

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Jana MANKOČ

**VPLIV IZVLEČKA CIMETA NA VAMPNE BAKTERIJE
GOVEDA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2007

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Jana MANKOČ

VPLIV IZVLEČKA CIMETA NA VAMPNE BAKTERIJE GOVEDA

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**THE EFFECT OF CINNAMON EXTRACT ON CATTLE RUMEN
BACTERIA**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2007

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

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

Recenzent: doc .dr. Andrej Lavrenčič

Komisija za oceno in zagovor:

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

Recenzent: doc. dr. Andrej LAVRENČIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

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

Datum zagovora:

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

Jana Mankoč

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 579(043.2)=163.6
KG mikrobiologija/vamp/bakterije/bakterijskisevi/rastlinski izvlečki/cinamaldehyd/
govedo
KK AGRIS 5212
AV MANKOČ, Jana
SA AVGUŠTIN, Gorazd (mentor)
KZ SI-1230 Domžale, Groblje 3
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
LI 2007
IN VPLIV IZVLEČKA CIMETA NA VAMPNE BAKTERIJE GOVEDA
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP X, 46 str., 6 pregl., 12 sl., 63 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI V intenzivnih živalskih produkcijskih sistemih je bila do leta 2006 zelo razširjena uporaba antibiotičnih prehranskih dodatkov za povečanje učinkovitosti produkcije mleka, mesa ali volne. S 1.1.2006 je v Evropski skupnosti pričel veljati zakon o prepovedi uporabe prehranskih antibiotikov zaradi nevarnosti akumulacije le-teh v živalskih produktih ter morebitnega horizontalnega prenosa rezistenc na patogene bakterije. Ker so zaradi omenjenega ukrepa zelo narasli stroški reje, smo pričeli raziskovati alternativne prehranske dodatke, ki bi nadomestili prehranske antibiotike. Med drugim v zadnjem času intenzivno preučujemo različne rastlinske izvlečke, npr. izvleček cimeta. Namen diplomskega dela je bil preučiti vpliv izvlečka cimeta (cinamaldehyda) na izbrane bakterijske seve iz vampa. Vpliv cinamaldehyda na hitrost in obseg mikrobne rasti smo ugotavljali z merjenjem optične gostote in pH, koncentracijo celičnih beljakovin po Lowryju, in ugotavljanjem kratkoverižnih maščobnih kislin in vodika. Ugotovili smo, da (i) je cinamaldehyd v večji koncentraciji (1000 mg/l) popolnoma inhibiral rast sevov *P. bryantii* B₁₄, *P. ruminicola* 23^T, *B. fibrisolvens* 3071^T in *F. succinogenes* S85; (ii) v 10× manjši koncentraciji (100 mg/L) cinamaldehyd ni vplival na rast omenjenih sevov sodeč po rezultatih meritev optične gostote gojišča in pH vrednosti, sodeč po rezultatih, ki smo jih dobili po ugotavljanju koncentracije skupnih beljakovin pa je pri sevu *P. ruminicola* 23^T prišlo do spremembe v rasti, saj je bila tvorba celičnih beljakovin kar za štirikrat manjša kot v kontrolnem gojišču; (iii) pri gram pozitivnih bakterijah *R. albus* 20455 in *R. flavefaciens* 007 S/6 sta večji koncentraciji cinamaldehyda (500 mg/l) popolnoma inhibirali njihovo rast; (iv) manjši koncentraciji cinamaldehyda (20 in 250 mg/l) pa sta pri omenjenih sevih povzročili delno zmanjšan obseg in hitrost celične rasti. (v) Pri meritvah skupne koncentracije kratkoverižnih maščobnih kislin smo le pri sevu *P. ruminicola* 23^T s cinamaldehydom v koncentraciji 100 mg/l dokazali zmanjšanje skupne koncentracije kratkoverižnih maščobnih kislin.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDC 579(043.2)=163.6
- CX microbiology/rumen/bacteria/bacterial strains/plant extracts/cinnamaldehyde/
cattle
- CC AGRIS 5212
- AU MANKOČ, Jana
- AA AVGUŠTIN, Gorazd (supervisor)
- PP SI-1230 Domžale, Groblje 3
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Zootechnical Department
- PY 2007
- TI THE EFFECTS OF CINNAMON EXTRACT ON CATTLE RUMEN
BACTERIA
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO X, 46 p., 6 tab., 12 fig., 63 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Before 2006, intense livestock production systems witnessed a widespread use of in-feed antibiotics, the purpose of which was to enhance the efficiency of milk, meat or wool production. On January 1, 2006, the EU banned in-feed antibiotics due to possible accumulation in animal products and further horizontal transmission of resistance to pathogenic microbes. Since these measures resulted in the growth of livestock production costs, this prompted research into alternative in-feeds to substitute in-feed antibiotics. Among such alternative in-feeds, intense research efforts are currently focused on various plant extracts, such as the cinnamon extract. The purpose of this paper was to examine the effect of cinnamon extract (cinnamaldehyde) on selected bacterial strains from the rumen. The effect of cinnamaldehyde on the rate and extent of microbial growth was studied by optical density measurement, measurement of pH, Lowry method for the determination of total cell protein concentration, and the estimation of produced short chain fatty acids and hydrogen. The results have shown that (i) the cell growth and microbial activity of *P. bryantii* B₁₄, *P. ruminicola* 23^T, *B. fibrisolvans* 3071^T and *F. succinogenes* S85 was completely inhibited by cinnamaldehyde in a higher tested concentration (1000 mg/l); (ii) judging from the results of optical density and pH the bacterial strains were not inhibited by the 10 times lower tested concentration (100 mg/l); judging from the results of the total cell protein concentration only *P. Ruminicola* 23^T have shown a change in cell growth because the concentration of total cell protein concentration was four times lower than the control culture; (iii) gram positive bacterial strains *R. albus* 20455 and *R. flavefaciens* 007 S/6 were totally inhibited by the higher tested concentrations (500 mg/l); (iv) the lower tested concentrations (20 and 250 mg/l) just partly inhibited the extent and speed of the cell growth; (v) the estimation of total produced short chain fatty acids showed an increase in total short chain fatty acids only on the bacterial strain *P. ruminicola* 23^T in lower tested concentration (100 mg/l).

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	IX
Okrajšave in simboli	X
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 POSEBNOSTI PREBAVNEGA TRAKTA PREŽVEKOVALCEV	2
2.2 VAMP	3
2.2.1 Zgradba vampa	3
2.2.2 Mikroorganizmi v vampu	3
2.2.2.1 Skupine vampnih bakterij	4
2.2.2.2 Praživali	5
2.2.2.3 Glive	6
2.2.2.4 Arheje	6
2.2.2.5 Bakteriofagi (virusi)	6
2.2.3 Potek prebave in presnova hranilnih snovi	6
2.2.3.1 Prebava in presnova ogljikovih hidratov	7
2.2.3.2 Prebava in presnova beljakovin	8
2.2.3.3 Prebava in presnova maščob	9
2.2.3.4 Plini v vampu	10
2.2.4 Manipulacija vampne fermentacije	10
2.2.4.1 Posegi na nivoju krme	10
2.2.4.2 Posegi na nivoju fiziologije živali	11
2.2.4.3 Posegi na nivoju mikroorganizmov	11
2.2.5 Modifikatorji mikrobne aktivnosti v vampu	11
2.2.5.1 Nevtralizirajoči agensi (pufri)	11
2.2.5.2 Ionoforni antibiotiki	11
2.2.5.3 Inhibitorji metana	12
2.2.5.4 Inhibitorji proteolize, deaminacije in peptidolize	12
2.2.5.5 Rastni dejavniki	13

2.2.5.6	Maščobe	13
2.2.5.7	Mikrobni krmni dodatki in encimi	13
2.2.5.8	Rastlinski izvlečki	14
3	MATERIALI IN METODE	18
3.1	MATERIAL	18
3.1.1	Vampni sok	18
3.1.2	Bakterijski sevi	18
3.1.3	Gojišče M2	19
3.1.4	Cinamaldehyd	20
3.1.5	Pufri in raztopine	20
3.2	METODE	21
3.2.1	Bryantova modifikacija Hungate tehnike	21
3.2.2	Dodajanje izvlečka v gojišča z bakterijskimi sevi	21
3.2.3	Spremljanje rasti z ugotavljanjem motnosti gojišča	22
3.2.4	Merjenje pH	22
3.2.5	Analiza kratkoverižnih maščobnih kislin (KMK) in plinska kromatografija	22
3.2.6	Ugotavljanje koncentracije celičnih beljakovin po Lowryju	23
3.2.7	Statistična obdelava rezultatov s Studentovim t-testom	24
4	REZULTATI	25
4.1	PRIPRAVA RASTNIH KRIVULJ ZA PREUČEVANE BAKTERIJSKE SEVE	25
4.2	RAST IZBRANIH BAKTERIJSKIH SEVOV V GOJIŠČIH Z IN BREZ CINAMALDEHIDA	26
4.2.1	Spremljanje rasti preučevanih sevov z ugotavljanjem motnosti gojišča	26
4.2.2	Merjenje pH	28
4.2.3	Ugotavljanje koncentracije celičnih beljakovin po Lowryju	30
4.3	EKSTRAKCIJA KRATKOVERIŽNIH MAŠČOBNIH KISLIN IN PLINSKA KROMATOLOGRAFIJA ZA DOLOČANJE VODIKA	32
4.3.1	Ugotavljanje koncentracije kratkoverižnih maščobnih kislin	32
4.3.2	Ugotavljanje koncentracije vodika po rasti R. albus 20455 in B. fibrisolvens 3071T v prisotnosti cinamaldehyda	34
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	35
5.1	RAZPRAVA	35
5.2	SKLEPI	38

6	POVZETEK	39
7	VIRI	41
	ZAHVALA	47

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Ključni podatki in lastnosti cinamaldehida (Cinnamaldehyde, 2000)	16
Preglednica 2: Lastnosti in oblika preučevanih bakterij	18
Preglednica 3: Sestavine za modificirano anaerobno gojišče M2	19
Preglednica 4: Sestava pufrov in raztopin	20
Preglednica 5: Mešanica maščobnih kislin, ki smo jih uporabili kot standard pri plinski kromatografiji	20
Preglednica 6: Koncentracije KMK, deleži posameznih KMK in OD vrednosti	32
Preglednica 7: Koncentracija vodika in statistična analiza vzorcev pri sevih <i>R. albus</i> 20455 in <i>B. fibrisolvens</i> 3071 ^T	34

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Prebavni trakt pri govedu (Graham, 2005)	3
Slika 2: Mikrobna razgradnja ogljikovih hidratov v vampu prežvekovalcev (Orešnik, 2000)	8
Slika 3: Mikrobna razgradnja in sinteza beljakovin v vampu (Orešnik, 2000)	9
Slika 4: Cejlonsko (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>) in kitajsko cimetovo drevo (<i>Cinnamomum cassia</i>) (Darling, 2002)	15
Slika 5: Kemična zgradba cinamaldehida (Shakhashiri, 2007)	16
Slika 6: Rastne krivulje testiranih sevov v dveh paralelkah	25
Slika 7: Merjenje OD vrednosti za seve <i>P. ruminicola</i> 23 ^T , <i>P. bryantii</i> B ₁₄ ^T , <i>B. fibrisolvens</i> 3071 ^T in <i>F. succinogenes</i> S85	27
Slika 8: Merjenje OD vrednosti za seva <i>R. flavefaciens</i> 007 S/6 in <i>R. albus</i> 20455	27
Slika 9: pH in rast v odvisnosti od časa za seve <i>P. ruminicola</i> 23 ^T , <i>P. bryantii</i> B ₁₄ ^T , <i>B. fibrisolvens</i> 3071 ^T in <i>F. succinogenes</i> S85	28
Slika 10: pH in rast v odvisnosti od časa za seva <i>R. flavefaciens</i> 007 S/6 in <i>R. albus</i> 20455	29
Slika 11: Koncentracija celičnih beljakovin in rast v odvisnosti od časa za seve <i>P. ruminicola</i> 23 ^T , <i>P. bryantii</i> B ₁₄ ^T , <i>B. fibrisolvens</i> 3071 ^T in <i>F. succinogenes</i> S85	30
Slika 12: Koncentracija celičnih beljakovin in rast v odvisnosti od časa za seva <i>R. flavefaciens</i> 007 S/6 in <i>R. albus</i> 20455	31

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

BSA	goveji serumski albumin; angl. <i>bovine serum albumin</i>
CIN	cinamaldehyd
KMK	kratkoverižna maščobna kislina
MK	maščobna kislina
mol%G+C	molski delež gvanina in citozina
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid
NPN	neproteinski dušik; angl. <i>non-protein nitrogen</i>
OD	optična gostota; angl. <i>optical density</i>
PBS	fosfatno zapufrana slana raztopina; angl. <i>phosphate-buffered saline</i>
rpm	število obratov v minuti; angl. <i>rotations per minute</i>
ut. %	utežni odstotek [w/v]
vol. %	volumski delež [v/v]

1 UVOD

Prebavni trakt prežvekovalcev se precej razlikuje od prebavnega trakta drugih rastlinojedih živali. Prežvekovalci lahko izjemno učinkovito prebavljajo celulozo ter druge rastlinske polisaharide iz rastlinske krme in jih izkoristijo za energetske in proizvodne potrebe. Ta izjemna sposobnost prebave je povezana z anatomsko zgradbo njihovih prebavil ter mikroorganizmov, ki jih naseljujejo.

V vampu prežvekovalcev je mikrobní ekosistem sestavljen iz kompleksne anaerobne mikrobne združbe bakterij, praživali, gliv, metanogenih arhej in bakteriofagov, ki s produkti vampne fermentacije omogočajo vzdrževanje osnovnih življenjskih funkcij in proizvodno sposobnost gostitelja (mlečnost, mesnatost...). Zato raziskovalci intenzivno preučujejo možnost spreminjanja mikrobne fermentacije v vampu. Glavni namen manipulacije vampne fermentacije je maksimirati prebavo in presnovo hranilnih snovi iz krme in povečati produktivnost živali ter zatirati neželjene procese (produkcija metana). V intenzivnih živalskih produkcijskih sistemih so zato vrsto let z dodajanjem prehranskih dodatkov, med njimi tudi in predvsem nekaterih antibiotikov, povečevali učinkovitost produkcije mleka, mesa in volne. Zaradi strahu pred akumulacijo antibiotikov v živalskih produktih ter morebitnega horizontalnega prenosa genov za rezistenco proti tem antibiotikom na patogene bakterije, so v Evropski skupnosti s 1.1.2006 prepovedali uporabo prehranskih antibiotikov. Zaradi prepovedi so stroški reje izjemno narasli, zato smo pričeli iskati alternativne snovi, ki bi prehranske antibiotike lahko nadomestili. V zadnjih letih v ta namen intenzivno preučujemo vpliv različnih probiotikov, prebiotikov ter rastlinskih izvlečkov.

Namen tega diplomskega dela je bil preučiti vpliv izvlečka cimeta (cinamaldehyd) z mikrobiološkimi in biokemijskimi metodami na šest izbranih sevov vampnih bakterij (*Prevotella bryantii* B₁₄^T, *Prevotella ruminicola* 23^T, *Ruminococcus albus* 20455, *Ruminococcus flavefaciens* 007 S/6, *Butyrivibrio fibrisolvens* 3071^T in *Fibrobacter succinogenes* S85). Cilj naloge je bil ugotoviti, kako vpliva cinamaldehyd na rast, vsebnost beljakovin, produkcijo vodika in kratkoverižnih maščobnih kislin preučevanih sevov.

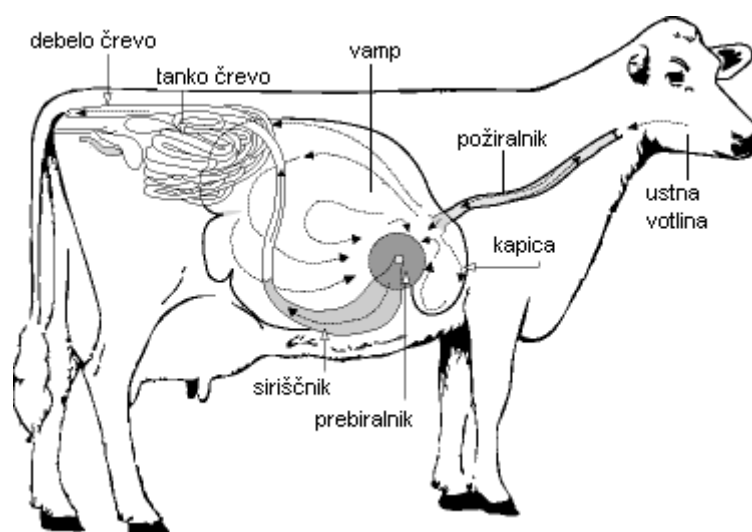
2 PREGLED OBJAV

2.1 POSEBNOSTI PREBAVNEGA TRAKTA PREŽVEKOVALCEV

V intenzivnih živalskih produkcijskih sistemih je govedo pomemben člen. Dobra molznica lahko z mlekom v desetih mesecih proizvede 226 kg beljakovin, 356 kg laktoze, 255 kg maščob in 56 kg vseh rudninskih snovi. Človeku bi taka količina beljakovin zadostovala za približno 10 let, energije za 5 let in kalcija za 30 let (Umphrey in Staples, 1992). Ta izredna produkcijska sposobnost je rezultat njihovega enkratne presnove. Posebnost prežvekovalcev je v tem, da lahko prebavljajo in izkoriščajo celulozo in druge strukturne polisaharide iz rastlinske krme za energetske in proizvodne potrebe, ki jih druge skupine živali slabo izkoriščajo ali jih sploh ne morejo izkoristiti. Druga značilnost je v tem, da lahko izkoriščajo anorganski dušik v anabolne namene mnogo bolje kot druge rastlinojede živali. Posebnosti prebave prežvekovalcev so povezane z anatomsko zgradbo njihovih prebavil (Vatovec, 1971). Prebavni trakt prežvekovalcev je sestavljen iz ustne votline, požiralnika, štiridelnega želodca, ki je grajen iz treh predželodcev (vamp, kapica, prebiralnik) in pravega želodca (siriščnik) ter tankega, slepega in debelega črevesa (Cestnik, 1999).

Pri trganju krme imajo zelo pomembno vlogo ustnice, ki so v primerjavi z drugimi rastlinojedimi in mesojedimi živalmi slabo gibljive. V zgornji čeljusti imajo zobno ploščo, ki je pokrita z odpornim večskladnim ploščatim poroženevajočim epitelijem. Jezik, ki zapolnjuje večji del ustne votline in zobje so prilagojeni hitremu zauživanju rastlinske hrane, ki jo ob regurgitaciji (vračanje želodčne vsebine v ustno votlino) iz predželodcev znova in znova drobijo. Požiralnik je kožno mišična cev, ki povezuje ustno votlino s predželodci (Cestnik, 1999).

V predželodcih poteka mehčanje in mešanje grobe rastlinske krme in razgradnja polisaharidnih delcev sten rastlinskih celic. Slednjo razgrajuje kompleksna mikrobna združba v predželodcih, predvsem v vampu. Tanko, slepo in debelo črevo je v primerjavi z drugimi vrstami živali zaradi težje prebavljive hrane dolgo. Pri govedu doseže črevo 25 do 30 kratno dolžino lastnega telesa (Cestnik, 1999).



Slika 1: Prebavni trakt pri govedu (prirejeno po Graham, 2005)

2.2 VAMP

2.2.1 Zgradba vampa

Vamp je vrečast prebavni organ, ki v celoti zapolnjuje levo polovico trebušne votline. Na površini vampa je krožna brazda, ki razdeli vamp na zgornjo in spodnjo vampo vrečo. Na obeh koncih vampovih vreč so z venčnimi brazdami ločene slepe vreče. Navzven je mišična stena pokrita s serozno, v notranjosti pa s kutano sluznico, ki je porasla z nitastimi, listastimi in kijastimi papilami. Papile zelo povečajo notranjo površino in s tem tudi sposobnost za absorpcijo (Vatovec, 1971).

2.2.2 Mikroorganizmi v vampu

Vamp prežvekovalcev je mikroben ekosistem, sestavljen iz kompleksne anaerobne mikrobne združbe bakterij, praživali, gliv, metanogenih arhej in bakteriofagov. Ti mikroorganizmi živijo v temperaturno optimalnem anaerobnem okolju. Tu razgrajujejo rastlinske polisaharide v ocatno, propionsko in masleno kislino ter pline kot sta metan in CO₂ (Miller in Wolin, 2001). Napolnjen s hranljivo podlago, prepojen z vodo, slino ter zaščiten s puferskim sistemom, je vamp specifično okolje (Vatovec, 1971).

Ko mikroorganizmi živijo, uporabljajo hranljivo rastlinsko podlago v vampu kot substrat za lastno rast in razmnoževanje. Najpomembnejši so polisaharidi, saj so nekateri od njih poglobitni vir energije in pomembnih spojin za vampne mikroorganizme. Vendar jih lahko

uporabijo šele, ko jih hidrolizirajo na enostavnejše komponente, oligosaharide in monosaharide (Fenchel in Finlay, 1995).

2.2.2.1 Skupine vampnih bakterij

Bakterije predstavljajo polovico vampne biomase in so verjetno najbolj pomembne za skupno mikrobno aktivnost v vampu. Izvajajo življenjsko pomembne funkcije za preživetje gostitelja. Število bakterij v vampu se giblje med 10^{10} in 10^{11} na mililiter. Gostota bakterij v vampu je odvisna od količine in narave razpoložljivih substratov za fermentacijo. V vampu prevladujejo obligatno anaerobne bakterije, na notranji steni vampa pa najdemo tudi fakultativne aerobe, ki uporabljajo za preživetje kisik, ki prihaja iz krvožilnega sistema vampa (Žgajnar, 1990).

Prevotella ruminicola in *Prevotella bryantii*

Vrste iz rodu *Prevotella* predstavljajo eno od najštevilčnejših skupin bakterij v vampu (Stewart in sod., 1997) in imajo pomembno vlogo predvsem pri presnovi beljakovin in peptidov (Wallace in sod., 1997). Bakterije iz rodu *Prevotella* razgrajujejo in izkoriščajo tudi škrob ter polisaharide rastlinske celične stene, ne pa celuloze (Stewart in sod., 1997). Prevotele so striktni anaerobi in imajo gram negativno strukturo celične stene (Cotta, 1992). Najpomembnejši fermentacijski produkti so očetna, propionska in jantarna kislina.

Fibrobacter succinogenes

Robert Hungate je že leta 1950 opisal bakterijsko vrsto *Bacteroides succinogenes*, danes poznano kot *Fibrobacter succinogenes*. Paster in sod. (1993) so ugotovili, da *F. succinogenes* ni filogenetsko soroden drugim vrstam rodu *Bacteroides* in tudi ne nobeni drugi znani vrsti bakterij. Danes predstavlja *F. succinogenes* popolnoma svojo evolucijsko vejo in samostojno bakterijsko deblo. *F. succinogenes* je ena izmed najbolj razširjenih celulolitičnih bakterij v vampu, poleg celuloze pa fermentira tudi ksilan v očetno, propionsko in jantarno kislino. Za rast potrebuje izobutirično in valerijansko kislino ter vitamin biotin (Stewart in sod., 1997). Za *F. succinogenes* je značilno, da je zelo odporen na ionoforne antibiotike, saj sta ga na primer Stewart in Duncan (1985) odkrila tudi v vampu ovce, ki je bila krmljena z dodatkom antibiotika avoparicina.

Butyrivibrio fibrisolvens

B. fibrisolvens je striktno anaerobna, gram pozitivna bakterija z nizko vsebnostjo G+C, ki proizvaja masleno kislino. Ker v vampu tvori okoli 16% vse maslene kisline pravimo, da je največji proizvajalec le-te (Stewart in sod., 1997). Poleg maslene kisline, kot glavnega fermentacijskega produkta, tvori tudi mravljično in jantarno kislino ter vodik (Russell in Rychlik, 2001). Med omenjenimi bakterijami je *B. fibrisolvens* zanimiv tudi zato, ker se pri

barvanju po Gramu obarva kot gram negativna bakterija, ima pa gram pozitivno ultrastrukturo celične stene, ki pa je nekoliko tanjša kot pri drugih gram pozitivnih bakterijah (Stewart in sod., 1997). Sharpe in sod. (1975) so dokazali, da je ultrastruktura celične stene unikatna, saj ni tipična za gram pozitivne kot tudi ne za gram negativne bakterije. Poleg tega sta Cheng in Costerton (1976) ugotovila, da celična stena omenjene bakterije vsebuje tudi teihoično kislino, ki je prisotna le v celični steni gram pozitivnih bakterij. *B. fibrisolvens* učinkovito razgrajuje predvsem hemicelulozo, na primer ksilan, ima pa tudi proteolitično funkcijo v vampu (Stewart in sod., 1997).

Ruminococcus albus in *Ruminococcus flavefaciens*

Bakteriji spadata v rod ruminokokov in sta striktno anaerobna koka s tipično gram pozitivno ultrastrukturo celične stene. Fermentirata predvsem celulozo, ksilan in celobiozo. *R. albus* je v vampu v primerjavi z *R. flavefaciens* številčnejši in ne tvori rumenega pigmenta ob fermentaciji celuloze tako kot *R. flavefaciens*. Za slednjega je značilno, da lahko razgradi tudi težko razgradljive oblike celuloze. Za rast potrebujeta vitamine in razvejane maščobne kisline. *R. albus* pa potrebuje poleg tega za optimalno rast, tvorbo kapsule in celulolitično aktivnost še 3 fenilpropanoično kislino. *R. albus* s tvorbo vodika sodeluje pri zagotavljanju energetskega prekursorja, ki ga metanogene arheje nato prevedejo do metana. Glavni produkt fermentacije je očetna kislina. Pri *R. flavefaciens* so glavni produkti fermentacije poleg očetne in jantarjeve kisline v nekaterih primerih tudi mlečna kislina in H₂. Ruminokoki so v nasprotju s *F. succinogenes* zelo občutljivi na ionoforni antibiotik monenzin in so znani po temu, da proizvajajo snovi, ki inhibirajo celulolitične glive (Stewart in sod., 1997).

2.2.2.2 Praživali

Kljub temu, da so v vampu bakterije številčnejše od praživali lahko rečemo, da slednji zaradi svoje velikosti predstavljajo podoben delež mikrobne biomase v vampu kot bakterije. Najpomembnejše praživali v vampu so anaerobni migetalkarji in jih glede na njihovo morfologijo delimo v dve družini. *Isotrichidae* imajo celotno površino telesa pokrito z bički, pri družini *Orphyroscolecidae*, pri katerih je večina površine telesa gola, pa bički tvorijo skupke le na določenih mestih (Findlay, 1998). Praživali v vampu imajo pomembno vlogo pri prebavi in stabilizaciji vampnega mikrobiološkega ekosistema. Žival ščitijo pred toksini iz hrane in patogenimi bakterijami (Jouany, 2005). Poleg tega pa je za vampne praživali značilno, da lahko z njihovimi encimi razgradijo katerikoli del rastline in bi zato njihova odsotnost v vampu imela negativen vpliv na obseg presnove vlaknine (Selinger in sod., 1996). Vampnim praživalim pripisujemo tudi pomembno vlogo pri razgradnji in fermentaciji škroba, ki ga lahko tudi požirajo in s tem na nek način umaknejo iz vampa. Ko del škroba skladiščijo kot intracelularno rezervo preprečujejo

prehitro razgradnjo tega lahko razgradljivega polisaharida, ki lahko vodi v nezaželeno vampno acidozo (Žgajnar, 1990).

2.2.2.3 Glive

Anaerobne glive proizvajajo številne encime, ki so sposobni razgraditi široko paleto substratov (Selinger in sod., 1996). V vampu aktivno razgrajujejo celično steno rastlin z lastnimi encimi: celulazami, hemicelulazami in ksilanazami. Poleg tega imajo unikatno sposobnost penetracije v kutikulo na površini rastline in celično steno lignificiranih tkiv (Akin in Borneman, 1990).

2.2.2.4 Arheje

Število metanogenih arhej v vampu je med 10^5 in 10^8 celic/ml vampne tekočine (Morvan in sod., 1996). Metanogene arheje imajo pri prežvekovalcih življenjsko pomembno vlogo, saj odstranjujejo iz vampa molekularni vodik, ki nastane v procesu vampne fermentacije (Kamra, 2005). Tako vzdržujejo nizek parcialni tlak tega plina, kar omogoča normalno reoksidacijo NADH fermentativnim mikroorganizmom v vampu in posledično nadaljevanje oziroma bolj učinkovito rast (Findlay, 1998). Ker se v procesu metanogeneze za tvorbo metana porablja vodik, je fermentacija v vampu kontinuiran proces (Kamra, 2005), ki pa s produkcijo in izrigavanjem metana privede do velikih energijskih izgub za žival.

2.2.2.5 Bakteriofagi (virusi)

Bakteriofagi so bakterijski virusi in so v vampu prisotni v velikem številu. Litični bakteriofagi z liziranjem bakterijskih celic v vampu sprostijo bakterijske proteine. Vendar o njih vemo zelo malo. Še manj vemo o temperentnih bakteriofagih, ki pa naj bi jih bilo veliko, saj so jih odkrili kar pri eni četrtnini preiskanih bakterijskih sevov. Na ta način omogočijo gostitelju uporabo bakterijskih beljakovin kot vir amonokislin (Klieve in Swain, 1993).

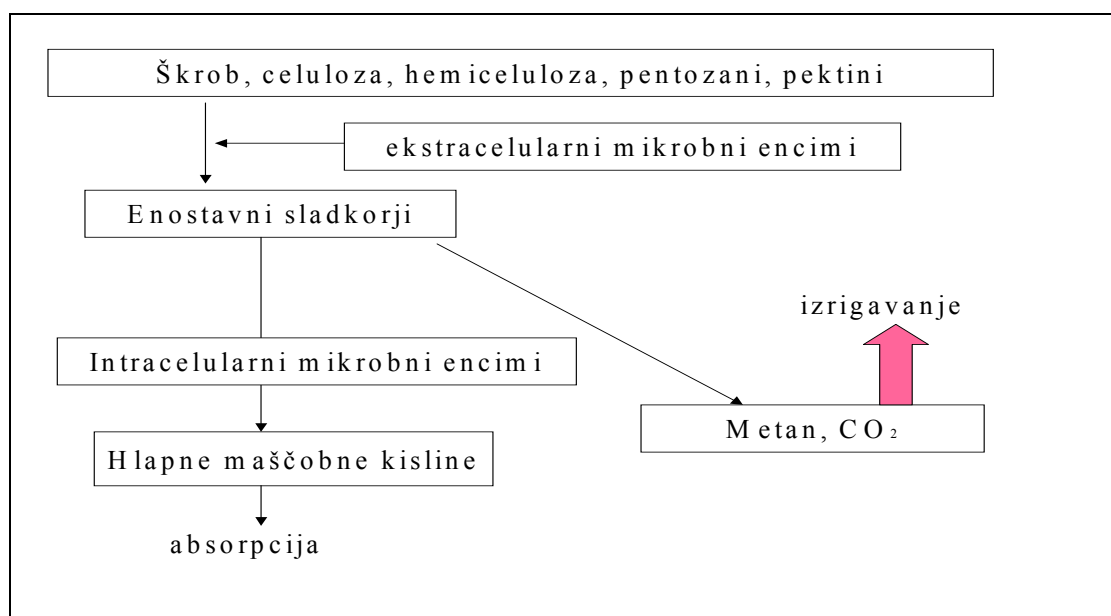
2.2.3 Potek prebave in presnova hranilnih snovi

Bistvo vsake prebave je cepitev hranljivih snovi na ustrezne sestavine, ki jih organizem absorbira. Prebavo delimo na biokemični in mehanski del. Slednji se pri govedu prične že v ustih s trganjem krme in žvečenjem. Žvečenje stimulira izločanje velikih količin sline, ki navlažijo krmo. Slina ima zelo pomembno funkcijo, saj vsebuje sečnino, rudninske snovi, karbonate in deluje kot pufer. Mehanski del prebave se nadaljuje v vampu, kjer krčenje mišične stene vampa povzroči mešanje navlažene krme z vampnimi mikroorganizmi. Ob mešanju se v vampu tvori t.i. bolus, ki se vrne po požiralniku v usta in ga žival ponovno prežveči in dodatno zdrobi večje rastlinske delce. Ponovno drobljenje je pomembno zato,

ker se delcem krme poveča površina, na katero se lahko mikroorganizmi pritrdijo. Vampni mikroorganizmi nato hidrolizirajo celulozo, hemicelulozo, pektine, fruktozane, škrob in ostale polisaharide v monosaharide in disaharide. Ti vstopijo v različne fermentacijske procese, produkti fermentacije pa so kratkoveržne maščobne kisline kot očetna, propionska in maslena kislina ter vodik in CO₂. Hlapne maščobne kisline se resorbirajo skozi steno vampa v krvni sistem, kjer služijo kot vir energije za rast epitelnega tkiva črevesja in v končni fazi vstopijo v proces glukoneogeneze (Hobson, 1997). Metan, ki nastane iz vodika in in CO₂ in preostali CO₂ izhajata iz vampa z izrigavanjem. Z metanom lahko tako žival izgubi tudi do 12% bruto zaužite energije krme (Beauchemin in McGinn, 2006).

2.2.3.1 Prebava in presnova ogljikovih hidratov

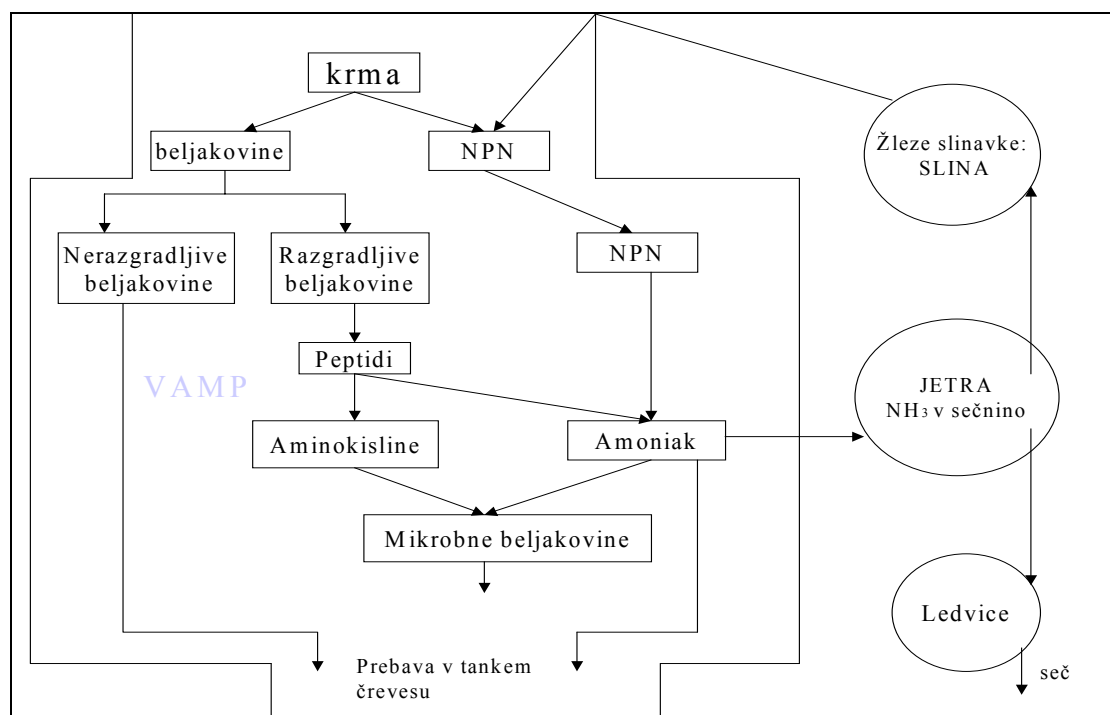
Večji del ogljikovih hidratov iz rastlinske krme razgradijo že v vampu mikroorganizmi. Razgradnja celične stene se prične s pripetjem vampnih mikroorganizmov na rastlinske delce. Najpogostejše celulozitične bakterijske vrste v vampu so *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* in *Fibrobacter succinogenes* (Akin, 1986). Le te razgradijo komplekse s svojimi ekstracelularnimi in intracelularnimi encimi do enostavnih sladkorjev (Slika 2). Poleg bakterij imajo pomembno vlogo tudi nekatere praživali, ki tudi razgrajujejo strukturne polisaharide. Razgradnjo celuloze omogočajo predvsem: depolimerazni in celulazni encimi, ker jih gostiteljske živali nimajo, proizvajajo pa jih mikroorganizmi. Pri razgradnji hemiceluloze nastanejo uronska kislina ter pentoze, ki se pozneje razgradijo v ksilozo (Žgajnar, 1990). Tako celulozo kot hemiceluloze vampni mikroorganizmi učinkovito razgrajujejo, vendar se njuna razgradljivost zmanjša, kadar tvorita komplekse z ligninom, ker ta mikrobnim celulazam in hemicelulazam preprečuje dostop do substrata (Van Soest, 1994). Razgradnjo škroba in dekstrinov zagotavljajo mikrobne amilaze. Razgraditev škroba poteka v smer hlapnih maščobnih kislin, predvsem v tvorbo propionske kisline. Pri razgradnji pektinov nastane v končni fazi predvsem očetna kislina (Žgajnar, 1990).



Slika 2: Mikrobna razgradnja ogljikovih hidratov v vampu prežvekovalcev (Orešnik in Kermauner, 2000)

2.2.3.2 Prebava in presnova beljakovin

Ko beljakovine prispejo v vamp, jih večinoma razgradijo mikrobni proteolitični encimi naprej do polipeptidov, dipeptidov in aminokislin. Slednji se nato v procesu deaminacije pretvorijo v amonijak (NH_3) in organske kisline. Nekaj NH_3 preide skozi steno vampa in se pretvori v sečnino, nekaj pa jo skupaj s peptidi in prostimi aminokislinami uporabijo mikroorganizmi za tvorbo lastnih beljakovin (Hobson, 1997). Zelo pomembno dejstvo je, da lahko mikrobi tvorijo poleg neesencialnih tudi esencialne aminokisline, kar omogoči preživetje živali tudi s krmo, ki je revna z beljakovinami. Uživanje krme, ki je revna z beljakovinami zmanjša vsebnost amonijaka v vampu, zaradi česar je rast mikroorganizmov zavirana, posledično pa je zmanjšana tudi razgradnja ogljikovih hidratov, predvsem celuloze. Pri krmi, ki je bogata z nebeljakovinskim dušikom (NPN, angl. *non protein-nitrogen*), se zaradi hitre razgradnje izloči veliko amonijaka (slika 3), ki se absorbira iz vampa v kri in se v jetrih pretvori v sečnino. Večina sečnine v vampu se izloči s sečem, del pa se vrača v prebavila s slino, delno tudi neposredno skozi vampno sluznico v vamp (Orešnik in Kermauner, 2000).



Slika 3: Mikrobna razgradnja in sinteza beljakovin v vampu (Orešnik in Kermauner, 2000)

Aktivnost sinteze beljakovin v vampu ni odvisna le od razgradljivosti beljakovin in razpoložljive energije, temveč tudi od drugih razmer v vampu. Za razvoj mikroorganizmov je potreben optimalen pH, zato vsi vplivi, ki spreminjajo pH v vampu spreminjajo tudi mikrobnost sintezo beljakovin. Če je prisotnih dovolj lahko topnih ogljikovih hidratov, je fermentacija burna in lahko pH doseže dokaj nizke vrednosti (manjše od 5), vendar se z dotokom sline in nastajanjem NH_3 pH hitro izravna (Žgajnar, 1990). Slina je bikarbonatno-fosfatni pufer s pH okoli 8. Izloča se v vamp, kjer ustvari primeren vodni medij za rast mikroorganizmov in kljub konstantnemu nastajanju organskih kislin vzdržuje vampno vsebino v nevtralnem pH nivoju (Hobson, 1997).

2.2.3.3 Prebava in presnova maščob

Maščobe za odraslo žival niso tako pomembne kot za teleta ali monogastrične živali. Mikroorganizmi v vampu so zelo občutljivi na večjo koncentracijo maščob v krmi. Povečan delež maščob v vampu ima inhibitoren učinek na mikroorganizme, kar se kaže v manjšem zauživanju krme, slabšem izkoriščanju celuloze in manjšem odstotku maščobe v mleku (Žgajnar, 1990).

Večina nenasičenih maščobnih kislin se v vampu hidrogenira, vendar kljub hidrogenaciji v vampu pride zelo redko do pomanjkanja esencialnih maščobnih kislin. Poleg hidrogenacije potekajo v vampu tudi izomerizacija nekaterih nenasičenih maščobnih kislin, hidroliza

nevtralnih maščob in fosfatidov ter procesi sinteze, pri katerih lahko mikroorganizmi proizvajajo samo nenasičene dolgoverižne maščobne kisline (Žgajnar, 1990).

2.2.3.4 Plini v vampu

V vampu nastaja več plinov, največ CO₂ (40%) in CH₄ (30 do 40%) ter N₂ (5%). CO₂ nastaja kot produkt fermentacije in kot produkt v reakcijah organskih kislin z bikarbonatom. Metan nastaja v procesu metanogeneze. To je zapleten proces, ki ga izvajajo izključno metanogene arheje. Na vsakih 100 g prebavljenih ogljikovih hidratov nastane 4,5 g metana (Žgajnar, 1990).

2.2.4 Manipulacija vampne fermentacije

Glavni namen manipulacije vampne fermentacije je maksimirati prebavo, absorpcijo in presnovo hranljivih snovi iz krme in povečati produktivnost živali. Z njo želimo doseči optimizacijo fermentacijskih procesov. Pri iskanju optimalnega stanja moramo v odvisnosti od vrste krme in živalskih produktov pospeševati ali zavirati fermentacijske procese. Zavreti želimo predvsem procese, ki vodijo do izgub energije: produkcija metana, fermentacija beljakovin, peptidov, aminokislin ter absorpcija amonijaka. Vendar, ker je vampna fermentacija opisana kot integriran sistem, ki je sestavljen iz mreže prepletajočih se reakcij, lahko s posegom vanje pride do pozitivnih ali negativnih učinkov. Primer nastanka pozitivnih in negativnih učinkov lahko opazimo pri inhibiciji različnih procesov. Pozitiven učinek se kaže pri inhibiciji metanogeneze, zaradi katere pride do povečane tvorbe propionske kisline (to ne velja za molznice). Inhibicija procesa deaminacije lahko privede do redukcije razvejanih maščobnih kislin (*angl.* branched fatty acids), ki so rastni faktorji za fibrolitične bakterije, kar se kaže kot negativen učinek (Nagaraja in sod., 1997).

Mikrobne procese v vampu lahko modificiramo s posegom na treh nivojih (Hobson, 1997):

- krma
- žival
- mikroorganizmi

2.2.4.1 Posegi na nivoju krme

Je najstarejša metoda za manipulacijo vampne fermentacije. S posegi na nivoju krme želimo povečati prebavljivost strukturnih ogljikovih hidratov in zaščititi prehranske beljakovine pred mikroorganizmi v vampu. Najpogosteje uporabljene metode za zmanjšanje razgradnje prehranskih beljakovin sta toplotna in kemična obdelava krme. Pri toplotni obdelavi krme nastanejo t.i. križne vezi (*angl.* cross-links), ki so bolj odporne na encimsko hidrolizo v vampu. Za kemično obdelavo krme uporabljajo aldehide, tanine, alkohole, kisline, alkalije, cink in reducirajoče sladkorje. Kemična obdelava krme povzroči

v večini primerov modifikacije, ki zmanjšujejo razgradnjo v vampu zaradi sprememb v pH-ju in so delno ali popolnoma reverzibilne zaradi kislosti v siriščniku in dvanajstniku (Schwab, 1995).

2.2.4.2 Posegi na nivoju fiziologije živali

Fiziološki procesi kot so prežvekovanje, slinjenje, regurgitacija, izrigavanje in absorpcija fermentacijskih produktov tudi vplivajo na sestavo in aktivnost mikrobne populacije v vampu. Posegi na nivoju fiziologije prežvekovalcev temeljijo na temu, da spremenijo vampno fermentacijo. Do modifikacije le te pride s kontrolo apetita, če pri živali izzovemo večjo izločanje sline ter z vplivom na funkcionalno aktivnost samega vampa (Nagaraja in sod., 1997).

2.2.4.3 Posegi na nivoju mikroorganizmov

Znanstveniki so testirali veliko število kemičnih snovi, ki naj bi modificirale število in aktivnost mikroorganizmov v vampu. V naslednjem podpoglavju bomo opisali nekaj teh snovi.

2.2.5 Modifikatorji mikrobne aktivnosti v vampu

2.2.5.1 Nevtralizirajoči agensi (pufri)

Pufri izboljšujejo zdravje in povečujejo produktivnost živali tako, da nevtralizirajo kisline v vampu, ko nastajajo prekomerno, ali ko odpove naravni puferski sistem prežvekovalca (Nagaraja in sod., 1997). Najpogostejši puferski dodatki krme so: soda bikarbona, kalcijev karbonat, magnezijev oksid, bentonit in nekateri drugi (Tucker in sod., 1992). Mehanizem delovanja pufrov temelji na vzdrževanju optimalnega pH oziroma večanja pH predželodcev (Le Ruyet in Tucker, 1992). Okeke in sod. so že leta 1983 dokazali, da povečan pH v vampu pospešuje tudi fermentacijo vlaknin in beljakovin.

2.2.5.2 Ionoformni antibiotiki

Ionoformni antibiotiki so protimikrobne snovi, ki jih rejci pogosto uporabljajo v obliki prehranskih dodatkov v prehrani prežvekovalcev. Z inhibicijo specifičnih delcev bakterijske združbe spreminjajo vampno fermentacijo, ki omogoča večjo produktivnost (Callaway in sod., 2003).

Bakterije iz rodu *Streptomyces* proizvedejo večino ionoformnih antibiotikov. Znani tvorci le teh so tudi bakterije iz rodu *Streptoverticillium*, *Nocardiopsis*, *Nocardia*, in *Actinomadura* spp. (Benno in sod., 1988). Ponekod po svetu ionoforme antibiotike še vedno uporabljajo

kot promotorje rasti domačih živali in kot učinkovino proti parazitom (Watanabe in sod., 1981), v Evropski skupnosti pa so zaradi strahu pred akumulacijo antibiotikov v živalskih produktih ter morebitnega horizontalnega prenosa rezistence na za človeka ali živali patogene mikroorganizme, s prvim januarjem 2006 prepovedali uporabo prehranskih antibiotikov. Do omenjenega datuma smo v Evropi največ uporabljali ionoforni antibiotik monenzin.

Monenzin je monovalentni karboksilni ionoforni antibiotik. Proizvaja ga vrsta *Streptomyces cinnamonensis* (Haney in Hoehn, 1968). Selektivno ovira predvsem po Gramu pozitivne bakterije kot npr. vrste iz rodov *Ruminococcus* in *Butyrivibrio*. Te bakterije so znani tvorci acetata, številne pa tvorijo tudi vodik kot enega od fermentacijskih produktov. Zato se v vampu poveča produkcija propionata, zmanjša pa produkcija metana. Tako se izboljša energijsko izkoriščanje krme, saj se propionat energijsko boljše izkorišča kot acetat. Poleg tega ne prihaja do energijskih izgub zaradi emisije metana (Žgajnar, 1990).

2.2.5.3 Inhibitorji metana

Poleg specifičnih inhibitorjev produkcije metana (kloroform, trikloroacetamid,...) lahko proces metanogeneze inhibirajo tudi ionofori, prehranske maščobe in proces defaunacije vampa. Inhibicija metanogeneze navadno spremlja povečana tvorba propionata (Wolin, 1975). Lopez in sod. (1995) so ugotovili, da se je tudi ob dodatku mravljične kisline, ki je prekursor propionata, v poskusnih fermentorjih povečala produkcija propionata in hkrati zmanjšala produkcija metana (Martin in Streeter, 1995).

2.2.5.4 Inhibitorji proteolize, deaminacije in peptidolize

Konverzija prehranskih beljakovin v peptide in aminokislino do amonijaka predstavlja za prežvekovalca in posledično rejca veliko izgubo. V začetni proces razgradnje beljakovin v vampu so vpletene praživali, glive in bakterije. Broderick in sod. (1991) so prišli do spoznanja, da je najbolj učinkovita metoda, ki bi preprečila razgradnjo beljakovin krme, njihova toplotna ali kemična obdelava.

Deaminacija aminokislin v vampu poteka pod vplivom več različnih mikroorganizmov. Največjo deaminacijsko aktivnost med vampnimi bakterijami so odkrili pri bakterijah *Peptostreptococcus anaerobius*, *Clostridium sticklandii* in *Clostridium aminophilum* (Paster in sod., 1993). Na omenjene bakterije delujejo različni inhibitorji. Eden izmed teh je DDIC (angl. *Dimetyldiphenyliodonium chloride*), ki poleg inhibicijske funkcije stimulira produkcijo propionske kisline v vampu. Znani inhibitorji deaminacije so tudi timol, hidrazin in kalcijev arzenit. Vendar pa te snovi zaradi morebitne toksičnosti za žival niso

primerni za uporabo. Najboljša zaščita pred izgubo aminokislin je predhodna obdelava, bodisi z inkapsulacijo bodisi s krmljenjem živali z analognimi aminokislinami (Nagaraja in sod., 1997).

2.2.5.5 Rastni dejavniki

To so organske ali anorganske substance, ki so esencialne za vampne mikroorganizme, vendar jih le-ti ne morejo sintetizirati. Zato jih morajo dobiti iz okolja. Le te dobi žival iz okolja. Anorganski rastni dejavniki za bakterije so CO₂ in elektoliti, organski pa aminokislinae, vitamini, maščobne kisline, hemin, purini in pirimidini (Nagaraja in sod., 1997). Med naštetimi ravnimi dejavniki imajo vitamini pomembno prehrabeno vlogo za mnoge vampne bakterije, predvsem vitamin B in vitamin K. Slednjega potrebuje za rast in razmnoževanje le nekaj vrst bakterij, vitamini B (biotin, folna kislina, niacin, tiamin, vitamin B₁₂ in drugi) pa so sodelujejo v različnih biokemičnih reakcijah pri metabolizmu vampnih mikroorganizmov (Kon in Porter, 1954).

2.2.5.6 Maščobe

Maščobe v prehrani lahko močno vplivajo na fermentacijo v vampu. Učinek je odvisen od vrste in količine dodanih maščob. Dodatek kratkoverižnih, nerazvejanih ali prostih maščobnih kislin prehrani, vpliva na fermentacijo ogljikovih hidratov, presnova dušika in nastanek fermentacijskih produktov (Van Nevel in Demeyer, 1988). Henderson (1973) je ugotovil, da imajo maščobe protimikrobni učinek, saj dodatek le teh učinkuje inhibitorno na nekatere mikroorganizme, predvsem na celulolitične bakterije, metanogene arheje in praživali.

2.2.5.7 Mikrobni krmni dodatki in encimi

Uporaba probiotikov kot prehranskih dodatkov v prehrani prežvekovalcev sega že v začetek 20. stoletja, saj so Eckles in sod. (1924) poročali o uporabi kvasa v prehrani telet. *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Enterococcus diacetylactis* in *Bacillus subtilis* so najbolj pogosto uporabljeni mikroorganizmi pri dodatku k prehrani živali. *L. acidophilus* zmanjšuje proteolizo pri teletih (Skrivanova in Machanova, 1990) in stimulira razgradnjo vlaknin (Yoon in Stern, 1995). Kung in Hession (1995) sta ugotovila, da dodatek propionskih bakterij povzroči pretvorbo mlečne kisline in glukoze v očetno in propionsko kislino. Poleg propionskih bakterij uporabljajo tudi bakterije vrste *Megasphaera elsdenii*, ki ščitijo žival pred akumulacijo mlečne kisline (Robinson in sod., 1992).

Encimi so proteinske molekule, ki katalizirajo specifične kemijske reakcije. V prehrani domačih živali jih uporabljamo zato, da izboljšamo njihovo prirejo. Kot dodatke k prehrani

navadno uporabljamo proteolitične, celulozične, hemicelulozične, pektinolitične in amilolitične encime. Encime k krmi dodajamo med samim siliranjem, vendar so znanstveniki ugotovili, da je najboljša metoda, ki preprečuje encimsko razgradnjo, da dodamo encime krmi tik pred krmljenjem (Kung, 1998).

2.2.5.8 Rastlinski izvlečki

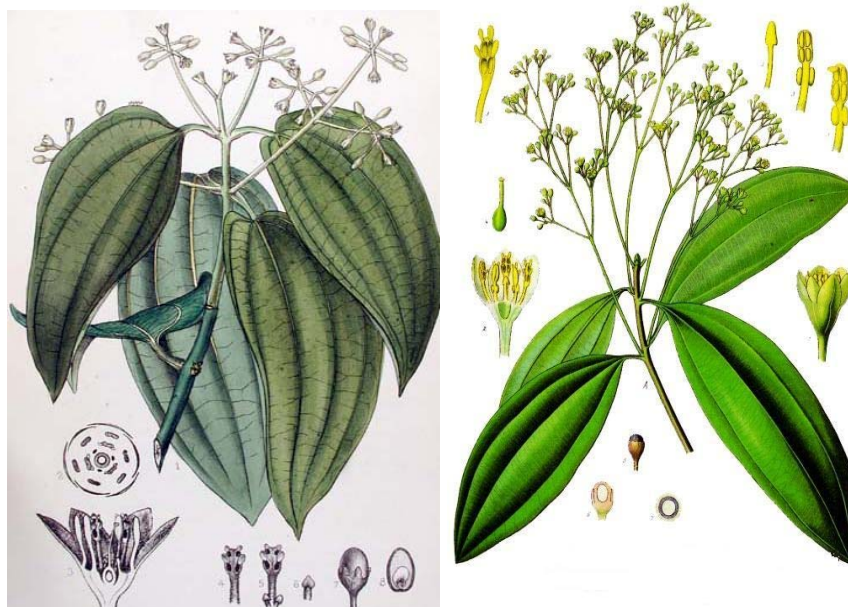
Rastlinske izvlečke iz različnih rastlinskih vrst uporabljamo že stoletja v t.i. etnomedicini in etnoveterini zaradi njihovih protimikrobnih učinkov (Dano in Bogh, 1999). Zanimanje za rastlinske izvlečke je ponovno naraslo, ko je z letom 2006 v Evropski skupnosti pričel veljati zakon o prepovedi uporabe prehranskih antibiotikov zaradi nevarnosti akumulacije le-teh v mleku in mesu, možnosti za razvoj bakterijskih rezistenc ter horizontalnega prenosa genov za rezistenco na patogene seve.

V zadnjih letih so raziskovalci dokazali učinkovitost nekaterih rastlinskih izvlečkov tudi proti patogenim bakterijam. Tako so znanstveniki ugotovili, da eterično olje, pridobljeno iz rastline cimeta (*Cinnamomum spp.*) deluje protibakterijsko proti nekaterim človeku nevarnim bakterijam kot so: *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp. in drugim (Wallace in sod., 1994). Chang in sod. (2001) so odkrili, da je bila glavna protibakterijska komponenta tega olja cinamaldehyd. Tako lahko protimikrobno aktivnost rastlinskih izvlečkov pripišemo predvsem sekundarnim rastlinskim metabolitom. Med te uvrščamo: saponine, terpenoide (karvakrol, karvon, timol), fenilpropanoide (cinamaldehyd, eugenol) (Busquet in sod., 2006). Mehanizem protibakterijskega delovanja rastlinskih eteričnih olj temelji na uničenju celične membrane zaradi lipofilnega značaja olja, posledično pa pride do motenj v prenosu protonov skozi celično membrano (Cox in sod., 2000). Helander in sod. (1998) pa trdijo, da imajo nekatera eterična olja in njihove aktivne komponente tudi drugačne mehanizme delovanja. Eterična olja delujejo proti gram pozitivnim in gram negativnim bakterijam, vendar so slednje manj občutljive zaradi tipične strukture zunanje membrane s hidrofilno površino, ki deluje kot močna nepropustna bariera (Busquet in sod., 2006). Sklepamo lahko, da je učinek različnih eteričnih olj na vampno mikrobovno fermentacijo odvisen od občutljivosti posameznih vampnih mikroorganizmov na te komponente (Wallace in sod., 1994).

Izvleček cimeta cinamaldehyd (CIN)

Cinamaldehyd je kemična snov, ki nastaja v skorji cimetovega drevesa in je znan po protivirusnem, protibakterijskem in protifungicidnem delovanju (Burnham, 2006). Poznamo več vrst rastlin cimeta, najbolj znani sta cejlonski (*Cinnamomum zeylanicum*) in kitajski (*Cinnamomum cassia*) (slika 4). Za cimetovo drevo je značilno, da so mladi listi

živo rdeče barve, ko se postarajo, postanejo zeleni. Kot začimba se uporablja posušena tanka notranja plast skorje, bodisi kot zvite paličice, bodisi kot prah.



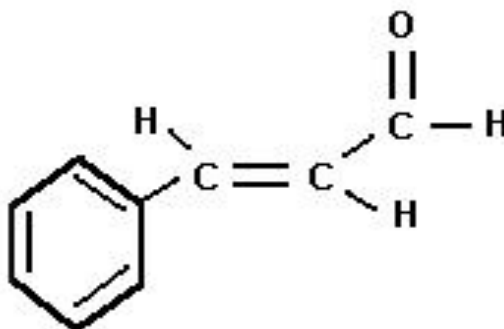
Slika 4: Cejlonsko (*Cinnamomum zeylanicum*) in kitajsko cimetovo drevo (*Cinnamomum cassia*) (Darling, 2002)

Za cimet velja, da je ena od najstarejših začimb. Domneva se, da so ga Kitajci uporabljali že 3000 let pr.n.št. V Evropo so ga prinašali arabski trgovci. Veljal je za zelo drago in cenjeno začimbo, saj so ga evropski osvajalci med 16. in 18. stoletjem na Cejlonu, ozemlju današnje Šrilanke, zahtevali od prebivalcev kot davek. Stari Egipčani so ga uporabljali pri mumifikaciji, verjetno prav zaradi protibakterijskega učinka. Poleg tega so ga uporabljali pri zdravljenju črevesnih obolenj, predvsem pri zdravljenju drisk. Danes ga uporabljajo pri zdravljenju sladkorne bolezni. Različne raziskave so dokazale, da že majhne količine cimeta v hrani zmanjšajo nivo sladkorja v krvi (Darling, 2002).

Preglednica 1: Ključni podatki in lastnosti cinamaldehyda (Cinnamaldehyde, 2000)

CINAMALDEHID	
Molekulska formula	C ₉ H ₈ O
sinonimi	3-fenil-2propenal, cinamal, cinamil aldehyd,...
Molska masa (g/mol)	132,16
Toksičnost (mg/kg)	2220 (podgane)
Nevarnost	Draži kožo
Fizikalne in kemične lastnosti	
Fizikalno stanje	Oljnata tekočina
Tališče (°C)	-7,5
Vrelišče (°C)	248-251
Gostota (g/l)	1,05
Topnost v vodi	Slabo topen

Cinamaldehyd (slika 5) je rumena, oljnata tekočina (preglednica 1) z močnim vonjem po cimetu in je glavna učinkovina cimetovega olja. Uporabljamo ga kot aromatizacijski dodatek k zdravilom v farmacevtskih, parfumskih in živilskih industrijah. Pridobivamo ga s parno destilacijo cimetovih listov in lubja. Poleg tega ga lahko pripravimo tudi s sintezo iz sorodne snovi kot je cinamilni alkohol ali s kondenzacijo benzaldehyda in acetaldehyda (Cinnamaldehyde, 2000).



Slika 5: Kemična zgradba cinamaldehyda (Shakhashiri, 2007)

Busquet in sod. (2006) so dokazali, da je učinek cinamaldehyda odvisen od pH v vampu. Pri manjšem pH v vampu (pH<6) cinamaldehyd zmanjša izgubo dušika, poveča tvorbo propionske in maslene kisline in zmanjša produkcijo očetne kisline. Pri višjem pH (pH>6) cinamaldehyd zmanjša produkcijo hlapnih maščobnih kislin in poveča razmerje med očetno in propionsko kislino, kar povzroči izgubo energije zaradi izgube ogljika z

metanom (Wolin in Miller, 1988). Cardozo in sod. (2005) so tako postavili hipotezo, ki pravi, da obstaja med pH v vampu in protimikrobnim učinkom rastlinskih izvlečkov tesna povezava, saj postanejo kisline pri nizkem pH hidrofobne, zaradi česar lažje prehajajo skozi celično membrano.

Študije so pokazale, da cinamaldehyd deluje protimikrobno na različne vrste mikroorganizmov (Helander in sod., 1998). Njegov protimikrobni učinek se kaže predvsem na gram pozitivnih bakterijah (Outtara in sod., 1997), učinkovitost na določenih gram negativnih bakterijah pa so dokazali Helander in sod. (1998) šele pri uporabi očiščenega cinamaldehyda. Mehanizem protimikrobnega delovanja cinamaldehyda še ni razjasnjen, kljub temu pa ga omenjeni znanstveniki pripisujejo karbonilni skupini.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Vampni sok

Svež, goveji vampni sok smo dobili v klavnici Kamnik. Pred uporabo smo ga precedili in centrifugirali (centrifuga Sorvall® - RC5C, Nemčija) zato, da smo odstranili večje delce krme. Centrifugiranje je potekalo pol ure pri sobni temperaturi, pri 10000 obratih (rpm). Supernatant smo avtoklavirali in ga do uporabe shranili v hladilniku pri 4°C.

3.1.2 Bakterijski sevi

V poskus smo vključili naslednje vampne bakterijske seve: *P. ruminicola* 23^T, *P. bryantii* B₁₄, *B. fibrisolvens* 3071^T, *F. succinogenes* S85, *R. albus* 20455 in *R. flavefaciens* 007 S/6. Te seve smo uporabili, ker so dobro proučeni, jih lahko gojimo v laboratorijskih »in vitro« razmerah in so zato njihove lastnosti (Preglednica 2) in vloga v vampu precej dobro poznane.

Preglednica 2: Lastnosti in oblika preučevanih bakterij

Bakterija in morfologija	Celična stena	Fermentacijski produkti	DNA (mol%C+G)	substrat
<i>P. ruminicola</i> 23 ^T Paličaste in kokoidne celice, oblika se spreminja s starostjo kulture	-	propionska, očetna, mravljična, jantarna kislina	45-51	sladkor, škrob, pektin, ksilani
<i>P. bryantii</i> B ₁₄ Paličaste celice	-	propionska, očetna, mravljična, jantarna kislina	39-43	sladkor, škrob, pektin, ksilani
<i>F. succinogenes</i> S85 Paličaste celice	-	očetna, mravljična, jantarna kislina	45-51	celuloza
<i>B. fibrisolvens</i> 3071 ^T Ukrivljene paličaste celice	morfološko+ fiziološko -	mravljična, očetna, maslena, H ₂ in CO ₂	41	sladkor, škrob, pektin, celuloza, hemiceluloze,
<i>R. flavefaciens</i> 007 S/6 Kokoidne celice	+	mravljična, očetna, jantarna kislina	39-44	celuloza, hemiceluloza
<i>R. albus</i> 20455 Kokoidne celice	+	mravljična, očetna, jantarna kislina, H ₂ in CO ₂	42-46	celuloza, hemiceluloza

+ : gram pozitivna celična struktura, - : gram negativna celična struktura

3.1.3 Gojišče M2

Bakterijske seve smo gojili v modificiranem anaerobnem gojišču M2 (Hobson, 1969), ki je osnovna rastna podlaga za vampne bakterije. Za pripravo M2 gojišča smo potrebovali naslednje sestavine (preglednica 3):

Preglednica 3: Sestavine za modificirano anaerobno gojišče M2

Sestavina	Koncentracija (ut.%)
NaHCO ₃	0,4
Bakto tripton	1,0
Kvasni izvleček	0,25
Glukoza	0,2
Celobioza	0,2
Topni škrob	0,2
Resazurin	0,001
L-cistein HCl	0,1
Mineralna raztopina I	15,0 (vol.%)
Mineralna raztopina II	15,0 (vol.%)
Vampni sok	30,0 (vol.%)
Deionizirana voda	40,0 (vol.%)

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

Sestavine gojišča (razen L-cisteina HCl) smo zatehtali in odmerili po recepturi. Pomembno vlogo pri pripravi gojišča ima resazurin, saj deluje kot indikator prisotnosti kisika v gojišču tako, da obarva gojišče rožnato, kadar je prisoten kisik. Sestavine smo nato segrevali in mešali na magnetnem kuhalniku do vretja in dodali L-cistein HCl (dodatni reducent). Temu je sledilo prepihanje s CO₂, da je gojišče izgubilo rožnato barvo. Gojišča smo nato alikvotirali v steklene epruvete "Hungate" (Bellco Glass Inc., Vineland, ZDA) ter jih neprodušno zaprli z zamaški iz butilne gume in avtoklavirali 15 minut pri 121 °C.

Za pripravo poltrdega gojišča M2 smo v pripravljeno gojišče dodali 0,75 ut. % agarja. Poltrdo gojišče M2 smo uporabljali za shranitev sevov v zamrzovalniku pri -20°C.

3.1.4 Cinamaldehyd

Najprej smo preverili sterilnost cinamaldehyda (Trans-cinnamaldehyde, Merck 8.02505.0250, MW = 132,16 g/mol, Merck[®], Nemčija). To smo storili tako, da smo ga dodali v sterilno M2 gojišče in inkubirali pri 37°C. Z merjenjem motnosti optične gostote (pri 654 nm) smo ugotovili, da je gojišče postalo motno, kar je kazalo na to, da smo ga okužili z dodatkom našega izvlečka. Nesterilnost izvlečka smo nato preverili in dokazali z barvanjem po Gramu in opazovanjem pod mikroskopom. Izvleček je vseboval Gram pozitivne koke.

Zato smo ga sterilizirali s filtracijo skozi 0,22 µm membranski filter Millex GS (Millipore[®], Irska) in nato ponovno preverili njegovo sterilnost. Ker do porasta motnosti gojišča ni prišlo, smo ga uporabili v poskusu.

3.1.5 Pufri in raztopine

V preglednicah 4 in 5 navajamo sestavo pufrov in raztopin, ki smo jih uporabili v poskusu.

Preglednica 4: Sestava pufrov in raztopin

ime	sestava
1M Na-fosfatni pufer (6,5)	1M Na ₂ HPO ₄ + 1M NaH ₂ PO ₄
Lowry A	5 % Na ₂ CO ₃
Lowry B	0,1 % NaKC ₄ H ₄ O ₆ + 0,5 % CuSO ₄ x 5H ₂ O, pH 7
Folin-Ciocalteu reagent	57,5 % H ₂ O 15 % Li ₂ SO ₄ 10 % NaH ₂ W 10 % HCl (25 %) 85 ut. % H ₃ PO ₄ 2,5 % NaH ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O

Preglednica 5: Mešanica maščobnih kislin, ki smo jih uporabili kot standard pri plinski kromatografiji

Kislina	Količina na 100 ml	Koncentracija (g/l)	Koncentracija (mM)
Ocetna kislina	100 µl	1,05	17,485
Propionska kislina	100 µl	0,99	13,364
Izo-maslena kislina	100 µl	0,95	10,782
n-maslena kislina	100 µl	0,96	10,895
Izo-valerianska kislina	100 µl	0,93	9,109
n-valerianska kislina	100 µl	0,94	9,207
Krotonska kislina (=IS)	100 µl	1,00	dodana pri ekstrakciji
n-kaprionska kislina	100 µl	0,93	8,003

IS = interni standard

3.2 METODE

3.2.1 Bryantova modifikacija Hungate tehnike

Za gojenje bakterij smo uporabili Bryantovo modificirano Hungatove tehniko za gojenje anaerobnih vampnih mikroorganizmov (Bryant, 1972). Sevi so bili shranjeni v poltrdem agarškem gojišču (0,75 ut.% agarja) pri -20°C . Po odmrznitvi smo seve anaerobno precepili v epruvete s tekočim gojiščem M2. Precepljanje je potekalo pod zaščitnim plinom CO_2 , ki je preprečil vnos O_2 v epruvete in tako omogočil anaeroben potek dela.

3.2.2 Dodajanje izvlečka v gojišča z bakterijskimi sevi

Poskus je bil vključen v širšo raziskavo vpliva različnih rastlinskih izvlečkov na rast in nekatere fenotipske lastnosti preučevanih bakterij, v katerem smo kot referenčni krmni dodatek uporabili ionoforni antibiotik monenzin. Poskus smo razdelili na dva dela. V prvi del smo vključili bakterijske seve *P.ruminicola* 23^T, *P. bryantii* B₁₄, *F. succinogenes* S85 in *B. fibrisolvens* 3071^T, v drugi del pa seva *R. albus* 20455 in *R. flavefaciens* 007 S/6. V prvem delu poskusa smo cinamaldehyd dodali v gojišča v dveh različnih koncentracijah, t.j. 100 mg/l in 1000 mg/l.

V drugem delu poskusa smo preučevali vpliv treh različnih koncentracij cinamaldehyda za seva *R. albus* 20455 in *R. flavefaciens* 007 S/6 (20, 100 in 500 oz. 250, 500 in 750 mg/l). V poskusu smo uporabili koncentracije cinamaldehyda, ki jo je pred nami že uporabljal španski raziskovalec (Busquet Solé, 2005) pri preučevanju vpliva cinamaldehyda na presnovo vampnih simbiontov v kontinuiranih tekočih kulturah (100 in 1000 mg/l). Pri obeh ruminokokih pa smo koncentracije prilagodili glede na rezultate preučevanja vpliva cinamaldehyda na prve štiri bakterije.

S spreminjanjem rasti preučevanih sevov v gojiščih brez dodanega cinamaldehyda smo preverili rastne krivulje in na osnovi le-teh določili štiri faze rasti, v katerih smo analizirali vpliv cinamaldehyda na nekatere parametre.

- začetek eksponentne faze (OD ~ 0,2)
- sredina eksponentne faze (OD ~ ½ OD max)
- konec eksponentne faze (OD max)
- stacionarna faza rasti (28 ur)

V teh kontrolnih točkah smo opravili meritve poskusa (merjenje pH, ugotavljanje koncentracije celičnih beljakovin po Lowryju, ugotavljanje produkcije kratkoverižnih maščobnih kislin (KMK) in plinov).

3.2.3 Spremljanje rasti z ugotavljanjem motnosti gojišča

Merjenje optične gostote (angl. *Optical density, OD*) s spektrofotometrom je posredna fizikalna metoda za ugotavljanje spremembe motnosti gojišča, ki jo običajno pripisujemo spremenjenemu številu mikrobnih celic v gojišču, torej rasti mikroorganizmov.

Pri procesu merjenja v svetlobni žarek določene valovne dolžine zaporedno vstavimo raztopino slepega vzorca in raztopino vzorca ter tako določimo delež prepuščene svetlobe (Marczenko, 1986). Intenziteto vpadle svetlobe pri slepem vzorcu označimo z I_0 , intenziteto svetlobe, ki prehaja raztopino pravega vzorca pa označimo z I . Desetiški logaritem teh dveh vrednosti je optična gostota (OD) in je podan v enačbi 1:

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

V našem poskusu smo optično gostoto merili s spektrofotometrom (Novaspec[®] II, Švedska) pri valovni dolžini 654 nm. Za kalibracijo spektrofotometra smo uporabili M2 gojišče iz iste serije kot gojišče.

3.2.4 Merjenje pH

Rast proučevanih bakterijskih sevov smo spremljali tudi z merjenjem pH vrednosti, ki se z rastjo pričakovano spreminja, saj fermentacijski produkti anaerobnih bakterij praviloma povzročijo zakisanje gojišča.

Meritev smo opravili s pH elektrodo (Orion[®] 520 A, ZDA) v supernatantu, ki smo ga pridobili s centrifugiranjem tekočih kultur (30 minut, 3000 rpm, 25°C).

3.2.5 Analiza kratkoveržnih maščobnih kislin (KMK) in plinska kromatografija

Za analizo KMK smo uporabili plinski kromatograf Hewlett Packard 5890 A (Hewlett Packard, ZDA). KMK smo ekstrahirali iz supernatantov kultur z dvojno etrsko ekstrakcijo (Holdeman in Cato, 1977). Po četrti meritvi optične gostote smo pri vseh sevih odvzeli 1ml vzorca in naredili etrsko ekstrakcijo po naslednji recepturi. V Hachove epruvete smo dodali 0,4 g NaCl, ki nase veže vodo in 1ml kulture ter epruveto zaprli. Na ta način smo preprečili izhlapevanje iz epruvete. Vzorcem in standardni mešanici KMK, ki smo jo uporabili za kalibracijo (Preglednica 5), smo dodali 100 µl internega standarda. Kot interni standard smo uporabili krotonsko kislino s koncentracijo 1g/100ml. Vzorce smo zakisali s 50 % H₂SO₄ (200 µl). Po dodatku 1 ml etra (dietiler; Merck[®], Nemčija) smo epruvete zaprli in jih 20x premešali z obračanjem. Temu je sledilo enominutno centrifugiranje pri 2000 rpm (Jantezki[®] TM23, Nemčija), pri sobni temperaturi. Med centrifugiranjem sta se ločili dve fazi, zgornja eterska in spodnja vodna faza. Po centrifugiranju smo prenesli zgornjo etrsko fazo s pasteurjevimi pipetami v novo Hachovo epruveto, v prvo pa smo

ponovno dodali 1 ml etra in ponovili ekstrakcijo. Zgornjo etrsko fazo smo združili s prvo in dodali CaCl_2 , ki nase veže vodo. Do analize s plinskim kromatografom smo etrski ekstrakt hranili v zamrzovalniku pri $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

Etrske ekstrakte smo analizirali na plinskem kromatografu Shimadzu[®] GC-14A, Japonska. Analiza je potekala pri temperaturnem programu od $75\text{ }^\circ\text{C}$ do $160\text{ }^\circ\text{C}$ (končno temperaturo smo ohranjali 3 minute) s hitrostjo naraščanja temperature $14\text{ }^\circ\text{C}$ na minuto. Temperatura injektorja je bila $185\text{ }^\circ\text{C}$ in temperatura detektorja $290\text{ }^\circ\text{C}$. Nosilni plin je bil argon, vodik in zrak pa detektorska plina.

3.2.6 Ugotavljanje koncentracije celičnih beljakovin po Lowryju

Za merjenje koncentracije beljakovin smo uporabili metodo po Lowryju (Lowry in sod., 1951), ki smo jo priredili za delo v mikrotitrskih ploščah. Vzorce, ki smo jih odvzeli po 4. meritvi smo centrifugirali (30 minut, 3000 rpm, $25\text{ }^\circ\text{C}$) in resuspendirali v 1ml 50 nM Na-fosfatnega pufra (pH 6,5). Suspenzijo smo prelili v minicentrifugirke ter ponovno centrifugirali (Hettich Mikro 200 R, Nemčija) pri $4\text{ }^\circ\text{C}$, za 10 minut in 12000 g. Pelete smo do naslednje analize (določanje količine beljakovin v vzorcih) hranili v zamrzovalniku pri $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Zamrznjenim celičnim peletom smo dodali 1 ml 50 mM Na-fosfatnega pufra, nato smo jih resuspendirali na vrtničnem mešalniku (Vibromix204EV, Tehtnica, Slovenija) in jih ponovno 10 minut centrifugirali pri 3000 obratih. Po centrifugiranju smo odlili supernatant in ponovno dodali pufer v prej omenjeni količini ter znova premešali na vrtničnem mešalniku. V mikrocentrifugirke smo prenesli $40\text{ }\mu\text{l}$ suspenzije in pripravili ustrezne redčitve ($20\times$ in $100\times$). Vsako redčitev smo analizirali v dveh paralelkah. Isočasno smo pripravili redčitvene vrste govejega serumskega albumina (BSA; angl. *bovine serum albumin*) (0,4, 0,32, 0,24, 0,16 in 0,08 mg BSA/ml). Sledilo je dodajanje $40\text{ }\mu\text{l}$ 1M NaOH (potekala je hidroliza vzorca) in denaturacija beljakovin s kuhanjem 5 minut pri $100\text{ }^\circ\text{C}$. Ko so se mikrocentrifugirke ohladile na sobno temperaturo smo dodali $80\text{ }\mu\text{l}$ biuretne reagenta (Lowry A : Lowry B, 50 : 1) ter inkubirali 15 minut na sobni temperaturi. Nato smo jih premešali in dodali Folin-Ciocalteu reagent ($16\text{ }\mu\text{l}$), ki smo ga predhodno pripravili tako, da smo ga zmešali z destilirano vodo v razmerju 1 : 1. Preostale celične pelete smo resuspendirali v 1ml 50 mM Na-fosfatnega pufra (pH 6,5) na vrtničnem mešalniku (Vibromix204EV, Tehtnica, Slovenija) in suspenzijo prelili v minicentrifugirke ter ponovno centrifugirali (Hettich Mikro 200 R, Nemčija) pri $4\text{ }^\circ\text{C}$, za 10 minut in 12000 g. Pelete smo do naslednje analize (določanje količine beljakovin v vzorcih) hranili v zamrzovalniku pri $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

Po vnosu Folin-Ciocalteu reagenta smo vsebino prenesli s pipeto na mikrotitrsko ploščo in inkubirali 30 minut. Sledilo je merjenje absorbance (Elx 808 Bio-Tek instruments, ZDA) pri 650 nm.

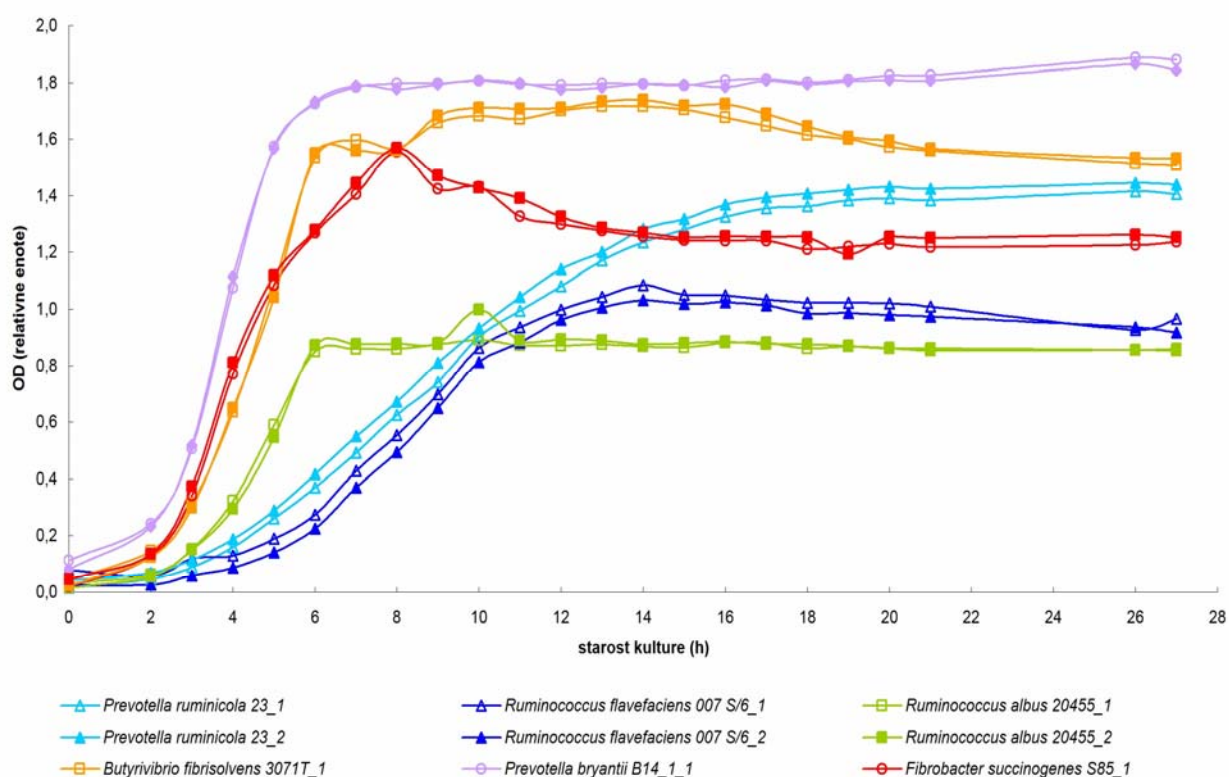
3.2.7 Statistična obdelava rezultatov s Studentovim t-testom

Za vrednotenje rezultatov plinske kromatografije smo uporabili Studentov t-test (SAS Institute Inc., 2001). Razlike smo imeli za statistično značilne, kadar je bila stopnja tveganja (vrednost p) manjša od 0,05 ($p < 0,05$). Student t-test ugotavlja dejansko statistično značilnost razlik med dvema srednjima vrednostima. Uporablja se le pri majhnem številu vzorcev ($n_1+n_2 < 30$, pri čemer je n_1 število paralelk prvega vzorca in n_2 število paralelk kontrolnega vzorca). Število paralelk prvega vzorca z dodanim cinamaldehydom ($n_{CIN} = 2$) je enako številu paralelk kontrolnega vzorca ($n_{CTR} = 2$). Ker gre za vzorčni porazdelitvi odštejemo vrednost 2 od n_1+n_2 ($n_1+n_2 - 2$). Iz tabele vrednosti za Studentovo t-porazdelitev z n stopinjami prostosti določimo s 95 % verjetnostjo t-vrednost, ki je $\pm 4,3$. Če je izračunana t-vrednost večja od tabelirane t-vrednosti, potem lahko predpostavimo, da je med vrednostmi statistično značilna razlika.

4 REZULTATI

4.1 PRIPRAVA RASTNIH KRIVULJ ZA PREUČEVANE BAKTERIJSKE SEVE

Ker smo nameravali meritve vpliva cinamaldehida na rast preučevanih bakterijskih sevov pri vsakem sevu opraviti v 4 različnih fazah rasti, smo najprej pripravili rastne krivulje za vse seve v tekočem M2 gojišču brez dodanega cinamaldehida. Vsak sev smo gojili v dveh paralelkah. Tako smo lahko ugotovili, kako dolga inkubacija je potrebna, da so sevi dosegli začetek, sredino in konec eksponentne faze rasti in zagotovo prešli v stacionarno fazo.



Slika 6: Rastne krivulje testiranih sevov v dveh paralelkah

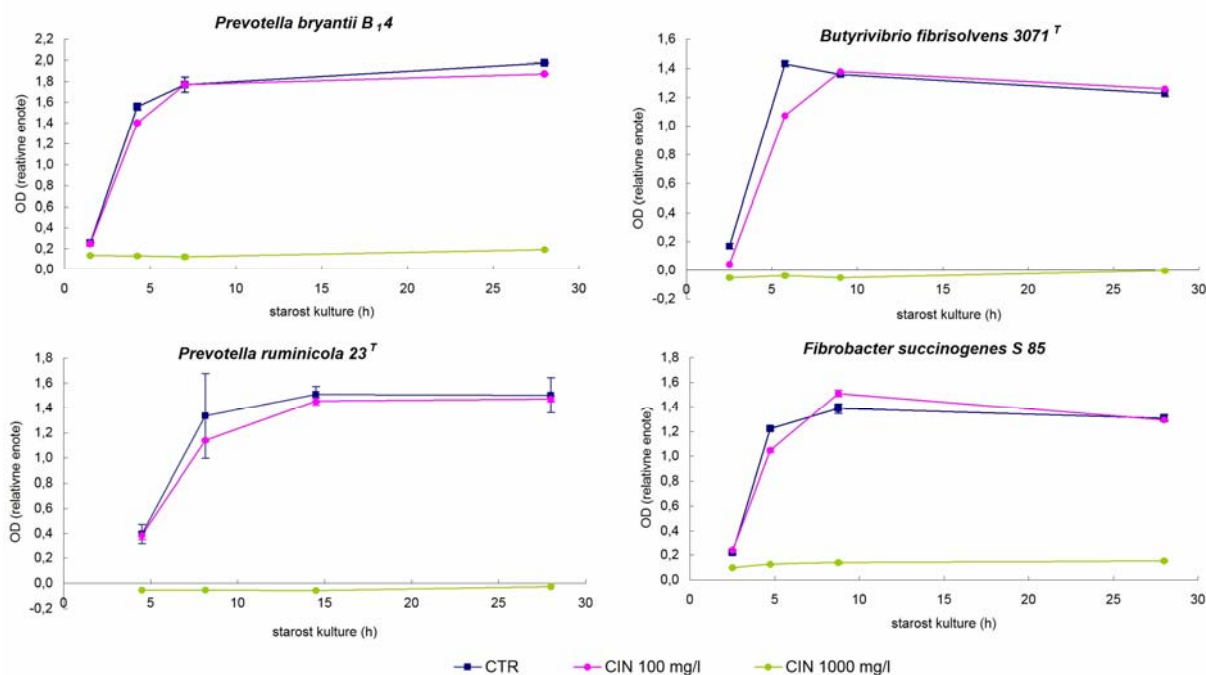
Iz slike 6 je razvidno, da sta bili pri vseh sevih rastni krivulji obeh paralelk zelo primerljivi z le minimalnimi odstopanji. Opazili pa smo razlike v hitrosti in obsegu rasti pri različnih sevih. V nadaljevanju dela smo poskuse izvajali v serijah s po dvema sevoma naenkrat, v vsako serijo smo uvrstili tiste seve z najbolj podobnimi hitrostmi oziroma obsegom rasti. Izbrali smo tudi čase vzorčenja in sicer smo za vsak sev (glede na hitrost rasti) izbrali 4 čase: na začetku, sredini in koncu eksponentne faze rasti in v pozni logaritemski fazi rasti (za vse seve po 28. urah inkubacije).

Trije preučevani sevi (*P. bryantii* B₁₄, *B. fibrisolvens* 3071^T, *F. succinogenes* S85) so rasli bistveno hitreje kot ostali, kar lahko ugotovimo iz naklona krivulje v eksponentni fazi rasti oziroma iz dejstva, da so eksponentno fazo zaključili po približno 6 urah inkubacije (*P. bryantii* B₁₄ in *B. fibrisolvens* 3071^T) oziroma po malce več kot 8 urah (*F. succinogenes* S85). V približno istem času se je eksponentna faza rasti končala tudi pri sevu *R. albus* 20455 (okoli 6 ur), a je le ta dosegel bistveno manjšo optično gostoto (OD) (približno pol manjšo od prej omenjenih sevov) in tudi lag faza je bila pri tem sevu malce daljša kot pri prej omenjeni trojici. Ostala seva (*R. flavefaciens* 007 S/6 in *P. ruminicola* 23^T) sta rasla počasneje in dosegla konec eksponentne faze rasti šele po 14. urah (*R. flavefaciens* 007 S/6) oziroma po 18 urah rasti (*P. ruminicola* 23^T), dosegla pa sta tudi manjšo optično gostoto kot prvi trije sevi.

4.2 RAST IZBRANIH BAKTERIJSKIH SEVOV V GOJIŠČIH Z IN BREZ CINAMALDEHIDA

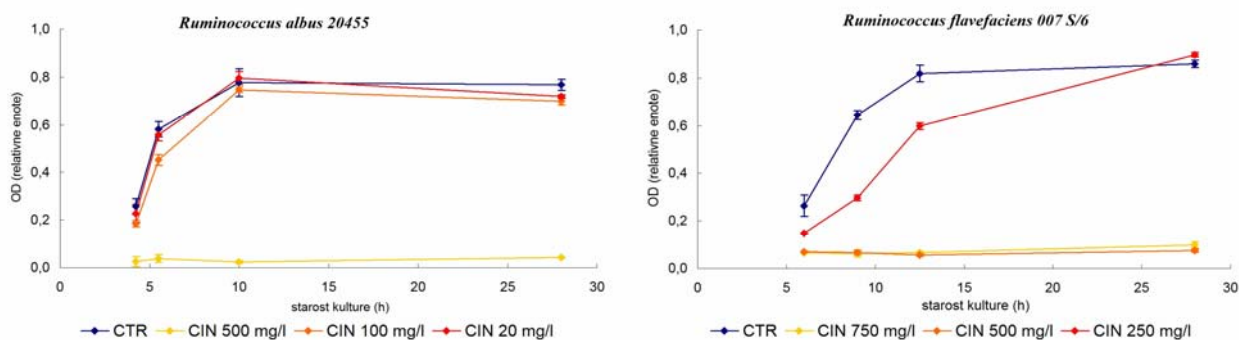
4.2.1 Spremljanje rasti preučevanih sevov z ugotavljanjem motnosti gojišča

Merjenje OD v gojiščih, ki so vsebovala dve različni koncentraciji cinamaldehida (100 in 1000 mg/l) smo opravili pri sevih *P. ruminicola* 23^T, *P. bryantii* B₁₄, *B. fibrisolvens* 3071^T in *F. succinogenes* S85. Za *R. albus* 20455 in *R. flavefaciens* 007 S/6 smo izbrali tri drugačne koncentracije cinamaldehida, ki smo jih določili na podlagi rezultatov preučevanja cinamaldehida na omenjene štiri seve. Za sev *R. flavefaciens* 007 S/6 smo uporabili naslednje koncentracije cinamaldehida: 750, 500, 250 mg/l, za sev *R. albus* 20455 pa smo uporabili še nekoliko manjše koncentracije cinamaldehida (500, 100 in 20 mg/l), sicer bi bila rast preveč inhibirana.



Slika 7: Merjenje OD vrednosti za seve *P. ruminicola* 23^T, *P. bryantii* B₁₄^T, *B. fibrisolvens* 3071^T in *F. succinogenes* S85

Pri pregledu izmerjenih OD vrednosti (slika 7), ki ponazarjajo uspešnost rasti smo ugotovili, da je cinamaldehyd v koncentraciji 1000 mg/l popolnoma inhibiral vse štiri v tem delu poskusa preučevane seve, to je *P. ruminicola* 23^T, *P. bryantii* B₁₄, *B. fibrisolvens* 3071^T in *F. succinogenes* S85. Cinamaldehyd v manjši koncentraciji (100 mg/l) pa ni inhibiral rasti omenjenih sevov, temveč je pri dveh sevih (*P. ruminicola* 23^T, *B. fibrisolvens* 3071^T) le rahlo upočasnjal eksponentno fazo rasti.



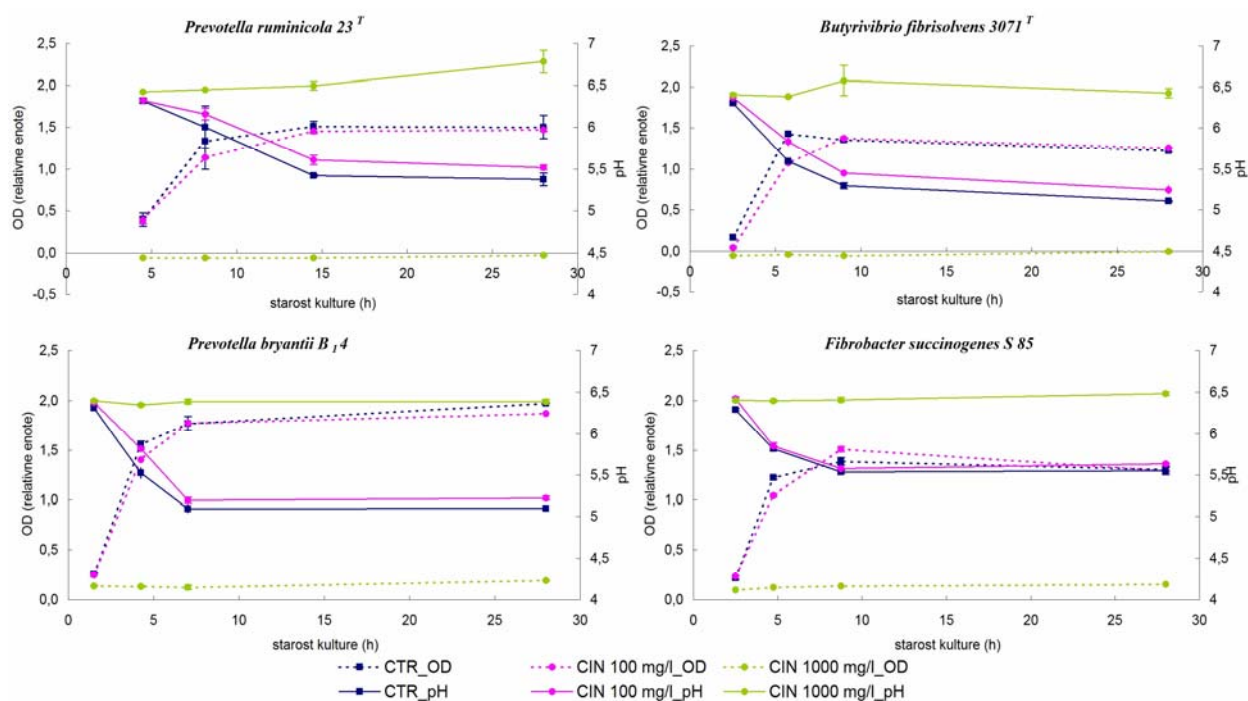
Slika 8: Merjenje OD vrednosti za seva *R. flavefaciens* 007 S/6 in *R. albus* 20455

Rezultati merjenja OD za sev *R. albus* 20455 v gojišču z dodanim cinamaldehydom (slika 8) so pokazali, da je le največja koncentracija dodanega izvlečka (500 mg/l), popolnoma

inhibirala celično rast. Pri koncentraciji 100 mg/l je cinamaldehyd le rahlo zmanjšal obseg rasti. Najmanjša koncentracija cinamaldehyda (20 mg/l) v primerjavi s kontrolo ni povzročila nobene spremembe. Pri sevu *R. flavefaciens* 007 S/6 je največja (750 mg/l) in vmesna (500 mg/l) koncentracija cinamaldehyda popolnoma inhibirala celično rast in obseg rasti, najmanjša koncentracija cinamaldehyda (250 mg/l) pa je v primerjavi s kontrolo, celično rast upočasnila na začetku, nato pa se je rast nadaljevala do zadnjega merjenja pri 28. urah, ko je dosegla podobno OD kot sev, ki je rasel v kontrolnem gojišču.

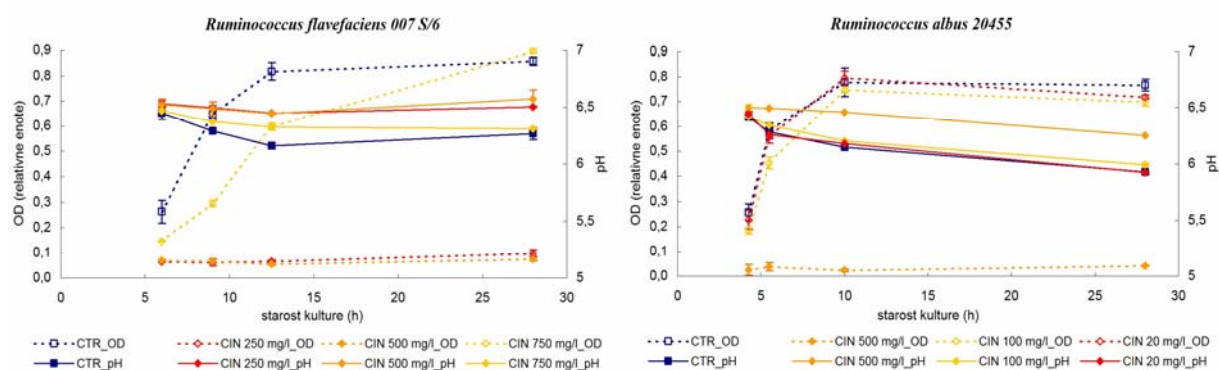
4.2.2 Merjenje pH

Pri vseh preučevanih sevih smo poleg OD izmerili tudi pH vrednost gojišč. Ugotovili smo, da so pri sevih (*P. ruminicola* 23^T, *P. bryantii* B₁₄, *B. fibrisolvens* 3071^T in *F. succinogenes* S85) izmerjene pH vrednosti v skladu z ugotovitvami po analizi OD vrednosti (slika 9). Tisoč mg CIN/l je pri vseh štirih sevih preprečilo rast, kar se odraža na nespremenjenih pH vrednosti v vseh štirih izmerjenih časovnih točkah. Manjša koncentracija cinamaldehyda pa na rast ne vpliva, kar se znova vidi tudi v pH vrednostih, ki so popolnoma primerljive s kontrolnimi vrednostmi, to je pH vrednostmi v gojiščih brez cinamaldehyda. Zanimivo pa je, da je v vseh štirih primerih pH vrednost pri manjši koncentraciji cinamaldehyda kljub vsemu malenkost večja kot v kontrolnih gojiščih.



Slika 9: pH in rast v odvisnosti od časa za seve *P. ruminicola* 23^T, *P. bryantii* B₁₄^T, *B. fibrisolvens* 3071^T in *F. succinogenes* S85

Na sliki 10 so prikazani rezultati pH in rasti za seva *R. albus* 20455 in *R. flavefaciens* 007 S/6. Kljub popolni inhibiciji rasti, sodeč po OD v vzorcu s cinamaldehydom v koncentraciji 500 mg/l, se je pH vrednost pri sevu *R. albus* 20455 nekoliko zmanjšala. Po rasti v prisotnosti obeh manjših koncentracijah cinamaldehyda se je pH vrednost zmanjšala v pričakovanem obsegu, primerljivo z rastjo v kontrolnem gojišču.

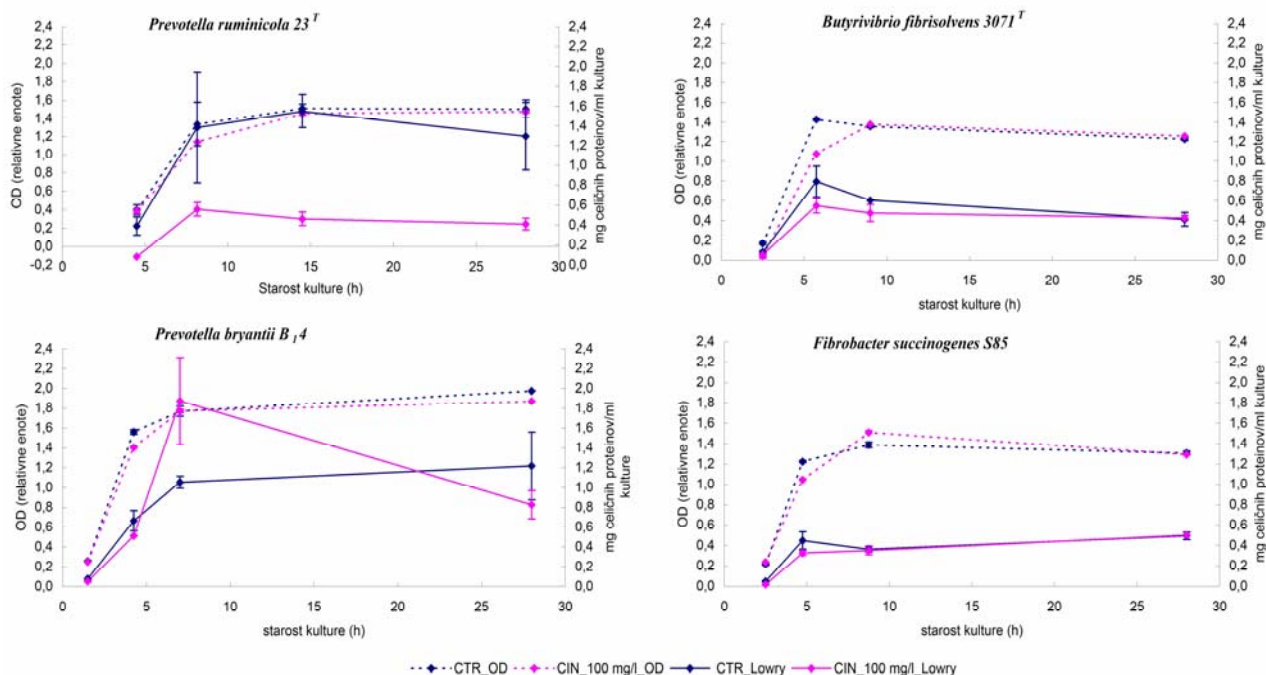


Slika 10: pH in rast v odvisnosti od časa za seva *R. flavefaciens* 007 S/6 in *R. albus* 20455

Največja (750 mg/l) in vmesna (500 mg/l) koncentracija cimetovega izvlečka sta sodeč po izmerjenih OD popolnoma inhibirali sev *R. flavefaciens* 007 S/6 (slika 10). pH vrednosti sta se kljub temu do določene ure zmanjšali, v stacionarni fazi rasti pa sta nepričakovano nekoliko narasli. Zanimivo je, da sta bili ob zadnjem merjenju (po 28 urah) zopet nekoliko večji, blizu ali celo večji kot ob prvem merjenju. Najmanjša koncentracija cinamaldehyda (250 mg/l) je le upočasnila celično rast, padec pH vrednosti pa je bil sorazmeren z rastjo mikrobov v gojišču.

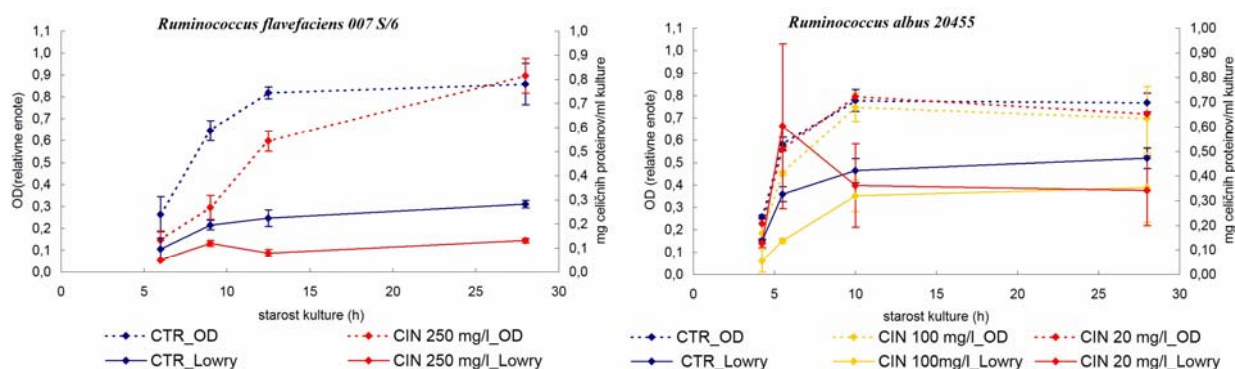
4.2.3 Ugotavljanje koncentracije celičnih beljakovin po Lowryju

Ugotavljanje koncentracije celičnih beljakovin smo opravili le pri tistih vzorcih, pri katerih rast ni bila inhibirana.



Slika 11: Koncentracija celičnih beljakovin in rast v odvisnosti od časa za seve *P. ruminicola* 23^T, *P. bryantii* B₁₄^T, *B. fibrisolvens* 3071^T in *F. succinogenes* S85

Rezultati meritev celokupnih koncentracij celičnih beljakovin in OD so prikazani na sliki 11. Pri sevu *P. ruminicola* 23^T smo opazili, da je bilo naraščanje koncentracije skupnih beljakovin glede na rast v kontrolnem gojišču v skladu z naraščanjem OD vrednosti. Po rasti v gojišču z manjšo koncentracijo cinamaldehida pa je koncentracija skupnih beljakovin tudi naraščala, a dosegla bistveno manjše vrednosti kot po rasti v kontrolnem gojišču, čeprav se OD ni bistveno razlikovala. Zanimiva je tudi dokaj velika razlika med paralelkama po rasti v kontrolnem gojišču, česar dotlej pri drugih meritvah (OD in pH) nismo opazili. To nakazuje, da so mikroorganizmi v obeh paralelkah rasli dokaj različno. Takšnega fenomena (t.j. kljub podobnim OD precej manjše koncentracije beljakovin) pri *B. fibrisolvens* 3071^T in *F. succinogenes* S85 nismo opazili. Pri teh bakterijah cinamaldehyd očitno ni vplival na rast in produkcijo beljakovin. Podobno kot pri sevu *P. bryantii* B₁₄^T je tudi pri sevu *F. succinogenes* S85 koncentracija skupnih celičnih beljakovin odsevala rast pri manjši koncentraciji cinamaldehida. Enako velja za sev *B. fibrisolvens* 3071^T, kjer se nekoliko počasnejša rast manjše koncentracije cinamaldehida odrazi v rezultatih obeh meritev.



Slika 12: Koncentracija celičnih beljakovin in rast v odvisnosti od časa za seva *R. flavefaciens* 007 S/6 in *R. albus* 20455

Na sliki 12 so prikazani rezultati meritev celokupnih koncentracij celičnih beljakovin za seva *R. flavefaciens* 007 S/6 in *R. albus* 20455. Iz meritev smo zaradi popolne inhibicije pri sevu *R. flavefaciens* 007 S/6 izključili največjo (750 mg/l) in vmesno (500 mg/l) koncentracijo cinamaldehida, pri sevu *R. albus* 20455 pa le največjo koncentracijo izvlečka (500 mg). Pri sevu *R. flavefaciens* 007 S/6 so rezultati meritev skupne koncentracije celičnih beljakovin kazali na delno inhibicijo rasti pri najmanjši koncentraciji cinamaldehida (250 mg/l). Koncentracija celokupnih celičnih beljakovin po 28 urah rasti ni dosegla enake vrednosti kot v kontrolnem gojišču, čeprav je bila v tej fazi OD celo malenkost večja. Pri sevu *R. albus* 20455 je prišlo do večjih odstopanj in sicer pri najmanjši koncentraciji cinamaldehida (20 mg/l), pri kateri je skupna koncentracija celičnih beljakovin sunkovito narasla po nekaj več kot petih urah rasti, po 10. urah rasti pa je ponovno padla.

4.3 EKSTRAKCIJA KRATKOVERIŽNIH MAŠČOBNIH KISLIN IN PLINSKA KROMATOGRAFIJA ZA DOLOČANJE VODIKA

4.3.1 Ugotavljanje koncentracije kratkoverižnih maščobnih kislin

Preglednica 6: Koncentracije KMK, deleži posameznih KMK in OD vrednosti

Sev	Vzorec	Ocetna kislina [mg/ml]	Propionska kislina [mg/ml]	Maslena kislina [mg/ml]	Celokupna kol. KMK [mg/ml]	Deleži KMK			OD _{654 nm} (hr=28)
						Ocetna kislina	Propionska kislina	Maslena kislina	
<i>P. ruminicola</i> 23 ^T	CTR	1,555	0,190	0,010	1,755	0,88	0,11	0,01	1,503
	CIN100	1,181*	0,117*	/	1,298	0,91	0,09	/	1,473
<i>P. bryantii</i> B,4	CTR	2,855	/	/	2,855	1,00	/	/	1,975
	CIN100	0,882*	/	/	0,882	1,00	/	/	1,869
<i>B. fibrisolvens</i> 3071 ^T	CTR	/	/	1,135	1,135	/	/	1,00	1,229
	CIN100	/	/	1,128	1,128	/	/	1,00	1,259
<i>F. succinogenes</i> S85	CTR	/	/	1,458	1,458	/	/	1,00	1,308
	CIN100	/	/	1,286	1,286	/	/	1,00	1,292
<i>R. flavefaciens</i> 007 S/6	CTR	/	/	/	/	/	/	/	0,859
	CIN250	0,228*	/	/	0,228	1,00	/	/	0,897
<i>R. albus</i> 20455	CTR	0,096	/	/	0,096	1,00	/	/	0,769
	CIN100	1,025*	/	/	1,025	1,00	/	/	0,699
	CIN20	0,670	/	/	0,670	1,00	/	/	0,720

Opomba: Vrednosti označene z zvezdico se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$)

Meritve kratkoverižnih maščobnih kislin (KMK) smo opravili le pri tistih vzorcih, pri katerih cinamaldehyd ni inhibiral rasti in so predstavljeni v preglednici 6. Polja označena s poševnico označujejo negativne rezultate, ki smo jih izračunali kot razliko med ugotovljenimi koncentracijami KMK v kontrolnih vzorcih in vzorcih gojišč po rasti bakterij. Iz preglednice 6 je razvidno, da je le 5 rezultatov meritev glede na kontrolni vzorec statistično značilnih, kar kaže na to, da smo v poskus vključili premajhno število vzorcev in paralelk.

Analiza koncentracije KMK je pri sevu *P.ruminicola* 23^T pokazala, da je cinamaldehyd v koncentraciji 100 mg/l povzročil delno inhibicijo (slika 7) rasti, temu primerno pa je bila tudi manjša skupna koncentracija KMK (za približno 26 %). Pri omenjenemu sevu smo še ugotovili, da sta bila večinska produkta po rasti v kontrolnem gojišču očetna in propionska kislina v razmerju 8:1, medtem, ko se je njuno razmerje po rasti v gojišču z dodatkom manjše koncentracije cinamaldehyda (100 mg/l) rahlo, a statistično neznačilno povečalo. Cinamaldehyd v koncentraciji 100 mg/l ni imel na sev *P. bryantii* B₁₄ v primerjavi s kontrolnim vzorcem bistvenega vpliva, kar smo dokazali z meritvami optične gostote, pH in koncentracijo celičnih beljakovin. Iz preglednice 6 pa je razvidno, da je bila skupna koncentracija KMK v vzorcu precej manjša od skupne koncentracije KMK kontrolnega vzorca. Pri sevu *R. flavofaciens* 007 S/6 smo po rasti v gojišču z manjšo koncentracijo cinamaldehyda (250 mg/l) odkrili povečano koncentracijo očetne kisline (23 %) v primerjavi z gojiščem brez dodatka cinamaldehyda. Tudi pri sevu *R. albus* 20455 smo po rasti v gojišču brez cinamaldehyda odkrili prisotnost očetne kisline, nepričakovano pa smo le to odkrili v gojišču z vmesno koncentracijo cinamaldehyda (100 mg/l) in to v bistveno večji koncentraciji (11 krat večji), kot po rasti v kontrolnem vzorcu.

4.3.2 Ugotavljanje koncentracije vodika po rasti *R. albus* 20455 in *B. fibrisolvens* 3071^T v prisotnosti cinamaldehida

Tvorbo vodika (preglednica 7) smo po 28. uri rasti ugotavljali le za seva *R. albus* 20455 in *B. fibrisolvens* 3071^T pri manjših koncentracijah cinamaldehida (20 in 100 mg/l za sev *R. albus* 20455 in 100 mg/l za sev *B. fibrisolvens* 3071^T).

Preglednica 7: Koncentracija vodika in statistična analiza vzorcev pri sevih *R. albus* 20455 in *B. fibrisolvens* 3071^T

sev	vzorec	vodik (vol.%)	Student t-test	OD (28 h)
<i>R. albus</i> 20455	CTR	5,16	/	0,769
	CIN 100	7,30	-1,19*	0,699
	CIN 20	6,89	-2,22*	0,720
<i>B. fibrisolvens</i> 3071 ^T	CTR	8,04	/	1,229
	CIN 100	6,59	3,75*	1,259

Opomba: Vrednosti označene z zvezdico niso statistično značilno različne ($p > 0,05$), pozitivna vrednost prikazuje zmanjšano produkcijo vodika, negativna vrednost pa povečano produkcijo vodika

Pri sevu *B. fibrisolvens* 3071^T smo zasledili zmanjšano produkcijo vodika, pri sevu *R. albus* 20455 pa povečano produkcijo vodika, vendar kot je razvidno iz preglednice 7 rezultati niso statistično značilno različni.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Rastlinske izvlečke izkoriščamo že tisočletja v etno-medicinske in veterinarske namene. V ustreznih koncentracijah imajo lahko pozitiven vpliv na mikrobno populacijo vampa in posledično na celoten proces prebave krme. Protibakterijski učinek nekaterih rastlinskih izvlečkov pripisujemo njihovim sekundarnim metabolitom. V našem poskusu smo uporabili izvleček cimeta, katerega glavna komponenta je cinamaldehyd. Njegov učinek smo testirali pri različnih koncentracijah na šestih bakterijskih sevih, *P. bryantii* B₁₄, *B. fibrisolvens* 3071^T, *F. succinogenes* S85, *R. flavefaciens* 007 S/6, *P.ruminicola* 23^T, *R. albus* 20455. V poskus smo vključili dva seva iz rodu *Prevotella* (*P.ruminicola* 23^T in *P. bryantii* B₁₄) zaradi njune zgradbe celične stene (gram negativna), pomembne presnovne vloge (pomembni proteoliti in ksilanoliti, ne razgrajujejo pa celuloze), številčne zastopanosti v vampu (sev *P. ruminicola* 23^T) in možnosti razvoja ultrarezistence na monenzin (sev *P. bryantii* B₁₄^T). Seva iz rodu *Ruminococcus* (*R. flavefaciens* 007 S/6 in *R. albus* 20455) smo v poskus vključili, ker imata gram pozitivno strukturo celične stene, sta pomembna razgrajevalca polisaharidov v vampu, še posebno *R. flavefaciens* 007 S/6, sev *R. albus* 20455 pa smo izbrali tudi zato, ker je znan tvorec vodika, ki je prekursor sinteze metana v vampu. Sev *F. succinogenes* S85 je ena izmed najbolj pomembnih celolitičnih bakterij v vampu z gram negativno celično steno, sev *B. fibrisolvens* 3071^T pa smo vključili v poskus zaradi tvorbe vodika, ker je pomemben ksilanolit ter zaradi tega, ker je fiziološko gram pozitivna vrsta, morfološko pa se barva kot gram negativna vrsta.

Z meritvami optične gostote vzorcev smo ugotovili, da je cinamaldehyd v koncentraciji 1000 mg/l popolnoma inhibiral rast sevov *P. bryantii* B₁₄, *B. fibrisolvens* 3071^T, *F. succinogenes* S85 in *P.ruminicola* 23^T, v manjši koncentraciji (100 mg/l) pa ne. Rezultati kažejo, da je cinamaldehyd vsekakor učinkovito sredstvo za inhibicijo rasti vampnih mikroorganizmov, da pa bi odkrili optimalno koncentracijo cinamaldehyda, ki bi selektivno inhibirala vampne mikroorganizme, bi morali pri proučevanih sevih preveriti učinke inhibicije s testiranjem celične rasti pri več različnih koncentracijskih območjih cinamaldehyda. To smo poskušali izvesti v nadaljevanju poskusa z obema ruminokokoma. Pri sevu *R. flavefaciens* 007 S/6 sta največja (750 mg/l) in vmesna (500 mg/l) koncentracija cinamaldehyda popolnoma inhibirali rast in s tem preprečili porast OD, medtem ko je pri *R. albus* 20455 le največja (500 mg/l) izbrana koncentracija cinamaldehyda popolnoma inhibirala celično rast. Vmesna koncentracija izvlečka (100 mg/l) je pri *R. albus* 20455 nekoliko zmanjšala obseg rasti, najmanjša koncentracija cinamaldehyda (20 mg/l) pa ni imela na omenjeni sev v primerjavi s kontrolo rasti

nobenega učinka. Pri sevu *R. flavefaciens* 007 S/6 je manjša koncentracija cinamaldehida (250 mg/l) rast upočasnila le na začetku, nato pa je rast nemoteno naraščala do zadnje meritve (28 ur), kjer je kultura dosegla podobno optično gostoto kot kontrolno gojišče. Rezultati kažejo na to, da bi za ugotovitev optimalne koncentracije cinamaldehida morali testirati celično rast za oba seva pri različnih koncentracijskih območjih ter v daljšem časovnem obdobju (vsaj 48 ur).

Ob spremljanju rasti bakterijskih sevov na osnovi merjenja pH vrednosti smo ugotovili, da se pri sevih *P. bryantii* B₁₄, *B. fibrisolvans* 3071^T in *F. succinogenes* S85 v gojišču s cinamaldehydom (1000 mg/l), kjer je bila rast popolnoma inhibirana, po pričakovanju tudi pH ni spreminjal. Pri sevu *P.ruminicola* 23^T pa je prišlo pri enaki koncentraciji v stacionarni fazi rasti do dviga pH, kar je nenavadno, saj je največja koncentracija cinamaldehyda popolnoma inhibirala rast omenjenega seva. Pri manjši koncentraciji cinamaldehyda (100 mg/l) je sprememba pH vrednosti pri omenjenih sevih popolnoma primerljiva s spremembo pH vrednosti v gojišču brez cinamaldehyda. Pri sevu *R. albus* 20455 se je kljub popolni inhibiciji rasti v gojišču z največjo koncentracijo cinamaldehyda (500 mg/l) pH vrednost nekoliko zmanjšala. Po rasti v prisotnosti obeh manjših koncentracij cinamaldehyda (100 in 20 mg/l), se je pH vrednost zmanjšala v pričakovanem obsegu. Pri sevu *R. flavefaciens* 007 S/6 smo opazili, da sta večja (750 mg/l) in vmesna (500 mg/l) koncentracija cinamaldehyda sev popolnoma inhibirali sodeč po OD, kljub temu pa je pH vrednost nepričakovano padla v drugi in tretji fazi meritev, kasneje pa ponovno narasla. Pri najmanjši koncentraciji cinamaldehyda (250 mg/l) je bil padec pH skladen z mikrobnostjo v gojišču.

Da bi potrdili ali ovrgli oceno vpliva cinamaldehyda na rast preučevanih bakterijskih sevov, smo opravili še meritve skupne koncentracije celičnih beljakovin z metodo ugotavljanja celičnih beljakovin po Lowryju. Meritve smo opravili le pri tistih sevih, pri katerih rast ni bila inhibirana sodeč po OD, zato smo iz poskusa izločili vzorce z največjo koncentracijo cinamaldehyda (1000 mg/l). Iz meritev smo tako ugotovili, da je po rasti v gojišču z manjšo koncentracijo cinamaldehyda (100 mg/l) pri sevu *P.ruminicola* 23^T koncentracija skupnih beljakovin naraščala do določene točke, vendar bistveno manj kot po rasti v kontrolnem gojišču. Za omenjeni pojav bi lahko sklepali, da je prišlo do lize celic, posledično pa do izhajanja peptidov v raztopino. Ker pa OD teh vzorcev ni padla, razloga za precej manjše koncentracije beljakovin v tem primeru ne poznamo. Pri sevih *B. fibrisolvans* 3071^T in *F. succinogenes* S85 je bila rast v prisotnosti manjše koncentracije cinamaldehyda podobna ali enaka kot v kontrolnem gojišču, sodeč tako po OD kot koncentraciji celičnih beljakovin. Pri *P. bryantii* B₁₄ je rast pri manjši koncentraciji cinamaldehyda očitno potekala, vendar so bile pri obeh paralelkah prisotne bistveno večje razlike kot sicer, zato dogajanje težko komentiramo.

Tudi pri sevu *R. flavefaciens* 007 S/6 smo zaradi popolne inhibicije rasti izločili iz meritev največjo (750 mg/l) in vmesno (500 mg/l), koncentracijo cinamaldehida pri sevu *R. albus* 20455 pa smo iz meritev izključili največjo koncentracijo izvlečka (500 mg/l). Najmanjša koncentracija cinamaldehida (250 mg/l) je le delno inhibirala rast seva *R. flavefaciens* 007 S/6, kar se kaže tudi v celokupni koncentraciji beljakovin. Podobno kot pri sevu *R. flavefaciens* 007 S/6 se je zgodilo tudi pri sevu *R. albus* 20455 pri vmesni koncentraciji cinamaldehida (100 mg/l). Do večjih odstopanj je prišlo pri najmanjši koncentraciji cinamaldehida (20 mg/l), kjer je koncentracija celokupnih beljakovin sunkovito narasla po petih urah rasti in padla po 10. urah rasti. Tako kot pri poskusu pri sevu *P. ruminicola* 23^T lahko sklepamo, da je morda prišlo tudi pri sevu *R. albus* 20455 do eksperimentalne napake.

Pri merjenju koncentracije kratkoverižnih maščobnih kislin smo pri sevih *P. bryantii* B₁₄, *B. fibrisolvens* 3071^T, *F. succinogenes* S85 in *P. ruminicola* 23^T po rasti v gojišču z manjšo koncentracijo cinamaldehida (100 mg/l) v primerjavi s kontrolnim vzorcem ugotovili, da je prišlo do upadanja produkcije KMK. Tudi Cardozo in sod. so leta 2005 dokazali, da cinamaldehyd povzroči upadanje produkcije KMK, kar so ugotovili tudi Busquet in sod. (2006). Pri sevu *P. ruminicola* 23^T ni prišlo do odstopanj med OD in koncentracijo KMK (preglednica 6). Po pričakovanju sta pri omenjenemu sevu bila po rasti v kontrolnem gojišču večinska produkta očetna in propionska kislina, njuno razmerje pa se je še nekoliko povečalo (9:1) po rasti v gojišču z dodatkom 100 mg cinamaldehida/l. Podoben rezultat so dobili tudi španski znanstveniki (Cardozo in sod., 2005), ki navajajo, da se je razmerje med očetno in propionsko kislino povečalo ob dodatku nizkih koncentracij cinamaldehida (3 in 30 mg/l). Manjša koncentracija cinamaldehida (100 mg/l) ni imela v primerjavi s kontrolnim gojiščem na sev *P. bryantii* B₁₄ bistvenega vpliva na rast, vendar je kljub temu iz rezultatov poskusa (preglednica 7) razviden upad skupne koncentracije KMK pri vzorcu z dodanim izvlečkom. Pri sevu *R. flavefaciens* 007 S/6 smo po pričakovanju odkrili po rasti v gojišču z manjšo koncentracijo cinamaldehida (250 mg/l) v primerjavi s kontrolnim gojiščem večjo koncentracijo očetne kisline, saj je za to vrsto značilno, da je očetna kislina eden najpomembnejših stranskih produktov fermentacije. Podobne rezultate smo dobili tudi pri sevu *R. albus* 20455 po rasti v gojišču z manjšo (20 mg/l) in vmesno (100 mg/l) koncentracijo cinamaldehida, vendar je bila produkcija očetne kisline bistveno večja kot v kontrolnem gojišču.

Polja s poševnicami prikazujejo negativne rezultate, ki smo jih izračunali kot razliko med ugotovljenimi koncentracijami KMK v kontrolnih vzorcih in vzorcih gojišč po rasti bakterij. Do negativnih rezultatov je najverjetneje prišlo zaradi dela v neprimernih razmerah glede na veliko hlapnost kratkoverižnih maščobnih kislin. Najkrajšo verigo ima očetna kislina in pri slednji je prišlo tudi do največjih eksperimentalnih napak.

Produkcijo vodika smo določali le pri tvorcih vodika (*R. albus* 20455 in *B. fibrisolvens* 3071^T), katerih rast ni bila popolnoma inhibirana zaradi dodatka cinamaldehida. Neinhibitorne koncentracije cinamaldehida so bile: 20 in 100 mg/l za sev *R. albus* 20455 in 250 mg/l za sev *B. fibrisolvens* 3071^T. Pri prvemu smo zasledili povečano, pri drugemu pa zmanjšano produkcijo vodika, vendar pri obeh tvorba vodika v primerjavi s kontrolnim vzorcem ni bila statistično značilna.

Ker smo v poskusu uporabili koncentracije cinamaldehida, ki ga je pred nami že uporabljala španska raziskovalka (Busquet Solé, 2005) pri proučevanju vpliva cinamaldehida na rast in formulacijo vampne mikrobne združbe v kontinuiranem reaktorskem sistemu, lahko ugotovimo, da cinamaldehyd v večji koncentraciji očitno popolnoma inhibitoren za proučevane seve. Poleg tega smo s preučevanjem učinka cinamaldehyda na rast ruminokokov potrdili domnevo, da so gram pozitivne bakterije (vsaj ruminokoki) bolj občutljive na prisotnost omenjenega izvlečka, ter da je cinamaldehyd v večjih koncentracijah zelo učinkovit tudi proti gram negativnim bakterijam. Manjše koncentracije cinamaldehyda so povzročile pri proučevanih sevih le delno inhibicijo obsega ali hitrosti rasti. Vmesne koncentracije (500 in 100 mg/l) izvlečka smo testirali le pri dveh sevih, *R. flavefaciens* 007 S/6 in *R. albus* 20455 in ugotovili, da bi za ugotovitev optimalne koncentracije cinamaldehyda bilo potrebno proučiti celično rast za oba seva pri različnih koncentracijskih območjih ter v daljšem časovnem obdobju (vsaj 48 ur).

5.2 SKLEPI

V poskusu smo dokazali, (i) da je cinamaldehyd v večji koncentraciji (1000 mg/l) popolnoma inhibiral rast sevov *P. ruminicola* 23^T, *P. bryantii* B₁₄, *B. fibrisolvens* 3071^T in *F. succinogenes* S85. (ii) Sodeč po rezultatih skupnih celičnih beljakovin je manjša koncentracija cinamaldehyda (100 mg/l) le delno inhibirala rast seva *P. ruminicola* 23^T, ne pa rasti sevov *P. bryantii* B₁₄, *B. fibrisolvens* 3071^T in *F. succinogenes* S85. (iii) Pri sevih *R. albus* 20455 in *R. flavefaciens* 007 S/6 je imel cinamaldehyd popolnoma inhibitoren učinek že pri koncentraciji 500 mg/l, (iv) manjši koncentraciji (20 in 250 mg/l) pa sta povzročili le zmanjšan obseg in hitrost celične rasti. (v) Pri meritvah skupne koncentracije KMK smo s cinamaldehydom v manjši koncentraciji (100 mg/l) dokazali ustrezno zmanjšanje skupne koncentracije KMK le pri sevu *P. ruminicola* 23^T.

6 POVZETEK

Prežvekovalci se od neprežvekovalcev in drugih rastlinojedih živali razlikujejo v tem, da lahko prebavljajo in izkoriščajo celulozo in druge strukturne polisaharide iz rastlinskih celičnih sten za energetske in proizvodne potrebe. To izjemno sposobnost omogočajo njihovi predželodci s kompleksno vampno združbo mikroorganizmov, ki je sestavljena iz bakterij, praživali, gliv, metanogenih arhej in bakteriofagov. Rezultat njihovega delovanja so hlapne maščobne kisline, ki se resorbirajo skozi steno vampa v krvožilni sistem in metan ter CO₂, ki izhajata iz vampa z izrigavanjem. Produkcija metana predstavlja za žival energetska in snovna izguba, njegovo izhajanje v okolje pa je eden od pomembnih dejavnikov globalnega onesnaževanja. Znanstveniki (Busquet in sod., 2006) so tako raziskovali različne prehranske dodatke, s katerimi bi lahko izboljšali prirajo živali ter zmanjšali emisijo toplogrednih plinov. Najbolj učinkoviti so bili prehranski antibiotiki. Uporaba prehranskih antibiotikov je bila v intenzivnih živalskih produkcijskih sistemih zelo razširjena, vendar so jih v Evropski skupnosti s 1. januarjem 2006 prepovedali zaradi strahu pred njihovim kopičenjem v živalskih produktih ter morebitnega horizontalnega prenosa genov za rezistenco na človeku patogene seve. Na področju manipulacije vampne mikroflore smo zato začeli intenzivno iskati alternativne prehranske dodatke, ki bi nadomestili prepovedane prehranske antibiotike. Kot alternativni modifikatorji mikrobnosti v vampu so zanimanje vzbudili nekateri rastlinski izvlečki, ki so že stoletja znani po svojem protimikrobnem učinku. Eden izmed teh je tudi cinamaldehyd, ki nastaja v skorji cimetovega drevesa (*Cinnamomum spp.*) in je znan po svojem protibakterijskem, protivirusnem in protifugicidnem delovanju. V naši raziskavi smo želeli ugotoviti, kako vpliva cinamaldehyd na izbrane bakterijske seve iz vampa (*P. bryantii* B₁₄, *B. fibrisolvens* 3071^T, *F. succinogenes* S85, *R. flavefaciens* 007 S/6, *P.ruminicola* 23^T, *R. albus* 20455). V poskusu smo te seve gojili v modificiranem anaerobnem gojišču M2 za vampne bakterije z ali brez dodatka cinamaldehyda v ustrezni koncentraciji. Pri sevih *P. bryantii* B₁₄, *B. fibrisolvens* 3071^T, *F. succinogenes* S85, *P.ruminicola* 23^T, smo ugotavljali vpliv večje in manjše koncentracije cinamaldehyda (1000 in 100 mg/l), pri sevih *R. flavefaciens* 007 S/6 in *R. flavefaciens* 007 S/6 pa smo poleg vpliva večjih in manjših koncentracij izvlečka ugotavljali še vmesne koncentracije. Pri *R. flavefaciens* 007 S/6 smo tako uporabili 750, 500 in 250 mg cinamaldehyda/l, pri *R. flavefaciens* 007 S/6 pa 500, 100 in 20 mg cinamaldehyda/l. Pri omenjenih sevih smo po rasti v gojišču z ali brez cinamaldehyda spremljali OD, pH vrednost gojišč, koncentracijo celičnih beljakovin, ekstrakcijo in detekcijo nastalih KMK in detekcijo nastalih plinov.

Ugotovili smo, da cinamaldehyd v koncentraciji 1000 mg/l popolnoma inhibira rast striktno anaerobnih vampnih bakterijskih sevov *P. bryantii* B₁₄, *B. fibrisolvens* 3071^T, *P.ruminicola* 23^T in *F. succinogenes* S85. Cinamaldehyd v 10× manjši koncentraciji (100

mg/l) ne inhibira rasti omenjenih sevov sodeč po rezultatih merjenja OD, sodeč po nastanku mikrobne biomase oziroma skupnih celičnih beljakovin pa delno inhibira rast le v primeru seva *P.ruminicola* 23^T. Tudi pri gram pozitivnih bakterijah *R. albus* 20455 in *R. flavefaciens* 007 S/6 obe večji koncentraciji cinamaldehida (500 mg/l pri *R. albus* 20455, 750 in 500 mg/l pri *R. flavefaciens* 007 S/6) popolnoma inhibirata rast. (iv) Manjši koncentraciji (20 in 250 mg/l) pri omenjenih sevih le delno inhibirata rast ruminokokov. Pri ugotavljanju koncentracije kratkoverižnih maščobnih kislin smo le pri sevu *P.ruminicola* 23^T s cinamaldehydom v koncentraciji 100 mg/l dokazali ustrezno zmanjšanje skupne koncentracije KMK. Na podlagi dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da cinamaldehyd različno vpliva na različne vampne bakterije in ugotavljamo, da bi za popolno razumevanje delovanja cinamaldehyda in uporabe optimalne koncentracije v praksi morali opraviti dodatne poskuse z različnimi koncentracijami cinamaldehyda v čistih kulturah in vamp stimulirajočih kontinuiranih sistemih.

7 VIRI

- Akin D.E. 1986. Interaction of ruminal bacteria and fungi with Southan forages. *Journal of Animal Science*, 63: 962
- Akin D.E., Borneman W.S. 1990. Role of rumen fungi in fiber degradation. *Journal of Dairy Science*, 73: 3023
- Beauchemin K.A., McGinn S.M. 2006. Methane emissions from beef cattle: Effects of fumaric acid, essential oil, and canola oil. *Journal of Animal Science*, 84: 1489-1496
- Benno Y., Endo K., Shiragami N., Mitsuoka T. 1988. Susceptibility of fecal anaerobic bacteria from pigs and chickens to five polyether antibiotics for growth promotion. *Japanese Journal of Veterinary Science*, 50: 783-790
- Broderick G.A., Wallace R.J., Orskov E.R. 1991. Control of rate and extent of protein degradation. V: Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants. Tsuda T., Sasaki Y., Kawashima R. (eds.). Cambridge, Portland Press: 541-592
- Burnham P.M. 2006. Cinnamaldehyde. The smell and flavour of cinnamon. University of Bristol. <http://www.chm.bris.ac.uk/motm/cinnamaldehyde/cinnoc.htm> (13. jul. 2007)
- Busquet M., Calsamiglia S., Ferret A., Kamel C. 2006. Plant extracts affect in vitro rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*, 89: 761-771
- Busquet Solé M. 2005. Extractos de plantas como modificadores de la fermentación microbiana ruminal. Tesis Doctoral. Bellaterra, Universitat Autònoma de Barcelona, Departament de Ciència Animal i dels Aliments: 179 str.
- Bryant M.P. 1972. Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. *American Journal of Clinical Nutrition*, 25: 1324-1328
- Cardozo P.W., Calsamiglia S., Ferret A., Kamel C. 2005. Screening for the effects of natural plant extracts at different pH on in vitro rumen microbial fermentation of a high-concentrate diet for beef cattle. *Journal of Animal Science*, 83: 2572-2579
- Callaway T.R., Edrington T.S., Rychlik J.L., Genovese K.J., Poole T.L., Jung Y., 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
- Cestnik V., Pogačnik A., Fazarinc G. 1999. Repetitorij fiziologije z anatomijo domačih živali. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta: 61-97
- Cinnamaldehyde. 2000. Chemicalland21. Specialty chemicals. <http://www.chemicalland21.com/specialtychem/perchem/CINNAMALDEHYDE.htm> (14. nov. 2006)

- Chang S.T., Chen P.F., Chang S.C. 2001. Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. *Journal of Ethnopharmacology*, 77: 123-127
- Cheng K.J., Costerton J.W. 1976. Ultrastructure of *Butyrivibrio fibrisolvens*: a Gram-Positive Bacterium? *Journal of Bacteriology*, 129: 1506-1512
- Cotta M.A. 1992. Interaction of ruminal bacteria in the production and utilization of maltooligosaccharides from starch. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 48-54
- Cox S.D., Mann C.M., Markhama J.L., Bell H.C., Gustafson J.E., Warmington J.R., Wyllie S.G. 2000. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*, 88, 1: 170-175
- Darling L.M. 2002. Spices, exotic flowers and medicines. University of California. <http://unitproj.library.ucla.edu/biomed/spice/index.cfm> (19. jul. 2007)
- Dano A.R., Bogh H.O. 1999. Use of herbal medicine against helminthes in livestock—renaissance of an old tradition. *World Animal Review*: 60-67
- Eckles C.H., Williams V.M., Wilbur J.W, Palmer L.S., Harshaw H.M.. 1924. Yeast as supplementary feed for calves. *Journal of Dairy Science*, 7: 421-439
- Fenchel T., Finlay B.J. 1995. Ecology and evolution in anoxic worlds. University of Edinburgh. <http://www.vet.ed.ac.uk/clive/cal/RUMENCAL/frames/frmRumen.html> (13. jan. 2007)
- Findlay A. 1998. Work in progress on veterinary physiology. University of Cambridge. <http://www.chu.cam.ac.uk/~ALRF/micrbiol.htm> (12.jan.2007)
- Graham T. 2005. Conservation of traditional buildings. Tony Graham & Co. http://www.tonygraham.co.uk/house_repair/wattle_daub/rumen.jpg (1.avg.2007)
- Haney M.E., Hoehn M. M. 1968. Monensin, a new biologically active compound. I. Discovery and Isolation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 7: 349-352
- Helander I.M., Alakomi H.L., Latva-Kala K., Mattila-Sandholm T., Pol I., Smid E. J., Gorris L. G. M., von Wright A. 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46: 3590-3595
- Henderson C. 1973. The effects of fatty acids on pure cultures of rumen bacteria. *Journal of Agricultural Science*, 81:107-112
- Hobson P.N. 1969. Rumen bacteria. V: Methods in microbiology. Vol. 3B. Norris J.R., Ribbons D.W. (eds.). New York, Academic Press: 133-149

- Hobson P.N. 1997. Introduction. V: The rumen microbial ecosystem. Hobson P.N., Stewart C.S. (eds.). 2nd edition. London, Blackie Academic & Professional, an imprint of Chapman & Hall: 1-9
- Holdeman L.V., Cato E.P. 1977. Ether extraction of volatile fatty acids. V: Anaerobe laboratory manual. Moore W.E.C (ed.). Virginia, Southern Printing Company: 132 str.
- Hungate R.E. 1950. The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacteriological Reviews*, 14: 1-49
- Jouany J.P. 2005. A European bank for rumen protozoa. French National Institute for agricultural research. http://www.international.inra.fr/press/a_european_bank_for_rumen_protozoa (5. jan. 2007)
- Kamra D.N. 2005. Rumen microbial ecosystem. *Current Science*, 89: 124-135
- Klieve A.V., Swain R.A. 1993. Estimating ruminal bacteriophage numbers using pulsed field gel electrophoresis and laser densitometry. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 2299-2303
- Kon S.K., Porter J.W. 1954. The intestinal synthesis of vitamins in the ruminant. V: Vitamins and hormone advances in research and applications XII. Harris R.S., Marriam G.F., Thimann K.V. (eds.). New York, Academic Press: 53-68
- Kung L. 1998. Direct-fed microbials and enzymes for dairy cows. University of Delaware. <http://www.txanc.org/proceedings/1998/directfed2.pdf> (20. mar. 2007)
- Kung L., Hession Jr. A. O. 1995. Altering rumen fermentation by microbial inoculation with lactate-utilizing microorganisms. *Journal of Animal Science*, 73: 250-256
- Le Ruyet P., Tucker W.B. 1992. Ruminant buffers: temporal effects on buffering capacity and pH of ruminal fluid from cows fed a high concentrate diet. *Journal of Dairy Science*, 75: 1069-1077
- Lopez S., Valdes C., Newbold C.J., Wallace R.J. 1995. Decreased methane production and altered fermentation in response to the addition of fumaric acid to the rumen simulation technique (Rusitec). *Journal of Animal Science*, 60: 540 (Abstract)
- Lowry O.H., Rosebrough N.H., Farr A.L., Randall R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275
- Marczenko Z. 1986. Separation and spectrophotometric determination of elements. Chichester, Ellis Horwood limited: 61
- Martin S.A., Streeter M.N. 1995. Effect of malate on in vitro mixed ruminal microorganism fermentation. *Journal of Animal Science*, 73: 2141-2145

- Miller T.L., Wolin M. J. 2001. Inhibition of growth of methane-producing bacteria of the ruminant forestomach by hydroxymethylglutaryl-ScoA reductase inhibitors. *Journal of Dairy Science*, 84:1445–1448
- Morvan B., Bonnemoy F., Fonty G., Gouet P. 1996. Quantitative determination of H₂-utilizing acetogenic and sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea from digestive tract of different mammals. *Current Microbiology*, 32: 129-133
- Nagaraja T.G., Newbold C.J., Van Nevel C.J., Demeyer D.I. 1997. Manipulation of ruminal fermentation. V: The rumen microbial ecosystem. Hobson P.N., Stewart C.S. (eds.). 2nd edition. London, Blackie Academic & Professional, an imprint of Chapman & Hall: 522-577
- Okeke G.C., Buchanan-Smith J.G., Grovum W.L. 1983. Effects of buffers on ruminal rate of passage and degradation of soybean meal in steers. *Journal of Animal Science*, 56: 1393-1399
- Orešnik A., Kermauner A. 2000. Prehrana domačih živali. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za zootehniko: 40-74
- Outtara B., Simard R. E., Holley R. A., Piette G. J.-P., Begin A. 1997. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology*, 37: 155-162
- Paster B.J., Russell J.B. Yang C.M.J. 1993. Phylogeny of the ammonia producing ruminal bacteria *Peptostreptococcus anaerobius*, *Clostridium sticklandii*, and *Clostridium aminophilum* sp nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 43: 107-110
- Robinson J.A, Smolemski W.J., Greening R.L., Ogilvie R.L., Bell K.B., Peters J.P. 1992. Prevention of acute acidosis and enhancement of feed intake in the bovine by *Megasphaera elsdenii* 407A. *Journal of Animal Science*, 70: 183 (abstract)
- Russell J.B., Rychlik J. L. (2001). Factors that alter rumen microbial ecology. *Science*, 292: 1119-1122
- SAS Institute Inc. 2001. The SAS System for Windows, Release 8.02. Cary, NC, USA, SAS Institute.
- Selinger L.B., Forsberg C.W., Cheng K.J. 1996. The Rumen: A unique source of enzymes for enhancing livestock production. *Anaerobe*, 2: 263-284
- Schwab C.G. 1995. Protected proteins and amino acids for ruminants. V: Biotechnology in animal feeds and animal feeding, Wallace R.J., Chesson A. (eds.). New York, VCH Publishers: 115-141
- Shakhashiri B. 2007. Chemoreceptors: The chemistry of odors. University of Wisconsin. http://scifun.chem.wisc.edu/chemweek/odors/chemorec_sh.html (19. jul. 2007)

- Sharpe M.E., Brock J.H., Phillips B.A. 1975. Glycerol teichoic acid as an antigenic determinant in a gram negative bacterium *Butyrivibrio fibrisolvens*. *Journal of General Microbiology*, 88: 355-363
- Skrivanova V., Machanova L. 1990. The influence of *Lactobacillus acidophilus* probiotics on efficiency and parameters of rumen fluid in calves. *Zivocisna Vyroba*, 35: 87-94
- Stewart C.S., Duncan, S.H. (1985). The effect of avoparicin on cellulolytic bacteria of the ovine rumen. *Journal of General Microbiology*, 131: 427-35
- Stewart C.S., Flint H.J., Bryant M.P. 1997. The rumen bacteria. V: The rumen microbial ecosystem. Hobson P.N. Stewart C.S. (eds.). 2nd edition. London, Blackie Academic & Professional, an imprint of Chapman & Hall: 10-72
- Tucker W.B., Hogue J.F., Aslam M. 1992. A buffer value index to evaluate effects of buffers on ruminal milieu in cows fed high or low concentrate, silage, or hay diets. *Journal of Dairy Science*, 75: 811-819
- Umphrey J.E., Staples C. R. 1992. General anatomy of the ruminant digestive system. University of Florida. http://edis.ifas.ufl.edu/BODY_DS061 (12. jan. 2007)
- Van Nevel C.J., Demeyer D.I. 1988. Manipulation of rumen fermentation. V: The rumen microbial ecosystem. Hobson P.N. (ed.). New York, Elsevier Applied Science: 387-443
- Van Soest P.J. 1994. Nutritional ecology of the ruminant. 2nd edition. New York, Press Ithaca: 476 str.
- Vatovec S. 1971. Fiziologija prebave v predželodcih prežvekovalcev. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za zootehniko: 22-24
- Wallace R.J., Arthaud L., Newbold C.J. 1994. Influence of *Yucca schidigera* extract on ruminal ammonia concentrations and ruminal microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 1762-1767
- Wallace R.I., McKain N., Broderick G.A., Rode L.M., Walker N.D., Newbold C.J., Kopečný J. 1997. Peptidases of the Rumen Bacterium, *Prevotella ruminicola*. *Anaerobe*, 3: 35-42
- 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: 519-525
- Wolin M.J., Miller T.L. 1988. Microbe interactions in the rumen microbial ecosystem. V: The rumen microbial ecosystem. Hobson P.N. (ed.). New York, Elsevier Applied Science: 343-359
- Wolin M.J. 1975. Interactions between the bacterial species of the rumen. V: Digestion and metabolism in the ruminant. McDonald I.W., Warner C.I. (eds.). Armidale, University of New England Publishing Unit: 134-148

Yoon I.K., Stern M.D. 1995. Influence of direct-fed microbials on ruminal fermentation and performance of ruminants. *Journal of Animal Science*, 8: 533–555

Žgajnar J. 1990. Prehrana in krmljenje goved. Ljubljana, Kmečki glas: 564 str.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Gorazdu Avguštinu za vodenje, pomoč in spodbudo pri izdelavi diplomskega dela, recenzentu doc. dr. Andreju Lavrenčiču za recenzijo diplomskega dela in prof. dr. Juriju Poharju za pregled naloge. Posebna zahvala gre Darji Ferme za vloženi čas in trud v času laboratorijskega poskusa, predvsem pa za sproščeno vzdušje, ki ga je ustvarjala s svojo preprostostjo in dobro voljo.

Hvala mami, Mirotu, Sari in Pinki za brezpogojno ljubezen in Sheherezadam za čudovite plesne trenutke.