

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Matej MALNERŠIČ

**VPLIV CINAMALDEHIDA IN MONENZINA NA RAST
IZBRANIH VAMPNIH BAKTERIJ**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Matej MALNERŠIČ

**VPLIV CINAMALDEHIDA IN MONENZINA NA RAST IZBRANIH
VAMPNIH BAKTERIJ**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**EFFECT OF CINNAMALDEHYDE AND MONENSIN ON GROWTH
OF SELECTED RUMEN BACTERIA**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo v laboratorijih Katedre za mikrobiologijo in mikrobiološko biotehnologijo na Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Po sklepu Študijske komisije univerzitetnega študija mikrobiologije je bil za mentorja diplomskega dela imenovan prof. dr. Gorazd Avguštin, za recenzentko pa prof. dr. Romana Marinšek Logar.

Mentor: prof. dr. Gorazd Avguštin

Reczenzenka: prof dr. Romana Marinšek Logar

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Ines Mandić – Mulec
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

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

Članica: prof. dr. Romana Marinšek Logar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Matej Malneršič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.22:577.181:547.9:636.2.085(043)=163.6
KG	vampne bakterije/protimikrobine učinkovine/ rastlinski izvlečki /cinamaldehid/monenzin/ krmni antibiotiki/bakterijski sevi/ / <i>Prevotella</i> /minimalna inhibitorna koncentracija
AV	MALNERŠIČ, Matej
SA	AVGUŠTIN, Gorazd (mentor)/MARINŠEK LOGAR, Romana (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2010
IN	VPLIV CINAMALDEHIDA IN MONENZINA NA RAST IZBRANIH VAMPNIH BAKTERIJ
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XIII, 87 str., 10 pregl., 31 sl., 4 pril., 154 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Po prepovedi uporabe krmnih antibiotikov v EU raziskovalci pospešeno iščejo nadomestke, med drugim tudi med rastlinskimi metaboliti. Ker v večini primerov še ne poznamo mehanizmov delovanja le-teh, smo poskušali ugotoviti, kakšen je vpliv cinamaldehida na vampne bakterije v primerjavi z vplivom krmnega antibiotika monenzina. V prvem delu smo pri sevih šestih izbranih vrst (<i>Prevotella bryantii</i> , <i>Prevotella ruminicola</i> , <i>Ruminococcus flavefaciens</i> , <i>Ruminococcus albus</i> , <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> in <i>Fibrobacter succinogenes</i>) ugotovili, da rast teh sevov v mikrotitrskih ploščah v anaerobni komori primerljiva z rastjo v Hungatovih epruvetah. Pri vseh sevih smo odkrili dobro korelacijo med motnostjo in številom celic v kulturah, a ugotovili, da za podroben opis rasti preučevanih sevov ne zadostuje posamezen podatek, ampak šele kombinacija več izmerjenih parametrov med rastjo. V nadaljevanju smo preučevali vpliv monenzina in cinamaldehida na rast tipskih sevov vrst <i>P. ruminicola</i> in <i>P. bryantii</i> . Določili smo koncentracijo IC ₅₀ in koncentracijo pri kateri je še zaznavna rast teh sevov za obe učinkovini. Ugotovili smo, da oba seva za monenzin kažejo od koncentracije odvisen odgovor, za cinamaldehid pa le sev 23 vrste <i>P. ruminicola</i> . Monenzin zavre rast obej sevov pri nižji koncentraciji kot cinamaldehid. Na obe učinkovini je bolj odporen sev <i>P.bryantii</i> B14. Na koncu smo pri omenjenih koncentracijah in v treh rastnih fazah merili motnost kulture, število celic, velikost celic in količino celičnih beljakovin. Opazili smo različen učinek monenzina in cinamaldehida. Pri obeh učinkovinah pa smo opazili pojav povečanih celic, kar kaže, da obe neposredno ali posredno delujeta na delitev bakterij.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
 DC UDC 579.22:577.181:547.9:636.2.085(043)=163.6
 CX rumen bacteria/antimicrobials/plant extracts/cinnamaldehyde/monensin/ feed antibiotics/bacterial strains/*Prevotella*/minimal inhibitory concentration
 AU MALNERŠIČ, Matej
 AA AVGUŠTIN, Gorazd (supervisor)/MARINŠEK LOGAR, Romana (reviewer)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmenal Programme in Microbiology
 PY 2010
 TI EFFECT OF CINNAMALDEHYDE AND MONENSIN ON GROWTH OF SELECTED RUMEN BACTERIA
 DT Graduation thesis (University studies)
 NO XIII, 87 p., 10 tab., 31 fig., 4 ann., 154 ref.
 LA sl/en
 AB Since the use of feed antibiotics was banned in EU, researchers are looking for substitutes, also among plant metabolites. The mechanism of action of these substances is not known in most cases, therefore we tried to elucidate the effects of cinnamaldehyde on rumen bacteria and to compared them with the effects of feed antibiotic monensin. During the first part of our work we found out that the growth of the six strains of selected rumen bacteria (*Prevotella bryantii*, *Prevotella ruminicola*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, *Butyrivibrio fibrisolvens* and *Fibrobacter succinogenes*) in microtiter plates was comparable to growth in Hungate tubes. Good correllation between turbidity of the culture and cell numbers was determined for all six strains, however, several and not single parameter must be followed in order to describe the growth accurately. Subsequently the effects of both substances on type strains of *P. ruminicola* and *P. bryanti* were investigated. The IC₅₀ concentration and the highest concentration that still allowed growth of both strains were determined for both substances. Both strains were found to exhibit concentration dependant growth with monensin. With cinnamaldehyde, the concentration dependant growth was observed only in *P. ruminicola* 23. Monensin inhibits growth at lower concentrations in both strains. Strain *P. bryantii* B₁4 is more resistant to both additives. Enlarged cells were observed in both cases, which might be the result of direct or indirect involvement in cell division process.

KAZALO VSEBINE

str.

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	X
KAZALO PRILOG	XII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIII

1	UVOD	1
2	PREGLED OBJAV	3
2.1	VAMPNI EKOSISTEM	3
2.2	VAMPNI MIKROORGANIZMI	5
2.2.1	Bakterije	7
2.2.1.1	Podrobnejši opis nekaterih bakterijskih vrst in rodov, ki smo jih preučevali v naši nalogi	8
2.2.1.2	Rod <i>Prevotella</i>	8
2.2.1.3	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	9
2.2.1.4	<i>Fibrobacter succinogenes</i>	10
2.2.2	Arheje	11
2.2.3	Praživali	11
2.2.4	Glive	12
2.2.5	Virusi	13
2.3	UČINKOVINE, KI VPLIVAJO NA VAMPNE MIKROORGANIZME	13
2.3.1	Monenzin ($C_{36}H_{61}O_{11}Na^+$)	16
2.3.2	Cinamaldehid (C_9H_8O)	18
3	MATERIALI IN METODE	21

3.1	MATERIAL	21
3.1.1	Sevi.....	21
3.1.2	Gojišče M2.....	22
3.1.3	Pufri in raztopine.....	23
3.1.3.1	Pufri	23
3.1.3.2	Reagenti za merjenje proteinov po Lowry-ju:.....	24
3.1.3.3	Monenzin in cinamaldehid	25
3.1.3.4	Materiali, ki smo jih uporabili v pretočni citometriji	25
3.2	METODE	26
3.2.1	Anaerobna tehnika gojenja	26
3.2.2	Spremljanje mikrobne rasti z merjenjem motnosti kultur	27
3.2.3	Pretočna citometrija.....	27
3.2.3.1	Priprava vzorcev za pretočno citometrijo.....	28
3.2.3.2	Meritev	29
3.2.4	Barvanje po Gramu.....	30
3.2.5	Mikroskopija in analiza slike	31
3.2.6	Ugotavljanje koncentracije celičnih beljakovin po Lowry-ju	32
3.2.7	Ugotavljanje minimalne inhibitorna koncantracija - MIC	32
3.2.8	Regresijska analiza.....	33
3.2.9	Uporaba Baranyi-Roberts modela za opis rasti bakterijskih sevov	34
3.2.10	Shema dela	35
4	REZULTATI	35

4.1	RAST PREUČEVANIH BAKTERIJSKIH SEVOV V GOJIŠČU M2 V MIKROTITRSKIH PLOŠČAH	36
4.1.1	Ugotavljanje razmerja med motnostjo in številom celic v vzorcih odvzetih med rastjo preučevanih sevov v gojišču M2 v mikrotitrskih ploščah	36
4.1.2	Značilnost rasti preučevanih sevov.....	43
4.2	PREUČEVANJE VPLIVA MONENZINA IN CINAMALDEHIDA NA RAST IZBRANIH BAKTERIJSKIH SEVOV, <i>P.BRYANTTI</i> B ₁₄ IN <i>P. RUMINICOLA</i> 23.....	43
4.2.1	Določanje IC₅₀ monenzina in cinamaldehida.....	43
4.2.1.1	Določanje IC ₅₀ monenzina	44
4.2.1.2	Določanje IC ₅₀ cinamaldehida.....	46
4.2.2	Ugotavljanje vpliva monenzina in cinamaldehida v koncentraciji IC₅₀ na rast preučevanih sevov.....	48
4.2.2.1	Ugotavljanje vpliva monenzina in cinamaldehida v koncentraciji IC ₅₀ na rast <i>P. ruminicola</i> 23	48
4.4.3	Velikost delcev in stranski odboj laserskega žarka v pretočnem citometru	53
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	57
5.1	RAZPRAVA	57
5.1.1	Rast preučevanih bakterijskih sevov v gojišču M2 v mikrotitrskih ploščah	57
5.1.2	Preučevanje vpliva monenzina in cinamaldehida na rast sevov <i>P. bryantii</i> B₁₄ in <i>P. ruminicola</i> 23	59
5.1.2.1	Ugotavljanje IC ₅₀ za monenzin in cinamaldehid.....	59
5.1.2.2	Analiza vpliva monenzina in cinamaldehida na rast preučevanih bakterij ...	61
5.1.2.3	Primerjava analize vpliva monenzina in cinamaldehida na velikost celic z mikroskopskim opazovanjem in merjenjem intenzitete stranskega odboja s pretočnim citometrom	64
5.2	SKLEPI	65
6	POVZETEK.....	66

7

VIRI **69****PRILOGE.....** **83**

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1	Lastnosti izbranih sevov	21
Preglednica 2	Sestavine za modificirano gojišče M2	22
Preglednica 3	Sestavine za mineralni raztopini I in II	22
Preglednica 4	Sestavine za pripravo pufra PBS pH 7,4	24
Preglednica 5	Sestavine za pripravo pufra PBS pH8	24
Preglednica 6	Reagenti za merjenje proteinov po Lowry-ju in njihova sestava	24
Preglednica 7	Monenzin in cinamaldehid	25
Preglednica 8	Lastnosti barvila SYTO 13	28
Preglednica 9	Značilnost rasti preučevanih sevov	43
Preglednica 10	Izmerjene vrednosti MON1, MON2, CIN1 in CIN2 za seva <i>P.bryantii</i> B ₁ 4 in <i>P.ruminicola</i> 23	48

KAZALO SLIK

Slika 1	Zgradba prebavnega trakta prežvekovalca (Prijejeno po Graham, 2004)	3
Slika 2	Govedo s fistulo (Jacobson, 2008)	4
Slika 3	Molekulska zgradba monenzina (Lobos, 2007).....	16
Slika 4	Mehanizem razklopa, ki ga povzroči monenzin (Callaway in sod. 2003: 45).....	18
Slika 5	Shematska slika rastline <i>Cinnamomum cassia</i> (cimetovec) (Köhler, 1887)	19
Slika 6	Cimet v prahu (lasten vir).....	19
Slika 7	Molekulska zgradba cinamaldehida oz. 3-fenil-2-propenal fenol (Calsamiglia, 2007)...	19
Slika 8	Absorpcijski in emisijski spekter barvila SYTO 13 (Invitrogen, 2010)	28
Slika 9	Primer slike razporeditve izmerjenih dogodkov na točkovnem grafu po analizi stranskega odboja svetlobe in zelene fluorescence po analizi s pretočnim citometrom .	29
Slika 10	Histogram razporeditve izmerjenih dogodkov glede na stranski odboj po analizi poskusnega vzorca s pretočnim citometrom pred in po shranjevanju vzorcev pri 4 °C.	30
Slika 11	Prikaz različnih koeficientov rasti opredeljenih z Baranyi-Roberts modelom	34
Slika 12	Shema dela.....	35
Slika 13	Shema razporeda jamic z vzorci in kontrolami na mikrotitrski plošči.....	36
Slika 14	Izmerjena motnost kulture in število celic tekom rasti seva <i>P. bryantii</i> B₁4	37
Slika 15	Izmerjena motnost kulture in število celic tekom rasti seva <i>P. ruminicola</i> 23^T	38
Slika 16	Izmerjena motnost kulture in število celic tekom rasti seva <i>R. albus</i> 20455.....	39
Slika 17	Izmerjena motnost kulture in število celic tekom rasti seva <i>R. flavefaciens</i> 007 S/6.	40
Slika 18	Izmerjena motnost kulture in število celic tekom rasti seva <i>F. succinogenes</i> S85	41
Slika 19	Izmerjena motnost kulture in število celic tekom rasti seva <i>B. fibrisolvens</i> 3071^T.....	42
Slika 20	Rastne krivulje seva <i>Prevotella ruminicola</i> 23 v gojišču M2 brez in z različnimi koncentracijami monenzina.....	44
Slika 21	Rastne krivulje seva <i>Prevotella bryantii</i> B₁4 v gojišču M2 brez in z različnimi koncentracijami monenzina.....	45
Slika 22	Rastne krivulje seva <i>Prevotella ruminicola</i> 23 v gojišču M2 brez in z različnimi koncentracijami cinamaldehida	46
Slika 23	Rastne krivulje seva <i>Prevotella bryantii</i> B₁4 v gojišču M2 brez in z različnimi koncentracijami cinamaldehida	47
Slika 24	Prikaz izmerjene koncentracije in ploščine celic seva <i>P. ruminicola</i> 23 v treh fazah rasti v gojišču M2 z dodanim monenzinom oz. cinamaldehidom v dveh koncentracijah.....	49
Slika 25	Prikaz izmerjene motnosti in količine celičnih beljakovin seva <i>P. ruminicola</i> 23 v treh fazah rasti v gojišču M2 z dodanim monenzinom oz. cinamaldehidom v dveh koncentracijah.....	50
Slika 26	Prikaz izmerjene koncentracije in ploščine celic seva <i>P. bryantii</i> B₁4 v treh fazah rasti v gojišču M2 z dodanim monenzinom oz. cinamaldehidom v dveh koncentracijah	51
Slika 27	Prikaz izmerjene optične gostote in količine celičnih beljakovin seva <i>P. bryantii</i> B₁4 v treh fazah rasti v gojišču M2 z dodanim monenzinom oz. cinamaldehidom v dveh koncentracijah	52

Slika 28	Mikroskopski posnetek po Gramu barvanih celic <i>P. bryantii</i> B ₁ 4 po rasti v gojišču M2 z ali brez monenzina v koncentraciji MON2 v času T3 pri 1000X povečavi.....	53
Slika 29	Prikaz jakosti stranskega odboja in ploščine seva <i>P.bryantii</i> B ₁ 4 v treh fazah rasti v gojišču M2	54
Slika 30	Prikaz jakosti stranskega odboja in ploščine seva <i>P.bryantii</i> B ₁ 4 v času T2 v gojišču M2 brez in z doatkom monenzina v dveh koncentracijah.....	54
Slika 31	Prikaz jakosti stranskega odboja (temno zeleni stolpci) in ploščino (svetlo zeleni stolpci) seva <i>P.bryantii</i> B ₁ 4 v času T2 v gojišču M2 brez in z doatkom monenzina v dveh koncentracijah.....	55

KAZALO PRILOG

- Priloga A Preglednica motnosti kultur (OD) in števila celic glede na pretočni citometer za šest sevov
- Priloga B Preglednica štirih merjenih parametrov (število celic na mililiter kulture, ploščina celic, motnost kulture in količina celičnih beljakovin po Lowryju) za sev *Prevotella ruminicola* 23
- Priloga C Preglednica štirih merjenih parametrov (število celic na mililiter kulture, ploščina celic, motnost kulture in količina celičnih beljakovin po Lowryju) za sev *Prevotella bryantii* B₁4
- Priloga D Stranski odboji seva *P. bryantii* B₁4 v gojišču M2 brez dodatka v treh izbranih časih in v gojišču z dodatkom monenzina oz. cinamaldehida v času T2 v primerjavi s kontrolo

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

BF	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>
CIN	cinamaldehid (izvleček cimeta)
(r)DNK	(ribosomska) deoksiribonukleinska kislina
FL1	oznaka kanala pretočnega citometra, ki meri zeleno flourescenco (530 ± 30 nm)
FS	<i>Fibrobacter succinogenes</i>
G+C	gvanozin in citozin
IC ₅₀	koncentracija snovi, ki razpolovi najvišjo doseženo motnost kulture
mg/l	miligram na liter
ml	mililiter (10^{-3} litra)
mM	milimol (10^{-3} mol)
MON	monenzin
nm	nanometer (10^{-9} metra)
OD	optična gostota (optical density) ali motnost
PB	<i>Prevotella bryantii</i>
PC	pretočna citometrija
PR	<i>Prevotella ruminicola</i>
R ²	koeficient korelacije (0-1; 0 - popolno neujemanje, 1 - popolno ujemanje)
RA	<i>Ruminococcus albus</i>
RF	<i>Ruminococcus flavefaciens</i>
SD	standardna deviacija
SSC	stranski odboj svetlobe
ut.%	utežni odstotek [w/v]
µl	mikroliter
µmol	mikromol (10^{-6} mol)

1 UVOD

V zadnjem obdobju smo bili priča številnim spremembam na področju krmnih dodatkov, ki se s pridom uporablajo predvsem v okviru tehnološko visoko razvite reje živali. Na to je vplivala uredba Evropske unije, ki je s 1.1.2006 prepovedala uporabo še zadnjega t.i. krmnega antibiotika, predvsem zaradi možnega raznosa rezistenc in pojava navzkrižne odpornosti. Ker so raziskave pokazale, da se npr. pri reji prašičev cena prieje dvigne tudi do 10% po prenehanju uporabe krmnih antibiotikov, so raziskovalci, še zlasti v EU pričeli iskati možne alternative. V skupini rastlinskih metabolitov so prepoznali mnoge, ki bi jih lahko s pridom uporabljali, je pa mehanizem delovanja teh snovi praviloma nepoznan, predvsem, ko gre za vpliv na mikroorganizme v prebavnem traktu živali, ki so tudi primarna tarča takšnih učinkovin.

V naši nalogi smo se osredotočili na preučevanje cinamaldehida, ki ga pridobivajo iz skorje in listov nam dobro poznanega drevesa cimetovca. Zanimal nas je vpliv te snovi na seve izbranih bakterijskih vrst iz vampa goveda v primerjavi z vplivom najpogosteje uporabljanega krmnega antibiotika, monezina.

V prvem delu naše naloge smo se nameravali osredotočiti na izbiro primernih sevov vamnih bakterij za naš poskus. Tako smo žeeli v raziskavo vključiti predstavnike po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih vrst, in tudi takšnega, ki se barva po Gramu negativno, a taksonomsko sodi med po Gramu pozitivne bakterije. Seve smo izbrali tudi glede na njihove metabolne značilnosti in funkcije, ki jih v vamu opravlja, npr. tvorbo vodika v fermentacijskih procesih. Da bi lahko izvedli poskus z dokaj velikim številom vzorcev, smo nameravali preveriti ali lahko uporabimo metode, ki takšno delo omogočajo, npr. gojenje v mikrotitrskih ploščah v anaerobni komori in ugotavljanje števila celic s pretočnim citometrom.

V nadaljevanju dela smo nameravali na izbranih sevih opazovati učinke preučevanih snovi. Opazovanja smo žeeli omejiti na štiri lastnosti, ki vsaka na svoj način opisujejo predvsem rast: motnost kulture, število celic na volumen, površino celic in količino celičnih beljakovin. Žeeli smo ugotoviti ali lahko z izbranimi parametri odkrijemo podobnosti oz.

razlike v delovanju cinamaldehida in monenzina na izbrane seve in/ali obstajajo razlike v odpornosti oz. občutljivosti sevov na preučavane učinkovine

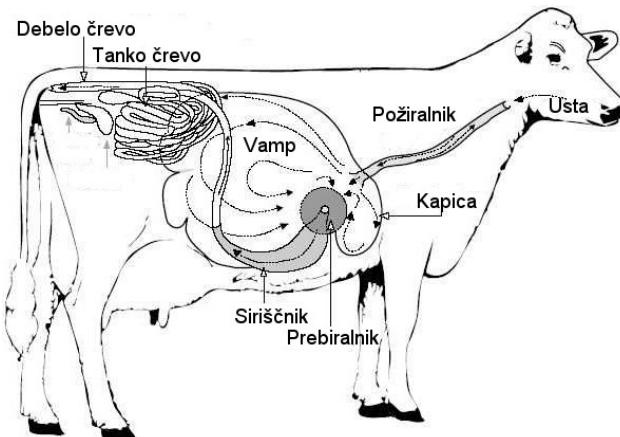
V skladu z zapisanim smo pred izvedbo diplomskega dela postavili naslednje hipoteze:

- Predpostavljeni smo, da bo rast izbranih vampnih bakterij v gojišču M2 v mikrotitrskih ploščah dovolj dobra, da bomo lahko izvedli primerljive poskuse, kot se običajno izvajajo v Hungate-ovih epruvetah, vendar z večjim številom vzorcev in ponovitev ter bolj pogostimi meritvami
- Da bomo z uporabljenimi meritvami (motnosti kulture, števila celic, količine mikrobnih beljakovin in površine celic) lahko odkrili podobnosti oz. razlike v delovanju cinamaldehida in monenzina na izbrane seve
- Da razlike v občutljivosti oz. odpornosti sevov na preučevane učinkovine obstajajo in da jih bomo lahko z izbranimi meritvami dokazali

2 PREGLED OBJAV

2.1 VAMPNI EKOSISTEM

Pri nekaterih rastlinojedih živalih so se med evolucijo deli prebavnega trakta močno povečali in omogočili nastanek okolja še posebno primernega za rast in razvoj striktno anaerobnih mikrobov in daljše zadrževanje zaužite hrane (Hobson, 1997). Na ta način si je gostiteljska žival simbiozo, ki se je pojavljala že pred tem, še bolj prilagodila v smeri izkoriščanja produktov mikrobnega metabolizma, ki temelji predvsem na izkoriščanju kompleksnih sladkorjev v krmi in na pretvorbi le-teh v gostiteljski živali dostopne molekule. Pri nekaterih rastlinojedih, t.j. prežvekovalcih, je povečani del prebavnega trakta pred želodcem. Izoblikovali so se prebavni organi (slika 1): kapica, vamp, prebiralnik in siriščnik vsak s svojo posebno funkcijo (Nickel, 1960). Med temi je vamp največji. Pri drugih rastlinojedih je ključno mesto mikrobne prebave šele za želodcem in tankim črevesom. Bolj učinkovit in z mikrobiološke plati bolj preučen od obeh sistemov je vamp. K temu največ prispeva enostavnost vzorčenja (možno skozi usta ali vstavljeni fistulo (slika 2) in velikost vampa, ki zmanjuje vpliv na mikrobioto ob vzorčenju. Pomemben razlog za preučevanje mikroorganizmov vampa prežvekovalcev je tudi njihova pomembna vloga, ker za svoje gostitelje malo vreden rastlinski material pretvarjajo v hrano.



Slika 1: Zgradba prebavnega trakta prežvekovalca (Graham, 2004)



Slika 2: Govedo s fistulo (Jacobson, 2008)

Že v 19. stol so mikrobiologi opazovali različne bakterije, praživali in ugotavljalji prisotnost lahkoklapnih maščobnih kislin v vampu (Tappeiner, 1884). Pred dobrimi 60-imi leti pa so prvič opisali mehanizme in interakcije, ki potekajo v vampu in med vsebino vampa in gostiteljem (Barcroft in sod., 1944). Potreben je bil še razvoj anaerobne tehnike (Hungate, 1950), ki je omogočala gojenje vampnih mikroorganizmov v laboratoriju. Od takrat so bile opravljene številne raziskave na področju mikrobiologije in biokemije vampa ter prehrane prežvekovalcev.

Pri odrasli kravi je volumen vampa med 100 in 150 litri, ki tako zapolnjuje velik del telesne votline. Vamp novorojene govedi je še majhen in nima naseljene mikrobiote, ki bi zagotovila razgradnjo kompleksnih sladkorjev v krmi. Razgradnja krme v tej fazи poteka s pomočjo kislin in encimov v siriščniku (analog želodca). Vamp med razvojem živali pridobi končno obliko, viri mikroorganizmov pa so poleg materinega mleka še okuženi delčki rastlin, ki zaidejo v prebavila mladiča preko matere ali okolja. Pojavijo se prve fermentacije, katerih produkti spodbudijo razvoj vampa in vnos trde hrane. Razmere v vampu v tem obdobju še niso povsem prilagojene rasti in razvoju vampnih mikroorganizmov, zato je ključen stalni vnos le-teh. Vir mikrobov je lahko tudi slina matere in iztrebki ostalih živali v skupini, kakor tudi kontaminante v hrani. Mikroorganizmi se znotraj skupine živali hitro prenašajo. Vsi organizmi pa niso sposobni zadrževanja v vampu, nekateri se zadržijo v vampu le prehodno. S spremenjanjem razmer v vampu poskušamo doseči dinamično ravnovesje populacije vampa. Opravljeni so bili tudi poskusi z umetnim vnosom mikrobov, s čimer naj bi prilagodili populacijo vampa na vnos

določene krme (Ghorbani in sod., 2002). Vendar se je pri večini poskusov s probiotiki izkazalo, da ti le malo ali sploh ne vplivajo na procese v vampu (Hillman in sod., 1995).

Sam proces prebave se začne s pašo na različnih travah, nizkorastočih rastlinah, le redko na listju grmičevja in drevja. Živali požirajo večje dele hrane, skupaj z velikim volumnom slino, katere izločanje je stimulirano ob hranjenju. Nastale "kepe" hrane, se nadalje razgradijo kasneje, ko se premaknejo iz vampa s pomočjo krčenja mišic nazaj v usta. Tu se kepe prezvečijo (zato prezvekovlci), kar ne samo razdrobi velike delce ampak tudi premeša hrano s slino in mikrobi, ki so se pritrdirili v vampu (Schalk in Amadon, 1928). Sedaj se lahko začne prava razgradnja. Vampni mikrobi razgrajujo rastlinske polisaharide (celuloza, hemiceluloza, škrob,...) v dimerne in monomerne sladkorje, ki jih nato fermentirajo. Končni produkti metabolizma vampne mikrobiote so ocetna, maslena in propionska kislina, metan in ogljikov dioksid. Pline žival izrige, kisline pa se absorbirajo skozi steno vampa v kri, kjer služijo kot vir energije za gostiteljsko žival. Maščobe v krmu se hidrolizirajo v dolgoverižne maščobne kisline (če so nenasocene se najprej hidrogenirajo), ki se absorbirajo v tankem črevesju. Proteini so hidrolizirani v aminokisline in peptide, končni produkti pa so maščobne kisline in amoniak. Mikrobne beljakovine se v siriščniku razgradijo z gostiteljskimi encimi in predstavljajo vir aminokislin za gostitelja (Hobson, 1997). Omeniti moramo tudi proces razstrupljanja fitotoksinov in mikrotoksinov, s čimer mikrobi v vampu ščitijo gostiteljsko žival pred nevarnimi snovmi v prehrani (Mackie in sod., 2001).

Na grobo lahko dogajanje v vampu opišemo kot skupek metabolnih procesov mikroorganizmov, ki omogoča pretvorbo neprebavljivih rastlinskih delov v za gostiteljsko žival izrabljive snovi. Zato je poznavanje in možnosti modifikacije procesov vampnih mikroorganizmov tako pomembno.

2.2 VAMPNI MIKROORGANIZMI

Za okolja, kjer prevladujejo počasi rastoči in/ali specializirani mikroorganizmi, je znano, da lahko uspešno izoliramo in gojimo le majhen del celotne populacije (Amann in sod.,

1995). Vamp pa je okolje, skozi katerega poteka stalen pretok krme in s tem hranil za vampne mikroorganizme. Da lahko mikroorganizmi preživijo v takem okolju je potrebna visoka hitrost rasti. Dinamično okolje pomeni tudi zelo spremenljive razmere. Tako okolje v laboratoriju težko posnemamo, tudi zato so opisani odstotki uspešno gojenih sevov zelo različni. Leedle in sod. (1982) so v poskusu uspeli gojiti 14 % do 74 % mikroorganizmov glede na direktno štetje z mikroskopom. Odstotek se je spremenjal glede na vrsto krme in čas med hranjenjem in odvzemom vzorca. Šele z uporabo molekularnih tehnik so se približali dejanskemu številu vrst v vamu. Iz primerjave zaporedij ribosomskih genov znanih vampnih bakterij in vseh sekvenc pridobljenih iz vampa, so ugotovili, da je bilo do sedaj le 11 % vrst tudi gojenih (Edwards in sod., 2004). Nizek odstotek pripisujejo pogosti sintrofiji v tem okolju in nepopolnim tehnikam gojenja (ustrezno gojišče in anoksične razmere). Hitro lahko tudi spregledamo maloštevilne organizme v bogati združbi ali pa ne uspemo ločiti mikrobov od neživega materiala v vamu.

Gojišča, ki jih običajno uporabljamo za gojenje vampnih bakterij, posnemajo okolje v vamu. Nekatera vsebujejo visoke koncentracije sladkorja, kvasnega ekstrakta in proteinskih hidrolizatov, s čimer naj bi dosegli hitro okrevanje in rast mikrobov po prenosu v laboratorij. Te razmere pa se močno razlikujejo od naravnih. Tudi ob uporabi prečiščenega vampnega soka dobimo spremenljive rezultate, predvsem glede na pripravo (Grubb in Dehority, 1976). Torej, zaradi nepredvidljivih vplivov okolja in prisotnosti prehodnih sevov, še nekaj časa ne bomo mogli odgovoriti na vprašanje: "Koliko vrst živi v vamnem ekosistemu?".

Tudi gostota različnih skupin vampnih mikrobov se razlikuje od primera do primera: do 10^{11} bakterij /ml (okoli 200 vrst), 10^7 - 10^9 metanogenih arhej/ml, 10^4 - 10^6 praživali /ml (25 vrst), in 10^2 - 10^4 gliv /ml (Klieve in Bauchop, 1988; Hobson in Stewart, 1997; Mackie in sod., 2001). Omeniti moramo še viruse oziroma bakteriofage (10^7 - 10^9 virusov/ml), ki jim priznavajo vse bolj pomembno vlogo v uravnavanju števila mikroorganizmov v ekosistemih (Breitbart in Rohwer, 2005). Pravzaprav prihaja do interakcij prav med vsemi vampnimi mikroorganizmi npr. glive izločajo antibiotike, praživali se prehranjujejo z bakterijami,...

2.2.1 Bakterije

Vampne bakterije merijo od 0,5 do 10 μm in se pojavljajo v oblikah kokov, kokobacilov, spiral, vibrijev in palčk. V vampu prežvekovalca, ki uživa krmo bogato z vlakninami, prevladujejo Gram negativne bakterije. V primeru koncentrirane krme (bogate z enostavnimi sladkorji) pa Gram pozitivne bakterije (Stewart in sod., 1997).

Sprva so razvrščali izolate v vrste glede na gramsko barvanje, morfologijo, gibljivost, zmožnost fermentacije različnih substratov, glavne in stranske produkte fermentacije kot tudi glede na raznolikost metabolnih reakcij npr. redukcije nitrata. Že prva molekularna študija na vampnem ekosistemu je pokazala velika razhajanja med rezultati raziskav v katerih so uporabljali tradicionalne oz. molekularne tehnike (Stahl in sod., 1988). Z uporabo novih tehnik so izpodobili mnoge predhodne razvrstitve in preklasificirali številne taksone.

Van Gylswyk je leta 1990 z uporabo tradicionalnih tehnik ugotovil, da med izolati prevladuje rod *Prevotella*. Kasneje so Mackie in sodelavci (2001) večino izolatov iz vampa uvrstili med Gram pozitivne bakterije z nizko vsebnostjo gvanina in citozina (sem spadajo npr. *Ruminococcus*, *Butyrivibrio*). Druga večja skupina, kamor so uvrstili izolate, je bilo deblo CFB (*Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Bacteroides*), ki ga danes imenujemo *Bacteroidetes*, kamor spada tudi rod *Prevotella*. Ostale izolate so uvrstili v skupine proteobakterij, spirohet, fibrobaktrov in aktinobakterij. Ostalo pa je mnogo izolatov, ki niso sodili v nobeno do sedaj opisano skupino.

Z molekularnimi tehnikami je Stevenson (2007) dobil do neke mere primerljive rezultate kot Van Gylswyk (1990). Njegov poskus kvantifikacije izbranih bakterijskih populacij z verižno polimerazo v realnem času je pokazal visok delež (42 %-60 %) 16 rRNA molekul iz organizmov, ki sodijo v rod *Prevotella*, vendar so le majhen del tega (2-4 %) predstavljal že gojeni predstavniki rodu, to so vrste *P.ruminicola*, *P.bryantii* in *P.brevi*.

Vrste, ki so jih Mackie in sod.(2001) opisali kot pogoste izolate očitno predstavljajo le majhen delež vseh bakterijskih celic iz tega rodu.

2.2.1.1 Podrobnejši opis nekaterih bakterijskih vrst in rodov, ki smo jih preučevali v naši nalogi

Za potrebe naše naloge smo izbrali bakterijske vrste, ki se razlikujejo po strukturi celične ovojnice in po funkciji, ki jih opravlja v vampu.

2.2.1.2 Rod *Prevotella*

Gre za skupino, ki skupaj z do sedaj še nepoznanimi sorodniki predstavlja 40-60 % vampnih bakterij (Stevenson in sod., 2007). Predstavnike najdemo pri večini prežvekovalcev, delež pa je odvisen od vrste prehrane. Spadajo v bakterijsko deblo *Bacteroidetes*. Predstavniki skupine so bili prej vključeni v vrsto *Bacteroides ruminicola*, kasneje pa so jih prenesli v rod *Prevotella* in razdelili v več vrst (Shah in Collins, 1990; Avguštin in sod., 1997). So striktni anaerobi, Gram negativne, pleomorfne palčke ali kokobacili. Za vampni ekosistem je pomembna njihova zmožnost razgradnje in uporabe škroba in polisaharidov celičnih sten, kot sta ksilan in pektin. Celuloze ne razgrajujejo. Pomembna je tudi njihova razgradnja proteinov in fermentacija peptidov. Za rod značilna je aktivnost dipeptidilpeptidaze (DAP1) (Wallace in McKain, 1991; McKain in sod., 1992). Glavni metabolni produkti skupine so soli jantarjeve, propionske in ocetne kisline.

Štirje najpogosteje preučevani tipski sevi 23 (ATCC 19189), GA33(ATCC 19188), B₁₄ in M384 so pri DNK hibridizaciji pokazali vrednosti le med 19 % in 22 % (Mannarelli in sod., 1991). To kaže, da je stara razdelitev prevotel na vrsti *P. brevis* in *P.ruminicola* neustrezna. Po analizah sekvenč 16S rDNK so uvedli dve novi vrsti, tako, da danes poznamo štiri vrste vampnih prevotel: *P.ruminicola*, *P.brevis*, *P.bryantii* in *P.albensis*.

Prevotella ruminicola je najpogosteje izoliran predstavnik rodu. Za večino sevov je značilna aktivnost karboksimetilcelulaze in ksilanaze. V gojišču brez vampnega soka rast

močno stimulira hemin. Odstotek G+C parov je od 45 % do 52 %. In v tej lastnosti se tudi najbolj razlikuje od vrste *Prevotella bryantii* (Avguštin in sod., 1994). Ta ima odstotek G+C od 39 % do 42 %.

Sol propionske kisline naj bi se tvorila po akrilatni poti (Wallnöfer in Baldwin, 1967), a poše ne čisto pojasnjениh razlogov je produkcija tega pri *P.ruminicola* odvisna od vitamina B₁₂. Prenašalci respiratorne verige vsebujejo menakinone, ki imajo kot stranske verige pripetih 11, 12 in 13 prenilnih (C3) enot (Shah in Collins, 1983). Prisotni so tudi *b* in *o* citokromi (Holdeman in sod., 1984). Sev *P.bryantii* B₁₄ potrebuje visoko koncentracijo CO₂ za optimalno rast (Howlett in sod., 1976). Skupne lastnosti rodov *Prevotella* in *Bacteroides* so prisotnost sfingolipidov, prisotnost nasičenih nerazvejanih in izo- in anteizometil razvejanih maščobnih kislin ter prisotnost encimske aktivnosti malat dehidrogenaze in glutamat dehidrogenaze (Shah in Collins, 1990).

2.2.1.3 *Butyrivibrio fibrisolvens*

Butirivibrije najdemo tako v vampu kot tudi v prebavnem traktu neprežvekovalcev. Prva sta jih opisala Bryant in Burkey leta 1953. So Gram-negativne palčke, široke 0,4-0,6 µm in dolge 2-5 µm z zoženim koncem. Lahko tvorijo verižice (Bryant in Small, 1956). Kljub temu, da se obarvajo po Gramu negativno, so ob podrobnejši analizi prepoznali tipično strukturo Gram pozitivne ovojnica (Cheng in Costerton, 1977; Hespell in sod., 1993).

Opisana je le ena vrsta iz rodu *Butyrivibrio* (*B. fibrisolvens*). Vrsta kaže veliko fiziološko raznolikost kakor tudi heterogenost dednega materiala (Mannarelli, 1988). Vsem sevom pa je skupna zmožnost fermentacije hemiceluloze/ksilana, kar je njihov glavni prispevek k razgradnji vlaknin v vampu (Krause in sod., 2003). Večina sevov je zmožna tudi razgradnje škroba in pektina (Wojciechowicz in sod., 1982; Cotta in sod., 1988). Glavni produkt fermentacij so soli maslene kisline, deleža soli ocetne kisline in mlečne kisline pa sta odvisna od seva. Običajni vir dušika je amoniak, drugi viri pa so še različni peptidi in aminokisline (Bryant in sod., 1956).

2.2.1.4 *Fibrobacter succinogenes*

Prvi je to bakterijo opisal Hungate (1950). Celice *Fibrobacter succinogenes* so debele, kokoidne do ovalne palčke s premerom od 0,8 do 1,5 µm. Ta vrsta sodi med pomembne celulolitične bakterije, ki poleg vampa naseljujejo tudi prebavila drugih živali, ki zaužijejo veliko vlaknin. Sprva so jo opredelili kot vrsto *Bacteroides succinogenes*, po odkritju odsotnosti sfingolipidov (Shah in Collins, 1983) in po analizi genov za 16S rRNA (Paster in sod., 1985) in DNA-DNA hibridizaciji (Montgomery in sod., 1988), pa so jih prenesli v samostojno filogenetsko deblo s predstavniki *F. intestinalis* in *F. succinogenes* (ima še dve podvrsti). Vrsti ločimo po morfologiji in potrebi po biotinu.

2.2.1.5 Rod *Ruminococcus*

Za skupino je značilna močna celulitična aktivnost in produkcija rumenega pigmenta v primeru rasti na celulozi. Sijpesteijn (1951) je prvi opisal vrsto, ki jo je imenoval *Ruminococcus flavefaciens*. Celice so negibljični koki s premerom 0,8 do 1,0 µm in se pojavljajo v parih ali kratkih verižicah. Vsi sevi fermentirajo celulozo, ksilan in celobiozo. Glavna produkta fermentacij sta soli jantarjeve kisline in ocetne kisline (Stewart in sod., 1997).

Večjega sorodnika *R. albus* s premerom od 1 do 2 µm je odkril Hungate (1957). Tudi ta se združuje v pare. Sposoben je fermentacije celuloze, celobioze in glukoze do soli mravljične in ocetne kisline, etanola, ogljikovega dioksida in vodika kot glavnih produktov. Obe vrsti kot glavni vir dušika izrabljajo amoniak (Bryant in Robinson, 1963). Značilne so tudi potrebe po razvezjanih maščobnih kislina (npr. izo-valerat in izo-maslena kislina), ogljikovem dioksidu, cistinu ali sulfidu (vir žvepla), biotinu in vitaminu B (Bryant in Robinson, 1962). Še ena od značilnosti obeh vrst je encimski kompleks celulaze vezan zunaj membrane (Pettipher in Latham, 1979). Ta kompleks omogoča vrsti hitro vezavo in naselitev rastlinskih delcev v vampu.

2.2.2 Arheje

V vampu različnih živali so doslej izolirali že 70 vrst, a od teh jim je uspelo gojiti le sedem metanogenih arhej (Jarvis, 2000; Joblin, 2005). Njihova pojavnost v vampu je spremenljiva glede na vrsto prehrane, predvsem je pomemben delež vlaknin (Kamra, 2005). Pripisujejo jim glavno vlogo izkoriščanja vodika, ki se sprošča ob fermentaciji bakterij. To po eni strani omogoča kroženje snovi (reoksidacija NADH), ki nastajajo s fermentacijo, hkrati pa povzroča izgube energije za žival (Stumm, 1982b). Izraba vodika je najverjetneje tudi vzrok za pripenjanje nekaterih arhej na entodinomorfe (praživali). Tako si zagotovijo stalen vir vodika. Ob vpihanju vodika se arheje odcepijo s površja praživali (Stumm, 1982a).

Produkt arhej je metan, eden izmed toplogrednih plinov, zato je toliko bolj v našem interesu, da bi našli način za nadzorovanje procesov metanogeneze (Kirchgessner, 1995). Značilnost arhej je edinstvena sestava membrane, kjer najdemo glicerol vezan z etrskimi vezmi na dolge verige izoprenoidnih alkoholov (De Rosa in sod., 1986).

2.2.3 Praživali

Zaradi njihove velikosti so od vampnih mikroorganizmov najprej odkrili prav praživali (Gruby in Delafond, 1843). Takrat so jih opredelili kot pomemben vir proteinov, zaradi njihove razgradnje ob izstopu iz vampa (Günther, 1899). Kasneje so ugotovili, da praživali niso nujne za preživetje živali (Becker in sod., 1930; Eadie in Gill, 1971; Veira in sod., 1983). Spoznali so ključno vlogo bakterij v vampu, vseeno pa so živali brez praživali v vampu kazale razliko v procesih vampne fermentacije in gostiteljevem izkoristku zaužite krme (Veira, 1986; Williams in Coleman, 1997; Hobson in Jouany, 1997). Vseeno jim ne pripisujemo velike vloge pri presnovi, predvsem zaradi njihovega majhnega števila v vampu. Kasneje se je izkazalo, da je to število še manjše, ko so ugotovili, da so nekateri izmed teh organizmov pravzaprav zoospore gliv (Orpin, 1975).

S pregledom predhodnih raziskav sta Williams in Coleman (1997) prišla do spoznanj, da odsotnost praživali povzroči:

- rahel dvig števila bakterij
- rahel padec učinkovitosti vampne razgradnje krme
- majhen do neopazen zastoj v rasti gostitelja

Celotna prebava krme pa ostane nespremenjena, predvidoma zaradi sprememb v številu bakterij. Vzrok za slabo poznavanje procesov, ki jih opravljamjo praživali, je zahtevnost gojenja v laboratorijskem okolju. Raziskave metabolizma praživali izvajajo na vzorcih vampa, ki jim odstranijo bakterije z antibiotiki. Tako so ugotovili, da porabljamjo topne ogljikovodike (Williams in Coleman, 1997), prebavljamjo tudi škrob (Coleman, 1986), pomembno pa je tudi njihovo požiranje bakterij (Gutierrez, 1955). Manj znana je njihova vloga pri razgradnji strukturnih ogljikovodikov in proteinov.

Na splošno jih delimo na »holotrihe« (takson, ki zajema skupine *Buetschliidae*, *Isotricha*, *Paraisotrichidae* in *Blepharocorythidae*), običkane po celotni površini, in entodinomorfe, ki so uvrščeni v red *Entodiniomorphida*. Njihova pojavnost in koncentracije v vampu so odvisne od dejavnikov, kot je geografska lokacija (Dehority in Orpin, 1992), vrsta krme, čas hranjenja (Warner, 1966) in lastnosti posamezne živali.

2.2.4 Glive

Prvi je vampne glive opazil Liebetanz (1910), le da jih je takrat poimenoval običkane praživali. Njihovo vlogo v razgradnji rastlinskih vlaken v vampu je raziskoval Orpin (1975). Temu so sledile podobne študije, ki so pripeljale do odkritja vloge gliv pri (delni) razgradnji lignina (Bauchop, 1979; Borneman in sod., 1989). Ob ustrezni prehrani živali lahko glive predstavljajo pomembne razkrojevalce rastlinskih vlaken (Akin in sod., 1983). Sprva so glivam pripisali enostaven življenjski krog, po katerem naj bi gibljiva zoospora naselila vlakno in se razvila do sporangija, ki proizvede nove spore (Orpin, 1977; Bauchop, 1981). Kasneje so odkrili vedno več oblik, ki so se izkazale za pripadnike iste vrste. Eden od pojasnil je, da glive razvijajo drugačne strukture zunaj gostitelja, ki jim omogočajo preživetje in razširjanje (Munn, 1992).

Druga posebnost gliv je njihova sposobnost razgradnje celičnih struktur, ki ščitijo rastline pred vdorom bakterij. Primer je voskast lipidni polimer kutin, ki ščiti liste in debla rastlin (Akin in Rigsby, 1987). Po razgradnji tega lahko glice prosto vstopajo v rastlino in se nadalje razširjajo z razraščanjem rizoida. Glice tvorijo apresoriju podobne strukture in vdirajo preko površine rastlin tudi s pomočjo mehanske sile (Ho in sod., 1988). Posedujejo tudi izredno učinkovite celulaze, ki razgradijo tudi kristalinično celulozo, in številne encime, ki cepijo ksilansko hrbitenico hemiceluloze (Borneman, 1993) .

Taksonomsko so uvrščene v deblo - Eumycota, poddeblo - Mastigomycotina, razred – Chytridiomycetes, red - Spizellomycetales, družina – Neocallimasticaceae. Po rodovih glice razvrstimo glede na morfologijo talusa (monocentričen ali policentričen), tip rizoida (filamentozen ali čebulast) in običkanosti zoospor (en ali več bičkov) (Trinci in sod., 1994). Rodovi anaerobnih gliv izoliranih iz vampa so: *Neocallimastix*, *Piromyces*, *Caecomyces*, *Orpinomyces*, *Anaeromyces* (*Ruminomyces*).

2.2.5 Virusi

Odkriti so bili dokaj pozno (Adams in sod., 1966). Gre za bakteriofage, katerih gostitelji so bakterije. So specifični za svoje vampne gostitelje, kar lahko izkoristimo za ciljno odstranjevanje bakterij (Klieve, 1999). S povzročanjem lize bakterij sodelujejo pri kroženju biomase v vampu. To ima pozitivne in negativne posledice za živali. Bakteriofagi se namnožijo nekaj ur po hranjenju in z lizo bakterij zmanjšajo obseg razgradnje krme, po drugi strani pa olajšajo živali dostop do bakterijskih beljakovin (Swain in sod., 1996).

2.3 UČINKOVINE, KI VPLIVAJO NA VAMPNE MIKROORGANIZME

Z naraščanjem znanja o vampnih mikroorganizmih je naraščalo tudi zanimanje za načine, ki bi omogočali neposreden vpliv na ta ekosistem. Tako so že v petdesetih letih 20. stol. spoznali, da je možno z antibiotiki povečati učinkovitost reje prežvekovalcev (Prescott,

1953). Sledili so še poskusi uporabe drugih snovi, ki bi lahko vplivali na fermentacije v vampu (Jouany, 1994). Izkoriščanje različnih t.i. vampnih modifikatorjev je bila povezana z napredkom v razumevanju metabolnih poti gostitelja in simbiontov, ki se prepletajo v vampu. Večina spojin pa ni delovala specifično, temveč na različna mesta v metabolni mreži. Tako ni možnih učinkov in smiseln razdeliti glede na mesto delovanja. Bolj smiselna je razdelitev snovi glede na učinek, saj ima več snovi podobne učinke: uravnavanje pH v vampu, inhibicija procesov (proizvodnje metana, proteoliza, peptidoliza, deaminacija), biociden/biostatski učinek, učinek rastnega faktorja...

T.i. vampne modifikatorje delimo na (Nagaraja in sod., 1997):

- ionoforne antibiotike (monenzin idr.)
- neionoforne antibiotike (avoparcin, tilozin, virginamicin idr.)
- nevtralizirajoče agense (NaHCO₃, CaCO₃, MgO, bentonit, Na-seskvikarbonat)
- inhibitorje proteolize, peptidolize in deaminacije
- metanske inhibitorje (amikloral, kloral hidrat idr.)
- rastne faktorje (vitamini, maščobne kisline, hemin idr.)
- maščobe
- mikrobne krmne dodatke in encime ter druge spojine (probiotiki, rastlinski izvlečki idr.)

Pred spremembo zakonodaje se zaradi številnih in učinkovitih antibiotikov znanost ni veliko posvečala rastlinskim izvlečkom. Od dne uvedbe (1.januar 2006) zakona o krmnih dodatkih v državah EU (Regulation No. 1831/2003, 2003), ki prepoveduje uporabo antibiotikov v krmi, pa se vse bolj raziskuje možnost uporabe rastlinskih izvlečkov, da bi prevzeli nekdanjo vlogo antibiotikov.

Najpogosteje gre za sekundarne metabolite rastlin. Ljudje že dolgo uporabljamo te spojine zaradi njihovih zdravilnih učinkov, prijetnega vonja, kot konzervirna sredstva ali kot začimbe. Te kompleksne molekule so odgovorne za lastnosti rastlin, kot je vonj, barva, okus (začimbe). Omogočajo tudi kontrolo rasti mikroorganizmov v njihovem okolju na podoben način kot antibiotiki (Gershenson in Croteau, 1991). Predvsem v zadnjih letih jih vse pogosteje uporabljamo za zatiranje patogenov v hrani in v sredstvih za osebno higieno.

Za uporabo kot alternativo klasičnim antibiotikom je vzpodbuden podatek, da je do sedaj poznan le en primer razvoja odpornosti na esencialno olje (Matasyoh in sod., 2008), običajno pa se pojavi le prilagoditev bakterij na nižje koncentracije (Ultee in sod., 2000).

Rastlinske izvlečke lahko razdelimo na tri strukturne skupine: saponini, tanini in esencialna olja. Vpliv prvih dveh na metabolizem vampa je bil obsežno raziskan, medtem ko je znanje o vplivu esencialnih olj zelo pomankljivo (Calsamiglia, 2007). Kemijsko gre za zelo pestre spojine. Gershenson in Croteau (1991) sta jih razdelila v dve skupini glede na prekurzor: terpenoidi (prekurzor je glukoza) in fenilpropanoidi (prekurzor je pentoza). Terpenoidi so prepoznavni po izoprenskih podenotah (C_5H_8). Ogrodje fenilpropanoidov pa je običajno sestavljeno iz aromatskega obroča šestih ogljikovih atomov s pripeto verigo treh ogljikovih atomov (Gershenson in Croteau, 1991).

Biološke učinke esencialnih olj deloma pripisujejo njihovi hidrofobni naravi, ki omogoča interakcije z biološkimi membranami (Griffin in sod., 1999). Znano je tudi, da so učinkovitejše oksidirane spojine (Oh in sod., 1968). Čeprav ne učinkujejo na vse bakterije v vampu, je prednost, da je delovanje trajno, vsaj dokler vzdržujemo ustrezno koncentracijo. Uporaba rastlinskih izvlečkov povzroči zmanjšanje produkcije amoniaka (NH_3), kar je v skladu s povečano občutljivostjo HAP (Hiper-ammonia-producing) bakterij t.j. bakterij, katerih značilnost je večja produkcija amonijaka, na te spojine (Russell in sod., 1991). V tej skupini najdemo tudi rod *Prevotella*. Imajo tudi bakteriolitičen vpliv, kar zmanjša razgradnjo bakterijskega proteina v vampu in s tem poveča dostopnost le-tega za gostitelja (Lu in Jorgensen, 1987). Delujejo tudi na druge skupine, npr. na praživali (migetalkarje) (McIntosh in sod., 2003). Poznani so tudi negativni učinki, tako lahko npr. zmanjšujejo razgradnjo določene krme v vampu tako, da preprečujejo kolonizacijo rastlinskega materiala (Wallace in sod., 2002).

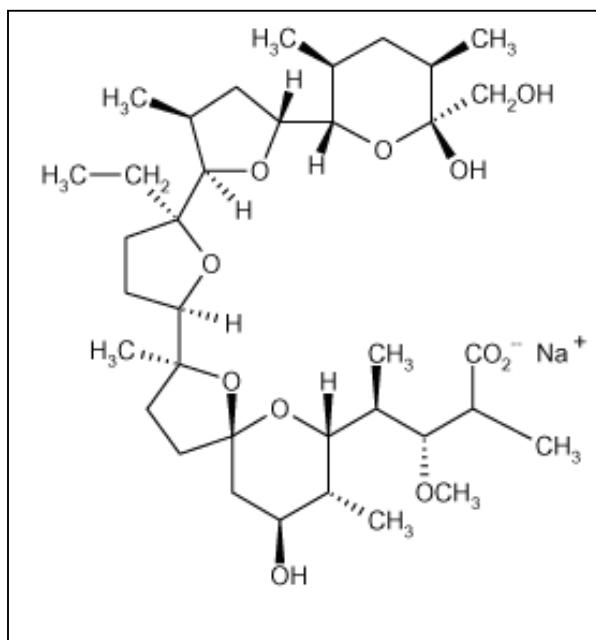
Poskus s kombinacijo rastlinskih izvlečkov in monenzina je pokazal, da slednji učinkuje na podoben nabor mikrobnih vrst, le da je učinek inhibicije izrazitejši (McIntosh in sod., 2003). V določenih razmerah pa se rastlinski izvlečki izkažejo kot učinkovitejši. To so ugotovili v primeru prehranjevanja živali z lahko razgradljivo krmo (vsebuje velik delež

škroba), medtem ko so ob uporabi krme z visoko vsebnostjo kompleksnih sladkorjev (npr. slama), učinki zanemarljivi (Attwood in sod, 1998; McSweeney in sod., 1999).

Monenzin je predstavnik nekoč pogosto uporabljenih antibiotikov, ki so danes v EU prepovedani. Cinamaldehid pa je možna alternativa, saj kaže podobne učinki kot monenzin, hkrati pa predstavlja naravno spojino, ki je uvrščena med t.i. varna živila (GRAS – Generally recognized as safe) (Code of Federal Regulations..., 2003).

2.3.1 Monenzin ($C_{36}H_{61}O_{11}Na^+$)

Monenzin sta prva opisala Haney in Hoehn leta 1967 (istega leta Agtarap s sodelavci opiše kemijo spojine). Spada v skupino ionofornih antibiotikov. Že ime pove, da gre za spojine, ki imajo sposobnost vezave ionov. V primeru monenzina so to monovalentni kationi (enkrat pozitiven ion). Druga značilnost so etski obroči (povezava ogljikov z atomom kisika), ki so pogosti v ogrodju molekule monenzina (slika 3).



Z vezavo kationa monenzin izniči lasten negativen naboj (prispevek karboksilne skupine). Tako nastala nenabita molekula je sposobna prehoda lipidne membrane. Posledično prihaja do prenosa kationov preko lipidnih membran in s tem do izničevanja razlike v elektrokemijskem potencialu med notranjostjo in zunanjostjo celice. Končno lahko pride do razklopa elektronskih verig preko katerih celice pridobivajo energijo (Russell, 1987).

Slika 3: Molekulska zgradba monenzina (Lobos, 2007)

Učinek monenzina je bakteriostatski in le redko baktericiden (Nagaraja in Taylor, 1987). Monenzin v celični membrani deluje kot Na/H antiporter. Na primeru Gram pozitivne bakterije so vzpostavili model delovanja ionofora (slika 4). Ob dodatku monenzina se zmanjša intracelularna koncentracija kalija. To povzroči vdor protonov, kar posledično zmanjša pH. Ob tem pride do padca koncentracije znotrajceličnega ATP, kar je verjetno posledica delovanja ATPaz, ki poskušajo preprečiti tok protonov v celico. Notranjost celice se zakisa, ob dovolj nizkem pH pa monenzin katalizira izmenjavo natrija in kalija. Znotrajcelična koncentracija natrija se močno poveča, koncentracija kalija pa zmanjša. Torej pride do zaustavitve celične rasti zaradi izgub energije ob nenadzorovanem prehodu ionov (Russell in Strobel, 1989).

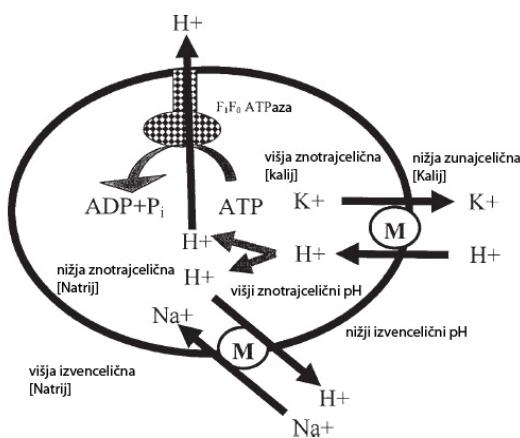
Na splošno velja za ionoforne antibiotike, da so bolj učinkoviti proti Gram pozitivnim bakterijam (Chen in Wolin, 1979; Watanabe in sod., 1981). To kaže na pomembnost celičnih ovojnici za odpornost proti ionoforom. Ovojnica Gram negativnih bakterij vsebuje porine, proteinske kanalčke, ki preprečujejo vstop molekul večjim od 600 Da. Večina ionoforov je večjih od 600 Da, torej ne morejo prehajati porinov. Prav tako predstavlja bariero lipidni del celične stene Gram negativnih bakterij. Vanjo ionofori lahko vstopajo, a nato tu tudi ostanejo (Russell in Strobel, 1989).

Izkazalo se je, da nekatere Gram negativne bakterije niso odporne na višje koncentracije ionofornih antibiotikov. Hkrati so opazili tudi povišan prehod ionov. Bakterije, ki so sprva občutljive, se lahko prilagodijo na prisotnost ionofora, lahko pa se celo razvije odpornost. V *in vitro* razmerah se je izkazalo, da se rezistentni sevi zaradi porabe dodatne energije težko ohranijo v vampnem ekosistemu, kjer prevladuje stanje kompetitivnosti (Nagaraja in Taylor, 1987).

Ionoforni antibiotiki so postali zanimivi za uporabo s poskusi v raziskovalnih laboratorijih Lilly (Greenfield, IN, USA), kjer so dokazali, da monenzin in nekateri drugi antibiotiki povečajo produkcijo soli propionske kisline ter zmanjšajo produkcijo soli ocetne in maslene kisline v *in vitro* fermentacijskih sistemih (Perry in sod., 1976; Richardson in sod., 1976). Z istim učinkom v vampu bi tako dosegli višji energijski izplen krme (Raun in sod.,

1976), saj je produkcija propionske kisline energetsko najbolj učinkovita (Wolin, 1960; Hungate, 1969). Poleg tega je za gostitelja tudi ugodnejši vir energije kot ocetna kislina (Blaxter in sod., 1967) in zmanjšuje izgube dušika (Eskeland in sod., 1974).

Premik razmerja nastalih lalkohlapnih maščobnih kislin v smeri soli propionske kisline glede na soli ocetne in maslene kisline ni nujno povezan s produkcijo le-te. Kopičenje bi lahko bila tudi posledica preusmeritve metabolizma vodika ob zmanjšani produkciji metana (Chen in Wolin, 1979).



Slika 4: Mehанизem razklopa, ki ga povzroči monenzin (Callaway in sod. 2003: 45)

2.3.2 Cinamaldehid (C_9H_8O)

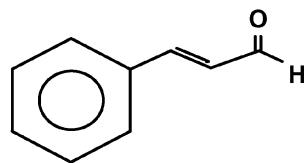
Med pogosto uporabljenimi rastlinske izvlečke sodi cinamaldehid (CIN). Pridobivamo ga z destilacijo listov in vejic drevesa cimetovca (*Cinnamomum* sp.), ki vsebujejo 1-4 % esencialnih olj, 65 % do 75 % le-teh pa predstavlja cinamaldehid (Burnham, 2006). Je spojina odgovorna za aroma cimeta, ki ga poznamo kot začimbo. Najpogosteje ga uporabljajo kot dodatek k prehrabnim in kozmetičnim izdelkom, poznan je tudi kot fungicid, insekticid in antikoroziv (Hoffmann in sod., 1911). V medicini ga uporabljajo za lajšanje simptomov gastritisa, prehlada, kot antiagregativno sredstvo trombocitov in zaradi njegovega antimutagenega in bakteriocidnega učinka (Yu in sod., 2006; Yanaga in sod., 2006).



Slika 5: Shematska slika rastline *Cinnamomum cassia* (cimetovec) (Köhler, 1887)



Slika 6: Cimet v prahu (lasten vir)



Slika 7: Molekulska zgradba cinamaldehida oz. 3-fenil-2-propenal fenol (Calsamiglia, 2007)

Varno uporabo zagotavlja poskusi, ki dokazujejo odsotnost akutne ali kronične toksičnosti, karcinogenosti, mutagenosti in genotoksičnosti na bakterijskih celicah, žuželkah in sesalcih (Bickers in sod., 2005). Dokazana je popolna inhibicija rasti patogenih bakterij iz rodov: *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium smegmatis* (Moleyar in sod., 1992; Ali in sod., 2005). V primeru človeškega prebavnega trakta se je izkazalo, da zavira aktivnost patogenov *Clostridium perfringens* in *Bacteroides fragilis* v primerjavi s koristnimi bakterijami kot so bifidobakterije in *Lactobacterium acidophilus* (Lee in Ahn, 1998). Pri poskusih na bakteriji *Bacillus cereus* ob dodatku cinamaldehida v eksponentni fazì rasti prihaja do filamentacije in inhibicije celične delitve. Opaziti je bilo mogoče začetek tvorbe sept, a se proces ob dodatku cinamaldehida ni zaključil (Kwon in sod., 2003). Pred kratkim so odkrili, da cinamaldehid pri nekaterih bakterijah deluje na protein FtsZ. Ta protein se v procesu od GTP odvisne polimerizacije pretvori v filamente, ki tvorijo Z-obroč. Ta obroč je dinamična polimerna struktura, ki jo najdemo v notranji membrani na sredi celice in je vključena v delitev celice. Odkrili so, da se fenil-propanoidna skupina veže na FtsZ in s tem prepreči od GTP odvisno polimerizacijo. Predlagan je bil tudi model vezave cinamaldehida na FtsZ (Domadia in sod., 2007).

Po prepovedi uporabe antibiotikov v Evropski uniji raziskujejo možnost uporabe cinamaldehida kot krmnega dodatka, saj že dalj časa poznamo njegov antibakterijski učinek. Z raziskavami vplivov cinamaldehida na mikrobnno združbo vampa so ugotovili, da deluje splošno zavirajoče na večino sevov (Ferme in sod., 2004).

Mehanizem delovanja te spojine še ni povsem znan, bolj poznani so učinki na vampni metabolizem. V *in vitro* poskusu z zaprtim sistemom vampnih fermentacij se je izkazalo, da se ob dodatku cinamaldehida zniža koncentracija amonijskega dušika, poviša pa se molarni delež soli propionske kisline glede na kontrolo (Cardozo in sod., 2005). V kontinuirani kulturi je cinamaldehid v nizki koncentraciji inhibiral peptidolizo, na sestavo lahkoklapnih maščob pa ni imel kazal bistvenega učinka. Pri višjih koncentracijah pa prihaja do povišanja molarnega odstotka soli ocetne kisline in soli maslene kisline glede na ostale lahkoklapne maščobne kisline in znižanje molarnega odstotka soli propionske kisline (Busquet in sod., 2005). Vpliv na metabolizem dušika je zelo spremenljiv in je najverjetneje odvisen od koncentracije cinamaldehida (Cardozo in sod., 2004; Busquet in sod., 2005). Možen vpliv je znižanje števila predstavnikov *Prevotella* spp., ki so pomembni pri deaminaciji v vampnem ekosistemu (Ferme in sod., 2004).

Protimikrobeni učinek cinamaldehida pripisujejo reaktivnosti karbonilne skupine (Wendakoon in Sakaguchi, 1995; Helander in sod., 1998). Znano je le, da ne vpliva na stabilnost membrane, zato predvidevajo, da deluje na proteine v periplazmi ali v sami celici (Nikaido in sod., 1994). Druga pomembna lastnost je večja učinkovitost spojine pri nižjem pH (Cardozo in sod., 2005). Pri Gram pozitivnih bakterijah so že dokazali, da najverjetneje deluje na ATPazo (Gill in Holley, 2004). Velja pa tudi, da so Gram pozitivne bakterije občutljivejše zaradi hidrofobne membrane (Ouattara in sod., 1997). Do sedaj še niso zapazili pojava odpornosti na cinamaldehid.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1. Sevi

V diplomski nalogi smo uporabili seve navedene v Preglednici 1. Izbrani sevi so dobro preučeni in jih lahko gojimo v *in vitro* razmerah. Poleg tega gre za seve, ki se različno barvajo po Gramu, zato smo domnevali, da bomo lahko opazovali tudi odziv na dodatke glede na zgradbo celične membrane.

Preglednica 1: Lastnosti izbranih sevov

Sev	Barvanje po Gramu	Vsebnost GC mol%	Opis morfologije	Glavni fermentacijski produkti	Oznaka
<i>Prevotella bryantii</i> B ₁ 4	G-	39-42	Kratki kokobacili	propionska, acetna, mravljična in jantarna kislina	PB
<i>Prevotella ruminicola</i> 23 ^T	G-	45-52	Ovalne ali paličaste, skupki, 0,8-1,0 X 0,8-3,0 µm, pojav sluzi	propionska, acetna, mravljična in jantarna kislina	PR
<i>Ruminococcus albus</i> 20455	G+	42-46	Sferični do podolgovati koki, posamezni ali v paru, včasih kratke verige, Φ=0,8 – 1,5 µm	mravljična, acetna, jantarna kislina, H ₂ in CO ₂	RA
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> 007 S/6	G+	39-44	Sferični do podolgovati koki, posamezni, pari ali kratke verige, Φ=0,8 – 0,9 µm	mravljična, acetna in jantarna kislina	RF
<i>Fibrobacter succinogenes</i> S85	G-	47-49	Ravne ali ukrivljene paličice, posamezne ali v verigi, 0,3-0,8 X 1,0-5,0 µm	acetna, mravljična, in jantarna kislina	FS
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> 3071 ^T	G*	36-41	Ukrivljene palčke, polarni ali subpolarni biček, 0,4-0,6 X 2-5 µm, posamezne, pari ali verige	mravljična, acetna maslena kislina, H ₂ in CO ₂	BF

* - struktorno podobna po Gramu pozitivnim celičnim stenam

3.1.2. Gojišče M2

Za gojenje bakterij smo uporabljali modificirano tekoče gojišče M2 za vampne bakterije (Hobson, 1969), ki je najpogosteje uporabljen rastna podlaga za vampne mikroorganizme. Za pripravo potrebujemo naslednje sestavine (preglednica 2):

Preglednica 2: sestavine za modificirano gojišče M2

Sestavina	Koncentracija (ut. %)
tripton	1,0
kvasni izvleček	0,25
glukoza	0,2
celobioza	0,2
topni škrob	0,2
NaHCO ₃	0,4
L-cistein HCl	0,1
mineralna raztopina I (glej Preglednico 3)	15,0 (vol. %)
mineralna raztopina II (glej Preglednico 3)	15,0 (vol. %)
vampni sok	30,0 (vol. %)
resazurin	0,001 (100 µL/100 ml gojišča)
deionizirana voda	40,0 (vol. %)
*agar	0,75

* - dodamo za pripravo poltrdega (»slippery«) gojišča, ki smo ga uporabili za shranjevanje kultur na -20 °C

Preglednica 3: sestavine za mineralni raztopini I in II

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

Predhodno pripravimo mineralni raztopini I in II (preglednica 3). Sestavine gojišča M2 (razen L-cisteina HCl) smo zatehtali in odmerili po recepturi. Pomembno vlogo pri pripravi gojišča ima resazurin, ki deluje kot indikator prisotnosti kisika v gojišču. Če je prisoten kisik, gojišče obarva rožnato. L-cistein HCl dodamo ob vretju sestavin na magnetnem kuhalniku, ker deluje kot dodatni reducent. Sledi še prepihovanje gojišča z CO₂, ki ga še dodatno reducira, dokler povsem ne izgubi rožnate barve. Odsotnost oksidantov v CO₂ smo zagotovili z uporabo kolone s segretimi (350 °C) bakrovimi opilki, ki je nameščena med jeklenko in izvodilom plina. Gojišče smo porazdelili v steklene Hungatove epruvete (po 8 ml) (Bellco Glass, ZDA). Epruvete med prelivanjem preprihujemo s CO₂, nato pa zatesnimo z zamaški iz butilne gume. Vsa gojišča smo avtoklavirali in shranili pri sobni temperaturi.

Vampni sok smo dobili v klavnici podjetja Meso Kamnik novembra 2006. Sok smo nato precedili skozi več slojev gaze in centrifugirali (centrifuga Sorvall – RC50C, Nemčija). Centrifugiranje je trajalo pol ure pri sobni temperaturi, število obratov na minuto smo nastavili na 10000. Supernatant smo nato avtoklavirali in shranili v hladilnik (4°C). Kadar smo potrebovali gojišča za fotospektroskopske analize, smo vampni sok dodatno centrifugirali še pol ure pri 10000 rpm tik pred dodatkom.

3.1.3. Pufri in raztopine

3.1.3.1 Pufri

Pufer uporabljamo za redčenje vzorcev, ker pomaga pri ohranjanju ustrezne vrednosti pH. Poleg tega je osmolarnost in koncentracija ionov podobna tisti v živih sistemih. To je za nas še posebej pomembno, ker je pri opazovanju morfologije celic potrebno čim bolj ohraniti izvorno obliko le-teh.

Fosfatni pufer s soljo (PBS - phosphate buffer saline) pH7,4

Preglednica 4: sestavine za pripravo pufra PBS pH 7,4

Koncentracija sestavine	Količina na 1000 ml H ₂ O (g)
130 mM NaCl	7,6
7 mM Na ₂ HPO ₄ X2H ₂ O	1,246
3 mM NaH ₂ PO ₄ X1H ₂ O*	0,414

PBS pH8*

Preglednica 5: sestavine za pripravo pufra PBS pH8

Koncentracija sestavine	Količina na 1000 ml H ₂ O (g)
130 mM NaCl	7,6
7 mM Na ₂ HPO ₄ X2H ₂ O	1,655
3 mM NaH ₂ PO ₄ X1H ₂ O**	0,096

* - Raztopinam PBS nismo popravljali pH, ker lahko dodatek kisline ali baze vpliva na meritve s pretočnim citometrom.

3.1.3.2 Reagenti za merjenje proteinov po Lowry-ju:

Preglednica 6: reagenti za merjenje proteinov po Lowry-ju in njihova sestava

Ime raztopine:	Sestavine:
Lowry A	5 % Na ₂ CO ₃
Lowry B	0,1 % NaK tartrat + 0,5 % CuSO ₄ *5H ₂ O, pH=7
Folin-Ciocalteu reagent	57,5 % H ₂ O 15 % Li ₂ SO ₄ 10 % Na tungstat dihidrat 10 % HCl (25%) 85 ut.% H ₃ PO ₄ 2,5 % Molibdenova kislina Na dihidrat

3.1.3.3 Monenzin in cinamaldehid

Preglednica 7: Lastnosti monenzina in cinamaldehida

Monenzin natrijeva sol	
MW (molska masa)	692,9 g/mol
Oznaka Sigma	M5273
CAS RN	22373-78-0
Založna koncentracija	2 mM (raztopljen v etanolu)

Trans-cinamaldehid (3-fenil-2-propanal)	
MW (molska masa)	132,16 g/mol
CAS RN	104-55-2
Oznaka Merck	(Trans-Cinnamaldehyde Merck 8.02505.0250)
Proizvajalec	Merck®, Nemčija
Čistost	~99 %
Založna koncentracija	1000 mg/l

3.1.3.4 Materiali, ki smo jih uporabili v pretočni citometriji

Preglednica 8: Lastnosti barvila SYTO®13 in standardnih kroglic

Barvilo:	SYTO®13 (S-7575, Molecular Probes, USA)
Založna koncentracija	5 mM raztopljen v DMSO
Delovna koncentracija	250 µM raztopljen v PBS pH8

Kroglice:	Fluorebrite PolyfluorTM 511 Microspheres, 1 micron (2,59 % Solids-Latex)
Premer	0,945 µm (SD=0,027 µm)
Proizvajalec	Polysciences, Inc., ZDA

Delovne redčitve smo vedno uporabljali sveže, razen v primeru SYTO13. Pri slednjem smo tudi delovno raztopino shranjevali v zamrzovalniku (-20 °C).

3.2. METODE

3.2.1. Anaerobna tehnika gojenja

Vampne bakterije iz rodov *Prevotella*, *Butyrivibrio*, *Fibrobacter* in *Ruminococcus* so striktno anaerobni mikroorganizmi, ki v atmosferi, v kateri je prisoten kisik ne le ne rastejo, ampak jih takšna atmosfera ubije. Za gojenje teh bakterij moramo zato zagotoviti rast in tudi precepljanje v razmerah, v katerih kisika ni. To je mogoče v posebnih, t.i. Hungatovih epruvetah, v katere pri delu dovajamo kisika prost CO₂, ali pa v t.i. anaerobnih komorah (pri našem delu smo uporabljali komoro proizvajalca COY Laboratory Products Inc., ZDA). V komori je vzpostavljena atmosfera brez kisika, torej 95 % ogljikovega dioksida in 5 % vodika. Temperaturo 37 °C vzdržujeta ventilatorja z grelci. Na ventilatorjih so pritrjene plošče s paladijem, ki deluje kot katalizator. Na paladiju prihaja do vezave kisika, ki prodre v komoro, z vodikom iz plinske mešanice. Nastane voda, ki jo odvajamo s kroglicami silikagela. Paladij in silikagel redno regeneriramo, oba z gretjem v pečici. Silikagel izpostavimo temperaturi 120 °C za 2 uri, paladij pa temperaturi 160 °C za 2 uri.

Pri našem delu smo del poskusov izvedli v Hungatovih epruvetah, del pa v mikrotitrskih ploščah v anaerobni komori. Kadar smo uporabljali Hungatove epruvete, smo vsa dela opravili tako, kot je opisal Bryant (1972). Kadar smo bakterije gojili v anaerobni komori, pa smo pred začetkom poskusa pripravili sterilno anaerobno gojišče M2 v 1 L neprepustno zamašenih steklenicah (t.i. transfuzijske steklenice). Hungatove epruvete smo pokrili z aluminijasto folijo in zavili pripadajoče pokrovčke v folijo ter oboje sterilizirali. Cinamaldehid smo pred uporabo filtrirali skozi 0,22 µm filter (Millex GS, Millipore®, Irska) s sterilno injekcijsko brizgo in ga dodali v že pripravljeno sterilno anaerobizirano gojišče. V preteklih študijah (Mankoč, 2007) se je izkazalo, da so rastlinski izvlečki pogosto okuženi z mikroorganizmi, ki so sposobni rasti v M2 gojišču. Z uporabo filtra te kontaminante odstranimo. V nenacepljenih gojiščih z monenzinom rasti nismo zaznali. Epruvete, gojišče in ostale pripomočke smo nato prenesli v anaerobno komoro. Nato smo v plastičnih sterilnih epruvetah Falcon™ (BD Biosciences, ZDA), ki so bili že nekaj dni v komori, da se zamenja atmosfera, pripravili želene redčitve in te prenesli mikrotitrske

plošče (250 µl v vsako jamico, Brand, Nemčija) oz. v Hungatove epruvete (8 ml v epruveto). Epruvete smo zatesnili s pripadajočimi zamaški in jih prenesli iz anaerobne komore v inkubator (37 °C). Okužbe gojišč v mikrotitrskih ploščah smo kontrolirali z opazovanjem motnosti v t.i. kontrolnih jamicah.

3.2.2. Spremljanje mikrobne rasti z merjenjem motnosti kultur

Absorbanca (A) vzorca je definirana kot razmerje med intenziteto svetlobe, ki vstopa (I_0) in intenziteto svetlobe, ki izstopa (I) iz vzorca. Motnost ali optična gostota (ang. optical density - OD) je absorbanca snovi pri določeni valovni dolžini (λ) in dolžini poti žarka skozi njo (l).

$$\log \frac{I_0}{I} = A \quad OD = \frac{A}{l} \quad \dots(1)$$

Za spektrofotometrično merjenje motnosti ali optične gostote smo uporabljali dve napravi. V primeru anaerobnega gojenja v mikrotitrskih ploščah smo merili motnost z čitalcem plošč (Titertek Multiskan® MCC, ZDA) pri valovni dolžini 620 nm, ki smo ga prav za ta namen prenesli v anaerobno komoro. Motnost kultur v Hugatovih epruvetah (Bellco glass) smo izmerili z spektrofotometrom Novaspec II (Amersham pharmacia biotech, Švedska) pri valovni dolžini 654 nm. Od dobljenih vrednosti smo vedno odšteli motnost sterilnega gojišča M2.

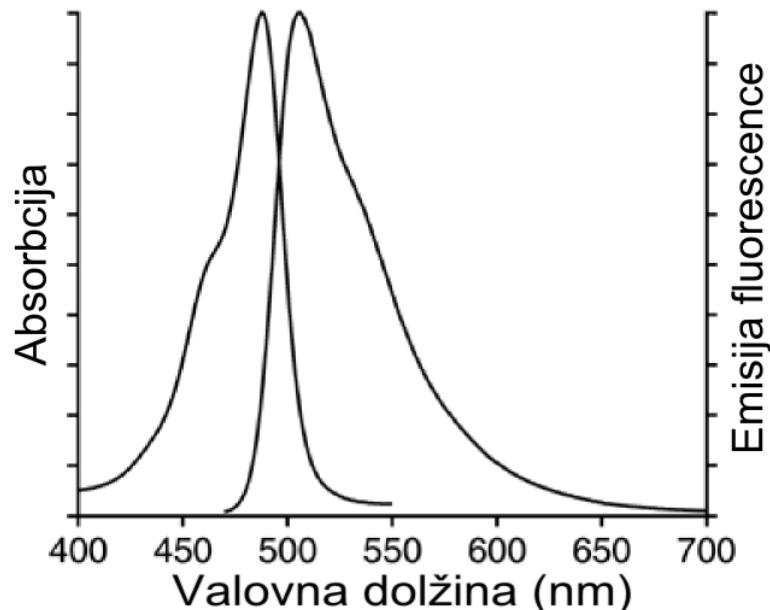
3.2.3. Pretočna citometrija

Pretočni citometer je naprava, ki omogoča štetje, analizo in sortiranje posameznih celic v raztopini. Hkrati lahko opazujemo več parametrov, ki omogočajo opredelitev celic. Temelji na obsevanju z laserskim žarkom, ki je usmerjen v hidrodinamsko fokusiran tok vzorca. Odbito svetlobo nato zaznavajo detektorji, ki so nameščeni pod različnimi koti glede na žarek. Z uporabo ustreznih barvil in standardnih kroglic lahko ločimo celice in ugotavljamo njihovo število v vzorcu.

V naši raziskavi smo uporabljali napravo FACScan proizvajalca Becton-Dickinson (BD, Franklin lakes, NJ, USA).

3.2.3.1. Priprava vzorcev za pretočno citometrijo

Vzorce smo po odvzemu iz Hungate epruvet ali mikrotitrskih plošč hrани v epicah na ledu. Pripravili smo ustrezne redčitve s pufom PBS pH8, ki smo jim dodali $2\mu\text{L}$ barvila SYTO 13 (končna koncentracija $1\mu\text{M}$).



Slika 8: Absorpcijski in emisijski spekter barvila SYTO 13 (Invitrogen, 2010)

Preglednica 9: Lastnosti barvila SYTO 13

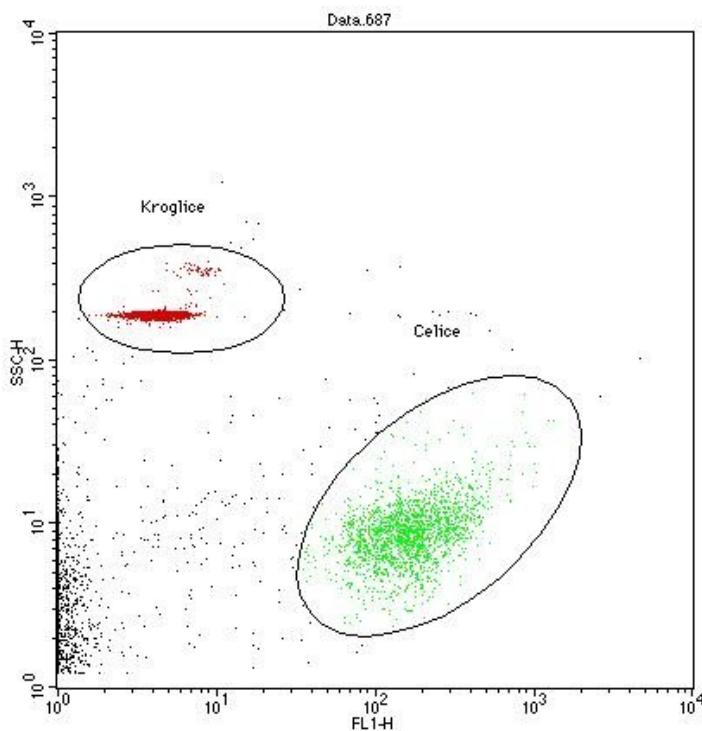
Barvilo	Cat #	Absorpcija*		Emisija *		QY† DNA	QY† RNA
		+DNA	+RNA	+DNA	+RNA		
SYTO 13	S-7575	488	491	509	514	0.40	0.40

QY- kvantni doprinos ob vezavi barvila

To barvilo po vezavi na DNK ali RNK poveča svoj doprinos k fluorescenci za več kot 40X in oddaja svetlobo z višjo valovno dolžino (slika 8, preglednica 9). Mešanico smo inkubirali v temi 5 minut, dodali $2\mu\text{L}$ flourescentno označenih kroglic (glej sklop 3.1.3.4.) in vorteksirali.

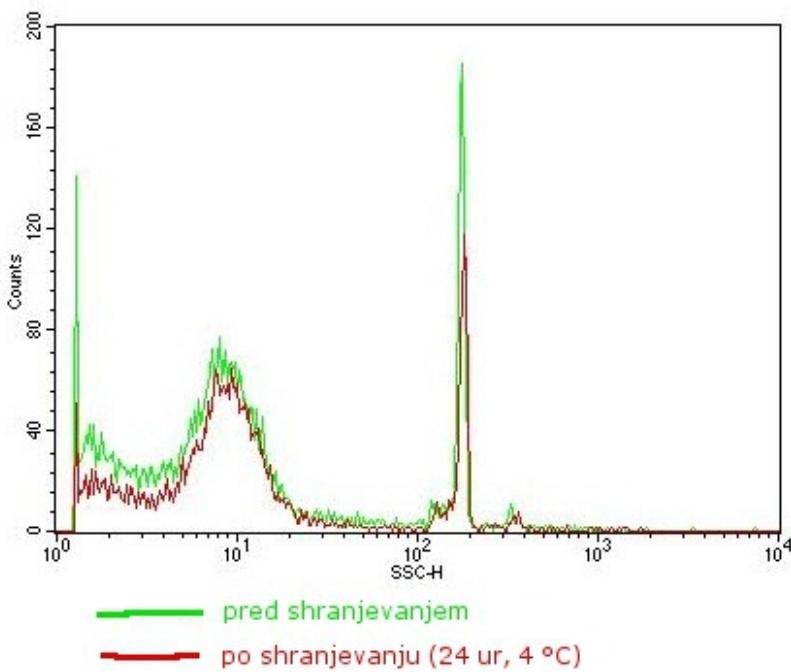
3.2.3.2. Meritev

Vsi vzorci so bili pripravljeni v paralelkah. Pred meritvijo smo vzorce rahlo pretresli, dvakrat izmerili, zopet rahlo pretresli in spet dvakrat izmerili. Čas merjenja smo določili s preštetim številom celic. Opazovali smo parametre prednji odboj, stranski odboj (SSC) in zeleno fluorescenco (FL1, 530 ± 30 nm). Na sliki (Slika 9) smo videli kroglice kot pas levo zgoraj, na desni polovici pa so se razporedile celice.



Slika 9: Primer slike razporeditve izmerjenih dogodkov na točkovnem grafu po analizi stranskega odboja svetlobe (SSC) in zelene fluorescence (FL1) po analizi s pretočnim citometrom

Nekatere vzorce smo čez noč shranili v hladilniku na -4 °C in analizirali šele naslednji dan (slika 10). S predhodnim poskusom smo ugotovili, da takšno shranjevanje povzroči le zanemarljivo razliko pri rezultatih.



Slika 10: Histogram razporeditve izmerjenih dogodkov glede na stranski odboj (SSC) po analizi poskusnega vzorca s pretočnim citometrom pred in po shranjevanju vzorcev pri 4 °C.

3.2.4. Barvanje po Gramu

Del vzorca smo uporabili za pripravo mikroskopskega preparata. Alikvot smo najprej centrifugirali 10-15 min pri 4000 X g, da so se celice usedle na dno. Nato smo odpipetirali gojišče in celice resuspendirali v PBS (pH=8). Tako smo odstranili velik del gojišča, ki bi sicer povzročal motnje na sliki preparata. Gojišče vsebuje tudi vampni sok, v katerem najdemo delce mikrobnega izvora. Na objektno stekelce smo nanesli 10-kratno redčitev vzorca. Posušen in fiksiran preparat smo nato barvali po Gramu:

3.2.5. Mikroskopija in analiza slike

Uporabili smo mikroskop (Olympus BX-50, Japonska), ki je imel pritrjeno črno-belo digitalno kamero (Hamamatsu Orca 2, Japonska). Preparate smo opazovali pri 1000X povečavi (imerzijski objektiv). Pri tej povečavi smo tudi zajeli slike, ki smo jih nato analizirali. Na enemu preparatu smo zajeli slike na treh različnih mestih. Za zajemanje smo uporabili program Kromascan (Kinetic Imaging, VB). Pred začetkom zajemanja slik smo pridobili še posnetek ozadja, tako da smo zajeli sliko, ko mikroskop ni bil izostren na vzorec. Ta je posledica elektronskega šuma in umazanije v mikroskopu. Slike so bile velike 512 X 512 pikslov, globina barve pa 8-bitna, torej 256 odtenkov sivin. Vrednost 0 predstavlja črno barvo, vrednost 255 pa belo.

Za analizo slik smo uporabili odprtakodno programsko okolje, ki je prosto dostopno in se zaradi svoje "odprtosti" nenehno dopoljuje in razvija. Tako smo pri vseh slikah preparatov najprej odstranili ozadje s programom za urejanje slik GIMP 2.0 (GNU, 2009). Uporabili smo postopek deljenja slike ozadja od slike preparata. Čez sloj izbrane slike smo prilepili sliko ozadja (šuma) in izvedli funkcijo deljenja (divide). Gre za algoritem, ki združi dva sloja po enačbi (2). Tako vrednosti slikovnega elementa (pixel) spodnjega sloja (E) pomnoži z 256 in zmnožek deli z vrednostjo nalegajočega zgornjega sloja (M) plus ena (s tem se izognemo deljenju z nič).

$$E = \frac{I * 256}{M + 1} \quad \dots(2)$$

Tako smo odstranili večji del šuma in nečistoč na sliki.

Obdelane slike smo nato analizirali s programom ImageJ (Abramoff, 2004). Potem, ko smo naložili slike, smo pognali makro "Particle Cluster Analysis", ki označi delce glede na intenziteto. Med izbranimi delci smo nato izbrisali skupke celic, celice, ki se prekrivajo in delce za katere nismo prepričani, da so celice. V programu smo nastavili merilo (umerili smo s pomočjo slike Petroff-Hausserjeve števne komore). V našem primeru je en piksel predstavljal dolžino 135 nm. Sledi analiza delcev. Velikost delcev smo omejili, da v analizo niso bili zajeti majhni delci nepravilnih oblik, ki so bili najverjetneje ostanki gojišča ali razpadlih celic. Program izmeri izbrane parametre označenih delcev in jih prikaže v tabeli. Izbrali smo tudi opcijo izrisa oštevilčenih obrisov celic, s pomočjo

katerega smo kasneje lahko razbrali kateri celici pripadajo določeni parametri. Iskali smo podatke o površini, cirkularnosti in premeru delca (gre za največji možni premer, ki ga da delec). Podatke smo shranili in jih nato obdelali v programu Excel® (Microsoft, USA).

3.2.6. Ugotavljanje koncentracije celičnih beljakovin po Lowry-ju

(prirejen protokol za merjenje v mikrotitrskih ploščah)

Ker motnost ni nujno direktno posledica mikrobne rasti, smo podatke o rasti preučevanih kultur dopolnili še z meritvami koncentracij celičnih beljakovin (Lowry in sod., 1951). Odločili smo se, da izvedemo metodo v mikrotitrski plošči, ker to omogoča hitrejšo pripravo in meritev.

Reakcijske mešanice smo pripravili v mikrocentrifugirkah (0,5 ml). V mikrocentrifugirke smo dodali 40 µl vzorca ali standarda. V našem primeru smo za standard uporabili goveji serumski albumin (BSA). Za izris standardne krivulje smo opravili meritve na vzorcih s koncentracijami BSA od 0,00 do 0,40 mg/ml s koraki po 0,08 mg/ml.

V mikrocentrifugirke z vzorci oziroma standardi smo dodali 40 µl 1M NaOH, ki celice hidrolizira in denaturira beljakovine. Zaprete mikrocentrifugirke smo inkubirali 5 minut pri 100 °C v termostatirani vodni kopeli. Ko smo vzeli mikrocentrifugirke iz kopeli, smo jih pustili 15 minut na sobni temperaturi, da se ohladijo. Zatem smo v vse mikrocentrifugirke dodali biuretni reagent in Folin-Ciocalteu reagent. Vsebino smo prepipetirali na mikrotitrsko ploščo, pustili stati 10 min in izmerili motnost vzorcev pri valovni dolžini 650 nm s čitalcem mikrotitrskih plošč (Elx 808, Bio-Tek instruments, USA).

3.2.7. Ugotavljanje minimalne inhibitorne koncentracije - MIC

Za vse vrste protimikrobnih snovi lahko ocenimo minimalno inhibitorno koncentracijo ali MIC. Ta nam pove pri kateri koncentraciji antibiotika določen mikroorganizem preneha rasti. Pri iskanju ustrezne koncentracije moramo biti previdni, saj izpostavitev prenizki

koncentraciji lahko vzpostavi stanje odpornosti pri določenih Gram-negativnih bakterijah. Delovanje ionoforov je tudi soodvisno od koncentracije kationov v uporabljenem gojišču, pH-ju gojišča - nižji pH, višja inhibicija (Chow and Russell, 1990). V našem poskusu smo uporabili tudi parameter IC_{50} , ki smo ga definirali kot koncentracijo, ki zmanjša rast za polovico oziroma razpolovi motnost ob vstopu v stacionarno fazo (Alsop, 1980).

3.2.8 Regresijska analiza

O regresijski analizi govorimo, kadar iščemo odnos med neodvisno spremenljivko x in odvisno spremenljivko y . Najosnovnejši je model linearne regresije (4).

$$y = a + bx + \varepsilon \quad \dots(4)$$

Spremenljivka ε je napaka, ki je enaka razliki med dejansko vrednostjo spremenljivke y in pričakovano vrednostjo y pri določeni vrednosti x (5).

$$\varepsilon = y(x) - My(x) \quad \dots(5)$$

Uporabljeni program Microsoft Excel uporablja model nelinearne regresije za izračun enačbe, ki se najbolje ujema z grafom. Program Excel išče odnos prek eksponentne enačbe (6).

$$y = ae^{bx} \quad \dots(6)$$

Izračuna tudi koeficient determinacije, R^2 . Definiran je kot razmerje vsot pojasnjene in celotne variance (7). Služi kot merilo za ujemanje dobljenih podatkov in izračunane enačbe. Vrednost $R^2=1$ pomeni popolno naleganje izmerjenih podatkov in izračunane enačbe, vrednost $R^2=0$ pa popolno neujemanje.

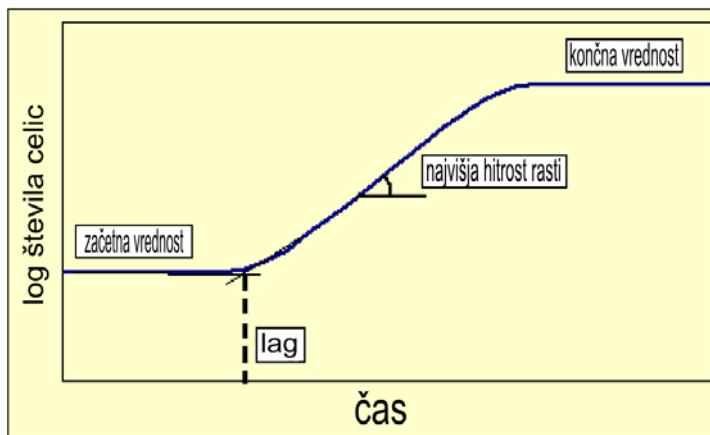
$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{X}_i - \bar{X})^2}{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2} \quad \dots(7)$$

m - število enačb učne množice

\hat{X}_i - ocena spremenljivke X

\bar{X} - srednja vrednost spremenljivke X

3.2.9 Uporaba Baranyi-Roberts modela za opis rasti bakterijskih sevov



Slika 11 - Prikaz različnih koeficientov rasti opredeljenih z Baranyi-Roberts modelom

Za opis rasti sevov smo izbrali Baranyi-Robertsov model, ker je bil prizrejen za opis rasti bakterijskih kultur v zaprtih sistemih (Baranyi in Roberts, 1994). Pomembno je, da zagotovimo enako fiziološko stanje vcepk. Model opisuje stanje z eno spremenljivko (y). Dolžina lag faze je opredeljena z vrednostjo te spremenljivke v času inokulacije in z okoljem v katerega smo vnesli mikroorganizem. Za razliko od ostalih modelov (Gompertz ali logistični model) omenjeni model bolje opiše rast, tudi ko prihaja do sprememb v okolju. Model je bil narejen za opis rasti v spremenljivih razmerah, ne pa za iskanje optimalnih razmer za rast. Razlikuje se tudi v tem, da je sredni del krivulje skoraj linearen (slika 11). Uporabili smo računalniški program DMFit (ComBase), ki za izračun uporablja enačbo (8):

$$y(t) = y_0 + \mu_{\max} t + \frac{1}{\mu_{\max}} \ln(e^{-vt} + e^{-h_0} - e^{-vt-h_0}) - \frac{1}{m} \ln(1 + \frac{e^{m\mu_{\max} t + \frac{1}{\mu_{\max}} \ln(e^{-vt} + e^{-h_0} - e^{-vt-h_0})} - 1}{e^{m(y_{\max} - y_0)}}) \quad \dots(8)$$

y_0 - naravni logaritem začetne koncentracije celic

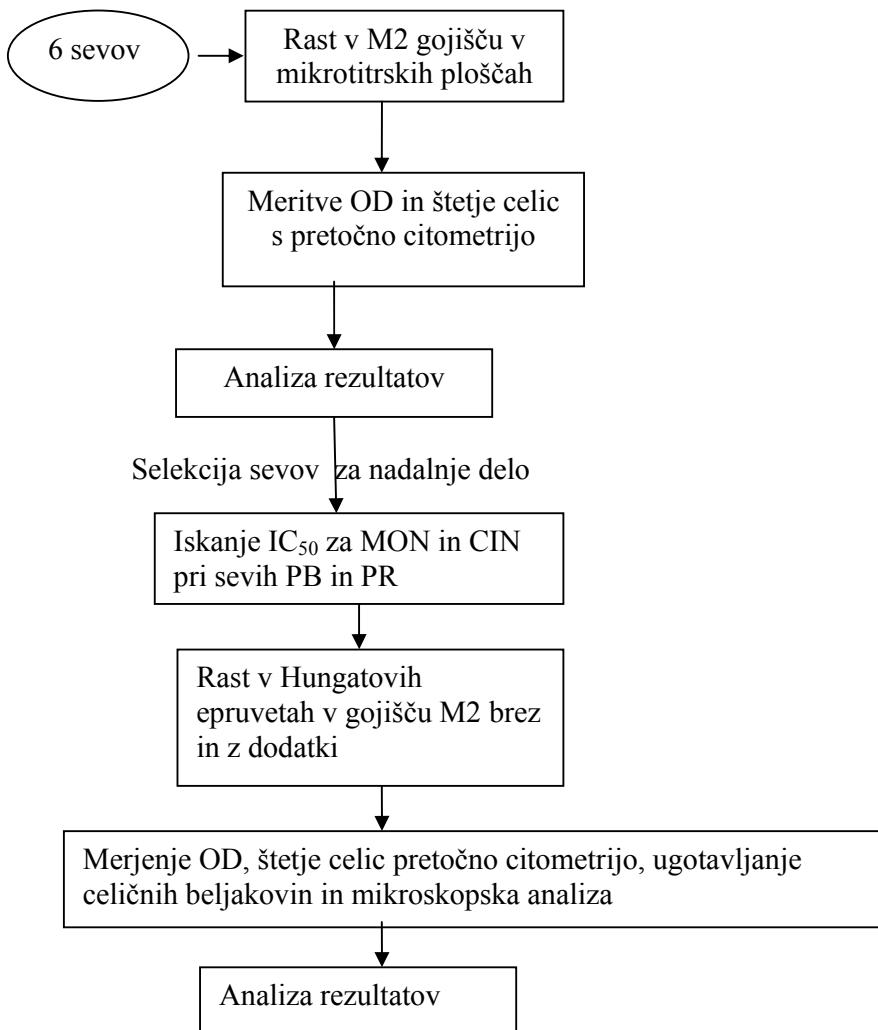
μ_{\max} - največja specifična hitrost rasti

v - koeficient ukrivljenosti, ki opisuje graf ob prehodu v stacionarno fazo

m - koeficient ukrivljenosti, ki opisuje graf ob prehodu v eksponentno fazo

h_0 - parameter brez dimenzijs, ki številčno opredeli fiziološko stanje celic

3.2.10 Shema dela



Slika 12: Grafični prikaz poteka našega dela

4 REZULTATI

4.1. RAST PREUČEVANIH BAKTERIJSKIH SEVOV V GOJIŠČU M2 V MIKROTITRSKIH PLOŠČAH

4.1.1 Ugotavljanje razmerja med motnostjo in številom celic v vzorcih odvzetih med rastjo preučevanih sevov v gojišču M2 v mikrotitrskih ploščah

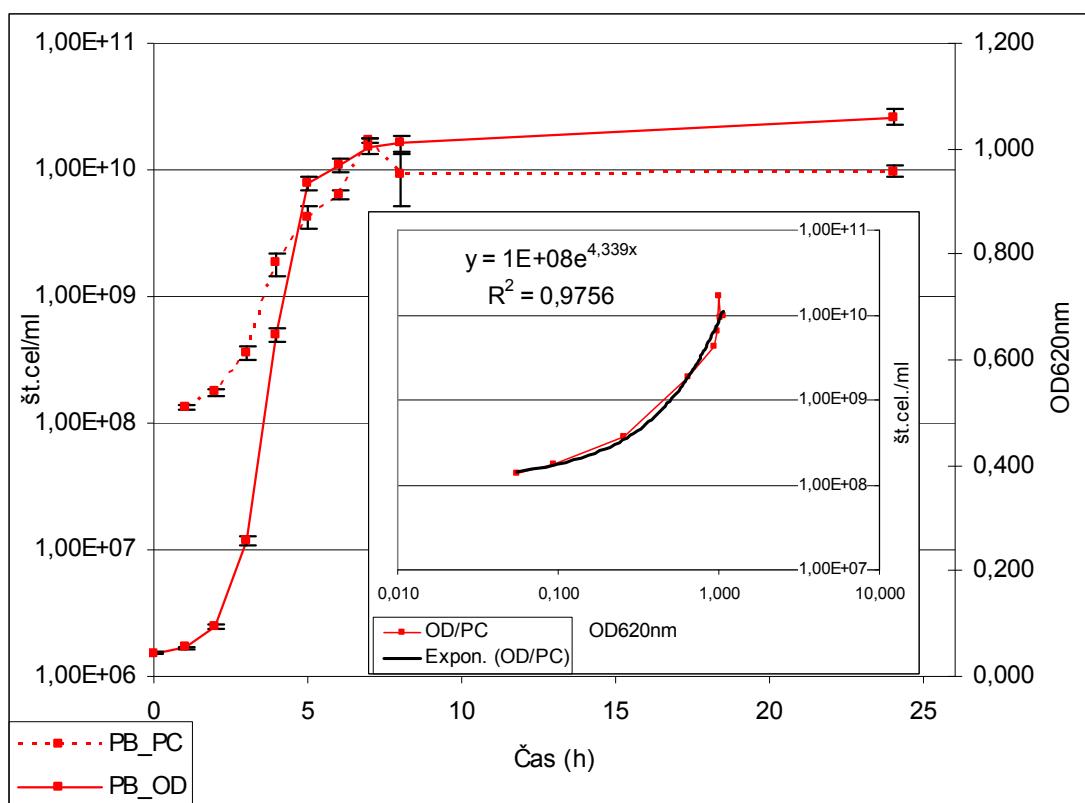
S čitalcem mikrotitrskih plošč, ki smo ga vstavili v anaerobno komoro, smo spremeljali rast preučevanih sevov v jamicah mikrotitrskih plošč v gojišču M2 tako, da smo merili motnost kultur pri 620 nm. Na vsako mikrotitrsko ploščo s 96 jamicami z gojiščem M2 smo nacepili dva preučevana seva (po 35 paralelk na sev), v preostale jamicice (26), ki so bile razporejene po celotni površini mikrotitrskih plošč (glej shemo - slika 13), pa gojišča M2 nismo nacepili in so predstavljale t.i. kontrole.

								Sev št. 1.									Sev št. 2.
K								K	K								K
K	K								K	K							
K									K								
K		K							K		K						
K									K								
K			K						K					K			
K									K								
K				K					K							K	

Slika 13: Shema razporeda jamic z vzorci in kontrolami na mikrotitrski plošči. K = kontrola (sterilno gojišče)

Rast smo merili vsako uro v prvih dvanajstih urah poskusa, oziroma do prehoda v stacionarno fazo rasti, ter po 24 urah in 48 urah. Ob vsaki meritvi optične gostote smo iz dveh jamic odvzeli vzorca za ugotavljanje števila bakterijskih celic s pretočnim citometrom.

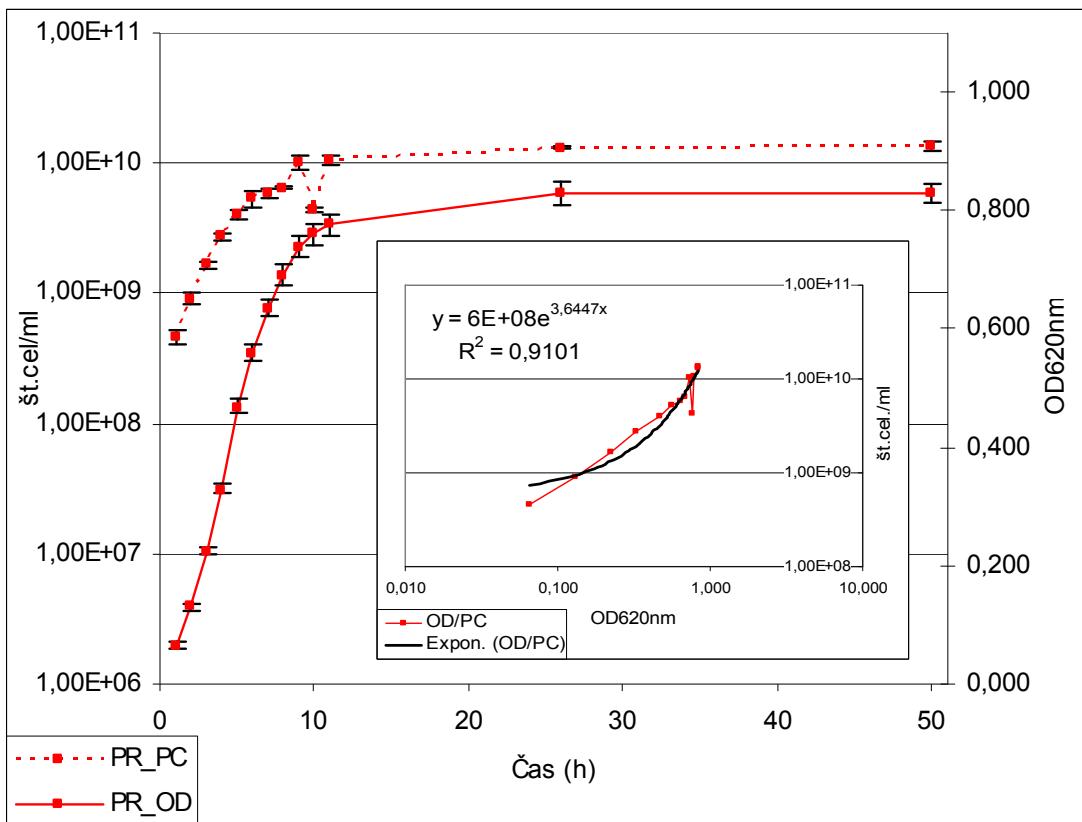
Analiza rezultatov je potrdila, da obstaja korelacija med motnostjo kulture seva *P. bryantii* B₁4 in številom celic v kulturi. Vrednost R² je pri bila tem sevu najvišja (slika 14). Lag faza oz. faza prilagajanja je bila med daljšimi in je trajala približno dve uri. Tudi hitrost rasti seva B₁4 je bila med vsemi preučevanimi sevi najvišja (Preglednica 10). Do prehoda v stacionarno fazo je prišlo po 6 urah rasti. Ob zadnjem merjenju je bila motnost kulture še nekoliko večja in je dosegla maksimalno vrednost 1,06, s pretočno citometrijo pa smo takrat prešteli 9,76 × 10⁹ celic.ml⁻¹.



Slika 14: Izmerjena motnost kulture in število celic tekom rasti seva *P. bryantii* B₁4. Veliki graf prikazuje izmerjene vrednosti motnosti pri 620 nm (— PB_OD) in koncentracije celic merjene s pretočno citometrijo (--- PB_PC), mali graf pa prikazuje odvisnost motnosti in števila celic na mililiter (— OD/PC) ter regresijsko eksponentno enačbo (—).

Opazili smo povečanje števila celic glede na pričakovano število ob prehodu v stacionarno fazo, podobnega pojava pa z merjenjem motnosti nismo opazili. Takrat je bilo število celic celo više kot ob zadnjem merjenju, kjer je bila motnost največja.

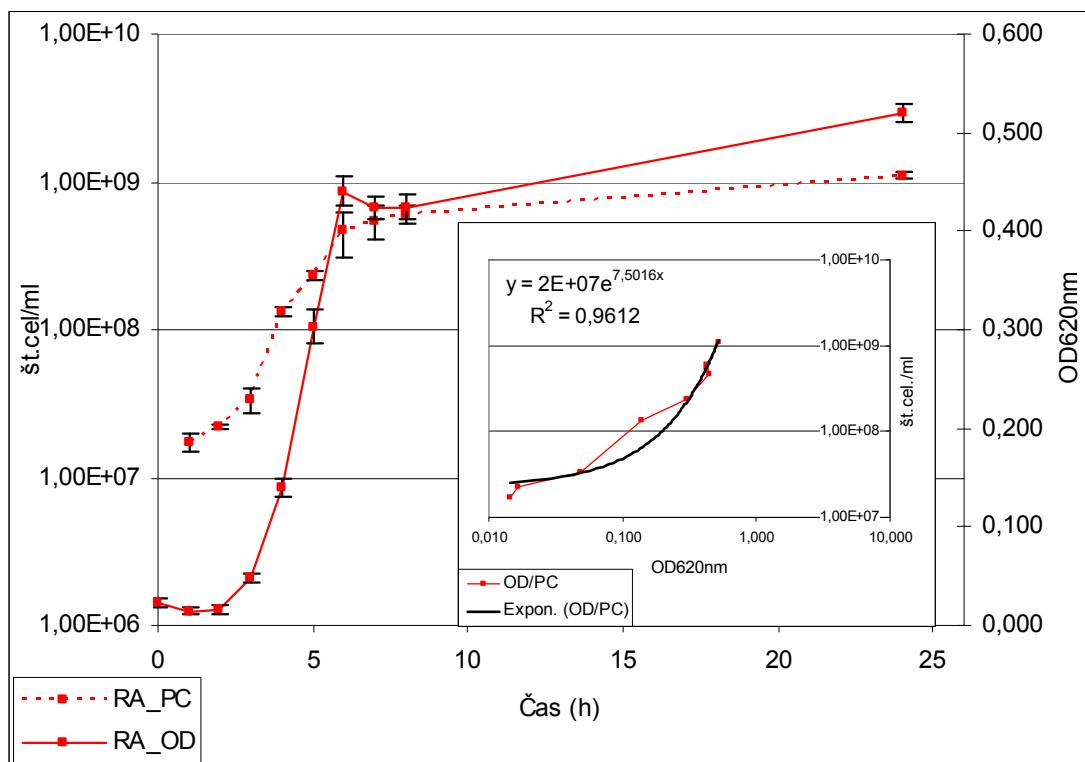
Analiza rezultatov je tudi v primeru rasti seva *P. ruminicola* 23 pokazala dobro korelacijo med motnostjo kulture in številom celic v kulturi. V tem primeru je bila vrednost R^2 nekoliko nižja kot pri sevu *P.bryantii* B₁₄, a je še vedno dobro opredeljevala gibanje premice rasti (slika 15). Faza prilagajanja je bila zelo kratka oz. je bila znotraj enournega intervala med prvima meritvama. Hitrost rasti je bila bistveno manjša kot pri sevu B₁₄ (preglednica 9), stacionarno fazo rasti pa je sev *P. ruminicola* 23 dosegel po 8 urah. Oba parametra sta dosegla najvišjo vrednost po 24 urah. Pri merjenju motnosti smo izmerili vrednost 0,83, s pretočno citometrijo pa smo takrat prešteli $1,37 \times 10^{10}$ celic.ml⁻¹. Ob naslednji meritvi (50 ur) se ti dve vrednosti nista spremenili.



Slika 15: Izmerjena motnost kulture in število celic tekom rasti seva *P. ruminicola* 23^T. Veliki graf prikazuje izmerjene vrednosti motnosti pri 620 nm (— PR_OD) in koncentracije celic merjene s pretočno citometrijo (--- PR_PC), mali graf pa prikazuje odvisnost motnosti in števila celic na mililiter (— OD/PC) ter regresijsko eksponentno enačbo (—).

Tu smo opazili nasproten pojav kot pri sevu *P.bryantii* B₁₄. Opazili smo odstopanje v številu celic na prehodu med eksponentalno in stacionarno fazo rasti, vendar je v tem primeru prišlo do nepojasnjenega zmanjšanja števila celic (slika 15).

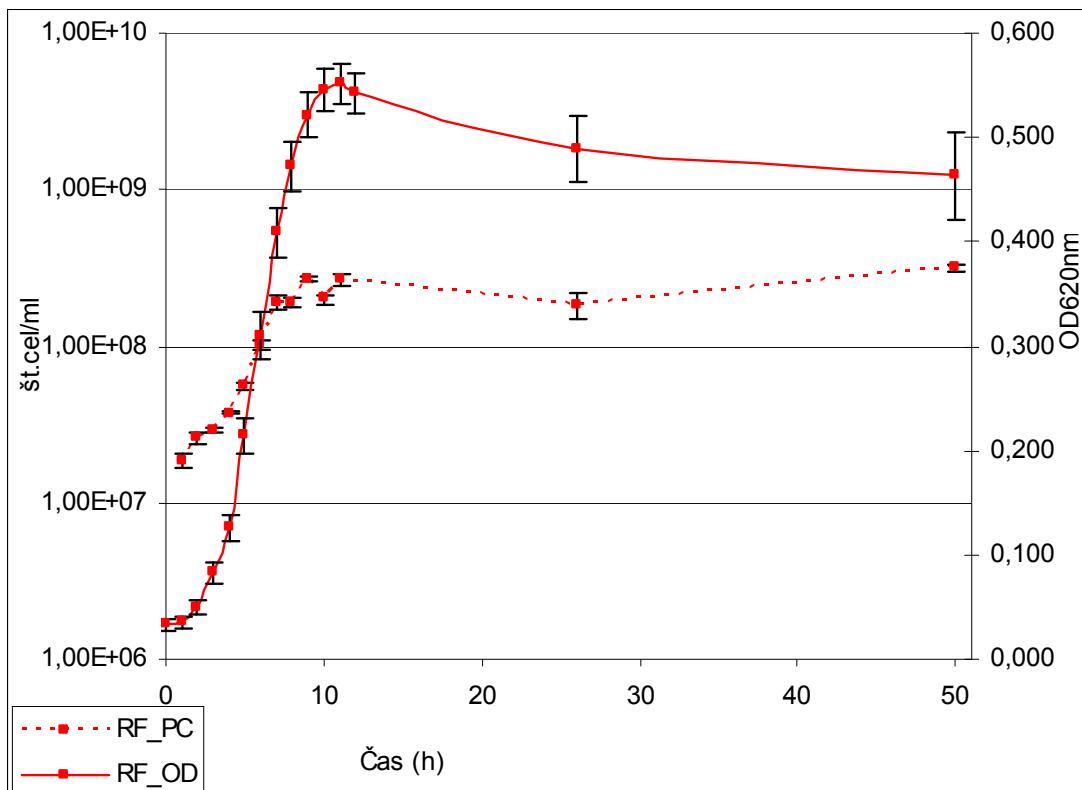
Pri analizi rasti seva *R. albus* 20455 se je pokazala dobra korelacija med motnostjo in številom celic, vrednost R^2 je bila med višimi (slika 16). Faza prilagajanja je bila dolga, trajala je skoraj štiri ure. Zaznali smo tudi rahel padec motnosti med to fazo. Hitrost rasti *R. albus* 20554 je bila med obema sevoma prevotel, medtem ko sta motnost in število celic.ml⁻¹ dosegla manjše vrednosti. Prehod v stacionarno fazo rasti se je zgodil po 6 urah rasti. Motnost je pri zadnji meritvi (24ur) dosegla vrednost 0,519, torej večjo vrednost kot ob prehodu. Po 24 urah je bila najvišja tudi gostota celic, ki je dosegla $1,11 \times 10^9$ celic.ml⁻¹.



Slika 16: Izmerjena motnost kulture in število celic tekom rasti seva *R. albus* 20455. Veliki graf prikazuje izmerjene vrednosti motnosti pri 620 nm (— RA_OD) in koncentracije celic merjene s pretočno citometrijo (--- RA_PC), mali graf pa prikazuje odvisnost motnosti in števila celic na mililiter (— OD/PC) ter regresijsko eksponentno enačbo (—).

Analiza rasti seva *R. flavefaciens* 007 S/6 je pokazala dobro korelacijsko med motnostjo in številom celic, vrednost R^2 je bila visoka (slika 17). Ta sev je rasel najpočasneje

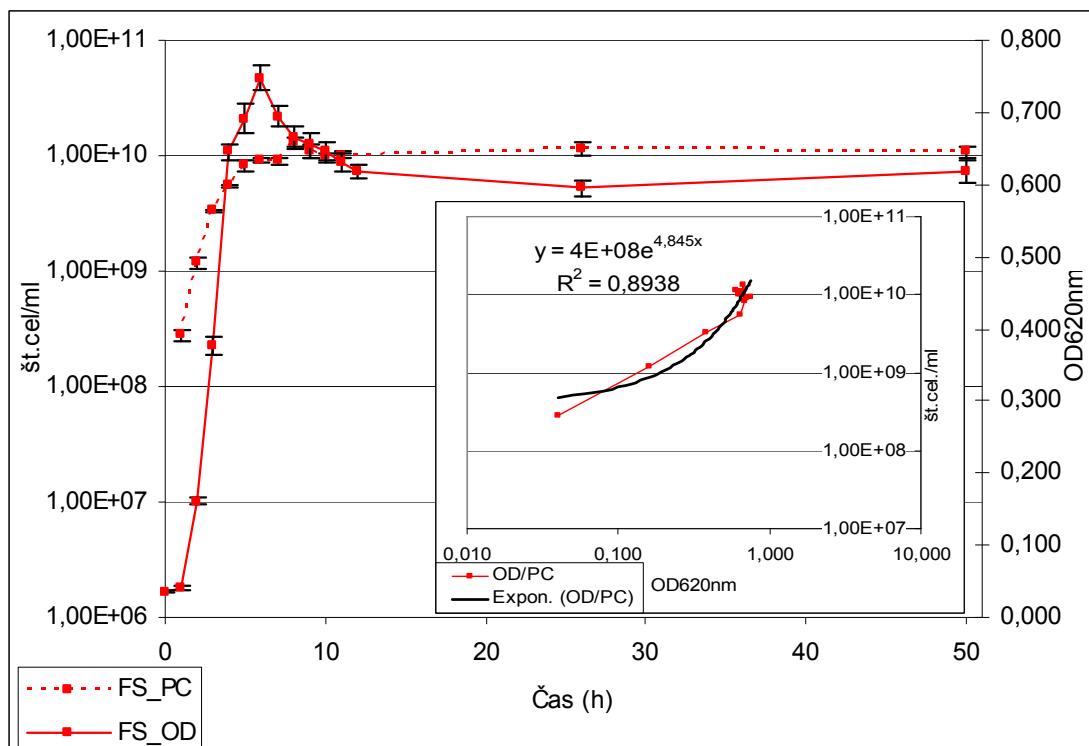
(preglednica 10). Faza prilagajanja je trajala 2 ur. Stacionarno fazo rasti je dosegel 8 ur po inkubaciji. Tudi vrednosti motnosti so bile med nižjimi, najvišja dosežena gostota celic pa je bila od vseh sevov najnižja. Največja izmerjena motnost je znašala 0,55, število celic pa $3,15 \times 10^8$ na ml. Ob prehodu v stacionarno fazo je gostota celic zanihala. Pri meritvi motnosti kultur po 24 urah smo opazili večja nihanja, kot pri drugih sevih, vendar razloga ne poznamo. Zadnja meritev je pokazala očiten padec motnosti med stacionarno fazo.



Slika 17: Izmerjena motnost kulture in število celic tekom rasti seva *R. flavefaciens* 007 S/6. Veliki graf izmerjene vrednosti motnosti pri 620 nm (— RF_OD) in koncentracije celic merjene s pretočno citometrijo (--- RF_PC), mali graf pa prikazuje odvisnost motnosti in števila celic na mililiter (— OD/PC) ter regresijsko eksponentno enačbo(—).

Pri analizi rasti seva *F. succinogenes* S85 smo opazili nekoliko slabšo korelacijo med motnostjo in številom celic (slika 18). Vrednost R^2 je bila tu pod 0,90. Ta sev sodi med hitrorastoče (preglednica 10). Že po uri inkubacije je kultura prešla v logaritemsko fazo.

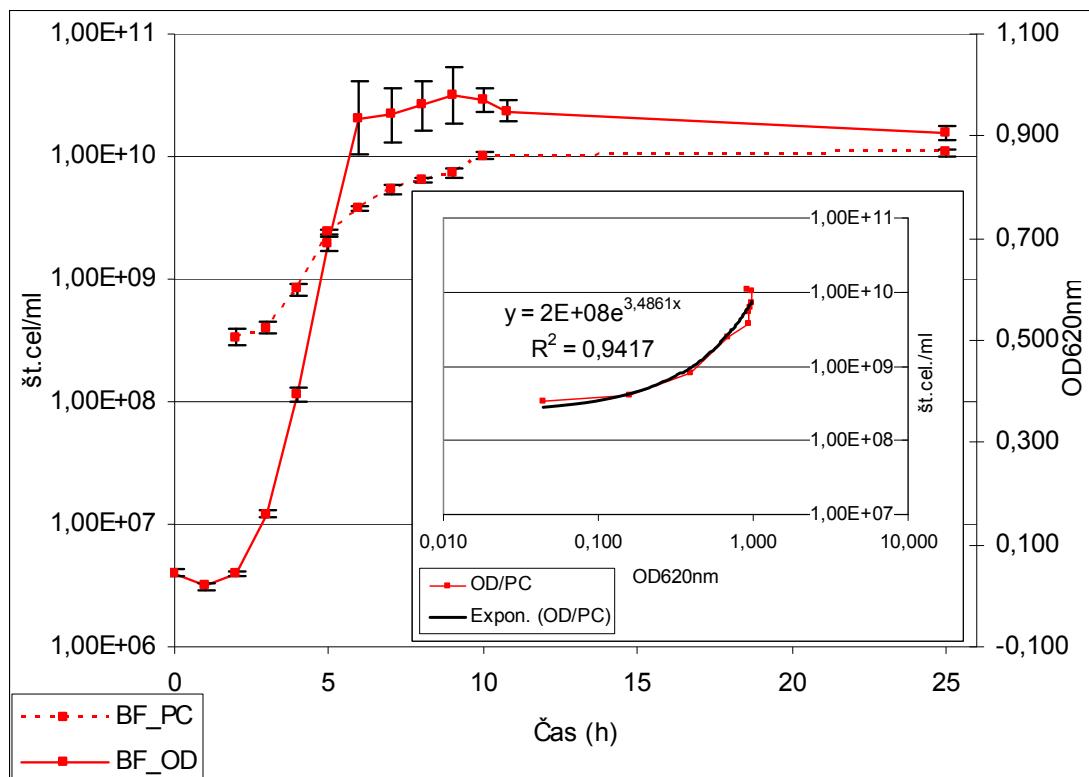
Ob prehodu v stacionarno fazo po 6 urah rasti je dosegla največjo motnost 0,748, ki pa je nato padla na okoli 0,6. Število celic je naraščalo vse do pozne stacionarne faze, najvišja vrednost je znašala $1,15 \times 10^{10}$ celic.ml $^{-1}$. Pri tem sevu smo opazili največjo razliko med vrednostmi motnosti in gostoto kulture. Znova smo opazili dvig motnosti na pričakovanim v prehodu v stacionarno fazo, ki se je zgodil tudi s številom celic, a v manjši meri in z nekajurnim zamikom.



Slika 18: Izmerjena motnost kulture in število celic tekom rasti seva *F. succinogenes* S85. Veliki graf prikazuje izmerjene vrednosti motnosti pri 620 nm (— FS_OD) in koncentracije celic merjene s pretočno citometrijo (- - - FS_PC), mali graf pa prikazuje odvisnost motnosti in števila celic na mililiter (— OD/PC) ter regresijsko eksponentno enačbo (—).

Pri analizi motnosti in števila celic seva *B. fibrisolvens* 3071 smo ugotovili, da gre za dobro korelacijo, kar je kazala tudi visoka vrednost R^2 (slika 19). Merjene vrednosti seva *B. fibrisolvens* 3071 so bile med višjimi, le hitrost rasti je bila srednja (preglednica 10).

Znotraj triurne faze prilagajanja je prišlo do padca motnosti. Prehod v stacionarno fazo se je zgodil po šestih urah. Največjo motnost je dosegel nekaj ur kasneje (po devetih urah rasti) in sicer 0,98. Gostota je bila najvišja pri naslednji meritvi, $1,02 \times 10^{10}$ celic.ml⁻¹. Motnost je bila ob zadnji meritvi malenkost manjša, število celic pa se ni spremenilo.



Slika 19: Izmerjena motnost kulture in število celic tekom rasti seva *B. fibrisolvens* 3071^T. Veliki graf prikazuje izmerjene vrednosti motnosti pri 620 nm (— BF_OD) in koncentracije celic merjene s pretočno citometrijo (- - BF_PC), mali graf pa prikazuje odvisnost motnost in števila celic na mililiter (— OD/PC) ter regresijsko eksponentno enačbo (—).

4.1.2 Značilnost rasti preučevanih sevov

Uporabili smo Baranyi-Robertsov (Baranyi in sod., 1994) model in izračunali maksimalno hitrost rasti preučevanih sevov. Model omogoča tudi oceno trajanja lag faze na podlagi pridobljenih podatkov.

Preglednica 10: Značilnosti rasti preučevanih sevov

	<i>P.bryantii</i>	<i>P.ruminicola</i>	<i>R.albus</i>	<i>R.flavefaciens</i>	<i>F.succinogenes</i>	<i>B.fbrisolvens</i>
$\mu_{\max} (\log 10 \cdot h^{-1})$	0,5078	0,2497	0,4197	0,2308	0,4808	0,3381
$t_{lag} (h)$	1,9	0,6	2,1	3,1	0,7	2,6
OD_{\max}	1,060	0,830	0,519	0,551	0,748	0,980
$N_{\max} (\text{št. celic.mL}^{-1})$	9,76E+09	1,37E+10	1,11E+09	3,15E+08	1,34E+10	1,08E+10

Primerjava podatkov (preglednica 10) nam pokaže različne odnose med pridobljenimi spremenljivkami. Tako najhitreje rastoči sev *P.bryantii* B₁₄ sicer doseže najvišjo optično gostoto, ima pa razmeroma dolgo lag fazo. *P. ruminicola* 23 raste bistveno počasneje in doseže nižjo optično gostoto, vendar ob koncu rasti doseže najvišje število celic.

4.2. PREUČEVANJE VPLIVA MONENZINA IN CINAMALDEHIDA NA RAST IZBRANIH BAKTERIJSKIH SEVOV, *P.BRYANTTI* B₁₄ IN *P. RUMINICOLA* 23

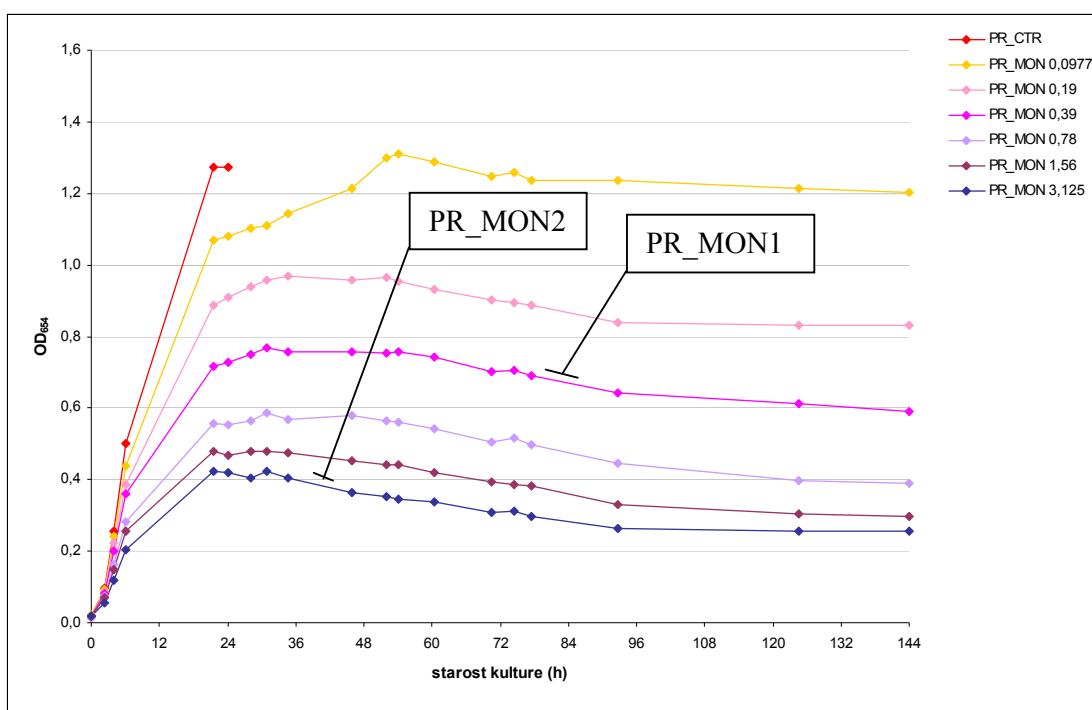
4.2.1 Določanje IC₅₀ monenzina in cinamaldehida

Da bi izmerili IC₅₀ vrednost monenzina in cinamaldehida, smo izbrana seva *P.bryantii* B₁₄ in *P. ruminicola* 23 gojili v gojišču M2 v Hungatovih epruvetah z različnimi koncentracijami preučevanih učinkovin.

Rast smo spremljali s spektrofotometričnim merjenjem motnosti pri 654 nm. Glede na predhodne poskuse smo vedeli, da je motnost v sorazmerju s številom celic, torej je dober pokazatelj dejanskega števila celic v gojišču. Razpon koncentracij monenzina oz.

cinamaldehida, pri katerih smo rast sevov spremljali, smo izbrali na podlagi predhodnih raziskav (Ferme, 2008; Varga, 2009).

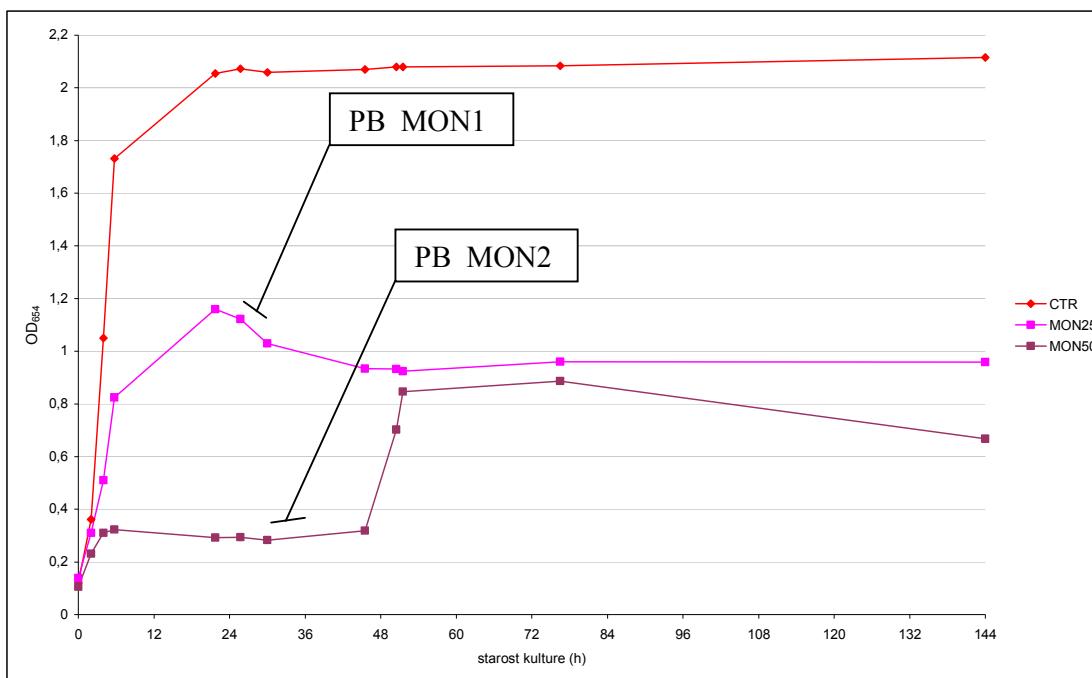
4.2.1.1. Določanje IC_{50} monenzina



Slika 20: Rastne krivulje seva *Prevotella ruminicola* 23 v gojišču M2 brez (PR_CTR) in z različnimi koncentracijami monenzina. Enote v legendi so μmol . Označeni sta krivulji izbranih koncentracij (PR_MON1 in PR_MON2).

Tipski sev vrste *P. ruminicola* 23 smo gojili v gojišču M2 z dodanim monenzinom v koncentraciji od 0,1 do 3,125 μmol . Ob pregledu podatkov (slika 20) smo opazili od koncentracije odvisen odgovor in sicer je monenzin vplival tako na hitrost kot na obseg rasti. Oboje se je ob večji koncentraciji zmanjšalo. Trajanje lag faze se ni bistveno spremenilo. Oblika rastne krivulje je bila podobna kot v preliminarnem poskusu v mikrotitrskih ploščah, le da je bil tokrat obseg rasti večji. Za kasnejše ugotavljanje vpliva monenzina na rast seva *P. ruminicola* 23 smo izbrali koncentracijo 0,39 μmol monenzina, ki smo jo opredelili kot IC_{50} (MON 1), torej koncentracijo, ki je rast seva (v tem poskusu

merjene motnosti) približno prepolovila. V kasnejših analizah smo ob IC_{50} preučevali tudi tiste najvišje koncentracije monenzina, ki so rast še omogočale (MON 2).

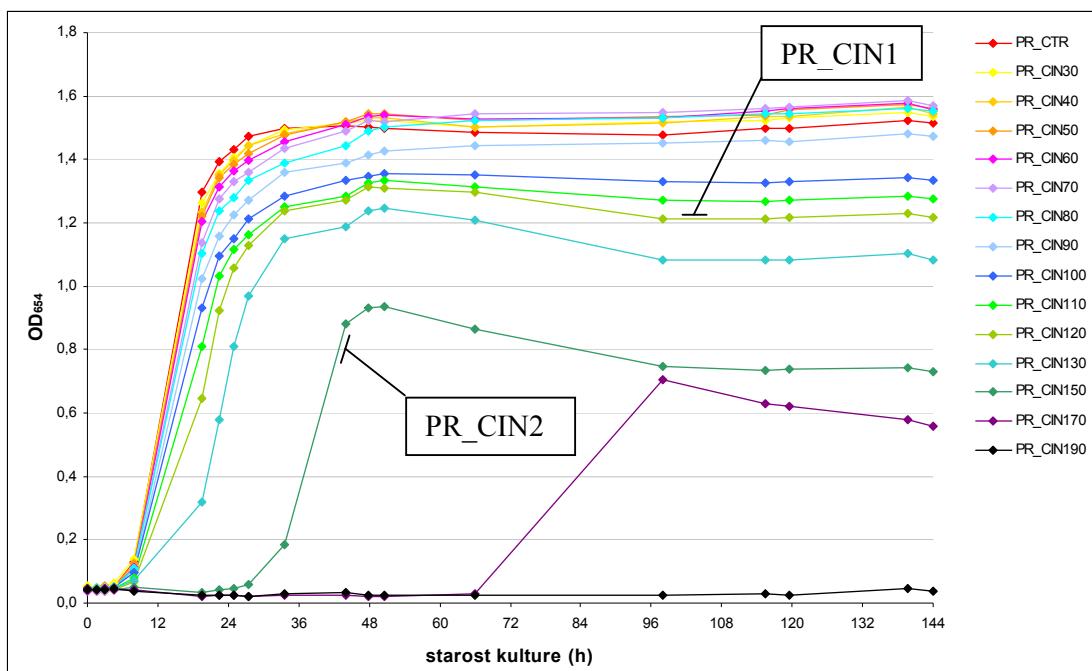


Slika 21: Rastne krivulje seva *Prevotella bryantii* B₁₄ v gojišču M2 brez (CTR) in z različnimi koncentracijami monenzina. Enote v legendi so μmol . Označeni sta krivulji izbranih koncentracij (PB_MON1 in PB_MON2).

Ker so odziv seva *P. bryantii* B₁₄ na monenzin že večkrat preučevali (Callaway in Russell, 2000; Ferme 2008; Varga 2009), smo na podlagi že objavljenih podatkov preizkusili le vpliv dveh izbranih koncentracij monenzina na rast seva *P. bryantii* B₁₄ (slika 21). Koncentracija monenzina 25 μmol je ustrezala vrednosti IC_{50} (MON 1), koncentracija 50 μmol pa koncentraciji MON2. Analiza podatkov je prav tako pokazala od koncentracije odvisen odgovor, a nekoliko drugačen kot v primeru seva *P.ruminicola* 23. Faza prilagajanja je bila še krajsa, tako pri kontrolni skupini, kot tudi pri kulturah, ki sta rastli v gojišču z monenzinom. Povečana koncentracija monenzina je zmanjšala obseg rasti, IC_{50} kot pričakovano približno na polovico. Rast v gojišču z 50 μmol monenzina (MON2) pa je potekala v dveh fazah. Sprva skoraj enako hitro kot v kontrolnem gojišču, po 7 urah rasti pa je prišlo do popolne inhibicije. Po 46 urah je kultura začela ponovno rasti, dosegla v približno 5 urah skoraj polovičen obseg v primerjavi s kontrolo ($OD_{654} = 0,85$) in nato

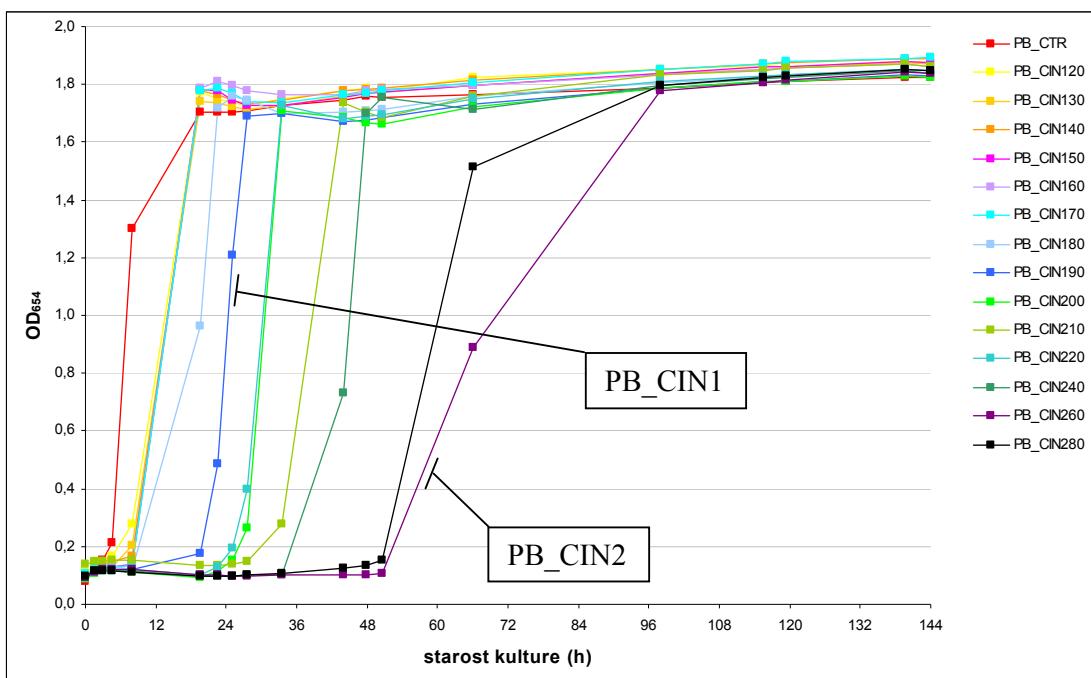
znova prenehala rasti. Tako kot v primeru seva *P.ruminicola* 23, se je tudi sevu *P.bryantii* B₁4 povečal obseg rasti glede na gojenje v mikrotitrski plošči.

4.2.1.2. Določanje IC₅₀ cinamaldehida



Slika 22: Rastne krivulje seva *Prevotella ruminicola* 23 v gojišču M2 brez (PR_CTR) in z različnimi koncentracijami cinamaldehida. Enote v legendi so mg/L. Označeni sta krivulji izbranih koncentracij (PR_CIN1 in PR_CIN2).

Pri analizi podatkov o rasti *P.ruminicola* 23 v gojišču M2 z dodanim cinamaldehidom (slika 22), smo prav tako opazili od koncentracije odvisen odgovor. Hitrost rasti se je razen pri najvišjih dveh koncentracijah le malo spremenila. Do koncentracije cinamaldehida 90 mg/L se je obseg rasti proti pričakovanjem celo malenkost povečal. Pri koncentracijah cinamaldehida nad 90 mg/L pa se je obseg rasti v primerjavi s kontrolo zmanjšal. Pri koncentracijah nad 120 mg/L smo opazili podaljševanje lag faze. Največja koncentracija pri kateri smo rast še zaznali, je bila 170 mg/L, in tu je bila faza prilaganja daljša od 66 ur. IC₅₀ smo določili pri koncentraciji cinamaldehida 120 mg/L (CIN 1) in koncentracijo CIN 2 pri 150 mg/L.



Slika 23: Rastne krivulje seva *Prevotella bryantii* B₁₄ v gojišču M2 brez (PB_CTR) in z različnimi koncentracijami cinamaldehida. Enote v legendi so mg/L. Označeni sta krivulji izbranih koncentracij (PB_CIN1 in PB_CIN2).

Analiza podatkov o rasti seva *P. bryantii* B₁₄ v gojišču M2 z naraščajočimi koncentracijami cinamaldehida (slika 23) je pokazala, da je bil pri vseh vzorcih obseg rasti enak (OD približno 1,8). Sev se je odzival na naraščajoče koncentracije cinamaldehida s podaljševanjem faze prilagajanja. Ta se je podaljševala do 48 ur. Ko je kultura pričela rasti, večjih razlik v hitrosti rasti nismo opazili. Čeprav izgleda, kot da cinamaldehid pri *P. bryantii* B₁₄ le podaljšuje fazo prilagajanja, je izvleček v še višji koncentraciji (300 in 600 mg.l⁻¹) rast seva povsem zavrl (rezultati niso prikazani).

Na podlagi pridobljenih podatkov (slike 20,21,22 in 23) smo določili iskane koncentracije IC₅₀ za monenzin in cinamaldehid za oba seva. Ker v primeru rasti seva *P. bryantii* B₁₄ (slika 20) v gojišču z cinamaldehidom nismo opazili zmanjšanega obsega rasti, pač pa le podaljševanje lag faze, smo v tem primeru priredili pravilo za IC₅₀ in arbitrarno izbrali koncentracijo 190 mg/L, pri kateri se je faza prilagajanja podaljšala do 20 ur inkubacije.

Preglednica 11: Izmerjene koncentracije MON1, MON2, CIN1 in CIN2 za seva *P.bryantii* B₁4 in *P.ruminicola* 23

	<i>P. bryantii</i> B ₁ 4	<i>P. ruminicola</i> 23
MON1	25 µM	0,391 µM
MON2	50 µM	3,125 µM
CIN1	1,438 mM (190 mg/L)	0,908 mM (120 mg/L)
CIN2	1,967 mM (260 mg/L)	1,135 mM (150 mg/L)

4.2.2 Ugotavljanje vpliva monenzina in cinamaldehida v koncentraciji IC₅₀ na rast preučevanih sevov

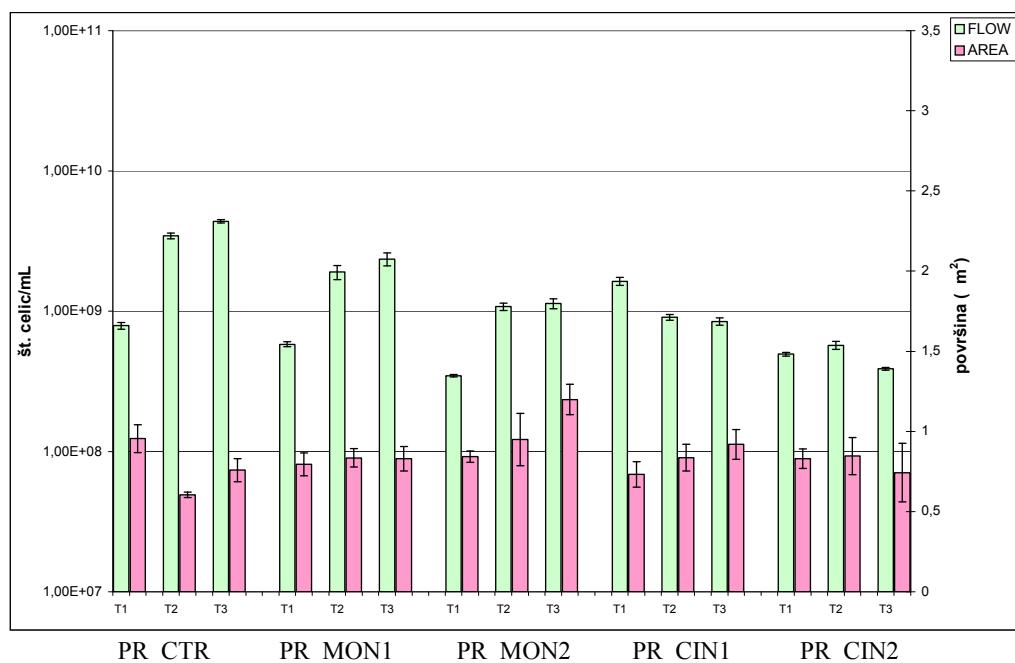
Vse omenjene parametre smo merili v treh rastnih fazah:

- T1 - čas po katerem motnost naraste na polovico maksimalne, torej nekako v sredini eksponentne faze rasti
- T2 - čas, ko začne upadati naraščanje motnosti, torej smo nekje na meji med eksponentno in stacionarno rastno fazo
- T3 - čas po katerem se motnost neha spremenjati ali celo začne začne upadati, torej so celice v stacionarni fazi rasti (celice odmirajo)

4.2.2.1 Ugotavljanje vpliva monenzina in cinamaldehida v koncentraciji IC₅₀ na rast *P. ruminicola* 23

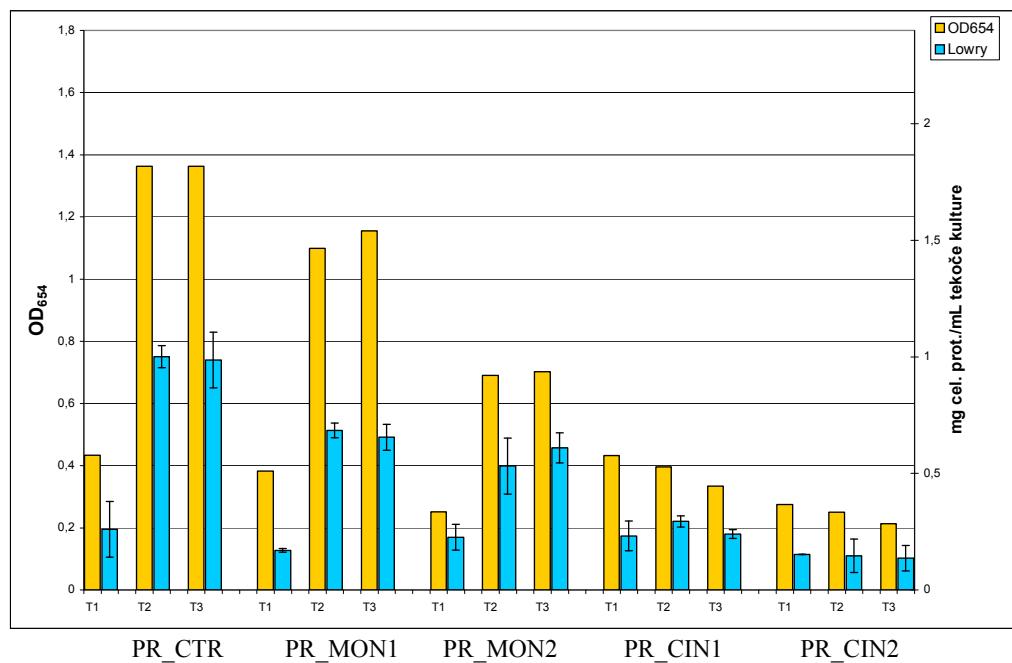
Po analizi izmerjenih podatkov smo opazili, da se povprečna velikost celic seva *P. ruminicola* 23 med rastjo v gojišču M2 s časom zmanjša za približno 35 % (Slika 24, priloga B). Pri dodani nižji koncentraciji monenzina (MON1 = IC₅₀) se je število celic, motnost in koncentracija celičnih beljakovin v primerjavi s kontrolo (torej kulturo seva 23, ki je rastla v gojišču M2 brez dodanih učinkovin) sorazmerno znižala (Slika 24, 25), ni pa se spremenila ploščina celic (ki je v bistvu pokazatelj velikosti celic). Pri višji koncentraciji monenzina (MON2) se je število celic, motnost in koncentracija celičnih beljakovin še bolj

znižali, razen povprečne velikosti celic, ki se je v kasnejših fazah rasti (T2 in T3) celo povečala.



Slika 24: Prikaz izmerjene koncentracije in ploščine celic seva *P. ruminicola* 23 v treh fazah rasti v gojišču M2 z dodanim monenzinom oz. cinamaldehidom v dveh koncentracijah (glej preglednico 11).

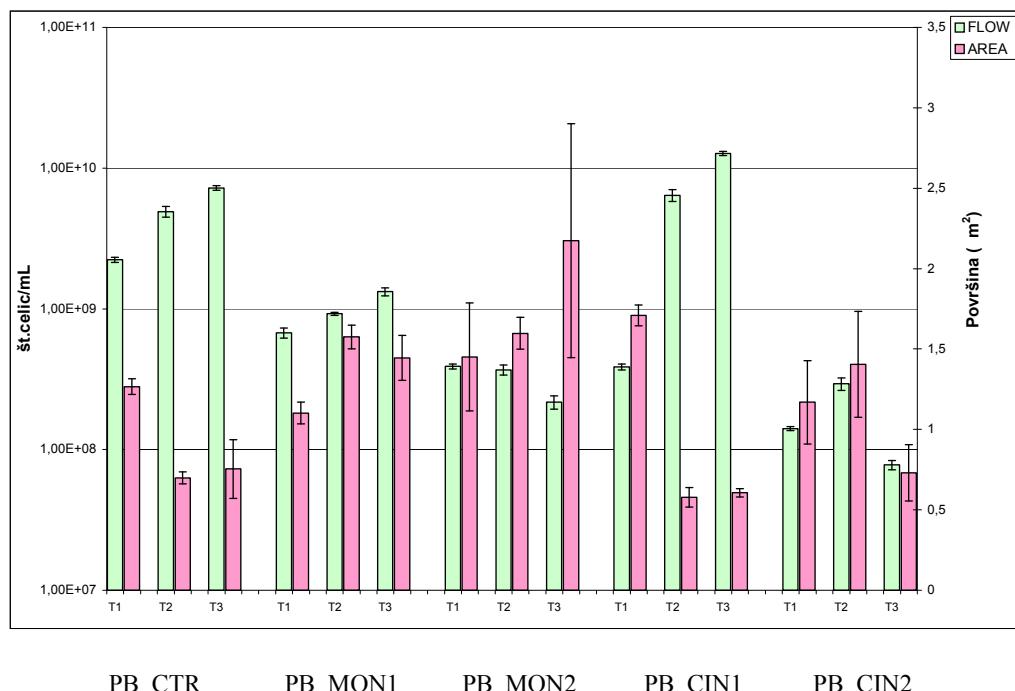
V gojiščih z dodanim cinamaldehidom je sev *P. ruminicola* 23 rastel slabše od pričakovanj, saj je kultura dosegla maksimalno optično gostoto 0,43 v času T1 pri koncentraciji IC₅₀ (CIN 1). Obe koncentraciji cinamaldehida sta povzročili padec števila celic in količine celičnih beljakovin v primerjavi s kontrolo, medtem ko je velikost celic ostala bolj ali manj nespremenjena. Za razliko od vpliva monenzina na sev *P. ruminicola* 23, pri katerem so se vsi parametri razen ploščine celic v kasnejših fazah povečevali, smo pri cinamaldehidu lahko v kasnejših fazah rasti opazili zmanjšanje števila celic in motnosti.



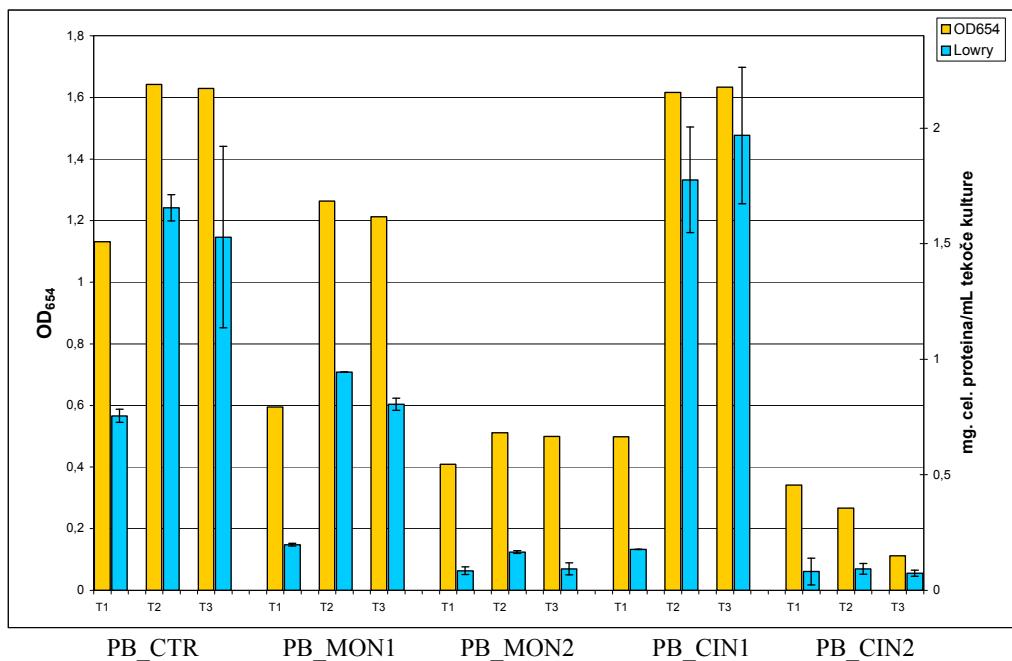
Slika 25: Prikaz izmerjene motnosti in količine celičnih beljakovin seva *P. ruminicola* 23 v treh fazah rasti v gojišču M2 z dodanim monenzinom oz. cinamaldehidom v dveh koncentracijah (glej preglednico 11).

4.2.2.2 Ugotavljanje vpliva monenzina in cinamaldehida v koncentraciji IC_{50} na rast *P. bryantii* B₁₄

Tako kot v primeru *P. ruminicola* 23, smo tudi pri tem sevu opazili zmanjšanje celic med rastjo v gojišču M2 za približno 45 % (Slika 26, priloga B). Ob dodatku nižje koncentracije monenzina (MON1 = IC_{50}), pri čemer moramo opozoriti, da je IC_{50} za sev B₁₄ več kot 50 krat višji od IC_{50} za sev 23, so se izmerjene vrednosti motnosti, števila celic in količine celičnih beljakovin prav tako znižale glede na kontrolo pri vseh treh časih (Slika 26, 27). Opazili pa smo obratno spremembo v velikosti celic, ki je tokrat s časom naraščala. Ob dodatku višje koncentracije monenzina (MON2), smo ugotovili podobno, le število celic je za razliko od kontrole in vzorca MON1 s časom padalo, in ne naraščalo. Na mikroskopskih slikah (Slika 28) lahko vidimo jasno povečanje velikosti celic *P. bryantii* B₁₄ po rasti v gojišču M2 z dodanim monenzinom. Pri teh povečanih celicah smo opazili črne zažetke na različnih delih celic.

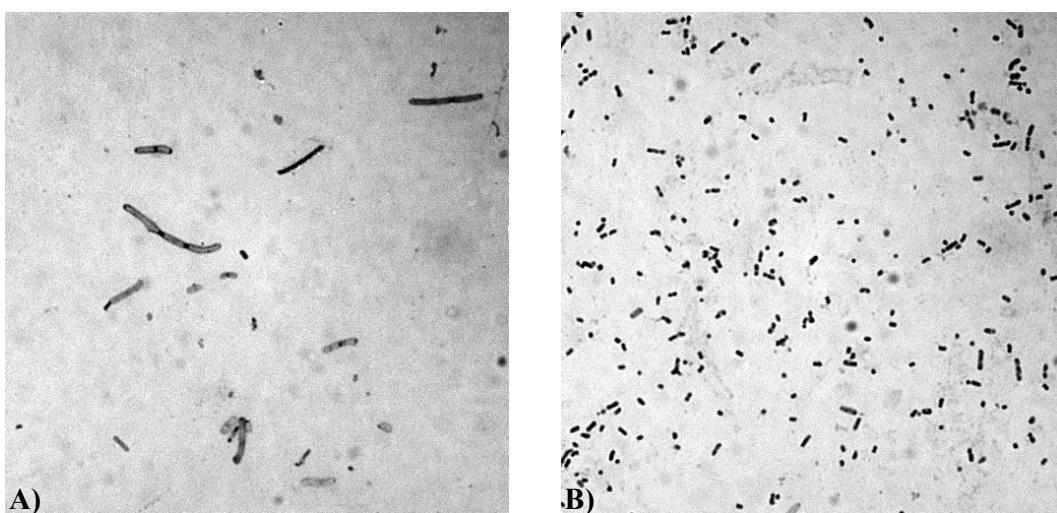


Slika 26: Prikaz izmerjene koncentracije in ploščine celic seva *P. bryantii* B₁₄ v treh fazah rasti v gojišču M2 z dodanim monenzinom oz. cinamaldehidom v dveh koncentracijah (glej preglednico 11).



Slika 27: Prikaz izmerjene optične gostote in količine celičnih beljakovin seva *P. bryantii* B₁₄ v treh fazah rasti v gojišču M2 z dodanim monenzinom oz. cinamaldehidom v dveh koncentracijah (glej preglednico 11).

opažanje po analizi izmerjenih podatkov o rasti seva *P. bryantii* B₁₄ rasti v gojišču M2 z dodanim cinamaldehidom je bilo, da so se celice med rastjo v gojišču M2 zelo različno odzvale na prisotnost cinamaldehida v različnih koncentracijah (CIN1 = IC₅₀ = 1,438 mM in CIN2 = 1,967 mM). Cinamaldehid v nižji koncentraciji (CIN1) kljub začetnemu inhibitornemu učinku (upad števila celic, manjša motnost), kasneje navidezno ne vpliva na rast (slika 26,27). Število celic in količina celičnih beljakovin je bila v časih T2 in T3 celo višja kot pri kontroli. Meritve so tudi pokazale, da so bile celice večje kot pri kontroli v času T1, medtem ko so v časih T2 in T3 malo manjše. Ob dodatku višje koncentracije cinamaldehida (CIN2), je inhibitorni učinek bolj izrazit. To se najbolj očitno kaže s zmanjšanjem motnosti in koncentracije celičnih beljakovin. Tudi število celic je nižje kot v primerjavi s kontrolo. Velikost celic pa je bila podobna kot v kontroli.



Slika 28: Mikroskopski posnetek po Gramu barvanih celic *P. bryantii* B₁4 po rasti v gojišču M2 z (A) ali brez (B) monenzina v koncentraciji MON2 v času T3 pri 1000X povečavi

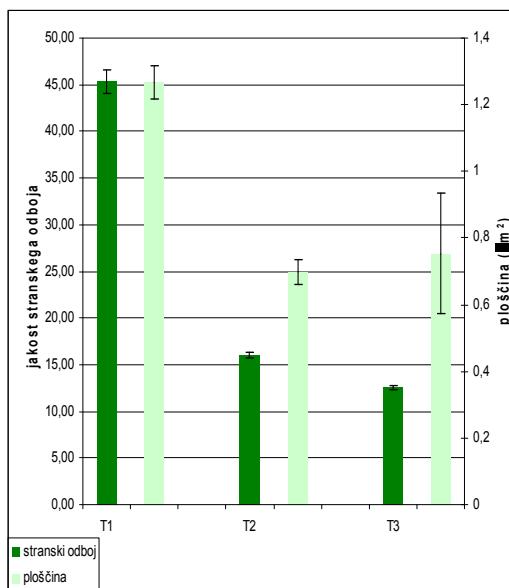
4.4.3 Velikost delcev in stranski odboj laserskega žarka v pretočnem citometru

Poznano je, da je lahko velikost delcev sorazmerna s prednjim ali s stranskim odbojem svetlobe v pretočnem citometru, odvisno od lastnosti delcev in pretočnega citometra. Pri analizi naših vzorcev s pretočnim citometrom smo opazili, da so se vrednosti stranskega odboja v nekaterih primerih skladale z velikostjo celic izmerjeno z mikroskopom. Ta odnos je že bil opisan pri analizi planktonskih bakterij iz mediteranskega morja s pretočnim citometrom istega proizvajalca (Becton-Dickinson) s podobnim optičnim in tekočinsko-pretočnim sistemom (Troussellier, 1999). Izvedli smo predposkus s kroglicami iz lateksa različnih velikosti, ki je pokazal, da je tudi v primeru naše naprave stranski odboj v linearinem sorazmerju z velikostjo delcev (Lipoglavšek, 2005). Večji stranski odboj torej pomeni večji delec.

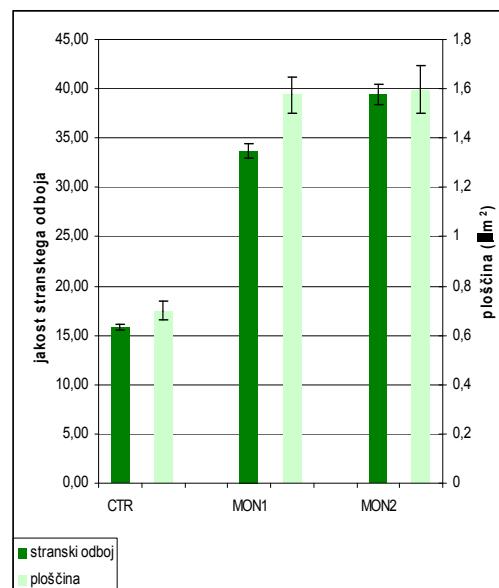
Ko smo šteli celice v kulturi s pretočnim citometrom smo istočasno pridobivali tudi podatke o jakosti stranskega odboja celic. Preučili smo podatke o stranskem odboju celic *P. ruminicola* 23 in *P. bryantii* B₁4, ki smo jih gojili v gojišču z ali brez monenzina oz. cinamaldehida in poskušali ugotoviti, ali lahko mikroskopsko opažene spremembe velikosti celic potrdimo tudi s podatki o jakosti stranskega odboja svetlobe s pretočno

citometrijsko analizo. Domnevali smo, da ta metoda ne bo dala tako natančnih in zanesljivih podatkov kot mikroskopska analiza. V kolikor pa bi rezultati obeh metod bili primerljivi, pa bi bila zaradi možnosti delne ali popolne avtomatizacije procesa pretočna citometrija zelo uporabna za sprotno preverjanje sprememb v velikosti celic pri velikem številu vzorcev.

V nalogi smo prikazali tri primere, pri katerih je prišlo do jasne spremembe v velikosti celic. Grafi prikazujejo povprečja vrednosti stranskega odboja štirih meritev iz dveh paralelk, v vsaki meritvi pa smo analizirali približno 2000 celic.



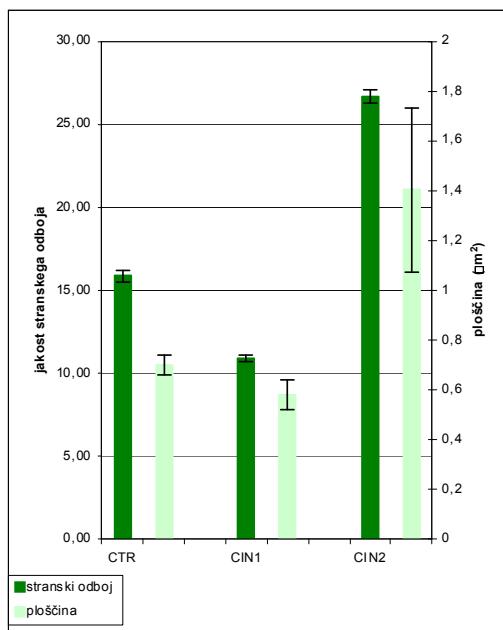
Slika 29: Prikaz jakosti stranskega odboja (temno zeleni stolpci) in ploščine (svetlo zeleni stolpci) seva *P.bryantii* B₁4 v treh fazah rasti v gojišču M2



Slika 30: Prikaz jakosti stranskega odboja (temno zeleni stolpci) in ploščine (svetlo zeleni stolpci) seva *P.bryantii* B₁4 v času T2 v gojišču M2. Prvi par stolpcov predstavlja kontrolno skupino, drugi par skupino z dodatkom monenzina v koncentraciji MON1, tretji par pa skupino z dodatkom monenzina v koncentraciji MON2.

Prvi graf (slika 29) prikazuje jakost stranskega odboja celic *P.bryantii* B₁4 v treh izbranih rastnih fazah (glej poglavje 4.2.2) po rasti v gojišču M2 brez dodatkov. Jakost stranskega odboja je v tem primeru padla z začetnih 45,4 enot (relativne enote jakosti stranskega odboja) v času T1 na 16,0 enot v času T2. V času T3 je bila sprememba manjša, in sicer se je znižala na 12,6. Rezultati se skladajo z rezultati mikroskopske analize celične ploščine, opazili pa smo precej manjša odstopanja od ugotovljenih srednjih vrednosti kot pri

mikroskopski analizi. Razlog je verjetno v bistveno manjšem številu preučenih celic z mikroskopsko analizo. Na drugem grafu (slika 30) nismo vzorcev primerjali po času, ampak po koncentraciji monenzina, ki je bil dodan v gojišče. Analizirali smo *P.bryantii* B₁4 v času T2, v katerem so bile glede na mikroskopsko analizo razlike v velikosti celic največje (slika 30). Medtem ko smo pri kontrolni skupini izmerili stranski odboj 16 relativnih enot, je bil pri vzorcu MON1 več kot dvakrat višji (33,7) in še nekoliko višji pri vzorcu MON2 (39,5). Tudi v tem primeru so se rezultati skladali z rezultati mikroskopske analize celične ploščine, in tudi v tem primeru smo opazili večje odstopanje od ugotovljene srednje vrednosti pri ugotavljanju ploščine celic z mikroskopsko analizo.



Slika 31: Prikaz jakosti stranskega odboja (temno zeleni stolpci) in ploščino (svetlo zeleni stolpci) seva *P.bryantii* B₁4 v času T2 v gojišču M2. Prvi par stolpcov predstavlja kontrolno skupino, drugi par skupino z dodatkom cinamaldehida v koncentraciji CIN1, tretji pa skupino z dodatkom cinamaldehida v koncentraciji CIN2.

Treći graf (slika 31) se od drugega razlikuje le po uporabljeni učinkovini, to je cinamaldehidu. V vzorcu CIN1 smo izmerili stranski odboj 10,9 relativnih enot, v vzorcu CIN2 pa 26,7 relativnih enot. Čeprav so tu razlike manjše kot v primeru dodatka monenzina, so se rezultati prav tako ujemali z rezultati mikroskopske analizo. Tudi v tem

primeru smo opazili večje sisanje rezultatov pri ugotavljanju ploščine celic z mikroskopsko analizo.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1. 1 Rast preučevanih bakterijskih sevov v gojišču M2 v mikrotitrskih ploščah

Ker smo želeli pri naši raziskavi preučevati dokaj veliko število vzorcev (spremljali smo rast šestih bakterijskih sevov v paralelkah v več časovnih točkah), smo se odločili za gojenje bakterijskih sevov v mikrotitrskih ploščah v anaerobni komori. Motnost kultur smo merili s čitalcem mikrotitrskih plošč vstavljenim anaerobno komoro, število celic v vzorcih pa s pretočnim citometrom, ki tudi omogoča analizo velikega števila vzorcev v relativno kratkem času. S primerjavo motnosti kulturo in gostote celic smo ugotovili, da obstaja med temo vrstama podatkov dobra korelacija za večino sevov.

Izkazalo se je, da so preučevani bakterijski sevi rastli do neke mere drugače kot v Hungatovih epruvetah in sicer je bila lag faza praviloma krajsa, obseg rasti v mikrotitrskih ploščah pa je bil pri vseh sevih manjši. Razlogi za to bi lahko bili manj ugodne anaerobne razmere v mikrotitrskih ploščah v primerjavi z razmerami v Hungatovih epruvatah ali manjša količina gojišča v katerem so bakterije rastle. Kljub temu pa smo po primerjavi rezultatov rasti v mikrotitrskih ploščah lahko prišli do podobnih ugotovitev kot naši predhodniki v enakem gojišču (Ferme, 2008; Zajc, 2007; Kocbek, 2007; Mankoč, 2007; Mislej, 2007), ki so te seve gojili na običajen način v Hungatovih epruvetah.

Pri najhitreje rastočem sevu *P.bryantii* B₁₄ smo izmerili tudi največjo motnost kulture ob koncu rasti, po številu celic pa se je ta sev uvrstil šele na četrto mesto (preglednica 10). Višje število celic smo izmerili pri *F.succinogenes* S85, *P. ruminicola* 23 in *B.fibrisolvens* 3071 pri katerih pa smo izmerili manjšo motnost kulture. Najslabše sta rastla oba seva iz rodu *Ruminococcus*, ki sta se v vseh pogledih uvrstila na zadnja mesta, z izjemo maksimalne hitrosti rasti pri sevu *R. albus* 20554. Ob pregledu podatkov lahko vidimo, da za podrobnejši opis rasti preučevanih sevov ne zadostuje posamezen podatek (npr. največkrat uporabljena meritev motnosti kulture), ampak šele kombinacija več izmerjenih parametrov. Na zgornjih primerih smo videli, da je rast hitrorastočega seva lahko le kratkotrajna in ne privede nujno do visokega števila celic. Na drugi strani pa so sevi s počasno rastjo vztrajali

dlje in dosegali višje število celic. Podobno se izkaže za parameter motnosti, ki ni vedno dober pokazatelj gostote kulture glede na število celic. Tako smo npr. pri sevu *P. ruminicola* 23 kljub očitno manjši doseženi motnosti (0,83) v primerjavi s sevom *P.bryantii* B₁₄ (1,06), prešteli podobno oz. celo večje število celic ($1,37 \times 10^{10} \cdot \text{ml}^{-1}$ in $9,76 \times 10^9 \cdot \text{ml}^{-1}$)

Opazili smo tudi nekatere nenavadnosti v posameznih fazah rasti pri nekaterih preučevanih sevih. Tako smo ob prehodu kulture *P.bryantii* B₁₄ (slika 14) v stacionarno fazo opazili odstopanje navzgor v številu celic glede na pričakovano (brez dviga motnosti kulture). Ta pojav smo opazili tudi pri sevu *F. succinogenes* S85 (slika 18), vendar se je pri nekaterih sevih število celic znižalo (*R. flavefaciens* 007 S/6 in *P. ruminicola* 23; sliki 15 in 17) in ne povišalo. Glede na to, da smo ta dogodek zaznali le s pretočnim citometrom, je možno, da je prišlo do neznanih sprememb na površini celic. Zaradi principa delovanja citometra (odboj laserskega žarka) je površina celic namreč zelo pomemben dejavnik, ki lahko vpliva na meritve.

V primerih sevov *R. flavefaciens* 007 S/6 (slika 17) in *B. fibrisolvens* 3071 (slika 19) se je standardna deviacija motnosti po prehodu v stacionarno fazo povišala. To smo si razlagali s pojavom skupkov celic (grozdi v primeru ruminokokov oz. verižic v primeru butirivibrijev), kar smo potrdili tudi z mikroskopskim opazovanjem. Nastanek skupkov pa ni imel večjega vpliva na analizo s pretočnim citometrom, čeprav bi lahko bil skupek zaznan kot en velik dogodek. Možno je, da je vez med celicami šibka in je zaradi stresanja z vrtinčnim mešalom pred merjenjem razpadla.

Pri sevu *F. succinogenes* S85 (slika 18) je motnost med logaritemsko fazo rasti strmo naraščala, kar pa se ni skladalo z ugotovljenim številom celic. Zaradi te razlike smo izračunali najnižjo korelacijo med izmerjeno motnostjo kulture in številom celic v njej ($R^2 \approx 0,89$). Veliko razliko med številom celic in motnost smo si razlagali z obliko celic. Fibrobaktri so namreč tanke palčke, medtem ko so ostali sevi koki ali ovalne palčke. Tudi sev *B. fibrisolvens* 3071 (slika 19) ima paličasto obliko, vendar so te bakterije nekoliko

debelejše. V tem primeru je bila tudi korelacija med motnost in številom celic boljša ($R^2 \approx 0,94$).

5.1.2 Preučevanje vpliva monenzina in cinamaldehida na rast sevov *P. bryantii* B₁₄ in *P. ruminicola* 23

5.1.2.1 Ugotavljanje IC₅₀ za monenzin in cinamaldehid

Vpliv monenzina in cinamaldehida na rast vamnih bakterij smo želeli preučevati pri koncentraciji IC₅₀, ker smo predvidevali, da je pri tej koncentraciji učinek že dovolj izrazit, hkrati pa lahko še vedno spremljamo rast preučevanih sevov. Zaradi spoznanj iz podobnih raziskav, ki so potekale vzporedno (Ferme, 2008; Varga, 2009), smo za nadaljne raziskave izbrali le predstavnika rodu *Prevotella* iz naslednjih razlogov:

- seva iz rodu *Prevotella* sta sorodna in imata enak tip celične stene
- sev *P. bryantii* B₁₄ je bil modelni sev za preučevanje vpliva različnih učinkovin (tudi monenzina) na rast v mnogih študijah
- želeli smo ugotoviti, ali so mehanizmi delovanja pri sorodnih organizmih enaki ali različni

Za gojenje v Hungatovih epruvetah smo se v tem delu diplomske naloge odločili zaradi več razlogov: (i) v Hungatovih epruvetah so bili izvedeni že mnogi predhodni poskusi opisani v literaturi, (ii) ker smo preučevali vpliv relativno nizkih koncentracij učinkovin, smo izbrali poskusni model z cca. 25 krat večjo količino gojišča, kar je omogočalo večjo natančnost in zanesljivost raziskave, (iii) potrebovali smo večjo količino vzorca za analize, ki smo jih nameravali opraviti (pretočna citometrija, Lowry test, mikroskopija), kot ga je bilo na razpolago ob rasti v mikrotitrskih ploščah.

Ob pregledu podatkov poskusa, v katerem smo preučevali vpliv monenzina na rast *P. ruminicola* 23 (slika 20), smo opazili od koncentracije odvisen odgovor in sicer je monenzin vplival tako na hitrost kot na obseg rasti. Naraščajoča koncentracija monenzina v gojišču je povzročila zmanjšanje hitrosti in obsega rasti, ki smo ju ugotovljali na podlagi

merjanja motnosti kulture. Uspeli smo določiti IC_{50} ($0,39 \mu\text{M}$), in tisto najvišjo koncentracijo, ki je še dovoljevala rast seva. To smo poimenovali MON2 ($3,125 \mu\text{M}$).

Podoben odziv smo opazili tudi pri rasti seva *P. bryantii* B₁4 v gojišču z monenzinom (slika 21). Tokrat je bila IC_{50} kar $64 \times$ višja koncentracija monenzina kot pri sevu *P. ruminicola* 23. Naraščajoča koncentracija monenzina v gojišču je zmanjšala obseg rasti. Hitrost rasti se je v nižji koncentraciji zmanjšala, v višji pa je prišlo do rasti v dveh fazah. Ker smo pri sevu B₁4 zaradi že predhodno opravljenih študij (Callaway in Russell, 2000, Ferme 2008, Varga 2009) preučili vpliv le dveh koncentracij monezina na rast, smo drugo (višjo) koncentracijo monenzina ($50 \mu\text{M}$) opredelili kot koncentracijo MON2.

Ob preučevanju vpliva različnih koncentracij cinamaldehida na rast seva *P. ruminicola* 23, smo tudi opazili od ko centracije odvisen odgovor (slika 22). IC_{50} smo določili pri koncentraciji $0,91\text{mM}$ cinamaldehida (CIN1), višjo koncentracijo, pri kateri je bila rast še opazna, pa pri $1,13 \text{ mM}$ cinamaldehida (CIN2). Rast smo opazili tudi pri višji koncentraciji ($1,29 \text{ mM}$), a je bila tu lag faza zelo dolga ($\approx 3\text{dn}i$), kar je predstavljalo oviro za izvedbo poskusa.

Opazovanje rasti seva *P. bryantii* B₁4 v gojišču s cinamaldehidom je pokazalo, da povečane koncentracije cinamaldehida podaljšajo lag fazo, ne vplivajo pa na obseg rasti (slika 23). Tudi hitrost rasti se je pri višjih koncentracijah le malo zmanjšala. Ker tu nismo mogli določiti IC_{50} na podlagi zmanjšanja motnosti, smo koncentracije izbrali arbitrarno glede na fazo prilagajanja. CIN1 smo določili pri koncentraciji cinamaldehida $1,44 \text{ mM}$ (faza prilagajanja je tu trajala približno 1 dan), CIN2 pa pri koncentraciji $1,97 \text{ mM}$ (faza prilagajanja je trajala približno 2 dni). Koncentraciji sta 58% oziroma 74% višji kot pri sevu *P. ruminicola* 23.

Ob primerjavi izbranih koncentracij (preglednica 11) je očitno, da je cinamaldehid veliko manj učinkovit pri zaviranju rasti opazovanih sevov od monenzina. Koncentracija cinamaldehida, ki še omogoča rast, je $39 \times$ višja kot podobno učinkovita koncentracija monenzina pri sevu *P. bryantii* B₁4 in kar $413 \times$ višja pri sevu *P. ruminicola* 23. Hkrati pa

vidimo, da je sev *P. bryantii* B₁₄, ki raste pri veliko višjih koncentracijah monenzina kot sev *P. ruminicola* 23, prenesel le malo višjo koncentracijo cinamaldehida.

5.1.2.2 Analiza vpliva monenzina in cinamaldehida na rast preučevanih bakterij

V tem delu diplomske naloge smo gojili seva *P. ruminicola* 23 in *P. bryantii* B₁₄ v gojišču M2 brez in z monenzinom oz. cinamaldehidom v koncentraciji IC₅₀ in še v eni višji koncentraciji, ki je še dovoljevala rast preučevanega seva. Analizirali smo vpliv učinkovin na štiri lastnosti, ki so povezane z rastjo: motnost kulture, koncentracijo celic v gojišču, ploščino celic in količino celičnih beljakovin. Vse omenjene parametre smo merili v treh rastnih fazah:

- T1 - čas po katerem motnost naraste na polovico maksimalne, torej nekako v sredini eksponentne faze rasti
- T2 - čas, ko začne upadati naraščanje motnosti, torej smo nekje na meji med eksponentno in stacionarno rastno fazo
- T3 - čas po katerem se motnost neha spreminjati ali celo začne začne upadati, torej so celice v stacionarni fazi rasti (celice odmirajo)

Pri pregledu rezultatov smo opazili, da je bila rast preučevanih bakterij glede na izmerjeno motnost do neke mere drugačna kot v predhodnih poskusih in da je monenzin inhibiral preučevana seva manj, cinamaldehid pa bolj. Domnevamo, da je to povezano z razlikami v koncentraciji uporabljenih učinkovin. Opazili pa smo enak princip delovanja, in sicer je monenzin v koncentraciji MON1 in MON2 zmanjšal doseženo motnost obeh sevov (*P. bryantii* B₁₄ in *P. ruminicola* 23). Cinamaldehid v koncentraciji CIN1 je sevu *P. bryantii* B₁₄ le podaljšal lag fazo, ni pa zmanjšal obsega rasti. V koncentraciji CIN2 mu tudi podaljša lag fazo in močno zmanjša obseg rasti. Sev *P. ruminicola* 23 je imel v obeh poskusih pri koncentraciji cinamaldehida CIN1 zmanjšan obseg rasti in podobno dolgo lag fazo kot kontrolna skupina, ob dodatku cinamaldehida v koncentraciji CIN2 pa se je obseg rasti še pomanjšal in tudi lag faza se je podaljšala.

Pri merjenju motnosti nismo opazili večjih posebnosti (slika 25 in 27). Monenzin je pri obeh sevih zmanjšal motnost, v nižji koncentraciji manj, v višji bolj. Opazili smo le, da se je motnost seva *P. bryantii* B₁4 med fazama T2 in T3 rahlo zmanjšala, pri sevu *P. ruminicola* 23 pa se je rahlo povečala. Bolj raznoliki so učinki cinamaldehida. V primeru seva *P. ruminicola* 23 je motnost veliko manjša kot pri kontroli (pri CIN2 manjša kot pri CIN1) in se je manjšala vse od faze T1 do T3. Do podobnega opažanja smo prišli tudi v primeru *P. bryantii* B₁4 pri višji koncentraciji cinamaldehida. Pri koncentraciji CIN1 pa je sev kljub nekoliko manjši motnosti v točki T1 dosel podobno veliko motnost kot kontrola v točkah T2 in T3 (v točki T3 celo rahlo večjo).

Iz znanstvene literature je poznano dejstvo, da se začne povprečna velikost bakterijskih celic v kulturi zmanjševati že med rastjo v eksponentni fazi (Åkerlund in sod., 1995). Tudi pri naših poskusih smo opazili, da so bile celice obeh preučevanih sevov v vzorcih odvzetih v stacionarni fazi rasti (T2 in T3) opazno manjše kot celice med eksponentno fazo rasti (T1) (slika 24 in 26). Ta pojav smo v poskusih, v katerih sta seva rastla v gojišču z monezinom in cinamaldehidom, opazili le v primeru seva *P. bryantii* B₁4 pri koncentraciji CIN1 (slika 26). V drugih primerih so bile celice v vzorcih T2 in T3 enako velike (sev *P. ruminicola* 23 MON1 in CIN2; slika 24) ali celo večje kot v vzorcih T1 (*P. bryantii* B₁4 pri MON1 in MON2 (slika 26), *P. ruminocola* 23 pri MON2 (slika 24)). Možna razloga je, da učinkovine ovirajo delitev celic, kar povzroči, da nekatere celice rastejo, a se ne delijo (slika 28).

Čeprav smo v prvem poskusom ugotavliali, da je obstaja korelacija med motnostjo kulture in številom celic, pa smo v poskusu z učinkovinami ugotovili, da ni vedno tako. V primeru *P. ruminocola* 23 se je le v primeru dodatka cinamaldehida v višji koncentraciji v točki T2 izkazalo, da je številu celic kljub zmanjšaju velikosti celic narastlo (slika 24). V primeru *P. bryantii* B₁4 smo opazili, da kljub naraščanju motnosti v gojišču z dodatkom MON2, število celic pada od točke T1 do T3 (slika 26). Povsem nepričakovani pa so rezultati v primeru dodatka cinamaldehida. Ob dodatku nižje koncentracije (CIN1) je število celic v točki T1 več kot 100 x manjše kot v kontrolni skupini, v točkah T2 in T3 pa je presenetljivo naraste višje kot pri kontroli. V skupini z višjo koncentracijo cinamaldehida

(CIN2) število celic kljub padcu motnosti naraste do točke T2, v točki T3 pa je število celo manjše kot v točki T1. Ob spremeljanju motnosti in števila celic smo videli, da je korelacija med tem dvojico spremenljivkama dobra, dokler ni rast organizma ovirana.

Zadnja merjena količina je bila celična beljakovina. Količina te je v primeru *P. ruminocola* 23 večino časa korelirala z motnostjo in številom celic (slika 25). Manjše odstopanje smo opazili le v primeru dodatka CIN1 v točki T2, kjer količina celične beljakovine naraste, kar pa lahko pojasnimo z povečanjem števila celic. V primeru seva *P. bryantii* B₁₄, gojenega v gojišču M2 z dodatkom monenzina, je količina celične beljakovine sorazmerna z motnostjo in številom celic (slika 27). V gojišču z dodatkom cinamaldehida v koncentraciji CIN1 smo opazili podoben pojav, kot se je zgodil s številom celic. Celična beljakovina kljub nižje vrednosti v točki T1 glede na kontrolo, močno zraste v točkah T2 in T3. V gojišču z nižjo koncentracijo dodanega cinamaldehida je izmerjena vrednost celične beljakovine ves čas tako nizka, da ne moremo spremljati razlik v količini.

Zelo razločno je viden različen učinek monezina in cinamaldehida. Slednji ima na videz dolgotrajnejši učinek, saj smo pri rasti v gojišču z cinamaldehidom upazili padec števila celic, motnosti in celičnih beljakovin po času. Monenzin je tri naštete lastnosti celic le sorazmerno znižal, še vedno pa so naraščale s časom.

Pri višji koncentraciji (MON2) smo poleg močnega povečanja celic *P. bryantii* B₁₄ (slika 26) videli še padec celičnih beljakovin (slika 27). Vse to kaže, da monenzin poleg delitve ovira tudi izdelovanje beljakovin, kar se kaže kot zelo podaljšane prosojne celice (slika 28).

5.1.2.3 Primerjava analize vpliva monenzina in cinamaldehida na velikost celic z mikroskopskim opazovanjem in merjenjem intenzitete stranskega odboja s pretočnim citometrom

Pri opazovanju sevov z mikroskopom smo opazili, da se velikost celic spreminja v odvisnosti od faze rasti in učinkovine v gojišču. Ker je bilo število meritev majhno zaradi narave mikroskopske analize, smo pri rezultatih dobili velike odklone. Zato smo velikost celic poskusili določiti še z metodo, ki omogoča hitro obdelavo velike količine bakterij, torej z metodo stranskega odboja. S primerjavo rezultatov smo potrdili, da tudi v našem poskušu obstaja korelacija med velikostjo celic, merjeno z mikroskopom, in stranskim odbojem, merjenim s pretočnim citometrom (Becton-Dickinson). Velikost celic se je ujemala, sisanje rezultatov pa je bilo manjše. Podrobneje smo preučili tri primere. Pri prvem primeru so rezultati stranskega odboja potrdili, da pride do zmanjšanja celic *P. bryantii* B₁4 tekom rasti v gojišču M2 brez dodatkov. V času T3 ima podatek o stranskem odboju veliko manjši standardni odklon kot podatek z mikroskopom. To nam daje možnost, da bi na ta način celice analizirali veliko bolj natančno. Eden od možnih vzrokov za razlike v odklonu je, da je pretočni citometer delčke, ki pod mikroskopom niso bili videti kot celice, zazna kot le-te. Naslednja dva primera oba obravnavata velikost celic *P. bryantii* B₁4 v fazi T2, razlikujeta se le v učinkovini dodani gojišču M2. Za dodatek monenzina lahko tudi v primeru analize prek stranskega odboja rečemo, da višja kot je koncentracija, večje so celice. Pri dodatku cinamaldehida pa zaznamo prek stranskega odboja podobne učinke kot pri analizi z mikroskopom. Pri nižji koncentraciji cinamaldehid pomanjša celice, pri višji pa jih poveča (v prehodu iz eksponentne v stacionarno fazo rasti).

5.2 SKLEPI

- Rast v mikrotitrskih ploščah in Hungatovih epruvetah je primerljiva
- Pri sevih *P. bryantii* B14 in *P. ruminocola* 23 opazimo od koncentracije odvisen odgovor na monenzin in cinamaldehid
- za podrobnejši opis rasti preučevanih sevov ne zadostuje posamezen podatek (npr. največkrat uporabljeni meritev motnosti kulture), ampak šele kombinacija več izmerjenih parametrov
- cinamaldehid veliko manj učinkovit pri zaviranju rasti opazovanih sevov od monenzina
- metoda primerjave velikosti celic prek stranskega odboja svetlobe
- tako monenzin kot tudi cinamaldehid vplivata na rast bakterijskih celic in sicer z inhibicijo rasti
- monenzin in cinamaldehid delujeta različno, poleg tega pa je učinek odvisen tako od koncentracije učinkovine kot tudi od faze rasti v kateri so celice
- metoda pretočne citometrije je primerna za spremeljanje števila celic, v nekaterih primerih pa tudi za primerjavo velikosti celic

6 POVZETEK

Vamp je bil zaradi svoje pomembne vloge pri prežvekovalcih, ki omogoča učinkovito izkoriščanje sicer težko razgradljive krme, že dolgo tarča številnih raziskav na področju živinoreje. Raziskovalci so bili vedno znova presenečeni nad množico organizmov (bakterije, arheje, praživali, glive in virusi) in snovi (metaboliti prej naštetih organizmov) odkritih v vampu. Ko so enkrat spoznali najpomembnejše mehanizme, ki potekajo v vampu, so kmalu začeli stremeti k temu, da bi dogajanje usmerili sebi v prid. Ker se je to dogajalo sočasno z razmahom uporabe antibiotikov, so začeli le-te uporabljati tudi za manipulacijo vampne mikrobiote. Več kot 50 let so predvsem v ZDA krdmi dodajali t.i. krmne antibiotike v subterapevtskih koncentracijah., vse dokler se ni pokazalo, da takšno početje s seboj prinaša ne le koristi, temveč tudi določena tveganja. Zato so leta 2006 na območju EU dokončno prepovedali uporabo t.i. krmnih antibiotikov. Predvsem evropski raziskovalci so posledično pospešeno pričeli iskati možne alternative. Mednje sodijo tudi različni rastlinski metaboliti, npr.: cinamaldehid, ki smo ga obravnali v našem delu. Pridobivamo ga iz destilata skorje in listov drevesa cimetovca (*Cinnamomum* sp.) Njegov učinek smo primerjali z učinkom sedaj prepovedanega, a v ZDA še vedno uporabljanega ionofornega antibiotika monenzina.

V preliminarnem delu naše raziskave smo žeeli ugotoviti ali je metoda gojenja vampnih bakterij v mikrotitrskih ploščah v anaerobnem okolju primerljiva z gojenjem v tradicionalnih Hungatovih epruvetah. Izbrali smo šest sevov vampnih bakterij, ki so se razlikovale tako po strukturi celične stene kot tudi po metabolnih značilnostih: *Prevotella ruminicola* 23^T, *Prevotella bryantii* B14, *Ruminococcus albus* 20455, *Ruminococcus flavefaciens* 007 S/6, *Fibrobacter succinogenes* S85 in *Butyrivibrio fibrisolvens* 3071^T. Spremljali smo rast teh bakterij v standardnem gojišču za vampne bakterije M2, zanimalo pa nas je tudi razmerje med motnostjo kulture in število celic, ki smo ga merili s pretočnim citometrom. Ugotovili smo, da je rast v mikrotitrskih ploščah primerljiva s tisto v Hungatovih epruvetah, kljub temu da je obseg rasti nekaj manjši. Pri vseh šestih sevih smo po analizi zbranih podatkov opazili dokaj dobro korelacijo med motnostjo kulture in številom celic v njej. Opazili smo tudi nekaj odstopanj pri enem ali drugem merjenem

parametru, vedno pa se je to zgodilo ob prehodu v stacionarno fazo rasti. Pravega razloga za te pojave nismo odkrili, morda pa so povezani s spremembami površine celic v tem delu rasti. Z Baranyi-Roberts modelom smo tudi izračunali hitrost rasti preučevanih sevov.

Na podlagi podatkov iz prvega dela diplomske naloge smo za drugi del izbrali dva seva in poskušali ugotoviti kako vplivata cinamaldehid in monenzin nanju. Izbrali smo oba seva iz rodu *Prevotella* in ju gojili v Hungatovih epruvetah ter najprej poskušali določiti koncentracijo IC₅₀ ter tisto koncentracijo obeh učinkovin, ki rast ravno še omogoča. Med rastjo v prisotnosti obeh določenih koncentracij ene ali druge učinkovine smo nato spremljali naslednje parametre: motnost kulture, število celic, velikost (ploščino) celic in količina celičnih beljakovin. Meritve smo opravljali v treh določenih časih (sredi eksponentne faze, med prehodom v stacionarno fazo in v zgodnji stacionarni fazi).

V tem delu smo potrdili, že znano ugotovitev, da je sev *P. bryantii* B₁₄ bolj odporen na monenzin kot njegov sorodnik *P.ruminicola* 23. Enako smo ugotovili tudi za cinamaldehid, le da so bile tu razlike med koncentracijami manjše. Opazili smo tudi, da je odziv obeh sevov na monenzin odvisen od koncentracije, medtem ko je v primeru cinamaldehida to vidno le v primeru seva *P.ruminicola* 23 (naraščajoča koncentracija cinamaldehida sevu *P. bryantii* B₁₄ le podaljša lag fazo, ne zmanjša pa dosežene motnosti kulture). Opazili smo, da so bile celice preučevanih sevov ob dodatku monenzina na splošno večje kot v primeru kontrole. V vzorcih z dodano višjo koncentracijo monenzina (MON2) smo pod mikroskopom opazili močno podaljšane odebujene celice. Spreminjače velikosti celic smo potrdili tudi z metodo merjenja stranskega odboja v pretočnem citometru. Za razliko od merjenje velikosti celic na podlagi zajetih mikroskopskih slik, kjer je bilo število opazovanih celic majhno in odstopanja velika, smo s to metodo zajeli v opazovanje veliko število celic in s tem tudi zmanjšali nihanja v rezultatih. Vpliv cinamaldehida ni bil tako enoznačen. Njegovo delovanje je bilo veliko bolj odvisno od koncentracije. Sev *P.ruminicola* 23 se je na nižjo koncentracijo (CIN1) odzval z padanjem števila celic (ob prvem merjenju (T1) celo večje kot pri kontroli) in motnosti kulture, celice pa so se rahlo povečale. Količina celičnih beljakovin se ni spremenjala (v kontroli je v kasnejših fazah rasti močno narastla). Ob dodatku višje koncentracije (CIN2) je bila motnost in količina

celičnih beljakovin se nekoliko nižja, število in velikost celic pa je bilo ves čas enako (rahlo zaniha). Sev *P. bryantii* B₁4 nas je ob dodatku nižje koncentracije cinamaldehida presenetil s celo višjim številom celic v primerjavi s kontrolo v drugem in tretjem času merjenja (v prvem je bilo število nižje). Enak vpliv je imel cinamaldehid tudi na motnost kulture in količino beljakovine. Povsem obraten učinek smo opazili pri velikosti celic (v prvem merjenju večje, v drugem in tretjem manjše). Veliko bolj inhibitorni učinek smo opazili v primeru dodatka višje koncentracije cinamaldehida. Vse merjene lastnosti so se močno znižale v primerjavi s kontrolo in pokazale negativen trend. Izjema je bila le velikost celic, za katero smo izmerili povečanje ob prvem in drugem merjenju.

Na podlagi rezultatov smo zaključili, da je gojenje v mikrotitrskih ploščah lahko nadomesti gojenje v Hungat-ovih epruvetah, nastane le problem vzorčenja. Parametra motnosti kulture in števila celic sta do neke mere primerljiva. Monenzin deluje inhibitorno pri nižjih koncentracijah kot cinamaldehid.

7 VIRI

- Abramoff M.D., Magelhaes P.J., Ram S.J. 2004. Image processing with ImageJ. Biophotonics International, 11, 7: 36-42
<http://rsbweb.nih.gov/ij/>
- Adams J. C., Gazaway J. A., Brailsford M. D., Hartman P.A., Jacobsen N. L. 1966. Isolation of bacteriophages from the bovine rumen. Cellular and Molecular Life Sciences, 22, 11: 717-718
- Agtarap A., Chamberlin J. W., Pinkerton M., Steinrauf L. 1967. Structure of monensic acid, a new biological active compound. Journal of American Chemical Society, 89, 22: 5737-5739
- Åkerlund T., Nordström K., Bernander R. 1995. Analysis of cell size and DNA content in exponentially growing and stationary-phase batch cultures of *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 177, 23: 6791-6797
- Akin D. E., Gordon G. L. R., Hogan J. P. 1983. Rumen bacterial and fungal degradation of *Digitaria pentzii* grown with or without sulfur. Applied and Environmental Microbiology, 46, 3:738-748
- Akin D.E., Rigsby L.L. 1987. Mixed fungal populations and lignocellulosic tissue degradation in the bovine rumen. Applied and Environmental Microbiology, 53, 9: 1987-1995
- Ali S.M., Khan A.A., Ahmed I., Musaddiq M., Ahmed K.S., Polasa H., Rao L.V., Habibullah C.M., Sechi L.A., Ahmed N. 2005. Antimicrobial activities of eugenol and cinnamaldehyde against the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 4:20, doi:10.1186/1476-0711-4-20: 7 str.
- Alsop G.M., Waggy G.T., Conway R.A. 1980. Bacterial growth inhibition test. Journal-Water Pollution Control Federation, 52, 10: 2452-2456
- Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 59, 1: 143-169
- Attwood G. T., Klieve A. V., Ouwerkerk D., Patel B. K. C. 1998. Ammonia-hyperproducing bacteria from New Zealand ruminants. Applied and Environmental Microbiology, 64, 5:1796–1804
- Avguštin G., Wright F., Flint H. J. 1994. Genetic diversity and phylogenetic relationships among strains of *Prevotella (Bacteroides) ruminicola* from the rumen. International Journal of Systematic Bacteriology, 44, 2: 246-255

- Avguštin G., Wallace R.J., Flint H.J. 1997. Phenotypic diversity among ruminal isolates of *Prevotella ruminicola*: proposal of *Prevotella brevis* sp. nov., *Prevotella bryantii* sp. nov., and *Prevotella albensis* sp. nov. and redefinition of *Prevotella ruminicola*. International Journal of Systematic Bacteriology, 47, 2: 284-288
- Baranyi J., Roberts T.A. 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. International Journal of Food Microbiology, 23, 3-4: 277-294
- Barcroft J., McAnally R. A., Phillipson A. T. 1944. Absorption of volatile acids from the alimentary tract of sheep and other species. Journal of Experimental Biology, 20: 120-129
- Bauchop T. 1979. Rumen anaerobic fungi of cattle and sheep. Applied and Environmental Microbiology, 38, 1: 148-158
- Bauchop T. 1981. The anaerobic fungi in rumen fibre digestion. Agriculture and Environment, 6, 2-3: 339-348
- Becker E. R., Everett R. C. 1930. Comparative growth of normal and infusoria-free lambs. American Journal of Hygiene, 11: 362-370. Cit. po: Veira D.M., Ivan M. 1983. Rumen ciliate protozoa: Effects on digestion in the stomach of sheep. Journal of Dairy Science, 66: 1015-1022
- Bickers D., Calow P., Greim H., Hanifin J.M., Rogers A.E., Saurat J.H., Sipes I.G., Smith R.L., Tagami H. 2005. A toxicologic and dermatologic assessment of cinnamyl alcohol, cinnamaldehyde and cinnamic acid when used as fragrance ingredients. Food and Chemical Toxicology, 43: 799-836
- Blaxter K.L. Kielanowski J., Thorbek G. 1967. The energy metabolism of farm animals. Newcastle, Oriel Press: 522 str.
- Bomeman W. S., Akin D. E., Ljungdahl L. G. 1989. Fermentation products and plant cell wall degrading enzymes produced by monocentric and polycentric anaerobic rumen fungi. Applied and Environmental Microbiology, 55, 5: 1066-1073
- Borneman W.S., Ljunghahl L.G., Hartley R.D., Akin D.E. 1993. Feruloyl and p-coumaryl esterases from the anaerobic fungus *Neocallimastix* strain MC-2: Properties and functions in plant cell wall degradation. V: Hemicellulose and hemicellulases. Coughlan M.P., Hazlewood G.P. (eds.). Cambridge, Portland Press: 85-102
- Breitbart M., Rohwer F. 2005. Here a virus, there a virus, everywhere the same virus. Trends in Microbiology, 13, 6: 278-284
- Bryant M. P., Burkey L.A. 1953. Cultural methods and some characteristics of some of the more numerous groups of bacteria in the bovine rumen. Journal of Dairy Science, 36, 3: 205-217

- Bryant M. P., Small N. 1956. The anaerobic monotrichous butyric acid-producing curved rod-shaped bacteria of the rumen. *Journal of Bacteriology*, 72: 16-21
- Bryant M.P., Robinson I.M. 1962. Some nutritional characteristics of predominant culturable ruminal bacteria. *Journal of Bacteriology*, 84, 4: 605-614
- Bryant M.P., Robinson I.M. 1963. Apparent incorporation of ammonia and amino acid carbon during growth of selected species of ruminal bacteria. *Journal of Dairy Science*, 46, 2: 150-154
- Bryant M.P., 1972. Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. *American Journal of Clinical Nutrition*, 25: 1324-1328
- Burnham P.M. 2006. Cinnamaldehyde: The smell and flavour of the spice cinnamon. Sheffield, Hillsborough College (avg. 2006): 2 str.
<http://www.chm.bris.ac.uk/motm/cinnamaldehyde/cinnc.htm> (8.nov. 2008)
- Busquet M., Calsamiglia S., Ferret A., Cardozo P. W., Kamel C. 2005. Effects of cinnamaldehyde and garlic oil on rumen microbial fermentation in a dual flow continuous culture. *Journal of Dairy Science*, 88, 7: 2508–2516
- Callaway T.R., Russell J.B. 2000. Variations in the ability of ruminal Gram-negative *Prevotella* species to resist monensin. *Current Microbiology*, 40, 3:185-190
- Callaway T.R., Edrington T.S., Rychlik J.L., Genovese K.J., Poole T.L., Jung Y.S., Bischoff K.M., Anderson R.C., Nisbet D.J. 2003. Ionophores: Their use as ruminant growth promotants and impact on food safety. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 4: 43-51
- Calsamiglia S., Busquet M., Cardozo P.W., Castillejos L., Ferret A. 2007. Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*. 90, 6: 2580-2595
- Cardozo P. W., Calsamiglia S., Ferret, A., Kamel C. 2004. Effects of natural plant extracts on ruminal protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. *Journal of Animal Science*, 82: 3230–3236
- Cardozo P.W., Calsamiglia S., Ferret A., Kamel C. 2005. Screening for the effects of natural plant extracts at different pH in vitro rumen microbial fermentation of a high-concentrate diet for beef cattle. *Journal of Animal Science*, 83: 2572-2579
- 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, 1: 72-77
- Cheng K. J., Costerton J. W. 1977. Ultrastructure of *Butyrivibrio fibrisolvens*: a Gram-positive bacterium. *Journal of Bacteriology*, 129, 3: 1506-1512

Chow J. M., Russell J. B.. 1990. Effect of ionophores and pH on growth of *Streptococcus bovis* in batch and continuous culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 6: 1588-1593

Code of Federal Regulations 21CFR582.60 of 1 april 2009 of substances generally recognized as safe. 2009. Silver Spring, U.S. Food and Drug Administration <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?fr=582.60&SearchTerm=cinnamaldehyde> (9.jun. 2010): 2 str.

Coleman G.S. 1986. The metabolism of rumen ciliate protozoa. *FEMS Microbiology Letters*, 39, 4: 321-344

ComBase: DMfit web edition.2010. Norwich, Institute of Food Research
<http://ifrswwwdev.ifrn.bbsrc.ac.uk/CombasePMP/GP/DMFit.aspx> (april 2010)
programska oprema

Cotta M. A. 1988. Amylolytic activity of selected species of ruminal bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 3: 772-776

De Rosa M., Gambacorta A., Gliozi A. 1986. Structure, biosynthesis, and physicochemical properties of archaeabacterial lipids. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 50, 1: 70-80

Dehority B.A., Orpin C.G. 1992. Developement of, and natural fluctuations in, rumen microbial populations. V: The rumen microbial ecosystem. Hobson P.N. (ed.) Essex, Elsevier Applied Science: 151-185

Domadia P., Swarup S., Bhunia A., Sivaraman J., Dasgupta D. 2007. Inhibition of bacterial cell divison protein FtsZ by cinnamaldehyde. *Biochemical Pharmacology*, 74: 831-840

Duxbury J. M., Harper L. A., Mosier R. 1993. Contributions of agroecosystems to global climate change. V: Agricultural ecosystem effects on trace gases and global climate change. Harper L. A., Mosier A. R., Duxbury J. M., Rolston D. E. (eds.). Denver, American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America: 1-18

Eadie J. M., Gill J. C. 1971. The effect of the absence of rumen ciliate protozoa on growing lambs fed on a roughage age-concentrate diet. *British Journal of Nutrition*, 26: 155-167

Edwards E. J., McEwan R.N., Travis J.A., Wallace R.J. 2004. 16S rDNA library-based analysis of ruminal bacterial diversity. *Antonie von Leeuwenhoek*, 86, 3: 263-281

Eskeland B., Pfander W.H., Preston R.L. 1974. Intravenous energy infusion in lambs: Effects on nitrogen retention, plasma free amino acids and plasma urea nitrogen. *British Journal of Nutrition*, 31, 2: 201-211

Ferme D., Banjac M., Calsamiglia S., Busquet M., Kamel C., Avguštin G. 2004. The effects of plant extracts on microbial community structure in a rumen-simulating continuous-culture system as revealed by molecular profiling. *Folia Microbiologica*, 49, 2: 151-155

Ferme D. 2008. Vpliv izvlečkov česna in cimeta ter kostanjevih taninov na strukturo mikrobnne združbe iz prebavnega trakta prežvekovalcev in kuncev. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 261 str.

Gershenson J., Croteau R. 1991. Terpenoids. V: *Herbivores: Their interaction with secondary metabolites*. Vol. 2. Rosenthal G.A., Berenbaum M. (eds.). New York, Academic Press: 165-219

Ghorbani G.R., Morgavi D.P., Beauchemin K.A., Leedle J.A.Z. 2002. Effects of bacterial direct-fed microbials on ruminal fermentation, blood variables, and the microbial populations of feedlot cattle. *Journal of Animal Science*, 80: 1977-1985

Gill A.O., Holley R.A. 2004. Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 10 :5750-5755

GNU. 2009. GNU Image Manipulation Program (GIMP). Boston, Free Software Foundation
<http://www.gimp.org/> programska oprema (januar 2007): software

Graham T. 2004. Slika prebavnega sistema prežvekovalcev. Bath, University of Bath (2004)
http://www.tonygraham.co.uk/house_repair/wattle_daub/WD-7.html#Heading1344 (6. jan. 2009) 1 str.

Griffin S. G., Wyllie S. G., Markham J. L., D. N. Leach. 1999. The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour and Fragrance Journal*, 14, 5 :322–332

Grubb J.A., Dehority B.A. 1976. Variation in colony counts of total viable anaerobic rumen bacteria as influenced by media and cultural methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 31, 2: 262-267

Gruby D., Delafond O. 1843. Recherches sur des animalcules se developpant en grand homme dans l'estomac et dans les intestines pendant la digestion des animaux herbivores et carnivores. *Comptes rendus*, 17: 1304-1308. Cit. po: Pounden W.D., Hibbs J.W. 1950. The development of calves raised without protozoa and certain other characteristic rumen microorganisms. *Journal of Dairy Science*, 33, 9: 639-644

Günther A. 1899. Untersuchungen über die im Magen unserer Hauswiederkäuer vorkommenden Wimperinfusorien. *Zeitschrift für Wissenschaftliche Zoologie*, 65:

- 529-572. Cit. po: Krascheninnikow S. 1953. Observations on the morphology and division of *Eudiplodinium neglectum* Dogiel (Ciliate Entodiniomorpha) from the stomach of a moose. Journal of Eukaryotic Microbiology, 2, 3: 124-134
- Gutierrez J. 1955. Experiments on the culture and physiology of holotrichs from the bovine rumen. Biochemical Journal, 60, 3: 516-522
- Helander I.M., Alakomi H., Latva-Kala K., Mattila-Sandholm T., Pol I., Smid E.J., Gorris L.G.M., Wright A. 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46, 9: 3590–3595
- Hespell R.B., Kato K., Costerton J.W. 1993. Characterization of the cell wall of *Butyrivibrio* species. Canadian Journal of Microbiology, 39, 10: 912-921
- Hillman K., Spencer R.J., Murdoch A.T., Stewart C.S. 1995. The effect of mixtures of *Lactobacillus* spp. on the survival of enterotoxigenic *Escherichia coli* in *in vitro* continuous culture of porcine intestinal bacteria. Letters in Applied Microbiology, 20, 2: 130-133
- Ho Y. W., Abdullah N., Jalaludin S. 1988. Penetrating structures of anaerobic rumen fungi in cattle and swamp buffalo. Journal of General Microbiology, 134: 177-181
- Hobson P.N. 1969. Rumen bacteria. V: Methods in microbiology. Vol. 3B. Norris J.R., Ribbons D.W. (eds.). London, New York, Academic Press: 133-149
- Hobson P.N. 1997. Introduction. V; The rumen microbial ecosystem. 2nd ed. Hobson P.N., Stewart C.S. (eds.). London, Blackie Academic & Professional: 1-9
- Hobson P. N., Jouany J.-P. 1997. Models, mathematical and biological of the rumen function. V: The rumen microbial ecosystem. 2nd ed. Hobson P.N., Stewart C.S. (eds.). London, Blackie Academic & Professional: 661-684
- Hoffmann C., Evans C. A. 1911. The use of spices as preservatives. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 3, 11: 835–838
- Holdeman L. V., Kelly R.W., Moore W. E. C. 1984. Genus I: *Bacteroides* Castelani and Chalmers 1919, 959^{AL}. V: Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol.1. Krieg N.R., Holt J.G. (eds.). Baltimore, Williams and Wilkins Co.: 604-631
- Howlett M. R., Mountfort D. O., Turner K. W., Roberton A. M.. 1976. Metabolism and growth yields in *Bacteroides ruminicola* strain B14. Applied and Environmental Microbiology, 32, 2: 274-283
- Hungate R. E. 1950. The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 14: 1-49

- Hungate R. E. 1957. Microorganisms in the rumen of cattle fed a constant ration. Canadian Journal of Microbiology, 3, 2: 289-311
- Hungate R.E. 1969. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. V: Methods in microbiology. Vol. 3B. Norris J.R., Ribbons D.W. (eds.). London, New York, Academic Press: 117-132
- Invitrogen. 2010. Product spectra - SYTO 13/DNA, Carlsbad, Life Technologies Corporation
<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Product-Technical-Resources/Product-Spectra.7575dna.html> (junij 2010): 1 str.
- Jacobson N. L. 2008 Slika goveda s fistulo. Iowa, Iowa State University, Department of Animal Science
www.ans.iastate.edu/history/index.php?ind=history (januar 2009): 1str.
- Jarvis G.N., Strömpl C., Burgess D.M., Skillman L.C., Moore E.R.B., Joblin K.N. 2000. Isolation and identification of ruminal methanogens from grazing cattle. Current Microbiology, 40, 5: 327-332
- Joblin K.N. 2005. Methanogenic archea. V: Methods in gut microbial ecology for ruminants. Makkar H.P.S., McSweeney C.S. (eds.). Dordrecht, Springer: 47-53
- Jouany J.P. 1994. Manipulation of microbial activity in the rumen. Archives of Animal Nutrition, 46, 2: 133–153
- Kamra D. N. 2005. Rumen microbial ecosystem. Current Science, 89, 1: 124-132
- Kirchgessner M., Windisch W., Müller H. L. 1995. Nutritional factors for the quantification of methane production. V: Ruminant physiology: Digestion, metabolism, growth and reproduction. Engelhardt W. (ed.). Stuttgart, Ferdinand Enke Verlag: 333–348
- Klieve A.V., Bauchop T. 1988. Morphological diversity of ruminal bacteriophages from sheep and cattle. Applied and Environmental Microbiology, 54, 6: 1637-1641
- Klieve A.V., Hegarty R.S. 1999. Opportunities for biological control of ruminal methanogenesis. Australian Journal of Agricultural Research, 50, 8: 1315–1319
- Kocbek R. 2007. Vpliv ionofornega antibiotika monenzina na nekatere fenotipske značilnosti izbranih bakterijskih sevov iz vampa. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 69 str.
- Köhler F.E. 1887. Medizinal Pflanzen. Gera, Gera-Unterhaus: 1 str.

- Krause D.O., Denman S.E., Mackie R.I., Morisson M., Rae A.L., Attwood G.T., McSweeney C.S. 2003. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology and genomics. FEMS Microbiology Reviews, 27, 5: 663-693
- Kwon J.A., Yu C.B., Park H.D. 2003. Bacteriocidal effects and inhibition of cell separation of cinnamic aldehyde on *Bacillus cereus*. Letters in Applied Microbiology, 37: 61–65
- Lee H.S., Ahn Y.J. 1998. Growth-inhibiting effects of *Cinnamomum cassia* bark-derived materials on human intestinal bacteria. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46, 1: 8–12
- Leedle J.A., Bryant M.P., Hespell R.B. 1982. Diurnal variations in bacterial numbers and fluid parameters in ruminal contents of animals fed low- or high-forage diet. Applied and Environmental Microbiology, 44, 2: 402-412
- Liebetanz E. 1910. Die parasitischen Protozoen des Wiederkäuermagens. Archiv für Protistenkunde, 19: 19-80. Cit. po: Dehority B.A., Tirabasso P.A. 2000. Antibiosis between ruminal bacteria and ruminal fungi. Applied and Environmental Microbiology, 66, 7: 2921-2927
- Lipoglavšek L. 2005. "Umerjanje pretočnega citometra z lateks kroglicami standardnih velikosti". Domžale, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko (osebni vir, februar 2007)
- Lobos N. 2007. Slika molekulske zgradbe monenzina. Madison, University of Wisconsin (23. mar. 2007) :1 str.
<http://dairynutrient.wisc.edu/302/news.php?id=39> (12.jan.2009)
- Lowry O.H., Rosembrough A.L., Farr N.H., Randall R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, 193: 265-275
- Lu C.D., Jorgensen N.A. 1987. Alfalfa saponins affect site and extent of nutrient digestion in ruminants. Journal of Nutrition, 117, 5: 919-927
- Mackie R., McSweeney C.S., Aminov R. 2001. Rumen. doi: 10.1038/npg.els.0000404: 11 str.
- Mankoč J. 2007. Vpliv izvlečka cimeta na vampne bakterije goveda. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 46 str.
- Mannarelli, B.M. 1988. Deoxyribonucleic acid relatedness among strains of the species *Butyrivibrio fibrisolvens*. International Journal of Systematic Bacteriology, 38: 340-347
- Mannarelli B.M., Ericsson L.D., Lee D., Stack R.J. 1991. Taxonomic relationships among strains of the anaerobic bacterium *Bacteroides ruminicola* determined by DNA and

- extracellular polysaccharide analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 10: 2975-2980
- Matasyoh J.C., Maiyo Z.C., Ngure R.M., Chepkorir R. 2008. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Coriandrum sativum*. *Food Chemistry* 113, 2: 526-529
- McIntosh F.M., Williams P., Losa R., Wallace R.J., Beever D.A., Newbold C.J. 2003. Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 ,8: 5011-5014
- 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, 2-3: 169-173
- McSweeney C. S., Palmer B., Bunch R., Krause D.O. 1999. Isolation and characterization of proteolytic ruminal bacteria from sheep and goats fed the tannin-containing shrub legume *Calliandra calothyrsus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 7: 3075-3083
- Mislej J. 2007. Vpliv česnovega izvlečka dialil sulfida na rast izbranih bakterijskih sevov iz vampa ter tvorbo kratkoverižnih maščobnih kislin in plinov. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 66 str.
- Moleyar V., Narasimham P. 1992. Antibacterial activity of essential oil components. *International Journal of Food Microbiology*, 16, 4: 337-342
- Montgomery L., Flesher B., Stahl D. 1988. Transfer of *Bacteroides succinogenes* (Hungate) to *Fibrobacter* gen. nov. as *Fibrobacter succinogenes* comb. nov. and description of *Fibrobacter intestinalis* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 38: 430-435
- Munn E.A. 1992. The ultrastructure of anaerobic fungi. V: *Anaerobic fungi*. Mountfort D.O., Orpin C.G. (eds.) New York, Marcel Dekker Inc.: 47-106
- Nagaraja T.G., Taylor M.B. 1987. Susceptibility and resistance of ruminal bacteria to antimicrobial feed additives. *Applied and Environmental Microbiology*, 53, 7: 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*. 2nd ed. Hobson P.N., Stewart C.S. (eds.). London, Blackie Academic & Professional: 523-632
- Nickel R. 1960. *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere II*. Berlin, Hamburg, Paul Parrey: 411 str.

- Nikaido H. 1994. Prevention of drug access to bacterial targets: Permeability barriers and active efflux. *Science*, 264: 382-388
- Nolan J. V., Norton B. W., Leng R. A. 1976. Further studies of the dynamics of nitrogen metabolism in sheep. *British Journal of Nutrition*, 35: 127-147
- Oh H. K., Jones M. B., Longhurst W. M. 1968. Comparison of rumen microbial inhibition resulting from various essential oils isolated from relatively unpalatable plant species. *Applied and Environmental Microbiology*, 16, 1: 39-44.
- Orpin C.G. 1975. Studies on the rumen flagellate *Neocalliamstix frontalis*. *Journal of General Microbiology*, 91, 2: 249-262
- Orpin C.G. 1977. Invasion of plant tissue in the rumen by the flagellate *Neocallimastix frontalis*. *Journal of General Microbiology*, 98: 423-430
- Ouattara B., Simard R. E., Holley R. A., Piette G. J.-P., Bégin A. 1997. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology*, 37, 2-3: 155-162
- Paster B.J., Ludwig W., Weisburg W.G., Stackelbrandt E., Hespell R.B., Hahn C.M., Reichenbach H., Stetter K.O., Woese C.R. 1985. A phylogenetic grouping of the Bacteroides, Cytophagaceae and certain flavobacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 6, 1: 34-42
- Perry T.W., Beeson W.M., Mohler M.T. 1976. Effect of monensin on beef cattle performance. *Journal of Animal Science*, 42, 3: 761-765
- Pettipher G. L., Latham M. J. 1979. Characteristics of enzymes produced by *Ruminococcus flavefaciens* which degrade plant cell walls. *Journal of General Microbiology*, 110: 21-27
- Prescott J. M. 1953. Effects of diet and antibiotics on utilization of nonprotein nitrogen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1, 14: 894-896
- 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
- Regulation (EC) No 1831/2003 of 22 september 2003 on additives for use in animal nutrition. 2003. *Official Journal of the European Union*, L 268: 29-43
- Richardson L.F., Raun A.P., Potter E.L., Cooley C.O., Rathmacher R.P. 1976. Effect of monensin on rumen fermentation *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Animal Science*, 43: 657-664

- Russell J.B. 1987. A proposed mechanism of monensin action in inhibiting ruminal bacterial growth: Effects on ion flux and protonmotive force. *Journal of Animal Science*, 64: 1519-1525
- Russell J.B., Strobel H.J. 1989. Effects of ionophores on ruminal fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 1: 1-6
- Russell J. B., Onodera R., Hino, T. 1991. Ruminal protein fermentation: new perspectives on previous contradictions. V: In physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants. Tsuda T., Sasaki Y., Kawashima R. (eds.). San Diego, Academic Press: 681-697
- Schalk A.F., Amadon R.S. 1928. Physiology of the ruminant stomach (bovine). Fargo, Agricultural Experiment Station. poročilo št. 216: 64 str.
- Shah H. N., Collins M. D. 1983. Genus *Bacteroides*: A chemotaxonomical perspective. *Journal of Applied Bacteriology*, 55, 3: 403-416
- Shah H. N., Collins M. D. 1990. *Prevotella*, a new genus to include *Bacteroides melaninogenicus* and related species formerly classified in the genus *Bacteroides*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 40, 2: 205-208
- 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
- Stahl D.A., Flesher B., Mansfield H.R., Montgomery L. 1988. Use of phylogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 5: 1079-1084
- Stevenson D.M., Weimer P.J. 2007. Dominance of *Prevotella* and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75, 1: 165-174
- Stewart C.S., Flint H.J., Bryant M.P. 1997. The rumen bacteria. V: The rumen microbial ecosystem. 2nd ed. Hobson P.N., Stewart C.S. (eds.). London, Blackie Academic & Professional: 10-72
- Stumm C. K., Gijzen H. J., G. D. Vogels. 1982a. Association of methanogenic bacteria with ovine rumen ciliates. *British Journal of Nutrition*, 47 :95-99
- Stumm W., Grauer R. 1982b. Die Koordinationschemie oxidischer Grenzflächen und ihre Auswirkung auf die Auflösungskinetik oxidischer Festphasen in wäßrigen Lösungen. *Colloid & Polymer Science*, 260, 10: 1435-1536

- Swain R.A., Nolan J.V., Klieve A.V. 1996. Natural variability and diurnal fluctuations within the bacteriophage population of the rumen. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 3: 994-997
- Tappeiner H. 1884. Untersuchungen Über die Gfirung der Cellulose insbesondere Über deren Losung im Dannkanale. *Zeitschrift für Biologie*, 20:52-134. Cit. po: Gray F.V., Pilgrim A.F., Rodda H.J., Weller R.A. 1952. Fermentation in the rumen of sheep: IV. The nature and origin of volatile fatty acids in the rumen of the sheep. *Journal of Experimental Biology*, 29: 57-65
- Trinci A.P.J., Davies D.R., Gull K., Lawrence M.I., Bonde Nielsen B., Rickers A., Theodorou M.K. 1994. Anaerobic fungi in herbivorous animals. *Mycological Research*, 98, 2: 129-152
- Troussellier M., Courties C., Lebaron P., Servais P. 1999. Flow cytometric discrimination of bacterial populations in seawater based on SYTO 13 staining of nucleic acids. *FEMS Microbiology Ecology*, 29: 319-330
- Ultee A., Ketts E.P.W., Alberda M., Folkert A.H., Smid E.J. 2000. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Archives of Microbiology*. 174, 4: 233-238
- Van Gylswyk N. O. 1990. Enumeration and presumptive identification of some functional groups of bacteria in the rumen of dairy cows fed grass silage-based diets. *FEMS Microbiology Letters*, 73, 3: 243-254
- Varga A. 2009. Analiza vpliva rastlinskih izvlečkov na izbrane vampne bakterije. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 58 str.
- Veira D. M., Ivan M., Jui P. Y. 1983. Rumen ciliate protozoa: Effects on digestion in the stomach of sheep. *Journal of Dairy Science*, 66, 5: 1015-1022
- Veira D.M. 1986. The role of ciliate protozoa in nutrition of the ruminant. *Journal of Animal Science*, 63: 1547-1560
- Wallace R.J., McKain N. 1991. A survey of peptidase activity in rumen bacteria. *Journal of General Microbiology*, 137: 2259-2264
- Wallace R.J., McEwan N.R., McIntosh F.M., Teferedegne B., Newbold C.J. 2002. Natural products as manipulators of rumen fermentation. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 15, 10: 1458-1468
- Wallnöfer P., Baldwin R.L. 1967. Pathway of propionate formation in *Bacteroides ruminicola*. *Journal of Bacteriology*, 93, 1: 504-505

- Warner A.C.I. 1966. Diurnal changes in the concentrations of microorganisms in the rumens of sheep fed to appetite in pens or at pasture. *Journal of General and Applied Microbiology*, 45: 243-251
- Watanabe K., Watanabe J., Kuramitsu S., Maruyama H.B. 1981. Comparison of the activity of ionophores with other antibacterial agents against anaerobes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 19, 4: 519-525
- Wendakoon C. N., Sakaguchi M. 1995. Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *Journal of Food Protection*, 58, 3: 280–283
- Williams A. G., Coleman G. S. 1997. The rumen protozoa. V: The rumen microbial ecosystem. 2nd ed. Hobson P.N., Stewart C.S. (eds.). London, Blackie Academic & Professional: 73-139
- Wojciechowicz M., Heinrichova K., Ziolecki A. 1982. An exopectate lyase of *Butyrivibrio fibrisolvens* from the bovine rumen. *Journal of General and Applied Microbiology*, 128: 2661-2665
- Wolin M.J. 1960. A theoretical rumen fermentation balance. *Journal of Dairy Science*, 43, 10: 1452-1459
- Yanaga A., Goto H., Nakagawa T., Hikiami H., Shibahara N., Shimada Y. 2006. Cinnamaldehyde induces endothelium dependent and -independent vasorelaxant action on isolated rat aorta. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29, 12: 2415–2418
- Yu B.S., Lai S.G., Tan Q.L. 2006. Simultaneous determination of cinnamaldehyde, eugenol and paeonol in traditional Chinese medicinal preparations by capillary GC-FID. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 54, 1: 114-116
- Zajc P. 2007. Vpliv evgenola na nekatere fenotipske značilnosti izbranih bakterijskih sevov iz vampa. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 51 str.

ZAHVALA

Rad bi se zahvalil vsem, ki so pomagali pri nastanku te diplomske naloge. Še posebej bi se rad zahvalil:

- mentorju prof. dr. Gorazdu Avguštinu za nadzor in produktivne nasvete tekom nastajanja tega dela;
- somentorici dr. Darji Ferme za vse praktične nasvete in podajanje znanja
- Lukatu, Gregorju in ostalim iz laboratorija za pomoč in nasvete
- prof. dr. Romani Marinšek Logar za hitro in konstruktivno recenzijo;
- staršema Andreji in Jožetu za neizmerno potrpežljivost in vso podporo med mojim (pre)dolgom študijem;
- Mateji in hčerki Kaori za vso ljubezen, podporo in pomoč;

PRILOGE

Priloga A: Preglednica motnosti kultur (OD) in števila celic glede na pretočni citometer za šest sevov

	<i>Prevotella bryantii</i>		<i>Ruminococcus albus</i>		<i>Prevotella ruminicola</i>		<i>Ruminococcus flavefacines</i>		<i>Fibrobacter succinogenes</i>		<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	
t(h)	OD (620nm)	št. celic na ml	OD (620nm)	št. celic na ml	OD (620nm)	št. celic na ml	OD (620nm)	št. celic na ml	OD (620nm)	št. celic na ml	OD (620nm)	št. celic na ml
0	0,044		0,023		0,051		0,033		0,036		0,045	
1	0,055	1,35E+08	0,014	1,73E+07	0,065	4,61E+08	0,035	1,86E+07	0,040	2,78E+08	0,020	
2	0,093	1,78E+08	0,017	2,24E+07	0,130	9,15E+08	0,050	2,59E+07	0,161	1,19E+09	0,044	3,36E+08
3	0,256	3,65E+08	0,049	3,39E+07	0,224	1,65E+09	0,083	2,92E+07	0,377	3,32E+09	0,160	4,00E+08
4	0,646	1,85E+09	0,140	1,33E+08	0,326	2,77E+09	0,126	3,75E+07	0,645	5,49E+09	0,394	8,19E+08
5	0,933	4,24E+09	0,303	2,34E+08	0,468	4,02E+09	0,214	5,62E+07	0,691	8,29E+09	0,691	2,45E+09
6	0,968	6,46E+09	0,441	4,72E+08	0,557	5,34E+09	0,310	1,02E+08	0,748	9,16E+09	0,935	3,81E+09
7	1,005	1,71E+10	0,424	5,42E+08	0,635	5,86E+09	0,409	1,90E+08	0,695	9,03E+09	0,942	5,32E+09
8	1,011	9,24E+09	0,425	6,04E+08	0,689	6,46E+09	0,472	1,91E+08	0,666	1,34E+10	0,961	6,36E+09
9	1,017		0,424		0,737	1,02E+10	0,522	2,68E+08	0,654	1,11E+10	0,980	7,29E+09
10					0,760	4,30E+09	0,545	2,01E+08	0,645	9,94E+09	0,971	1,02E+10
10,75											0,948	
11					0,775	1,05E+10	0,551	2,67E+08	0,631	1,01E+10		
12					0,791		0,543		0,618			
24	1,060	9,76E+09	0,519	1,11E+09								
25											0,906	1,08E+10
26					0,829	1,32E+10	0,488	1,83E+08	0,595	1,15E+10		
32											0,892	
50					0,830	1,37E+10	0,464	3,15E+08	0,619	1,09E+10		

Priloga B: Preglednica štirih merjenih parametrov (število celic na mililiter kulture, ploščina celic, motnost kulture in količina celičnih beljakovin po Lowry-ju) za sev *Prevotella ruminicola* 23

<i>P.ruminicola</i> 23	Čas	št. celic na ml	SD	Ploščina (μm^2)	SD	OD ₆₅₄	prot. (mg/ml)	SD
PR CTR	T1	7,88E+08	4,32E+07	0,96	0,09	0,434	0,260	0,120
	T2	3,44E+09	1,67E+08	0,60	0,02	1,363	1,001	0,048
	T3	4,36E+09	1,22E+08	0,76	0,07	1,363	0,986	0,119
PR MON1	T1	5,81E+08	2,38E+07	0,79	0,07	0,383	0,170	0,008
	T2	1,90E+09	2,20E+08	0,84	0,06	1,099	0,684	0,032
	T3	2,35E+09	2,50E+08	0,83	0,08	1,155	0,655	0,055
PR MON2	T1	3,47E+08	6,60E+06	0,84	0,04	0,251	0,226	0,056
	T2	1,08E+09	6,53E+07	0,95	0,16	0,69	0,532	0,120
	T3	1,14E+09	9,37E+07	1,20	0,10	0,702	0,610	0,064
PR CIN1	T1	1,64E+09	1,09E+08	0,73	0,08	0,433	0,232	0,064
	T2	9,05E+08	4,10E+07	0,73	0,08	0,396	0,294	0,024
	T3	8,45E+08	5,00E+07	0,92	0,09	0,334	0,240	0,018
PR CIN2	T1	4,94E+08	1,56E+07	0,83	0,06	0,275	0,153	0,000
	T2	5,72E+08	3,79E+07	0,85	0,12	0,25	0,147	0,072
	T3	3,87E+08	8,73E+06	0,74	0,18	0,214	0,136	0,055

MON1 - 0,391 μM ; MON2 - 3,125 μM ; CIN1 - 0,908 mM; CIN2 - 1,135 mM; prot. - vsebnost celičnih beljakovin po Lowry-ju

Priloga C: Preglednica štirih merjenih parametrov (število celic na mililiter kulture, ploščina celic, motnost kulture in količina celičnih beljakovin po Lowry-ju) za sev *Prevotella bryantii* B₁₄

<i>P.bryantii</i> B ₁₄	čas	Št. celic na ml	SD	Ploščina (μm^2)	SD	OD ₆₅₄	prot. (mg/ml)	SD
PB CTR	T1	2,23E+09	9,57E+07	1,27	0,05	1,132	0,755	0,029
	T2	4,90E+09	4,30E+08	0,70	0,04	1,642	1,656	0,057
	T3	7,24E+09	2,85E+08	0,75	0,18	1,629	1,528	0,393
PB MON1	T1	6,74E+08	5,54E+07	1,10	0,07	0,595	0,198	0,006
	T2	9,21E+08	2,11E+07	1,57	0,07	1,264	0,945	0,000
	T3	1,32E+09	8,58E+07	1,44	0,14	1,212	0,806	0,026
PB MON2	T1	3,90E+08	1,59E+07	1,45	0,34	0,409	0,085	0,017
	T2	3,68E+08	3,09E+07	1,60	0,10	0,511	0,166	0,006
	T3	2,17E+08	2,36E+07	2,17	0,73	0,5	0,093	0,026
PB CIN1	T1	3,86E+08	1,84E+07	1,71	0,06	0,498	0,178	0,000
	T2	6,41E+09	6,18E+08	0,58	0,06	1,616	1,777	0,228
	T3	1,27E+10	4,53E+08	0,61	0,03	1,633	1,969	0,295
PB CIN2	T1	1,41E+08	4,91E+06	1,17	0,26	0,342	0,082	0,058
	T2	2,93E+08	3,03E+07	1,40	0,33	0,267	0,092	0,023
	T3	7,76E+07	6,15E+06	0,73	0,18	0,112	0,074	0,013

MON1 - 25 μM ; MON2 - 50 μM ; CIN1 - 1,438 mM; CIN2 - 1,967 mM; prot. - vsebnost celičnih beljakovin po Lowry-ju

Priloga D: Stranski odboji seva *P. bryantii* B₁₄ v gojišču M2 brez dodatka v treh izbranih časih in v gojišču z dodatkom monenzina oz. cinamaldehida v času T2 v primerjavi s kontrolo

	povprečje vrednosti stranskega odboja	SD
PB CTR T1	45,38	1,27
PB CTR T2	16,00	0,32
PB CTR T3	12,55	0,25
PB CTR T2	16,00	0,32
PB MON1 T2	33,68	0,75
PB MON2 T2	39,45	1,06
PB CTR T2	16,00	0,32
PB CIN1 T2	10,88	0,17
PB CIN2 T2	26,65	0,38

MON1 - 25 µM; MON2 - 50 µM; CIN1 - 1,438 mM; CIN2 - 1,967 mM