo analizirali nekatere ali vse preučevane parametre. Prav tako pa smo na podlagi primerjav rastnih krivulj ugotovili, kateri sevi imajo podobno hitrost rasti. Takšne seve smo uvrstili v isto skupino (3 skupine po 2 seva) in meritve na sevih opravljali v parih.

Preglednica 8: Določanje točk v fazi rasti, v katerih smo opravljali meritve

Čas meritve	Faza rasti seva	Točke meritev
1	začetek eksponencialne faze	OD ~ 0,2
2	sredina eksponencialne faze	OD ~ $\frac{1}{2}$ OD max
3	konec eksponencialne faze	OD max
4	stacionarna faza	28 h kultura

Za izračun količine gojišča, ki smo ga potrebovali v poskusu za en par sevov, smo uporabili naslednji postopek:

$$\begin{aligned} \text{Volumen M2} &= (2 \text{ seva} \times 4 \text{ časi meritev} \times 2 \text{ paralelki}) \times 8 \text{ ml} \\ &= 16 \text{ Hungate epruvet} \times 8 \text{ ml} \\ &= 128 \text{ ml} \approx 140 \text{ ml} \end{aligned} \quad \dots (7)$$

Iz govejega vamnega soka smo pripravili 140 ml M2 tekočega gojišča, ki smo ga razdelili v 16 Hungatovih epruvet po 8 ml za gojenje kontrol (gojišče + inokulum) ter dve označeni transfuzijski steklenici po 140 ml za pripravo nižje in višje koncentracije monenzina (gojišče + monenzin). Zaradi manjše eksperimentalne napake smo monenzin dodali v 140 ml gojišča in ne v vsako Hungatovo epruveto posebej. Odmrznjene bakterijske kulture smo uporabili za precepljanje v tekoče gojišče (po 2 cepilni zanki), da smo pripravili čeznočni inokulum posameznega seva. Raztopino monenzina smo pripravili tako, da smo monenzin v obliki praška v pravilnem razmerju raztopili v absolutnem etanolu. V eno transfuzijsko steklenico z gojiščem smo dodali monenzin v koncentraciji 1,25  $\mu\text{M}$ , v drugo pa monenzin v koncentraciji 12,5  $\mu\text{M}$ . Pripravljena gojišča v Hungatovih epruvetah (16) in transfuzijskih steklenicah (2), sterilizirane, posušene in označene Hungatove epruvete z zamaški (32), brizgo za razlivanje gojišč in stojala za Hungatove epruvete smo prenesli v anaerobno komoro. Gojišči z dodanim monenzinom smo iz transfuzijskih steklenic razdelili v Hungatove epruvete (vsako transfuzijsko steklenico v 16 Hungatovih epruvet po 8 ml, skupno v 32 epruvet).

Po čeznočni inkubaciji smo nacepljenima sevoma izmerili OD vrednost in ju ponovno precepili v poltrda gojišča za shranitev kulture na -20°C. V anaerobno komoro (Sholzen, Švica) smo prenesli čeznočni kulturi dveh sevov.

Vseh 48 epruvet s tekočim gojiščem z ali brez dodatka monenzina smo inokulirali z izbranima sevoma (100  $\mu\text{l}$  na 8 ml gojišča, kar je 1,25 vol. %), kot je razvidno iz preglednice 9.

Preglednica 9: Inokulacija tekočih gojišč z izbranimi sevi

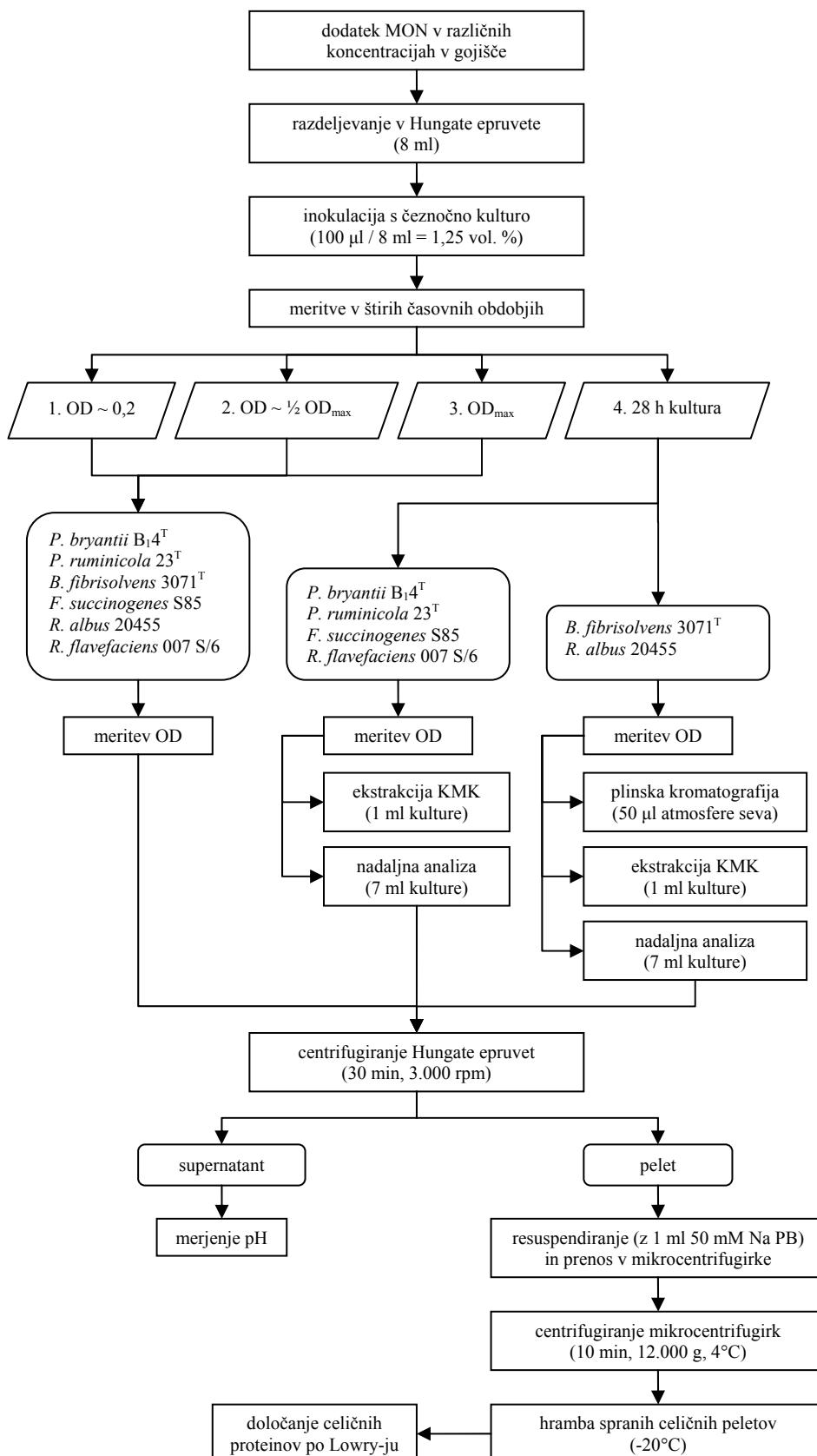
	kontrola				MON1,25				MON12,5			
sev 1												
sev 2												
čas vzorčenja	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4

kontrola – gojišča brez monenzina; MON1,25 – gojišče z monenzinom v koncentraciji 1,25 µM; MON12,5 – gojišče z monenzinom v koncentraciji 12,5 µM; čas 1, 2, 3, 4 – vzorčenje v časih, ki so bili predhodno določeni; | - Hungatova epruveta;

Po končani inokulaciji smo epruvete inkubirali pri 39°C do meritev.

Ob časih 1, 2 in 3 smo izvajali naslednje meritve in poskuse: (i) merjenje **absorbance** s spektrofotometrom (sledilo je centrifugiranje Hungatovih epruvet 30 minut na 3.000 rpm), (ii) merjenje **pH** vrednosti supernatanta s pH elektrodo (sledilo je resuspendiranje peleta v 1 ml 50 mM Na fosfatnega pufra, prenos vzorca iz Hungatovih epruvet v Eppendorf mikrocentrifugirke, ponovno centrifugiranje za 10 minut na 12.000 g in shranitev 1x sprnih celičnih peletov na -20°C do uporabe za določanje celičnih proteinov po Lowry-ju), (iii) **ugotavljanje koncentracije proteinov** po Lowry-ju s čitalcem mikrotitrskih plošč.

Ob času 4 smo (i) ponovno izmerili **absorbanco**, (ii) poleg tega pa še opravili **plinsko kromatografijo plinov (GC)** za seva BF in RA, ker producirata vodik, (iii) od tod smo odvzeli po 1 ml kulture za **ekstrakcijo KMK** (epruvete z ekstrahiranimi KMK smo do uporabe shranili v hladilniku); (iv) slednje pa smo uporabili v **GC za KMK**. Po odvzemu vzorca za ekstrakcijo KMK smo Hungatove epruvete s preostalo kulturo centrifugirali, v supernatantu izmerili **pH** vrednost, nastale pelete pa smo pripravili za analizo koncentracije skupnih beljakovin (proteinov) po **Lowry-ju**.

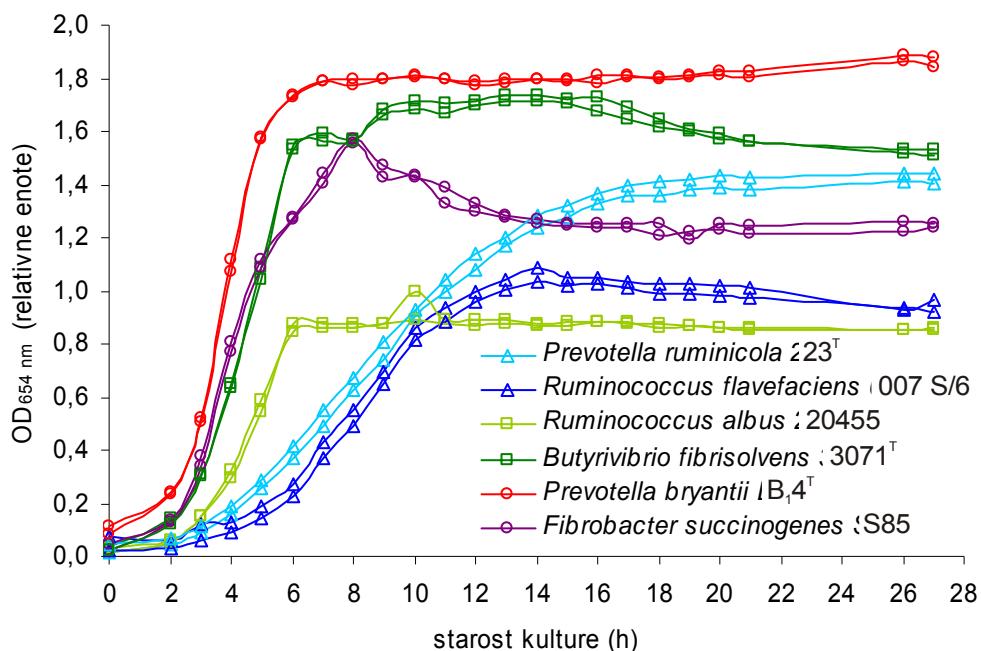


Slika 11: Shema poskusa

Med samo izvedbo eksperimenta smo ugotovili, da sta se koncentraciji monenzina, določeni iz predhodnega poskusa, pokazali za popolnoma inhibitorni pri sevih *R. albus* 20455 in *R. flavefaciens* 007 S/6. Na podlagi tega smo se v drugem delu poskusa odločili za tri manjše ustreznejše koncentracije monenzina pri omenjenih sevih (monenzin v koncentracijah 0,25 µM, 0,125 µM in 0,025 µM).

## 4 REZULTATI

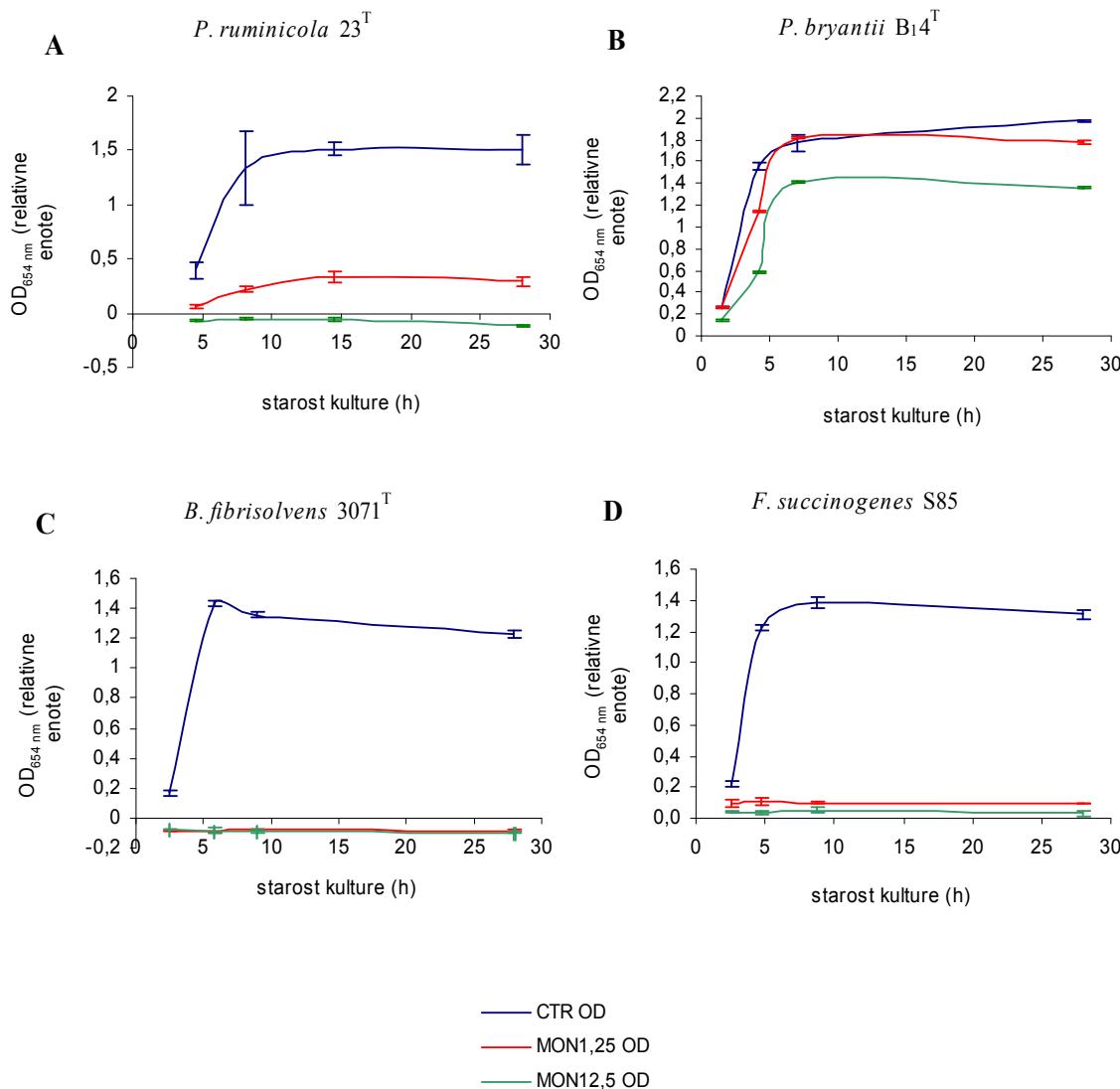
### 4.1 RASTNE KRIVULJE



Slika 12: Rastne krivulje za vseh šest sevov (v dveh paralelkah)

Slika 12 prikazuje rastne krivulje šestih izbranih sevov (v dveh paralelkah) v gojišču M2 brez dodanega monenzina. Na osnovi rastnih krivulj smo določili štiri čase meritev poskusa, in sicer začetek, sredino in konec eksponencialne faze rasti ter stacionarno fazo pri 28. uri. Krivulje paralelk posameznih sevov se obnašajo zelo podobno, opaziti pa je mogoče razlike v rasti med posamezni sevi. Sev *P. bryantii* B<sub>14</sub><sup>T</sup> se je izkazal za najhitreje rastočega, hkrati je dosegel najvišjo OD vrednost (1,89). V skupino najhitreje rastočih sevov smo uvrstili tudi *B. fibrisolvens* 3071<sup>T</sup>, ki je rasel podobno hitro, le maksimalna rast je bila sodeč po motnosti gojišča malo nižja (OD 1,74). Najpočasnejšo rast smo zaznali pri sevih *R. flavefaciens* 007 S/6, njegova eksponencialna faza je trajala 12 ur in pri *P. ruminicola* 23<sup>T</sup> z najdaljšo eksponencialno fazo (18 ur). Tudi maksimalna rast teh dveh sevov je bila nižja in sicer 1,45 za *P. ruminicola* 23 in 1,09 za *R. flavefaciens* 007 S/6. Najnižjo OD vrednost smo izmerili pri sevu *R. albus* 20455 (0,85). Sev *F. succinogenes* S85 je rasel podobno hitro kot seva *P. bryantii* B<sub>14</sub><sup>T</sup> in *B. fibrisolvens* 3071<sup>T</sup> in dosegel tudi podobno visoko OD vrednost na koncu eksponencialne faze rasti, a je OD vrednost po prehodu v stacionarno fazo rasti začela padati in se je ustavila pri relativno nizki vrednosti (1,25). Glede na hitrost rasti smo naredili 3 skupine, kamor smo uvrstili po dva seva, ki sta imela podobno hitrost rasti.

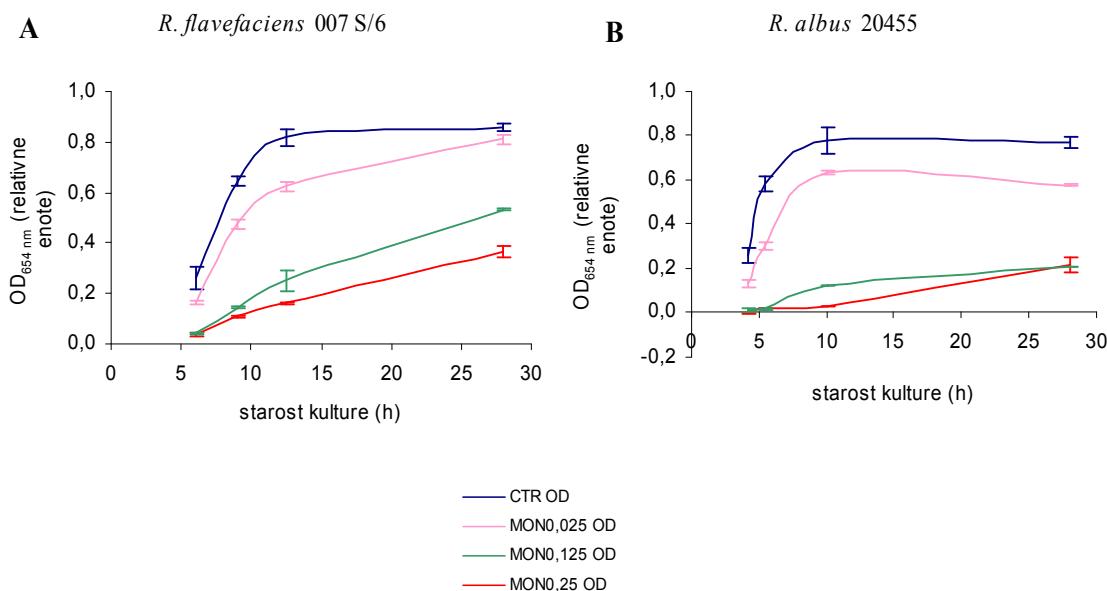
#### 4.2 MERJENJE OPTIČNE GOSTOTE ZA VSAK SEV POSEBEJ



Slika 13: Merjenje OD vrednosti za seve **A** *P. ruminicola* 23<sup>T</sup>, **B** *P. bryantii* B<sub>14</sub><sup>T</sup>, **C** *B. fibrisolvens* 3071<sup>T</sup> in **D** *F. succinogenes* S85

Na sliki 13 so predstavljeni rezultati merjenja OD za posamezne seve po rasti v gojišču z dodanim monenzinom v dveh koncentracijah (1,25  $\mu\text{M}$  in 12,5  $\mu\text{M}$ ). Vsaka krivulja je prikazana s standardno deviacijo dveh paralelki posameznega seva in meritev. Pri sevu *P. ruminicola* 23<sup>T</sup> smo ob dodatku monenzina v koncentraciji 1,25  $\mu\text{M}$  opazili delno inhibirano rast (le približno 15 % v primerjavi z rastjo v gojišču brez monenzina), monenzin v koncentraciji 12,5  $\mu\text{M}$  je popolnoma zavrl rast. Pri sevih *B. fibrisolvens* 3071<sup>T</sup> in *F. succinogenes* S85 smo opazili popolno inhibicijo rasti z obema koncentracijama monenzina. Nasprotno pa smo pri sevu *P. bryantii* B<sub>14</sub><sup>T</sup> opazili določeno stopnjo odpornosti na monenzin. Ta v koncentraciji 1,25  $\mu\text{M}$  ni vplival na rast,

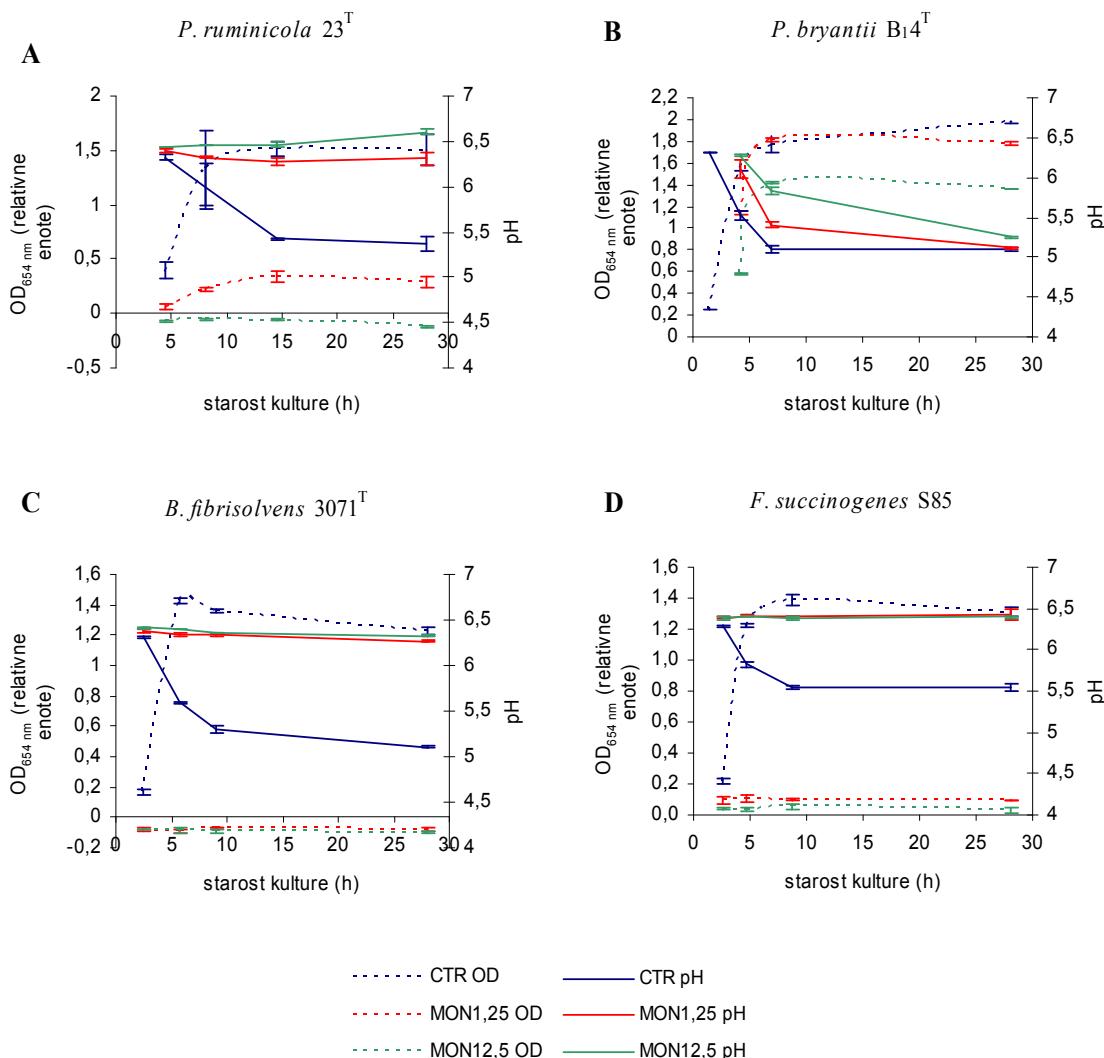
monenzin v koncentraciji  $12,5 \mu\text{M}$  pa je rast le nekoliko zavrl (približno 70 % v primerjavi z rastjo v gojišču brez monenzina), oblika krivulje je primerljiva s kontrolo.



Slika 14: Merjenje OD vrednosti za seva A *R. flavefaciens* 007 S/6 in B *R. albus* 20455

Pri sevih *R. flavefaciens* 007 S/6 in *R. albus* 20455 smo poskus opravili s tremi nižjimi koncentracijami monenzina ( $0,25 \mu\text{M}$ ,  $0,125 \mu\text{M}$ , in  $0,025 \mu\text{M}$ ), sicer bi bila rast preveč inhibirana. Slika 14 prikazuje izmerjene OD vrednosti pri obeh sevih, skupaj z vrednostmi standardnih deviacij med paralelkama. Monenzin vpliva podobno na rast obeh preučevanih ruminokokov. V koncentraciji  $0,25 \mu\text{M}$  rast inhibira za približno 20 %. Razlika se pokaže v stacionarni fazi, v kateri ostane oblika krivulje rasti pri *R. albus* 20455 enaka kot v gojišču brez monenzina (OD se ne spreminja), pri *R. flavefaciens* 007 S/6 pa se OD tudi v stacionarni fazi še dviga, kadar je monenzin prisoten (sicer počasneje kot v eksponencialni fazi rasti), dokler se po 28. urah skoraj ne izenači z OD v kontrolnem gojišču. Srednja koncentracija monenzina podobno upočasni rast obeh ruminokokov v eksponencialni fazi rasti, nato pa se rast (oz. dvigovanje vrednosti OD) nadaljuje, le da v primeru *R. flavefaciens* 007 S/6 precej hitreje in doseže po 28. urah le približno 25 % vrednost OD v primerjavi s kontrolo. Pri najvišji koncentraciji monenzina opazimo dokaj podoben odziv pri obeh sevih, ki se odraža v počasnejši rasti. Ta se nadaljuje tudi v stacionarni fazi rasti in doseže po 28. urah približno 30 % v primerjavi z rastjo v kontrolnem gojišču brez monenzina.

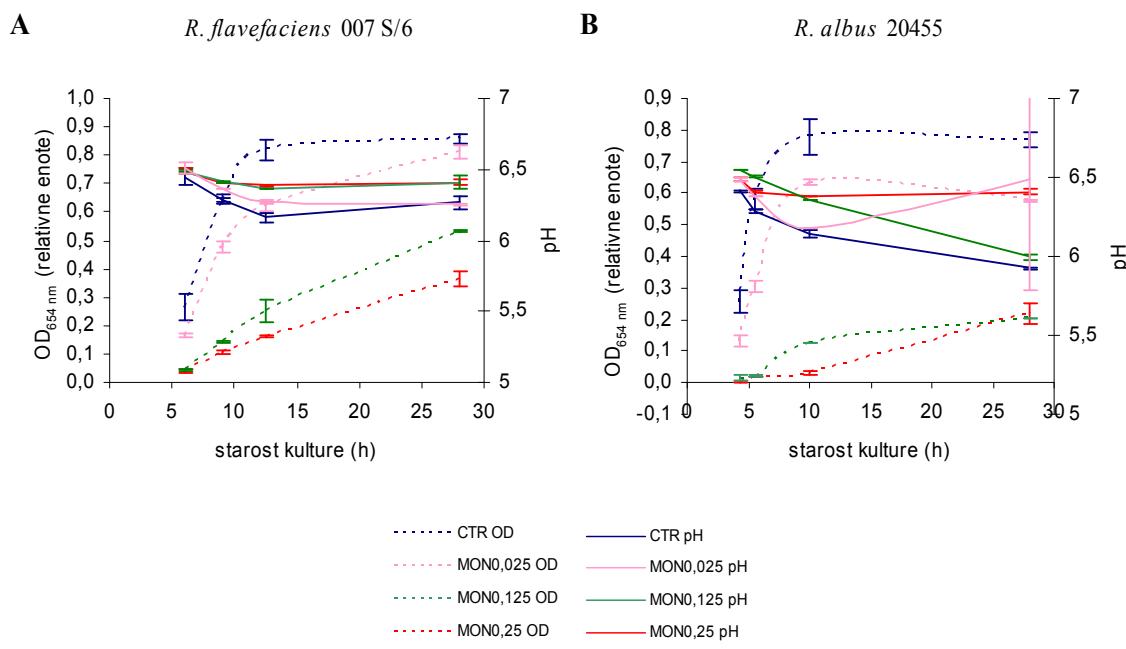
#### 4.3 MERJENJE pH VREDNOSTI ZA VSAK SEV POSEBEJ



Slika 15: Merjenje pH vrednosti za seve **A** *P. ruminicola* 23<sup>T</sup>, **B** *P. bryantii* B<sub>14</sub><sup>T</sup>, **C** *B. fibrisolvens* 3071<sup>T</sup> in **D** *F. succinogenes* S85

pH vrednost je pri štirih preučevanih sevih (*P. ruminicola* 23<sup>T</sup>, *P. bryantii* B<sub>14</sub><sup>T</sup>, *B. fibrisolvens* 3071<sup>T</sup> in *F. succinogenes* S85) ob rasti v gojišču brez monenzina padla iz začetnih ~ pH 6,3 (sterilno gojišče) za 1,2 do 2 pH enoti ob tretjem merjenju (prehod iz eksponencialne faze rasti v stacionarno fazo rasti). Takrat se je nehala spremenjati in je bila po 28. urah pri treh sevih enaka, pri sevu *B. fibrisolvens* 3071<sup>T</sup> pa še za ~ 0,3 enote nižja. Ker je bila rast sevov *B. fibrisolvens* 3071<sup>T</sup> in *F. succinogenes* S85 v prisotnosti obeh koncentracij monenzina popolnoma inhibirana, se tudi pH vrednost v gojišču ni spremojala. Pri obeh prevotelah je bilo drugače. *P. ruminicola* 23<sup>T</sup> je bolj občutljiva na prisotnost monenzina. Pri višji koncentraciji, ki je rast popolnoma inhibirala (sodeč po OD vrednosti) se je pH celo za ~ 0,3 enote dvignil po 28. urah. Pri nižji koncentraciji pa

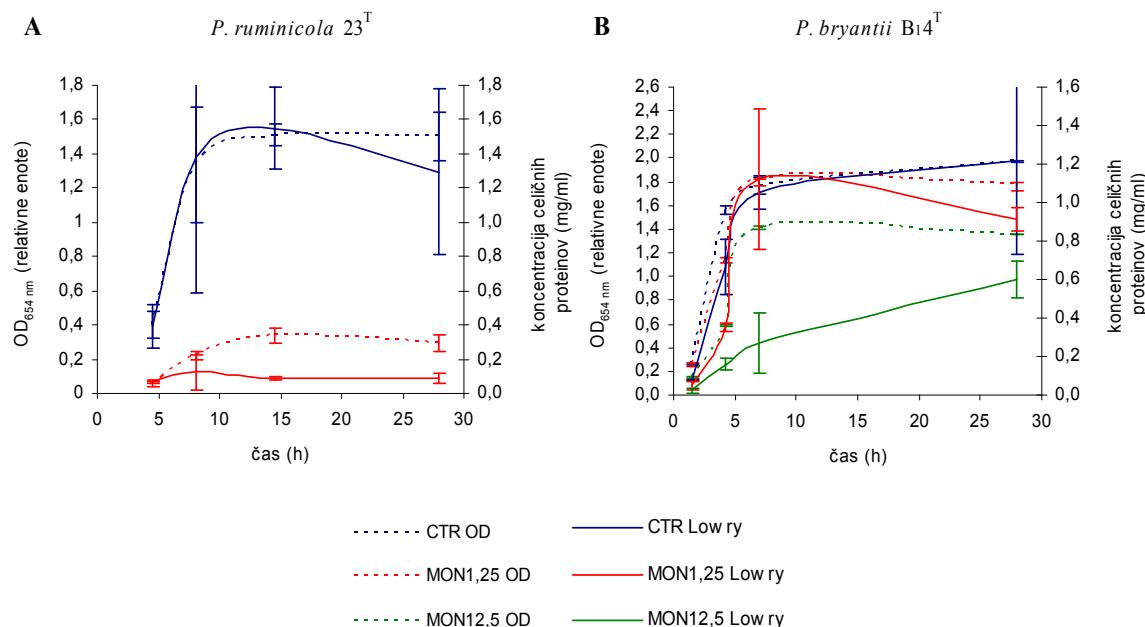
je sprva pH vrednost malo padla, a je po 28. urah dosegla izhodiščno vrednost. Spremembe pH vrednosti pri *P. bryantii* B<sub>14</sub><sup>T</sup> odražajo rast glede na koncentracijo monenzina. V končni fazи dosežejo podobno OD vrednost kot po rasti v kontrolnem gojišču.



Slika 16: Merjenje pH vrednosti za seva **A** *R. flavefaciens* 007 S/6 in **B** *R. albus* 20455

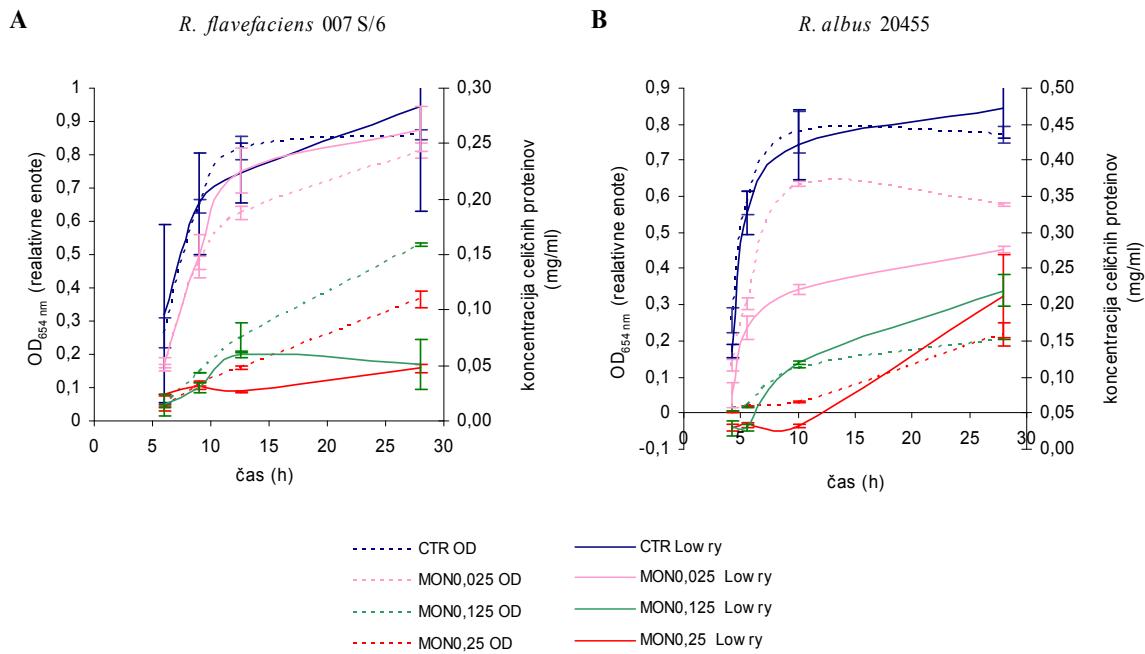
pH vrednost se pri *R. flavefaciens* 007 S/6 za razliko od ostalih sevov med rastjo ni zelo spremenjala. Pri rasti v kontrolnem gojišču brez monenzina se je ob prehodu iz eksponencialne v stacionarno fazо rasti zmanjšala za ~ 0,3 pH enote in se nato po 28. urah rahlo dvignila. Podobno se je spremenjala pH vrednost po rasti v gojišču z najnižjo koncentracijo monenzina. Po rasti v gojišču z višjima koncentracijama monenzina pa se je pH vrednost znižala za ~ 0,14 pH enote v obdobju eksponencialne faze rasti in ostala na istem nivoju tudi po 28. urah. Pri sevu *R. albus* 20455 se je pH vrednost spremenjala bolj občutno kot pri *R. flavefaciens* 007 S/6.

#### 4.4 UGOTAVLJANJE KONCENTRACIJE CELIČNIH PROTEINOV PO RASTI VAMPNIH BAKTERIJSKIH SEVOV V GOJIŠČU Z IN BREZ MONENZINA



Slika 17: Koncentracija celičnih proteinov glede na OD vrednost za seva **A** *P. ruminicola* 23<sup>T</sup> in **B** *P. bryantii* B14<sup>T</sup>

Analizo koncentracije celičnih proteinov smo opravili samo pri tistih vzorcih, pri katerih je bila opazna rast, zato smo iz analize izločili seva *B. fibrisolvens* 3071<sup>T</sup> in *F. succinogenes* S85 (slika 13). Pri sevu *P. ruminicola* 23<sup>T</sup> je monenzin v nižji koncentraciji rast inhibiral približno 80 %. Analiza koncentracije celičnih proteinov ne kaže statistično zanesljivega povečanja v nobenem od odvzetih vzorcev. Pri *P. bryantii* B14<sup>T</sup> se krivulji, ki ponazarjata povečevanje koncentracije celičnih proteinov lepo ujemata s krivuljami rasti OD v primeru rasti tega seva v kontrolnem gojišču in pri nižji koncentraciji monenzina. V primeru rasti *P. bryantii* B14<sup>T</sup> v gojišču z višjo koncentracijo monenzina pa je prišlo do razlik, ko smo opazovali rast z merjenjem OD oziroma ugotavljanjem koncentracije celičnih proteinov. Medtem ko OD vrednost po 28. urah ostane enaka tudi na prehodu v stacionarno fazo ali celo rahlo pada, koncentracija celičnih proteinov tudi po prehodu v stacionarno fazo rasti narašča. Sicer počasneje kot v eksponencialni fazi rasti, a enakomerno. Zanimivo je tudi opažanje, da narašča koncentracija celičnih proteinov v eksponencialni fazi rasti počasneje kot v tej fazi narašča OD vrednost, česar pri rasti v kontrolnem gojišču nismo opazili.



Slika 18: Koncentracija celičnih proteinov glede na OD vrednost za seva  
**A** *R. flavefaciens* 007 S/6 in **B** *R. albus* 20455

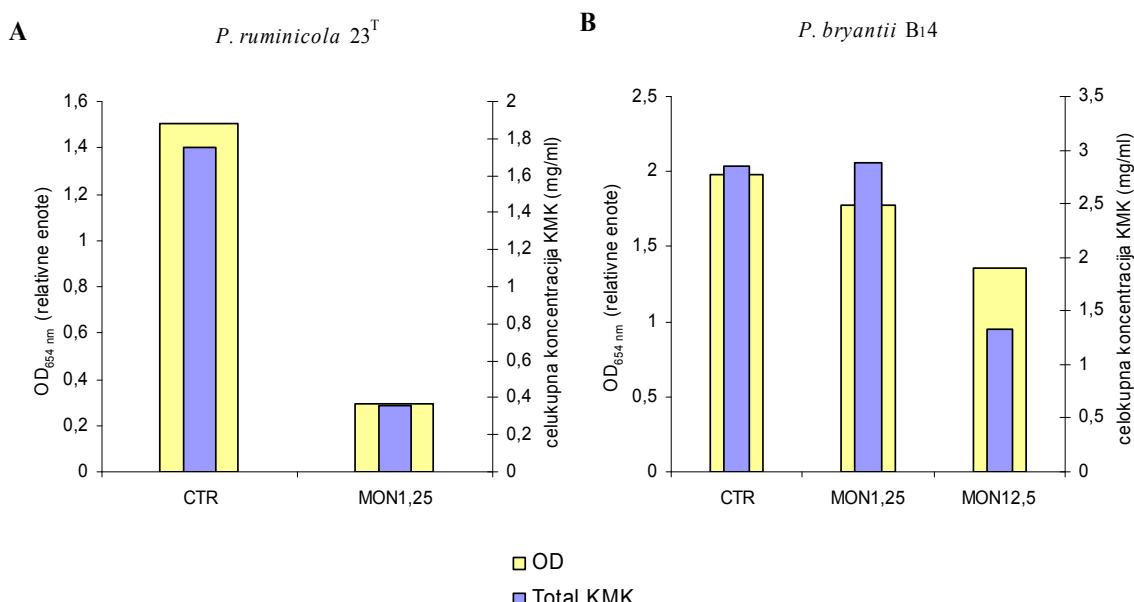
Pri obeh ruminokokih potekata krivulji za OD in koncentracijo celičnih proteinov pri kontroli in najnižji dodani koncentraciji monenzina podobno. Medtem, ko analiza koncentracije celičnih proteinov po rasti seva *R. flavefaciens* 007 S/6 v gojišču z 0,25  $\mu\text{M}$  in 0,125  $\mu\text{M}$  koncentracijo monenzina ne kaže jasnega povečanja koncentracije, se koncentracija celičnih proteinov pri sevu *R. albus* 20455 povečuje in to celo hitreje kot narašča OD.

#### 4.5 UGOTAVLJANJE KONCENTRACIJE KMK PO RASTI V PRISOTNOSTI MONENZINA

sev	vzorec	ocetna kislina [mg/ml]	propionska kislina [mg/ml]	i-maslena kislina [mg/ml]	n-maslena kislina [mg/ml]	skupne KMK [mg/ml]	deleži KMK		OD <sub>654</sub> mm (h=28)
							ocetna kislina	propionska kislina	
<i>P. ruminicola</i> 23 <sup>T</sup>	CTR	1,555	0,19	0,003	0,007	1,755	0,88	0,11	1,503
	MON1,25	0,295	0,057	0	0,003	0,355	0,83	0,16	0,01
<i>P. bryantii</i> B <sub>1</sub> 4 <sup>T</sup>	CTR	2,855	0	0	0	2,855	1	0	0,292
	MON1,25	2,88	0	0	0	2,88	1	0	1,975
<i>R. flavefaciens</i> 007 S/6	CTR	1,326	0	0	0	1,326	1	0	1,776
	MON0,025	0	0	0	0	0	0	0	1,361
<i>R. albus</i> 20455	CTR	0,096	0	0	0	0,096	1	0	0,859
	MON0,025	0	0	0	0	0	0	0	0,812
	MON0,125	0	0	0	0	0	0	0	0,531
	MON0,25	0	0	0	0	0	0	0	0,366
	MON0,25	0,686	0	0	0	0,686	1	0	0,206
	MON0,25	0	0	0	0	0	0	0	0,219

Opomba: obarvane vrednosti predstavljajo statistično značilne razlike.

Ekstrakcijo in analizo koncentracije KMK smo naredili za tiste seve, pri katerih je bila rast opazna. *F. succinogenes* S85 in *B. fibrisolvens* 3071<sup>T</sup> sta bila s strani monenzina popolnoma inhibirana, zato tudi ni bilo pričakovati produkcije KMK. S tem razlogom smo ju iz poskusa analize KMK izločili. Iz preglednice 10 je razvidno, da so le tri spremembe vrednosti koncentracij KMK v primerjavi s kontrolo statistično značilne, vzrok za to pa je najverjetnejše v premajhnem številu vzorcev, s katerimi smo rokovali v poskusu. Od dobljenih vrednosti za posamezne KMK smo odsteli KMK vrednosti, ki smo jih izmerili v etrskem ekstraktu sterilnega gojišča M2 in te zapisali v preglednico 10. Pri tem smo v okviru eksperimentalne napake (izhlapevanje vzorca), ki je vzrok razlikam v izmerjeni vsebnosti KMK med vzorci in samim gojiščem, v nekaterih primerih dobili negativne vrednosti, kar smo v preglednico zapisali kot vrednost 0.



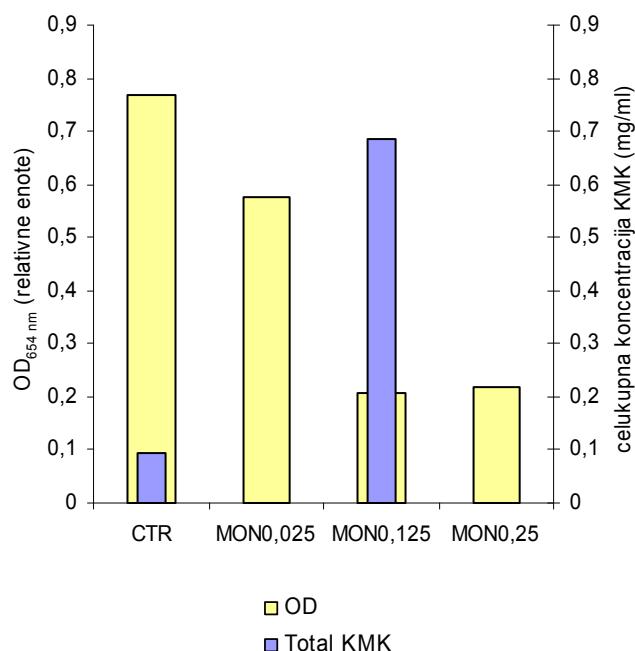
Slika 19: Koncentracija ekstrahiranih KMK za seva A *P. ruminicola* 23<sup>T</sup> in B *P. bryantii* B<sub>14</sub><sup>T</sup>

Analiza koncentracije KMK je pri sevu *P. ruminicola* 23 pokazala, da sta večinska produkta po rasti v kontrolnem gojišču ocetna in propionska kislina v razmerju 8:1, kot pričakovano. Rast v prisotnosti nižje koncentracije monenzina je bila temu primerno nižja, približno za 20 %. Deleža ocetne in propionske kisline se nista bistveno spremenila. *P. bryantii* B<sub>14</sub><sup>T</sup> je precej manj občutljiva na prisotnost monenzina, kar kaže tudi analiza koncentracije KMK (preglednica 10). Nižja koncentracija monenzina praktično ne vpliva na končno koncentracijo KMK v gojišču po 28. urah rasti, zanimivo pa je, da propionske kisline v teh vzorcih nismo odkrili. Tudi maslene kisline, kar pa je bilo pričakovano, v vzorcih nismo odkrili. Delno inhibirana rast *P. bryantii* B<sub>14</sub><sup>T</sup> je vodila tudi do nastanka manjše koncentracije KMK po 28. urah v gojišču z višjo koncentracijo monenzina. In sicer se je koncentracija KMK zmanjšala za približno polovico, ustrezno zmanjšanju koncentracije celičnih proteinov in zanimivo bolj, kot se je zmanjšala OD vrednost v gojišču (le za 46 %). Pri sevu *R. flavefaciens* 007 S/6 v

nasprotju s pričakovanji sploh nismo odkrili povečanja koncentracije KMK v primerjavi z gojiščem, čeprav je ta vrsta znana po tvorbi ocetne kisline, kot enim pomembnejših stranskih produktov fermentacije. Preden izključimo možnost eksperimentalne napake, bi morali ta poskus ponoviti.

Tudi rezultati analize koncentracije KMK po rasti seva *R. albus* 20455 so presenetljivi. Po rasti v kontrolnem gojišču smo pričakovali odkrili prisotnost ocetne kisline, kot edinega pomembnejšega produkta fermentacije poleg plinov H<sub>2</sub> in CO<sub>2</sub>. Nepričakovana je bila le zelo nizka koncentracija tega fermentacijskega produkta, kar 15 oziroma 30 krat manjša kot pri sevih *P. ruminicola* 23<sup>T</sup> in *P. bryantii* B14<sup>T</sup>. V nasprotju s pričakovanji pa v gojišču z najnižjo koncentracijo monenzina ocetne kisline nismo odkrili, kar velja tudi za gojišče z najvišjo koncentracijo monenzina. Odkrili pa smo jo v vzorcu iz gojišča s srednjo 0,125 µM koncentracijo monenzina in to v bistveno višji koncentraciji, kot po rasti v kontrolnem gojišču (sedem krat višji). Tudi te poskuse bi morali zavoljo izključitve možnosti eksperimentalne napake ponoviti.

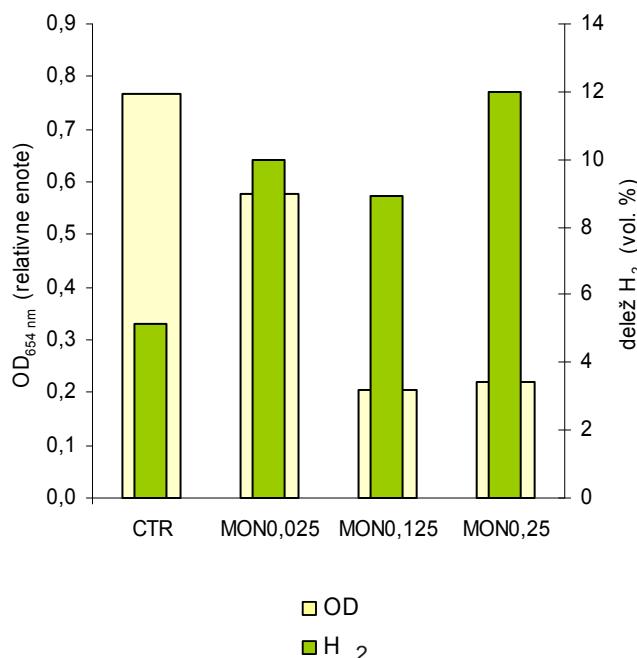
*R. albus* 20455



Slika 20: Koncentracija ekstrahiranih KMK za sev *R. albus* 20455

#### 4.6 UGOTAVLJANJE KONCENTRACIJE VODIKA PO RASTI *R. albus* 20455 V PRISOTNOSTI MONENZINA

*R. albus* 20455



Slika 21: Koncentracija vodika in OD vrednost za sev *R. albus* 20455

Koncentracijo vodika po 28. uri rasti v gojiščih brez in z monenzinom smo ugotavljali le v primeru seva *R. albus* 20455. Edini drugi producent vodika *B. fibrisolvens* 3071<sup>T</sup> namreč v prisotnosti dodanih koncentracij monenzina ni rasel.

Po statistični analizi s Studentovim t-testom so glede na kontrolo meritve statistično značilne. Pri dodajanju monenzina v vseh treh koncentracijah se produkcija H<sub>2</sub> poveča, največje povečanje smo opazili pri najvišji koncentraciji monenzina (0,25 μM), kar je lahko posledica spremembe metabolizma. Rast je bila upočasnjena (sklepamo iz OD in pH vrednosti ter koncentracije celičnih proteinov), zato bi pričakovali v nasprotju z dobljenimi rezultati zmanjšanje produkcije vodika. Možen vzrok za obratno sorazmerje med rastjo in produkcijo vodika je v etanolu, v katerem smo raztopili v gojišče dodani monenzin. Možno bi bilo, da bi se vodik iz etanola odcepil v samo gojišče.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

#### 5.1.1 Spremljanje rasti bakterijskih sevov s pomočjo OD vrednosti

Poskus je bil razdeljen v dva dela, pri čemer smo v prvi del poskusa vključili seve *P. ruminicola* 23<sup>T</sup>, *P. bryantii* B<sub>1</sub>4<sup>T</sup>, *B. fibrisolvens* 3071<sup>T</sup> in *F. succinogenes* S85, za katere smo uporabili dve koncentraciji monenzina (1,25 µM in 12,5 µM).

Sev *P. bryantii* B<sub>1</sub>4<sup>T</sup> je bil edini, ki ga monenzin v nižji koncentraciji ni inhibiral oziroma ga je pri višji koncentraciji inhibiral le do neke mere (sodeč po OD vrednostih). Sev je po pričakovanjih odpornejši od ostalih, saj je njegova struktura celične stene temu primerna (G-). Podobne ugotovitve sta podala Russell in Houlihan (2003) in sicer, da je sev *P. Bryantii* B<sub>1</sub>4 rasel hitro tudi ob prisotnosti monenzina v visokih koncentracijah. To potrjuje hipotezo o t.i. ultrarezistenci vrste *P. bryantii* na monenzin (Callaway in Russell, 1999). Pri sevu *P. ruminicola* 23<sup>T</sup> smo ugotovili, da je že 1,25 µM koncentracija monenzina precej inhibirala rast, monenzin v 12,5 µM koncentraciji pa popolnoma. *P. ruminicola* je v začetku sicer občutljiva na monenzin, toda lahko hitro postane odporna nanj (Newbold in sod., 1993). Nekatere Gram negativne bakterije lahko postanejo dovezetne za visoke koncentracije ionoforov (Nagaraja in Taylor, 1987). Sev *F. succinogenes* S85 ima prav tako Gram negativno strukturo celične stene, vendar je bila njegova rast s strani monenzina popolnoma zavrta (slika 13). Chen in Wolin (1979) sta eksperimentalno dokazala, da se je pri sevu *F. succinogenes* S85 ob povečevanju koncentracije monenzina, obdobje do začetka rasti podaljševalo. V naši študiji rasti pri omenjenem sevu nismo opazili, zato bi bilo smiselno čas inkubacije podaljšati. Nekatere Gram negativne vampne bakterije so na začetku občutljive na učinek monenzina tako kot nekatere Gram pozitivne vrste, razvoj rezistence na monenzin se pojavi pri Gram pozitivnih in Gram negativnih vrstah (Callaway in Russell, 2000; Rychlik in Russell, 2002). Pri sevu *B. fibrisolvens* 3071<sup>T</sup>, za katerega je značilna Gram pozitivna ultrastruktura celične stene, čeprav se barva Gram negativno, smo opazili popolno inhibicijo rasti. Chen in Wolin (1979) sta v poskusu dokazala inhibicijo rasti za vrsto *B. fibrisolvens* že pri nizki koncentraciji monenzina. Callaway in Russell (1999) navajata, da je rast Gram pozitivnih bakterij v čistih kulturah vedno zmanjšana ob prisotnosti monenzina.

Drugi del poskusa je obsegal meritve OD za seva *R. flavefaciens* 007 S/6 in *R. albus* 20455 s tremi nižjimi koncentracijami monenzina (0,25 µM, 0,125 µM in 0,025 µM), izmed katerih nobena ni bila popolnoma inhibitorna za omenjena seva (slika 14). Sev *R. flavefaciens* 007 S/6 je po Gramu pozitiven, čeprav se pogosto barva po Gramu variabilno. Glede na to bi pričakovali, da monenzin vsaj pri sevu *R. flavefaciens* 007 S/6

bolj zaviralno deluje na rast. Dokazano je bilo, da monenzin v koncentraciji 2,5 µM na rast obeh ruminokokov deluje zaviralno (Chen in Wolin, 1979). O izjemni občutljivosti vrste *Ruminococcus* na monenzin je poročal tudi Bryant (1986). Na sliki 14 vidimo, da je *R. albus* 20455 bolj občutljiv na monenzin kot drugi ruminokok.

Krivulji, ki prikazujeta rast obeh ruminokokov ob prisotnosti monenzina v najnižji koncentraciji (0,025 µM) sta pričakovano primerljivi s krivuljo kontrole. Monenzin v koncentracijah 0,25 µM in 0,125 µM je pri obeh izbranih sevih vrste *Ruminococcus* povzročil netipično, vendar naraščajočo (pri *R. flavefaciens* 007 S/6 hitreje) rastno krivuljo, kar je morda posledica tega, da je bila eksponencialna faza podaljšana in bi šele po 30-ih urah inkubacije seva prešla v stacionarno fazo rasti. Visoka OD vrednost po 28. uri je morda posledica izločkov, ki jih lizirajoče celice sproščajo v gojišče, kar pa pripomore k večji motnosti in s tem višji OD vrednosti.

### 5.1.2 Spremljanje rasti bakterijskih sevov s pomočjo pH vrednosti

Po rasti v gojišču brez monenzina se je pri sevih *P. bryantii* B<sub>14</sub><sup>T</sup>, *B. fibrisolvens* 3071<sup>T</sup> in *F. succinogenes* S85 po 10. uri inkubacije (pri *P. ruminicola* 23<sup>T</sup> pri 15. uri inkubacije) pH znižal in se do konca merjenja skoraj ni več spremenjal (slika 15). Pri sevih (*B. fibrisolvens* 3071<sup>T</sup> in *F. succinogenes* S85), pri katerih ni bilo rasti oziroma je bila le-ta komaj zaznavna (pri obeh koncentracijah monenzina), smo z merjenjem pH ugotovili, da se pH vrednost v gojišču sevov od začetka do konca inkubacije po pričakovanih skoraj ni spremenila (pri *B. fibrisolvens* 3071<sup>T</sup> komaj zaznavno pada). Opazili smo velike razlike med sevoma *P. bryantii* B<sub>14</sub><sup>T</sup> in *P. ruminicola* 23<sup>T</sup>. Pri sevu *P. bryantii* B<sub>14</sub><sup>T</sup> je zanimivo zniževanje pH vrednosti pri višji koncentraciji monenzina, tudi ko se OD vrednost več ne spreminja. Manj intenzivno padanje pH vrednosti prav tako opazimo pri nižji koncentraciji monenzina, medtem ko OD vrednost ostaja praktično enaka. Pri sevu *P. ruminicola* 23<sup>T</sup> so se pH vrednosti obnašale v skladu z vrednostmi OD, med pH vrednostmi med obema koncentracijama monenzina smo opazili pričakovano odstopanje, ki je naraščalo s časom inkubacije. Porast pH vrednosti proti koncu stacionarne faze rasti bi lahko pripisali lizirajočim celicam in njihovim presnovkom, ki so se sprostili v gojišče.

Obraten fenomen kot smo ga opisali pri sevu *P. bryantii* B<sub>14</sub><sup>T</sup>, pa se je pokazal pri sevu *R. flavefaciens* 007 S/6. OD vrednost se v stacionarni fazi rasti dviguje, pH vrednost pa ne pada. Pri sevu *R. albus* 20455 v prisotnosti monenzina v koncentraciji 0,25 µM OD vrednost narašča, pH vrednost pa ostaja praktično konstantna. Toda monenzin v 0,125 µM koncentraciji vpliva na slabo naraščanje OD vrednosti, medtem ko pH vrednost kar močno pada. Velik standardni odklon (velike razlike med paralelkama) (slika 16) najverjetneje nakazuje na eksperimentalno napako.

### 5.1.3 Spremljanje rasti bakterijskih sevov s pomočjo ugotavljanja koncentracije celičnih proteinov

Monenzin v 12,5 µM koncentraciji je pri sevu *P. ruminicola* 23<sup>T</sup> povzročil popolno inhibicijo rasti in s tem pogojeno nično koncentracijo celičnih proteinov. Kljub opazni rasti v prisotnosti monenzina v nižji koncentraciji (OD vrednost), se koncentracija celičnih proteinov ne spreminja (podobno kot pH), in ostaja zelo nizka. Pri sevu *P. bryantii* B14<sup>T</sup> je opaziti podobnosti med koncentracijo celičnih proteinov in OD vrednostmi za kontrolo in nižjo koncentracijo monenzina. Do razhajanja med primerjanima parametroma pa je prišlo pri višji koncentraciji monenzina v stacionarni fazi, kjer koncentracija celičnih proteinov konstantno in precej narašča glede na OD vrednost, ki pa komaj zaznavno pada (slika 17).

Učinek monenzina v koncentracijah 0,25 µM in 0,125 µM se kaže v nizki koncentraciji celičnih proteinov pri sevu *R. flavefaciens* 007 S/6, ki se od 12. ure starosti skoraj ne spreminja (monenzin v koncentraciji 0,125 µM) oziroma počasi naraščajo (monenzin v koncentraciji 0,25 µM), toda OD vrednost precej narašča. To odstopanje je presenetljivo, vendar bi morali, preden bi sklepali, poskus ponoviti. Toda v našem primeru je bila ponovitev poskusa fizično neizvedljiva, kajti v naši raziskavi smo poleg monenzina opazovali še tri rastlinske izvlečke in sicer v različnih koncentracijah in njihov vpliv na šest sevov v dveh paralelkah. Hkrati pa je metoda zelo dolgotrajna in zahteva maksimalno natančnost dela. Obraten fenomen pa je viden pri sevu *R. albus* 20455 (slika 18), kjer koncentracija celičnih proteinov hitreje narašča kot OD vrednost.

Metoda ugotavljanja celičnih proteinov po Lowry-ju s čitalcem mikrotitrskih plošč (v nadaljevanju Lowry metoda) za spremljanje hitrosti celične rasti, je ustaljena in zanesljiva metoda, kljub temu pa dopušča precej napak med samim izvajanjem, saj so vzorci zelo majhni (eksperimentalne napake izvajalcev, nenatančna umeritvena krivulja, napake pri redčenju). Metoda merjenja OD vrednosti je zanesljiva, toda rezultati OD vrednosti so lahko višji kot je dejanska količina celic v vzorcu, čemur botruje sproščanje celičnih izločkov v gojišče. Na vrednost optične gostote vpliva tudi oblika celic. Obstaja pa še ena stvar, ki pokvari realno sliko OD vrednosti, in sicer polisaharidni matriks, ki obdaja vsako celico. Nekatere celice imajo namreč debelejši sloj matriksa, ki poveča absorbanco.

Rešitev za natančno določeno število celic v vzorcu bi predstavljala analitska metoda, ki bi omogočala enostavno in hitro ugotavljanje dejanskega števila celic v vzorcu. Ker je mikroskopiranje zelo zamudno in zahtevno delo, bi problem lahko rešili z dokaj zapletenima metodama, kot sta računalniška analiza mikroskopske digitalne slike ali pretočna citometrija. S takšnimi metodami bi lahko ugotovili tudi, ali monenzin oziroma

druge izbrane učinkovine vplivajo na velikost in druge morfološke lastnosti preučevanih celic, česar nismo mogli ugotoviti s pomočjo ugotavljanja optične gostote, niti z izvedbo Lowry metode.

#### **5.1.4 Spremljanje rasti bakterijskih sevov s pomočjo ekstrakcije KMK**

Pri sevu *P. ruminicola* 23<sup>T</sup> ni prišlo do odstopanj med OD vrednostjo in koncentracijo KMK, v vzorcu brez monenzina pa se je v največji meri tvorila ocetna kislina, ostali produkti so v zelo nizkih koncentracijah (preglednica 10). Celice seva *P. bryantii* B<sub>14</sub><sup>T</sup> so se izkazale za zelo dobro rastoče (visoka OD vrednost), ne glede na koncentracijo dodanega monenzina. Ob dodatku nižje koncentracije monenzina je ta isti sev dosegel po 28. urah sicer nekoliko nižjo vrednost OD glede na kontrolo (slika 19), a sta obe krivulji potekali dokaj podobno (slika 13), zato nas ne presenetiti, da sta tudi obe vrednosti KMK podobni.

Pri sevu *R. flavefaciens* 007 S/6 se ocetna kislina, kot glavni produkt sploh ni tvorila (vrednosti v preglednici 10 enake 0). Za ta pojav bi bilo možnih več razlag. Obstaja možnost, da ta bakterijski sev šele po 28-ih urah starosti začne proizvajati KMK (glede na OD vrednost; slika 14). Nadalje ne smemo izključiti možnosti, da smo med poskusom naredili eksperimentalno napako. Izpostaviti pa moramo tudi problem izhlapevanja, do katerega je prišlo med samo ekstrakcijo KMK. Molekula ocetne kisline je namreč zaradi svoje molekulske mase (samo 2 C-atoma) zelo hlapljiva, kar velja tudi za propionsko kislino. Povečana produkcija propionske kisline pod vplivom monenzina prispeva k 5 % boljšemu energetskemu zadrževanju iz KMK (Raun in sod., 1976). Kljub hitri izvedbi metode ekstrahiranja obstaja potem takem verjetnost, da je prej omenjenih KMK veliko izhlapelo še preden bi jih uspeli detektirati v plinskem kromatografu. Preden bi lahko rekli karkoli dokončnega, bi morali poskus ponoviti. Pri sevu *R. albus* 20455 smo pri vzorcu z dodanim monenzinom v 0,125 µM koncentraciji, izmerili presenetljivo visoko skupno produkcijo KMK (0,686 mg/ml) glede na nizko OD vrednost (0,21; slika 14). Slika 20 prikazuje neskladje med rastjo in produkcijo KMK, vendar pa smo ob merjenju pH vrednosti v prisotnosti monenzina v 0,125 µM koncentraciji in kontroli opazili podobno upadanje pH vrednosti, medtem ko se pH vrednost pri najvišji koncentraciji monenzina ni spreminala, pri najnižji koncentraciji monenzina pa je pH celo naraščal.

#### **5.1.5 Spremljanje rasti bakterijskih sevov s pomočjo produkcije vodika**

Pri sevu *B. fibrisolvens* 3071<sup>T</sup> zaradi inhibirane celične rasti pri obeh koncentracijah monenzina koncentracije vodika nismo analizirali. Nasprotno pa smo ugotovili pri drugem producentu vodika, sevu *R. albus* 20455. V splošnem nam slika 21 prikazuje nemoteno produkcijo vodika pri kontrolnem vzorcu, še večje volumske deleže vodika pa je bilo zaznati v atmosferi vzorcev, tretiranih z eno od koncentracij monenzina.

Rezultati, ki so proti pričakovanju pokazali, da je monenzin ugodno deloval na nastanek plinov pri tem sevu, so presenetljivi. Obsežno plinsko produkcijo je možno pripisati (glede na inhibirano rast) spremenjenim metabolnim procesom, ki pa še niso raziskani. Druga hipoteza pravi, da je izmerjen višji delež vodika v atmosferi nad kulturo lahko posledica odcepa vodika iz raztopine monenzina v etanolu. Vsekakor pa je to rezultat, ki ga nismo pričakovali, saj naj bi monenzin zaviralno vplival na produkcijo vodika, ki je prekurzor za nastanek metana. Z večjo verjetnostjo bi lahko trdili, da ni prišlo do pomembnejših analitskih napak, če bi poskus ponovili.

Poleg tega, da smo želeli z učinkom monenzina inhibirati seve, ki tvorijo prekurzorje metanske sinteze, smo te seve preučevali še z razlogom, da ugotovimo, ali je produkcija manjša zaradi manjše rasti, ali pa manjša rast sploh ni pogoj za manjšo produkcijo.

## 5.2 SKLEPI

Prisotnost monenzina v čistih kulturah šestih izbranih bakterijskih sevov iz vampa je različno vplivala na obseg in hitrost rasti, lastnosti in aktivnosti posameznih sevov.

- *Prevotella ruminicola* 23<sup>T</sup>
  - rast je bila proti pričakovanjem precej zavirana ( $1,25 \mu\text{M}$ ) oziroma popolnoma inhibirana ( $12,5 \mu\text{M}$ );
  - pH vrednost je bila v gojišču po rasti seva v prisotnosti monenzina višja od pH kontrole, kar je presenetljivo in doslej ni znane razlage za ta fenomen;
  - koncentracija celičnih proteinov ob delovanju monenzina v  $1,25 \mu\text{M}$  koncentraciji je bila zelo nizka;
  - $1,25 \mu\text{M}$  koncentracija monenzina je v skladu z omejeno rastjo precej zavrla produkcijo vseh KMK, katerih koncentracije smo merili, razmerje med ocetno in propionsko kislino pa se ni spremenilo.
- *Prevotella bryantii* B<sub>14</sub><sup>T</sup>
  - rast ob prisotnosti  $1,25 \mu\text{M}$  koncentracije monenzina ni bila inhibirana, višja koncentracija jo je zavrla le delno;
  - pH vrednost je bila nekoliko višja pri obeh koncentracijah monenzina v primerjavi s kontrolo, vendar se je po 28. urah približala kontrolni vrednosti;
  - koncentracija celičnih proteinov ob dodatku  $1,25 \mu\text{M}$  koncentracije monenzina se skoraj ni razlikovala od kontrole,  $12,5 \mu\text{M}$  koncentracija monenzina pa je vplivala na zmanjšanje koncentracije celičnih proteinov, ki pa so do konca meritev počasi naraščali, kljub temu, da se OD vrednost ni spremnjala po prehodu iz eksponencialne v stacionarno fazo rasti;
  - koncentracija ocetne kislino, kot edinega nastalega produkta med KMK, je bila ob prisotnosti nižje koncentracije monenzina celo višja ( $2,88 \text{ mg/ml}$ ) v primerjavi

s kontrolo ( $2,85 \text{ mg/ml}$ ), medtem ko je monenzin v koncentraciji  $12,5 \mu\text{M}$  precej vplival na zmanjšanje produkcije te kisline ( $1,326 \text{ mg/ml}$ ); drugih produktov fermentacije proti pričakovanjem nismo zasledili.

- *Butyrivibrio fibrisolvens* 3071<sup>T</sup>
  - rast je bila popolnoma zavrta v prisotnosti obeh koncentracij monenzina, zato tudi nismo ugotovili nobenih sprememb v preučevanih parametrih v primerjavi s kontrolo.
- *Fibrobacter succinogenes* S85
  - v prisotnosti obeh koncentracij monenzina rasti nismo opazili zaradi prekratkega obdobja izvajanja meritev, zato tudi nismo ugotovili nobenih sprememb v preučevanih parametrih v primerjavi s kontrolo.
- *Ruminococcus flavefaciens* 007 S/6
  - rast ob prisotnosti monenzina v  $0,025 \mu\text{M}$  koncentraciji je najbolj sledila kontroli, monenzin v koncentracijah  $0,25 \mu\text{M}$  in  $0,125 \mu\text{M}$  pa je pripomogel k nižjemu obsegu rasti, ki pa se je nadaljevala tudi po prehodu v stacionarno fazo;
  - pH vrednost pri najnižji koncentraciji monenzina je sledila kontroli, vendar nekoliko počasneje, vpliv monenzina v koncentracijah  $0,25 \mu\text{M}$  in  $0,125 \mu\text{M}$  pa je povzročil zelo rahel padec pH vrednosti in še to le do prehoda v stacionarno fazo rasti;
  - monenzin v koncentraciji  $0,025 \mu\text{M}$  ni vplival na zmanjšanje koncentracije celičnih proteinov, pri dodatku monenzina v  $0,25 \mu\text{M}$  in  $0,125 \mu\text{M}$  koncentraciji pa je koncentracija celičnih proteinov naraščala le do stacionarne faze, čeprav je OD vrednost naraščala tudi kasneje;
  - v plinskem kromatografu ni bilo zaznati nobenih koncentracij kislin (ponovitev poskusa).
- *Ruminococcus albus* 20455
  - oblika rastne krivulje z dodanim monenzinom v  $0,025 \mu\text{M}$  je sledila krivulji kontrole; monenzin v koncentracijah  $0,125 \mu\text{M}$  in  $0,25 \mu\text{M}$  je precej inhibiral rast;
  - pH vrednost je bila v prisotnosti  $0,125 \mu\text{M}$  koncentracije monenzina med rastjo nekoliko višja kot pH vrednost kontrole, vendar z enakim trendom padanja, monenzin v  $0,25 \mu\text{M}$  koncentraciji je povzročil bolj ali manj konstantno pH vrednost med inkubacijo,  $0,025 \mu\text{M}$  koncentracija monenzina je po začetnem sledenju pH kontrole spremenila svoj trend in začela naraščati in naraščala do konca poskusa;

- monenzin je v vseh treh koncentracijah povzročil upočanjeni naraščanje koncentracije celičnih proteinov;
- produkcijo ocetne kisline je bilo mogoče zaznati le ob dodatku monenzina v  $0,125 \mu\text{M}$  koncentraciji ( $0,686 \text{ mg/ml}$ );
- produkcija vodika je bila proti pričakovanju s strani vseh treh koncentracij monenzina vzpodbujena, najbolj jo je stimulirala  $0,25 \mu\text{M}$  koncentracija monenzina (možen odcep vodika iz raztopine monenzina v etanolu).

## 6 POVZETEK

Prežvekovalci z vampno združbo mikroorganizmov živijo v simbiozi, pri čemer jim encimi mikroorganizmov zagotavljajo razgradnjo težko razgradljivih polisaharidov rastlinskih celičnih sten. Vendar med fermentacijo prihaja tudi do neželjenih procesov, ki negativno vplivajo na žival, izrabo energije, so okoljsko problematični, iz ekonomskega vidika pa povečajo stroške reje.

Za preprečevanje oziroma zmanjševanje učinkov neželjenih procesov so znanstveniki odkrili monenzin, ionoformi antibiotik, kot prehranski dodatek z mnogimi ugodnimi učinki. Manipulacija vampnega metabolizma z monenzinom deluje na nivoju vampnih mikroorganizmov, posredno pa ugodno vpliva na žival in s tem tudi na zmanjšano onesnaževanje v smislu živalskih izločkov in emisije toplogrednih plinov.

V naši raziskavi smo žeeli ugotoviti, kako ionoformi antibiotik monenzin vpliva na nekatere fenotipske značilnosti šestih izbranih sevov, rastočih v čistih kulturah glede na kontrolne vzorce. Izbrali smo seve, ki so bili predhodno dobro raziskani, z različno ultrastrukturo celične stene in, ki s tvorbo različnih fermentacijskih produktov obremenilno vplivajo na žival in okolje ter bi jih naj bilo z monenzinom mogoče zavreti. V poskušu smo spremljali optično gostoto (OD) in pH vrednost gojišč, skupno koncentracijo celičnih proteinov, ekstrakcijo in detekcijo nastalih KMK in detekcijo nastalih plinov.

V prvo skupino smo uvrstili dva seva iz rodu *Prevotella* (*P. ruminicola* 23<sup>T</sup> in *P. bryantii* B<sub>1</sub>4<sup>T</sup>), sev *Butyrivibrio fibrisolvens* 3071<sup>T</sup> in sev *Fibrobacter succinogenes* S85. Pri vseh metodah smo za te štiri seve uporabili dve koncentraciji monenzina (1,25 µM in 12,5 µM), za kateri smo pričakovali, da bosta ustrezno zavrli rast in s tem zmanjšali koncentracijo celičnih proteinov, povišali pH vrednost, zmanjšali produkcijo acetne in maslene kisline na račun propionske kisline ter zmanjšali nastajanje plinov. Za bakterijo *P. bryantii* B<sub>1</sub>4<sup>T</sup> smo potrdili že znano dejstvo, da je ultrarezistentna na monenzin, kajti niti monenzin v višji koncentraciji (12,5 µM) ni pretirano zmotil njene rasti, pa tudi pH vrednost je časovno padala, opazili pa smo nekoliko nižjo koncentracijo proteinov pod vplivom 12,5 µM koncentracije monenzina. Sev *P. ruminicola* 23<sup>T</sup> se ni obnašal v skladu s pričakovanji glede na strukturo celične stene, kajti monenzin je njegovo rast močno zavrl, in v skladu s tem je vplival na pH vrednost (višja glede na kontrolo) in na zmanjšanje koncentracije acetne kisline. Pri sevu *B. fibrisolvens* 3071<sup>T</sup> smo bili priča popolni inhibiciji rasti, pH vrednost je ostala tekom rasti praktično konstantna in višja od pH vrednosti kontrolnega vzorca. Drugih parametrov pri tem sevu nismo merili. *F. succinogenes* S85 pod vplivom monenzina ni rasel, česar glede na gramsko negativnost

nismo pričakovali, vendar pa sta Chen in Wolin (1979) ugotovila, da pri višjih odmerkih monenzina začne sev kasneje rasti.

V drugo skupino smo uvrstili dva seva iz rodu *Ruminococcus* (*R. flavefaciens* 007 S/6 in *R. albus* 20455), ki sta bila glede na svojo občutljivost na monenzin tretirana s tremi nižjimi koncentracijami ionofora (0,25 µM, 0,125 µM in 0,025 µM). Najnižja koncentracija monenzina je bila tako nizka, da je bila rast tukaj dokaj podobna kontrolnemu vzorcu, drugi dve koncentraciji pa sta vplivali na upočasnjeno rast pri obeh ruminokokih. Koncentracija celičnih proteinov je pri *R. albus* 20455 pod vplivom monenzina počasneje naraščala, pri drugem ruminokoku pa je bila precej zavrta, razen pri tretmaju z monenzinom v koncentraciji 0,025 µM. Producijo KMK smo pri *R. flavefaciens* 007 S/6 popolnoma zavrli, 0,125 µM koncentracija monenzina pa je stimulirala produkcijo acetne kisline pri *R. albus* 20455. Slednji je proti pričakovanjem kljub prisotnosti monenzina tvoril visoke koncentracije plina H<sub>2</sub>, celo višje kot pri kontroli, kar gre lahko pripisati analitski napaki, odcepljenemu vodiku iz etanola in posledični sprostitvi v gojišče, ali popolnoma spremenjenemu metabolnemu poteku.

V našem poskusu smo želeli ugotoviti, ali monenzin v resnici zavira rast Gram pozitivnih bakterij, kot poglavitnih producentov acetne kisline in vodika kot prekurzorja za nastanek metana. Nismo pričakovali zavrete rasti Gram negativnega seva *P. ruminicola* 23<sup>T</sup> in prav tako ne kakrsnekoli produkcije vodika pri sevu *R. albus* 20455. Ugotovili smo, da v nekaterih primerih manjša rast sploh ni bila pogoj za zmanjšano produkcijo (*R. albus* 20455 in tvorba H<sub>2</sub>). Vpliv monenzina na aktivnost bakterijskih sevov se je stopnjeval s povečevanjem njegove koncentracije. Tam, kjer rezultati niso bili v skladu s pričakovanji, bi bilo poskus smiselno ponoviti, s čimer bi lahko potrdili njihovo obnašanje ali pa ugotovili, da je prišlo med poskusom do napake.

Na podlagi dobljenih rezultatov ne moremo z zagotovostjo trditi, da enake značilnosti veljajo za ostale vampne mikroorganizme in da bi monenzin enako učinkoval, če bi poskus izvedli v kontinuirani kulturi, kajti vamp je ekosistem kompleksne mikrobne združbe, v kateri mikroorganizmi delujejo vzajemno in medsebojno odvisno. To pa pomeni, da zavrta rast ene vrste in s tem njena okrnjena fermentacija lahko negativno ali pozitivno vpliva na druge vrste in njihove značilnosti ter aktivnosti. Vsekakor pa smo pridobili vpogled v delovanje monenzina na posamezne bakterijske vrste in s tem v mehanizem delovanja tega ionoformega antibiotika.

## 7 VIRI

- Acar J., Casewell M., Freeman J., Friis C., Goossens H. 2000. Avoparcin and virginiamycin as animal growth promoters: a plea for science in decision making. *Clinical Microbiology and Infection*, 6: 477-482
- Altenbach S.B., Townsend J.A. 1995. Transgenic plants with improved protein quality. V: *Biotechnology in Animal Feeds and Animal Feeding*. Wallace R.J., Chesson A. (eds.). New York, VCH Publishers: 71-92
- Bagg R. 1997. Mode of action of ionophores in lactating dairy cattle. V: *Proceedings of the Symposium on Usefulness of Ionophores in Lactating Dairy Cattle*, Guelph, 25-26 jun. 1997. Guelph, Canada, Ontario Veterinary College: 13-21
- Baldwin K.A., Bitman J., Thompson M.J. 1982. Comparison of N,N-dimethyl-dodecanamine with antibiotics on *in vitro* cellulose digestion and volatile fatty acid production by ruminal microorganisms. *Journal of Animal Science*, 55: 673-679
- Baker S.K. 1999. Rumen methanogens, and inhibition of methanogenesis. *Australian Journal of Agricultural Research*, 50: 1293-1298
- Beauchemin K.A., Rode L.M. 1996. Use of feed enzymes in ruminant nutrition. V: *Proceedings of the Canadian Society of Animal Science Annual Meeting*, Lethbridge, Alberta: 103-130
- Bell E. Chemistry 326 - Membrane Transport. University of Richmond.  
<http://www.richmond.edu/~jbell2/chem326-membrane-transport.html> (9. nov. 2006)
- Bergen W.G., Bates D.B. 1984. Ionophores: Their effect on production efficiency and mode of action. *Journal of Animal Science*, 58: 1465-1483
- Booth I.R., Mitcell W.J., Hamilton W.A. 1979. Quantitative analysis of proton – linked transport system. *Biochemistry Journal*, 182: 687-696
- Booth I.R. 1985. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiological Reviews*, 49: 359-378
- Briskin D.P. 2000. Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. *Plant Physiology*, 124: 507-514
- Bronstein I.N., Semedjajew K.A., Musiol G., Mühlig H. 1997. Matematični priročnik. 2. izdaja. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 967 str.
- Bryant M.P. 1972. Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 25: 1324-1328
- Bryant M.P. 1986. *Ruminococcus*. V: *Bergey's Manual Systematic Bacteriology*. Volume 2. Sneath P.H.A. (ed.). Baltimore, Williams & Wilkins: 1093-1097
- Broderick G.A., Wallace R.J., Ørskov E.R. 1991. Control of rate and extent of protein degradation. V: *Physiological aspects of digestion and volatile and metabolism of ruminants*. Tsuda T., Sasaki Y., Kawashima R. (eds.). Cambridge, Portland Press: 542-592

- Busquet Solé M. 2005. Extractos de Plantas como Modificadores de la Fermentación Microbiana Ruminal. Tesis Doctoral. Bellaterra, Universitat Autònoma de Barcelona, Departament de Ciència Animal i dels Aliments: 179 str.
- Callaway T.R., Russell J.B. 1999. Selection of a Highly Monensin-Resistant *Prevotella bryantii* Subpopulation with Altered Outer Membrane Characteristics. Applied and Environmental Microbiology, 65: 4753-4759
- Callaway T.R., Russell J.B. 2000. Variations in the ability of ruminal gram-negative *Prevotella* species to resist monensin. Current Microbiology, 40: 185-189
- Carr S.M. 2005. Ruminant digestion in *Bos taurus*. Addison Wesley Longman, Inc. (6. apr. 2006)  
[www.mun.ca/biology/scarr/ruminant-digestion.html](http://www.mun.ca/biology/scarr/ruminant-digestion.html) (16. maj 2007)
- Casewell M., Friis C., Granell E. M., McMullin P., Phillips I. 2002. The European ban on the growth – promoting antibiotics and its consequences for animal and human health. International Federation for Animal Health Europe.  
<http://www.fedesa.be/News/news18-annex1.htm> (12. dec. 2002)
- Chalupa W. 1984. Manipulation of rumen fermentation. V: Recent Advances in Animal Nutrition. Haresign W., Cole D.J.A. (eds.). London, Butterworths: 143-160
- Chen G., Russell J.B. 1989. More monensin – sensitive, ammonia producing bacteria from the rumen. Applied and Environmental Microbiology, 55: 1052-1057
- Chen M., Wolin M.J. 1979. Effect of monensin and lasalocid – sodium on the growth of methanogenic and rumen saccharolytic bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 38: 72-77
- Cheng K.-J., Costerton J.W. 1977. Ultrastructure of *Butyrivibrio fibrisolvens*: a gram – positive bacterium? Journal of Bacteriology, 129: 1506-1512
- Chesson A., Stewart C.S., Wallace R.J. 1982. Influence of plant phenolic acids on growth and cellulolytic activity of rumen bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 44: 597-603
- Chow J.M., Van Kessel J.S., Russel J.B. 1994. Binding of radiolabeled monensin and lasalocid to ruminal microorganisms and feed. Journal of Animal Science, 72: 1630-1635
- CHRISP Thesaurus. 1999. National Institutes of Health.  
<http://www.crisp.cit.nih.gov/Thesaurus/00005189.htm> (15. dec. 2006)
- Cotta M.A. 1988. Amylolytic activity of selected species of ruminal bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 54: 772-776
- Cowan M.M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews, 12: 564-582
- Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C., Gustafson J.E., Warmington J.R., Wyllie S.G. 2000. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). Journal of Applied Microbiology, 88: 170-175

Dano A.R., Bogh H.O. 1999. Use of herbal medicine against helminthes in livestock – renaissance of an old tradition. World Animal Review: 60-67

DBGET. 2007. Kyoto University Bioinformatics Center (21. feb. 2007)  
[http://www.genome.jp/dbget-bin/www\\_bget?cpd:C06693](http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?cpd:C06693) (11. mar. 2007)

Della-Fera M.A., Baile C.A. 1984. Control of feed intake in sheep. Journal of Animal Science, 59: 1362-1368

Dellinger C.A., Ferry J.G. 1984. Effect of monensin on growth and methanogenesis of *Methanobacterium formicicum*. Applied and Environmental Microbiology, 48: 680-682

Demeyer D.I., Van Nevel C.J., Henderickx H.K., Martin J.A. 1969. The effect of unsaturated fatty acids upon methane and propionic acid in the rumen. V: Energy metabolism of farm animals. Blaxter K.L. (ed.). Newcastle-upon-Tyne, Oriel Press:139-147

Demeyer D.I., Van Nevel C.J. 1987. Chemical manipulation of rumen metabolism. V: In The Ruminant Stomach. Volume 1. Ooms L.A.A., Degryse A.D., Marsboom R. (eds.). Antwerp, The Janssen Research Foundation: 227-250

Dennis S.M., Nagaraja T.G., Bartley E.E. 1981. Effects of lasalocid or monensin on lactate producing or using rumen bacteria. Journal of Animal Science, 52: 418-426

Dennis S.M., Nagaraja T.G., Dayton A.D. 1986. Effect of lasalocid, monensin and thiopetin on rumen protozoa. Research in Veterinary Science, 41: 251-256

Dinius D.A., Simpson M.E., Marsh P.B. 1976. Effect of monensin fed forage on digestion and the ruminal ecosystem of steers. Journal of Animal Science, 42: 229-234

Donoho A.L. 1984. Biochemical studies on the fate of monensin in animals and in the environment. Journal of Animal Science, 58: 1528-1539

Durand M., Kawashimi R. 1980. Influence of minerals in rumen microbial digestion. V: Digestive physiology and metabolism in ruminants. Ruckebusch Y., Thivend P. (eds.). United Kingdom, Lancaster, MTP Press Limited: 375-408

Elanco 1978. Rumensin technical manual for pasture and range cattle. Indianapolis, IN, Elanco Products Co.

EPA – Ruminant Livestock. 2006. U.S. Environmental Protection Agency (08. mar. 2006)  
<http://www.epa.gov/methane/rlep/faq.html#1> (12. mar. 2006)

Faostat. Data Archives, Production, Live Animals. 2006. FAO.  
<http://faostat.fao.org/site/409/default.aspx> (12. mar. 2007)

Feed Additive Compendium. 2002. Feed Additive Compendium 2003. Minnetonka, MN, Miller Publishing Co.

Fellner V., Sauer F.D., Kramer J.K.G. 1997. Effect of nigericin, monensin and tetronasin on biohydrogenation in continuous flow-through ruminal fermenters. Journal of Dairy Science, 80: 921-928

- Fiems L.O. 1994. The use of yeasts in practical diets for ruminants. V: Microorganisms and Enzyme Preparation in Animal Nutrition. Castanon J.I.R. (ed.). Brussels, European Commission, Directorate – General for Agriculture: 159-173
- Fuller R. 1989. Probiotics in man and animals. Journal of Applied Bacteriology, 66: 365-378
- Fuller J.R., Johnson D.E. 1981. Monensin and lasalocid effects on fermentation *in vitro*. Journal of Animal Science, 53: 1574-1580
- Gray W., Ryan J.P. 1989. Effect of yeast culture on volatile fatty acid levels in ovine rumen fluid incubated with oats, barley and hay. Biochemical Society Transactions, 17: 390-392
- Greathead H. 2003. Plants and plant extracts for improving animal productivity. Proceedings of the Nutrition Society, 62: 279-290
- Haney M.E., Hoehn M.M. 1967. Monensin, a new biologically active compound. I. Discovery and Isolation. Antimicrobial Agents and Chemotherapy: 349-352
- Hanson T.L., Klopfenstein T.J. 1979. Monensin, protein source and protein levels for growing steers. Journal of Animal Science, 48: 474-479
- Hespell R.B., Wolf R., Bothast R.J. 1987. Fermentation of xylans by *Butyrivibrio fibrisolvens* and other ruminal bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 53: 2849-2853
- Hobson P.N., Wallace R.J. 1982. Microbial ecology and activities in the rumen. CRC Critical Reviews in Microbiology, 9: 253-320
- Hobson P.N. 1969. Rumen bacteria. V: Methods in microbiology. Vol. 3B. Norris J.R., Ribbons D.W. (eds.). New York, Academic Press: 133-149
- Hobson P.N. 1997. Introduction. V: The rumen microbial ecosystem. 2nd edition. Hobson P.N., Stewart C.S. (eds.). London, Blackie Academic & Professional, an imprint of Chapman & Hall: 1-9
- Howis S. Cow flatulence. Rhodes University, Department of Botany.  
<http://www.rucus.ru.ac.za/~wolfman/Essays/Cow.html> (9. nov. 2006)
- Hudd D.L. 1983. The addition of antibiotics to feedingstuffs. V: Pharmacological Basis of Large Animal Medicine. Bogan J.A., Less P., Yoxall A.T. (eds.). Boston, Blackwell Scientific: 107-128
- Hungate R.E. 1957. Microorganisms in the rumen of cattle fed a constant ration. Canadian Journal of Microbiology, 3: 289-311
- Hungate R.E. 1966. The rumen and its microbes. New York, Academic Press, Incorporated: 49-54
- Hungate R.E., Smith W., Bauchop T., Ida Yu, Rabinowitz J.C. 1970. Formate as an Intermediate in the Bovine Rumen Fermentation. Journal of the Bacteriology, 102: 389-397
- Intergovernmental Panel on Climate Change. 2001. Climate change 2001: Synthesis report. A contribution of Working Groups I, II and III to the third assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge, Cambridge University Press: 111 str.

- Ipharrague I.R., Clark H. 2003. Usefulness of ionophores for lactating dairy cows: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 106: 39-57
- Janis C. 1976. The evolutionary strategy of the equine and the origins of rumen cecal digestion. *Evolution*, 30: 757-774
- Jarrell K.F., Sprott G.D. 1983. The effects of ionophores and metabolic inhibitors on methanogenesis and energy related properties of *Methanobacterium bryantii*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 225: 33-41
- Jeanneret-Gris J. What is an Ionophore and his utilisation. 2004. Universite de Neuchatel.  
<http://www.unine.ch/chim/neier/etudiants/2004/Pr%8Esentations%20%8Etudiants/jeanneret-gris.pdf> (15. dec. 2006)
- Johnson D.E., Hill T.M., Ward G.M. 1991. New perspectives on ruminant methane emission. V: Energy metabolism of farm animals. Wenk C., Boessinger M. (eds.). Zurich, ETH: 376-379
- Kahn C.M., Line S., Aiello S.E. 2006. The Merck Veterinary Manual. 9th edition. New Jersey, Merck and Co.: 2712 str.
- Kamel C. 2001. Tracing models of action and roles of plant extracts in non-ruminants. V: Recent Advances in Animal Nutrition. Garnsworthy P.C., Wiseman J. (eds.). U.K., Nottingham, University Press: 151-165
- Kaars-Sijpesteijn A.K. 1951. On *Ruminococcus flavefaciens* a cellulose decomposing bacterium from the rumen of sheep and cattle. *Journal of General Microbiology*, 5: 869-879
- Lana R.P., Russell J.B. 1996. Use of potassium depletion to assess adaptation of ruminal bacteria to ionophores. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 4499-4503
- Lanigan G.W., Payne A.L., Peterson J.E. 1978. Antimethanogenic drugs and *Heliotropium europaeum* poisoning in penned sheep. *Australian Journal of Agriculture Research*, 29: 1281-1291
- Leng R.A. 1982. Modification of rumen fermentation. V: Nutritional Limits to Animal Production from Pastures. Hacker J.B. (ed.). Buckinghamshire, Farnham Royal, Commonwealth Agricultural Bureaux: 427-453
- Lowry O.H., Rosembrough A.L., Farr N.H., Randal R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275
- Mackie R.I., McSweeney C.S., Aminov R.I. 2001. Rumen. V: Encyclopedia of Life Sciences. London, Nature Publishing Group: 1-11
- Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 2000. Brock Biology of Microorganisms. 9th edition. New Jersey, Prentice-Hall: 991 str.
- Maidera H.M.F., Zhang L., Morrison M. 1995. Use of the »smuggling concept« for the study of peptide transport in *Prevotella ruminicola*. V: Abstract of the 95th meeting of the American Society for Microbiology, Washington D.C., 21-25 maj 1995. American Society for Microbiology: 550 str.

- Maass E. Science History. 2001. MedSci Network (10. sep. 2001)  
<http://www.madsci.org/posts/archives/sep2001/1000136604.Sh.r.html> (30. mar. 2007)
- McAllister T.A., Cheng K.J., Rode, L.M., Forsberg C.W. 1990. Digestion of barley, maize and wheat by selected species of ruminal bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 3146-3153
- McDonald P., Edwards R.A., Greenhalgh J.F.D., Morgan C.A. 1995. Animal Nutrition. 5th edition. Essex, Longman Scientific & Technical: 607 str.
- McKain N., Wallace R.J., Watt N.D. 1992. Selective isolation of bacteria with dipeptidyl aminopeptidase type I activity from the sheep rumen. *FEMS Microbiology Letters*, 95: 169-174
- Mitchell P. 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type mechanism. *Nature (London)*, 191: 144-148
- Morehead M.C., Dawson K.A. 1992. Some growth and metabolic characteristics of monensin-sensitive and monensin-resistant strains of *Prevotella (Bacteroides) ruminicola*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 1617-1623
- Morris E.J., Cole C.J. 1987. Relationship between cellulolytic activity and adhesion to cellulose in *Ruminococcus albus*. *Journal of General Microbiology*, 133: 1023-1032
- Moss A.R. 1993. Methane, Global Warming and Production by Animals. Canterbury, Chalcombe Publications: 105 str.
- Nagaraja T.G., Avery T.B., Bartley E.E., Roof S.K., Dayton A.D. 1982. Effect of lasalocid, monensin or thiopetin on lactic acidosis in cattle. *Journal of Animal Science*, 54: 649-658
- Nagaraja T.G., Taylor M.B. 1987. Susceptibility and resistance of ruminal bacteria to antimicrobial feed additives. *Applied and Environmental Microbiology*, 53: 1620-1625
- Nagaraja T.G., Newbold C.J., Van Nevel C.J., Demeyer D.I. 1997. Manipulation of ruminal fermentation. V: The rumen microbial ecosystem. Hobson P.N., Stewart C.S. (eds). 2nd edition. London, Blackie Academic & Professional, an imprint of Chapman & Hall: 523-632
- Newbold C.J., Wallace R.J. 1988. Effects of the ionophores monensin and tetravasin on simulated development of ruminal lactic acidosis *in vitro*. *Applied and Environmental Microbiology*, 54: 2981-2985
- Newbold C.J., Wallace R.J., McKain N. 1990. Effects of the ionophore tetravasin on nitrogen metabolism by ruminal microorganisms *in vitro*. *Journal of Animal Science*, 68: 1103-1109
- Newbold C.J., Wallace R.J., Watt N.D. 1992. Properties of ionophore-resistant *Bacteroides ruminicola* enriched by cultivation in the presence of tetravasin. *Journal of Applied Bacteriology*, 72: 65-70
- Newbold C.J., Wallace R.J., Walker N.D. 1993. The effect of tetravasin and monensin on fermentation, microbial numbers and the development of ionophore resistant bacteria in the rumen. *Journal of Applied Bacteriology*, 75: 129-134

- Nikaido H., Nakae T. 1979. The outer membrane of gram – negative bacteria. Advances in Microbial Physiology, 20: 164-251
- Nolan J.V. 1975. Quantitative models of nitrogen metabolism in sheep. V: Digestion in the ruminant. McDonald I.V., Warner A.C.I. (eds.). Armidale, University of New England, Publishing Unit: 416-431
- O'Kelly J.C., Spiers W.G. 1992. Effect of monensin on methane and heat production of steers fed legume hay. Australian Journal of Agricultural Research, 42: 1789-1793
- Olumeyan D.B., Nagaraja T.G., Miller G.W. Frey R.A., Boyer J.E. 1986. Rumen microbial changes in cattle fed diets with or without salinomycin. Applied and Environmental Microbiology, 51: 340-345
- Okine E.K., Mathison G.W., Hardin R.T. 1989. Effects of change in frequency of reticular contractions on fluid and particulate passage rates in cattle. Journal of Animal Science, 67: 3388-3396
- Owens F.N., Goetsch A.L. 1988. Ruminal Fermentation. V: The Ruminant Animal-Digestive Physiology and Nutrition. Church D.C. (ed.). New Jersey, Englewood Cliffs, Prentice-Hall Inc.: 145-171
- Palmquist D.L. 1994. The role of dietary fats in efficiency of ruminants. Journal of Nutrition, 124: 1377S-1382S
- Paster B.J., Russell J.B., Yang C.M.J. 1993. Phylogeny of the ammonia producing ruminal bacteria *Peptostreptococcus anaerobius*, *Clostridium sticklandii*, and *Clostridium aminophilum* sp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology, 43: 101-110
- Pressman B.C. 1968. Ionophorus antibiotics as models for biological transport. Federation Proceedings, 27: 1283-1288
- Pressman B.C. 1976. Biological applications of ionophores. Annual Review of Biochemistry, 45: 501-530
- Ramšak A. 2000. Z analizo 16S rRNA ugotovljena raznolikost bakterijske populacije v vzorcu iz vampa goveda. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 196 str.
- Raun A.P., Cooley C.O., Potter E.L., Rathmacher R.P., Richardson L.F. 1976. Effect of monensin on feed efficiency of feedlot cattle. Journal of Animal Science, 43: 670-677
- Rogers M., Jouany J.-P., Thivend P., Fontenot J.P. 1997. The effect of short term and long term monensin supplementation and its subsequent withdrawal on digestion in sheep. Animal Feed Science Technology, 65: 113-127
- Rumen Fermentation Enhancers. 2004. Arm & Hammer. Animal Nutrition Group.  
<http://www.ahdairy.com/AHDairy/ourProducts/rfe/rumenFermentationEnhancers.aspx> (6. okt. 2006)
- Russell J.B., Dombrowski D.B. 1980. Effect of pH on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. Applied and Environmental Microbiology, 39: 604-610
- Russell J.B. 1987. A proposed model of monensin action in inhibiting rumen bacterial growth: effects on ion flux and protonmotive force. Journal of Animal Science, 64: 1519-1525

- Russell J.B., Strobel H.J. 1988. Effects of additives on *in vitro* ruminal fermentation: a comparison of monensin and bacitracin, another Gram-positive antibiotic. *Journal of Animal Science*, 66: 552-558
- Russell J.B., Strobel H.J., Chen G. 1988. The enrichment and isolation of a ruminal bacterium with a very high specific activity of ammonia production. *Applied and Environmental Microbiology*, 54: 872-877
- Russell J.B., Strobel H.J. 1989. Effect of ionophores on ruminal fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 55:1-6
- Russell J.B. 1996. Mechanisms of ionophore action in ruminal bacteria. V: Scientific Update on Rumensin / Tylan / Micotil for the Professional Feedlot Consultant. Indianapolis, IN, Elanco Animal Health: E1-E18
- Russell J.B. 2002. Rumen Microbiology and Its Role in Ruminant Nutrition. New York, Ithaca, Russell J.B. Publishing Co.: 121 str.
- Russell J.B., Houlihan A.J. 2003. Ionophore resistance of ruminal bacteria and its potential impact on human health. *FEMS Microbiology Reviews*, 27: 65-74
- Rychlik J.L., Russell J.B. 2002. The adaptation and resistance of *Clostridium aminophilum* F to the butyryvibriocin-like substance of *Butyrvibrio fibrisolvens* JL5 and monensin. *FEMS Microbiology Letters*, 209: 93-98
- SCAN. 1998. Opinion of the Scientific Committee for Animal Nutrition (SCAN) on the immediate and long-term risk to the value of streptogramins in human medicine posed by the use of virginiamycin as an animal growth promotor. Luxemburg, Office for EC Publications.  
[http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scan/out14\\_en.html](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scan/out14_en.html) (16. maj 2007)
- Schelling G.T. 1984. Monensin mode of action in the rumen. *Journal of Animal Science*, 58: 1518-1527
- Schwab C.G. 1995. Protected proteins and amino acids for ruminants. V: Biotechnology in Animal Feeds and Animal Feeding. Wallace R.J., Chesson A. (eds.). New York, VCH Publishers: 115-141
- Senese F. 2007. What is pH? General Chemistry online (6. mar. 2007)  
<http://antoine.frostburg.edu/chem/senese/101/acidbase/faq/what-is-pH.shtml> (30. mar. 2007)
- Sewell G.W., Aldrich H.E., Williams D., Mannarelli B., Wilkie A., Hespell R.B., Smith P.H., Ingram L.O. 1988. Isolation and characterisation of xylan- degrading strains of *Butyrvibrio fibrisolvens* from a Napier grass-fed anaerobic digester. *Applied and Environmental Microbiology*, 54: 1085-1090
- Sheppard N., Willis H.A., Rigg J.C. 1985. Names, symbols, definitions and units of quantities in optical spectroscopy. *Pure and Applied Chemistry*, 57: 105-120
- Shoemaker N.B., Vlamicis H., Hayes K., Salyers A.A. 2001. Evidence for Extensive Resistance Gene Transfer among *Bacteroides* spp. and among *Bacteroides* and Other Genera in the Human Colon. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 561-568
- Slyter L.L. 1976. Influence of acidosis on rumen function. *Journal of Animal Science*, 43: 910-929

- Slyter L.L. 1979. Monensin and dichloracetamide influences on methane and volatile fatty acid production by rumen bacteria *in vivo*. Applied and Environmental Microbiology, 37: 283-288
- Starnes S.R., Spears J.W. Froetschel M.A., Croom W.J. 1984. Influence of monensin and lasalocid on mineral metabolism and ruminal urease activity in steers. Journal of Nutrition, 114: 518-525
- Stewart C.S., Duncan S.H. 1985. The effect of avoparcin on cellulolytic bacteria of the ovine rumen. Journal of Genetic Microbiology, 131: 427-435
- Stewart C.S., Duncan S.H., Joblin K.N. 1987. Antibiotic manipulation of rumen microflora. The effects of avoparcin and monensin on the release of tritium from labeled cellulose by *Bacteroides succinogenes* in the rumen fungus *Neocallimastix frontalis*. V: Recent advances in anaerobic bacteriology. Borriello S.P., Hardie J.M. (eds.). Dordrecht, Martinus Nijhoff Publishers: 108-119
- Stewart C.S., Duncan S.H., McPherson C.A. Richardson A.J., Flint H.J. 1990. The implications of the loss and regain of cotton-degrading activity for the degradation of rice straw by *Ruminococcus flavefaciens* 007. Journal of Applied Bacteriology, 68: 349-356
- Stewart C.S., Flint H.J., Bryant M.P. 1997. The rumen bacteria. V: The rumen microbial ecosystem. 2nd edition. Hobson P.N., Stewart C.S. (eds). London, Blackie Academic & Professional, an imprint of Chapman & Hall: 10-72
- Tedeschi L.O., Fox D.G., Tylutki T.P. 2003. Potential Environmental Benefits of Ionophorus in Ruminant Diets. Journal of Environmental Quality, 32: 1591-1602
- Thornton J.H., Owens F.N. 1981. Monensin supplementation and *in vivo* methane production by steers. Journal of Animal Science, 52: 628-634
- Thurston B., Dawson K.A., Strobel H.J. 1993. Cellobiose versus glucose utilization by the ruminal bacterium *Ruminococcus albus*. Applied and Environmental Microbiology, 59: 2631-2637
- Treacher R.J., Hunt C.W. 1996. Recent developments in feed enzymes for ruminants. V: Proceedings of the Pacific Northwest Nutrition Conference, Seattle, WA.
- Tucker W.B., Hogue J.F., Aslam M. 1992. A buffer value index to evaluate effects of buffers on ruminal milieu in cows fed high or low concentrate, silage or hay diets. Journal of Dairy Science, 75: 811-819
- Van Nevel C.J., Demeyer D.I. 1977. Effect of monensin on rumen metabolism *in vitro*. Applied and Environmental Microbiology, 34: 251-257
- Van Nevel C.J., Demeyer D.I. 1988. Manipulation of rumen fermentation. V: The Rumen Microbial Ecosystem. Hobson P.N. (ed.). New York, Elsevier Applied Science: 387-443
- Van Nevel C.J. 1991. Modification of rumen fermentation by the use of additives. V: Rumen Microbial Metabolism and Ruminant Digestion. Jouany J. P. (ed.). Paris, INRA Editions: 263-280
- Varel V.H., Dehority B.A. 1989. Cellulolytic bacteria and protozoa from bison, cattle-bison hybrids, and cattle fed three alfalfa-corn diets. Applied and Environmental Microbiology, 55: 148-153

- Wallace R.J., Cotta M.A. 1988. Metabolism of nitrogen – containing compounds. V: The rumen microbial ecosystem. Hobson P.N. (ed.). London, Elsevier Applied Science: 217-250
- Wallace R.J., McKain N., Broderick G.A. 1993. Breakdown of different peptides by *Prevotella (Bacteroides) ruminicola* and mixed microorganisms from the sheep rumen. Current Microbiology, 26: 333-336
- Wallace R.J., Arthaud L., Newbold C.J. 1994. Influence of *Yucca schidigera* extract on ruminal ammonia concentrations and ruminal microorganisms. Applied and Environmental Microbiology, 60: 1762-1767
- Wedegaertner T.C., Johnson D.E. 1983. Monensin effects on digestibility, methanogenesis and heat increment of a cracked corn-silage diet fed to steers. Journal of Animal Science, 57: 168-177
- Westley J.W. 1983. Notation and classification. V: Polyether Antibiotics. Westley J.W. (ed.). New York, Marcel Dekker, Inc.: 1-20
- Whetstone H.D., Davis C.L., Bryant M.P. 1981. Effect of monensin on breakdown of protein by ruminal microorganisms *in vitro*. Journal of Animal Science, 53: 803-809
- Wolin M.J. 1960. A theoretical rumen fermentation balance. Journal of Dairy Science, 43: 1452-1459
- Wolin M.J., Miller T.L., Stewart C.S. 1997. Microbe-microbe interactions. V: The rumen microbial ecosystem. 2nd edition. Hobson P.N., Stewart C.S. (eds). London, Blackie Academic & Professional, an imprint of Chapman & Hall: 467-491
- Wood C., Knipmeyer C.K. 1998. Global Climate Change and Environmental Stewardship by Ruminant Livestock Producers. Agricultural Education, University of Missouri.  
[www.epa.gov/methane/pdfs/ffa.pdf](http://www.epa.gov/methane/pdfs/ffa.pdf) (7. feb. 2007)
- Yang C.M. J., Russell J.B. 1993a. Effect of monensin on the specific activity of ammonia production and disappearance of amino nitrogen from the rumen. Applied and Environmental Microbiology, 59: 3250-3254
- Yang C.M.J., Russell J.B. 1993b. The effect of monensin supplementation on ruminal ammonia accumulation *in vivo* and the numbers of amino acid-fermenting bacteria. Journal of Animal Science, 71: 3470-3476
- Yang C.M.J., Russell J.B. 1993c. Effect of monensin on the specific activity of ammonia production by ruminal bacteria and disappearance of amino nitrogen from the rumen. Applied and Environmental Microbiology, 59: 3250
- Žgajnar J. 1990. Prehrana in krmljenje goved. Ljubljana, Kmečki glas: 564 str.

## ZAHVALA

Svojo zahvalo namenjam ljudem, ki so s svojim sodelovanjem neposredno ali posredno pripomogli k nastanku pričujočega dela.

Mentorju prof.dr. Gorazdu Avguštinu za strokovne nasvete in pregled dela, prof.dr. Janezu Salobirju za recenzijo in prof.dr. Juriju Poharju za kritično presojo diplomske naloge, vsem skupaj pa za čas in trud, ki so mi ju naklonili. Darji Ferme za optimizem, pomoč in dobro voljo v času laboratorijskega poskusa. Družini in prijateljem za dobro voljo in razumevanje. Primož, tebi pa za podporo in pomoč ter vzpodbudo tudi med študijem ter za dar tvojega nasmeha, za twoje potrpljenje, za twojo vztrajno ljubezen.

## PRILOGE

Priloga A:  
Preglednica OD (654 nm) za rastne krivulje

	<i>Ruminococcus albus 20455</i>		<i>Ruminococcus flavefaciens 007 S/6</i>		<i>Prevotella ruminicola 23<sup>T</sup></i>		<i>Fibrobacter succinogenes S85</i>		<i>Butyrivibrio fibrisolvens 3071<sup>T</sup></i>		<i>Prevotella bryantii B14<sup>T</sup></i>	
16h kultura - INOKULUM	0,840		0,766		0,679		1,503		1,571		1,767	
starost kulture(h)	P1	P2	P1	P2	P1	P2	P1	P2	P1	P2	P1	P2
0	0,030	0,015	0,078	0,025	0,015	0,042	0,019	0,045	0,041	0,023	0,113	0,080
2	0,062	0,054	0,057	0,027	0,047	0,067	0,125	0,135	0,147	0,123	0,242	0,233
3	0,152	0,150	0,118	0,058	0,088	0,114	0,341	0,374	0,313	0,299	0,506	0,518
4	0,323	0,294	0,130	0,087	0,160	0,187	0,772	0,810	0,636	0,649	1,075	1,115
5	0,590	0,546	0,189	0,141	0,260	0,288	1,085	1,119	1,087	1,042	1,574	1,567
6	0,849	0,872	0,273	0,225	0,369	0,416	1,268	1,278	1,534	1,549	1,726	1,733
7	0,859	0,877	0,428	0,369	0,492	0,550	1,405	1,444	1,596	1,560	1,785	1,789
8	0,860	0,878	0,554	0,493	0,625	0,672	1,555	1,568	1,568	1,560	1,798	1,776
9	0,877	0,879	0,697	0,649	0,741	0,810	1,424	1,471	1,659	1,682	1,798	1,793
10	0,891	0,998	0,863	0,812	0,902	0,932	1,432	1,427	1,683	1,711	1,807	1,809
11	0,872	0,889	0,937	0,882	0,995	1,043	1,327	1,390	1,671	1,708	1,795	1,799
12	0,871	0,893	0,998	0,962	1,081	1,140	1,298	1,325	1,701	1,712	1,792	1,775
13	0,877	0,889	1,044	1,006	1,170	1,201	1,276	1,285	1,716	1,733	1,798	1,782
14	0,868	0,877	1,085	1,031	1,235	1,282	1,255	1,269	1,716	1,739	1,796	1,796
15	0,865	0,880	1,050	1,019	1,279	1,318	1,242	1,252	1,705	1,718	1,789	1,793
16	0,882	0,885	1,049	1,024	1,325	1,368	1,241	1,255	1,677	1,725	1,809	1,784
17	0,881	0,876	1,034	1,014	1,355	1,394	1,240	1,253	1,647	1,690	1,812	1,806
18	0,861	0,876	1,023	0,985	1,362	1,408	1,211	1,252	1,616	1,646	1,802	1,794
19	0,869	0,870	1,023	0,987	1,382	1,420	1,220	1,193	1,600	1,608	1,811	1,804
20	0,863	0,862	1,020	0,979	1,391	1,431	1,229	1,254	1,573	1,594	1,826	1,809
21	0,853	0,861	1,009	0,973	1,383	1,424	1,218	1,249	1,560	1,566	1,825	1,806
26	0,856	0,855	0,927	0,937	1,414	1,445	1,225	1,260	1,514	1,532	1,887	1,865
27	0,860	0,853	0,966	0,918	1,405	1,439	1,236	1,251	1,508	1,531	1,879	1,842