UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Jana MISLEJ

VPLIV ČESNOVEGA IZVLEČKA DIALIL SULFIDA NA RAST IZBRANIH BAKTERIJSKIH SEVOV IZ VAMPA TER TVORBO KRATKOVERIŽNIH MAŠČOBNIH KISLIN IN PLINOV

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

EFFECTS OF GARLIC EXTRACT DIALYL SULFIDE ON GROWTH OF SELECTED RUMEN BACTERIAL STRAINS AND ON PRODUCTION OF VOLATILE FATTY ACIDS AND GASES

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: prof. dr. Franc Viktor NEKREP

Komisija za oceno in zagovor:

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

Član: prof. dr. Franc Viktor NEKREP
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 knjižnjice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Jana Mislej

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 579(043.2)=163.6
KG mikrobiologija/bakterije/bakterijski sevi/vamp/rastlinski izvlečki/dialil sulfid/kratkoverižne maščobne kisline/plini
KK AGRIS /
AV MISLEJ, Jana
SA AVGUŠTIN, Gorazd (mentor)
KZ SI-1230 Domžale, Groblje 3
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
LI 2007
IN VPLIV ČESNOVEGA IZVLEČKA DIALIL SULFIDA NA RAST IZBRANIH BAKTERIJSKIH SEVOV IZ VAMPA TER TVORBO KRATKOVERIŽNIH MAŠČOBNIH KISLIN IN PLINOV
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XI, 66 str., 8. pregl., 24 sl., 58 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Uporaba antibiotičnih krmnih dodatkov je v intenzivni živinorejski proizvodnji zelo razširjena v ZDA in tudi drugih razvitih državah po svetu, ne pa v Evropski skupnosti, kjer so zaradi strahu pred akumulacijo antibiotikov v mleku in mesu ter morebitnega horizontalnega prenosa antibiotskih rezistenc na človeku patogene bakterije t.i. krmne antibiotike s 1. januarjem 2006 prepovedali. Zaradi konkurenčnosti kmetov iščemo antibiotikom alternativne vampne modifikatorje, med njimi rastlinske izvlečke, npr. izvleček česna dialil sulfid. Namen diplomskega dela je bil proučiti vpliv dialil sulfida na rast izbranih sevov vampnih bakterij, gojenih v čistih kulturah. Želeli smo ugotoviti pri katerih vrstah vampnih mikroorganizmov dialil sulfid vpliva na rast, vrednost pH v gojišču po rasti, ter tvorbo skupnih celičnih beljakovin, kratkoverižnih maščobnih kislin in vodika. Ugotovili smo, da dialil sulfid v 0,9 mM koncentraciji ni zavrl same rasti sodeč po spremembi motnosti gojišča pri sevih *P. ruminicola* 23^T, *P. bryantii* B_14^T, *B. fibrisolvens* DSMZ 3071^T in *F. succinogenes* S85, je pa pri teh istih sevih povzročil bodisi nižjo produkcijo skupnih celičnih beljakovin, bodisi vrednosti pH ali kratkoverižnih mašobnih kislin ali kombinacije naštetih parametrov. Dialil sulfid v 9 mM koncentraciji je močno vplival na rast seva *P. ruminicola* 23^T, ki je med vsemi preučevanimi sevi na to snov očitno najbolj občutljiv, medtem ko na ostale seve ni vplival bistveno bolj ali drugače kot v 0,9 mM koncentraciji. Preučevali smo tudi vpliv višjih koncentracij dialil sulfida na rast dveh predstavnikov rodu *Ruminococcus*. Dialil sulfid v 81 in 135 mM koncentraciji je popolnoma inhibiral rast sevov *R. flavefaciens* 007 S/6 in *R. albus* DSMZ 20455, čeprav smo pri sevu *R. albus* DSMZ 20455 opazili rahel padec vrednosti pH in povečanje koncentracije vodika po 28-urni inkubaciji. Dialil sulfid v 27 mM koncentraciji je popolnoma zavrl rast seva *R. albus* DSMZ 20455, omogočil pa je zapoznelo in počasnejšo rast seva *R. flavefaciens* 007 S/6. Ugotovili smo, da dialil sulfid različno učinkovito inhibira rast različnih vampnih bakterij in da različno vpliva tudi na metabolne procese teh bakterij.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 579(043.2)=163.6
CX microbiology/bacteria/bacterial strains/rumen/plant extracts/diallyl sulfide/volatile fatty acids/gases
CC AGRIS /
AU MISLEJ, Jana
AA AVGUŠTIN, Gorazd (supervisor)
PP SI-1230 Domžale, Groblje 3
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Zootechnical Department
PY 2007
TI EFFECTS OF GARLIC EXTRACT DIALLYL SULFIDE ON GROWTH OF SELECTED RUMEN BACTERIAL STRAINS AND ON PRODUCTION OF VOLATILE FATTY ACIDS AND GASES
DT Graduation thesis (University studies)
NO XI, 66., 8 tab., 24 fig., 58 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The use of antibiotic feed additives is a common practice in animal production in the USA and other developed countries around the world, with an exception of EU, where it was banned on January 1, 2006 because of the fear that infeed antibiotics may accumulate in milk and meat products and that eventual horizontal transfer of antibiotic resistances on human pathogen bacteria may take place. Facing the increased production costs as a consequence of the ban, alternative ruminal modifiers are searched. Among others, various plant extracts, garlic extractproved particulary promising. The aim of this work was to study the effect of one of the garlic extracts, the diallyl sulfide, on selected ruminal bacterial strains grown in pure culture and to find out which and how different species are affected by diallyl sulfide in terms of growth, cell protein production, pH as well as production of hydrogen and short chain fatty acids. We concluded that diallyl sulfide in 0.9 mM concentration had no effects on cell growth of *P. ruminicola* 23^T, *P. bryantii* B_14^T, *B. fibrisolvens* DSMZ 3071^T and *F. succinogenes* S85 as determined by the optical density measurements. However, lower cell protein production, pH or short chain fatty acid production or a combination of them was observed in all strains. 9 mM concentration of diallyl sulfide inhibited growth of *P. ruminicola* 23^T , which appears to be the most sensitive strain, to a larger extent, but did not affect other strains in a significantly different manner as the 0.9 mM concentration. The effect of diallyl sulphide in 27, 81 and 135 mM concentration on growth of two ruminococcii was studied too. The two higher concentrations of diallyl sulphide inhibited growth of both strains, i.e. *R. flavefaciens* 007 S/6 and *R. albus* DSMZ 20455 completely, however, a small drop in pH of the medium as well as higher concentration of hydrogen was observed. 27 mM concentration of diallyl sulphide completely inhibited growth of *R. albus* DSMZ 20455, but allowed delayed and slower growth of *R. flavefaciens* 007 S/6. The conclusion of the study is that diallyl sulphide affect different ruminal microbes in different ways and exerts different affects on metabolism of these bacteria.

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	XI
1	**UVOD**	**1**
2	**PREGLED OBJAV**	**3**
2.1	SPLOŠNO O PREŽVEKOVALCIH	3
2.2	ZGRADBA VAMPA	3
2.2.1	**Bakterije**	**5**
2.2.1.1	Vrste iz rodu *Prevotella*	5
2.2.1.2	Vrsta *Butyrivibrio fibrisolvens*	6
2.2.1.3	Vrste iz rodu *Ruminococcus*	6
2.2.1.4	Vrsta *Fibrobacter succinogenes*	7
2.2.2	**Vampne arheje**	**7**
2.2.3	**Vampne glive**	**7**
2.2.4	**Vampne praživali**	**7**
2.3	METABOLNI PROCESI PREBAVE V PREDŽELODCIH	8
2.3.1	**Presnova ogljikovih hidratov v vampu**	**8**
2.3.2	**Presnova beljakovin v vampu**	**9**
2.3.3	**Nastanek plinov**	**9**
2.3.3.1	Metan	9
2.3.3.2	Inhibitorji nastanka metana	10
2.4	IONOFORNI ANTIBIOTIKI	10
2.4.1	**Monenzin**	**10**
2.5	RASTLINSKI IZVLEČKI	11
2.5.1	**Esencialna olja**	**11**
2.5.2	**Saponini**	**12**

2.6 ČESEN 13
2.6.1 Zgodovina uporabe česna 13
2.6.2 Česen 14
2.6.3 Česnovi preparati 16
3 MATERIAL IN METODE 18
3.1 MATERIAL 18
3.1.1 Bakterijski sevi 18
3.1.2 Tekoče gojišče M2 19
3.1.3 Pufri in raztopine 21
3.2 METODE 21
3.2.1 Nacepljanje sevov in preverjanje čistosti kultur z barvanjem po Gramu 21
3.2.2 Sterilizacija in dodajanje česnovih izvlečkov v gojišče 22
3.2.3 Ugotavljanje rasti bakterijskih kultur s spektrofotometričnim merjenjem motnosti 23
3.2.4 Merjenje pH vrednosti kultur 24
3.2.5 Ugotavljanje koncentracije celičnih beljakovin po Lowryjevi metodi 24
3.2.6 Etrska ekstrakcija kratkoverižnih maščobnih kislin (KMK) 25
3.2.7 Plinska kromatografija KMK in vodika 26
3.2.8 Statistična obdelava rezultatov s Studentovim t-testom 27
3.2.9 Shema eksperimenta 28
4 REZULTATI 29
4.1 GOJENJE ČISTIH BAKTERIJSKIH KULTUR ZA UMERITEV RASTNIH KRIVULJ 29
4.2 RAST IZBRANIH BAKTERIJSKIH SEVOV V GOJIŠČIH Z IN BREZ DIALIL SULFIDA 30
4.2.1 Merjenje optične gostote in spremljanje rasti preučevanih bakterij 30
4.2.2 Merjenje pH 34
4.2.3 Ugotavljanje koncentracije celičnih beljakovin po Lowryju 38
4.3 UGOTAVLJANJE KONCENTRACIJE KRATKOVERIŽNIH MAŠČOBNIH KISLIN PO RASTI V PRISOTNOSTI DIALIL SULFIDA 43

4.4 UGOTAVLJANJE KONCENTRACIJE VODIKA PO RASTI *R. albus* DSMZ 20455 IN *B. fibrisolvens* DSMZ 3071^T V PRISOTNOSTI DIALIL SULFIDA 47

5 RAZPRAVA IN SKLEPI 49

5.1 RAZPRAVA 49

5.1.1 Preučevanje vpliva dialil sulfida na rast vampnih bakterij z ugotavljanjem sprememb v motnosti gojišča 49

5.1.2 Preučevanje vpliva dialil sulfida na rast vampnih bakterij z ugotavljanjem koncentracije skupnih celičnih beljakovin 51

5.1.3 Preučevanje vpliva dialil sulfida na rast vampnih bakterij z ugotavljanjem sprememb v vrednostih pH v gojišču 53

5.1.4 Preučevanje vpliva dialil sulfida na rast vampnih bakterij z ugotavljanjem sprememb v koncentraciji kratkoverižnih maščobnih kislin v gojišču in vodika v plinski fazi nad gojiščem 54

5.2 SKLEPI 57

6 POVZETEK 60

7 VIRI 62

ZAHVALA

KAZALO PREGLEDNIC

str.

Preglednica 1: Ključni podatki in lastnosti dialil sulfida (Chemblink Online Informational Database of Chemicals from China) 14

Preglednica 2: Pregled produktov narejenih iz česna, ki se jih dobi na trgu (Amagase in sod., 2001: 958) 17

Preglednica 3: Splošen pregled bakterijskih sevov uporabljenih v poskusu (Hobson, 1988) 18

Preglednica 4: Sestava M2 gojišča 20

Preglednica 5: Pregled in sestava pufrov ter raztopin uporabljenih v poskusu 21

Preglednica 6: Kalibracijska raztopina št. 3 uporabljena pri plinski kromatografiji za ugotavljanje koncentracije KMK 21

Preglednica 7: Koncentracije kratkoverižnih maščobnih kislin (KMK), deleži posameznih KMK in OD vrednosti 44

Preglednica 8: Koncentracija vodika (H_2) za sev *B. fibrisolvens* DSMZ 3071^T 47

KAZALO SLIK

str.

Slika 1: Prebavni trakt pri prežvekovalcih (prirejeno po Graham, 2005) 4

Slika 2: Presnova ogljikovih hidratov v vampu (prirejeno po Russel in Rychlik, 2001) 8

Slika 3: Kemijske strukture, ki so sestavine saponinov (prirejeno po Hostettmann in Marston, 1995, cit. po Wallace in sod., 2004) 12

Slika 4: Stroki česna 14

Slika 5: Kemijska reakcija ob ranitvi česna (prirejeno po Ankri in Mirelman, 1999) 15

Slika 6: Shema eksperimenta 28

Slika 7: Rastne krivulje sevov 29

Slika 8: Rast (OD_{654}) v odvisnosti od časa za seve *P. ruminicola* 23^T, *P. bryantii* B_14^T, *B. fibrisolvens* DSMZ 3071^T in *F. succinogenes* S85 pri dveh koncentracijah dialil sulfida 31

Slika 9: Rast (OD_{654}) v odvisnosti od časa za sev *P. ruminicola* 23^T za obe paralelki pri dveh koncentracijah dialil sulfida 32

Slika 10: Rast (OD_{654}) v odvisnosti od časa za seva *R. flavefaciens* 007 S/6 in *R. albus* DSMZ 20455 pri treh višjih koncentracijah dialil sulfida 33

Slika 11: Rast (OD_{654}) v odvisnosti od časa za sev *R. flavefaciens* 007 S/6 za obe paralelki pri treh koncentracijah dialil sulfida 34

Slika 12: pH in rast (OD_{654}) v odvisnosti od časa za seve *P. ruminicola* 23^T, *P. bryantii* B_14^T, *B. fibrisolvens* DSMZ 3071^T in *F. succinogenes* S85 pri dveh koncentracijah dialil sulfida 35

Slika 13: pH in rast (OD_{654}) v odvisnosti od časa za sev *P. ruminicola* 23^T pri dveh koncentracijah dialil sulfida in dveh paralelkah 36

Slika 14: pH in rast (OD_{654}) v odvisnosti od časa za seva *R. flavefaciens* 007 S/6 in *R. albus* DSMZ 20455 pri treh koncentracijah dialil sulfida 37

Slika 15: pH in rast (OD_{654}) v odvisnosti od časa za sev *R. flavefaciens* 007 S/6 pri treh koncentracijah dialil sulfida in dveh paralelkah 38

Slika 16: Koncentracija celičnih beljakovin in rast (OD_{654}) v odvisnosti časa za seve *P. ruminicola* 23^T, *P. bryantii* B_14^T, *B. fibrisolvens* DSMZ 3071^T in *F. succinogenes* S85 pri nižji koncentraciji dialil sulfida 39

Slika 17: Koncentracija celičnih beljakovin in rast (OD_{654}) v odvisnosti časa za sev *P. ruminicola* 23^T pri nižji koncentraciji dialil sulfida (obe paralelki) 40

Slika 18: Koncentracija celičnih beljakovin in rast (OD_{654}) v odvisnosti časa za sev *P. bryantii* B_14^T pri nižji koncentraciji dialil sulfida (obe paralelki) 41

Slika 19: Koncentracija celičnih beljakovin in rast (OD_{654}) v odvisnosti od časa za seve *R. flavefaciens* 007 S/6 in *R. albus* DSMZ 20455 pri višjih koncentracijah dialil sulfida 42

Slika 20: Koncentracija celičnih beljakovin in rast (OD_{654}) v odvisnosti od časa za sev *R. flavefaciens* 007 S/6 pri višjih koncentracijah dialil sulfida in obeh paralelkah 43

Slika 21: Koncentracija ekstrahiranih KMK za seva *P. bryantii* B_14^T in *P. ruminicola* 23^T 45

Slika 22: Koncentracija ekstrahiranih KMK za seva *B. fibrisolvens* DSMZ 3071^T in *F. succinogenes* S85 45

Slika 23: Koncentracija ekstrahiranih KMK za seva *R. flavefaciens* 007 S/6 in *R. albus* 20455 46

Slika 24: Koncentracija vodika (H_2) in OD vrednost za sev *R. albus* DSMZ 20455 47

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A_{654}	absorbanca pri valovni dolžini 654 nm
BSA	goveji serumski albumin; angl. *bovine serum albumin*
CTR	kontrola v poskusu
DS	dialil sulfid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkultur
EU	Evropska unija
KMK	kratkoverižna maščobna kislina
mg/l	miligram na liter
MK	maščobna kislina
ml	mililiter (10^{-3} litra)
mM	milimol
m.o.	mikroorganizem
nm	nanometer (10^{-9} metra)
NPN	neproteinski dušik; angl. *non-protein nitrogen*
OD	optična gostota; angl. *optical density*
PBS	fosfatno zapufrana slana raztopina; angl. *phosphate-buffered saline*
pr. n. št.	pred našim štetjem
ρ	gostota, masna koncentracija [kg/m^3]
rpm	število obratov v minuti; angl. *rotations per minute*
RSCC	kontinuirana kultura, ki posnema vamp; angl. *rumen stimulating continuous culture system*
SS	suha snov
V	volumen [L]
vol.%	volumski delež [v/v]
µl	mikroliter (10^{-6} litra)
µm	mikrometer (10^{-6} metra)

1 UVOD

Porast svetovnega prebivalstva stopnjuje tudi povpraševanje po hrani, zlasti bogati z beljakovinami. Nekatere beljakovine tvorijo rastline, najdemo jih tudi v ribah, najpomembnejši vir kvalitetnih beljakovin pa sta meso in mleko, ki ju proizvajajo prežvekovalci (govedo, ovce, koze,…). Zanje značilni in nujni so prebavni in presnovni procesi v vampu. V vampu so naseljene vampne bakterije, arheje, glive, praživali in virusi. Simbioza prežvekovalcev z vampnimi mikroorganizmi omogoča sposobnost pretvarjanja prehransko revne krme v bogat proizvod. Glavni produkti mikrobne aktivnosti v vampu so kratkoverižne maščobne kisline (KMK), metan (CH_4), ogljikov dioksid (CO_2) in amoniak (NH_3). KMK predstavljajo za prežvekovalca glavni vir energije, ki pokrijejo 70-80% energetskih potreb gostitelja. Pomemben vir beljakovin in vitaminov so vampni simbionti, ki postanejo dostopni v tankem črevesu po lizi mikrobnih celic v siriščniku.

Poleg glavnih produktov (meso, mleko) proizvajajo prežvekovalci oz. njihovi simbionti tudi stranski produkt metan (CH_4). Produkcija metana v vampu prežvekovalcev pomeni za žival energetsko izgubo in s tem škodo za rejca, istočasno pa predstavlja pojav onesnaževanja okolja s toplogrednimi plini. Zato želimo to proizvodnjo zmanjšati. Metanogene arheje so same odporne na delovanje krmnih antibiotikov, lahko pa z antibiotiki zmanjšamo produkcijo metana z inhibicijo bakterijskih vrst, ki proizvajajo prekurzorje za sintezo metana. Namen manipulacije vampne mikrobne združbe je povečana produktivnost živali (večja mlečnost, mesnatost, več volne) kot posledica spremembne metabolnih procesov v vampu. Uporaba prehranskih antibiotikov za spreminjanje obstoječe mikrobne združbe se je izkazala za učinkovito, vendar je njihova uporaba zaradi možnosti kopičenja v mleku in mesu ter zaradi možnosti razvoja bakterijskih resistenc na te in njim podobne antibiotike in prenosa na patogene bakterijske seve prepovedana v EU od 01.01.2006. Zaradi prepovedi uporabe prehranskih antibiotikov se išče alternativne vire krmnih dodatkov. V zadnjem času intenzivno preučujemo vplive ne-antibiotičnih krmnih dodatkov kot so probiotiki, prebiotiki in rastlinski izvlečki.

Namen diplomske naloge je bil s klasičnimi mikrobioloških in biokemijskimi metodami preučiti vpliv česnovega izvlečka dialil sulfida na nekatere fenotipske lastnosti izbranih sevov vampnih bakterij (*Prevotella bryantii* B_14^T, *Prevotella ruminicola* 23^T,

Ruminococcus albus 20455, *Ruminococcus flavefaciens* 007 S/6, *Butyrivibrio fibrisolvens* DSMZ 3071^T in *Fibrobacter succinogens* S85), gojenih v čistih kulturah. Česnove substance so znane kot naravni antibiotik in insekticid. Cilj diplomske naloge je bil ugotoviti, na katere vrste vampnih mikroorganizmov, kako in v kakšni meri dialil sulfid vpliva na rast, vsebnost beljakovin, količino nastalega metana s pomočjo produkcije vodika in kratkoverižnih maščobnih kislin. Predpostavljali smo hipotezo, da se ob dodatku dialil sulfida zmanjša produkcija vodika, ki ga metanogene arheje izkoriščajo in tako tvorijo metan, ki je za okolje škodljiv.

2 PREGLED OBJAV

2.1 SPLOŠNO O PREŽVEKOVALCIH

Prežvekovalci so najuspešnejša skupina rastlinojedov, zato ker so razvili sistem prebave, ki temelji na simbiotskem odnosu med prežvekovalcem in mikroorganizmi. Ti živijo v obsežnih predželodcih (vamp, kapica, prebiralnik) in pomagajo gostitelju pri prebavi hranilnih snovi, predvsem celuloze in drugih težje prebavljivih sestavin rastlinske celične stene. Beljakovine v vampu se stalno izmenjavajo. V vampu se krma premeša z ostalo vsebino z močnimi kontrakcijami mišic vampne stene in tako pride v stik z mikrobnimi simbionti, ki krmo razgradijo in jo v procesu fermentacije izkoristijo kot vir energije in gradbenih elementov za lastno rast in razvoj. Pri tem pa izločajo različne stranske produkte fermentacije, predvsem kratkoverižne maščobne kisline (KMK) in pline (CO_2 in H_2). Vodik metanogene arheje pretvorijo v metan. V vampu nastane na dan več 100 litrov plinov (Orešnik in Kermauner, 2002).

2.2 ZGRADBA VAMPA

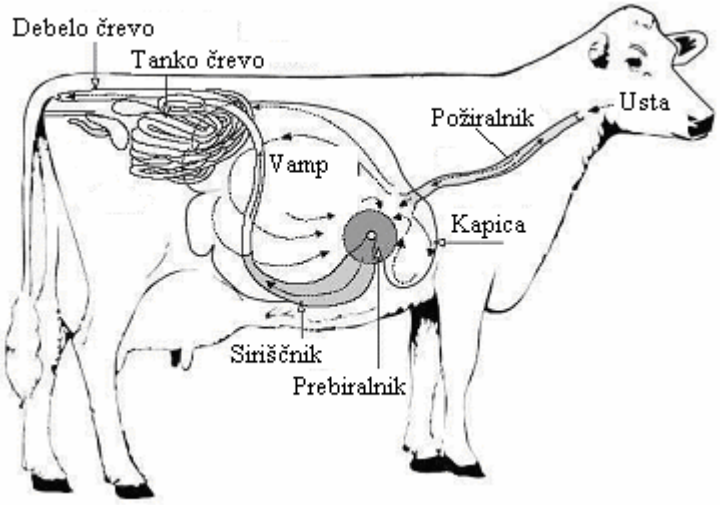
Vamp je najbolj prostran, votel, vrečast prebavni organ v sklopu prebavnega trakta prežvekovalcev. Mišično steno pokriva navzven serozna, navznoter pa kutana sluznica. Sluznica je pokrita s številnimi nitastimi, listastimi in kijastimi papilami. Stena vampa je močna. Osnova je zgrajena iz plasti gladkega mišičja. V določenih področjih je stena posebej odebeljena in tam predstavlja močne mišične grede, razmeščene pod posameznimi odseki. V zgornjem delu dorzalne vreče vampa se zbirajo v fermentaciji nastali plini. Po hranjenju v vampu ni proste tekočine. S časom od zadnjega obroka vsebina vampa postaja vse bolj redka (Vatovec, 1971).

Ker se hrana dalj časa zadržuje v predželodcih, je prebavljivost krme boljša in s tem tudi boljša izraba energije in istočasna večja sinteza beljakovin in vitaminov iz krme, ki je sicer praviloma bogata s celulozo in revna z beljakovinami (Hobson, 1988).

V vampu so ugodni pogoji za razvoj mikrobne združbe ali mikrobiote: obilo hranljivih snovi in relativno počasen iztok iz vampa. V anaerobnih razmerah naseljujejo vamp

bakterije, arheje, praživali, glive in virusi (Hobson, 1988). Bakterij je največ, od 10 do 100 milijard v 1 ml vampne vsebine. Praživali (protozoa) je precej manj (okrog 1 milijon v ml), vendar so precej večje, zato so po masi skoraj izenačene z bakterijami. Glive predstavljajo okrog 10% vse mikrobne mase (Orešnik in Kermauner, 2002).

Pri prežvekovalcih je najbolj raziskan del prebavil ravno vamp, predvsem zaradi velike gostote poselitve in kompleksnih interakcij. V vampu živi ogromno število (verjetno več kot 1000, vendar je večina še neopisanih) različnih vrst bakterij ter relativno malo vrst metanogenih arhej in anaerobnih gliv. Taksonomska razvrstitev mikrobov je pomembna tako za identifikacijo in klasifikacijo kot tudi za razumevanje metabolnih aktivnosti ter določenega mikrobnega razvoja. Mikrobna združba v vampu je dokaj dobro raziskana in pogosto služi kot model za preučevanje drugih prebavnih ekosistemov, tako pri rastlinojedih kot tudi pri nerastlinojedih živalih. Fermentativni mikrobi, zlasti bakterije, hidrolizirajo rastlinske polimere na krajše oligomere in monomere. Substrati, ki pri tem nastanejo, se prenašajo v mikrobne celice s specifičnimi transportnimi mehanizmi. V celicah poteka fermentacija, katere produkti so acetat, propionat, butirat in druge maščobne kisline, CO_2 in vodik. Bakterije so najpomembnejša skupina mikroorganizmov, vključenih v procese razgradnje vlaknine. Veliko vampnih bakterij izkoristi amoniak, ureo in ostale dušikove snovi kot samostojni vir dušika. 60 – 80% bakterijskih beljakovin je sintetiziranih iz predhodnega amoniaka (Mackie in sod., 2001).



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

V vampu je konstantna temperatura (39°C), pH vampne vsebine pa je 6,5. Hrana prihaja v vamp pomešana s slino, ki vsebuje bikarbonate. Pred vstopom v vamp se hrana pomeša in tako vstopi v vamp pripravljena na mikrobno razgradnjo. Hrana se v vampu zadržuje 9 do 12 ur. V vampu se kopiči velika količina CH_4 in CO_2 in sicer je CO_2 65% in CH_4 35% (Madigan in sod., 2000).

2.2.1 Bakterije

Bakterije so v vampu najštevilčnejše. Lahko so striktni ali fakultativni anaerobi. Fakultativni anaerobi predstavljajo stalno komponento vampne mikrobne združbe, ki je pomembna predvsem iz vidika odstranjevanja kisika. Fakultativni anaerobi kot potrošniki kisika pomagajo vzdrževati močno reducirano anaerobno okolje, ki je potrebeno za obstoj večine vampnih simbiontov (Mackie in sod., 2001).

Bakterije so morfološko, fiziološko, taksonomsko in filogenetsko precej različne (Stewart in sod., 1997). Najbolj zastopani po Gramu negativni rodovi so *Prevotella*, *Ruminobacter*, *Fibrobacter*, *Succinivibrio* in *Treponema* ter nekateri drugi, po Gramu pozitivni rodovi pa so *Ruminococcus*, *Streptococcus*, *Clostridium* in *Eubacterium*. Nekatere vampne bakterijske vrste je zaradi netipične zgradbe celične stene težko razvrstiti po Gramu. Takšne so nekatere vrste iz rodov *Butyrivibrio* in *Selenomonas*, ki sodijo med klostridijem sorodne po Gramu pozitivne bakterije z nizko vsebnostjo G + C, po Gramu pa se zaradi tanjše celične stene barvajo negativno. Glede na hranilni substrat, ki ga lahko izkoriščajo, jih delimo na saharolitične, amilolitične, celulolitične, proteolitične in lipolitične in kot takšne imajo pri procesih prebave odločilno vlogo (Madigan in sod., 2001).

2.2.1.1 Vrste iz rodu *Prevotella*

Bakterije iz rodu *Prevotella* predstavljajo eno izmed največjih skupin vampnih bakterij, so striktni anaerobi in po Gramu negativni kokobacili, ki živijo v samem vampnem soku (Wallace in sod., 1993). Vrsti *Prevotella bryantii* pripisujemo pomembno vlogo v metabolizmu dušika in je v primerjavi z ostalimi vampnimi bakterijami manj občutljiva na nizke vrednosti pH (Russel in Rychlik, 2001) in tudi nekatere krmne dodatke npr. ionoforni antibiotik monenzin (Callaway in Russel, 1999).

Vrsta *Prevotella ruminicola* je ena izmed najbolj zastopanih in raziskanih skupin mikroorganizmov v vampu. Raziskave kažejo, da ima *P. ruminicola* pomembno vlogo pri izkoriščanju rastlinskih polisaharidov, predvsem ksilanov, pektinov in škroba, poleg tega pa sodeluje tudi pri metabolizmu peptidov in beljakovin (Avguštin in sod., 1997).

2.2.1.2 Vrsta *Butyrivibrio fibrisolvens*

Butyrivibrio fibrisolvens je bakterija, ki kaže Gram pozitivno strukturo celične stene, vendar se zaradi tanjše stene, ki ne zadrži kompleksa kristal vijoličnega barvila barva po Gramu negativno (Madigan in sod., 2000). Butirivibriji so striktno anaerobne bakterije in imajo obliko ukrivljene paličice. Najdemo jih v prebavnem traktu prežvekovalcev in nekaterih predelih prebavnega trakta drugih sesalcev. V vampu so butirivibriji med najpomembnejšimi ksilanolitičnimi bakterijami in glavni producenti maslene kisline v vampu, ki predstavlja 16% vseh kratkoverižnih maščobnih kislin (Stewart in sod., 1997). Fermentirajo tudi celo vrsto različnih ogljikovih hidratov.

2.2.1.3 Vrste iz rodu *Ruminococcus*

Ruminococcus albus in *Ruminococcus flavefaciens* sta po Gramu pozitivni bakterijski vrsti (Varel in Dehority, 1989), ki se v vampu pojavljata v obliki diplokokov, glavni fermentacijski produkt pa je ocetna kislina (Hungate, 1957). Produkti fermentacije pri bakteriji *R. albus* so ocetna in mravljična kislina (Hungate, 1957), vodik (H_2) in ogljikov dioksid (CO_2). Glavni fermentacijski produkt seva *R. flavefaciens* je ocetna kislina, ostali produkti so jantarna kislina, v nekaterih primerih pa tudi mlečna kislina in vodik (Bryant, 1986).

Obe vrsti sta dokaj razširjeni, saj so ruminokoke odkrili ne le v vampu prežvekovalcev, temveč tudi v anaerobnih delih prebavnih traktov številnih drugih živali, tako rastlinojedih kot vsejedih. Ruminokoki pomembno sodelujejo pri razgradnji strukturnih polisaharidov in tako opisujemo npr. *R. flavefaciens* kot eno izmed najbolj celulolitičnih vampnih bakterijskih vrst.

2.2.1.4 Vrsta *Fibrobacter succinogenes*

Med najbolj celulolitične (Varel in Dehority, 1989) in dokaj zastopane anaerobne bakterijske vrste v vampu sodi *F. succinogenes* (10^7 m.o./ml vampnega soka), ki je evolucijsko in taksonomsko popolnoma drugačen od drugih vampnih bakterij (Koike in Kobayashi, 2001). Je Gram negativna bakterijska vrsta (Madigan in sod., 2000), katere glavna fermentacijska produkta sta ocetna in jantarna kislina (Stewart in Duncan, 1985).

2.2.2 Vampne arheje

Predstavniki arhej, ki živijo v vampu preževekovalcev so metanogene arheje. Arheje, ki predstavljajo samostojno kraljestvo (*Archaea*) razvrstimo v tri skupine t.j. *Crenarchaeota*, *Euryarchaeota* in *Korarchaeota*. Skupino *Euryarchaeota* sestavljajo halofilne in metanogene arheje. Te živijo v anaerobnih pogojih. V vampu izkoriščajo kot vir energije predvsem vodik, kot elektronski akceptor pa ogljikov dioksid in pri tem nastaja metan. Vampne arheje so striktni anaerobi in taksonomsko in filogenetsko dokaj raznolika družina. Najpogostejša arheja v vampu goveda je *Methanobrevibacter ruminantium*, poleg nje pa sta bili izolirani tudi *Methanobacterium formicicum* in *Methanomicrobium mobile* (Mackie in sod., 2001). Vseh vampnih metanogenih arhej je v vampu preko 50 različnih vrst (Madigan in sod., 2003).

2.2.3 Vampne glive

Vampne glive so prav tako obvezni anaerobi. Celične stene gliv so setavljene iz hitina. Vampne glive imajo specializiran življenjski krog, ki se začne s prostoplavajočo običkano zoosporo, ki se pritrdi na rastlinske delce. V fazi odraslosti začne sporangij brsteti in sprosti zopet gibljive zoospore, ki znova začnejo življenjski ciklus. Anaerobne glive so vpletene v razgradnjo polisaharidov rastlinskih celičnih sten in proizvajajo vrsto kratkoverižnih maščobnih kislin (KMK) kot končnih produktov fermentacije (Mackie in sod., 2001).

2.2.4 Vampne praživali

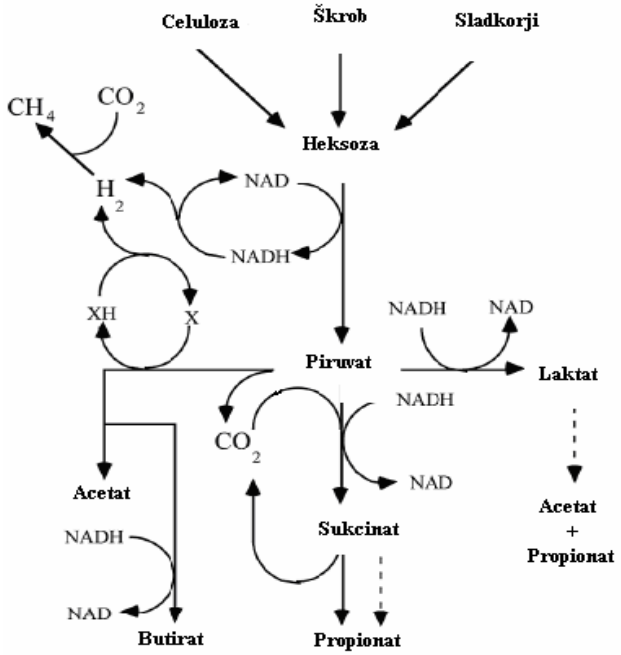
V vampu prežvekovalcev je naseljenih veliko število različnih praživali, ki skupaj predstavljajo tudi do 50% mikrobne biomase (Madigan in sod., 2000). Njihova naloga je,

da kot predatorji s plenjenjem bakterij vzdržujejo ravnotežje med različnimi bakterijskimi vrstami, hkrati pa povečajo hitrost metabolnega kroženja bakterijskih beljakovin v vampu. Imajo tudi sposobnost sinteze beljakovin in sicer iz aminokislin hrane ali tistih, ki jih sintetizirajo bakterije, gradijo beljakovine lastnega telesa in tako sodelujejo pri pretvarjanju rastlinskih beljakovin v živalske. Vampne praživali po njihovi prebavi v siriščniku in tankem črevesu (Dehority, 1991), predstavljajo pomemben vir dušika. Število praživali v vampu je odvisno od krme katero gostitelj zaužije (Hungate, 1960).

2.3 METABOLNI PROCESI PREBAVE V PREDŽELODCIH

2.3.1 Presnova ogljikovih hidratov v vampu

Kompleksne ogljikove hidrate razgradijo v vampu mikroorganizmi na enostavne sladkorje ki jih uporabijo za lastno presnovo. V teh presnovnih procesih nastajajo kratkoverižne maščobne kisline kot npr. ocetna, propionska in maslena kislina in plina vodik in ogljikov dioksid. Kratkoverižne maščobne kisline se absorbirajo skozi vampno sluznico in jih organizem prežvekovalca uporablja v svoji presnovi (Orešnik in Kermauner, 2002), ogljikov dioksid pa žival v glavnem izriga oziroma se z delovanjem metanogenih arhej pretvori v metan (Wolin in sod., 1997).



Slika 2: Presnova ogljikovih hidratov v vampu (prirejeno po Russel in Rychlik, 2001)

2.3.2 Presnova beljakovin v vampu

Večina beljakovin iz krme se pod vplivom proteolitičnih encimov, ki jih izločajo mikroorganizmi, razgradi že v vampu. Razgradijo se do peptidov in prostih aminokislin, le-te pa do organskih kislin in CO_2. V primeru, da je v vampu nizek pH, se razgradnja beljakovin zmanjša. Aminokislinska sestava beljakovin je odvisna od sestave obroka. Pri krmi bogati z beljakovinami nastane v vampu veliko amoniaka (Orešnik in Kermauner, 2002). Ko amoniak preseže optimalen nivo, se absorbira v kri, po krvi gre v jetra kjer se veže z ogljikovim dioksidom v ureo. Urea prehaja v kri in preko ledvic se izloča s sečem, deloma pa prehaja v žleze slinavke in preko sline nazaj v vamp (Nolan, 1975).

Pri mikrobni razgradnji in izgradnji lastnih beljakovin v vampu je zelo pomembno dejstvo, da so mikroorganizmi sposobni sintetizirati ne le neesencialne, ampak tudi esencialne aminokisline. To omogoča prežvekovalcem, da so mnogo manj odvisni od kakovosti beljakovin v krmi kot neprežvekovalci (Orešnik in Kermauner, 2002).

2.3.3 Nastanek plinov

2.3.3.1 Metan

Metan nastane pri porabi s fermentacijo nastalega vodika v predželodcih prežvekovalcev, tvorijo ga pa kot končni produkt lastnega metabolizma izključno metanogene arheje. Medtem ko lahko produkte bakterijskih fermentacij, kot so kratkoverižne maščobne kisline in mikrobne beljakovine, prežvekovalci izkoristijo, metan izrigajo z drugimi plini v ozračje. Metan nastaja tudi pri fermentaciji v debelem črevesu drugih domačih živali, vendar so te količine precej manjše kot v vampu prežvekovalcev. Glede na to se sprošča pri reji prežvekovalcev (govedo, ovce, koze) bistveno več metana kot pri reji neprežvekovalcev (konji, prašiči, perutnina). V Sloveniji prispeva fermentacija v prebavilih goved 76%, fermentacija v prebavilih prašičev 2%, fermentacija v prebavilih konj in drobnice pa 3% izpustov metana. Preostanek nastane med skladiščenjem živinskih gnojil (Verbič in Sušin, 2005).

Metan in didušikov oksid sta edina toplogredna plina, ki ju spremljamo v okviru izpustov v kmetijstvu. Zaradi razlik v toplogrednem učinku ju za namene spremljanja izpustov toplogrednih plinov preračunamo v ekvivalente ogljikovega dioksida. Metan ima 21 krat,

didušikov oksid pa 310 krat močnejši toplogredni učinek kot ogljikov dioksid (Verbič in Sušin, 2005).

2.3.3.2 Inhibitorji nastanka metana

Glede na vrsto prehrane živali je lahko izguba energije z nastajanjem metana v vampu do 10% (Czerkawski, 1969, cit. po Van Nevel in Demeyer, 1977; Van Nevel in Demeyer, 1977). Rast metanogenih arhej inhibirajo različne substance, kot so halogeni analogi metana, sulfit, nitrat, nenasičene maščobne kisline z dolgimi verigami. Pri inhibiciji metanogeneze se poveča delež propionata v profilu maščobnih kislin iz katerega lahko žival pridobi več energije kot iz bolj oksidiranih kratkoverižnih maščobnih kislin (Kamra, 2000, cit. po Patra in sod., 2006; Sliwinski, 2002, cit. po Patra in sod., 2006; Lila, 2003, cit. po Patra in sod., 2006; Patra, 2006). Na zmanjšanje produkcije nastalega metana lahko vplivamo tudi z dodatkom taninov (Patra in sod., 2006).

2.4 IONOFORNI ANTIBIOTIKI

Ionoforni antibiotiki so lipofilne substance, pri katerih je zunanjost hidrofobna, notranjost pa hidrofilna. V splošnem so ionoforni antibiotiki inhibitorni za Gram pozitivne vampne bakterije (npr. *Eubacterium*, *Lactobacillus* in *Streptococcus*) in tiste, ki se pogosto barvajo po Gramu negativno, vendar imajo Gram pozitivno strukturo celične stene, slabo pa so učinkoviti proti Gram negativnim bakterijam (Watanabe in sod., 1981, cit. po Newbold in sod., 1988; Newbold in sod., 1988).

2.4.1 Monenzin

V ZDA je bil leta 1976 kot krmni dodatek za povečanje produktivnosti domačih živali odobren ionoforni antibiotik monenzin, kasneje pa so odobrili še uporabo nekaterih drugih antibiotikov (Reed, 1979). V Evropi je bil s 1. januarjem 2006 prepovedan zaradi možnosti akumuliranja antibiotika v živalskih proizvodih (mleko, meso) in posledično vpliva na zdravje človeka (Russell in Houlihan, 2003). Monenzin (trgovska oznaka Rumensin) je antibiotik, ki ga sintetizira bakterija *Streptomyces cinnamonensins*. Je zmerno aktiven *in vitro* in deluje proti Gram pozitivnim bakterijam in določenim mikobakterijam (Haney in Hoehn, 1967, cit. po Van Nevel in Demeyer, 1977; Van Nevel in Demeyer, 1977). Monenzin je učinkovit tudi proti parazitskim kokcidijem. Opravljenih je bilo veliko

raziskav o vplivu monenzina na vampno fermentacijo tako na govedu kot tudi pri ovcah. Z uporabo monenzina se poveča produkcija propionata in zmanjšuje produkcija metana (Van Nevel in sod., 1977).

2.5 RASTLINSKI IZVLEČKI

Dodatke, ki spreminjajo vampno fermentacijo (organske kisline, kvas, encimi, krmni antibiotiki) uporabljajo za izboljšanje učinkov pri mlečnem in mesnem proizvodnem sistemu (Busquet in sod., 2005). Uporaba antibiotikov in prehranskih dodatkov je bila v EU v januarju 2006 prepovedana (Opinion …, 2003). Prepoved v EU temelji na dveh predpostavkah: (i) da se antibiotiki akumulirajo v mleku oz. mesu in tako pridejo direktno do potrošnika in (ii) da bi se zaradi pretirane rabe le-teh razvile rezistence, ki bi bile prenosljive. Zaradi tega so začeli izvajati raziskave z alternativnimi protimikrobnimi sredstvi, s katerimi bi bilo spreminjanje vampne fermentacije varno.

Rastlinski izvlečki in tudi eterična olja so se v tradicionalni medicini uporabljala skozi stoletja med drugim zaradi njihovega protimikrobnega delovanja. Rastlinski izvlečki vsebujejo številne sekundarne metabolite, ki delujejo protimikrobno. Sekundarni metaboliti so saponini, terpenoidi in fenilpropanoidi (sekundarni metaboliti cinamaldehida, eugenola in anethola). Rastlinski izvlečki in njihovi sekundarni metaboliti vplivajo na mikrobno fermentacijo v vampu, vendar imamo o njihovem delovanju malo informacij (Busquet in sod., 2005).

Mnoge rastline že tisočletja izkoriščamo v etno-medicinske in etno-veterinarske namene. Učinkovine najdemo v različnih delih rastlin (listi, korenine, lubje, cvet) oziroma v eteričnih in esencialnih oljih, grenčicah, čreslovinah, dišavah in drugih izvlečkih (Dano in Bogh, 1999).

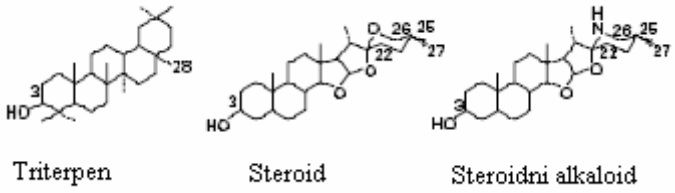
2.5.1 Esencialna olja

Esencialna olja so po specifičnem okusu in vonju poznana že več stoletij. Pridobivamo jih iz zeli in začimbnic (Wallace in sod., 2002) z destilacijo njihovih neolesenelih delov rastlin (Dorman in Deans, 2000). Posledično je tudi njihovo antiseptično delovanje že dolgo poznano. Značilnost esencialnih olj je, da so hitro hlapljiva in hidrofobna (Greathead, 2003).

Esencialna olja so možna alternativa antibiotikom in kemičnim biocidom. Raziskave so pokazale, da je delovanje derivatov esencialnih olj protiglivno (60%) in protibakterijsko (30%) (Cowan, 1999, cit. po Greathead, 2003; Greathead, 2003). Protibakterijski učinek lahko dosežejo esencialna olja zaradi lipofilne narave, ki povzroči razpad celične stene. Zunanja membrana Gram negativnih bakterij vsebuje lipopolisaharide, ki preprečujejo vstop v celico številnim snovem, med drugim tudi esencialnim oljem. Zato so načeloma Gram negativne bakterije bolj odporne proti esencialnim oljem kot pa Gram pozitivne bakterije (Greathead, 2003).

2.5.2 Saponini

Beseda saponin izhaja iz latinske besede *sapo*, kar pomeni milo. Saponini so glikozidi pri katerih so vezni členi sladkorji povezani v triterpen ali pa v steroidno alkaloidno obliko. Sladkorji, ki sestavljajo verigo tvorijo različne oblike obročev in s tem različne strukture (Wallace in sod., 2002).



Slika 3: Kemijske strukture, ki so sestavine saponinov (prirejeno po Hostettmann in Marston, 1995, cit. po Wallace in sod., 2004)

Pri preučevanju vpliva saponinov na vampne mikroorganizme so raziskovalci preučevali ali in kako saponini vplivajo na vampne fermentacije in ali zavirajo rast praživali v vampu. Ugotovili so, da so saponini toksični za vampne praživali (Wallace in sod., 2002). Ravno tako kot imajo saponini vpliv na vampne mikroorganizme, lahko mikroorganizmi presnavljajo saponine. Le to pa je pomemben dejavnik, ki ga je pri saponinih potrebno preučiti za hrano prežvekovalcev.

Juka (*Yucca schidigera*) je ena izmed rastlin, ki vsebuje saponine, ki zmanjšujejo koncentracijo amonijskega dušika in spreminjajo deleže acetata in propionata (Grobner, 1982, cit. po Cardozo in sod., 2004; Ryan, 1997, cit. po Cardozo in sod., 2004; Cardozo,

2004) v vampnem soku. Ravno tako saponini zavirajo rast vampnih bakterije v mešanih kulturah in *in vivo*. V čistih kulturah kažejo protibakterijski učinek. Tako izvleček *Y. schidigera* inhibira rast bakterije *Butyrivibrio fibrisolvens* (Wallace in sod., 1994), medtem ko so Wang in sod. (2000) ugotovili ovirano celulozno presnovo pri vrstah *Ruminococcus* spp. in *Fibrobacter succinogenes*.

2.6 ČESEN

2.6.1 Zgodovina uporabe česna

Česen izvira iz srednje Azije (Kazahstan, Uzbekistan, zahodna Kitajska). Spada v družino *Alliaceae*. V zgodovini se je uporabljal v zdravilne in kulinarične namene.

Kot zdravilo je česen v uporabi že več kot 2000 let, uporabnost česna pa je znana že več kot 5000 let. Omenjen je že v kitajski literaturi. Uporabljali so ga tudi stari Egipčani za zatiranje številnih bolezni. Aristotel in Hipokrat sta opozarjala na zdravilne učinke česna, Pasteur pa je opisal njegove zdravilne in protibakterijske učinke (Delaha in Garagusi, 1985).

Na področje Mediterana se je česen razširil že v stari dobi. V Egiptu so ga gojili že 1600 let pr. n. št. Najbolj značilen je za Kitajsko, Mediteran in države Južne Amerike. Veliko so česen uporabljali Egipčani, Feničani, Vikingi, Kitajci, Grki, Hindujci in Rimljani. Uporabljali so ga kot zdravilo proti črevesnim težavam, napenjanju, črvom, težavam pri dihanju, težavam s problematično kožo, poškodbam (ranam), proti staranju in še številnim boleznim. Česen se je uporabljal kot zdravilo za celjenje ran tudi med drugo svetovno vojno. Poleg česna so zdravilni tudi česnovi izvlečki (Amagase in sod., 2001).

Česen je imel pomembno vlogo tudi v ljudskem zdravilstvu. Največji pomen pripisuje ljudstvo česnovi tinkturi. Česnova tinktura naj bi zdravila gripo, grižo, tifus in druge nalezljive bolezni (Willfort, 1983). Zgodovinski recepti zagotavljajo, da delujejo proti plešavosti, noricam, turberkulozi, kozam, epilepsiji, koleri, malariji, revmatizmu in ikričavosti. Prav tako naj bi česen preprečeval tudi nekatere bolezni modernega človeka (sladkorna bolezen, rak, ...).

2.6.2 Česen

Česen ima okroglo steblo, ki zraste do višine enega metra. Steblo je popolnoma golo, spodaj je obdano z listnimi nožnicami, zgoraj je navadno 5 dolgih priostrenih listov. Glavičasto socvetje obdaja dolg list. V socvetju je 25 do 30 jajčastih zarodnih brstičkov, med katerimi je nekaj majhnih belkastih cvetov; ti so skoraj vedno jalovi. Česen cvete julija in avgusta, zori pa avgusta in septembra (Willfort, 1983).

Slika 4: Stroki česna

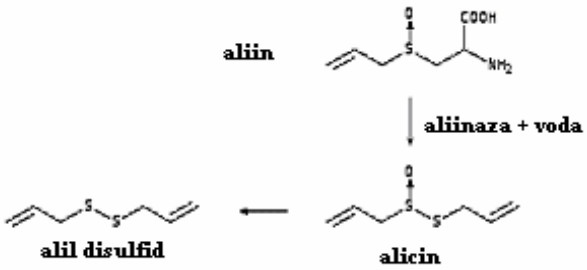
Strok česna (*Allium sativum*) vsebuje veliko vitaminov, mineralov in elementov v sledovih. V merljivih količinah so odkrili selen in germanij, ki naj bi bila odgovorna za protitumorske učinke. Česen vsebuje tudi okoli 0,5% hlapnega eteričnega olja, sestavljenega iz žveplovih spojin (alicin, dialil sulfidi, dialil didisulfidi, dialil tridisulfidi, metilalil trisulfidi, polisulfidi in drugi) (Ankri in Mirelman, 1999).

Preglednica 1: Ključni podatki in lastnosti dialil sulfida (Chemblink Online Informational Database of Chemicals from China)

ime	dialil sulfid (ang. diallyl sulfide)
sinonimi	alil sulfid
molekulska formula	$C_6H_{10}S$
molska masa	114,20 g/mol
vrelišče	138°C
zmrzišče	-83°C

Stroki česna so brez vonja, dokler jih ne ranimo. Raziskave so pokazale, da se substrat aliin in encim aliinaza sprostita na različnih nivojih česnove obrambe proti patogenim

organizmom (Ankri in Mirelman, 1999). Strok česna je sestavljen iz 58-74% vode, 6-7,9% beljakovin, 0,2% maščob, 30,8% ogljikovih hidratov, 0,8-1,5% balastnih snovi in 0,25-1% suhe teže eteričnega olja (Petauer, 1993). V strokih je brezbarvna aminokislina aliin (S-alil-L-cistein sulfoksid), ki je brez vonja in nima nobene farmakološke učinkovitosti. Aliina je v stroku okrog 1%. Aliin se pri nizkih temperaturah naravno akumulira v stroku česna (Amagase in sod., 2001). Prva dve komponenti česna, ki sta bili identificirani sta bili alil merkaptan in dialil sulfid. Ugotovili so, da proizvajata močan vonj (Laakso, 1989, cit. po Amagase in sod., 2001; Amagase in sod., 2001). Pri interakciji med aliinom in aliinazo nastane alicin (diallyl thiosulfinat), ki ustavi napadalca. Encim aliinaza povzroči pretvorbo aliina v 2-propensulfensko kislino, ta pa dimerizira v aktivni alicin (Ankri in Mirelman, 1999). Za aliinazo je značilno, da je zelo aktivna tudi pri nizkih temperaturah (2°C) (Lawson in Hughes, 1992). Glavno antimikrobno komponento česna, alicin, sta prvič omenila Cavallito in Bailey leta 1944. Življenjska doba alicina je zelo kratka, zato je tudi delovanje omejeno samo na mesto poškodbe stroka (Ankri in Mirelman, 1999). Odvisna je od koncentracije, temperature in topila, v katerem je alicin shranjen (Lawson, 1998). Pri nizkih temperaturah se lahko aliin v česnu sam akumulira (Amagase in sod., 2001). Alicin je najbolj stabilen, ko je shranjen pri nizkih temperaturah v topilu, ki vsebuje veliko število vodikovih vezi (Lawson, 1998). Alicin daje zdrobljenemu česnu značilen, neprijeten vonj, hkrati pa mu pripisujejo tudi nekatere farmakološke učinke. Čisti alicin je lahko hlapljiva molekula, ki se slabo meša z vodnimi raztopinami in ima tipične dišave svežega česna. Alicin lahko sintetiziramo z blago oksidacijo dialil disulfida. Ob razpadu alicina in nekaterih drugih žveplovih spojin iz stroka česna nastanejo precej bolj obstojne vodotopne organožveplove spojine, ki jim zaradi dolgoživosti pripisujejo bioaktivno učinkovanje česnovih preparatov v humani in živalski medicini (Ankri in Mirelman, 1999).



Slika 5: Kemijska reakcija ob ranitvi česna (prirejeno po Ankri in Mirelman, 1999)

Česnovi izvlečki delujejo na širok spekter mikroorganizmov (bakterije, glive, praživali, virusi). Česen inhibira rast oziroma razmnoževanje številnih Gram negativnih in Gram pozitivnih bakterij. Ugotovljen je bil tudi sinergističen efekt med alicinom in antibiotiki (streptomicin, kloramfenikol) npr. na rast *Mycobacterium turberculosis* (Harris in sod., 2001).

Alicinu poleg protibakterijskega, protiparazitskega in protiglivnega delovanja pripisujejo tudi znižanje holesterola in nivoja trigliceridov v krvi (Amagase in sod., 2001).

Česnovim izvlečkom pripisujejo tudi močno protiglivno delovanje. Čisti alicin je aktiven že v zelo majhnih koncentracijah in inhibira tako kalitev spor kot tudi rast hif v *in vitro* sistemih (Ankri in Mirelman, 1999), medtem ko njegovo protiglivno delovanje v *in vivo* sistemih do danes še ni dokazano (Shadkchan in sod., 2004).

Protiparazitsko delovanje alicina je že dolgo znano. Alicin v majhnih koncentracijah inhibira rast nekaterih parazitov npr. *Giardia lamblia, Leishmania major, Leptomonas colosoma* idr. (Ankri in Mirelman, 1999).

Sveži česnovi izvlečki, v katerih je alicin glavna aktivna komponenta delujejo protivirusno tako *in vitro* kot *in vivo*. Virusi, ki so občutljivi na delovanje alicina so: *cytamegalovirus*, *influenza B*, *herpes simplex virus tip 1*, *herpes simplex virus tip 2*, *parainfluenza virus tip 3* (Ankri in Mirelman, 1999).

2.6.3 Česnovi preparati

Na trgu se lahko dobi več česnovih preparatov. Največ jih vsebuje česnov prah in česnovo olje. Česnov prah je preparat iz narezanega in suhega česna, ki ga nato zdrobimo in dobimo česnov prah. Česnov prah tvori alicin ob dodatku vode (O'Gara in sod., 2000). Uporablja se v gospodinjstvu. Glavna komponenta surovega česna in česnovega prahu je aliin. Česnov prah vsebuje največ 1% aliina, kar kaže, da se več kot polovica aliina izgubi med dehidracijo. Zmečkan svež česen vsebuje okrog 3,7 mg/g alicina (Lawson in Hughes, 1992, cit po Amagase, 2001; Amagase, 2001). Noben od produktov, ki se na trgu lahko kupijo, ne vsebuje zaznavne količine alicina (manj kot 1 ppm) (Amagase in sod., 2001).

Preglednica 2: Pregled produktov narejenih iz česna, ki se jih dobi na trgu (Amagase in sod., 2001: 958)

Produkt	Glavne sestavine in karakteristike
Osnovno česnovo olje	Samo 1% topljivega olja, ki je žveplova komponenta in 99% rastlinskega olja Ni vodo-topne frakcije Ni alicina Ni dobro standardiziran Ni podatkov o nevarnosti
Izčrpano česnovo olje	Olje, topljiva žveplova substanca in aliin Ni alicina Ni dobro standardiziran Ni podatkov o nevarnosti
Česnov prah	Aliin in nizka vsebnost oljno topljiva žveplova substanca Ni alicina Ni dobro standardizirana Ni podatkov o nevarnosti
Star česnov ekstrakt	Veliko vodno topljivih komponent (npr. SAC, SAMC ali saponini) Majhna vsebnost oljno topljivih žveplovih komponent Veliko blagodejnih učinkov Dobro urejena varnost Zelo dobro raziskan

Česnovo olje je bolj komercialnega pomena. Nastane tako, da se zdrobljene stroke česna segreva na 100 °C, pri tem pa se zbira para kot destilat. Med tem procesom se alicin pretvori v dialil disulfid in ostale sulfide. Česnovo olje je dostopno v razmerju 1:200 skupaj z rastlinskim oljem (O'Gara in sod., 2000). Cel česnov strok, potopljen v vodo, je zaradi toplote destiliran ali ekstrahiran v organsko topilo tako, da doseže oljno frakcijo. Alicin je iz olja popolnoma odstranjen. Česnove kapsule, ki jih lahko kupimo v prosti prodaji vsebujejo rastlinsko olje in majhno vsebnost česnovega esencialnega olja zaradi ostrega vonja (Amagase in sod., 2001).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Bakterijski sevi

Za naš poskus smo izbrali naslednje seve vampnih bakterij: *Prevotella ruminicola* 23^T, *Prevotella bryantii* B_14^T, *Butyrivibrio fibrisolvens* DSMZ 3071^T, *Fibrobacter succinogenes* S85, *Ruminococcus albus* DSMZ 20455 in *Ruminococcus flavefaciens* 007 S/6. Sevi, ki smo jih v poskusu uporabili, so dosegljivi v mednarodnih mikrobioloških zbirkah in dokaj dobro preučeni, znamo jih gojiti *in vitro*, poleg tega imajo v vampu pomembno vlogo. *R. albus* in *B. fibrisolvens* sta pomembna s stališča produkcije H_2, ki je pomemben prekurzor nastanka metana v vampu in sodita tudi med pomembne razgrajevalce polisaharidov rastlinskih celičnih sten v vampu.

Preglednica 3: Splošen pregled bakterijskih sevov uporabljenih v poskusu (Hobson, 1988)

sev	**morfološke značilnosti**	**substrat**	**fermentacijski produkti**
Prevotella ruminicola sev 23^T	G-	sladkor, škrob, pektin, ksilani	glavni: ocetna, jantarna kislina stranski: mravljična, propionska, izomaslena, maslena, izovaleronska, mlečna kislina
Prevotella bryantii sev B_14^T	G-	sladkor, škrob, pektin, ksilani	glavni: mravljična, ocetna, jantarna kislina
Butyrivibrio fibrisolvens sev DSMZ 3071^T	morfološko G- fiziološko G+	sladkor, škrob, hemiceluloze, pektin, celuloza	glavni: mravljična, maslena, ocetna kislina stranski: mlečna, jantarna kislina plini: H_2, CO_2
Fibrobacter succinogenes sev S85	G-	celuloza	glavni: ocetna, jantarna kislina stranski: mravljična, propionska, izovaleronska kislina
Ruminococcus albus sev DSMZ 20455	G+	hemiceluloza, celuloze	glavni: ocetna kislina, etanol stranski: mravljična, mlečna kislina plini: H_2, CO_2
Ruminococcus flavefaciens sev 007 S/6	G+	hemiceluloza, celuloze	glavni: ocetna, jantarna kislina stranski: mravljična, mlečna kislina plini: H_2

Vir sevov *B. fibrisolvens* 3071^T in *R. albus* 20455 je DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen).

P. ruminicola je ena izmed najbolj zastopanih in raziskanih vrst mikroorganizmov v vampu. Raziskave kažejo, da ima *P. ruminicola* veliko vlogo pri izkoriščanju rastlinskih polisaharidov, predvsem ksilanov, pektinov in škroba, poleg tega pa sodeluje tudi pri metabolizmu peptidov in beljakovin (Avguštin in sod., 1997).

Vrsti *P. bryantii* pripisujejo pomembno vlogo v metabolizmu dušika in je v primerjavi z ostalimi manj občutljiva na padec pH (Russel in Rychlik, 2001) in tudi na ionoforne antibiotike kot drugi vampni mikroorganizmi.

Fibrobacter succinogenes in *Ruminococcus flavefaciens* sta predvsem pomembna kot razgrajevalca celuloze v vampu.

3.1.2 Tekoče gojišče M2

V diplomski nalogi uporabljeni bakterijski sevi so striktno anaerobni, zato smo jih gojili po Bryantovi modifikaciji Hungatove tehnike za gojenje anaerobnih mikroorganizmov (Bryant, 1972) v modificiranem anaerobnem gojišču za vampne bakterije (Hobson, 1969). Anaerobe gojimo v gojišču, ki je pripravljeno pod plinom, iz katerega je odstranjen kisik, prečiščen plin pa izpolnjuje tudi zračni prostor posode, v kateri gojimo kulturo.

Pline, ki jih uporabljamo pri Hungatovi anaerobni tehniki, predhodno očistimo primesi kisika in sicer tako, da jih vodimo skozi kolono bakrovih opilkov, ki je segreta na 350°C in smo jo reducirali z vodikom.

Epruvete, ki jih uporabljamo pri Hungatovi tehniki, moramo potrebno primerno zatesniti. Za to so primerni zamaški iz butilne gume, ki ne prepuščajo kisika. Zamaške moramo tudi pritrditi, kajti po gojitvi pogosto nastaja v epruvetah nadtlak. V ta namen uporabljamo aluminijaste ali plastične kapice z navoji. Pri pripravi anaerobnih gojišč moramo zagotoviti čim nižji tlak kisika v gojišču in istočasno zelo nizek redoks potencial. Nizke redoks potenciale lahko dosežemo z vključevanjem reducentnih snovi v gojišče.

Goveji vampni sok smo po odvzetju precedili in ga 30 minut centrifugirali (centrifuga Sorvall®-RC5C, Nemčija) pri 10000 rpm in 15°C. Supernatant smo nato avtoklavirali in ga shranili v hladilniku pri 4°C. V gojišču je kljub centrifugiranju ostalo še nekaj večjih delcev, zato smo pred pripravo M2 tekočega gojišča te delce ponovno odstranili s 30

minutnim centrifugiranjem ter supernatant takoj uporabili za pripravo gojišča. Supernatat je bil po drugem centrifugiranju bister in zato ni motil kasnejših meritev.

Preglednica 4: Sestava M2 gojišča

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_2O**
K_2HPO_4	3,0
mineralna raztopina II	**g/1000ml H_2O**
KH_2PO_4	3,0
$(NH_4)SO_4$	6,0
NaCl	6,0
$MgSO_4 \times 7H_2O$	1,3
$CaCl_2$	0,47

Termostabilne sestavine gojišča smo najprej zatehtali v primerno posodo, dodali vodo in redoks indikator (resazurin). Med kuhanjem oziroma vrenjem se iz gojišča odstranjuje kisik, gojišče se delno reducira. To nam pokaže sprememba barve resazurina iz vijolične (oksidirano gojišče) v rožnato (delno reducirano gojišče). Med in po kuhanju smo gojišče prepihovali s kisika prostim CO_2. Po zavretju smo gojišče odstavili in dodali kemijski reducent cistein, ki ob stalnem prepihavanju z zaščitnim plinom CO_2 še nadalje reducira gojišče. Barva resazurina se je spremenila iz rožnate v brezbarvno. Ta barvna sprememba resazurina je reverzibilna, zato morebitno ponovno rožnato obarvanje gojišča pomeni, da je zaradi poškodovanih zamaškov, nepazljivosti pri delu ali prisotnosti O_2 v CO_2 v gojišče ponovno prišel kisik. Po pripravi smo gojišče ob prepihovanju z zaščitnim plinom razlili v »Hungate« epruvete (Bellco Glass, USA), zatesnili in jih avtoklavirali. Gojišče mora ostati anaerobno, zato smo ga nacepljali tako in bakterijske kulture precepljali samo ob prepihavanju z zaščitnim plinom ter jih zavarovali pred vdorom kisika.

3.1.3 Pufri in raztopine

Preglednica 5: Pregled in sestava pufrov ter raztopin uporabljenih v poskusu

ime	sestava
1 M Na-fosfatni pufer (pH = 6,5)	1 M natrijev hidrogenfosfat (Na_2HPO_4) 1 M natrijev dihidrogenfosfat (NaH_2PO_4) v ustreznem razmerju
Lowry A	5% Na_2CO_3
Lowry B	1% natrijevkalijev (NaK) tartrat + 0,5% bakrov sulfat ($CuSO_4$) x $5H_2O$, pH 7
Folin – Ciocalteu reagent	57,5% voda H_2O 15% litijev sulfat Li_2SO_4 10% Na volfram dihidrat 10% klorovodikova kislina HCl (25%) 85 ut.% H_3PO_4 2,5% Molibdenova kislina Na dihidrat

Preglednica 6: Kalibracijska raztopina št. 3 uporabljena pri plinski kromatografiji za ugotavljanje koncentracije KMK

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

3.2 METODE

3.2.1 Nacepljanje sevov in preverjanje čistosti kultur z barvanjem po Gramu

Bakterijske seve smo hranili v poltrdem agarskem M2 gojišču pri -20°C, ter jih pred začetkom poskusa sterilno in anaerobno precepili v sveža tekoča M2 gojišča v Hungate epruvetah po Bryantovi modifikaciji Hungatove tehnike. Po inkubaciji preko noči smo dobili zrasle kulture, ki so služile kot vir inokuluma za poskus. Med poskusom smo občasno preverjali čistost sevov z barvanjem bakterijskih preparatov po Gramu.

Postopek barvanja po Gramu:

1. bakterijsko kulturo razmažemo po objektnem stekelcu in celice fiksiramo v plamenu,

2. preparat prelijemo s kristal vijoličnim barvilom, počakamo 1 minuto in nato speremo z rahlim curkom vode,

3. preparat polijemo z lugolovo raztopino, ga speremo in ponovno prelijemo z lugolovo raztopino za 1 minuto, speremo pod rahlim curkom vode,

4. razbarvamo z mešanico 90% etanola in 10% acetona in speremo z vodovodno vodo,

5. na koncu razmaz obarvamo s safraninom in speremo z vodovodno vodo ter posušimo.

Posamezne kulture, ki smo jih uporabili v nadaljevanju poskusa, smo ohranili s precepljanjem. Zrasle kulture smo precepljali v tekoče in poltrdo (sloppy) gojišče. Precepljali smo s cepilnimi zankami (po dve cepilni zanki v tekoče oz. trdo gojišče).

Nacepljene kulture smo inkubirali pri 37°C preko noči. Naslednji dan smo poltrda gojišča v katerih smo s prostim očesom opazovali rast shranili pri –20°C.

3.2.2 Sterilizacija in dodajanje česnovih izvlečkov v gojišče

Pred začetkom poskusa smo preverili ali je dialil sulfid (Acros Organics, 97% allyl sulfide, kataloška številka 592-88-1, 25 ml), aktivna komponenta česnovega izvlečka, ki smo jo testirali, sterilen. Dialil sulfid (10 µl) smo dodali v sterilno tekoče M2 gojišče ter spremljali motnost z merjenjem optične gostote tekoče kulture oz. gojišča. Po čeznočni inkubaciji na 37°C je gojišče postalo motno, zato smo sklepali, da dialil sulfid ni sterilen, kar smo dokazali tudi z mikroskopskim pregledom po Gramu barvanega preparata, videli smo G+ koke. Izvlečki so toplotno nestabilni, zato jih ne moremo sterilizirati z avtoklaviranjem. Dialil sulfid smo zato sterilizirali s filtracijo skozi 0,22 µm membranski filter (Millipore®, Irska). Sterilnost filtrata smo ponovno preverili z inokulacijo v tekoče M2 gojišče in ker ni prišlo do porasta optične gostote, smo filtrat uporabili v poskusu.

Sterilen dialil sulfid smo v anaerobni komori dodali transfuzijskim steklenicam, v katerih je bilo po 140 ml gojišča M2. Dialil sulfid smo dodali v dveh koncentracijah in sicer smo v prvo transfuzijsko steklenico dodali neredčen izvleček (t.j. 9 mM), v drugo pa 10-kratno

redčitev izvlečka (t.j. 0,9 mM). Vsebino transfuzijske steklenice smo enakomerno premešali, da se je izvleček enakomerno porazdelil po gojišču.

M2 gojišča, ki smo jim dodali česnov izvleček smo razdelili v »Hungate« epruvete. V paralelkah smo dodajali v vsako epruveto po 8 ml vsebine. Epruvete, ki so vsebovale gojišče z izvlečkom, smo nacepili s 100 µl zrasle kulture izbranega bakterijskega seva. Nacepljene »Hungate« epruvete smo inkubirali pri 37°C.

V drugem delu poskusa smo proučevali le seva *R. albus* DSMZ 20455 in *R. flavefaciens* 007 S/6. Dialil sulfid smo dodali v treh različnih koncentracijah: 27 mM, 81 mM in 135 mM.

3.2.3 Ugotavljanje rasti bakterijskih kultur s spektrofotometričnim merjenjem motnosti

Rast sevov smo najprej ugotavljali z merjenjem optične gostote. Optično gostoto posameznih kultur smo merili s spektrofotometrom (Novaspec® II, Švedska) in sicer pri valovni dolžini 654 nm. Optično gostoto smo merili dvakrat in sicer za pripravo rastnih krivulj v predposkusu ter za ugotavljanje vplivov česnovega izvlečka na rast v samem poskusu. Faze rasti smo časovno razdelili na štiri dele, t.j. začetek, sredina in konec logaritemske faze rasti in pozna stacionarna faza, ki smo jih določili glede na naraščanje vrednosti OD. Ob določenem času smo vzeli vzorec iz inkubatorja in izmerili vrednost OD. Najprej smo spektrofotometer umerili s sterilnim gojiščem, katerega vrednost OD smo nato odštevali od vrednosti OD tekočih bakterijskih kultur. Slepi vzorec nam je služil kot pokazatelj rasti oz. stagnacije rasti kultur. Višja absorbanca pomeni gostejšo kulturo t.j. intenzivnejšo rast mikroorganizmov. Zelo pomembno je, da je slepi vzorec iz iste serije kot ostali vzorci. Vsak vzorec smo pred merjenjem optične gostote premešali. Pred meritvami smo vzorce hranili v inkubatorju pri 37°C.

Absorbanca je odvisna od koncentracije raztopine, dolžine poti žarka skozi njo in molskega absorpcijskega koeficienta spojine.

$\log I_0/I = \varepsilon * C * l = A$

A absorbanca raztopine
I_0 intenziteta vpadne svetlobe
I intenziteta prepuščene svetlobe
C koncentracije v mol/l
l dolžina poti žarka v cm
ε molski absorpcijski koeficient spojine (l/mol cm ali cm^2/mol)

3.2.4 Merjenje pH vrednosti kultur

Rast proučevanih bakterijskih sevov smo merili tudi z ugotavljanjem vrednosti pH v gojišču. Ugotoviti smo hoteli ali dialil sulfid vpliva inhibitorno na rast mikroorganizmov v vampu in se to odraža tudi na spremembi vrednosti pH v gojišču. Kulture v Hungate epruvetah smo centrifugirali (Janetzki® TM23, Nemčija) 30 minut pri 3000 obratih/min in sobni temperaturi (25°C). Tako smo ločili tekočo fazo (supernatant) in celice (usedlina). Vrednosti pH smo merili s pH elektrodo (Orion® 520A, ZDA) v supernatantih (iz ene od obeh paralelk), ki smo jih dobili po centrifugiranju tekočih kultur.

3.2.5 Ugotavljanje koncentracije celičnih beljakovin po Lowryjevi metodi

Koncentracijo celičnih beljakovin lahko ugotavljamo z Lowryjevo metodo (Lowry in sod., 1951). Koncentracijo beljakovin smo ugotavljali v odmrznjenih celičnih peletih. Pelet smo resuspendirali v 1 ml 50 mM Na-fosfatnega pufra (pH 6,5) nato smo suspenzijo prelili iz epruvet v minicentrifugirke in le-te ponovno centrifugirali (Hettich® Mikro 200R, Nemčija) 10 min pri 12000 g in 4°C. Sprane pelete smo hranili v zmrzovalniku pri –20°C do uporabe.

Umeritveno krivuljo smo pripravili s standardnimi koncentracijami proteina BSA (goveji serumski albumin): 0.40, 0.32, 0.24, 0.16, 0.08 in 0.00 mg/ml. Celične pelete smo najprej odmrznili, jih resuspendirali v 1ml 50 mM Na-fosfatnega pufra in jih centrifugirali 30 min pri 3000 obratih/min. Supernatant smo odlili in pelete ponovno resuspendirali v 1ml 50 mM Na-fosfatnega pufra. Vzorce smo redčili 20-krat oz. 100-krat. V dve paralelki smo v mikrocentrifugirke odpipetirali po 40 µl redčenih koncentracij vzorca oziroma standardnih koncentracij BSA. Dodali smo 40 µl 1M NaOH ter vzorce premešali na vrtinčnem mešalu. Vzorce smo inkubirali 5 min pri 100°C in po alkalni hidrolizi vzorce ohladili na sobno

temperaturo (15 min). Dodali smo 80 µl biuretnega reagenta (mešanica reagentov Lowry A:Lowry B v razmerju 50:1) ter med mešanjem pri majhni hitrosti na vrtinčnem mešalu dodali še 16 µl Folin Ciocalteujevega reagenta mešanega z destilirano vodo v razmerju 1:1. Na sobni temperaturi smo vzorce inkubirali 10 min, da je prišlo do razvoja barve. Intenziteta barve je odvisna od koncentracije beljakovin v vzorcu.

Iz mikrocentrifugirk smo z multikanalno pipeto prenesli vzorce in standarde na mikrotitrsko ploščo. Absorbanco smo izmerili s spektrofotometrom (ELX 808 Bio Tek instruments, ZDA) pri 650 nm.

3.2.6 Etrska ekstrakcija kratkoverižnih maščobnih kislin (KMK)

Iz vsake testne kulture smo pri zadnji meritvi (četrti) optične gostote odvzeli 1 ml vzorca, ki smo ga uporabili za etrsko ekstrakcijo kratkoverižnih maščobnih kislin. Vsebnost kratkoverižnih maščobnih kislin smo ugotovljali s plinskim kromatografom (5890A, Hewlett Packard®, ZDA). Preostanek kulture (~7 ml) smo uporabili za meritev pH ter pripravo peleta in ugotavljanje celičnih beljakovin po Lowryju.

Za ekstrakcijo KMK smo potrebovali 1 ml vzorca. V »Hachove« epruvete smo dodali 0,4 g suhega NaCl, ki nase veže vodo, in dodali 1ml vzorca ter epruveto zaprli. S tem smo preprečili izhlapevanje KMK iz vzorca. Istočasno smo ekstrahirali standardno mešanico KMK. Vzorcem in standardni mešanici KMK smo dodali 100 µl internega standarda (krotonska kislina s koncentracijo 1g/100ml). Vzorce smo zakisali z 200 µl 50% H_2SO_4 in s stekleno Pasterjevo pipeto dodali 1 ml etra (dietileter; Merck®, Nemčija). Nato smo epruvete zaprli in jih 20 - krat premešali. Po stresanju smo epruvete centrifugirali (Janetzki® TM23, Nemčija) pri 2000 rpm pri sobni temperaturi. Med centrifugiranjem sta se ločili, in sicer zgornja eterska in spodnja vodna faza. Etrsko fazo ekstrakta smo s Pasteurjevo pipeto prenesli v novo »Hach« epruveto.

V prvo epruveto smo k preostali vodni fazi ponovno dodali 1 ml etra in ponovili ekstrakcijo. Po centrifugiranju smo s Pasteurjevo pipeto spet pobrali zgornjo etrsko fazo in jo združili s prvo. V vsako epruveto z etrsko fazo smo dodali dve mali spatuli $CaCl_2$

granulata, ki nase veže vodo in jih dobro zaprli. Analizirali smo jih s plinskim kromatografom oziroma smo jih shranili do analize pri –20°C.

3.2.7 Plinska kromatografija KMK in vodika

S plinsko kromatografijo smo ugotavljali vrsto in stopnjo mikrobne produkcije KMK ter plinskih produktov nastalih pri fermentaciji.

Hlapne maščobne kisline smo analizirali na plinskem kromatografu (5890A, Hewlett Packard®, ZDA) s kapilarno kolono (NUKOL, FUSED SILICA Capillary Column, 30m∗0,25 mm∗0,25 μm), ki je bila polnjena s polnilom POROPACK Q in plamensko ionizacijskim detektorjem (FID). Detektor plinskega kromatografa smo na začetku kalibrirali s kalibracijsko raztopino v kateri so znane količine kratkoverižnih maščobnih kislin (preglednica 6). Plinski kromatograf ima dve fazi in sicer mobilno fazo (plin, zajet neposredno iz plinskega dela vzorca) in stacionarno fazo (nameščena je na votli koloni). Mobilna faza se glede na stik s stacionarno fazo pomika skozi sistem s pomočjo kapilarnega vleka, gravitacijske sile ali pa nadtlaka. Nosilni plini imajo različno termično prevodnost in zato tudi različne čase (retenzijski čas) zadrževanja v koloni, preko katerih se prepozna plin. Isti plini imajo pri enakih pogojih vedno isti retenzijski čas.

V kromatograf s FID detektorjem (flame ionization detector) smo injicirali 1 μl etrskega ekstrakta iz »Hachovih« epruvet. Kapilarna kolona FID detektorja je bila prazna, nosilni plin pa argon. Temperatura injektorja je bila 185°C, analiza pa je potekala po sledečem temperaturnem programu: začetna temperatura kolone 75°C, vzorec se je tu zadrževal 3 min 30 sek, nakar je sledil dvig temperature za 14°C/min. Končna temperatura kolone, kjer se je vzorec zadrževal 3 min, je bila 160°C. Temperatura detektorja je bila 290°C.

Plinsko kromatografijo plinov smo izvajali samo za kulture *B. fibrisolvens* DSMZ 3071^T in *R. albus* DSMZ 20455. Po zadnji meritvi optične gostote smo izmerili prisotnost plinov v plinskem delu vzorca s plinskim kromatografom (GC 14-A, Shimadzu®, Japonska) s TCD detektorjem (thermal conductivity detector), ki je bil segret na 80°C. Plin smo odvzeli s plinotesno injekcijsko brizgo direktno skozi zamašek iz Hungate epruvete. Pred začetkom plinske kromatografije smo kromatograf umerili s standardno mešanico plinov (H_2 14,92 vol.%, N_2 20,29 vol.%, CH_4 20,12 vol.% in CO_2 44,67 vol.%). Pri obeh sevih nas je

zanimala produkcija vodika oz. vpliv dialil sulfida na stopnjo produkcije, kar je pomembno s stališča vplivanja na produkcijo metana v vampu.

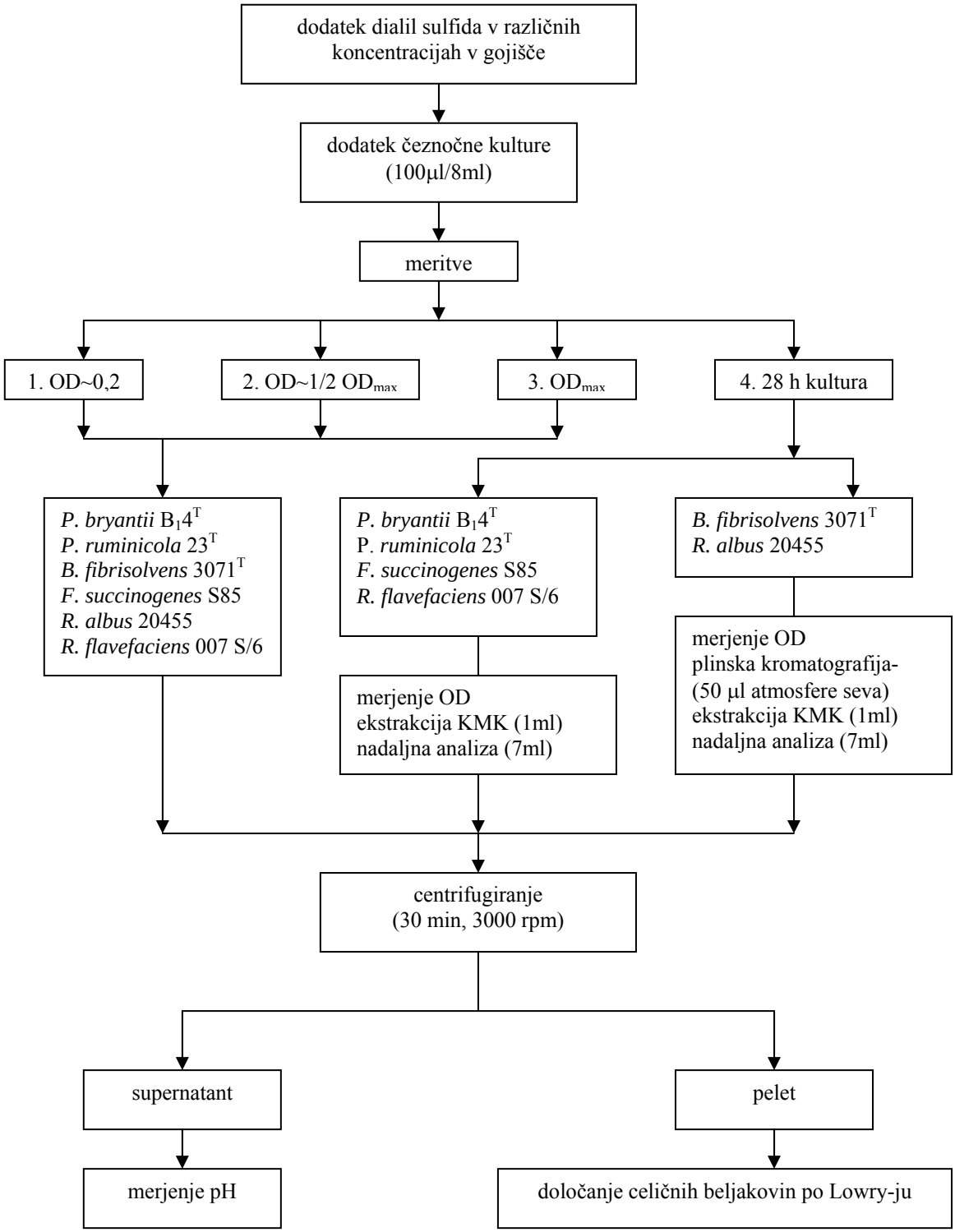
3.2.8 Statistična obdelava rezultatov s Studentovim t-testom

Rezultate plinske kromatografije (za ugotavljanje KMK in za ugotavljanje H_2) smo statistično ovrednotili s Studentovim t-testom in 95% stopnjo zaupanja oz. 5% dvostranskim tveganjem ($\alpha = 5\%$ oz. $p = 0,05$).

Studentov t-test uporabljamo za statistično ovrednotenje razlik (t.j. s 95% zaupanjem poda sklep, da je razlika statistično značilna oz. neznačilna) med dvema povprečjema (v našem primeru med povprečjema paralelk vzorca z dodanim dialil sulfidom in povprečjem paralelk kontrolnega vzorca za posamezen sev) glede na to, kakšna je variabilnost samih vrednosti oz. podatkov. t - porazdelitev je verjetnostna porazdelitev za manjše vzorce in je modifikacija standardizirane normalne porazdelitve. t - porazdelitev ni porazdelitev rezultatov v majhnem vzorcu in tudi ni porazdelitev aritmetičnih sredin ali porazdelitev razlik med aritmetičnimi sredinami majhnih vzorcev okrog prave aritmetične sredine, ker je le-ta porazdelitev normalna. Test se uporablja v primeru, ko imamo v poskusu malo vzorcev t.j. majhno število paralelk v poskusu (n_1… število paralelk prvega vzorca (v našem primeru vzorca z dialil sulfidom) in n_2… število paralelk drugega vzorca (v našem primeru kontrolnega vzorca) ter velja $n_1 + n_2 < 30$. V našem primeru smo imeli dve paralelki z dialil sulfidom in dve paralelki kontrolnega vzorca, skupaj 4 vzorce. Iz tabele parcentilnih vrednosti za Studentovo t – porazdelitev z n stopinjami prostosti odčitamo t - vrednost, ki določi meje, pri katerih razlika med povprečjema postane statistično značilna. V našem primeru smo imeli $n_1 + n_2 – 2 = 2$ stopinj prostosti (od $n_1 + n_2$ odštejemo vrednost 2, ker gre za vzorčni porazdelitvi), zato pri 5% tveganju iz tabele odčitamo t - vrednost ± 4,30. Če je s Studentovim testom izračunana t - vrednost večja od t - vrednosti iz tabele, potem lahko podamo sklep, da sta povprečji dveh vzorcev statistično značilno različni.

Značilnosti t – funkcije so (i), da je zvezna, simetrična okrog $t = 0$, definirana za $-\infty < t < \infty$, (ii) povsem je določena s stopinjami prostosti (r), (iii) je nekoliko bolj sploščena kot standardizirana normalna porazdelitev in (iv) ko gre $r \rightarrow \infty$, se t - porazdelitev približuje normalni porazdelitvi.

3.2.9 Shema eksperimenta

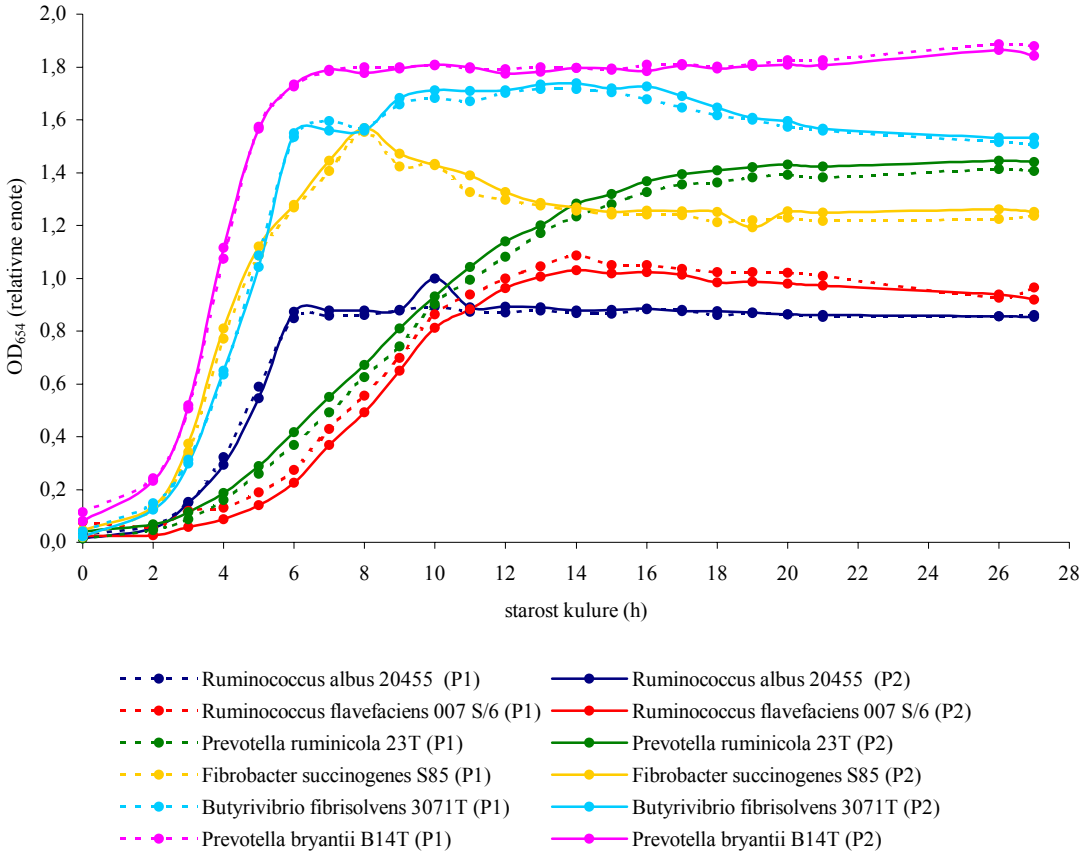


Slika 6: Shema eksperimenta

4 REZULTATI

4.1 GOJENJE ČISTIH BAKTERIJSKIH KULTUR ZA UMERITEV RASTNIH KRIVULJ

Rastno krivuljo smo pripravili na osnovi meritev motnosti gojišča (OD_{654}) in vseh šestih preučevanih sevov. Seve smo nacepili v M2 gojišče (brez izvlečka). Rastne krivulje smo izkoristili za določitev začetka, sredine in konca eksponentne faze rasti posameznega seva, da smo lahko izbrali čase vzorčenja v poskusu.



Slika 7: Rastne krivulje sevov

Slika 7 prikazuje rast šestih izbranih sevov v dveh paralelkah. Med lag fazo, ki je pri večini trajala od 1 – 3 ure, se celice prilagajajo na novo okolje. Ko so celice prilagojene na novo okolje, začnejo rasti in se deliti pri tem pa določajo hitrost rasti rastne razmere.

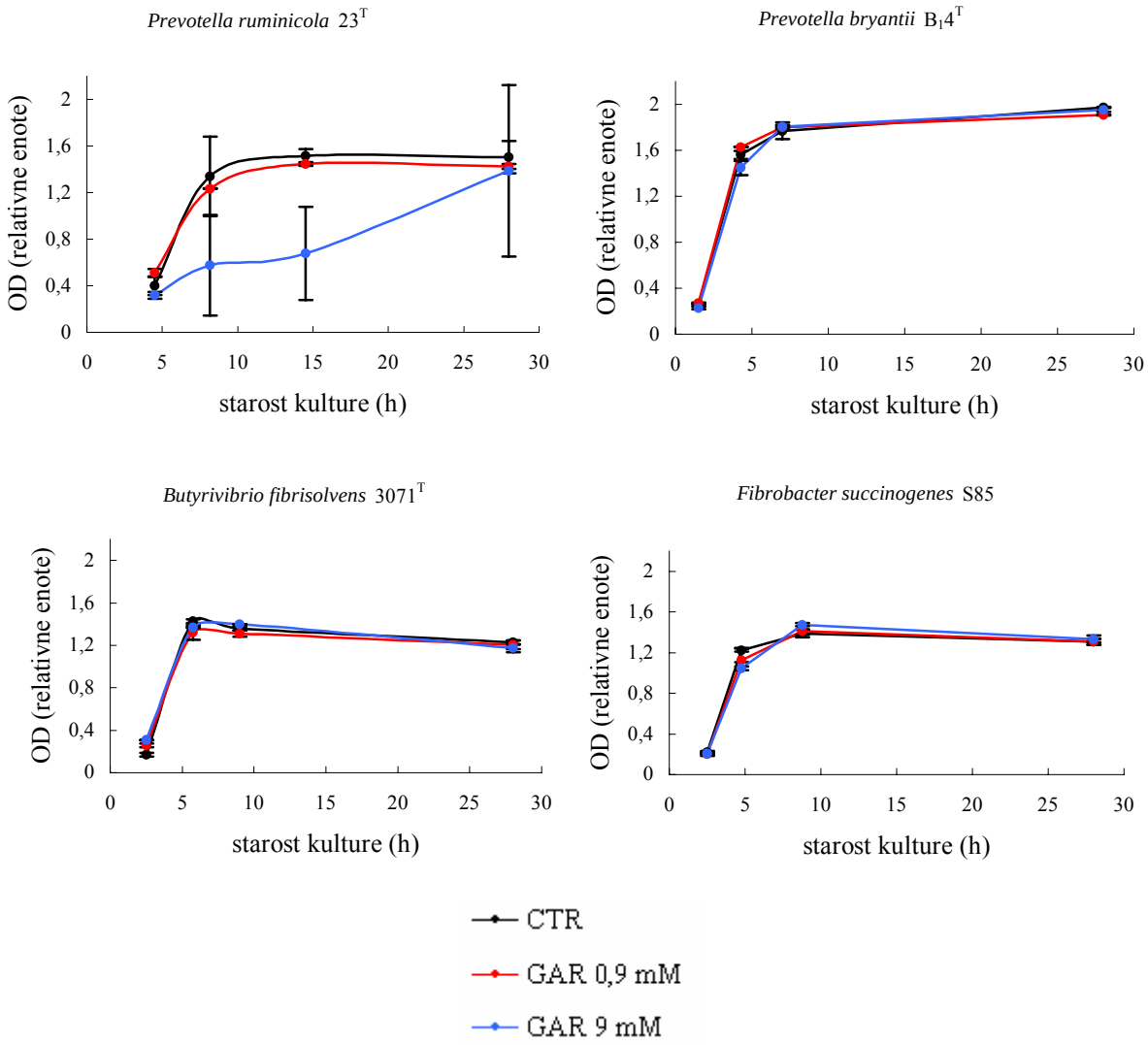
Eksponencialna rast je uravnotežena rast pri kateri prihaja do podvajanja s konstantno hitrostjo. V stacionarni fazi se hitrost rasti celic upočasni. Na sliki 7 vidimo, da so paralelke istih sevov med seboj primerljive. Odločili smo se, da bomo dejanske poskuse izvajali s po dvema sevoma istočasno in sicer s tistima dvema, ki sta si najbolj podobna v hitrosti in po obsegu rasti (*P. ruminicola* 23^T in *P. bryantii* B_14^T, *R. flavefaciens* 007 S/6 in *R. albus* DSMZ 20455, *F. succinogenes* S85 ter in *B. fibrisolvens* DSMZ 3071^T).

Za najhitreje rastoč sev se je izkazal sev *P. bryantii* B_14^T, dosegel pa je tudi najvišji OD_{654} (1,89) med vsemi sevi. Podobno hitro rast smo zabeležili še pri sevih *B. fibrisolvens* DSMZ 3071^T, *R. albus* DSMZ 20455 in *F. succinogenes* S85. Hitro rastoči sevi so eksponentno fazo celične rasti zaključili v 6 do 8 urah po inokulaciji v tekoče M2 gojišče. Iz slike 7 se vidi, da so vsi sevi po inokulaciji potrebovali približno dve uri za adaptacijo na rastne razmere v gojišču. Preostala seva (*P. ruminicola* 23^T in *R. flavefaciens* 007 S/6) sta rastla počasneje, poleg tega sta za prehod v stacionarno fazo potrebovala več časa. Po 28 urah so bili vsi sevi v stacionarni fazi rasti, kar je razvidno iz krivulj (slika 7), zato smo četrto meritev naredili takrat.

4.2 RAST IZBRANIH BAKTERIJSKIH SEVOV V GOJIŠČIH Z IN BREZ DIALIL SULFIDA

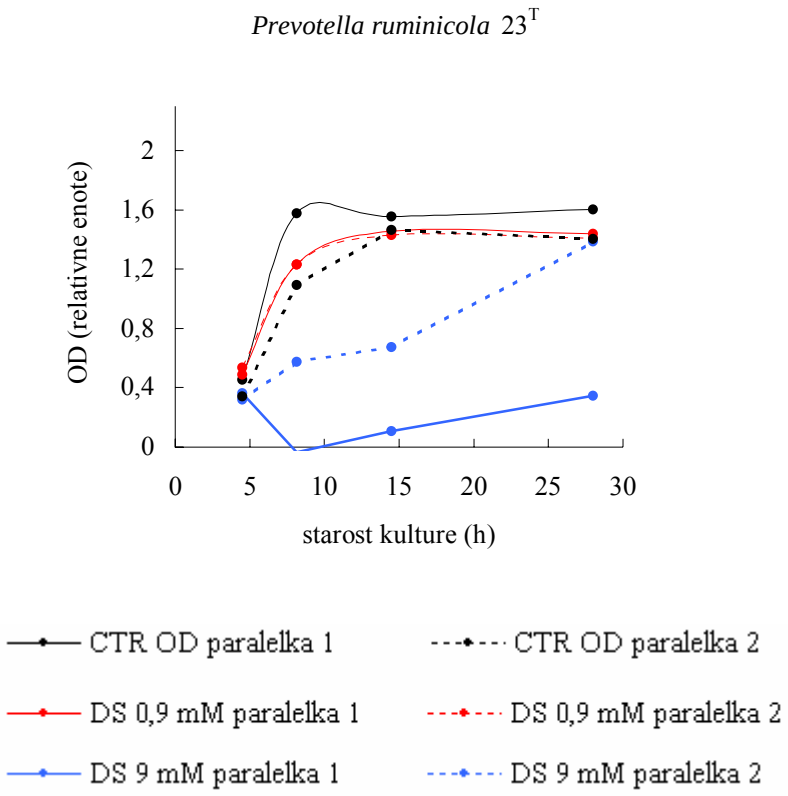
4.2.1 Merjenje optične gostote in spremljanje rasti preučevanih bakterij

V gojišči smo v prvem delu poskusa, ko smo preučevali rast obeh prevotel, *B. fibrisolvens* in *F. succinogenes*, dodali dve koncentraciji dialil sulfida (0,9 mM in 9 mM) in ju primerjali s kontrolo (brez dodanega izvlečka v gojišču). Grafikoni (slika 8) prikazujejo meritve optične gostote bakterijskih kultur v dveh paralelkah in gojiščih z ali brez dialil sulfida. Prikazani so tudi standardni odkloni med paralelkami.



Slika 8: Rast (OD_{654}) v odvisnosti od časa za seve *P. ruminicola* 23^T, *P. bryantii* B_14^T, *B. fibrisolvens* DSMZ 3071^T in *F. succinogenes* S85 pri dveh koncentracijah dialil sulfida

Iz grafov (slika 8) je razvidno, da tako višja kot nižja koncentracija dialil sulfida ne inhibirata rasti preučevanih sevov z izjemo seva *P. ruminicola* 23^T. Izmerjene vrednosti OD se pri vzorcih z dialil sulfidom v nobeni od štirih točk, v katerih smo opravljali vzorčenje in meritve praktično ne razlikujejo od kontrolnih vzorcev.

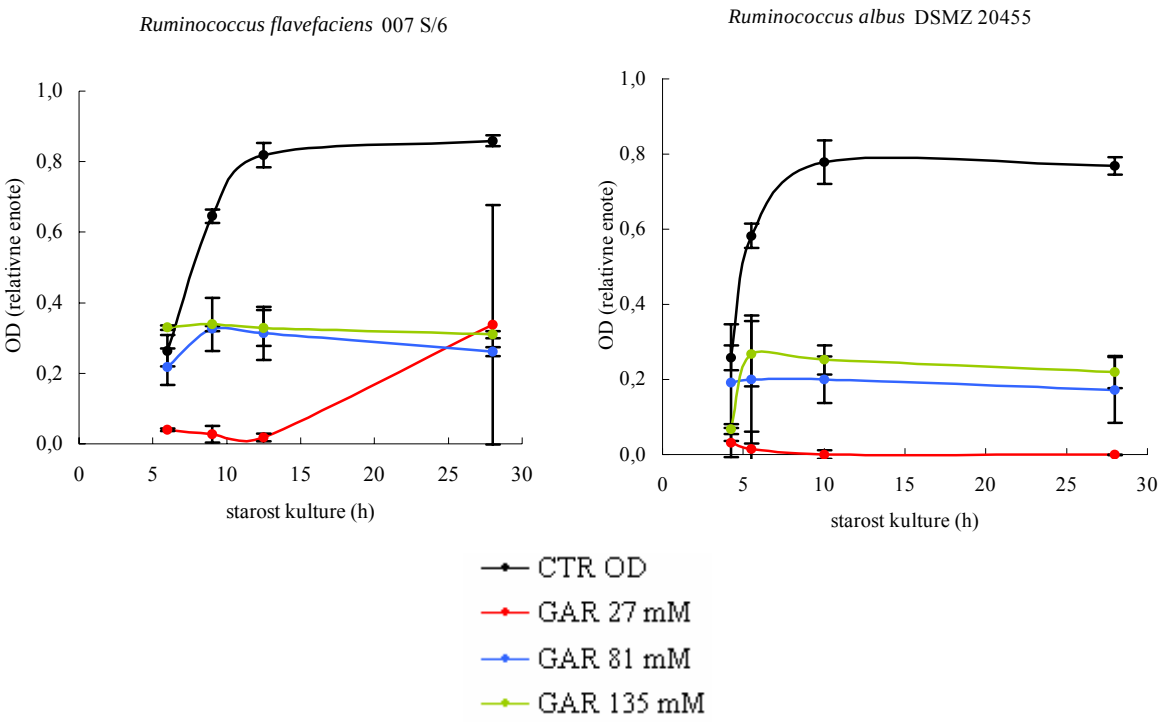


Slika 9: Rast (OD_{654}) v odvisnosti od časa za sev *P. ruminicola* 23^T za obe paralelki pri dveh koncentracijah dialil sulfida

Dialil sulfid v višji koncentraciji (9 mM) pa je inhibitorno vplival na celično rast seva *P. ruminicola* 23^T, kjer smo opazili tudi nenavadno veliko razliko med obema paralelkama (slika 8). Zato smo v sliki 9 prikazali rezultate merjenja vrednosti OD pri sevu *P. ruminicola* 23^T za vsako paralelko posebej. Ugotovili smo, da se je rast v obeh paralelkah začela kasneje kot v kontrolnem vzorcu in da je potekala počasneje. V eni paralelki je v času zadnje meritve, t.j. po 28. urah kultura dosegla skoraj enako vrednost OD kot kontrola oz. kultura z nižjo koncentracijo dialil sulfida (0,9 mM). Druga paralelka je šele ob zadnji meritvi dosegla vrednost OD okrog 0,348.

Na podlagi opažanj pri spremljanju rasti prvih štirih preučevanih bakterijskih sevov in rezultatov preluminarnih poskusov z obema ruminokokoma smo se odločili, da pri zadnjih dveh, t.j. *R. flavefaciens* 007 S/6 in *R. albus* DSMZ 20455 spremenimo koncentracijo dodanega dialil sulfida. Pri teh dveh sevih smo testirali tri višje koncentracije dialil sulfida in sicer 27 mM, 81 mM in 135 mM. Rezultati merjenja rasti sevov v gojišču s tremi

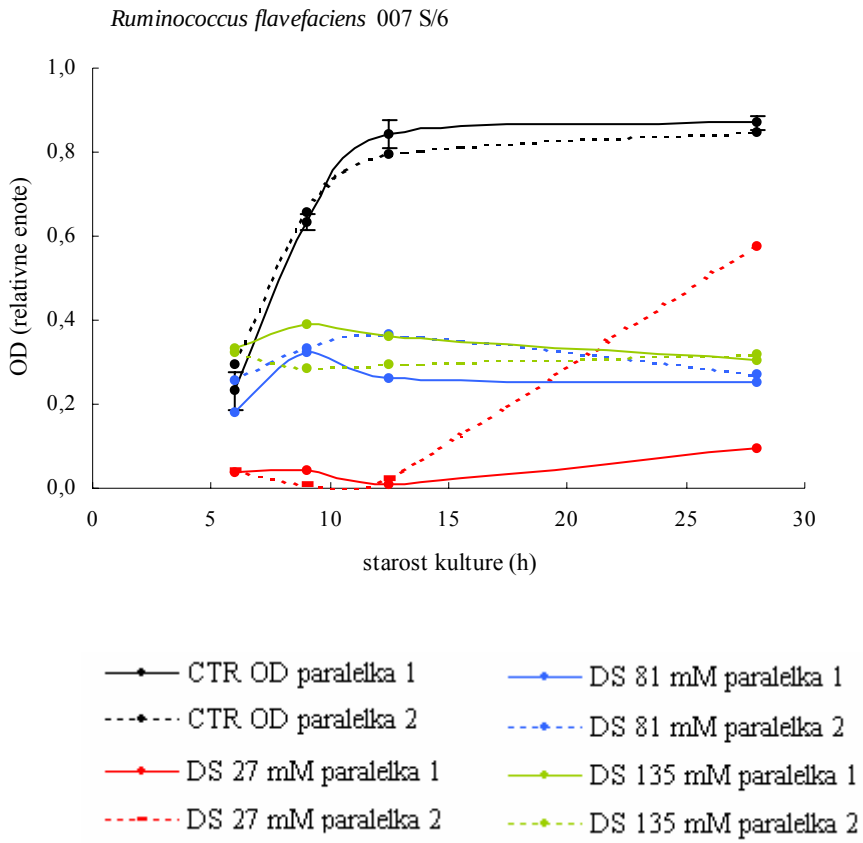
različnimi koncentracijami in standardnimi odkloni paralelk so prikazani na spodnjih grafikonih (slika 10).



Slika 10: Rast (OD_{654}) v odvisnosti od časa za seva *R. flavefaciens* 007 S/6 in *R. albus* DSMZ 20455 pri treh višjih koncentracijah dialil sulfida

Ugotovili smo, da je motnost gojišča s povišanimi koncentracijami dialil sulfida precejšnja, kar kažejo tudi rezultati prvih meritev v zgodnji eksponentni fazi rasti. Pri kulturi, ki je rastla brez dialil sulfida (kontrola) je bila izmerjena vrednost OD v točki 1, torej po 6 urah rasti, 0,2 (relativna enota), kar že odraža začetno rast. Pri kulturi s koncentracijo 27 mM dialil sulfida je bila vrednost OD blizu 0, torej blizu vrednosti OD sterilnega M2 gojišča, kar kaže, da se rast še ni pričela. Ostali dve kulturi sta imeli povišano absorbanco, najverjetneje zaradi povečane koncentracije dialil sulfida, ki je sam povzročil motnost gojišča. V kulturah s tema koncentracijema dialil sulfida se kasneje vrednost OD ni več spreminjala. Z meritvami optične gostote smo lahko ugotovili, da vse tri koncentracije dialil sulfida delujejo inhibitorno na rast seva *R. flavefaciens* 007 S/6 in *R. albus* DSMZ 20455. Dialil sulfid je v koncentracijah 81 mM in 135 mM popolnoma inhibiral rast obeh sevov. Koncentracija 27 mM deluje inhibitorno na sev *R. albus* DSMZ 20455, pri sevu *R. flavefaciens* 007 S/6 pa je zavrla rast le do 13. ure inkubacije. Po približno 13. urah se je

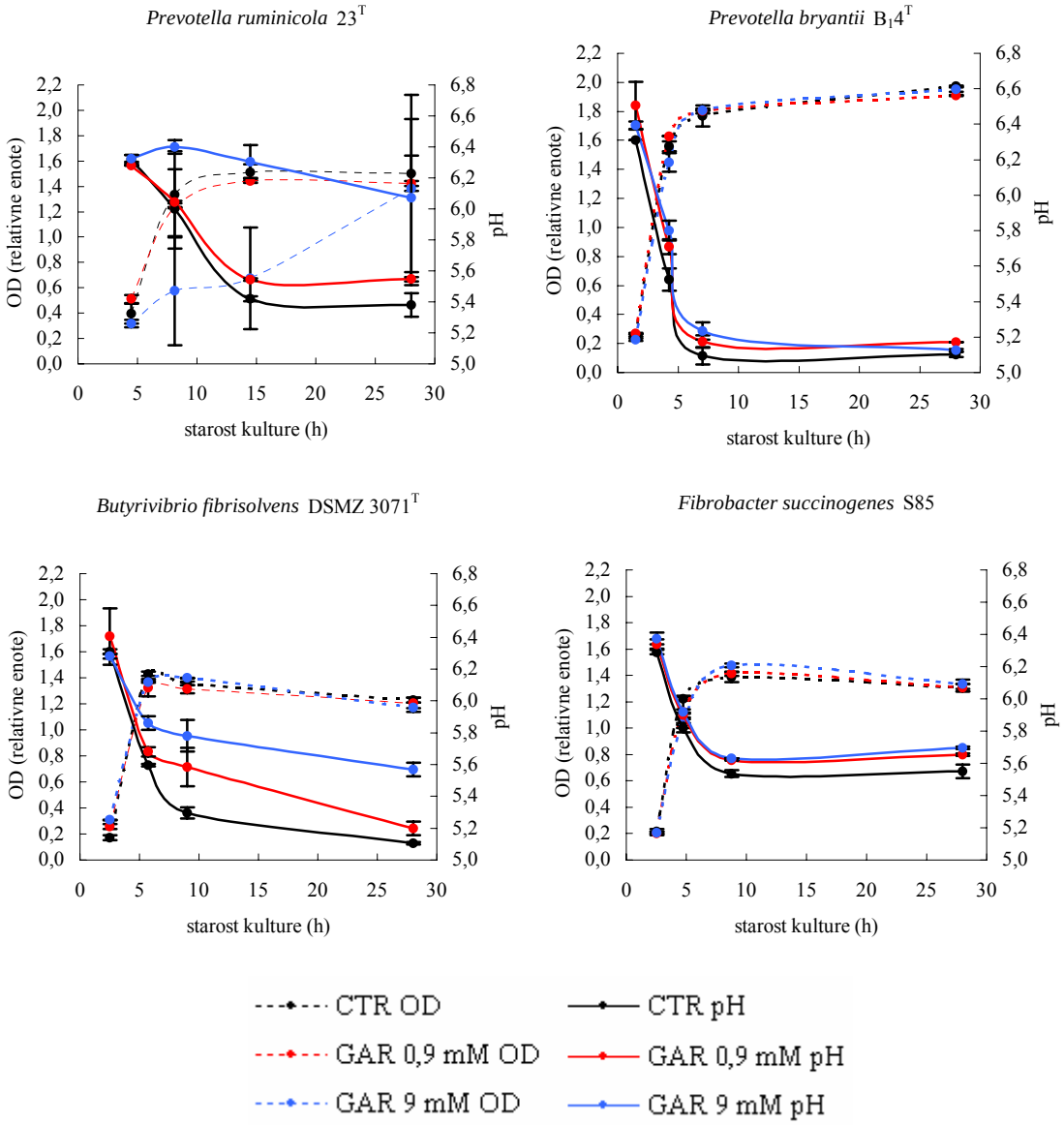
celična rast pričela in eksponentna faza rasti je potekala do zadnje meritve t.j. do 28 urne inkubacije. Če bi hoteli ugotoviti kdaj nastopi stacionarna faza, bi morali kulturo opazovati več časa. Hitrost rasti je bila v primerjavi z rastjo v kontrolnem gojišču močno upočasnjena. Tudi v tem primeru smo opazili velike razlike med paralelkama in ju zato prikazali na sliki 11. Zgoraj zapisana ugotovitev velja za obe paralelki, hitrost rasti obeh paralelk pa se je močno razlikovala, a bila v obeh primerih nižja kot v kontrolnem gojišču.



Slika 11: Rast (OD_{654}) v odvisnosti od časa za sev *R. flavefaciens* 007 S/6 za obe paralelki pri treh koncentracijah dialil sulfida

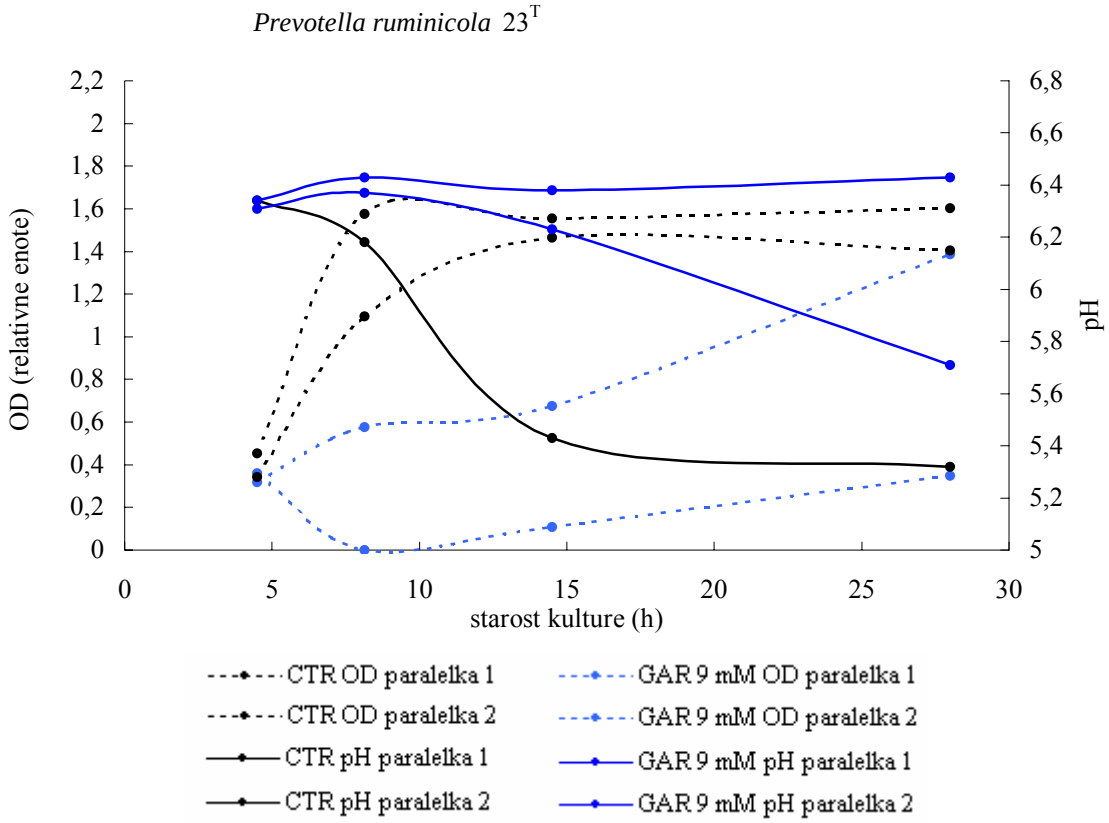
4.2.2 Merjenje pH

Pri vseh sevih smo ob mikrobni rasti zaznali padec vrednosti pH v gojišču. Padec vrednosti pH pri preučevanih bakterijah običajno povzroči produkcija maščobnih kislin. Rezultati meritev pH so prikazani na spodnjih grafikonih (slika 12).



Slika 12: pH in rast (OD_{654}) v odvisnosti od časa za seve *P. ruminicola* 23^T, *P. bryantii* B_14^T, *B. fibrisolvens* DSMZ 3071^T in *F. succinogenes* S85 pri dveh koncentracijah dialil sulfida

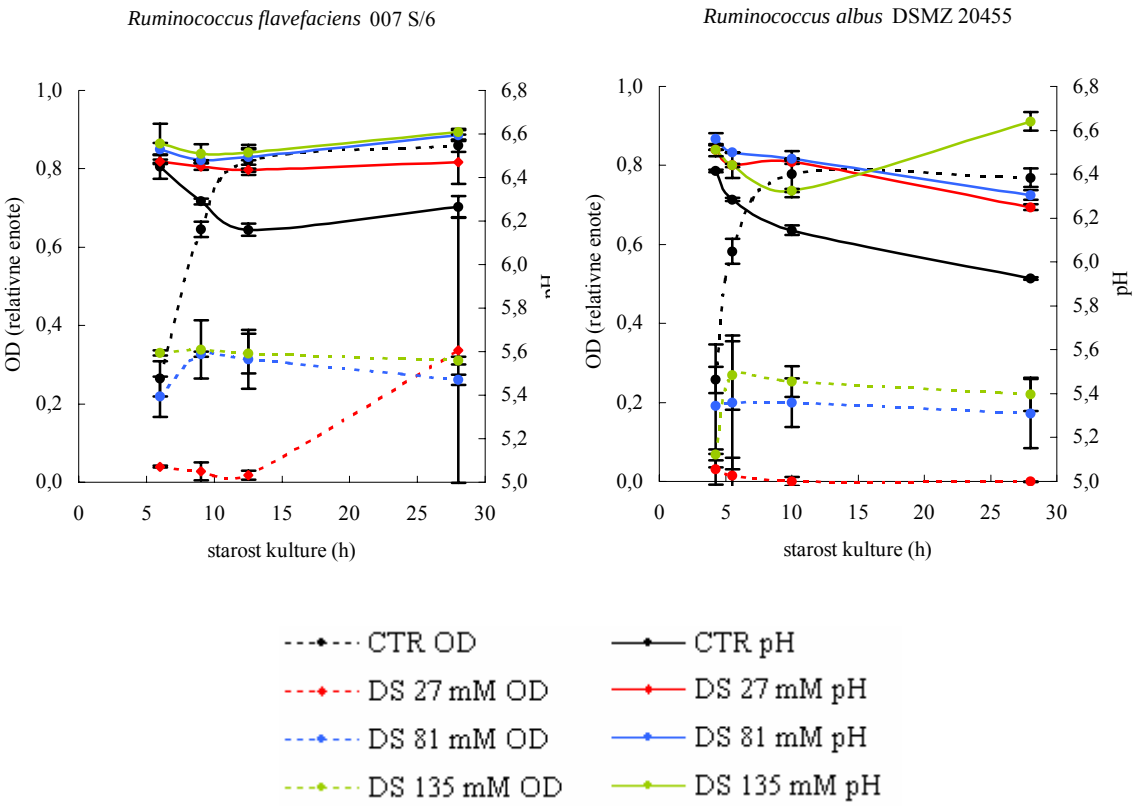
Medtem ko smo pri sevih *P. bryantii* B_14^T in *F. succinogens* S85 opazili pričakovan vpliv prisotnosti dialil sulfida na rast in posledično na spremembo vrednosti pH, ki se je v celoti ujemal s spremembo motnosti gojišča, je bilo v primeru sevov *B. fibrisolvens* DSMZ 3071^T drugače. Uporabljene koncentracije dialil sulfida pri *B. fibrisolvens* DSMZ 3071^T niso vplivale na spremembo rasti, ko smo jo opazovali z meritvami motnosti gojišča, je pa bila sprememba vrednosti pH manjša kot pri rasti v kontrolnem gojišču, kar nakazuje bodisi manjšo rast bodisi spremembo v metabolizmu, ki se je premaknil v smer nastanka bolj nevtralnih produktov.



Slika 13: pH in rast (OD_{654}) v odvisnosti od časa za sev *P. ruminicola* 23^T pri dveh koncentracijah dialil sulfida in dveh paralelkah

V primeru seva *P. ruminicola* 23^T nižja koncentracija dialil sulfida ni vplivala na rast in je bil posledično padec vrednosti pH ob koncu rasti primerljiv s tistim po rasti v kontrolnem gojišču (slika 12). Ker smo po rasti v gojišču z višjo koncentracijo dialil sulfida opazili velike razlike med paralelkama tudi pri rezultatih merjenja vrednosti pH, smo le-te posebej prikazali na sliki 13. V prisotnosti višje koncentracije dialil sulfida se vrednost pH sprva ni bistveno spremenil, čeprav je ena od paralelk (slika 13) že v drugem merjenju (pri 8. urah) dosegla vrednost OD ~ 0,534. Rast te paralelke se je nato nadaljevala, čeprav malce počasneje (naklon krivulje) kot v kontrolnem gojišču, ves čas inkubacije in je pri 28. urah dosegla podobno vrednost OD kot v gojišču z nižjo koncentracijo dialil sulfida in le malo nižjo od rasti v kontrolnem gojišču. Na podoben način se je znižala vrednost pH v gojišču s koncentracijo 9 mM dialil sulfida. Drugače pa je bilo v drugi paralelki, ki je z zapoznelo in precej počasnejšo rastjo dosegla po 28-ih urah inkubacije vrednost OD ~ 0,348, vrednost pH v tem gojišču pa ni padala in se je ob koncu inkubacije celo malce dvignila nad izhodiščno vrednost pH.

Pri sevih *R. flavefaciens* 007 S/6 in *R. albus* DSMZ 20455 smo preučevali vpliv treh različnih koncentracije dialil sulfida. Rezultati meritev vrednosti pH vrednosti so prikazani na spodnjih grafikonih (slika 14).



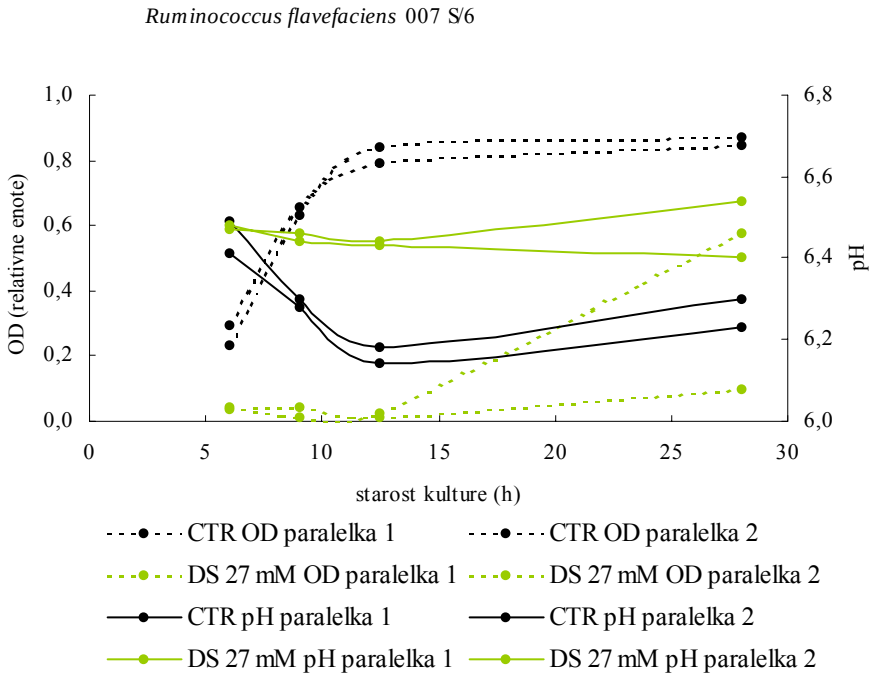
Slika 14: pH in rast (OD_{654}) v odvisnosti od časa za seva *R. flavefaciens* 007 S/6 in *R. albus* DSMZ 20455 pri treh koncentracijah dialil sulfida

Dodatek dialil sulfida je imel zelo zanimiv vpliv na rast obeh ruminokokov. Medtem ko sprememba vrednosti pH v kontrolnem gojišču (ki pa ni zelo velika, le ~ 0,4 pH enote) in v gojiščih z obema višjima koncentracijama dialil sulfida lepo odraža rast oziroma inhibicijo rasti seva *R. flavefaciens* 007 S/6, tako kot smo jo spremljali z ugotavljanjem motnosti gojišča, temu pri koncentraciji 27 mM ni tako. Čeprav tu rast dejansko poteka, in jo lahko zaznamo z merjenjem motnosti gojišča, a šele po 13. urah, se vrednost pH v gojišču ni bistveno spremenila (kljub doseženi vrednosti OD skoraj 0,4 po 28. urah inkubacije).

Pri sevu *R. albus* DSMZ 20455 smo tudi opazili nenavadno spreminjanje vrednosti pH. Medtem ko meritve motnosti gojišča po rasti v gojiščih s koncentracijo dialil sulfida 27

mM in 81 mM niso kazale na kakršno koli rast, je vrednost pH v teh gojiščih vztrajno padala (slika 14). Sicer manj kot v kontrolnem gojišču, a je kljub temu zdrsnila na 6,2, kar je podobno kot pri sevu *R. flavefaciens* 007 S/6 po rasti v kontrolnem gojišču. Nenavaden odklon je pokazala tudi četrta meritev vrednosti pH pri sevu *R. albus* DSMZ 20455 po rasti v gojišču s koncentracijo 81 mM dialil sulfida za katero pa nimamo prave razlage.

Zaradi velikega odklona vrednosti pH med paralelkama pri koncentraciji 27 mM smo paralelke predstavili še na sliki 15. Na sliki 15 vidimo, da sta bila rast in padec vrednosti pH v obeh paralelkah bistveno različna. Medtem ko se je pri paralelki, pri kateri je rast po drugem merjenju dosegla precejšnjo hitrost kot v kontrolnem gojišču (a še vedno manjšo kot v kontrolnem gojišču), vrednost pH zniževala, se je pri drugi paralelki prav nasprotno in podobno kot v prisotnosti obeh višjih koncentracij dialil sulfida zviševala.

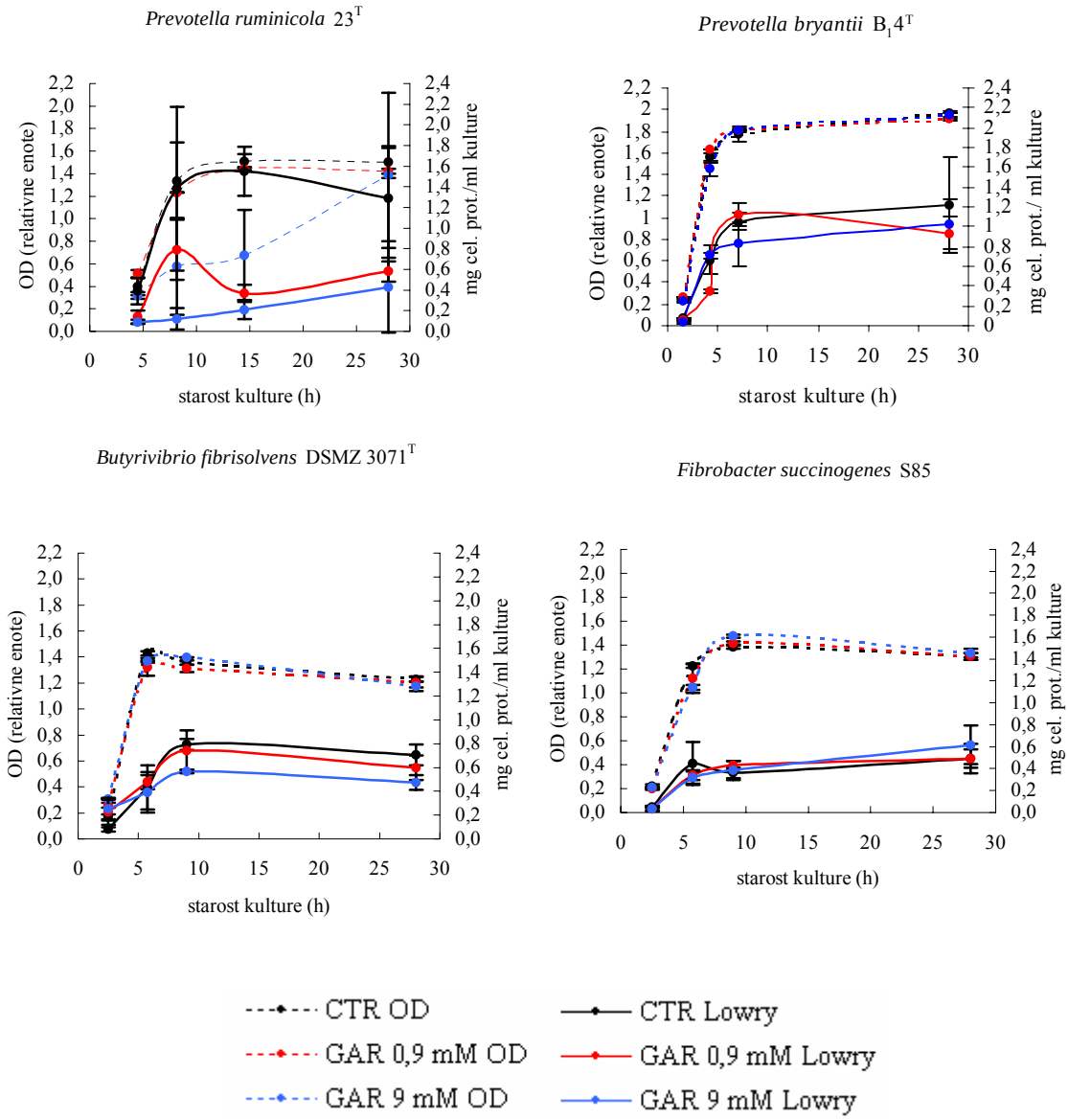


Slika 15: pH in rast (OD_{654}) v odvisnosti od časa za sev *R. flavefaciens* 007 S/6 pri treh koncentracijah dialil sulfida in dveh paralelkah

4.2.3 Ugotavljanje koncentracije celičnih beljakovin po Lowryju

Rast mikrobnih populacij lahko spremljamo tudi z meritvami skupnih celičnih beljakovin. Pri tistih vzorcih kjer smo opazili porast optične gostote gojišča, smo izvedli tudi

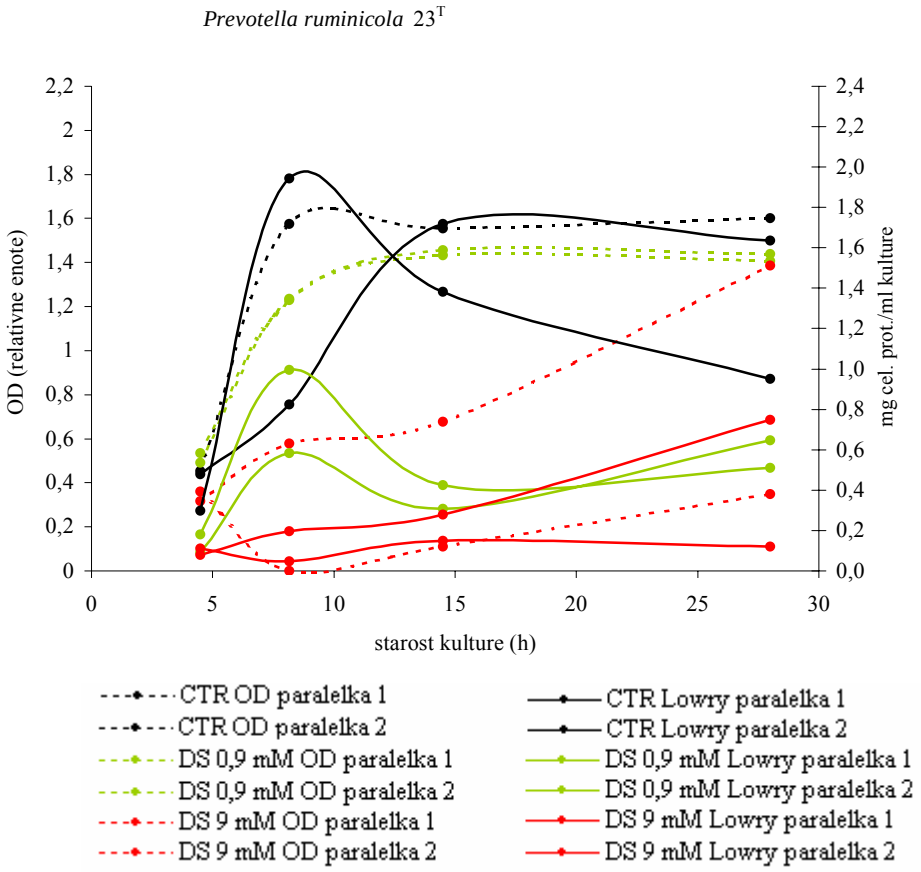
proteinsko analizo. Rezultati meritev skupnih koncentracij celičnih beljakovin so grafično prikazni skupaj z rezultati meritev optične gostote (slika 16).



Slika 16: Koncentracija celičnih beljakovin in rast (OD_{654}) v odvisnosti časa za seve *P. ruminicola* 23^T, *P. bryantii* B_14^T, *B. fibrisolvens* DSMZ 3071^T in *F. succinogenes* S85 pri nižji koncentraciji dialil sulfida

Pri obeh prevotelah smo opazili nepričakovane rezultate in velike razlike med paralelkami. Na sliki 17 in 18 so zato prikazane posamezne paralelke. Pri sevih *B. fibrisolvens* DSMZ 3071^T in *F. succinogenes* S85 smo opazili pričakovano porast koncentracije celičnih beljakovin v skladu z rastjo vrednosti OD in padcem vrednosti pH v gojišču. Tudi merjenje koncentracije celičnih beljakovin dokazuje, da dialil sulfid na rast *F. succinogenes* S85

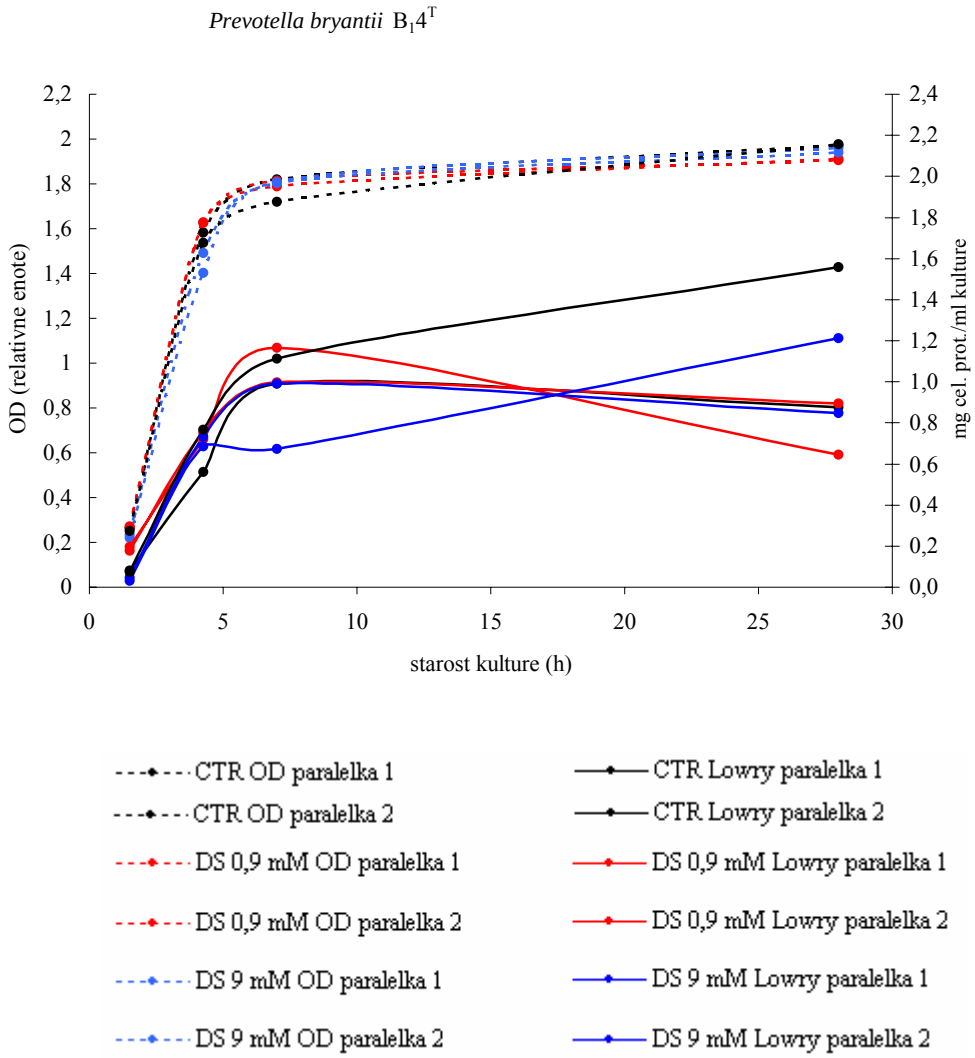
sploh ni vplival, medtem ko smo pri sevu *B. fibrisolvens* DSMZ 3071^T opazili do neke mere manjšo produkcijo skupnih celičnih beljakovin po rasti v gojišču z dialil sulfidom. Zanimivo je tudi opažanje, da je bila kljub temu, da sta *B. fibrisolvens* DSMZ 3071^T in *F. succinogenes* S85 dosegla podobno velike vrednosti OD kot *P. ruminicola* 23^T v kontrolnem gojišču (OD ~1.5), tvorba skupnih celičnih beljakovin bistveno manjša kot pri sevu *P. ruminicola* 23^T (le med 0,6 in 0,8 mg beljakovin/ml kulture v primerjavi z 1,6 mg beljakovin/ml kulture pri sevu *P. ruminicola* 23^T).



Slika 17: Koncentracija celičnih beljakovin in rast (OD_{654}) v odvisnosti časa za sev *P. ruminicola* 23^T pri nižji koncentraciji dialil sulfida (obe paralelki)

Pri sevu *P. ruminicola* 23^T smo dokaj presenetljivo tudi po rasti v gojišču z nižjo koncentracijo dialil sulfida (0,9 mM), ki sodeč po meritvah vrednosti OD in pH ni vplivala na rast, opazili najprej pričakovan porast koncentracije celičnih beljakovin v drugi točki faze rasti (po 8. urah), nato pa presenetljivo znižanje koncentracije celičnih beljakovin v tretji točki faze rasti (za več kot 2 krat) in nato znova rahlo povečanje. V gojišču z 9 mM

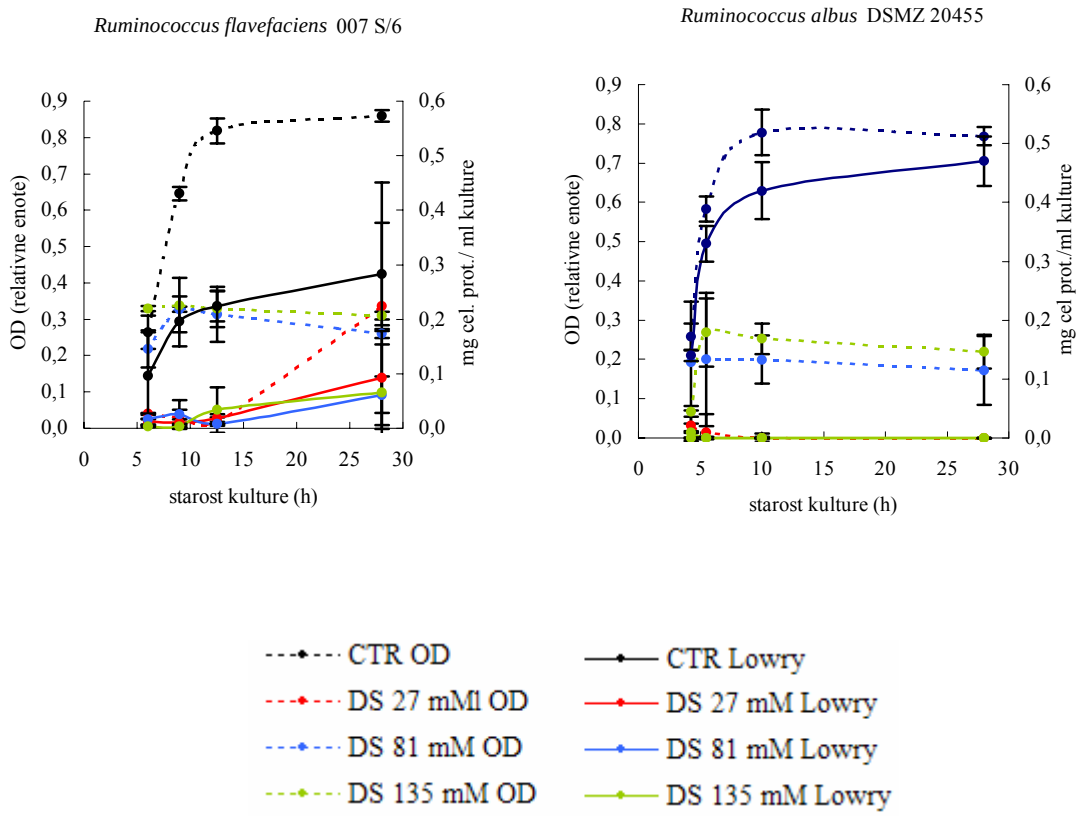
koncentracijo dialil sulfida pa smo pri tisti paralelki, pri kateri se je pokazala rast, sodeč po OD meritvah, zasledili sicer počasnejšo, a vztrajno naraščanje koncentracije celičnih beljakovin. Po 28. urah inkubacije je bila koncentracija celičnih beljakovin celo višja kot v vzorcu z 10 krat manjšo koncentracijo dialil sulfida.



Slika 18: Koncentracija celičnih beljakovin in rast (OD_{654}) v odvisnosti časa za sev *P. bryantii* B$_1$4^T pri nižji koncentraciji dialil sulfida (obe paralelki)

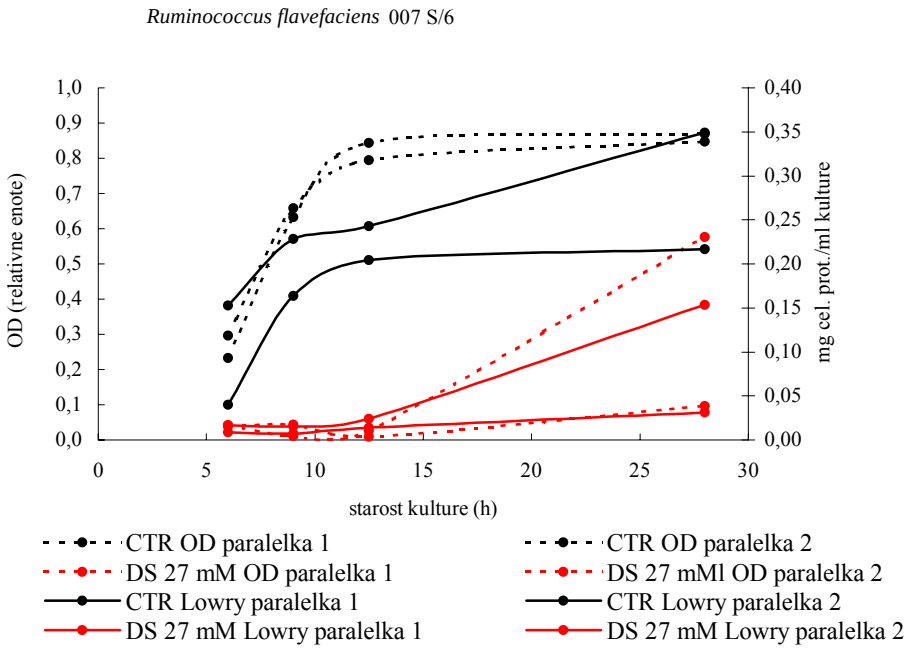
Tudi pri sevu *P. bryantii* B$_1$4^T smo opazili nenavaden odziv na prisotnost dialil sulfida, ko smo ugotavljali koncentracijo celičnih beljakovin. Pri merjenju vrednosti pH in OD nismo odkrili nobenega vpliva, medtem ko se je koncentracija skupnih celičnih beljakovin po rasti v prisotnosi 0,9 mM koncentracije dialil sulfida ob zadnjem merjenju (torej po 28. urah) znižala pod koncentracijo, ki smo jo ugotovili ob tretjem merjenju (po 7. urah).

Vsekakor lahko ugotovimo, da dialil sulfid vpliva tudi na rast seva *P. bryantii* B_14^T in sicer tako, da zmanjša produkcijo skupnih celičnih beljakovin, čeprav lahko ta vpliv opazimo šele v stacionarni fazi rasti.



Slika 19: Koncentracija celičnih beljakovin in rast (OD_{654}) v odvisnosti od časa za seve *R. flavefaciens* 007 S/6 in *R. albus* DSMZ 20455 pri višjih koncentracijah dialil sulfida

Kot smo ugotovili že pri merjenju vrednosti OD in pH sta obe višji koncentraciji dialil sulfida popolnoma inhibirali rast obeh ruminokokov. Koncentracija 27 mM mg dialil sulfida/l pa je inhibirala rast seva *R. albus* DSMZ 20455, ne pa tudi *R. flavefaciens* 007 S/6. Po zadnjem merjenju po 28. urah je namreč postalo očitno, da ta sev raste (tako sodeč po vrednostih OD kot koncentraciji celičnih beljakovin).



Slika 20: Koncentracija celičnih beljakovin in rast (OD_{654}) v odvisnosti od časa za sev *R. flavefaciens* 007 S/6 pri višjih koncentracijah dialil sulfida in obeh paralelkah

Zaradi velikih razlik med paralelkama pri merjenju koncentracije celičnih beljakovin smo za sev *R. flavefaciens* 007 S/6 posamezne paralelke prikazali na sliki 20. Očitno je, da je zrasla le ena paralelka, pri tem pa je nastalo približno 2 krat manj celičnih beljakovin kot po rasti v kontrolnem gojišču.

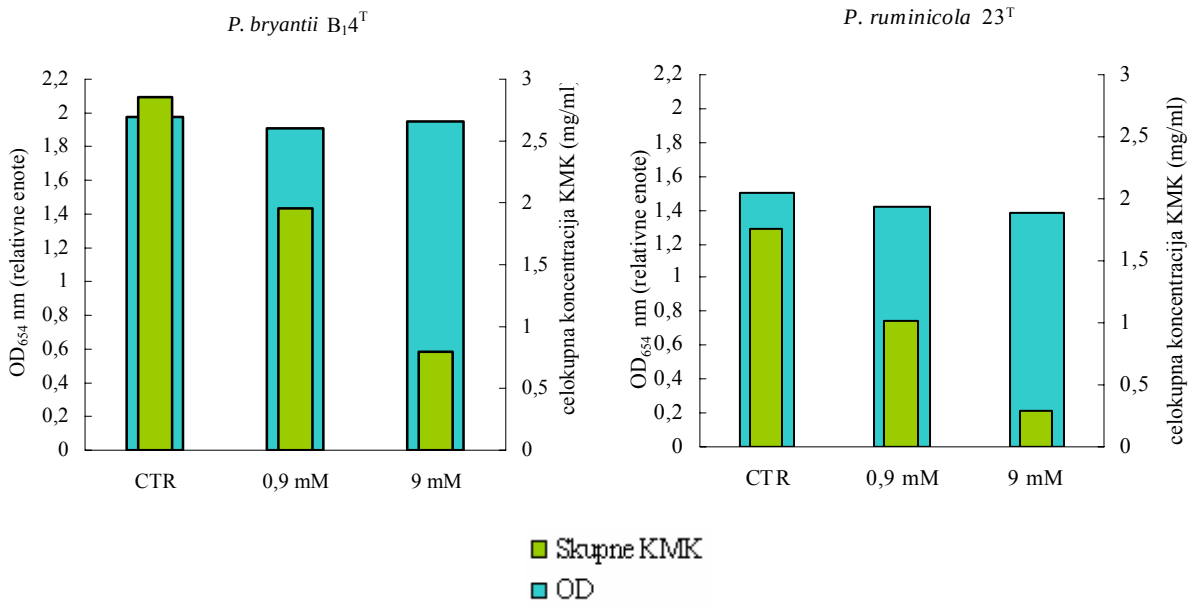
4.3 UGOTAVLJANJE KONCENTRACIJE KRATKOVERIŽNIH MAŠČOBNIH KISLIN PO RASTI V PRISOTNOSTI DIALIL SULFIDA

Ekstrakcijo in analizo maščobnih kislin smo naredili pri tistih sevih, pri katerih je bila rast opazna. Rezultate smo podali v preglednici 7. Od dobljenih vrednosti za posamezne KMK v preučenih vzorcih smo odšteli KMK vrednosti, ki smo jih izmerili v etrskem ekstraktu sterilnega gojišča M2, in te zapisali v preglednico 7. Pri tem smo v okviru eksperimentalne napake (prekomerno in nekontrolirano izhlapevanje nekaterih vzorcev, kot posledica okvare klimatske naprave v laboratoriju v času analize in posledično neprimernega delovanja aparature), ki je najverjetnejši vzrok razlikam v izmerjeni vsebnosti KMK med vzorci in samim gojiščem, v nekaterih primerih dobili negativne vrednosti, kar smo v preglednico zapisali kot vrednost nič (0).

Preglednica 7: Koncentracije kratkoverižnih maščobnih kislin (KMK), deleži posameznih KMK in OD vrednosti

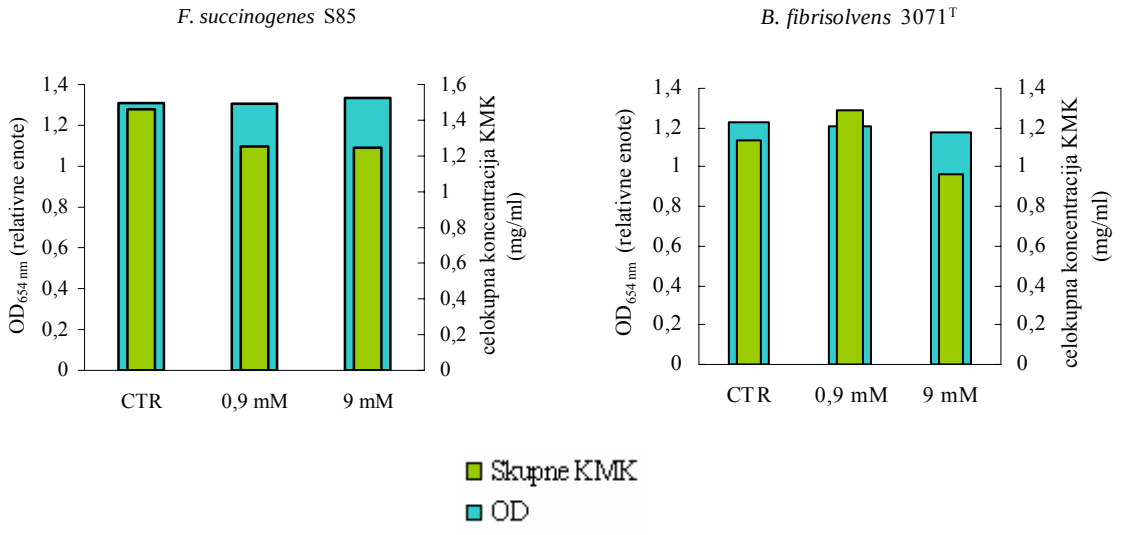
sev	vzorec (mM)	ocetna kislina (mg/ml)	propionska kislina (mg/ml)	i-maslena kislina (mg/ml)	n-maslena kislina (mg/ml)	skupne KMK (mg/ml)	deleži KMK ocet. kislina	deleži KMK prop. kislina	deleži KMK mas. kislina	OD_{654nm} (h=28)
Prevotella	CTR	1,555	0,190	0,003	0,007	1,755	0,88	0,11	0,01	1,503
ruminicola	0,9	0,923	0,090	0	0	1,013	0,91	0,09	0	1,423
sev 23^T	9	0,284	0,007	0	0	0,291	0,98	0,02	0	1,386
Prevotella	CTR	2,855	0	0	0	2,855	1	0	0	1,975
bryantii	0,9	1,957	0	0	0	1,957	1	0	0	1,909
sev B_I4^T	9	0,797	0	0	0	0,797	1	0	0	1,951
Butyrivibrio	CTR	0	0	0	1,141	1,141	0	0	1	1,229
fibrisolvens	0,9	0	0	0	1,285	1,285	0	0	1	1,206
sev DSMZ 3071^T	9	0	0	0	0,962	0,962	0	0	1	1,174
Fibrobacter	CTR	0	0	0	1,460	1,460	0	0	1	1,308
succinogenes	0,9	0	0	0	1,253	1,253	0	0	1	1,306
sev S85	9	0	0	0	0,827	0,827	0	0	1	1,333
Ruminococcus	CTR	0	0	0	0	0	0	0	0	0,859
flavefaciens	27	0	0	0	0	0	0	0	0	0,340
sev 007 S/6	81	0	0	0	0	0	0	0	0	0,261
	135	0,020	0	0	0	0,020	1	0	0	0,310
Ruminococcus	CTR	0,096	0	0	0	0,096	1	0	0	0,769
albus	27	0	0	0	0	0	0	0	0	0,000
sev DSMZ 20455	81	0	0	0,004	0,006	0,010	0	0	1	0,172
	135	0	0	0,002	0	0,002	0	0	1	0,220

Analiza koncentracij KMK je pri sevu *P. ruminicola* 23^T pokazala, da sta večinska produkta po rasti v kontrolnem gojišču ocetna in propionska kislina v razmerju 8:1. To smo v poskusu tudi pričakovali. Skupna koncentracija KMK se je v vzorcih z nižjo koncentracijo dialil sulfida močno zmanjšala, spremenil (a le malo) pa se je tudi razmerje med ocetno in propionsko kislino. Skupna koncentracija KMK je še bolj padla v vzorcih z višjo koncentracijo dialil sulfida, prav tako se je razmerje spremenilo med ocetno in propionsko kislino močno v korist produkcije ocetne kisline.



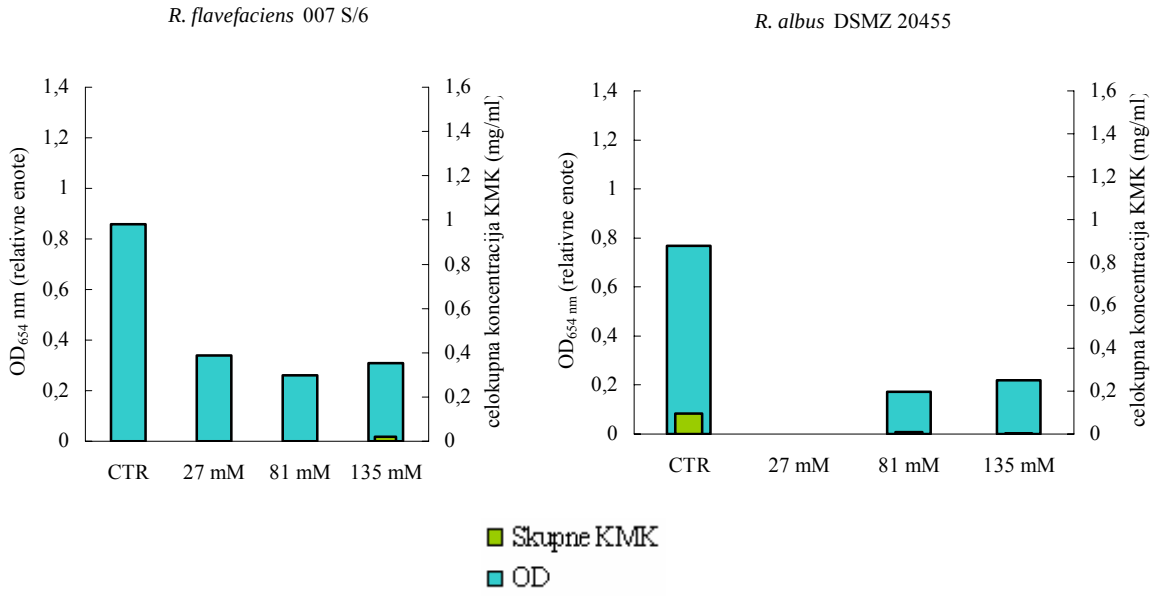
Slika 21: Koncentracija ekstrahiranih KMK za seva *P. bryantii* B_14^T in *P. ruminicola* 23^T

P. bryantii B_14^T je bila precej manj občutljiva na dodatek izvlečka dialil sulfida, kar kaže tudi analiza koncentracije KMK (preglednica 7). Tako nižja kot višja koncentracija dialil sulfida sta vplivali na končno koncentracijo KMK v gojišču po 28-ih urah. Koncentracija ocetne kisline se je zmanjševala. Po 28. urah se je koncentracija KMK ob dodatku dialil sulfida z višjo koncentracijo zmanjšala za približno 2/3, kar je zanimivo, ker se vrednosti OD niso zmanjšale, se je pa zmanjšala koncentracija celičnih beljakovin. Zanimivo je, da v vzorcih nismo odkrili propionske in maslene kisline.



Slika 22: Koncentracija ekstrahiranih KMK za seva *B. fibrisolvens* DSMZ 3071^T in *F. succinogenes* S85

Pri sevu *B. fibrisolvens* DSMZ 3071^T nismo v vzorcih zaznali ne ocetne in ne propionske kisline. V vzorcih je bila maslena kislina, katere koncentracije se je le malo znižala od kontrole, ravno tako je vrednost OD po 28. urah le malo padla. Tudi pri sevu *F. succinogenes* S85 nismo v vzorcih zaznali prisotnosti ocetne in propionske kisline, smo pa zaznali prisotnost maslene kisline. Manjša koncentracije dialil sulfida je le malo zmanjšala koncentracijo maslene kisline, medtem ko je višja koncentracija dialil sulfida zmanjšala koncentracijo maslene kisline za približno 43%, vrednost OD pa se je povečala.

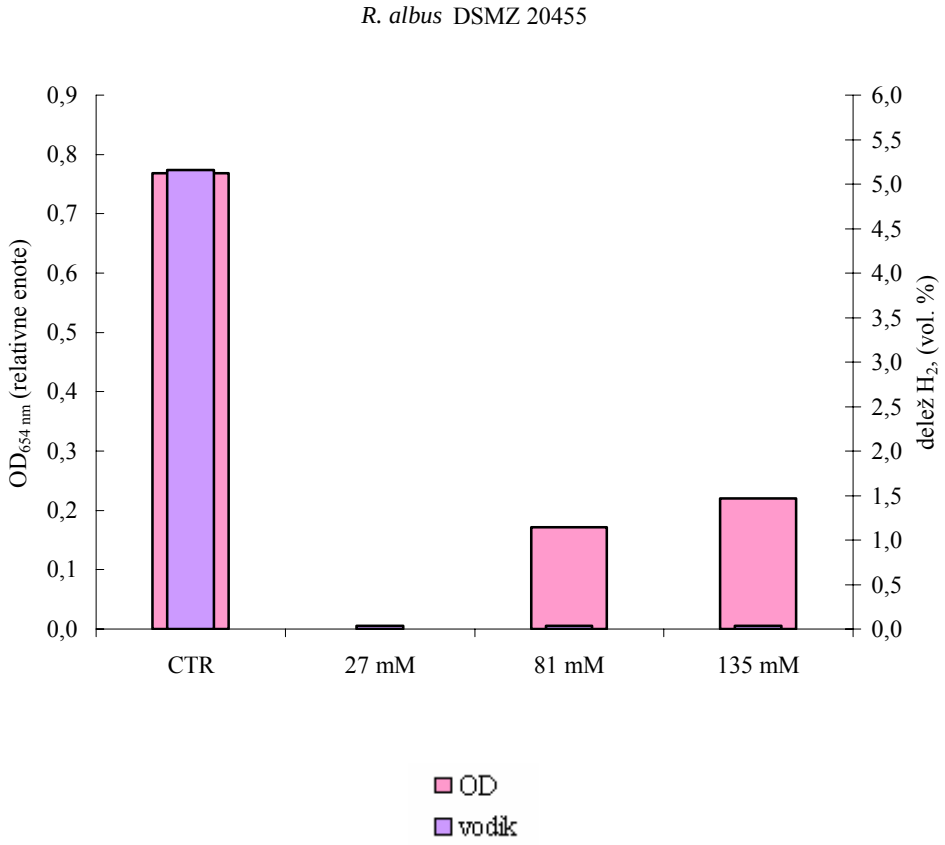


Slika 23: Koncentracija ekstrahiranih KMK za seva *R. flavefaciens* 007 S/6 in *R. albus* 20455

Pri sevu *R. flavefaciens* 007 S/6 nismo odkrili povečanja koncentracije KMK v primerjavi z gojiščem, razen v primeru ocetne kisline. Ob dodatku višje koncentracije (135 mM) dialil sulfida se koncentracija ocetne kisline zviša. Ta vrsta je znana po tvorbi ocetne kisline, ki je eden pomembnejših produktov fermentacije. Pri sevu *R. albus* DSMZ 20455 smo v vzorcih odkrili prisotnost maslene kisline, v kontrolnem vzorcu pa smo pričakovano odkrili le prisotnost ocetne kisline. Zanimivo je, da je bila prisotnost ocetne kisline kar 15 oziroma 30 krat manjša kot pri sevih *P. ruminicola* 23^T in *P. bryantii*, B$_1$4^T. Koncentracija maslene kisline se v vzorcih zmanjšuje. Te poskuse bi morali ponoviti, da bi lahko izključili možnost eksperimentalne napake.

4.4 UGOTAVLJANJE KONCENTRACIJE VODIKA PO RASTI *R. albus* DSMZ 20455 IN *B. fibrisolvens* DSMZ 3071^T V PRISOTNOSTI DIALIL SULFIDA

Koncentracijo vodika po 28. uri rasti v gojišču brez in z dialil sulfidom smo ugotavljali za dva seva, za katera je znano, do kot enega od fermentacijskih produktov tvorita vodik, in sicer *R. albus* DSMZ 20455 in *B. fibrisolvens* DSMZ 3071^T.



Slika 24: Koncentracija vodika (H_2) in OD vrednost za sev *R. albus* DSMZ 20455

Preglednica 8: Koncentracija vodika (H_2) za sev *B. fibrisolvens* DSMZ 3071^T

povprečna koncentracija	vodik (vol. %)	Student t - test	OD (28 ur)
kontrola (CTR)	8,04	/	1,229
DS 0,9 mM	10,99	- 2,71*	1,206
DS 9 mM	8,24	- 0,32*	1,174

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 trejem sevu, *R. flavefaciens* 007 S/6, ki sodeč po literaturnih navedkih tudi tvori vodik kot enega od fementacijskih produktov, vodika v predposkusu po rasti v kontrolnem gojišču nismo odkrili, zato zaradi obsežnosti poskusa in velikega števila podvzorcev produkcije vodika pri *R. flavefaciens* 007 S/6 v samem poskusu nismo odkrivali.

Ugotovili smo, da se je produkcija vodika pri sevu *B. fibrisolvens* DSMZ 3071^T po rasti v prisotnosti dialil sulfida povečala, in sicer se je bolj povečala po rasti v prisotnosti 0,9 mM kot 9 mM dialil sulfida, vendar razlike niso statistično značilne. Po rasti seva *R. albus* DSMZ 20455 v prisotnosti dialil sulfida smo ugotovili močno zmanjšanje produkcije vodika v gojiščih z 81 in 135 mM koncentracijo dialil sulfida (za 3 do 4 krat), medtem ko vodika po inkubaciji v gojišču s 27 mM koncentracijo vodika nismo odkrili.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Pred začetkom poskusa, v katerem smo preučevali vpliv dialil sulfida na rast izbranih vampnih bakterijskih sevov, smo najprej spremljali rast teh bakterij v osnovnem gojišču M2. Na osnovi teh krivulj smo določili štiri obdobja, v katerih smo nato med poskusi spektrofotometrično ugotavljali optično gostoto posameznih bakterijskih kultur in jemali vzorce za nadaljnje analize. Ugotovili smo, da so paralelke istih sevov med seboj primerljive. Zaradi lažjega izvajanja poskusa smo spremljali le po dva seva naenkrat in sicer tista dva, ki sta si bila najbolj podobna po hitrosti in obsegu rasti.

Celoten poskus smo razdelili na dva dela. V prvi del poskusa smo vključili štiri bakterijske seve: *P. ruminicola* 23^T, *P. bryantii* B_14^T, *B. fibrisolvens* DSMZ 3071^T in *F. succinogenes* S85. Pri teh sevih smo uporabili dve različni koncentraciji dialil sulfida, t.j. 0,9 in 9 mM. Ti koncentraciji smo izbrali zato, ker se pričujoča naloga navezuje na preučevanja vzorcev iz kontinuiranih reaktorskih kultur, ki so simulirale vampni mikrobni ekosistem, in v katerih so Busquet in sodelavci (2005) preučevali vpliv dialil sulfida na metabolizem vampnega mikrobnega ekosistema v takšnih koncentracijah. Po drugi strani sta v edini doslej objavljeni študiji (kolikor je nam poznano) vpliva česnovih izvlečkov na vampne anaerobne bakterije Caldwell in Danzer (1988) opisala vpliv 5 mM koncentracije dialil sulfida na produkcijo beljakovin in hitrost rasti nekaterih bakterijskih sevov, torej vmesno koncentracijo, kar je ponujalo dobra izhodišča za primerjavo rezultatov. V drugem delu poskusa smo preučevali rast obeh ruminokokov, t.j. sevov *R. albus* DSMZ 20455 in *R. flavefaciens* 007 S/6 v prisotnosti višjih koncentracij dialil sulfida, t.j. 27, 81 in 135 mM. V tem delu poskusa smo uporabili višje koncentracije dialil sulfida zaradi (i) preliminarnih opažanj iz prvega dela poskusa in (ii) ugotovitev Caldwella in Danzerjeve (1988), da 5 mM koncentracija dialil sulfida na ruminokoke bodisi sploh ni vplivala ali pa vpliv ni bil statistično značilen.

5.1.1 Preučevanje vpliva dialil sulfida na rast vampnih bakterij z ugotavljanjem sprememb v motnosti gojišča

Nižji koncentraciji dialil sulfida (0,9 in 9 mM) na seve *P. bryantii* B_14^T, *B. fibrisolvens* DSMZ 3071^T in *F. succinogenes* S85 sodeč po spremljanju motnosti gojišča (vrednosti

OD) nista delovali inhibitorno. Caldwell in Danzer (1988) sta ugotovila podobno, ko sta spektrofotometrično ugotavljala vpliv dialil sulfida na hitrost rasti preučevanih bakterij. Medtem, ko pri sevih *B. fibrisolvens* DSMZ 3071^T (sev D1) in *F. succinogenes* S85 (takrat opisovan še kot *Bacteroides succinogenes* S85) sploh nista opazili vpliva dialil sulfida na hitrost rasti, se je le ta pri *P. bryantii* B_14^T celo povečala (podvojevalni čas se je s približno 110 minut skrajšal na 74 minut). Pri sevu *P. ruminicola* 23^T (Caldwell in Danzer ga nista preučevala v svoji študiji) pa smo pri 9 mM koncentraciji opazili delno inhibicijo rasti, ki se je odražala v upočasnjeni hitrosti rasti. Ena od obeh paralelk je ob zadnjem merjenju motnosti gojišča, po 28. urah inkubacije, kljub upočasnjeni rasti dosegla enako vrednost OD kot po rasti v kontrolnem gojišču in gojišču z 0,9 mM koncentracijo dialil sulfida. V tem času na podlagi naših opažanj ta paralelka še ni dosegla stacionarne faze rasti, vendar bi bilo potrebno za bolj zanesljivo razlago tega fenomena poskus ponoviti in opraviti večje število vmesnih merjenj motnosti gojišča. Tudi v drugi paralelki smo pri zadnjih dveh merjenjih opazili znake rasti, ki pa je bila še počasnejša in je ob zadnjem merjenju dosegla šele približno 1/5 OD vrednosti prve paralelke.

V drugem delu poskusa smo preučevali vpliv treh višjih koncentracij dialil sulfida na rast ruminokokov. Ko smo dodali v gojišče dialil sulfid v koncentraciji 81 oz. 135 mM se je povečala motnost v gojišču, kar lepo kažejo rezultati prvih meritev v zgodnji eksponentni fazi rasti. OD vrednosti se tudi v kasnejših meritvah niso spremenile, kar kaže, da dialil sulfid v takšnih koncentracijah popolnoma inhibira rast ruminokokov. V kulturi, ki je vsebovala 27 mM dialil sulfida, je bila vrednost OD ob prvi meritvi blizu nič, kar je kazalo, da se rast še ni začela in da dialil sulfid v takšni koncentraciji tudi ni povzročil povečane motnosti gojišča. Pri sevu *R. albus* DSMZ 20455, rasti pri tej koncentraciji dialil sulfida nismo opazili do konca poskusa, pri sevu *R. flavefaciens* 007 S/6 pa je ena paralelka pričela rasti po tretjem merjenju motnosti gojišča (po 13. urah) in v preostalih 15. urah dosegla približno 1/3 vrednosti OD v primerjavi z rastjo v kontrolnem gojišču. Caldwell in Danzer (1988) pri preučevanju vpliva 5 mM koncentracije dialil sulfida nista opazila statistično značilnega vpliva na hitrost rasti ruminokokov (poleg dveh sevov *R. flavefaciens* in seva *R. albus* sta preučevala še sev *Ruminococccus bromi*). Kljub temu, da rezultati niso bili statistično značilni, sta opisala različen vpliv 5mM dialil sulfida na rast sevov *R. flavefaciens* in *R. albus*. Medtem, ko se je rast pri prvih rahlo upočasnila, se je pri

R. albus celo malce pospešila. Naši rezultati kažejo nasprotno sliko, vendar moramo pri tem poudariti, da smo preučevali druge seve v primeru vrste *R. flavefaciens* in seveda druge, bistveno višje koncentracije dialil sulfida.

5.1.2 Preučevanje vpliva dialil sulfida na rast vampnih bakterij z ugotavljanjem koncentracije skupnih celičnih beljakovin

Vpliv dialil sulfida na rast vampnih bakterij smo preučevali tudi z ugotavljanjem koncentracije skupnih celičnih beljakovin po Lowryju. V koncentracijah 0,9 in 9 mM dialil sulfid sodeč po spremembi motnosti v gojišču rasti ni inhibiral rasti pri sevih *P. bryantii* B_14^T, *B. fibrisolvens* DSMZ 3071^T in *F. succinogenes* S85. Rezultati ugotavljanja koncentracije skupnih celičnih beljakovin se z zgoraj zapisanim v celoti ujemajo le pri sevu *F. succinogenes* S85, pa še v tem primeru smo opazili, da je bila koncentracija skupnih beljakovin po četrtem merjenju rahlo višja kot po tretjem, medtem ko se je vrednost OD za malenkost znižala. Caldwell in Danzerjeva (1988) nista opazila nobenega vpliva 5 mM dialil sulfida na rast seva *F. succinogenes* S85.

Tudi pri ugotavljanju vpliva dialil sulfida na produkcijo skupnih celičnih beljakovin pri sevu *P. bryantii* B_14^T smo prišli do podobnih ugotovitev kot Caldwell in Danzerjeva (1988), ki sta v prisotnosti 5mM dialil sulfida opazila manjšo produkcijo skupnih celičnih beljakovin, ki pa ni bila statistično značilna. Tudi v našem poskusu smo ugotovili podobno, opazili pa smo ravno obraten fenomen kot pri *F. succinogenes* S85, in sicer se je skupna koncentracija celičnih beljakovin po četrtem merjenju rahlo znižala, medtem, ko je vrednost OD še naraščala.

Pri ugotavljanju skupnih celičnih beljakovin po rasti v prisotnosti dialil sulfida smo pri sevu *B. fibrisolvens* DSMZ 3071^T prišli do popolnoma drugačnih ugotovitev kot Caldwell in Danzerjeva (1988). V našem poskusu smo kljub temu, da sodeč po meritvah spremembe motnosti gojišča 0,9 in 9 mM koncentracija dialil sulfida ne vplivata na rast seva *B. fibrisolvens* DSMZ 3071^T, ugotovili znižanje koncentracije skupnih celičnih beljakovin v primerjavi z rastjo v kontrolnem gojišču in sicer v vseh merjenih točkah. Opazili smo, da je tudi nižja koncentracija dialil sulfida, t.j. 0,9 mM, zmanjšala koncentracijo skupnih celičnih beljakovin, čeprav ne tako očitno, kot 9 mM koncentracija. Caldwell in Danzerjeva (1988) sta v svojem poskusu preučevala vpliv dialil sulfia na dva seva *B.*

fibrisolvens. Sev D1 je tipski sev vrste *B. fibrisolvens* (torej isti sev, ki smo ga v svojem poskusu preučevali mi, t.j. DSMZ 3071^T, poleg tega pa sta preučevala še sev z oznako 49). Pri obeh sevih sta Caldwell in Danzerjeva (1988) opazila povečanje koncentracije skupnih celičnih beljakovin po rasti v gojišču z 5 mM koncentracijo dialil sulfida, le da je bilo to povečanje le v primeru tipskega seva tudi statistično značilno. Opaženih razlik med rezultati študije, ki sta jo opravila Caldwell in Danzerjeva in rezultati naše študije v primeru vpliva dialil sulfida na rast sevov *B. fibrisolvens* zaenkrat ne znamo razložiti. Razlike so morda posledica dejstva, da smo v našem poskusu zadnjo meritev opravili po 28. urah inkubacije, Caldwell in Danzerjeva pa šele po 168. urah, ali pa še manj verjetno, zaradi določenih manjših razlik v pripravi rastnega gojišča.

Pri preučevanju vpliva dialil sulfida na produkcijo skupnih celičnih beljakovin seva *P. ruminicola* 23^T smo opazili dokaj velike razlike med paralelkami, tudi po rasti v kontrolnem gojišču. 0,9 mM koncentracija dialil sulfida, ki sodeč po ugotovljenih vrednostih OD ni imela vpliva na rast seva, je povzročila očitno zmanjšano produkcijo skupnih celičnih beljakovin v primerjavi s kontrolo, predvsem glede na rezultate tretje in četrte meritve (po 14. in 28. urah inkubacije). Ob drugi meritvi smo pri obeh paralelkah zaznali znaten porast produkcije skupnih celičnih beljakovin, ki je dosegla približno polovico produkcije kulture, ki je rasla v kontrolnem gojišču. Nato pa je koncentracija skupnih celičnih beljakovin ob tretji meritvi padla z 0,8 na 0,4 mg celičnih beljakovin na ml kulture in se ob zadnji meritvi znova rahlo povzpela na 0,6 mg celičnih beljakovin na ml kulture. 9 mM koncentracija dialil sulfida je popolnoma inhibirala rast ene od obeh paralelk seva *P. ruminicola* 23^T, pri drugi paralelki pa smo ugotovili enakomerno povečevanje koncentracije skupnih celičnih beljakovin, dokler le ta ni dosegla celo rahlo višje vrednosti kot paralelki kulture, ki je rasla pri 10 x nižji koncentraciji dialil sulfida. Rezultati poskusa s sevom *P. ruminicola* 23^T kažejo, da je pri kulturi, ki je rastla v prisotnosti 0,9 mM koncentracije dialil sulfida, nekje med 7. in 15. uro inkubacije prišlo do ustavitve sinteze in celo do razkroja celičnih beljakovin. Razlogov za ta fenomen trenutno ne poznamo.

Rezultati preučevanja vpliva dialil sulfida na rast in produkcijo skupnih celičnih beljakovin obeh ruminokokov sovpadajo z rezultati Caldwell in Danzerjeve (1988). 5 mM

koncentracija dialil sulfida je sicer zmanjšala produkcijo skupnih celičnih beljakovin pri vseh treh sevih ruminokokov, a ne statistično značilno. V našem poskusu so vse tri koncentracije dialil sulfida popolnoma preprečile naraščanje koncentracije skupnih celičnih beljakovin pri sevu *R. albus* DSMZ 20455. Pri sevu *R. flavefaciens* 007 S/6 smo v nasprotju opazili rahlo povečanje koncentracije skupnih celičnih beljakovin pri vseh uporabljenih koncentracijah dialil sulfida, a šele ob četrti meritvi, po 28. urah inkubacije.

5.1.3 Preučevanje vpliva dialil sulfida na rast vampnih bakterij z ugotavljanjem sprememb v vrednostih pH v gojišču

V okviru pričujoče diplomske naloge smo ob merjenju sprememb v motnosti gojišča in ugotavljanju koncentracije skupnih celičnih beljakovin spremljali tudi spremembe v vrednostih pH v gojišču. Meritve vrednosti pH so potrdile, da tako 0,9 kot 9 mM koncentracija dialil sulfida ne vplivata bistveno na rast sevov *P. bryantii* B_14^T in *F. succinogenes* S85. Tako kot je naraščala motnost gojišča, je padala vrednost pH v gojišču in se ustalila pri 5,2 v primeru *P. bryantii* B_14^T in 5,6 v primeru *F. succinogenes* S85. To se sklada tudi s podatki iz literature, saj je znano, da je sev *P. bryantii* B_14^T precej bolj odporen proti nizkim pH vrednostim kot druge vampne bakterije (Russell, 1991), še posebno celulolitične, kamor sodi tudi *F. succinogenes*.

Pri ugotavljanju sprememb v vrednostih pH po rasti seva *B. fibrisolvens* DSMZ 3071^T v prisotnosti dialil sulfida smo ugotovili, da so vrednosti pH po rasti v prisotnosti obeh koncentracij dialil sulfida padle manj kot po rasti v kontrolnem gojišču. To se sklada z opažanjem o manjši produkciji skupnih celičnih beljakovin in je v nasprotju z rezultati meritev motnosti gojišča. Ravno obratno je pri sevu *P. ruminicola* 23^T, kjer rezultati meritev vrednosti pH lepo sovpadajo z rezultati meritev motnosti gojišča. Malce nenavaden je rahel vzpon vrednosti pH pri kulturi, ki je rasla v prisotnosti 0,9 mM koncentracije dialil sulfida, ob drugem merjenju (po 8. urah inkubacije), ki na nek način sovpada z dvigom koncentracije skupnih celičnih beljakovin. Vendar se je vrednost pH v nadaljevanju poskusa po pričakovanjih spustila in tako sovpada z rezultati merjenja motnosti gojišča, ki kažejo na očitno rast in metabolno aktivnost kulture, v nasprotju z rezultati produkcije skupnih celičnih beljakovin.

Pri ugotavljanju sprememb v vrednostih pH v gojišču po rasti v prisotnosti dialil sulfida smo pri obeh ruminokokih prišli do presenetljivih rezultatov. Ugotovimo lahko, da uporabljene koncentracije dialil sulfida prav velikega vpliva na spremembo vrednosti pH niso imele, ker so bolj ali manj popolnoma inhibirale rast obeh ruminokokov. Vendar smo opazili manjše, a kljub temu presenetljive spremembe. Tako smo pri sevu *R. flavefaciens* 007 S/6 po rasti v gojišču z 27 mM dialil sulfida pričakovali padec vrednosti pH, saj smo pri četrtem merjenju ugotovili tako večjo motnost gojišča kot dvig koncentracije skupnih celičnih beljakovin, ki sta obe kazali na metabolno aktivnost in rast kulture. Vendar se vrednost pH v gojišču pri nobenem merjenju ni bistveno spremenila. Ugotovili smo tudi, da se je po četrtem merjenju po inokulaciji gojišča z 81 in 135 mM dialil sulfida vrednost pH rahlo zvišala, za kar pa zaenkrat še nimamo razlage.

Za sev *R. albus* DSMZ 20455 smo ugotovili, da so vse tri uporabljene koncentracije dialil sulfida rast popolnoma zavrle, tako po rezultatih merjenja motnosti gojišča kot koncentracije skupnih celičnih beljakovin v gojišču. Kljub temu smo opazili vztrajno padanje vrednosti pH, tako po rasti v gojišču z 27 mM kot 81 mM koncentracijo dialil sulfida. Padec vrednosti pH je bil sicer manjši kot po rasti v kontrolnem gojišču, a vendarle očiten. V gojišču s koncentracijo 135 mM dialil sulfida pa se je vrednost pH spreminjala čisto drugače. V prvih dveh merjenjih smo ugotovili precej izrazit padec vrednosti pH v gojišču, v četrtem merjenju pa dokaj močan dvig. Vrednost pH se je povzpela na 6,7, višje kot ob prvem merjenju po 4. urah inkubacije. Tudi razlogov za te spremembe trenutno ne poznamo.

5.1.4 Preučevanje vpliva dialil sulfida na rast vampnih bakterij z ugotavljanjem sprememb v koncentraciji kratkoverižnih maščobnih kislin v gojišču in vodika v plinski fazi nad gojiščem

Ekstrakcijo in plinsko kromatografsko analizo kratkoverižnih maščobnih kislin smo opravili pri tistih sevih, pri katerih smo zaznali rast glede na očitne spremembe v motnosti gojišča. Opozoriti moramo, da smo analizo KMK in vodika opravljali le v zadnji, četrti meritvi, torej po 28. urah inkubacije in zato nismo opazili vseh tistih sprememb, ki so bile posledica rasti ob drugem in tretjem merjenju. V primeru obeh prevotel smo pri ugotavljanju koncentracije KMK po rasti v prisotnosti dialil sulfida ugotovili podobno. V obeh primerih je prišlo po rasti v gojišču z 0,9 mM koncentracijo dialil sulfida do padca

koncentracije KMK za približno 1/3 (58% pri *P. ruminicola* 23^T in 68% pri *P. bryantii* B_14^T) in po rasti v gojišču z 9 mM koncentracijo dialil sulfida na 17 oz. 28% v primerjavi s koncentracijo KMK po rasti v kontrolnem gojišču. V obeh primerih smo ugotovili daleč največjo koncentracijo ali celo samo ocetno kislino (opozoriti pa moramo, da z uporabljeno kromatografsko metodo nismo mogli ugotavljati koncentracije enega od pomembnejših metabolnih produktov vampnih prevotel, t.j. jantarne kisline). Očiten padec koncentracije KMK je presenetljiv predvsem v primeru seva *P. bryantii* B_14^T, saj pri tem sevu nismo ugotovili vpliva dialil sulfida na spremembo v vrednosti pH v gojišču v primerjavi s spremembo vrednosti pH po rasti v kontrolnem gojišču. Očitno dialil sulfid vpliva na metabolizem tega seva, kot smo ugotavljali že po ugotavljanju koncentracije skupnih celičnih beljakovin po rasti tega seva v prisotnosti dialil sulfida. Narava tega vpliva pa je zaenkrat neznana. Sprememba koncentracije KMK v gojišču z dialil sulfidom po rasti seva *P. ruminicola* 23^T je v skladu z merjenji motnosti, vrednosti pH in koncentracije skupnih celičnih beljakovin in odraža jasno inhibitoren vpliv dialil sulfida na rast tega organizma.

Pri ugotavljanju vpliva dialil sulfida na produkcijo KMK pri sevu *B. fibrisolvens* DSMZ 3071^T smo po pričakovanjih odkrili predvsem masleno kislino. Ugotovljene koncentracije KMK po rasti v gojišču z dialil sulfidom se niso bistveno razlikovale od tistih po rasti v kontrolnem gojišču, kar se sklada z ugotovitvami po merjenju sprememb v motnosti gojišča, ne pa z ugotovitvami po merjenju vrednosti pH in koncentracije skupnih celičnih beljakovin. Tudi v primeru seva *B. fibrisolvens* DSMZ 3071^T lahko ugotovimo, da dialil sulfid do neke mere zavira rast tega organizma in vpliva na njegov metabolizem, kar je popolnoma v nasprotju z ugotovitvami Caldwella in Danzerjeve (1988).

Pri ugotavljanju vpliva dialil sulfida na produkcijo KMK pri sevu *F. succinogenes* S85 smo, tako kot v primeru seva *B. fibrisolvens* DSMZ 3071^T, odkrili predvsem masleno kislino, kar je tudi popolnoma v nasprotju s pričakovanji. Ta organizem namreč kot glavna produkta fermentacije tvori ocetno in jantarno kislino. Zakaj smo v našem primeru odkrili le masleno kislino ni jasno. Vsekakor bi morali ta del poskusa ponoviti, da bi prišli do verodostojnih rezultatov. Nenavadno je tudi, da smo odkrili očiten padec koncentracije KMK po rasti tega seva v prisotnosti dialil sulfida, čeprav analiza motnosti gojišča,

vrednosti pH in koncentracije skupnih celičnih beljakovin ni kazala vpliva dialil sulfida na rast in metabolizem seva *F. succinogenes* S85.

Ugotovljene koncentracije KMK v gojiščih po rasti obeh ruminokokov so bile tako nizke, da jih pravzaprav ne moremo smiselno komentirati. Ker tudi po rasti v kontrolnem gojišču nismo odkrili večjih koncentracij ocetne kisline, ki je eden od glavnih fermentacijskih produktov teh organizmov, lahko le sklepamo, da je prišlo pri analizi KMK v primeru obeh ruminokokov do eksperimentalne napake in bi bilo zatorej ta del poskusa potrebno ponoviti.

Koncentracijo vodika po 28. uri rasti v gojišču brez in z dialil sulfidom smo ugotavljali le pri dveh sevih in sicer *R. albus* DSMZ 20455 in *B. fibrisolvens* DSMZ 3071^T. Pri sevu *R. flavefaciens* 007 S/6 produkcije vodika po rasti v prisotnosti dialil sulfida nismo preverjali, ker ga v predposkusu nismo odkrili že po rasti v kontrolnem gojišču. Pri sevu *B. fibrisolvens* DSMZ 3071^T smo presenetljivo ugotovili rahlo povečanje produkcije vodika po rasti v prisotnosti dialil sulfida, vendar sprememba v produkciji ni bila statistično značilna. Produkcijo vodika smo, spet proti pričakovanjem, odkrili tudi po inkubaciji seva *R. albus* DSMZ 20455 v gojiščih z dialil sulfidom, čeprav sodeč po spremembi motnosti gojišča in koncentracije skupnih celičnih beljakovin v primeru tega seva ne bi mogli govoriti o rasti. Smo pa, kot omenjeno na prejšnjih straneh, opazili znižanje vrednosti pH po inkubaciji v gojišču z dialil sulfidom, za kar pa takrat nismo imeli prave razlage. V primerjavi s produkcijo vodika v kontrolnem gojišču je sicer v prisotnosti dialil sulfida nastalo 3 do 4 krat manj vodika, vendar gre očitno kljub vsemu za določene metabolne reakcije, ki vodijo v nastanek manjših količin vodika in morda posledično tudi v padec vrednosti pH.

5.2 SKLEPI

Prisotnost dialil sulfida v gojišču je različno vplival na obseg in hitrost rasti, lastnosti in aktivnosti posameznih sevov.

- *Prevotella ruminicola* 23^T*:*

  - medtem ko je 0,9 mM koncentracija dialil sulfida v gojišču povzročila le rahel padec motnosti gojišča in vrednosti pH v gojišču v primerjavi z rastjo v kontrolnem gojišču, je po drugi strani povzročila opazen padec koncentracije skupnih celičnih beljakovin v tretjem in četrtem merjenju (t.j. na 1/4 oz. 1/3 v primerjavi s kontrolo po 15. in 28. urah inkubacije) in padec koncentracije KMK (le 58% v primerjavi s kontrolo) po 28. urni inkubaciji,
  - 9 mM koncentracija dialil sulfida je skoraj povsem zavrla rast ene in upočasnila rast druge paralelke, ki pa je po 28. urah inkubacije kljub temu dosegla podobno stopnjo rasti, sodeč po motnosti gojišča kot po rasti v kontrolnem gojišču in gojišču z 0,9 mM koncentracijo dialil sulfida. Podobna ugotovitev velja za spremembo vrednosti pH in koncentracije skupnih celičnih beljakovin pri paralelki, ki je zrastla, pri čemer pa ti vrednosti nista dosegli enakih vrednosti kot po rasti v kontrolnem gojišču ali gojišču z 0,9 mM koncentracijo dialil sulfida (padec vrednosti pH na 5,7 namesto 5,3 v primerjavi s kontrolo in približno za polovico manjša produkcija skupnih celičnih beljakovin). Produkcija KMK se je pri tej koncentraciji dialil sulfida zmanjšala na 17% v primerjavi s kontrolo,
  - ugotovimo lahko, da je sev *P. ruminicola* 23^T najbolj občutljiv na dialil sulfid, saj 0,9 mM povzroči za več kot polovico manjšo produkcijo skupnih celičnih beljakovin in za 1/3 manjšo produkcijo KMK, 9 mM koncentracija dialil sulfida pa upočasni ali popolnoma inhibira rast in povzroči močno zmanjšanje skupnih celičnih beljakovin in KMK.

- *Prevotella bryantii* B_14^T:
    - tako 0,9 kot 9 mM koncentracija dialil sulfida v gojišču ne upočasnita rasti sodeč po spremembah v motnosti gojišča in vrednosti pH v gojišču v primerjavi s kontrolo. Obe koncentraciji pa povzročita padec koncentracije skupnih celičnih beljakovin (1/3 do 1/2 v primerjavi s kontrolo) in KMK (za 30 oz. 70% v primerjavi s kontrolo),
    - ugotovimo lahko, da dialil sulfid v gojišču ne upočasni rasti seva *P. bryantii* B_14^T, vpliva pa na metabolizem tega mikroorganizma.
- *Butyrivibrio fibrisolvens* DSMZ 3071^T:
    - 0,9 in 9 mM koncentracija dialil sulfida nista upočasnili rasti in vplivali na metabolizem seva *B. fibrisolvens* 3071^T sodeč po ugotovljenih spremembah motnosti in koncentracije KMK v gojišču, sta pa povzročili manjši padec vrednosti pH in koncentracije celičnih beljakovin v primerjavi z vrednostmi, ki smo jih ugotovili po rasti v kontrolnem gojišču. Dokaj presenetljivo smo po rasti v gojišču z dialil sulfidom odkrili rahlo povečano produkcijo vodika, vendar je bila sprememba v produkciji v primerjavi s kontrolo statistično neznačilna,
    - ugotovimo lahko, da dialil sulfid v gojišču ne upočasni rasti seva *B. fibrisolvens* DSMZ 3071^T, vpliva pa na metabolizem tega mikroorganizma, vendar drugače kot v primeru *P. bryantii* B_14^T.
- *Fibrobacter succinogenes* S85:
    - 0,9 in 9 mM koncentracija dialil sulfida nista upočasnili rasti in vplivali na metabolizem seva *F. succinogenes* S85 sodeč po ugotovljenih spremembah motnosti gojišča, vrednosti pH in koncentracije skupnih celičnih beljakovin, sta pa povzročili opazen padec (do 40%) koncentracije KMK,
    - ugotovimo lahko, da dialil sulfid v gojišču ne upočasni rasti seva *F. succinogenes* S85, vpliva pa na metabolizem tega mikroorganizma, vendar drugače kot v primerih *P. bryantii* B_14^T in *B. fibrisolvens* DSMZ 3071^T.

- *Ruminococcus flavefaciens* 007 S/6:
  - v primeru ruminokokov smo preverjali vpliv bistveno višjih koncentracij dialil sulfida na rast in metabilozem kot v primeru prej opisanih sevov. Rast seva *R. flavefaciens* 007 S/6 je bila popolnoma inhibirana v prisotnosti 81 mM in 135 mM koncentracije dialil sulfida, medtem ko je 27 mM koncentracija dialil sulfida inhibirala rast le do 13. ure inkubacije, nato pa je sodeč po naraščanju motnosti gojišča in koncentracije skupnih celičnih beljakovin pri eni od obeh paralelk prišlo do rasti. Ta je po 28. urah inkubacije privedla do približno polovičnih vrednosti spremembe motnosti in koncentracije skupnih celičnih beljakovin v primerjavi s kontrolo. Vrednosti pH se niso spreminjale v skladu z opaženimi spremembami, analiza KMK pa ni dala verodostojnih rezultatov,
  - ugotovimo lahko, da dialil sulfid pri tako visokih koncentracija skoraj popolnoma inhibira rast seva *R. flavefaciens* 007 S/6.
- *Ruminococcus albus* DSMZ 20455:
  - dialil sulfid je pri uporabljenih koncentracijah popolnoma inhibiral rast seva *R. albus* DSMZ 20455,
  - kljub navidezno popolni inhibiciji rasti seva *R. albus* DSMZ 20455 smo po inkubaciji v gojiščih z dialil sulfidom odkrili rahlo znižanje vrednosti pH in tudi vodik. Produkcija vodika je bila sicer 3 do 4 krat manjša kot po rasti v kontrolnem gojišču, kljub temu pa kaže na potek nekaterih metabolnih reakcij.

6 POVZETEK

Vamp prežvekovalcev naseljuje veliko število striktno anaerobnih mikroorganizmov, ki jim ugodne razmere omogočajo hitro rast in razmnoževanje. Ker prežvekovalci nimajo lastnih polisaharidaz, mikrobni simbionti v vampu encimatsko razgradijo polisaharide celičnih sten rastlinskih celic, ki so izjemno pomemben del živalske krme, in jih v fermentacijskih procesih ob izplenu določenega dela energije prevedejo v redukcijske stranske produkte. Prežvekovalci pridobijo energijo in gradnike za biosintezo sebi lastnih snovi od svojih mikrobnih simbiontov iz vampa v obliki kratkoverižnih maščobnih kislin in mikrobnih beljakovin oziroma njihovih razpadnih produktov. Kljub temu, da se je opisani proces optimiziral v procesu dolgotrajne naravne selekcije, lahko rejci z določenimi posegi povzročijo spremembe v sestavi ali aktivnosti mikrobne združbe vampa, ki se odražajo na učinkovitosti živalske produkcije.

Ker je v Evropski skupnosti s 1. januarjem 2006 raba antibiotikov kot krmnih dodatkov prepovedana, iščemo alternativne snovi, kot so probiotiki, prebiotiki, encimi in tudi rastlinski izvlečki, s katerimi bi lahko nadomestili krmne antibiotike. V pričujoči diplomski nalogi smo tako preučevali vpliv rastlinskega izvlečka česna, t.i. dialil sulfid, na rast in tvorbo skupnih celičnih beljakovin, kratkoverižnih maščobnih kislin in vodika pri šestih sevih različnih vampnih bakterijskih vrst.

Izbrali smo šest sevov, ki (i) so bili že vključeni v predhodne raziskave, (ii) so dokaj dobro poznani in dostopni, (iii) predstavljajo tiste skupine v mikrobni združbi vampa, ki jim pripisujemo precejšen pomen, (iv) so imeli različno strukturo celične stene in (v) so vsaj nekateri med njimi tvorili tudi vodik kot fermentacijski produkt. Dialil sulfid naj bi namreč deloval na tiste procese v vampu, ki vodijo v nastanek za naravo obremenilnih fermentacijskih produktov (toplogredni plini, predvsem CO_2 in metan). Zato je pomembno tudi zaviranje produkcije vodika, ki je najpomembnejši prekurzor za tvorbo metana v vampu. V poskusu smo spremljali spremembe v motnosti oz. optični gostoti (OD) in vrednosti pH gojišča po rasti, skupno koncentracijo novonastalih celičnih beljakovin, produkcijo nastalih KMK in vodika.

V predposkusu smo najprej preučevali rast šestih izbranih sevov v kontrolnem gojišču z meritvami motnosti gojišča in na osnovi pridobljenih podatkov pripravili t.i. rastne krivulje iz katerih smo lahko odčitali hitrost in obseg rasti posameznih sevov. Nato smo izvedli sam poskus, ki smo ga razdelili na dva dela. V prvem delu smo preučevali vpliv dialil sulfida v dveh koncentracijah (t.j. 0,9 in 9 mM) na seve *Prevotella ruminicola* 23^T, *Prevotella bryantii* B_14^T, *Butyrivibrio fibrisolvens* DSMZ 3071^T in *Fibrobacter succinogenes* S85. Ugotovili smo, da dialil sulfid v 0,9 mM koncentraciji ni zavrl same rasti sodeč po spremembi motnosti gojišča pri naštetih sevih, je pa pri posameznih sevih povzročil bodisi nižjo produkcijo skupnih celičnih beljakovin, bodisi vrednosti pH ali kratkoverižnih mašobnih kislin ali kombinacije naštetih parametrov. Tako je kljub navidezno nespremenjeni rasti močno zmanjšal produkcijo skupnih celičnih beljakovin in KMK pri obeh prevotelah, produkcijo KMK in vrednost pH pri sevu *Butyrivibrio fibrisolvens* DSMZ 3071^T in samo produkcijo KMK pri sevu *F. succinogenes* S85. Dialil sulfid v 9 mM koncentraciji je močno vplival na rast seva *P. ruminicola* 23^T, ki je med vsemi preučevanimi sevi na to snov očitno najbolj občutljiv, medtem ko na ostale seve ni vplival bistveno bolj ali drugače kot v 0,9 mM koncentraciji.

V drugem delu poskusa smo preučevali vpliv treh višjih koncentracij dialil sulfida na rast dveh predstavnikov iz rodu *Ruminococcus*. Dialil sulfid v 81 in 135 mM koncentraciji je popolnoma inhibiral rast sevov *R. flavefaciens* 007 S/6 in *R. albus* DSMZ 20455, čeprav smo pri sevu *R. albus* DSMZ 20455 opazili rahel padec vrednosti pH in povečanje koncentracije vodika po 28. urni inkubaciji. Dialil sulfid v 27 mM koncentraciji je popolnoma zavrl rast seva *R. albus* DSMZ 20455, omogočil pa je zapoznelo in počasnejšo rast seva *R. flavefaciens* 007 S/6.

Ugotovili smo, da dialil sulfid različno učinkovito vpliva na rast različnih vampnih bakterij in da različno vpliva tudi na metabolne procese teh bakterij. Zato je glede na izjemno kompleksnost vampne mikrobne združbe, ki jo sestavlja na stotine, morda pa celo na tisoče različnih mikrobnih vrst, vpliv učinkovine, kot je dialil sulfid, na celoten vampni ekosistem in procese v njem zelo težko razložiti.

7 VIRI

Abram V. 2001. Vaje iz biokemije za študente agronomije, zootehnike in živilstva. 3. izdaja. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za živilstvo: 64 str.

Amagase H., Petesch B.L., Matsuura H., Kasuga S., Itakura Y. 2001. Recent Advances on the Nutritional Effects Associated with the Use of Garlic as a Supplement. Intake of Garlic and Its Bioactive Components. American Society for Nutritional Sciences, 131: 955S-962S

Ankri S., Mirelman D. 1999. Antimicrobal properties of allicin from garlic. Microbes and Infection, 2: 125-129

Avguštin G., Wallace J.R., Flint J.H. 1997. Phenotypic Diversiting among Ruminal isolates of *Prevotella ruminicola*: Proposal of *Prevotella brevis* sp. nov., *Prevotella bryantii* sp. nov., and *Prevotella albensis* sp. nov. and Redefiniton of *Prevotella ruminicola*. International Journal of Systematic Bacteriology, 47, 2: 284-288

Bryant M.P. 1972. Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. Microbes and Infection, 2: 125-129

Bryant M.P. 1986. Ruminococcus. V: Bergey's Manual Systematic Bacteriology. Volume 2. Sneath P.H.A. (ed.). Baltimore, Williams & Wilkins: 1093-1097

Busquet M., Calsamiglia S., Ferret A., Kamel C. 2005. Screeninig for effects of plant extracts and active compounds of plants on diary cattle rumen microbial fermentation in a continuous culture system. Animal Feed Science and Technology, 123-124: 597-613

Caldwell D.R., Danzer C.J. 1988. Effects of Allyl Sulfides on the Growth of Predominant Gut Anaerobes. Current Microbiology, 16: 237-241

Caldwell D.R., Murray K.M. 1986. Some effects of ethyl alcohol on the growth of rumen bacteria. Current Microbiology, 14: 193-197

Callaway T.R., Russel J.B. 1999. Selection of a Highly Monensin-Resistant Prevotella bryantii Subpopulation with Altered Outer Membrane Characteristics. Applied and Environmental Microbiology, 65: 4753-4759

Cardozo P.W., Calsamiglia S., Ferret A., Kamel C. 2004. Effects of natural plant axtracts on ruminal protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. Journal of American Science, 82: 3230-3236

Cavallito C.J., Bailey J.H. 1944. Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. 1. Isolation, physical properties, and antibacterial action. Journal of American Chemistry Society, 66: 1950-1951

Chemblink Online Informational Database of Chemicals from China: Suppliers of additives & reagents, agrochemicals. http://www.chemblink.com/products/592-88-1.htm (9. sep. 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

Dehority B.A. 1991. Effects of microbial synergism on fiber digestion in rumen. Proceedings of Nutrition Society, 50: 149-159

Delaha W.C., Garagusi V.F. 1985. Inhibition of Mycobacteria by Garlic Extract (*Allium sativum*). Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 27, 4: 485-486

Dorman H.J.D., Deans S.G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. Journal of Applied Microbiology, 88, 2: 308-316

Graham T. 2005. Conservation of traditional buildings. http://www.tonygraham.co.uk/house_repair/wattle_daub/rumen.jpg (15. jan. 2007)

Greathead H. 2003. Plants and plant extracts for improving animal productivity. Proceedings of the Nutrition Society, 62: 279-290

Harris J.C., Cottrell S.L., Plummer S., Lloyd D. 2001. Antimicrobial properties of Allium Sativum (garlic). Applied Microbiology and Biotechnology, 57: 282-286

Hespell R.B., Wolf R., Bothast R.J. 1987. Fermentation of xylans by Butyrivibrio fibrisolvens and other ruminal bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 53: 2849-2853

Hobson P.N. 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. 1988. The rumen microbial ecosystem. London and New York, Elsevier Applied Science: 527 str.

Hungate R.E. 1957. Microorganisms in the rumen of cattle fed a constant ration. Canadian Journal of Microbiology, 3: 289-311

Hungate R.E. 1960. Symposium: Selected topics in microbial ecology. 1. Microbial ecology of the rumen, 24: 353-364

Koike S., Kobayashi Y. 2001. Development and use of competitive PCR assays for the rumen cellulolytic bacteria: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*. FEMS Microbiology Letters, 204: 361–366

Lawson L.D. 1998. Garlic: a review of its medicinal effects and indicated active compounds: 176-209. V: Lawson L.D., Bauer R. (eds.). Phytomedicines of Europe: Chemistry and Biological Activity. ACS Symposium Series, vol. 691. Washington, DC. American Chemical Society: 176-209

Lawson L.D., Hughes B.G. 1992. Characterization of the formation of allicin and other thiosulfinates from garlic. Planta Medica, 58: 345-350

Lowry O.H., Rosenbrough A.L., Farr N.H., Randal R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, 193: 265-275

Mackie I.R., McSweeney S.R., Aminov I.R. 2001. Rumen. V: Encyclopedia of Life Sciences. London, Nature Publishing Group: 1-11

Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 2000. Brock Biology of microorganisms. 9th edition. Upper Saddle River, Prentice Hall: 991 str.

Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 2003. Brock Biology of microorganisms. 10th edition. Upper Saddle River, Prentice Hall: 1019 str.

Newbold C.J., Wallace R.J., Watt N.D., Richardson A.J. 1988. Effect of the novel ionophore tetronasin (ICI 139603) on ruminal microorganismc. Applied and Environmental Microbiology, 54: 544-547

Nolan J.V. 1975. Quantitative models of nitrogen metabolism in sheep. V: Digestion and metabolism in the ruminants. McDonald I.W., Warner A.C.I. (eds.), Armidale, University of New England Publishing Unit: 416-431

O'Gara E.A., Hill D.J., Maslin D.J. 2000. Activities of Garic oil, Garlic Powder, and Their Diallyl Constituents against Helicobacter pylori. Applied and Environmental Microbiology, 66, 5: 2269-2273

Opinion of the Economic and Social Committee on the »Proposal for a Regulation of the European Parliament and the Council on additives for use in animal nutrition« (COM (2002) 153 final – 2002/0073 (COD)) (2003/C61/08). Official Journal of the European Union, 14.03.2003, vol. 46, C61/43

Orešnik A., Kermauner A. 2002. Splošna prehrana živali. Skripta. Domžale, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za zootehniko: 48–49

Patra A.K., Kamra D.N., Agarwal N. 2006. Effect of plant extracts on in vitro methanogenesis, enzyme activities and fermentation of feed in rumen liquor of buffalo. Animal Feed Science and Technology, 128: 276-291

Petauer T. 1993. Leksikon rastlinskih bogastev. 1. izdaja. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 32

Reed P.W. 1979. Ionophores. Methods in Enzymology, 55: 435-454

Russel J.B. 1991. Intracellular pH of acid – tolerant ruminal bacteria. Applied and Environmental and Microbiology, 57,11: 3383-3384

Russel J.B., Rychlik J.L. 2001. Factors that alter rumen microbial ecology. Science, 292: 1119-1122

Russel J.B., Houlihan A.J. 2003. Ionophore resistance of ruminal bacteria and its potential impact on human health. FEMS Microbiology Reviews, 27: 65-74

Shadkchan Y., Shemesh E., Mirelman D., Miron T., Rabinkov A., Wilchek M., Osherov N. 2004. Efficacy of allicin, the reactive molecule of garlic, in inhibiting *Aspergillus* spp. In vitro, and in a murine model of disseminated aspergillosis. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 53: 832-836

Stewart C.S., Duncan S.H. 1985. The effect of avoparcin on cellulolytic bacteria of the ovine rumen. Journal of Genetic Microbiology, 131: 427-435

Stewart C.S., Flint H.J., Bryant M.P. 1997. The rumen bacteria. V: The rumen microbial ecosystem. 2nd edition. Hobson P.N., Stewart C.S. (eds.). London, Blackie Academic & Professional, an imprint of Chapman & Hall: 10-72

Van Nevel C.J., Demeyer D.I. 1977. Effect of monensin on rumen metabolism *in vitro*. Applied and Environmental Microbiology, 34: 251-257

Vatovec S. 1971. Fiziologija prebave v predželodcih prežvekovalcev. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za zootehniko: 46 str.

Varel V.H., Dehority B.A. 1989. Cellulolytic bacteria and protozoa from bison, cattle-bison hybrids, and cattle fed three alfalfa-corn diets. Applied and Environmental Microbiology, 55: 148-153

Verbič J., Sušin J. 2005. Izpusti toplogrednih plinov in amonijaka v kmetijstvu ter možnosti za njihovo zmanjšanje. V: Posvetovanje. Varstvo zraka '05: zbornik predavanj, Ljubljana, 18-20 maj 2005. Ljubljana, Zavod za tehnično izobraževanje: 41–51

Wallace R.J. 2004. Antimicrobial properties of plant seconday metabolites. V: Symposium on »Plants as animal foods: a case of catch 22?«. Proceedings of the Nutrition Society, 63: 621-629

Wallace R.J., Arthaud L., Newbold C.J. 1994. Influence of Yucca shidigera extract on ruminal ammonia concentrations and ruminal microorganisms. Applied and Environmental Microbiology, 60: 1762-1767

Wallace R.J., McEwan N. R., McIntosh F.M., Teferedegne B., Newbold C.J. 2002. Natural products as manipulators of rumen fermentation. Asian Australasian Journal of Animal Science, 10: 1458-1468

Wallace R.J., McKain N., Broderick G.A. 1993. Breakdown of different peptides by *Prevotella* (*Bacteroides*) *ruminicola* and mixed microorganisms from the sheep rumen. Current Microbiology, 26: 333-336

Wang Y., McAllister T.A., Yabke L.J., Cheeke L.M. 2000. Effect of steroidal saponin from Yucca schidigera extract on ruminal microbes. Journal of Applied Microbiology, 88: 887-896

Willfort R. 1983. Zdravilne rastline in njih uporaba. 3. izdaja. Maribor, Obzorja: 507 str.

Williams A.G., Coleman G.S. 1997. The rumen protozoa. V: The rumen microbial ecosystem. 2nd edition. Hobson P.N., Stewart C.S. (eds.). London, Blackie Academic & Professional, an imprint of Chapman & Hall: 467-491

Wolin M.J., Miller T.L., Stewart C.S. 1997. Microbe-microbe interactions. V: The rumen microbial ecosystem. 2nd edition. Hobson P.N., Stewart C.S. (eds.). London, Blackie Academic & Professional, an imprint of Chapman & Hall: 467-491

ZAHVALA

Za nastanek diplomske naloge se najlepše zahvaljujem vam mentor, prof. dr. Goradz Avguštin, za strokoven pregled diplomske naloge, pomoč pri izdelavi in voljo, ki ste jo vložil v nastanek diplomske naloge. Zares iskrena hvala. Zahvaljujem se tudi recenzentu prof. dr. Francu Viktorju Nekrepu za kritično presojo diplomske naloge ter predsedniku komisije prof. dr. Juretu Poharju.

Iskrena hvala tebi Darja, ker si nas opogumljala tekom poskusa, skupaj z nami vstajala ob nemogočih urah, se smejala in nam pomagala pri problemih, ki so nastajali. Hvala tudi za veliko znanja, ki si nam ga posredovala.

Skozi študijska leta mi je neštetokrat pomagala ga. Sabina Knehtl. Vedno je našla pravo besedo in rešitev ter si vzela čas, ko sem potrebovala pomoč. Hvala za vašo prijaznost.

Hvala mojim staršem atiju Edvinu in mami Danili, ker sta najboljša starša na svetu in ker brez vaju ne bi bila to kar sem. Hvala vama, da sta vedno verjela vame, kljub mojim nenadnim odločitvam. Velika zahvala gre vama, ker sta mi študij omogočila in mi pomagala v vsem kar sem potrebovala. Iskrena hvala, ker me imata rada. Hvala sestrici Ireni in bratcu Borutu za skupna presmejana in preštudirana študijska leta ter volji, ki smo si jo drug drugemu dajali v Ljubljani. Res smo dober team. Hvala tudi moji stari mami Ivanki, ki je razumela, da je treba med študijem tudi veliko videti in mi je to tudi omogočila.

Najlepša hvala teti Ani in stricu Jozotu. Vidva sta zares razumela kako lepa so študentska leta in sta me zato velikokrat branila, ko se kaj ni izteklo kot bi se moralo. Hvala tudi za topel sprejem, ki sem ga bila pri vaju vedno deležna tudi, ko sem se prikazala kot nenapovedan obisk. Vedno sta mi pomagala v vsem kar sem takrat potrebovala.

Hvala najboljši cimri Tadeji, ki je prenašala moje zgodnje vstajanje in pogovore dolgo v noč. Zahvaljujem se tudi prijateljem, s katerimi je ostala marsikatera noč neprespana, trenutki pa nepozabni. Res smo se imeli lepo.

Peter, Renata in Jana iskrena hvala za pomoč pri poskusu in vztrajnost, ki smo si jo delili. Skupaj nam je uspelo priti do cilja.

Hvala tebi Domen za prelepe trenutke, iskrene nasmehe in ljubezen.

Iz srca iskrena hvala vsem.

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Jana MISLEJ

VPLIV ČESNOVEGA IZVLEČKA DIALIL SULFIDA NA RAST IZBRANIH BAKTERIJSKIH SEVOV IZ VAMPA TER TVORBO KRATKOVERIŽNIH MAŠČOBNIH KISLIN IN PLINOV

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2007