

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Vesna ŠENTJURC

**VPLIV KONDENZIRANIH IN HIDROLIZIRAJOČIH TANINOV NA  
METANOGENO AKTIVNOST IN MIKROBNO BIOSINTEZO V  
VAMPU**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**INFLUENCE OF CONDENSED AND HYDROLYZABLE TANNINS  
ON METHANOGENIC ACTIVITY AND MICROBIAL  
BIOSYNTHESIS IN RUMEN**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo predstavlja zaključek univerzitetnega medoddelčnega študija mikrobiologije. Delo je bilo opravljeno na Katedri za mikrobiologijo in mikrobno biotehnologijo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je dne 27. maja 2005 za mentorico imenovala prof. dr. Romano Marinšek Logar. Za recenzenta je bil imenovan prof. dr. Gorazd Avguštin.

Mentorica: prof. dr. Romana Marinšek Logar

Recenzent: prof. dr. Gorazd Avguštin

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Peter Raspor  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

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

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

Datum zagovora:

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

Vesna Šentjurc

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn  
DK UDK 636.084.4: 636.085.1: 547.98 (043) = 163.6  
KG prehrana živali/taninski izvlečki/tanini/*in vitro* fermentacija/metan/vamp/mikrobna biomasa/ATP/ATP – luciferazni test  
AV ŠENTJURC, Vesna  
SA MARINŠEK LOGAR, Romana (mentorica)/AVGUŠTIN, Gorazd (recenzent)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije  
LI 2009  
IN VPLIV KONDENZIRANIH IN HIDROLIZIRAJOČIH TANINOV  
NA METANOGENO AKTIVNOST IN MIKROBNO  
BIOSINTEZO V VAMPU  
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
OP X, 46 str., 11 pregl., 16 sl., 81 vir.  
IJ sl  
JI sl/an  
AI V nalogi smo proučevali vpliv različnih taninskih izvlečkov na metanogeno aktivnost in mikrobno biosintezo v vampu. Uporabili smo tri različne taninske izvlečke (F75, QUE, in TAK) v različnih koncentracijah (0,33, 0,67 in 1,33 mg/ml gojišča). Produkcijo metana smo izmerili po 24 in 48 urah *in vitro* fermentacije celuloze in škroba. Vsebnost metana v plinu smo ugotavljali s plinsko kromatografijo. V vzorcih smo ugotavljali tudi količino mikrobne biomase z analizo vsebnosti ATP z ATP-luciferaznim testom. Dodatek taninskih izvlečkov je statistično značilno zmanjšal metanogenezo v primerjavi s kontrolnim vzorcem, kjer ni bilo prisotnih taninskih izvlečkov, medtem ko je količina ATP, ki odraža raven mikrobne biosinteze, ob dodatku taninskih izvlečkov narasla v primerjavi s kontrolnim vzorcem. Po 24 urni fermentaciji celuloze sta na nastanek metana najbolj zaviralno delovali največji koncentraciji (1,33 mg/ml gojišča) farmatana in taninske kisline, po 48 urni inkubaciji pa največji koncentraciji izvlečka kebračo in taninske kisline. Po 24 in 48 urni fermentaciji škroba je najbolj inhibiral tvorbo metana dodatek največje koncentracije farmatana, kebračo izvlečka in taninske kisline. Količina mikrobne ATP se je po 24 urah fermentacije celuloze povečala ob dodatku 0,33 in 0,67 mg F75/ml gojišča in 0,33 mg QUE/ml gojišča. Po 48 urah se je količina mikrobne biomase povečala le ob dodatku 1,33 mg TAK/ml gojišča. Po 24 urni inkubaciji s škrobom se je količina mikrobne ATP povečala ob dodatku vseh taninskih izvlečkov, po 48 urni inkubaciji pa se je količina ATP povečala v kontrolnem vzorcu in bila manjša v vzorcih z dodatkom taninskih izvlečkov.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDC 636.084.4: 636.085.1: 547.98 (043) = 163.6  
CX animal nutrition/tannins/tannin extracts/*in vitro*  
fermentation/methane/rumen/ATP/ATP luciferase assay  
AU ŠENTJURC, Vesna  
AA MARINŠEK LOGAR, Romana(supervisor)/AVGUŠTIN, Gorazd (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in  
Microbiology  
PY 2009  
TI INFLUENCE OF CONDENSED AND HYDROLYZABLE TANNINS ON  
METHANOGENIC ACTIVITY AND MICROBIAL BIOSYNTHESIS IN  
RUMEN  
DT Graduation Thesis (University studies)  
NO X, 46 p.,11 tab., 16 fig., 81 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB The aim of my graduation thesis was to determine the influence of different tannin extracts on methanogenic activity and microbial biosynthesis in rumen. Three different tannin extracts (F75, QUE and TAK) with different concentrations (0,33, 0,67 and 1,33 mg/ml media) were used. After 24 and 48 hours *in vitro* cellulose and starch fermentation methane production was measured. The production of methane was measured by gas chromatography. Additionally, in all samples beside methane microbial biomass was measured as ATP concentration by ATP luciferase assay. Statistically, the addition of tannin extracts characteristically decreased methanogenic activity in comparison with the control samples without tannin extracts. However, tannin extracts increased the quantity of ATP, which reflects the level of microbial biosynthesis, in comparison with the control samples. After 24 hours of cellulose fermentation the quantity of methane was decreased by the highest concentration (1,33 mg/ml media) of farmatan and tannic acid and after 48 hours the quantity of methane was decreased by the highest concentration of quebracho extract and tannic acid. After 24 and 48 hours of starch incubation the production of methane was decreased to the highest degree by the highest concentration of farmatan, quebracho extract and tannic acid addition. The quantity of microbial ATP increased after 24 hours of cellulose fermentation by the addition of 0,33 in 0,67 mg F75/ml media and 0,33 mg QUE/ml media. After 48 hours the quantity of microbial ATP increased only by the addition of 1,33 mg TAK/ml media. After 24 hours of incubation with starch the quantity of microbial ATP increased by the addition of all tannin extracts and after 48 hours of incubation the quantity of microbial ATP increased in the control sample and was smaller in the samples with the addition of tannin extracts.

## KAZALO VSEBINE

<b>Ključna dokumentacijska informacija (KDI)</b>	<b>III</b>
<b>Key words documentation (KWD)</b>	<b>IV</b>
<b>Kazalo vsebine</b>	<b>V</b>
<b>Kazalo preglednic</b>	<b>VII</b>
<b>Kazalo slik</b>	<b>VIII</b>
<b>Kazalo prilog</b>	<b>IX</b>
<b>Okrajšave in simboli</b>	<b>X</b>
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZE	1
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	<b>2</b>
2.1 PREŽVEKOVALCI	2
2.2 VAMP	3
<b>2.2.1 Zgradba vampa</b>	<b>3</b>
<b>2.2.2 Mikroorganizmi v predželodcih prežvekovalcev</b>	<b>4</b>
2.2.2.1 Bakterije	4
2.2.2.2 Praživali	5
2.2.2.3 Glive	5
2.2.2.4 Metanogene arheje	5
2.2.2.5 Bakteriofagi	6
2.3 TANINI	6
<b>2.3.1 Vrste taninov</b>	<b>6</b>
2.3.1.1 Hidrolizirajoči tanini	6
2.3.1.2 Kondenzirani tanini	8
<b>2.3.2 Delovanje taninov</b>	<b>9</b>
2.3.2.1 Vpliv taninov na mikroorganizme	10
2.4 METAN	11
<b>2.4.1 Lastnosti metana</b>	<b>11</b>
<b>2.4.2 Vpliv metana na okolje</b>	<b>12</b>
2.5 UGOTAVLJANJE KOLIČINE MIKROBNE BIOMASE	13
<b>2.5.1 Bioluminiscenca, merjenje ATP</b>	<b>13</b>
<b>3 MATERIALI IN METODE</b>	<b>15</b>
3.1 SUBSTRATI	15

3.2 TANINSKI IZVLEČKI	15
<b>3.2.1 Farmatan</b>	<b>16</b>
<b>3.2.2 Taninska kislina</b>	<b>16</b>
<b>3.2.3 Kebračo</b>	<b>16</b>
	17
3.3 PLINSKI (HOHENHEIMSKI) TEST	18
3.4 ANALIZA METANA	20
<b>3.4.1 Priprava materiala za določanje produkcije bioplina in metana</b>	<b>20</b>
<b>3.4.2 Merjenje produkcije bioplina</b>	<b>21</b>
<b>3.4.3 Analiza vsebnosti metana v bioplinu</b>	<b>21</b>
3.5 UGOTAVLJANJE KOLIČINE MIKROBNE BIOMASE	22
<b>3.5.1 Kemikalije za ATP-luciferazni test</b>	<b>22</b>
<b>3.5.2 Merjenje koncentracije ATP</b>	<b>22</b>
<b>3.5.3 Ekstrakcija ATP iz vzorcev</b>	<b>23</b>
<b>3.5.4 Priprava reagentov in merjenje ATP</b>	<b>23</b>
3.6 STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV	24
<b>4 REZULTATI</b>	<b>25</b>
4.1 VPLIV VRSTE IN KONCENTRACIJE TANINSKEGA IZVLEČKA NA METANOGENEZO IN KONCENTRACIJO MIKROBNEGA ATP	25
<b>4.1.1 Fermentacija celuloze po 24 urah <i>in vitro</i> inkubacije v vampnem soku ob         dodatku različnih koncentracij taninskih izvlečkov</b>	<b>25</b>
<b>4.1.2 Fermentacija celuloze po 48 urah <i>in vitro</i> inkubacije v vampnem soku ob         dodatku taninskih izvlečkov</b>	<b>26</b>
<b>4.1.3 Fermentacija škroba po 24 urah <i>in vitro</i> inkubacije v vampnem soku ob         dodatku taninskih izvlečkov</b>	<b>29</b>
<b>4.1.4 Fermentacija škroba po 48 urah <i>in vitro</i> inkubacije v vampnem soku ob         dodatku taninskih izvlečkov</b>	<b>31</b>
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	<b>33</b>
<b>6 POVZETEK</b>	<b>39</b>
<b>7 VIRI</b>	<b>40</b>
<b>ZAHVALA</b>	
<b>PRILOGE</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Fizikalno kemijske lastnosti metana (Methane, 2001):	11
Preglednica 2: Fizikalno kemijske lastnosti škroba in celuloze BWW 40 (Merck, Darmstadt, Nemčija, 2003; Arbocel <sup>®</sup> , J. Rettenmaier & Sohne, Nemčija, 2003)	15
Preglednica 3 : Sestava taninskih izvlečkov (Sigma-Aldrich, Nemčija; Roy Wilson Dickson, Velika Britanija; Vegetable, 2000)	15
Preglednica 4: Sestava raztopin A, B, C	18
Preglednica 5: Sestava redukcijske raztopine in puфра:	19
Preglednica 6: Količina taninskih izvlečkov (TI), substrata in gojišča	19
Preglednica 7: Kromatografske razmere in sestava kalibracijske mešanice za določanje metana	21
Preglednica 8: Volumen metana in koncentracija mikrobnega ATP v vapnem soku po 24 urah <i>in vitro</i> fermentacije celuloze ob dodatku različnih koncentracij taninskih izvlečkov	26
Preglednica 9: Volumen metana in koncentracija mikrobnega ATP v vampnem soku po 48 urah <i>in vitro</i> fermentacije celuloze ob dodatku različnih koncentracij taninskih izvlečkov	28
Preglednica 10: Volumen metana in koncentracija mikrobnega ATP v vampnem soku po 24 urah <i>in vitro</i> fermentacije škroba ob dodatku različnih koncentracij taninskih izvlečkov	30
Preglednica 11: Volumen metana in količina mikrobnega ATP v vampnem soku po 48 urah <i>in vitro</i> fermentacije škroba ob dodatku različnih koncentracij taninskih izvlečkov	32

## KAZALO SLIK

Slika 1: Zgradba vampa (Russell in Rychlik, 2001)	4
Slika 2: Kemijska struktura galotanina (Dunshea in sod., 2007)	7
Slika 3: Kemijska struktura elagitanina (Dunshea in sod., 2007)	7
Slika 4: Kemijska struktura taninske kisline (Chung in sod., 1998b)	7
Slika 5: Kemijska struktura kondenziranega tanina (McSweeney in sod., 2001)	8
Slika 6: Shema poskusov	17
Slika 7: Odvzem vampnega soka	18
Slika 8: Odčitavanje nastalega bioplina	20
Slika 9: Vpliv različnih koncentracij taninov na količino CH <sub>4</sub> v vampnem soku po 24 urah inkubacije s celulozo	25
Slika 10: Vpliv različnih koncentracij taninov na koncentracijo mikrobnega ATP v vampnem soku po 24 urah inkubacije s celulozo	25
Slika 11: Vpliv različnih koncentracij taninov na količino CH <sub>4</sub> v vampnem soku po 48 urah inkubacije s celulozo	27
Slika 12: Vpliv različnih koncentracij taninov na koncentracijo mikrobnega ATP v vampnem soku po 48 urah inkubacije s celulozo	27
Slika 13: Vpliv različnih koncentracij taninov na količino CH <sub>4</sub> v vampnem soku po 24 urah inkubacije s škrobom	29
Slika 14: Vpliv različnih koncentracij taninov na koncentracijo mikrobnega ATP v vampnem soku po 24 urah inkubacije s škrobom	29
Slika 15: Vpliv različnih koncentracij taninov na količino CH <sub>4</sub> v vampnem soku po 48 urah inkubacije s škrobom	31
Slika 16: Vpliv različnih koncentracij taninov na koncentracijo mikrobnega ATP v vampnem soku po 48 urah inkubacije s škrobom	31



## KAZALO PRILOG

- PRILOGA A: Vsebnost hlapnih maščobnih kislin (HMK), metana in razmerji med C2 in C3 ter prostornino metana in vsoto HMK v vavnem soku po 24 urah *in vitro* fermentacije celuloze ob dodatku različnih taninskih izvlečkov (preglednica 13, Kos, 2007)
- PRILOGA B: Vsebnost hlapnih maščobnih kislin (HMK), metana in razmerji med C2 in C3 ter prostornino metana in vsoto HMK v vavnem soku po 24 urah *in vitro* fermentacije škroba ob dodatku različnih taninskih izvlečkov (preglednica 14, Kos, 2007)
- PRILOGA C: Vpliv različnih koncentracij taninov na količino CH<sub>4</sub> in količino bioplina v vavnem soku po 24 in 48 urah inkubacije s celulozo oz. škrobom

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AMP	adenosine 5'-monophosphate (adenozin monofosfat)
ATP	adenosine 5'-triphosphate (adenozin trifosfat)
DTT	ditiotretitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid (etilendiamintetraacetat)
EU	Evropska unija
FAO	Food and Agriculture Organization of United Nations
F75	farmatan 75
PEG	polietilenglikol
QUE	taninski izvleček kebračo (quebracho) iz kebračo dreves vrste <i>Schinopsis balansae</i> in <i>Schinopsis lorentzii</i>
RLU	relative luminescent units (relativne luminiscenčne enote)
SS	suha snov
TAK	taninska kislina
TI	taninski izvleček
TRIS	hydroxymethylaminomethane (hidroksimetilaminometan)

## 1 UVOD

Ena pomembnih vej v kmetijstvu je živinoreja, ki predstavlja vir mesne hrane in je eden od tistih sektorjev gospodarstva, ki največ prispevajo k današnjim okoljskim problemom. V kmetijstvu in kmetijskih vedah bo potrebno veliko raziskav in razvoja v smeri ekološkega in ekonomskega pristopa, ki bo sprejemljiv za okolje. Znanstveniki opozarjajo, da bi ukrepi morali biti takojšnji in skrajni, če bi hoteli spremembe, ki jih že občutimo na lastni koži vsaj upočasniti, če že ne povsem zaustaviti.

V kmetijstvu so problematične zlasti emisije metana, zaradi anaerobne presnove v prebavilih prežvekovalcev in zaradi razgradnje iztrebkov. Produkcija metana predstavlja energetsko izgubo za prežvekovalca, poleg tega pa je metan eden izmed toplogrednih plinov in s tem močno onesnažuje okolje. Rešitev tega problema bi bila izgradnja naprav za izkoriščanje bioplina, medtem ko je druga alternativa, uporaba ne-antibiotičnih krmnih dodatkov, saj je uporaba prehranskih antibiotikov za pospeševanje produktivnosti in rasti domačih živali v EU od 01.01.2006 prepovedana. Alternativni vir ne-antibiotičnih krmnih dodatkov predstavljajo probiotiki, prebiotiki in rastlinski izvlečki.

Pomembni rastlinski izvlečki so tanini, ki so ena od sestavin krme prežvekovalcev. V naravi so zelo razširjeni. Imajo vlogo zaščite rastlin pred insekti, bakterijami, glivami in rastlinojedi. Rastline večinoma sintetizirajo kompleksno mešanico taninov, od katerih ena vrsta prevladuje. Na vsebnost le-teh vplivajo genetski in okoljski dejavniki (Mueller-Harvey, 1999).

Tanini tvorijo komplekse s hranljivimi snovmi, pa tudi z encimi in mikrobi v vampu. Velike koncentracije taninov v krmi zmanjšajo okusnost krme, njeno prebavljivost, izkoristek in zaužitje krme, medtem ko majhne koncentracije povečajo sintezo mikrobnih beljakovin, zmanjšajo razgradljivost beljakovin krme v predželodcih prežvekovalcev, kar vodi v manjšo produkcijo in izločanje metana v okolje (Makkar, 2003).

### 1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZE

Namen diplomske naloge je bil, ugotoviti, kako izbrani vrsti taninov (kondenzirani in hidrolizirajoči) vplivata na raven produkcije metana in priraščanje skupne mikrobne biomase v vampu prežvekovalca in pri katerih koncentracijah so ti vplivi statistično značilni.

V delu smo želeli preveriti sledečo hipotezo: izbrani vrsti taninov bosta zmanjšali raven metanogeneze v vampu, ne pa obsega mikrobne biosinteze. Ne moremo pa predvideti, pri katerih koncentracijah taninov bo vpliv statistično značilen. Rezultat bi bil ugoden, če tiste koncentracije, ki se običajno dodajajo krmi prežvekovalcev, zavirajo metanogenezo, ne pa mikrobne biosinteze.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 PREŽVEKOVALCI

Glede na vrsto hrane, s katero se prehranjujejo živalske vrste, so se v evolucijskem razvoju izoblikovale različne oblike prebavil. Rastlinojedi (herbivori) imajo daljša in bolj prostorna prebavila kakor mesojedi, ker je pri teh vrstah živali proces prebave dolgotrajnejši. Prežvekovalci zavzemajo med rastlinojedi posebno mesto. Med razvojem vrst so te živali v boju za obstanek razvile specifičen način prebave, ki jim omogoča določeno prednost pred drugimi rastlinojedi (Cestnik, 1994; Hobson, 1997).

Velika prednost in vrednost prežvekovalcev pred drugimi živalskimi vrstami je v tem, da lahko iz nekaterih enostavnih spojin s pomočjo mikroorganizmov ustvarja, podobno kot rastline, visokokakovostne spojine in jih uporabi za svojo rast. Druga velika prednost prežvekovalcev pa je sposobnost uporabe nekaterih visoko molekulskih in zelo razširjenih spojin, ki za človeka in monogastrične živali skoraj niso uporabne (npr. celuloza). Prav te lastnosti dajejo prežvekovalcem v živalskem svetu posebno mesto (Žgajnar, 1990).

Danes je znanih okoli 155 vrst prežvekovalcev in jih delimo na pet družin. To so *Giraffidae* (žirafe in okapi) z dvema rodovoma, *Cervidae* (jeleni) s 16 rodovi, *Antilocapridae* (vilorogi) z enim rodom, *Bovidae* (goveda) s 47 rodovi in *Tragulidae* (pritlikavi pižmarji) z dvema rodovoma. Družino *Camelidae* s tremi rodovi uvrščamo med pseudoruminante (polprežvekovalce). V evropskem prostoru sodijo k domačim prežvekovalcem govedo, drobnica, bivol in severni jelen, med avtohtone divje živeče pa zober, muflon, gams, alpski in pirenejski kozorog, koza bezoarka, moškatno govedo, navadni jelen, damjak, srnjak in los (Cestnik, 1994).

Živinorejcem je uspelo s selekcijo, izboljšano tehnologijo prehrane in različnimi zootehničnimi postopki izredno intenzivirati produkcijo domačih prežvekovalcev. Ta zavzema danes v svetu približno 70 % proizvodnje mesa in skoraj 100 % proizvodnje mleka. Intenzivirane rejske razmere pa so privedle tudi do okoljskih problemov, med katerimi je najbolj zaskrbljujoče globalno segrevanje ozračja, ki ga povzročajo povečane emisije toplogrednih plinov. Organizacija Združenih narodov za prehrano in kmetijstvo (FAO) je v svojem poročilu (2006) objavila, da živinorejski sektor ustvarja več emisij toplogrednih plinov, kot prometni sektor. Henning Steinfeld, vodja oddelka FAO za informacije o živinoreji in politiko živinoreje ter glavni avtor poročila, pravi: „Živinoreja je eden od največjih povzročiteljev današnjih najpomembnejših okoljskih težav. Za izboljšanje razmer je nujno potrebno ukrepanje.“ Živinoreja prispeva 37 % vsega metana. Metan je toplogredni plin z zelo velikim učinkom. Ima 24 krat večji toplogredni učinek kot CO<sub>2</sub> in je zato eden glavnih krivcev za nastanek učinka tople grede (FAO, 2006).

## 2.2 VAMP

Za podred prežvekovalcev (*Ruminantia*) je značilno, da imajo vse živalske vrste, ki mu pripadajo, štiridelni želodec (tri predželodce in pravi želodec) in da prežvekujejo. Ta posebnost jim je dala tudi ime.

Prebavni trakt prežvekovalcev je zgrajen iz treh predželodcev, in sicer vampa (rumen), kapice (reticulum) in prebiralnika (omasum). Sledi siriščnik (abomasum), tanko, slepo in debelo črevo. Vamp in kapica sta anatomsko sicer različna, funkcionalno pa sestavljata dokaj enoten prostor, ki ga označujemo kot retikulo-rumen. Sistem predželodcev je zgrajen tako, da je sposoben močnih kontrakcij in mešanja vsebine vampa (Žgajnar, 1990; Hobson, 1997). Sistem predželodcev ima zaradi kutane sluznice, odsotnosti lastnih prebavnih sokov posebno in odločilno vlogo v procesu prebave (Cestnik, 1994). Pravi želodec ali siriščnik (abomasum) je po svoji zgradbi in funkciji podoben kot pri monogastričnih živalih (Russell in Rychlik, 2001).

### 2.2.1 Zgradba vampa

#### **Vamp (rumen)**

Vamp je najboljšežnejši del prežvekovalčevih prebavil. Sestavljen je iz posameznih vreč, ki so med seboj ločene s stebrički. V grobem vreče razdelimo na dorzalne in ventralne. Notranja površina je bolj ali manj prekrita s papilami, ki zelo povečajo notranjo površino in s tem sposobnost za absorpcijo.

#### **Kapica (reticulum)**

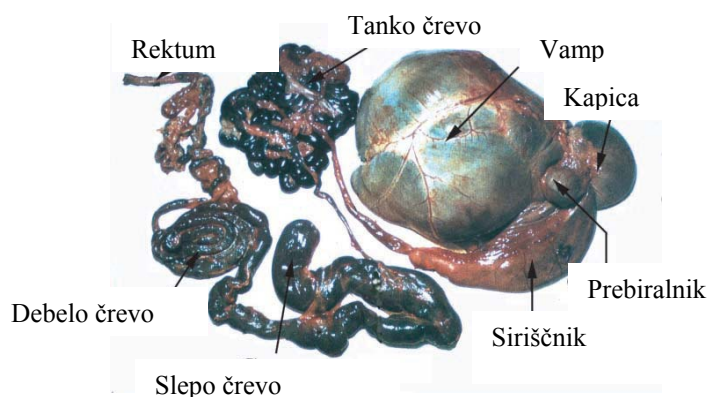
Deloma je ločena od vampa z dorzalno in ventralno retikularno gubo. Z vampom sestavljata precej enoten prostor. Tu je za mešanje vsebine poskrbljeno z motoriko vampa. Sestavni del retikulo-rumna je tudi izrigavanje nastalih plinov. Retikulo-rumen je tisti predel, kjer lahko neprestano potekajo procesi, saj je zagotovljena ustrezna toplota, mešanje, odvajanje plinov, absorpcija in potovanje ustreznih metabolitov, ostankov hrane in novonastalih mikroorganizmov v distalne dele prebavil.

#### **Prebiralnik (omasum)**

Leži med kapico in siriščnikom. V notranjosti so prisotne ploščam podobne gube, ki so pokrite s keratiniziranimi papilami, zaradi katerih teče material v smeri pravega želodca oziroma siriščnika.

#### **Siriščnik (abomasum)**

Je cevast organ, ki povezuje prebiralnik in tanko črevo. Stene so nagubane v podolgovate brazde, epitel pa je pokrit s sekretornimi celicami. Njihovi izločki so enaki kot v želodcih monogastričnih živali (Žgajnar, 1990; Russell in Rychlik, 2001).



Slika 1: Zgradba vampa (Russell in Rychlik, 2001)

Prežvekovanje je proces po katerem je celotna skupina živali dobila ime. Njen osnovni namen je, da se hrana dodobra mehansko razgradi. Prežvekovanje lahko razdelimo v štiri faze. To so: vračanje hrane v ustno votlino (regurgitacija), ponovno žvečenje (remastikacija), ponovno slinjenje (reinsalivacija) in ponovno požiranje (redegluticija) (Cestnik, 1994).

## 2.2.2 Mikroorganizmi v predželodcih prežvekovalcev

Vampni mikrobnio ekosistem predstavlja kompleksen konzorcij različnih mikrobnio populacij, ki živijo v simbiozi z gostiteljem in delujejo sinergistično (Kamra, 2005).

Najpomembnejši procesi prebave pri prežvekovalcih potekajo v predželodcih, predvsem v vampu, ki zelo variira v prostornini, in sicer pri ovcah od 3-15 litrov in od 35-100 litrov pri govedu (Dehority, 2003). Razgradnja hranil poteka z encimi, ki jih izločajo mikroorganizmi. Lignocelulozna hranila pretvarjajo v hlapne maščobne kisline, in sicer očetno, propionsko in masleno kislino ter pline kot sta  $\text{CH}_4$  in  $\text{CO}_2$ . Povprečna sestava produciranelega plina je okrog 65 %  $\text{CO}_2$  in 35 %  $\text{CH}_4$ . Govedo, ovce in koze uporabijo acetat, propionat, butirac in mikrobnio biomaso kot biosintetske prekurzorje, vir energije in aminokislin (Kamra, 2005; Miller in Wolin, 2001; Madigan in sod., 2003).

Mikrobnio ekosistem vampa predstavlja bakterije, praživali, glive, metanogene arheje in bakteriofagi (Miller in Wolin 2001; Hobson, 1997). Osnovna značilnost mikroorganizmov v vampu je visoka stopnja prilagojenosti na specifične življenjske razmere v vampu. To so predvsem relativno visoka temperatura (39 °C), nevtralni pH (6,5), pomanjkanje kisika in živahen potek biokemičnih procesov (Cestnik, 1994; Madigan in sod. 2003; Hobson, 1997).

### 2.2.2.1 Bakterije

Bakterije imajo s svojimi encimi pri procesih prebave odločilno vlogo. Njihova koncentracija v retikulo-rumnu se običajno giblje od  $10^{10}$  do  $10^{11}$  celic/ml vampe vsebine (Kamra, 2005). Nekatere encime bakterije izločajo v okolico, nekateri pa delujejo vezani na bakterijsko celico. Glede na substrat, ki ga razgrajujejo, ločimo saharolitične, amilolitične, celulozitične, hemicelulozitične, proteolitične, lipolitične in metanogene arheje (Cestnik, 1994; Hobson, 1997).

#### 2.2.2.2 Praživali

Pomen praživali v vampni vsebini je velik predvsem zaradi njihove sposobnosti sinteze beljakovin. Njihova koncentracija je med  $10^4$  do  $10^6$  celic/ml vampne vsebine. Praživali ne sintetizirajo aminokislin na novo, kot jih lahko bakterije, vendar iz aminokislin hrane ali tistih, ki jih sintetizirajo bakterije, gradijo proteine lastnih celic. S tem sodelujejo pri pretvarjanju rastlinskih proteinov v živalske in tako dvigajo biološko vrednost proteinov. Prebavljivost proteinov praživali je 91-odstotna, bakterijskih pa 74-odstotna (Cestnik, 1994; Hobson, 1997). Pomembna vloga praživali v vampu je predatorstvo (požirajo bakterije). Na ta način povečajo hitrost metabolnega kroženja bakterijskih proteinov v vampu, in uravnavajo tudi gostoto ter ravnotežje med različnimi bakterijskimi vrstami (Madigan in sod., 2000).

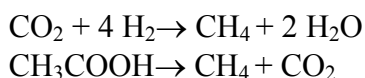
#### 2.2.2.3 Glive

Anaerobne glive imajo celično steno in sodelujejo v vampnih razgradnih procesih. To so striktno anaerobne filamentozne glive (Mackie in sod., 2001). Sodelujejo tudi pri sintezi nekaterih aminokislin in nekaterih vitaminov. Njihova koncentracija je med  $10^3$  do  $10^5$  celic/ml vampne vsebine. Zagotavljajo prisotnost encimov, kot so celulaze, hemicelulaze, proteaze in esteraze in imajo boljšo sposobnost penetracije v lignocelulozne delce krme (Kamra, 2005).

#### 2.2.2.4 Metanogene arheje

V vampu različnih prežvekovalcev živijo tudi metanogene arheje. Metanogeni organizmi so edini predstavniki kraljestva arhej (*Archaea*) v vampu. Metanogene arheje in ostale arheje imajo edinstvene membranske lipide. Vsebujejeo etre glicerola in izoprenoidnih alkoholov. Kraljestvo arhej ločimo v 2 debli: *Crenarchaeota* in *Euryarchaeota*. V deblo *Euryarchaeota* spadajo halofilne in metanogene arheje. Pogosta terminalna akceptorja elektronov pri metanogenezi v vampu sta predvsem  $\text{CO}_2$  in očetna kislina ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) (Madigan in sod. 2003; Miller in Wolin, 2001). Kot donor elektronov jim služi  $\text{H}_2$ . Rastejo le v okolju z redoks potencialom manj kot -300 mV.  $\text{H}_2$  je eden glavnih produktov fermentacije in poleg metanogenih bakterij, zanj tekmujejo acetogene bakterije in se tako ne akumulira v vampu (Moss, 2000).

Značilni kemijski reakciji metanogeneze sta prikazani v spodnjih formulah:



Najpogostejše vrste metanogenih mikroorganizmov so izolirali iz rodov *Methanobrevibacter*, *Methanomicrobium*, *Methanobacterium* in *Methanosarcina* (Whitford, 2001). Njihova koncentracija je med  $10^7$  do  $10^9$  celic/ml vampnega soka. Nekateri metanogeni mikroorganizmi so pritrjeni na površino praživali in si na ta način zagotavljajo stalen dotok vodika. Torej bi lahko zmanjšali produkcijo metana, če bi

zmanjšali število prisotnih praživali (defaunacija) v vampnem ekosistemu (Kamra, 2005). Metan se izloči v okolje in predstavlja 6-13 odstotno izgubo energije v prehranjevanju živali prav tako pa prispeva k povišanju koncentracije toplogrednih plinov (Miller in Wolin, 2001).

#### 2.2.2.5 Bakteriofagi

V vampni vsebini so tudi bakteriofagi. To so bakterijski virusi, ki so specifični za bakterije, prisotne v vampu. Z liziranjem bakterijskih celic omogočijo sproščanje bakterijskih proteinov, ki predstavljajo vir aminokislin za živali (Kamra, 2005).

### 2.3 TANINI

Tanini so po Bate-Smithu in Swainu (1962), definirani kot naravno prisotne vodotopne polifenolne spojine različnih molekulskih mas, od 500 do 3000 Da. Od ostalih naravnih polifenolnih snovi se razlikujejo po tem, da so sposobni precipitirati alkaloide, želatino in druge proteine iz vodnih raztopin (Jansman, 1993). Ta lastnost je ključna pri obdelavi usnja, v preteklosti in v sedanjosti (Bhat, 1998).

So močno razširjeni v kraljestvu rastlin in jih najdemo v listih, plodovih, lubju, lesu, lahko pa se akumulirajo v večjih količinah v določenih organih ali tkivih rastline (Haslam, 1989). V rastlinah delujejo tanini kot obramba pred patogeni, herbivori in neugodnimi okoljskimi razmerami.

Tanini veljajo za rastlinske sekundarne snovi, ki niso vključene v metabolnih poteh. Poleg lignina so druga velika skupina rastlinskih polifenolov.

Prisotnost velikega števila fenolnih hidroksilnih skupin v taninih omogoča tvorbo velikih kompleksov, predvsem s proteini in v manjšem obsegu z drugimi makromolekulami, kot so celuloza, hemiceluloza in pektin ter z minerali. Tako zmanjšajo njihovo presnovo. Prav tako pa tvorijo komplekse z izločenimi bakterijskimi encimi v vampu prežvekovalcev (McLeod, 1974; McSweeney in sod. 2001).

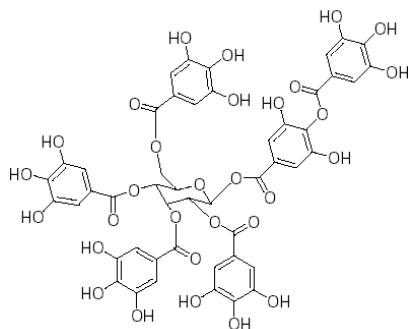
#### 2.3.1 Vrste taninov

Tanine delimo na hidrolizirajoče in kondenzirane, ki se razlikujejo med seboj po kemijski zgradbi molekul, reaktivnosti s hidrolitičnimi reagenti, prehranskih učinkih in toksičnosti (Kumar in Vaithiyanthan, 1990).

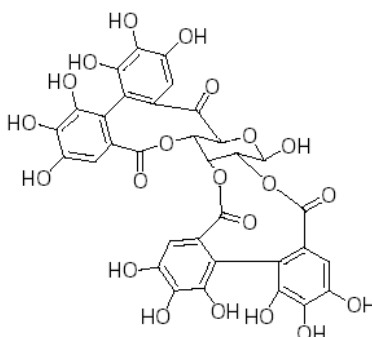
##### 2.3.1.1 Hidrolizirajoči tanini

Hidrolizirajoči tanini imajo centralno ogljikohidratno jedro pri katerem so hidroksilne skupine zaestrene s fenolnimi karboksilnimi kislina, kot so galna kislina, elagična kislina in heksahidroksidifenična kislina. Tako dobimo galotanine (slika 2) in elagitanine (slika 3) (Jansman, 1993). Taninska kislina (slika 4) je dobro poznan galotanin in vsebuje 8-10 molov galne kisline na 1 mol glukoze.

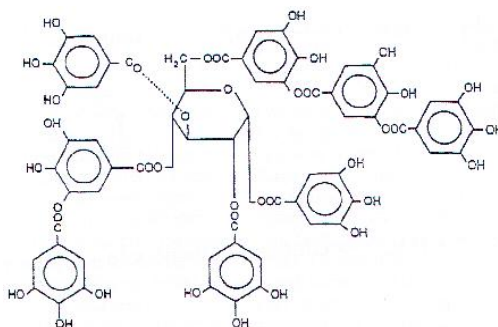




Slika 2: Kemijska struktura galotanina (Dunshea in sod., 2007)



Slika 3: Kemijska struktura elagitanina (Dunshea in sod., 2007)



Slika 4: Kemijska struktura taninske kisline (Chung in sod., 1998b)

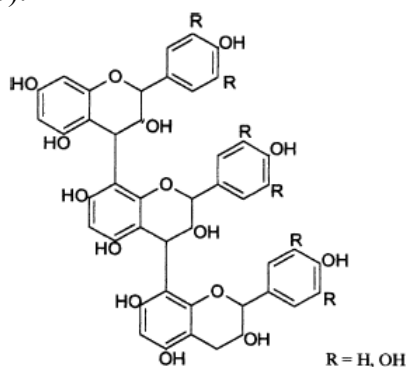
Hidrolizirajoče tanine najdemo v številnih rastlinah iz družin octovk (*Anacardiaceae*), metuljnic (*Leguminosae*), bukovk (*Fagaceae*), kombretovk (*Combretaceae*) in mirtovk (*Myrtaceae*), in sicer v lesu, lubju, listih, plodovih in šiškah (Mueller-Harvey 2001). Komercialno pomembne izvlečke hidrolizirajočih taninov pridobivajo iz drevesnih vrst kot so octovec (*Rhus semialata*, *Rhus coriara*), hrast (*Quercus* spp.), kostanj (*Castanea* spp.) in evkaliptus (*Eucalyptus* spp.) (Bhat in sod., 1998; Waghorn in McNabb, 2003).

Hidrolizirajoče tanine uporabljamo za strojenje kož, za čiščenje vina, bistrenje piva, izpiranje izplak pri naftnih vrtnah in za mehčanje vode v kotlih. V medicini pa kot antidiuretična sredstva, kot adstringenti pri poškodbah kože in kot protistrupe za obarjanje težkih kovin in alkaloidov (Skubic in Vengušt, 1993).

Hidrolizirajoči tanini so v velikih količinah toksični in povzročajo zastrupitve pri živalih, in sicer pri zaužitju večjih količin rastlinskega materiala, ki je bogat s tanini (Bhat in sod., 1998). V vampu prežvekovalcev se razcepijo zaradi delovanja esteraz in tanin acilhidrolaz, ki jih izločata npr. *Selenomonas ruminantium* in vrste iz rodu *Streptococcus* (McSweeney in sod. 2001). Pri tem nastajata metabolita, in sicer galna in elagična kislina. Galna kislina se nato dekarboksilira v pirogalol, ki se pretvori v resorcinol in fluoroglucinol. Nizkomolekularni fenoli pa se lahko absorbirajo in v večjih koncentracijah povzročijo poškodbe jeter in ledvic (Krumholz in Bryant, 1986). V to razgradnjo so vključene *Eubacterium oxidoreducens*, *Streptococcus bovis*, *Syntrophococcus sucromutans* in vrste iz rodu *Coprococcus* (McSweeney in sod. 2001).

### 2.3.1.2 Kondenzirani tanini

Kondenzirani tanini (slika 5) so najbolj razširjeni in tipični rastlinski tanini (Mangan, 1988). Nimajo esterskih vezi, ampak so polimeri flavan-3-olov (katehini) in flavan-3:4-diolov (leukoantocianidini). Monomerne enote se med seboj povezujejo z ogljikovimi C-C vezmi. Pri segrevanju z dodatkom kisline se pretvorijo v ustrezne antocianidine in rjavo obarvane flobafenu podobne polimere zato jih imenujemo proantocianidini (Tannins, 1998; Kumar in Vaithiyathan, 1990).



Slika 5: Kemijska struktura kondenziranega tanina (McSweeney in sod., 2001)

Končni produkti razgradnje flavonoidov v vampu so acetat, butirat, mono- in dihidroksifenoli in fluoroglucinol. Ni pa dokazov o cepitvi heterocikličnih obročev flavan-3-olov (katehin in epikatehin), ki so monomerne enote kondenziranih taninov (Lowry in Kennedy, 1996, cit. po McSweeney in sod., 2001).

Depolimerizacija kondenziranih taninov, s cepitvijo ogljikovih vezi, v anaerobnih razmerah prav tako ni dokazana, zato tudi najverjetneje ne poteka v vampu prežvekovalcev (McSweeney in sod., 2001).

Načeloma so kondenzirani tanini pri prežvekovalcih nezaželeni, saj močno zmanjšujejo vnos krme (Jones in sod., 1994) in zmanjšujejo prirejo s slabšanjem dostopnosti hranljivih snovi. Po drugi strani pa je njihova sposobnost precipitacije proteinov pri vavnem pH pomembna, saj na ta način zaščitijo rastlinske proteine pred mikrobo hidrolizo in deaminacijo, kar poveča dostopnost aminokislin, ki se absorbirajo v tankem črevesju (postruminalno).

Komercialno pomembne izvlečke kondenziranih taninov pridobivajo iz akacije (*Acacia mollissima* in *Acacia mearnsii*), kebračo dreves (*Schinopsis lorentzii* in *Schinopsis balansae*) in drevesne skorje bora (*Pinus spp.*), hrasta (*Quercus spp.*) in lesa avkumeje (*Aucoumea kleneana*) (Bhat in sod., 1998), najdemo pa jih tudi v navadni turški detelji (*Onobrychis viciifolia*), navadni nokoti (*Lotus corniculatus*), močvirski nokoti (*Lotus pedunculatus*), topolistni kislici (*Rumex obtusifolius*), semenu bombaževca, sirku (*Sorghum sp.*) ter bobu (*Vicia faba*) (Butter in sod., 1999). Kondenzirane tanine uporabljamo zaradi adhezivnih lastnosti, ki se pojavljajo ob kondenzaciji s formaldehidom, kot lepila pri proizvodnji vezanega lesa in ivernih plošč (Skubic in Vengušt, 1993).

### 2.3.2 Delovanje taninov

Taninske molekule se povezujejo s proteini, ogljikovimi hidrati, minerali in vitamini ter celičnimi stenami bakterij.

Kemična obramba pri rastlinah vključuje produkcijo in kopičenje organskih snovi, ki so lahko toksične, imajo neprijeten okus in lahko omejujejo prebavo pomembnih hranilnih snovi pri živalih (Harborne, 1999).

Rastlinam nudijo zaščito pred glivami, bakterijami in rastlinojedimi insekti in vretenčarji.

Uvrščamo jih v skupino antinutritivnih snovi. Zmanjšujejo zaužitje krme in s tem prirast, poslabšajo dostopnost hranilnih snovi zaradi zmanjšanja prebavljivosti proteinov in aktivnosti prebavnih encimov (Makkar, 2003). V visokih koncentracijah vplivajo na vavnno mikrobo združbo in na samo zdravje živali, medtem ko v nizkih dozah izboljšujejo vavnno fermentacijo. Lahko zmanjšajo sproščanje amonija, s tem ko inhibirajo mikrobo ureazo, tvorijo komplekse s proteini, adsorbirajo prosti amoniak in upočasnjujejo razgradnjo proteinov z inhibicijo proteaz (Sliwinski in sod., 2002).

Pozitivne oziroma koristne učinke taninov zaznamo ob nizkih koncentracijah ter ob dodatku polietilenglikola (PEG), ki s tanini tvori komplekse. Poveča se sinteza mikrobnih proteinov, zmanjša pa se razgradljivost proteinov in drugih makromolekul v vampu prežvekovalcev. Poveča se dostopnost ne-amonijskega dušika v spodnjem delu črevesja, kar vodi v povečano produkcijo mleka, mesa in volne. Prav tako se zmanjša produkcija metana in prostega dušika in njuno izločanje v okolje (Makkar, 2003), kar ima zelo pozitivne učinke, predvsem z vidika zmanjšanja emisij toplogrednih plinov v okolje.

Topni rastlinski proteini, sproščeni v vampu, stabilizirajo peno v katero se ujamejo plinski mehurčki, onemogočeno je izrigavanje plinov, kar povzroča napenjanje pri prežvekovalcih (McLeod, 1974). Torej so tanini, ki s topnimi proteini tvorijo reverzibilne komplekse, vključeni v preprečevanje napenjanja. Minimalna koncentracija v krmi, ki preprečuje napenjanje pa je 5 g /kg SS krme. Napenjanje pri prežvekovalcih je prehranska motnja, ki je zelo razširjena pri prežvekovalcih, ki se prehranjujejo s krmo, bogato s proteini, predvsem lucerno in drugimi vrstami detelje (Mangan, 1988). Odkrili so tudi antihelmintične učinke taninov (Makkar, 2003).

Tanini so prisotni v številnih rastlinskih vrstah. V 80% so prisotni pri drevesnih trajnih dvokaličnicah in v 15 % pri enoletnicah in trajnih dvokaličnicah. Najdemo jih tudi v prehrani in pijači ljudi. Tanini v vinu izhajajo iz grozdja, v jabolčniku iz jabolk ter v pivu iz hmelja, prav tako jih najdemo v brezalkoholnih pijačah, kot so zeleni čaj, sadni sokovi iz jagod, malin, črnega ribeza, v semenih ječmena, sirka, fižola,... (Mueller-Harvey, 1999). Chung in sodelavci (Chung in sod., 1998b) poročajo o različnih učinkih taninov na zdravje ljudi, in sicer naj bi bili antinutritivni, karcinogeni, mutageni, antikarcinogeni in antimutageni, odvisno od koncentracij. Predvidevajo, da karcinogenost ni odvisna le od prisotnosti taninov, temveč so udeležene še druge molekule.

Polifenoli v čaju in druge taninske molekule naj bi bile antikarcinogene, medtem ko mnoge taninske molekule zmanjšujejo mutagenost različnih mutagenih snovi. Karcinogene in mutagene substance tvorijo proste kisikove radikale, ki reagirajo s celičnimi makromolekulami, torej sta antikarcinogenost in antimutagenost povezani z antioksidativno lastnostjo taninov, ki ščiti celico pred poškodbami oksidacije (Chung in sod., 1998b).

### 2.3.2.1 Vpliv taninov na mikroorganizme

Dokazano je, da tanini negativno vplivajo na mikroorganizme v različnih ekosistemih vključno z vampom prežvekovalcev (Acamovic in sod., 2000). Tanini so splošno znani kot zaviralci rasti mikroorganizmov. Sposobni so tvoriti komplekse s celično steno bakterij in ekstracelularnimi encimi. Na ta način onemogočijo transport hranil v celico in s tem zaustavijo rast mikroorganizma (McSweeney in sod., 2001).

Jones in sodelavci (1994) so dokazali, da kondenzirani tanini navadne turške detelje (*Onobrychis vicifolia*), inhibirajo proteolitično aktivnost in rast več vrst vampnih bakterij, kondenzirani tanini iz detelje (*Lespedeza cuneata*) pa inhibirajo pektinaze in celulaze v vampnem soku (McSweeney in sod., 2001). Bae in sodelavci (1993) pa so poročali o inhibiciji pritrditve bakterij iz rodu *Fibrobacter* na substrat- celulozo.

Tanini se brez težav vežejo s proteini v krmi, slini in tvorijo netopne proteinsko-taninske komplekse. Moč in narava vezave je odvisna od kemijske narave reaktivnih fenolnih spojin (Bhat in sod., 1998). Tvorijo se vodikove vezi med fenolnimi skupinami tanina in karbonilno skupino proteina. To zmanjša hidratacijo molekule in poveča hidrofobnost kompleksa (Lowry, 1996). Stabilnost kompleksa je močno odvisna od pH, in sicer je stabilen oz. netopen v območju 3,5-7,0, medtem ko v območju < 3,0 in pri 8,5 razpade. Različne študije so pokazale, da obstajajo razlike med kompleksi, ki jih tvorijo proteini s kondenzirajočimi in hidrolizirajočimi tanin. Kompleks s hidrolizirajočimi tanini je bolj občutljiv na spremembe pH. Prisotnost taninov v sveži krmi zmanjša razgradnjo rastlinskih proteinov v vampu prežvekovalca (pH: 5,8-6,8) pa vendar omogoči raztapljanje in sproščanje proteinov v sirišniku (pH: 2,5-3,5) in v tankem črevesju (pH: 7,5-8,5) (Orešnik, 1996).

Neprestan vnos taninov lahko povzroči gastritis, draženje in otekanje črevesne sluznice (Kumar in Vaithiyathan, 1990). Zastrupitve so posledica predvsem hidrolizirajočih taninov, in sicer galotaninov. Vampni mikrobi jih razgradijo in nato pride do absorpcije razgradnih produktov predvsem fenolnih snovi, v krvni obtok, kar vodi do zastrupitev jeter, ledvic, vranice in drugih notranjih organov. Podatkov o absorpciji kondenziranih

taninov v krvni obtok ni. Do absorpcije pride le, če je poškodovana črevesna sluznica, kar pa vodi do podobnih zdravstvenih zapletov kot pri hidrolizirajočih taninih (Makkar, 2003). Odkrili so tudi mikroorganizme, ki tolerirajo visoke koncentracije hidrolizirajočih in kondenzirajočih taninov. Identificirali so različne bakterije, vključno s *Streptococcus gallolyticus*, seve sorodne *S. bovis* in *S. gallolyticus*, vrste iz rodu *Clostridium* in po Gramu negativne paličaste bakterije iz debla *Proteobacteria* (Nelson in sod., 1998). Izolirali so jih iz ovc, koz, srn in gosi. Mehanizem tolerance še ni povsem pojasnjen, opisujejo pa izločanje ekstracelularnega polisaharida (Brooker in sod., 2000), ki loči mikrobn celico od reaktivnega tanina in pa produkcijo glikoproteina, ki ima visoko afiniteto vezave za taninske molekule (McSweeney in sod., 2001). Sredi devetdesetih so raziskovalci predlagali vnos mikrobov iz živali, ki so prilagojene na visoke koncentracije taninov, v živali, ki so neprilagojene, da bi nevtralizirali negativne učinke taninov (Makkar, 2003).

## 2.4 METAN

### 2.4.1 Lastnosti metana

Metan je netoksičen plin brez barve in vonja in je prisoten v naravi. Imenujemo ga tudi močvirski plin, metil hidrid. V atmosferi ga je 0,00022 vol %. Nastane z direktno vezavo čistega ogljika in vodika pri temperaturah nad 1100 °C. Je glavna sestavina naravnega zemeljskega plina, ki vsebuje približno 75 % metana, 15 % etana in 5 % ostalih ogljikovodikov, kot sta propan in butan. Je najpreprostejši ogljikovodik s kemijsko formulo CH<sub>4</sub> in je lažji od zraka. Z zrakom tvori mešanice, ki so lahko eksplozivne, in sicer v 5 do 15 odstotni mešanici (University of Wisconsin, 2007; Methane, 2001).

Preglednica 1: Fizikalno kemijske lastnosti metana (Methane, 2001):

	<b>metan – CH<sub>4</sub></b>
<b>barva</b>	brezbarven
<b>vonj</b>	brez vonja
<b>oblika molekule</b>	tetraeder
<b>molska masa</b>	16,04 g/mol
<b>masnu delež C in H</b>	W <sub>C</sub> = 74,88 %; W <sub>H</sub> = 25,14 %
<b>topnost v vodi</b>	3,5 ml/100 ml H <sub>2</sub> O pri 17 °C
<b>specifična gostota</b>	0,7168 g/l
<b>tališče</b>	- 182,5 °C
<b>vrelišče</b>	- 161,4 °C
<b>kritična temperatura</b>	- 82,25 °C pri 45,8 atm
<b>temperatura samovžiga</b>	650 °C

## 2.4.2 Vpliv metana na okolje

Metan je toplogredni plin s potencialom segrevanja 24 v 100 letih, kar pomeni, da v povprečju v 100 letih vsak kilogram CH<sub>4</sub>, ogreje Zemljo 24-krat bolj, kot enaka masa CO<sub>2</sub>, vendar ima krajšo življenjsko dobo, od 10 do 15 let. Glavni viri metana so mokrišča, riževa polja, živalski procesi presnove, izkoriščanje fosilnih goriv in anaerobna razgradnja bioloških odpadkov (Wahlen, 1993).

Tako kot drugi toplogredni plini (CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O, ozon, vodna para, fluorirani ogljikovodiki (HFCs)) povečuje temperaturo zraka in s tem globalne spremembe podnebja, ki vplivajo na naravno okolje. Del energije, ki jo Zemlja prejme s sončnim sevanjem, preide z infrardečim sevanjem nazaj v vesolje. Plašč toplogrednih plinov to sevanje zadržuje in s tem vpliva na temperaturo našega planeta (Moss, 2000; Verbič in Sušin, 2004; Wahlen, 1993). Zaradi segrevanja ozračja in Zemlje lahko pričakujemo vse pogostejše suše, povečano verjetnost neurij, pozeb, toče, poplav, zemeljskih plazov in drugih, manj običajnih vremenskih pojavov, lahko se pojavijo tudi težave pri oskrbi s pitno vodo. Za razliko od nekmetijskih sektorjev, kjer v strukturi izpustov prevladuje CO<sub>2</sub>, sta v kmetijstvu najpomembnejša didušikov oksid in metan, ki prispevata 65 % oziroma 37 % vseh izpustov iz kmetijstva (Steinfeld in sod., 2006).

Največ metana nastane pri fermentaciji krme v predželodcih prežvekovalcev, ki ga izločijo v okolje, medtem ko ostale produkte fermentacije (hlapne maščobne kisline, mikrobnе beljakovine) živali izkoristijo. Vir naravnega atmosferskega metana predstavljajo tudi termiti, in sicer je njihov prispevek 11 %. Poleg termitov prispevajo metan še mokrišča (76 %), oceani (8 %) in ogljikovodiki (5 %) (EPA, 2006).

Metan nastaja tudi pri fermentaciji v debelem črevesu drugih domačih živali, vendar so količine precej manjše kot pri prežvekovalcih. V Sloveniji prispeva fermentacija v prebavilih goved 76 % izpustov metana, v prebavilih prašičev 2 %, v prebavilih konj in drobnice (ovce, koze) pa 3 %. Slovenija se je s podpisom Kjotskega protokola obvezala, da bo do obdobja 2008-2012 glede na izhodiščno obdobje 1985-1987 zmanjšala izpuste toplogrednih plinov za 8 %. Kmetijstvo je ta cilj že doseglo, saj so se izpusti do leta 2000 zmanjšali za 16 %, kar je posledica sprememb v načinu kmetovanja (Verbič in Sušin, 2004).

Emisije toplogrednih plinov so se v preteklih letih povečale v večini evropskih držav, ta trend pa naj bi se predvidoma nadaljeval tudi v prihodnosti. V večini evropskih držav so sprejeli nacionalne programe za zmanjšanje emisij, vendar pa bodo nekatere države pri doseganju kjotskih ciljev še vedno imele težave. Kjotski protokol, ki sodi v okvir Okvirne konvencije ZN o spremembi podnebja, in njegovo prvo ciljno obdobje predstavljata šele prvi korak pri obravnavi podnebnih sprememb. Številne raziskave napovedujejo, da bi se v povprečju temperatura ozračja še dodatno zvišala za 1,4 °C do 5,8 °C do leta 2100 (Steinfeld in sod. 2006). Da bi povečanje temperature omejili na največ 2 °C nad ravnjo iz predindustrijskega obdobja, kar je cilj, ki ga je kot nujnega za preprečitev nesprejemljivih vplivov podnebnih sprememb v prihodnosti predlagala EU, bo treba globalne emisije do leta 2050 zmanjšati za do 50 % (EEA, 2007).

## 2.5 UGOTAVLJANJE KOLIČINE MIKROBNE BIOMASE

### 2.5.1 Bioluminiscenca, merjenje ATP

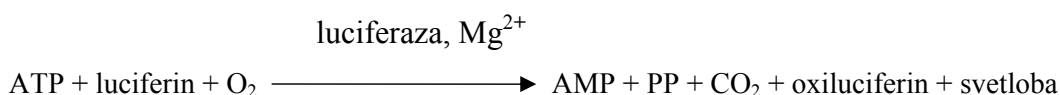
ATP se je izkazal za zelo uporabno molekulo pri ugotavljanju koncentracije prisotnih živih organizmov. Številni raziskovalci uporabljajo ATP analizo za ugotavljanje količine žive biomase v različnih okoljih, kot so morski in sladkovodni sistemi, odplake, hrana in v laboratorijskih študijah bakterij, alg,.. Analize ATP imajo skupno bioluminiscenčno reakcijo (Cheer, 1974).

Močno razširjen pojav v naravi - bioluminiscenca je encimsko posredovana produkcija svetlobe. Bioluminiscenca je posledica delovanja encima luciferaze, ki katalizira oksidacijo substrata luciferina, pri tem pa potrebuje energijo v obliki ATP (Thore, 1979).

Prvo poročilo o analitski uporabi bioluminiscence se je pojavilo že pred več kot 100 leti, ko je Beijerinck (1902) opisal zanznavanje kisika, nastalega s fotosintezo, v izvlečkih rastlinskih listov, s pomočjo luminiscenčnih bakterij (Thore, 1979).

Leta 1947 je McElroy odkril, da bioluminiscenčni sistem kresničke *Photinus pyralis* za svoje delovanje nujno potrebuje ATP in od takrat je bioluminiscenčni sistem osnova za večino občutljivih testov (Thore, 1979). Bioluminiscenčni test za merjenje ATP oziroma za ugotavljanje količine mikrobne biomase je zelo uporaben, saj je količina ATP v vseh živih bakterijskih celicah približno enaka ( $10^{-15}$  g/celico) (Stanley, 1986), zelo hitro po smrti bakterijske celice pa se ATP razgradi.

Bioluminiscenčna reakcija:



Gre za oksidacijo organskega substrata luciferina, z encimom luciferaza v oksiluciferin. Oksiluciferin je v vzbujenem stanju in ob prehodu v osnovno stanje odda foton, rumeno-zelene svetlobe. V naravi kresničke emitirajo rumeno-zeleno svetlobo v območju 540-580 nm (Liu in sod., 2007). Rumeno-zelena svetloba se lahko spremeni v rdečo, če se spremenijo razmere kot so pH (7,0), povečanje temperature, prisotnost analogov luciferina in molekule ATP (Min in Steghens, 1999).

Za delovanje sistema so potrebni luciferaza, luciferin, magnezijevi kationi in kisik. Če so koncentracije teh komponent konstantne, sistem odda svetlobo, katere intenziteta je sorazmerna z dodanimi nizkimi količinami ATP. Dokazano je, da sistem lahko zazna  $10^{-17}$  molov ATP (Thore, 1979).

pH optimum luciferazne reakcije je 7,75, optimalna temperatura delovanja pa 25 °C. Višje temperature inaktivirajo encim, pri nižjih temperaturah pa se reakcija upočasni (Cheer, 1974; Thore, 1979). Luciferazna aktivnost je odvisna od številnih parametrov, kot so luciferin,  $\text{Mg}^{2+}$ , pufer (vrsta, koncentracija, pH), aktivatorji (difosfat) in inhibitorji (analogi luciferina) (Lundin, 2000). Encim luciferaza je sestavljen iz dveh podenot, katerih molekulska masa je približno 50.000 Daltonov. Zelo pomembne za katalitično funkcijo encima so sulfhidrilne skupine.

Bioluminiscenco lahko merimo s katerokoli aparaturo občutljivo za svetlobo ustrezne valovne dolžine. Najpogosteje se uporablja aparature, ki zaznavajo svetlobo s fotopomnoževalko (Thore, 1979). Luminometer nam poda le relativne meritve (CPS-counts per second, RLU- relative luminescent unit ali mV-milivolt), ki pretvorimo v mole ali grame ATP na volumen. Pri tem si pomagamo s standardnimi raztopinami ATP, v katerih koncentracijo ATP poznamo. Pripravimo umeritveno premico, s pomočjo katere lahko ocenimo koncentracijo ATP v merjenih vzorcih (Lundin, 2000).

Pred samim merjenjem količine ATP v vzorcih, moramo ATP učinkovito ekstrahirati iz celic. Za to uporabljamo različne ekstraktante. Lastnosti idealnega ekstraktanta so: v trenutku mora prehajati celično steno in ekstrahirati zalogo ATP v celoti, povzročiti mora trenutno in ireverzibilno inaktivacijo encimov, ki porabljajo ATP ali ga producirajo, ne sme povzročiti hidrolize ATP, ne sme inhibirati luciferaze in ne sme vplivati na samo kinetiko bioluminiscenčne reakcije (Stanley, 1986).

Poznamo več različnih ekstraktantov, in sicer vreli pufer (ponavadi Tris-HCl z EDTA), različne razredčene kisline (dušikova kislina, žveplova kislina, perklorna kislina – PCA, trikloroacetna kislina – TCA in mravljična kislina), organske snovi (dimetilsulfoksid, etanol, aceton, kloroform in butanol) in surfaktanti (Triton X – 100, benzalkonijev klorid). Izbira ekstraktanta ATP je odvisna od vrste celic, iz katerih želimo ekstrahirati ATP. Zelo pogosto se za mikrobn celice uporablja ekstrakcija z vrelin pufrom Tris-HCl, saj je enostavna, hitra in daje zadovoljive rezultate. V primeru ekstrakcije ATP iz somatskih celic pa se uporablja Triton X-100 (Stanley, 1986; Ishnida in sod., 2002).



### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 SUBSTRATI

V diplomski nalogi smo uporabili dva različna mikrobn substrata, in sicer krompirjev škrob (Merck, Darmstadt, Nemčija, 2003) in celulozo (BWW 40) (Arbocel<sup>®</sup>, J. Rettenmaier & Sohne, Nemčija, 2003). Fizikalno kemijske lastnosti so opisane v preglednici 2.

Preglednica 2: Fizikalno kemijske lastnosti škroba in celuloze BWW 40 (Merck, Darmstadt, Nemčija, 2003; Arbocel<sup>®</sup>, J. Rettenmaier & Sohne, Nemčija, 2003)

	<b>škrob</b>	<b>celuloza BWW 40</b>
<b>barva</b>	bela	bela
<b>oblika</b>	fini prah	kosmiči
<b>gostota</b>	300 g l <sup>-1</sup>	530-630 g l <sup>-1</sup>
<b>pH*</b>	6,0 - 7,5	6,0 ± 1,0

\* pri 25 °C in 2 % vodni raztopini

Škrob vsebuje 89,6 % suhe snovi in 10,4 % vode ter je brez vonja in okusa. Njegova topnost v vodi znaša 50 g/l pri temperaturi 90 °C (Merck, Darmstadt, Nemčija, 2003).

Celuloza BWW 40 je brez barve in okusa. Vsebuje 96,5 % suhe snovi in 6,1 % vode. V suhi snovi je prisotnih 0,6 % surovih beljakovin, manj kot 0,1 % surovih maščob, 72,0 % surovih vlaknin, 20,9 % brezdušičnega izvlečka in 0,3 % pepela (Arbocel<sup>®</sup>, J. Rettenmaier & Sohne, Nemčija, 2003).

#### 3.2 TANINSKI IZVLEČKI

V nalogi smo uporabili tri različne taninske izvlečke, in sicer Farmatan 75 (F75; Tanin Sevnica), taninsko kislino (TAK; Sigma-Aldrich, 2003) in taninski izvleček iz dreves kebračo (QUE; Roy Wilson Dickson, 2003) v različnih koncentracijah (0,33, 0,67 in 1,33 mg/ml gojišča). Farmatan in taninska kislina sta predstavnika hidrolizirajočih taninov, medtem ko je kebračo predstavnik kondenziranih taninov. Njihova sestava je opisana v preglednici 3.

Preglednica 3 : Sestava taninskih izvlečkov (Sigma-Aldrich, 2003; Roy Wilson Dickson, 2003; Otto Dille, 2000)

	<b>F75</b>	<b>TAK</b>	<b>QUE</b>
<b>tanini (%)</b>	76	90	72
<b>netopne snovi (%)</b>	1,5	0	0,3
<b>netaninske topne snovi (%)</b>	17	5	3,6
<b>pH</b>	3,6	3,0	4,5-5,0

### 3.2.1 Farmatan

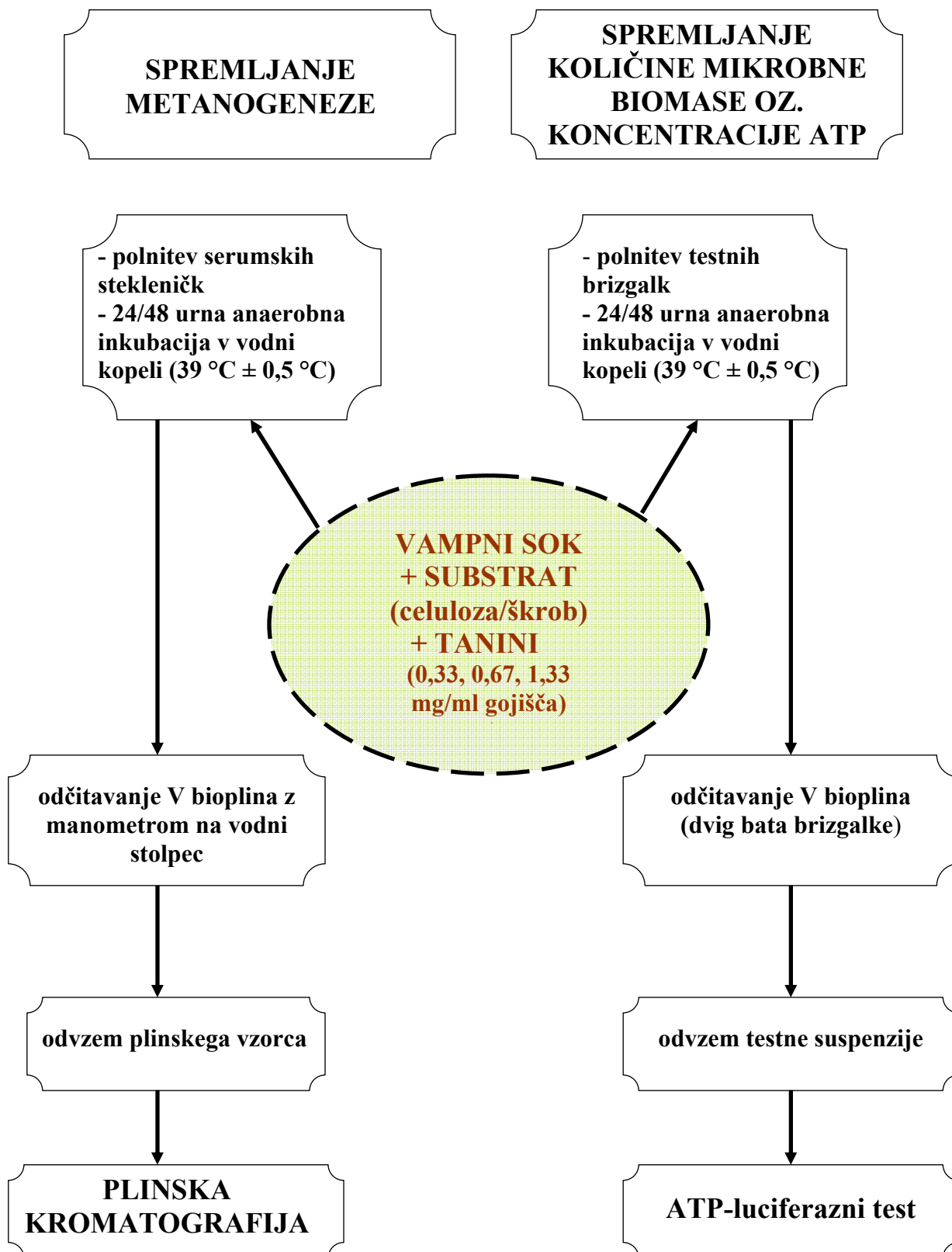
Izveček iz lesa pravega kostanja (*Castanea sativa Mill.*) vsebuje veliko taninov (75 %). Je zmes estrsko in glikozidno vezanih taninov (hidrolizirajočih in kondenziranih) v kateri prevladujejo predvsem hidrolizirajoči tanini. Pripravek imenovan Farmatan v Sloveniji proizvaja Tanin Sevnica d.d.. Farmatan je svetlo rjav prašek, grenkega okusa, kiselkastega vonja in topen v vodi. Uporablja se kot dodatek h krmi v intenzivnih rejah in kot kažejo izkušnje, izboljša proizvodne rezultate živali, kot sta prirast in konverzija hrane (Farmatan ..., 2003).

### 3.2.2 Taninska kislina

Taninska kislina je amorfni prah rumene barve, ki na zraku in izpostavljen svetlobi potemni. Je hidrolizirajoči tanin, ki ga pridobivajo iz hrastovih šišek, vrste *Quercus infectoria*, saj so bogat vir taninov. Žveplova kislina povzroči s hidrolizo razpad na galno kislino in glukozo. Z albuminom, želatino, večino alkaloidov in solmi težkih kovin tvori netopne komplekse. Topna je v etanolu (100 mg/ml), vodi (2,8 g/ml), toplem glicerolu (1 mg/ml) in acetonu. Netopna je v benzenu, kloroformu, etru, petrol-etru, ogljikovemu disulfidu in ogljikovemu tetrakloridu. Raztopine taninske kisline hranimo v temnih posodah, ki so dobro zaprte. Na ta način so zaščitene pred svetlobo in zrakom. V nasprotnem primeru potemijo (Sigma, 2003).

### 3.2.3 Kebračo

Izveček kebrača je kompleksna mešanica polifenolov, ki jo pridobijo iz stržena dreves kebračo, vrste *Schinopsis lorentzii* in *Schinopsis balansae*. Drevesa kebračo rastejo le v južni Ameriki na geografskem območju Chaco, ki obsega severno Argentino in Paragvaj. Izveček kebračo je predstavnik kondenziranih taninov in je bolj topen v vroči vodi (Unitan, 2007).



Slika 6: Shema poskusov

### 3.3 PLINSKI (HOHENHEIMSKI) TEST

Plinski test smo uporabljali za merjenje produkcije bioplina, ki je nastal med fermentacijo substrata v vampnem soku ob dodatku taninov. Pred začetkom plinskega testa smo pripravili ustrezno število čistih steklenih brizgalk, ki smo jih ustrezno označili. V brizgalke smo zatehtali 175 mg substrata (škrob ali celuloza) in taninske izvlečke (F75, QUE in TAK). Delali smo v dveh ponovitvah. Brizgalke smo zaprli z batom brizgalke, ki smo jih naoljili s parafinskim oljem, za lažje in neprodušno zapiranje ter odprtino brizgalke zaprli s plastičnim zamaškom.

Plinski test smo izvedli z metodo po Menke in Steingass (1988) (Hohenheimski plinski test). Za inokulum smo uporabili vampni sok, ki smo ga odvzeli iz vampov fistuliranih ovnov jezersko-solčavske pasme, in sicer 1,5 do 2 uri po jutranjem krmljenju (slika 7). Ovna sta bila krmljena s senom za pokrivanje potreb za vzdrževanje. Odvzeti vampni sok smo črpali v predhodno ogreto in s CO<sub>2</sub> preprihano termo steklenico (39 °C). Tako smo poskušali zagotoviti čimbolj ugodne razmere za vampne mikroorganizme.



Slika 7: Odvzem vampnega soka

Pripravljeni pufer je vseboval destilirano vodo, raztopino A, B, C (preglednica 4), resazurin (indikator prisotnosti kisika) in redukcijsko raztopino (preglednica 5). Mešanico pufrskih raztopin in resazurina, ogreto na 39 °C, smo ob stalnem mešanju na magnetnem mešalu preprihovali s CO<sub>2</sub> pod pritiskom 1,8 do 2,0 bara. Redukcijsko raztopino smo dodali dobro preprihanemu in ogretemu pufru, in sicer 5 minut pred dodajanjem vampnega soka. Modrikasta raztopina se je najprej obarvala rdeče (prisotnost kisika), nato pa se je razbarvala.

Preglednica 4: Sestava raztopin A, B, C

<b>RAZTOPINA A</b>	<b>RAZTOPINA B</b>	<b>RAZTOPINA C</b>
13,2 g CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	35,0 g NaHCO <sub>3</sub>	5,7 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
10,0 g MnCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O	4,0 g (NH <sub>4</sub> )HCO <sub>3</sub>	6,2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
1,0 g CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	destilirana voda do 1000 ml	0,6 g MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O
0,8 g FeCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O		destilirana voda do 1000 ml
destilirana voda do 100 ml		

Preglednica 5: Sestava redukcijske raztopine in pufra:

REDUKCIJSKA RAZTOPINA	RAZTOPINA RESAZURINA	PUFER*
47,5 ml destilirane vode	100 mg resazurina	474 ml destilirane vode
2 ml 1 M NaOH	destilirana voda do 100 ml	0,12 ml raztopine A
285 mg Na <sub>2</sub> S x H <sub>2</sub> O		237 ml raztopine B
		237 ml raztopine C
		1,22 ml resazurin
		50,0 ml redukcijske raztopine

\*količina pufra zadošča za 50 brizgalk

Vampni sok, ki smo ga prefiltrirali skozi 4 plasti gaze v ogret (40 °C) in s CO<sub>2</sub> prepihan merilni valj, smo dodali v popolnoma brezbarvno pufrsko raztopino. Mešanico vampnega soka in pufrske raztopine smo prepihovali s CO<sub>2</sub> pod pritiskom 1 bar še 15 minut. Količina vampnega soka in pufrske mešanice je bila odvisna od števila steklenih brizgalk, ki smo jih uporabili v eksperimentu.

Pred začetkom polnjenja brizgalk smo začeli v prostor nad mešanico vampnega soka in pufra uvajati CO<sub>2</sub> pod pritiskom 1 bar. Ogrete brizgalke smo napolnili s 30 ml mešanice vampnega soka in pufra (10 ml vampnega soka, 20 ml pufra) z avtomatsko pipeto.

Po vsaki polnitvi smo iz brizgalke iztisnili zrak, jo zaprli s plastičnim zamaškom in jo postavili v vodno kopel ogreto na 39 °C ± 0,5 °C. V vsaki brizgalki je vzorec vseboval 175 mg substrata (škrob ali celuloza) in taninski izvleček, tako da je bila njihova končna koncentracija v mešanici vampnega soka in pufra 10, 20 oz. 40 mg taninskega izvlečka/30 ml mešanice, kar znaša 0,33, 0,67 oz. 1,33 mg taninskega izvlečka/ml mešanice vampnega soka in pufra (preglednica 6). V poskus smo vključili še kontrolne vzorce (brizgalka z vampnim sokom). Volumen nastalega bioplina, ki smo ga zaznali (dvig bata brizgalke), smo odčitavali po 4, 8, 12, 24, 36 in 48 urah fermentacije (slika 8). Če smo po 8-ih urah odčitali več kot 50 ml nastalega bioplina, smo brizgalko obrnili, iztisnili plin in brizgalko postavili nazaj v vodno kopel in nadaljevali eksperiment.

Preglednica 6: Količina taninskih izvlečkov (TI), substrata in gojišča

TI (mg)	SUBSTRAT (mg)	GOJIŠČE (ml)	KONCENTRACIJA TI (mg/ml gojišča)
0	175	30	0
10	175	30	0,17
20	175	30	0,33
40	175	30	1,33

\*Taninski izvleček: F75, TAK, QUE

Substrat: škrob ali celuloza

Gojišče: 10 ml vampnega soka in 20 ml pufra



Slika 8: Odčitavanje nastalega bioplina

Ekspiriment smo opravili v dveh serijah, in sicer smov prvi seriji merili produkcijo bioplina po 24-ih urah, v drugi seriji pa smo merili produkcijo bioplina po 48-ih urah. Po končani inkubaciji in opravljeni meritvi bioplina smo iz vsake brizgalke odvzeli 1,5 ml mešanice vampnega soka in pufra ter jo shranili v predhodno označene Ependorfove mikrocentrifugirke, ki smo jih takoj zamrznili v tekočem dušiku (-196 °C) in tako ustavili fermentacijo. Po zamrzovanju smo vzorce shranili pri -70 °C za kasnejše ugotavljanje skupne mikrobne biomase v vampnem soku z ATP-luciferaznim testom.

### 3.4 ANALIZA METANA

#### 3.4.1 Priprava materiala za ugotavljanje produkcije bioplina in metana

Pred pričetkom ugotavljanja količine produciranega bioplina in deleža metana smo pripravili ustrezno število čistih in sterilnih serumskih stekleničk (100ml) in gumijastih zamaškov z aluminijastim navojnim tesnilom. Serumske stekleničke smo sterilizirali s suho sterilizacijo (180 °C, 45 min), gumijaste zamaške pa v avtoklavu. V serumske stekleničke smo zatehtali ustrezno količino substrata (škrob oz. celuloza), dodali taninske izvlečke, tako, da je bila njihova končna koncentracija v gojišču enaka kot pri hohenheimskem plinskem testu (10, 20 oz. 40 mg taninskega izvlečka/30 ml mešanice, oziroma 0,33, 0,67 oz. 1,33 mg taninskega izvlečka/ml mešanice vampnega soka in pufra). V poskus smo vključili še kontrolne vzorce ter opravili meritve v dveh ponovitvah.

Mešanico vampnega soka in pufra smo pripravili enako kot pri plinskem testu. Namesto brizgalk smo uporabili serumske stekleničke. Zatehtanemu substratu s taninskimi izvlečki smo dodali 30 ml mešanice vampnega soka in pufra in vsebino v steklenički prepihovali 3 minute s CO<sub>2</sub> in še 2 minuti prostor nad mešanico. CO<sub>2</sub> s katerim smo prepihovali, smo dovajali na segreto bakrovo (Cu) kolono, in s tem zagotovili odstranjanje kisika iz tehničnega plina. Po prepihovanju smo stekleničke zaprli z gumijastimi zamaški in aluminijastim navojnim tesnilom. S tem smo preprečili vdor kisika v stekleničke in zagotovili anaerobne razmere. Stekleničke smo postavili v vodno kopel ogreto na 39 ± 0,5 °C.

### 3.4.2 Merjenje produkcije bioplina

Volumen nastalega bioplina smo odčitali z manometrom na vodni stolpec, ki smo ga povezali z injekcijsko brizgo. S tem smo istočasno izenačili pritisk v steklenici z atmosferskim pritiskom.

### 3.4.3 Analiza vsebnosti metana v bioplinu

Vsebnost metana smo ugotavljali s plinskim kromatografom Shimadzu GC 14-A, opremljenim z detektorjem na toplotno prevodnost (TCD detektor). Za ugotavljanje vsebnosti metana smo uporabili jekleno kolono polnjeno s polnilom PORAPACK Q, dolžine 4 m in premera 1/8 inče s pretokom nosilnega plina 25 ml/min. Kromatografske razmere in sestava kalibracijske mešanice za ugotavljanje vsebnosti metana so opisani v preglednici 7.

Preglednica 7: Kromatografske razmere in sestava kalibracijske mešanice za določanje metana

<b>KROMATOGRAFSKI RAZMERE</b>	<b>KALIBRACIJSKA MEŠANICA (vol %)</b>		
temperatura injektorja	50 °C	CO <sub>2</sub>	44,67
temperatura detektorja	80 °C	H <sub>2</sub>	14,92
temperatura kolone	30 °C	CH <sub>4</sub>	20,12
temperatura detektorskega bloka	80 °C	N <sub>2</sub>	20,29
volumen injiciranja	50 µl		
čas analize	5,5 min		
pretok nosilnega plina (Ar)	25 ml/min		

Po opravljeni meritvi nastalega bioplina in izenačitvi pritiska v steklenički z atmosferskim pritiskom, smo s plinotesno injekcijsko brizgo skozi gumijasti zamašek odvzeli iz steklenice 50 µl plinskega vzorca in ga vbrizgali v injektor plinskega kromatografa. Pline, ki jih je vseboval plinski vzorec smo prepoznali na osnovi zadrževalnega (retencijskega) časa na kromatografski koloni in njihovo količino ocenili na osnovi površine detektorskega signala. Količino metana v plinskem vzorcu smo izrazili v odstotnih volumskih deležih.

### 3.5 UGOTAVLJANJE KOLIČINE MIKROBNE BIOMASE

Količino žive mikrobne biomase smo ugotavljali z merjenjem mikrobnega ATP z ATP-luciferaznim testom.

#### 3.5.1 Kemikalije za ATP-luciferazni test

Uporabili smo reagente proizvajalca SIGMA, in sicer Adenosine 5' – triphosphate (ATP) bioluminescent assay kit (FL-AA), ki je sestavljen iz:

- FL-AAB (ATP Assay Mix Dilution Buffer) – liofiliziran prah, ki vsebuje  $MgSO_4$ , DTT, EDTA, goveji serumski albumin in tricinske puferske soli, smo raztopili v 50 ml sterilne destilirane vode (mili q oz. MQ)
- FL-AAM (ATP Assay Mix) – liofiliziran prah, ki vsebuje encim luciferazo, luciferin,  $MgSO_4$ , DTT, EDTA, goveji serumski albumin in tricinske puferske soli, smo raztopili v 5 ml sterilne destilirane vode (MQ)
- FL-AAS (ATP Standard) – liofiliziran prah, ki vsebuje približno 1 mg ( $2,0 \times 10^{-6}$  mol) ATP smo raztopili v 2 ml sterilne destilirane vode (MQ)

Pripravljene raztopine reagentov smo alikvotirali v 1,5 ml Ependorfove mikrocentrifugirke in jih hranili pri  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do uporabe.

Kot ekstrakcijsko sredstvo za sproščanje ATP iz mikrobnih celic v vzorcih, smo uporabili Tris-EDTA pufer. Pripravili smo 200 ml mešanice 100 mM Tris ( $C_4H_{11}NO_3$ )-HCl in 2mM EDTA ( $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \times 2H_2O$ ) s pH vrednostjo 7,8. Zatehtali smo 2,423 g Tris (SIGMA, T-6066) pufra, 0,143 g EDTA pufra in vse skupaj raztopili v sterilni destilirani vodi do 200 mililitrov. Nato smo s HCl znižali pH na 7,8, ki je optimalen za delovanje encima luciferaze. Pripravljeni pufer smo nato avtoklavirali.

#### 3.5.2 Merjenje koncentracije ATP

##### Luminometer

Za merjenje koncentracije ATP smo uporabili luminometer *JUNIOR LB 9509* (Berthold technologies GmbH & Co. KG, Nemčija). Detektor oziroma fotopomnoževalka luminometra deluje v območju 380 – 630 nm. Po opravljeni meritvi so se rezultati izpisali na monitorju kot RLU (Relative Luminiscent Units).



### 3.5.3 Ekstrakcija ATP iz vzorcev

ATP smo iz vzorcev ekstrahirali po metodi z vrelinim pufrom (Zrimec, 2001; Sestava za pufer Tris: Thore in sod., 1975). V Ependorfove mikrocentrifugirke smo odpipetirali 900  $\mu$ l 100mM Tris-HCl z 2mM EDTA s pH vrednostjo 7,8 in ga segrevali tri minute v vodni kopeli, ogreti na 100 °C. Po treh minutah smo dodali 100  $\mu$ l homogeniziranega vzorca in ponovno segrevali tri minute v vodni kopeli pri 100 °C, da se je ATP sprostil iz celic in da so se inaktivirali bakterijski encimi. Tako pripravljene vzorce smo ohladili v ledeni kopeli. Po končani ekstrakciji smo izmerili koncentracijo ATP v vzorcih.

### 3.5.4 Priprava reagentov in merjenje ATP

Reagente, pripravljene po navodilih proizvajalca reagentov FL-AA (Sigma), t.j. FL-AAS (standard), FL-AAM (encim luciferaza) in FL-AAB (pufer za redčenje FL-AAM) smo postavili v ledeno kopel. FL-AAM smo redčili s FL-AAB tako, da smo dobili 25-kratne redčitve FL-AAM. Tako razredčen FL-AAM je primeren za detekcijo koncentracij ATP v območju od  $2 \times 10^{-10}$  do  $2 \times 10^{-7}$  mol/l. S sterilno destilirano vodo (MQ) smo redčili standard, za meritve znanih koncentracij ATP za pripravo umeritvene krivulje.

100  $\mu$ l reagenta FL-AAM smo prenesli v epruveto na sobno temperaturo in pustili, da se je reagent ogrel na optimalno temperaturo za delovanje encima luciferaze. Istočasno smo na sobni temperaturi ogreli prvi standard ali prvi vzorec. Po treh minutah smo v ogreti reagent FL-AAM dodali 100  $\mu$ l standarda ali vzorca, rahlo premešali in epruveto takoj prenesli v luminometer. Pri tem smo bili pozorni, da v mešanici ni bilo mehurčkov, ki bi lahko motili merjenje.

Pred vsakim merjenjem smo najprej izmerili RLU standardnih raztopin, katerih koncentracijo ATP smo poznali. Izmerili smo tudi RLU sterilne destilirane vode (MQ) s katero smo pripravili redčitveno vrsto standardov in to vrednost odšteli od vrednosti RLU standardov. Nato smo izrisali umeritveno premico v programu (Microsoft Excel). V diagram smo na Y os vnesli logaritmirane vrednosti RLU, na X os pa logaritmirane vrednosti molarnih koncentracij (mol/L) ATP standardov in izračunali enačbo regresijske premice.

Enačba umeritvene premice:

$$y = a \cdot x + b \quad \dots(1)$$

$y$  je logaritem RLU (log RLU),  $x$  je logaritem molarne koncentracije ATP (log [ATP]),  $a$  in  $b$  pa sta faktorja, ki smo ju na osnovi umeritvenih podatkov izračunali.

Sledilo je merjenje RLU vzorcev, katerih koncentracija ATP je neznana. Izmerili smo RLU Tris-EDTA pufru in to vrednost odšteli od vrednosti RLU vzorcev. Iz izmerjenih vrednosti RLU vzorcev, smo izračunali koncentracije ATP v vzorcih.

Koncentracijo ATP v vzorcih smo izračunali z naslednjo enačbo:

$$10^{(\log RLU - b)/a} \cdot 10^4 = C_{ATP} [mmol/L] \quad \dots(2)$$

Log RLU je logaritmirana vrednost RLU vzorca,  $a$  in  $b$  sta faktorja umeritvene premice, enačbo smo množili z 10 zaradi redčenja vzorca z vrelin pufrom (1:9) v postopku ekstrakcije ATP in še enkrat množili z  $10^3$  zato, da smo končni rezultat izrazili v milimolarni koncentraciji.

### 3.6 STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV

Podatke, ki smo jih pridobili pri analizi metana in ATP smo korigirali na suho snov substrata. Nato smo podatke uredili s programom Microsoft Excel in jih obdelali s statističnim programom SAS/STAT (2001), in sicer po metodi najmanjših kvadratov v postopku GLM (General Linear Model). Testirali smo sistematske vplive taninskega izvlečka (4 razredi) in koncentracije taninskega izvlečka (4 razredi) ter interakcije med njimi. V model smo jih vključili kot sistematske vplive z nivoji. Za ta model smo se odločili na podlagi statistično značilnega vpliva ( $p$  – vrednost), deleža pojasnjene variance ( $R^2$ ) ter stopinj prostosti za posamezen vpliv in model v celoti. Za ugotavljanje statistično značilnih razlik med vplivi smo uporabili Duncan-ov test.

Uporabili smo naslednji statistični model:

$$y_{ij} = \mu + V_{Ti} + C_{Tj} + VC_{TTij} + e_{ijk} \quad \dots(3)$$

kjer je:

$y_{ij}$  = količina produciranega metana in ATP

$\mu$  = srednja vrednost

$V_{Ti}$  = vrsta taninskega izvlečka;  $i = 1, 2, 3$

$C_{Tj}$  = koncentracija taninskega izvlečka;  $j = 1, 2, 3, 4$

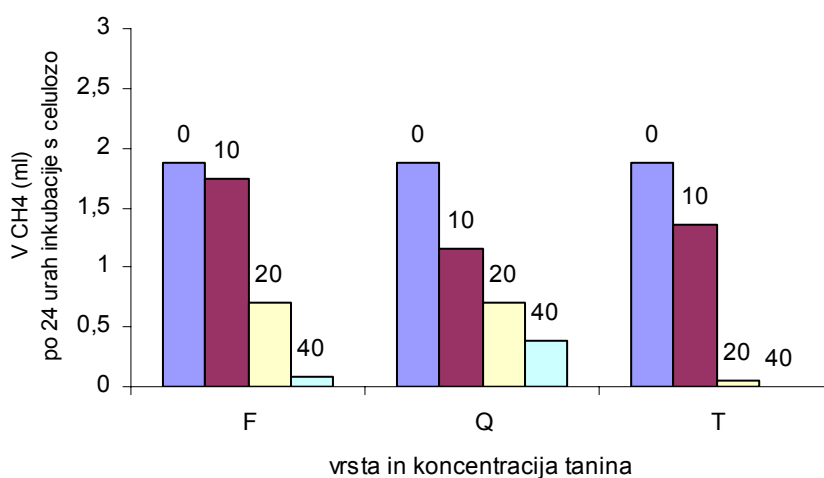
$VC_{TTij}$  = interakcija med vrsto in koncentracijo taninskega izvlečka

$e_{ijk}$  = ostanek

## 4 REZULTATI

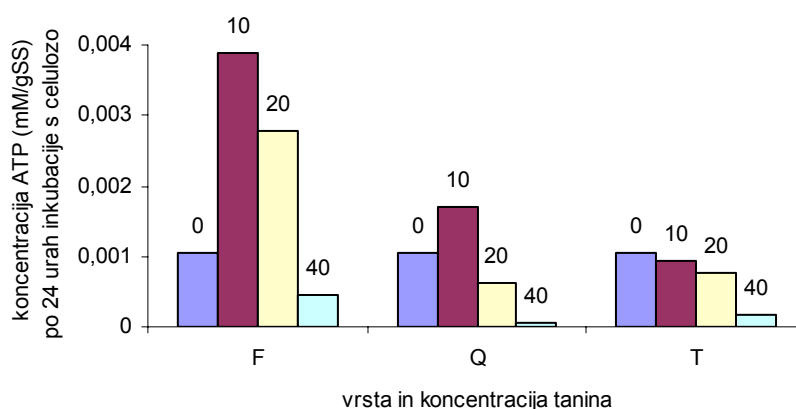
### 4.1 VPLIV VRSTE IN KONCENTRACIJE TANINSKEGA IZVLEČKA NA METANOGENEZO IN KONCENTRACIJO MIKROBNEGA ATP

#### 4.1.1 Fermentacija celuloze po 24 urah *in vitro* inkubacije v vavnem soku ob dodatku različnih koncentracij taninskih izvlečkov



Slika 9: Vpliv različnih koncentracij taninov na količino CH<sub>4</sub> v vavnem soku po 24 urah inkubacije s celulozo

F-farmatan, Q-kebračo, T-taninska kislina, 0-negativna kontrola



Slika 10: Vpliv različnih koncentracij taninov na koncentracijo mikrobnega ATP v vavnem soku po 24 urah inkubacije s celulozo

F-farmatan, Q-kebračo, T-taninska kislina, 0-negativna kontrola

Preglednica 8: Volumen metana in koncentracija mikrobnega ATP v vapnem soku po 24 urah *in vitro* fermentacije celuloze ob dodatku različnih koncentracij taninskih izvlečkov

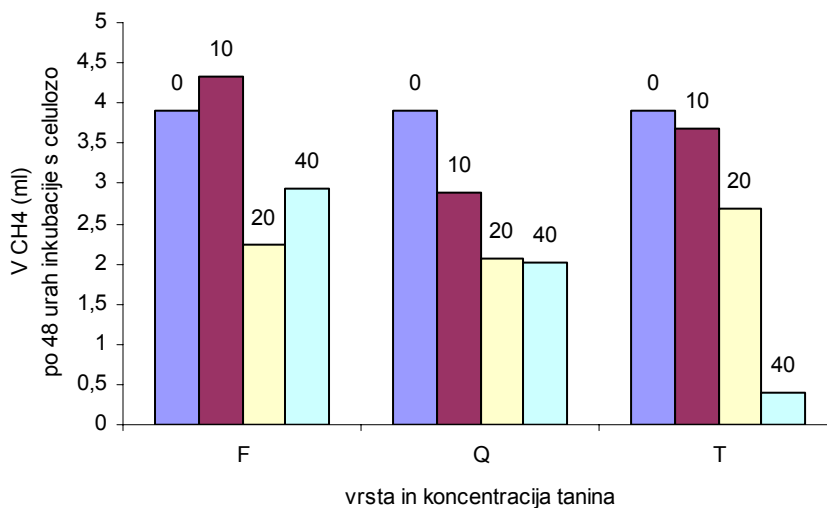
Opazovana lastnost	Konc.TI (mg/ml gojišča)	F	Q	T
Volumen CH <sub>4</sub> (ml)	0	1,88 <sup>a</sup>	1,88 <sup>a</sup>	1,88 <sup>a</sup>
	0,33	1,74 <sup>aA</sup>	1,15 <sup>bB</sup>	1,36 <sup>bB</sup>
	0,67	0,71 <sup>bA</sup>	0,71 <sup>cA</sup>	0,05 <sup>cB</sup>
	1,33	0,09 <sup>cB</sup>	0,38 <sup>cA</sup>	0,005 <sup>dB</sup>
ATP (mmol/g SS)	0	1,06*10 <sup>-3c</sup>	1,06*10 <sup>-3ab</sup>	1,06*10 <sup>-3a</sup>
	0,33	3,88*10 <sup>-3aA</sup>	1,71*10 <sup>-3aB</sup>	9,36*10 <sup>-4aC</sup>
	0,67	2,78*10 <sup>-3bA</sup>	6,16*10 <sup>-4bcB</sup>	7,56*10 <sup>-4abB</sup>
	1,33	4,58*10 <sup>-4cA</sup>	4,99*10 <sup>-5cA</sup>	1,73*10 <sup>-4bB</sup>

\*a,b,c = vrednosti v stolpcih, ki so označene z različnimi črkami se statistično značilno razlikujejo (p<0,05),  
 A B C = vrednosti v vrsticah, označene z različnimi črkami, se statistično značilno razlikujejo (p<0,05),  
 Konc. TI = koncentracija taninskega izvlečka, F = farmatan, Q = kebračo, T = taninska kislina

Ugotovili smo, da je po 24-urni fermentaciji največ metana nastalo pri fermentaciji celuloze brez dodanega taninskega izvlečka (1,88 ml CH<sub>4</sub>). Vse uporabljene koncentracije taninskih izvlečkov so statistično značilno znižale količino metana z izjemo 0,33 mg F75/ml gojišča (1,74 ml CH<sub>4</sub>), ki ni imel ststistično značilnega vpliva. Najbolj zaviralno so na produkcijo metana delovale koncentracije 1,33 mg/ml gojišča F75 ter 0,67 in 1,33 mg/ml gojišča TAK.

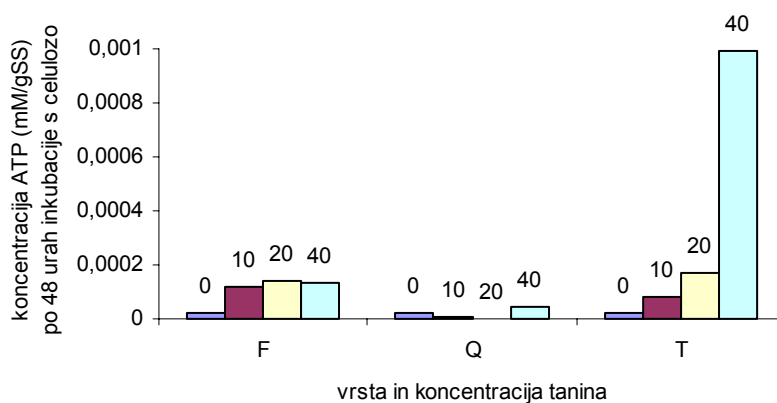
Po 24 urah fermentacije sta imeli ugoden in statistično značilen vpliv na koncentracijo ATP nižji koncentraciji (0,33 in 0,67 mg TI/ml gojišča) F75. Do neke mere je imela ugoden vpliv tudi najnižja koncentracija QUE (0,33 mg TI/ml gojišča), medtem ko je QUE pri najvišji koncentraciji (1,33 mg QUE/ml gojišča) deloval celo bolj inhibitorno kot TAK, ki je pri vseh koncentracijah delovala zaviralno.

#### 4.1.2 Fermentacija celuloze po 48 urah *in vitro* inkubacije v vampnem soku ob dodatku taninskih izvlečkov



Slika 11: Vpliv različnih koncentracij taninov na količino CH<sub>4</sub> v vampnem soku po 48 urah inkubacije s celulozo

F-farmatan, Q-kebračo, T-taninska kislina, 0-negativna kontrola



Slika 12: Vpliv različnih koncentracij taninov na koncentracijo mikrobnega ATP v vampnem soku po 48 urah inkubacije s celulozo

F-farmatan, Q-kebračo, T-taninska kislina, 0-negativna kontrola

Preglednica 9: Volumen metana in koncentracija mikrobnega ATP v vampnem soku po 48 urah *in vitro* fermentacije celuloze ob dodatku različnih koncentracij taninskih izvlečkov

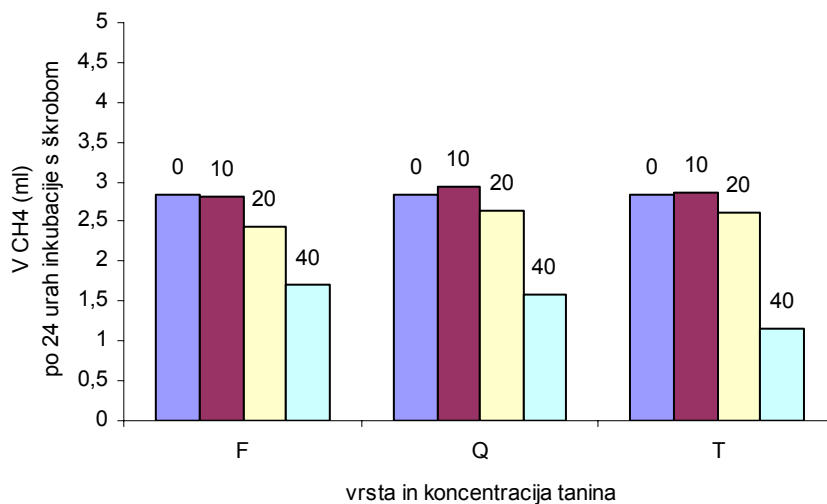
Opazovana lastnost	Konc. TI (mg/ml gojišča)	F	Q	T
Volumen CH <sub>4</sub> (ml)	0	3,91 <sup>b</sup>	3,91 <sup>a</sup>	3,91 <sup>a</sup>
	0,33	4,34 <sup>aA</sup>	2,89 <sup>bC</sup>	3,69 <sup>aB</sup>
	0,67	2,23 <sup>dB</sup>	2,06 <sup>cB</sup>	2,68 <sup>bA</sup>
	1,33	2,93 <sup>cA</sup>	2,02 <sup>cB</sup>	0,40 <sup>cC</sup>
ATP (mmol/g SS)	0	2,13*10 <sup>-5</sup>	2,13*10 <sup>-5</sup>	2,13*10 <sup>-5b</sup>
	0,33	1,16*10 <sup>-4</sup>	8,48*10 <sup>-6</sup>	8,44*10 <sup>-5b</sup>
	0,67	1,43*10 <sup>-4</sup>	1,20*10 <sup>-6</sup>	1,69*10 <sup>-4b</sup>
	1,33	1,31*10 <sup>-4B</sup>	4,08*10 <sup>-5B</sup>	9,93*10 <sup>-4aA</sup>

\*a,b,c = vrednosti v stolpcih, ki so označene z različnimi črkami se statistično značilno razlikujejo (p<0,05),  
A B C = vrednosti v vrsticah, označene z različnimi črkami, se statistično značilno razlikujejo (p<0,05),  
Konc. TI = koncentracija taninskega izvlečka, F = farmatan, Q = kebračo, T = taninska kislina

Ugotovili smo, da je po 48-urni fermentaciji celuloze brez dodanega taninskega izvlečka nastalo 3,91 ml CH<sub>4</sub>. Največ metana pa je nastalo v vzorcu z dodatkom 0,33 mg F75/ml gojišča (4,34 ml CH<sub>4</sub>). Statistično značilno so količino metana znižali koncentraciji 0,67 in 1,33 mg TI/ml gojišča F75 in TAK, medtem ko so imele pri QUE vse koncentracije statistično značilen vpliv. Za najbolj inhibitorno se je izkazala koncentracija 1,33 mg TAK/ml gojišča.

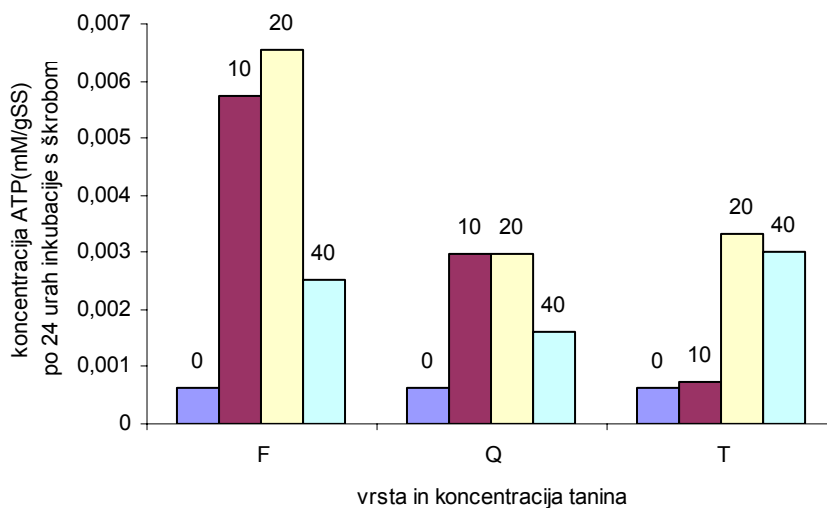
Po 48 urah fermentacije je imela statistično značilen vpliv na količino mikrobnega ATP le koncentracija 1,33 mg TAK/ml gojišča. Zanimivo pa je, da smo v primerjevi s 24-urno inkubacijo s celulozo odkrili 100 do 1000-krat manj mikrobnega ATP. 1000-krat manjše količine ATP smo izmerili v vzorcih z dodatkom najnižje koncentracije (0,33 mg TI/ml gojišča) izvlečka kebračo.

### 4.1.3 Fermentacija škroba po 24 urah *in vitro* inkubacije v vampnem soku ob dodatku taninskih izvlečkov



Slika 13: Vpliv različnih koncentracij taninov na količino CH<sub>4</sub> v vampnem soku po 24 urah inkubacije s škrobom

F-farmatan, Q-kebračo, T-taninska kislina, 0-negativna kontrola



Slika 14: Vpliv različnih koncentracij taninov na koncentracijo mikrobnega ATP v vampnem soku po 24 urah inkubacije s škrobom

F-farmatan, Q-kebračo, T-taninska kislina, 0-negativna kontrola

Preglednica 10: Volumen metana in koncentracija mikrobnega ATP v vampnem soku po 24 urah *in vitro* fermentacije škroba ob dodatku različnih koncentracij taninskih izvlečkov

Opazovana lastnost	Konc. TI (mg/ml gojišča)	F	Q	T
Volumen CH <sub>4</sub> (ml)	0	2,84 <sup>a</sup>	2,84 <sup>a</sup>	2,84 <sup>a</sup>
	0,33	2,81 <sup>a</sup>	2,94 <sup>a</sup>	2,87 <sup>a</sup>
	0,67	2,43 <sup>bB</sup>	2,65 <sup>aA</sup>	2,61 <sup>aA</sup>
	1,33	1,71 <sup>cA</sup>	1,59 <sup>bB</sup>	1,15 <sup>bC</sup>
ATP (mmol/g SS)	0	6,26*10 <sup>-4c</sup>	6,26*10 <sup>-4b</sup>	6,26*10 <sup>-4b</sup>
	0,33	5,73*10 <sup>-3aA</sup>	2,96*10 <sup>-3aB</sup>	7,19*10 <sup>-4bC</sup>
	0,67	6,54*10 <sup>-3aA</sup>	2,97*10 <sup>-3aB</sup>	3,32*10 <sup>-3aB</sup>
	1,33	2,51*10 <sup>-3b</sup>	1,63*10 <sup>-3a</sup>	3,00*10 <sup>-3a</sup>

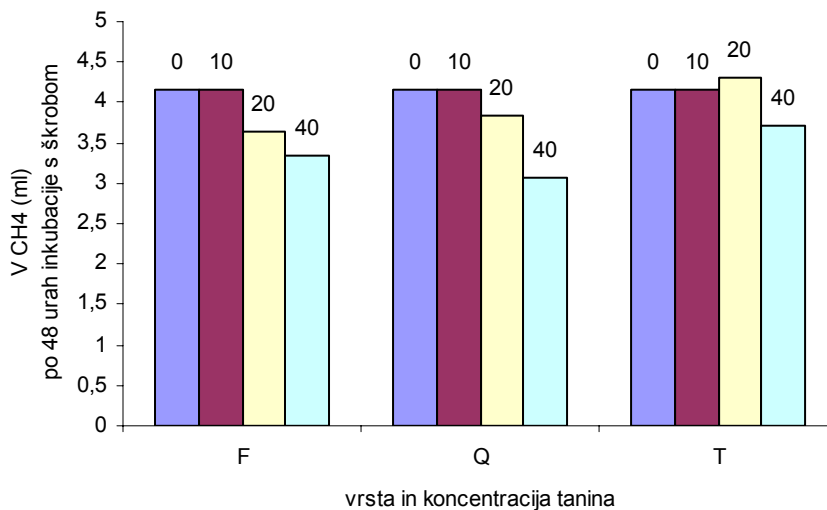
\*a,b,c = vrednosti v stolpcih, ki so označene z različnimi črkami se statistično značilno razlikujejo (p<0,05),  
 A B C = vrednosti v vrsticah, označene z različnimi črkami, se statistično značilno razlikujejo (p<0,05),  
 Konc. TI = koncentracija taninskega izvlečka, F = farmatan, Q = kebračo, T = taninska kislina

Metanogeni mikroorganizmi so po 24 urah inkubacije največ metana proizvedli v vzorcih ob dodatku 0,33 mg/ml gojišča QUE in TAK. Statistično značilno se je količina metana najbolj znižala ob dodatku koncentracij 1,33 mg TI/ml gojišča vseh taninskih izvlečkov.

Po 24 urah inkubacije s škrobom smo najmanjšo vrednost ATP zabeležili v vzorcih brez dodatka taninskih izvlečkov (6,26\*10<sup>-4</sup> mmol ATP/g SS škroba). Statistično značilen in ugoden vpliv so imele koncentracije 0,33, 0,67 in 1,33 mg TI/ml gojišča F75 in QUE, medtem ko sta imeli pri TAK statistično značilen vpliv koncentraciji 0,67 in 1,33 mg TI/ml gojišča. V primerjavi s 24-urno inkubacijo s celulozo ima TAK pri vseh koncentracijah ravno nasproten učinek, in sicer se je koncentracija mikrobnega ATP v primerjavi s kontrolo povečala. Pri QUE pa smo do podobnih ugotovitev prišli pri koncentracijah 0,67 in 1,33 mg TI/ml gojišča.

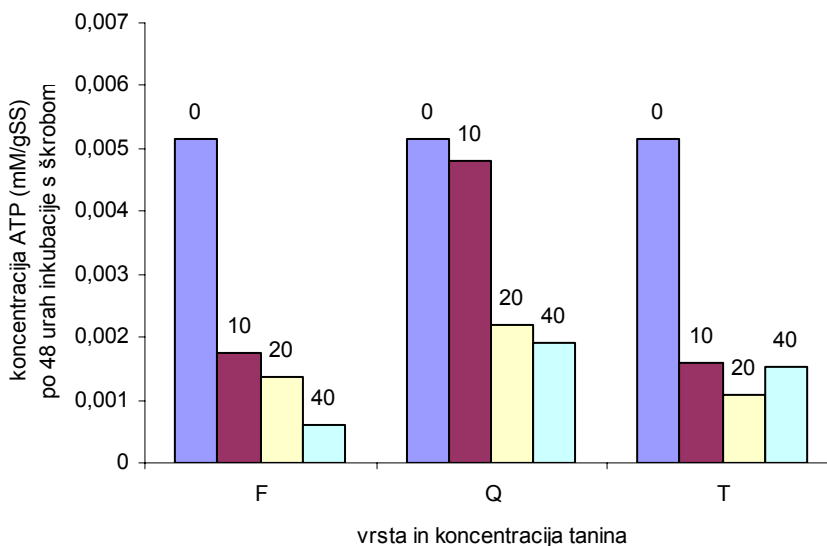


#### 4.1.4 Fermentacija škroba po 48 urah *in vitro* inkubacije v vampnem soku ob dodatku taninskih izvlečkov



Slika 15: Vpliv različnih koncentracij taninov na količino CH<sub>4</sub> v vampnem soku po 48 urah inkubacije s škrobom

F-farmatan, Q-kebračo, T-taninska kislina, 0-negativna kontrola



Slika 16: Vpliv različnih koncentracij taninov na koncentracijo mikrobnega ATP v vampnem soku po 48 urah inkubacije s škrobom

F-farmatan, Q-kebračo, T-taninska kislina, 0-negativna kontrola

Preglednica 11: Volumen metana in količina mikrobnega ATP v vavnem soku po 48 urah *in vitro* fermentacije škroba ob dodatku različnih koncentracij taninskih izvlečkov

Opazovana lastnost	Konc. TI (mg/ml gojišča)	F	Q	T
Volumen CH <sub>4</sub> (ml)	0	4,17 <sup>a</sup>	4,17 <sup>a</sup>	4,17 <sup>a</sup>
	0,33	4,16 <sup>a</sup>	4,16 <sup>a</sup>	4,17 <sup>a</sup>
	0,67	3,64 <sup>bB</sup>	3,83 <sup>aB</sup>	4,31 <sup>aA</sup>
	1,33	3,35 <sup>bA</sup>	3,07 <sup>bB</sup>	3,72 <sup>bA</sup>
ATP (mmol/g SS)	0	5,15*10 <sup>-3a</sup>	5,15*10 <sup>-3a</sup>	5,15*10 <sup>-3a</sup>
	0,33	1,74*10 <sup>-3aB</sup>	4,80*10 <sup>-3aA</sup>	1,58*10 <sup>-3bB</sup>
	0,67	1,37*10 <sup>-3b</sup>	2,20*10 <sup>-3b</sup>	1,08*10 <sup>-3b</sup>
	1,33	5,90*10 <sup>-4cB</sup>	1,92*10 <sup>-3bA</sup>	1,53*10 <sup>-3bA</sup>

\*a,b,c = vrednosti v stolpcih, ki so označene z različnimi črkami se statistično značilno razlikujejo (p<0,05),  
A B C = vrednosti v vrsticah, označene z različnimi črkami, se statistično značilno razlikujejo (p<0,05),  
Konc. TI = koncentracija taninskega izvlečka, F = farmatan, Q = kebračo, T = taninska kislina

Po 48 urah fermentacije škroba je največ metana nastalo v vzorcu z dodano (0,33 mg TI/ml gojišča) TAK (2,94 ml CH<sub>4</sub>). Statistično značilno so količino metana znižale koncentracije 0,67 mg F75/ml gojišča in 1,33 mg TI/ml gojišča F75, QUE in TAK.

Največ ATP smo zabeležili v vzorcih brez dodanega taninskega izvlečka (5,15\*10<sup>-3</sup> mmol ATP/g SS škroba). Nobena od koncentracij dodanih taninskih izvlečkov ni ugodno vplivala na koncentracijo mikrobnega ATP. Pokazal se je celo negativen vpliv vseh koncentracij dodanih taninskih izvlečkov, saj se je koncentracija ATP zmanjšala v primerjavi z negativno kontrolo. Pri negativni kontroli pa se je koncentracija ATP, v primerjavi s 24-urno inkubacijo s škrobom, zvišala

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Tanini so polifenolne snovi rastlinskega izvora in so ena od sestavin krme prežvekovalcev. Če so prisotni v velikih koncentracijah, lahko negativno vplivajo na mikrobn populacijo vampa in na zdravje samih živali. V ustreznih manjših koncentracijah pa imajo pozitiven vpliv na celoten proces prebave krme in absorpcijo hranilnih snovi v tankem črevesu. Zaradi ugodnih učinkov na živali, ki so posledica različnih mehanizmov delovanja, tanine uporabljamo tudi kot krmne dodatke.

Namen raziskave je bil ugotoviti, kako tri izbrane vrste taninov vplivajo na mikrobn produkcijo metana in priraščanje skupne mikrobn biomase v vampu in pri katerih koncentracijah so ti vplivi statistično značilni. Med številnimi različnimi vrstami taninov, ki jih preizkuša slovenski proizvajalec teh prehranskih dodatkov, smo izbrali en pripravek kondenziranih taninov (QUE) in dva pripravka hidrolizirajočih taninov (F75 in TAK).

Začetki tehnike merjenja proizvedenega bioplina pri fermentaciji v vampu prežvekovalcev, segajo v leto 1940. Menke in sod. (1979) (cit. po Getachew in sod., 1998) so poročali o značilni povezavi med produkcijo plina *in vitro* in resnično prebavljivostjo krme *in vivo*. Pri *in vitro* poskusu, kjer substrat inkubiramo z ustrežno pripravljenim vampnim sokom, vampni mikroorganizmi ogljikove hidrate fermentirajo v kratkoverižne maščobne kisline (ocetna, propionska in maslena kislina), ob tem in v nadaljnjih procesih nastajajo plini, predvsem CO<sub>2</sub> in CH<sub>4</sub> ter nova mikrobn biomasa (Getachew in sod, 1998). Molarno razmerje nastalih kratkoverižnih maščobnih kislin je odvisno od vrste substrata. Pri ogljikovih hidratih, ki hitro fermentirajo (npr.škrob) nastane več propionata kot pri ogljikovih hidratih, ki počasi fermentirajo (npr.celuloza). Večja produkcija propionata ima za posledico manjšo produkcijo metana. V primeru, da pri fermentaciji substrata nastane več acetata, nastane tudi večja količina metana v primerjavi s fermentacijo, kjer nastane več propionata. To pomeni, da se zaradi sprememb v razmerju nastalih kratkoverižnih maščobnih kislin spreminja sestava produciranega plina v vampu prežvekovalca. Obstaja pa še mnogo drugih faktorjev, ki vplivajo na samo mikrobn fermentacijo krme in na tvorbo metana (Getachew in sod, 1998; Hobson, 1997).

Na mikrobn fermentacijo in tvorbo plinov lahko vplivamo s krmno in krmnimi dodatki in eden izmed takšnih dodatkov so tanini. Dodatek taninskih izvlečkov zmanjša prebavljivost substrata. Makkar in sodelavci (1988) so poročali o vplivu hrastovih taninov na mikrobn encimsko aktivnost. Dokazali so, da dodatek hrastovih taninov inhibira aktivnost ureaze, karboksimetil celulaze in glutamat dehidrogenaze. Mehanizem, s katerim tanini inhibirajo ali pa v določenih primerih stimulirajo mikrobn encime, lahko pojasnimo s spremembo konformacije samega encima. Hervás in sodelavci (2003) pa so pri ovcah proučevali vpliv različnih koncentracij izvlečka kebračo. Ugotovili so, da je bila *in vitro* fermentacija odvisna tako od vrste uporabljenega substrata kot od koncentracije izvlečka kebračo. Z naraščajočo koncentracijo izvlečka kebračo se je znižala produkcija plina in hitrost razgradnje substrata. Izkazalo se je, da je bila največja koncentracija (3,0 g/kg žive teže dnevno) izvlečka kebračo toksična za mikrobn populacijo v vampu in za ovce. Tudi v našem poskusu je taninski izvleček kebračo znižal produkcijo metana. Z naraščajočo koncentracijo taninskega izvlečka kebračo se je zmanjševala produkcija metana in skupnega bioplina pri fermentaciji celuloze in pri fermentaciji škroba (preglednica 8,

preglednica 10, priloga C: slika 1, slika 2, slika 3, slika 4). Prav tako pa se je produkcija metana zmanjšala ob dodatku ostalih taninskih izvlečkov, z naraščajočo koncentracijo farmatana in taninske kisline. Pri obeh uporabljenih substratih (celuloza in škrob) je produkcijo metana najbolj zmanjšala največja koncentracija taninskih izvlečkov (1,33 mg/ml gojišča).

Zaznali pa smo razliko v količini nastalega metana pri fermentaciji celuloze in fermentaciji škroba. Več metana in tudi več skupnega bioplina je nastalo pri fermentaciji škroba kot pri fermentaciji celuloze (slika 9, slika 13, priloga C: slika 1, slika 3), kar je v nasprotju z literaturnimi podatki. Pri hitro fermentirajočih ogljikovih hidratih (škrob) naj bi praviloma nastalo več propionata, kot pri počasi fermentirajočih ogljikovih hidratih (celuloza). Pri tem je vodik nedostopen za metanogene mikroorganizme in je produkcija metana inhibirana (Hobson, 1997; Russell, 1998). Ravno obrnjene rezultate je v našem primeru težko direktno pojasniti.

Poleg našega poskusa je istočasno tekkel tudi eksperiment o vplivu taninov na tvorbo kratkoverižnih maščobnih kislin in metana pri *in vitro* fermentaciji v vampnem soku (Kos, 2007). Oba poskusa sta potekala *in vitro* pri enakih pogojih. Tak poskusni sistem je zaprt šaržni sistem inkubacije do 48 ur, medtem ko je vamp biotehnološko gledano odprt, pretočni sistem s stalnim dohranjevanjem in v njem vladajo nekoliko drugačne razmere in zakonitosti kot v šaržnih sistemih. V *in vitro* sistemu smo uporabili čiste substrate, v vampu pa so prisotni mešani substrati in glede na to se lahko združba mikroorganizmov odziva na drugačen način. Razpoložljivi literaturni viri o različnih vplivih hitro in počasi fermentirajočih substratov na produkcijo metana v vampu se nanašajo na *in vivo* poskuse in nativno krmo.

V omenjenem vzporednem poskusu (Kos, 2007) je bilo dokazano, da je pri fermentaciji celuloze nastalo več oetne kisline kot propionske kisline (priloga A). Pri fermentaciji škroba je nastalo nekoliko več propionske kisline kot pri fermentaciji celuloze (priloga B), vendar razlike niso bile statistično značilne, količina oetne kisline pa je bila v obeh primerih praktično ista. Vsebnost maslene kisline se med substratoma ni statistično značilno razlikovala. Tudi v tem primeru so dokazali, da je več metana nastalo pri fermentaciji škroba, kot pri fermentaciji celuloze.

Substrat, ki ga žival zaužije, je v procesu prebave izpostavljen *in vivo* fermentaciji v predželodcih, medtem ko sta obe raziskavi potekali *in vitro*, v zaprtem nepretočnem sistemu, kjer je bila začetna mikrobna združba eneka združbi v vampnem ekosistemu. Sčasoma pa se struktura mikrobne združbe v *in vitro* sistemu lahko spremeni in ni več pravi odsev dejanskega stanja v vampu prežvekovalca. Morda je prav zaradi spreminjanja mikrobne združbe v *in vitro* poskusu nastalo pri fermentaciji škroba več metana, kot pri fermentaciji celuloze.

Zmanjšanje produkcije plina *in vitro* zaradi dodanih taninov naj bi bilo povezano z manjšo mikrobno produkcijo hlapnih kratkoverižnih maščobnih kislin (Blümmel in Bullerdieck, 1997). Das in sod. (1996) so izmerili skupno produkcijo plina in hlapne kratkoverižne maščobne kisline po 24 in 48 urah *in vitro* fermentacije. Ugotovili so, da sta se produkcija plina in koncentracija kratkoverižnih maščobnih kislin zmanjšala, s

povečevanjem količine dodanega tanina. Do enakih ugotovitev so prišli tudi v raziskavi Kos (2007), kjer je dodatek taninskih izvlečkov zavrl tvorbo kratkoverižnih maščobnih kislin in zmanjšal produkcijo metana. Pri obeh uporabljenih substratih pa je njun nastanek najbolj zmanjšala največja koncentracija taninskih izvlečkov (1,33 mg/ml gojišča). Podobne rezultate kaže tudi naša raziskava. Na produkcijo metana sta po 24 urni fermentaciji celuloze najbolj zaviralno delovali največji koncentraciji (1,33 mg/ml gojišča) farmatana in taninske kisline (preglednica 8), po 48 urni inkubaciji pa največji koncentraciji izvlečka kebračo in taninske kisline (preglednica 9). Po 24 in 48 urni fermentaciji škroba je najbolj inhibiral tvorbo metana dodatek največje koncentracije farmatana, izvlečka kebračo in taninske kisline (preglednica 10, preglednica 11). Enak trend vpliva so imele koncentracije taninskih izvlečkov tudi na produkcijo skupnega bioplina (slika 1 (priloga C), slika 2 (priloga C), slika 3 (priloga C), slika 4 (priloga C)).

Rezultati kažejo, da je taninska kislina najbolj inhibirala metanogenezo. Prav tako pa sta bila pri tem uspešna farmatan in kebračo, saj je bila količina proizvedenega metana v primerjavi z negativno kontrolo v vseh primerih manjša. Glede na postavljeno hipotezo, bi se potemtakem morala količina mikrobne biomase v primerjavi z negativno kontrolo povečati v vzorcih z dodatkom taninske kisline. Vendar rezultati tega ne potrjujejo. Količina mikrobne biomase se je močno povečala v primerjavi z negativno kontrolo v vzorcih z dodatkom farmatana. Generalno gledano je bil v obeh primerih najbolj učinkovit farmatan, saj je zmanjšal nastajanje metana in hkrati ugodno vplival na povečanje mikrobne biomase v primerjavi z negativno kontrolo. Farmatan je mešanica različnih hidrolizirajočih taninov, ki jih morda nekateri od vampnih mikrobov lahko izkoristijo kot dodatni substrat za rast in razmnoževanje..

Večina mikroorganizmov je do neke mere občutljivih na inhibitorne učinke taninov, čeprav lahko nekateri tolerirajo visoke koncentracije le-teh in jih celo razgrajujejo in uporabijo kot vir ogljika za rast (McLeod, 1974; Krumholz in Bryant, 1986). Nekateri vrste s to sposobnostjo so bile tudi identificirane: *Streptococcus caprinus* izoliran iz prebavil divjih koz (razgrajuje komplekse taninske kisline s proteini), *Streptococcus gallolyticus*, sevi sorodni *S. bovis* in *S. gallolyticus*, vrste iz rodu *Clostridium* in vrste iz družine *Enterobacteriaceae* (Chiquette in sod., 1988; Brooker in sod., 1994; Osawa, 1992; Nelson in sod., 1998; Nelson in sod., 1995). Grm (2006) pa je v svojem diplomskem delu dokazala izboljšano rast čistih kultur bakterije *S. bovis* in *S. ruminantium* ob dodatku tanina. Rast je bila boljša v prisotnosti večjih koncentracij (1,00 g/l) kostanjevega tanina (farmatan).

Silanikove (2001) je pozitivne učinke taninov na gostiteljsko žival dokazal ob manjših koncentracijah ter ob dodatku polietilenglikola (PEG), ki ponavadi s tanini tvori komplekse. V vodi topen polivinil polipirrolidon (PVPP) in vodotopen polietilen glikol (PEG) vsebujeta veliko število kisikovih atomov, ki lahko tvorijo vodikove vezi s fenolnimi skupinami taninov in tako povzročijo njihovo obarjanje iz raztopine. Zato dodatek PEG in PVPP uporabljajo za nevtralizacijo negativnih učinkov taninov pri živalih. V diplomski nalogi so bile koncentracije dodanih taninov dovolj majhne, glede na koncentracije, ki se uporabljajo v praksi (1,5-3 % farmatan, 3-6 % kebračo) (Lavrenčič, 2009) in lahko predvidevamo, da ne bi negativno vplivale na živali. Njihov učinek je bil ugoden, saj so v večini primerov koncentracije dodanih taninskih izvlečkov zmanjšale

tvorbo metana, medtem ko so koncentracije 0,33 in 0,67 (mg TI/ml gojišča) F75 in 0,67 mg QUE/ml gojišča, količino mikrobne biomase povečale po 24 urah inkubaciji s celulozo. Prav tako so ugodno vplivale na mikrobnio biomaso koncentracije 0,33, 0,67 in 1,33 (mg TI/ml gojišča) F75, QUE in 0,67 in 1,33 (mg TI/ml gojišča) TAK po 24 urah inkubacije s škrobom (preglednica 8, preglednica 10).

Ob prisotnosti PEG ob dodatku taninov, se poveča sinteza mikrobnih proteinov, zmanjša pa se razgradljivost proteinov in drugih makromolekul v vampu prežvekovalca. Poveča se dostopnost ne-amonijskega dušika v spodnjem delu črevesja, kar vodi v povečano produkcijo mleka, mesa in volne. Prav tako pa se zmanjša produkcija metana in prostega dušika in njuno izločanje v okolje (Makkar, 2003), kar ima zelo pozitivne učinke, predvsem z vidika zmanjšanja emisij toplogrednih plinov v okolje.

Tavendale in sod. (2005) navajajo, da kondenzirani tanini močvirske nokote (*Lotus pedunculatus*) in lucerne (*Medicago sativa*) vplivajo na metanogenezo posredno in neposredno. Posredno z zmanjšanjem produkcije vodika (verjetno tudi z zmanjšanjem prebavljivosti krme) in neposredno z inhibitornimi učinki na metanogene arheje. Field in Lettinga (1987, cit. po Tavendale in sod., 2005) pa sta poročala, da hidrolizirajoči taninski izvlečki, kot je galotaninska kislina, za 50 % inhibirajo produkcijo metana. Idealna mešanica za inhibicijo metanogeneze v vampu bi bila tista, ki bi zmanjšala produkcijo metana in istočasno povečala sintezo propionata in vampnih mikrobnih proteinov (Tavendale in sod., 2005).

Iz rezultatov naše raziskave ne moremo sklepati, katere skupine vampnih mikroorganizmov so taninski izvlečki inhibirali. Povprečna koncentracija vodika v vampu je 0,18 % (Hobson, 1997) in predvidevamo da je bila tudi začetna koncentracija vodika v našem poskusu podobna. Z uporabljenim metodo plinskromatografske analize nastalega bioplina, vodika nismo zaznali ne na začetku in ne na koncu poskusa. Spodnja meja detekcije je pri tej metodi 0,5 %. Eventuelnih povečanj koncentracije vodika do 0,5 %, ki bi nakazovale direktno inhibicijo metanogenih arhej s tem eksperimentalnim sistemom nismo mogli zaznati.

V sedimentih in številnih drugih anaerobnih habitatih, lahko kratkoverižne maščobne kisline predstavljajo substrat metanogenim arhejam. To so počasi rastoči organizmi, kateri se iz vampnega sistema odplavljajo. Izjemoma se v določenih pogojih (krma) pojavi alternativna pot porabe H<sub>2</sub> in CO<sub>2</sub>, in sicer acetogeneza. Globalno gledano, se biološko 5-krat več CO<sub>2</sub> reducira v acetat, kot v metan, vendar je ta proces v vampu zanemarljiv. V preteklosti so izolirali vampni arheji, ki sta sposobni H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> acetogeneze: *Eubacterium limosum* in *Acetitomaculum ruminis*. Večina vampnih metanogenih arhej producira metan iz H<sub>2</sub> in CO<sub>2</sub> in so prisotni v velikih koncentracijah (*Methanobacterium ruminantium*, *Methanobrevibacter ruminantium*). Poleg acetata, lahko metanogene arheje izkoriščajo format, metanol, metilamin, di-, trietilamin. Acetogenezi posvečajo veliko pozornosti, saj predstavlja alternativo metanogenezi v smislu odstranjevanja vodika iz vampa. Na ta način bi se izognili energijskim izgubam živali in okoljskim problemom, katere povzroča metan (Hobson, 1997).

Količino mikrobne biomase v *in vitro* poskusu smo sledili posredno preko količine mikrobne ATP z ATP bioluminiscenčnim testom. Številni raziskovalci uporabljajo ATP-luciferazni test za ugotavljanje količine mikrobne biomase v različnih okoljih, kot so morski in sladkovodni sistemi, odplake, hrana in v laboratorijskih študijah bakterij, alg... (Cheer, 1974; Lundin, 2000). Bioluminiscenčni test za merjenje ATP oziroma za ugotavljanje mikrobne biomase je zelo uporaben, saj je količina ATP v vseh živih bakterijskih celicah približno enaka ( $10^{-15}$  g/celico) (Stanley, 1986). ATP test je hiter, občutljiv, ponovljiv, enostaven ter poceni (Thore in sod., 1975). Za ekstrakcijo ATP iz celic, smo uporabili metodo z vrelin pufrom TRIS-HCl. V vzorcih smo izmerili molarno koncentracijo ATP, ki smo jo preračunali v število milimolov na gram suhe snovi vzorca.

V diplomski nalogi smo večjo produkcijo mikrobne biomase zabeležili pri fermentaciji škroba ob dodatku taninov, kot pri fermentaciji celuloze ob dodatku taninov po 24 urah inkubacije (slika 10, slika 14). Podobne rezultate so zabeležili Erfle in sod., 1979.

Na količino mikrobne biomase po 24 urni inkubaciji s celulozo so najbolj zaviralno delovale najvišje koncentracije (1,33 mg/ml gojišča) vseh taninskih izvlečkov. Tanini se z ogljikovimi hidrati povezujejo s hidrofobnimi vezmi (Haslam, 1989), najpogosteje s celulozo, hemicelulozo, škrobom ter pektinom (McSweeney in sod., 2001; Reed, 1995). Lahko pa je tudi posledica zmanjšanja količine proteolitičnih, ureolitičnih, amilolitičnih in celulolitičnih encimov mikroorganizmov, njihovih glavnih fermentacijskih aktivnosti in celičnega razmnoževanja (Makkar in sod., 1988).

Koncentraciji 0,33 in 0,67 (mg TI/ml gojišča) farmatana in koncentracija 0,33 (mg TI/ml gojišča) izvlečka kebračo so ugodno in celo stimulatивно vplivale na količino mikrobne biomase (preglednica 8) po 24 urah fermentacije celuloze. Po 48 urah fermentacije celuloze je bila mikrobna biomasa 100 do 1000 – krat manjša v primerjavi s 24 urno fermentacijo. Izjema je bila le vzorec z dodatkom 1,33 mg TAK/ml gojišča. V tem primeru je TAK najverjetneje služila kot vir substrata, ki so ga bakterije razgradile s pomočjo tanaz in na ta račun povečale količino svoje biomase.

Po 24 urni inkubaciji s škrobom so količino mikrobne biomase povečale koncentracije 0,33, 0,67 in 1,33 (mg TI/ml gojišča) farmatana in kebračo izvlečka in pa koncentraciji 0,33 in 1,33 (mg TI/ml gojišča) taninske kisline v primerjavi s kontrolnim vzorcem (preglednica 10). Kasneje, po 48 urni inkubaciji pa se je trend pri škrobu obrnil.

Lahko sklepamo, da so rezultati po 24 urah inkubacije bolj relevantni kot po 48 urah, saj smo z ATP-luciferaznim testom ugotavljali mikrobno biomaso, ki skupno zajame bakterije, praživali in glive. Naš poskus smo izvajali v zaprtem *in vitro* sistemu brez kontinuiranega dohranjevanja. To pa so pogoji, ki so precej drugačni od *in vivo* sistema vampa. Sklepamo lahko, da bakterije po 24 urah izčrpajo substrat, začnejo odmirati in poleg vsega predstavljajo tudi vir hrane za praživali. Praživali zaradi svoje velikosti predstavljajo podoben delež mikrobne biomase v vampu kot bakterije. Pripisujemo jim pomembno vlogo pri razgradnji in fermentaciji škroba, ki ga lahko požirajo. S škrobnimi zrci se lahko napolnijo že v nekaj sekundah. S tem lahko pojasnimo rezultate po 48 urni inkubaciji s škrobom. Preko ATP ugotovljena količina mikrobne biomase verjetno zajema mikrobno biomaso praživali in bakterij, saj praživali višek škroba izločijo nazaj v okolico in je spet dostopen bakterijam. Poleg ustreznega substrata pa so k hitri rasti in razmnoževanju praživali prispevale še ugodne razmere zaprtega šaržnega sistema, saj njihova rast v pretočnem sistemu ni tako uspešna (Hobson, 1997).

Na podlagi naših rezultatov lahko podamo naslednje zaključke:

- dodani taninski izvlečki (farmatan, kebračo in taninska kislina) so zmanjšali produkcijo metana pri *in vitro* fermentaciji celuloze in škroba v vampnem soku
- intenzivnost mikrobne produkcije metana se je zmanjšala s povečevanjem koncentracije dodanih taninskih izvlečkov, in sicer najbolj pri največji koncentraciji taninskih izvlečkov (1,33 mg/ml gojišča)
- ugotovili smo, da je pri *in vitro* fermentaciji škroba v vampnem soku nastalo več metana, kot pri fermentaciji celuloze
- zaznali smo ugoden in celo stimulativen vpliv taninskih izvlečkov na mikrobnno biomaso po 24 urni fermentaciji substrata v vampnem soku
- farmatan je tako pri fermentaciji celuloze kot pri fermentaciji škroba po 24 urah inkubacije, najbolj povečal količino mikrobne biomase; vampni mikrobi ga verjetno izkoriščajo kot dodatni substrat



## 6 POVZETEK

Tanini so rastlinski polimeri z veliko molekulsko maso, ki ščitijo rastline pred herbivori, kateri se z njimi prehranjujejo. Pri pašni živini visoke koncentracije taninov povzročajo neugodne učinke pri prehranjevanju, in sicer zaradi tvorbe netopnih kompleksov s proteini, inhibicije encimov in neprijetnega trpkega okusa. Kombinacija vseh teh faktorjev pa zavira rast in produktivnost živali, ki se hranijo z rastlinami z visoko vsebnostjo taninov. Nasprotno pa nizke koncentracije taninov (< 5% suhe teže) lahko koristijo prežvekovalcem in izboljšajo vampno mikrobn fermentacijo substratov. Tanini v določenih pogojih tvorijo reverzibilne komplekse s proteini iz krme in na ta način omogočijo prežvekovalcem dodaten vir aminokislin, saj te komplekse vampni mikroorganizmi niso sposobni razgraditi.

Cilj diplomske naloge je bil preveriti vpliv izbranih vrst taninov (kondenzirani in hidrolizirajoči) na raven produkcije metana in priraščanje skupne mikrobne biomase v vampu prežvekovalca in pri katerih koncentracijah so ti vplivi statistično značilni pri *in vitro* fermentaciji celuloze in škroba v vampnem soku.

V poskusu smo uporabili farmatan 75 (F75) in taninsko kislino (TAK), ki sta hidrolizirajoča tanina ter taninski pripravek kebračo (QUE), ki je kondenziran tanin, v naslednjih koncentracijah: 0,33 mg TI/ml gojišča, 0,67 mg TI/ml gojišča in 1,33 mg TI/ml gojišča. Izvedli smo Hohenheimski plinski test z metodo po Menke in Steingass (1988). Delež metana, ki je nastal pri fermentaciji smo določili s plinsko kromatografijo. Prostornino nastalega plina (metana) smo izračunali iz njegovega deleža in prostornine nastalega bioplina. Mikrobno biomaso oziroma aktivnost mikrobne mase smo spremljali z ATP-luciferaznim testom. Predhodno pa smo ATP ekstrahirali po metodi z vrelim puffrom.

Dodatek taninskih izvlečkov je statistično značilno zmanjšal produkcijo metana v primerjavi s kontrolnim vzorcem, kjer ni bilo prisotnih taninskih izvlečkov, medtem ko je količina mikrobne biomase ob dodatku taninskih izvlečkov narasla v primerjavi s kontrolnim vzorcem. Z naraščanjem koncentracije dodanih taninskih izvlečkov se je produkcija metana zmanjševala, tako pri fermentaciji celuloze kot pri fermentaciji škroba. Na nastanek metana sta po 24 urni fermentaciji celuloze najbolj zaviralno delovali največji koncentraciji (1,33 mg TI/ml gojišča) farmatana in taninske kisline, po 48 urni inkubaciji pa največji koncentraciji izvlečka kebračo in taninske kisline. Po 24 in 48 urni fermentaciji škroba je najbolj inhibiral tvorbo metana dodatek največje koncentracije farmatana, kebračo izvlečka in taninske kisline.

Količina mikrobne biomase je po 24 urni inkubaciji celuloze najbolj narasla ob dodatku 0,33 in 0,67 (mg TI/ml gojišča) F75 in QUE. Po 48 urah pa je imel ugoden vpliv le dodatek 1,33 mg TAK/ml gojišča.

Prav tako so ugodno vplivale na mikrobn biomaso koncentracije 0,33, 0,67 in 1,33 (mg TI/ml gojišča) F75, QUE in TAK po 24 urah inkubacije s škrobom, po 48 urni inkubaciji s škrobom pa se je količina mikrobne biomase povečala v kontrolnem vzorcu in bila manjša v vzorcih z dodatkom taninskih izvlečkov.

## 7 VIRI

Acamovic T., Stewart C. S., Brooker J. D. 2000. Plant phenolic compounds and gastrointestinal microorganisms. V: Tannins in livestock and human nutrition. Proceedings of an International Workshop, Adelaide, Australia, 31 May – 2 June, 1999. Canberra, Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR): 137-139

ANU. 1998. Tannins. Canberra, ANU- Australian National University. (30. okt. 1998)  
<http://fennerschool-associated.anu.edu.au//fpt/nwfp/tannins/tannins.html> (nov. 2007): 1 str

Bae H.D., McAllister T.A., Yanke J., Cheng K.J., Muir A.D. 1993. Effects of condensed tannins on endoglucanase activity and filter paper digestion by *Fibrobacter succinogenes* S85. Applied and Environmental Microbiology, 59: 2132-2138

Bhat T.K., Sharma O.P., Singh B. 1998. Microbial degradation of tannins - A current perspective. Biodegradation, 9: 343-357

Blümmel M., Bullerdieck P. 1997. The need to complement *in vitro* gas production measurements with residue determinations from *in sacco* degradabilities to improve the prediction of voluntary intake of hays. Journal of Animal Science, 64: 71-75

Brooker J. D., O'Donovan L.A., Skene I., Clarke K., Blackall L., Muslera P. 1994. *Streptococcus caprinus* sp.nov., a tannin-resistant ruminal bacterium from feral goats. Letters in Applied Microbiology, 18: 313-318

Brooker J. D., O'Donovan L.A., Skene I., Sellick G. 2000. Mechanisms of tannin resistance and detoxification in the rumen. V: Tannins in livestock and human nutrition: Proceedings of an International Workshop, Adelaide, Australia, 31 May 2 June, 1999. Canberra, Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR): 127 - 132

Butter N.L., Dawson J.M., Buttery P.J. 1999. Effects of dietary tannins on ruminants. V: Secondary plant products: antinutritional and beneficial actions in animal feeding. Caygill J.C., Mueller-Harvey I. (eds.). Nottingham, Nottingham University Press: 51-70

Cestnik V. 1994. Fiziologija prebave pri domačih živalih. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta: 135 str.

Cheer S., Gentile J.H., Hegre C.S. 1974. Improved methods for ATP analysis. Analytical Biochemistry, 60: 102-114

Chiquette J., Cheng K.J., Costerton J.W., Milligan L.P. 1988. Effect of tannins on the digestibility of two isosynthetic strains of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) using *in vitro* and *in sacco* techniques. Canadian Journal of Animal Science, 68: 751-760

Chung K.T., Lu Z., Chou M.W. 1998a. Mechanism of inhibition of tannic acid and related compounds on the growth of intestinal bacteria. Food and Chemical Toxicology, 36: 1053-1060

- Chung K.T., Wong T.Y., Wei C., Huang Y., Lin Y. 1998b. Tannins and human health: a review. *Food Science and Nutrition*, 38, 6: 421-464
- Das M.M., Dwivedi P.N., Karnani, L.K., Upadhyay V.S. 1996. *In vitro* gas production and rumen degradation characteristics of *Zizyphus* leaves. *Indian Journal of Animal Nutrition*, 13: 142-147
- Dehority B. A. 2003. Rumen microbiology. 1<sup>st</sup> ed. Nottingham, Nottingham University Press: 372 str.
- Dunshea F.R., Parker A.J., Rochfort S. 2007. Plant bioactives for ruminant health and productivity. *Phytochemistry*, 69: 299-322
- EPA. 2006. Methane. Washington, EPA – Unuted States Environmental Protection Agency. (19. okt. 2006)  
<http://epa.gov/methane/sources.html#natural> (28. maj 2009): 1 str.
- EEA. 2007. Okolje Evrope: četrta presoja: Povzetek. Beograd, EEA – European Environment Agency  
[http://reports.eea.europa.eu/state\\_of\\_environment\\_report\\_2007\\_2/sl/](http://reports.eea.europa.eu/state_of_environment_report_2007_2/sl/) (28. feb. 2008): 3 str.
- Erfle J.D., Mahadevan S., Sauer F.D. 1979. Effect of diet quality on adenosine-5'-triphosphate concentration and adenylate energy charge of rumen microbes. *Journal of Dairy Science*, 62: 284-291
- FAO. 2006. Livestock a major threat to environment. Rome, FAO - Food and Agriculture Organization (29. nov. 2006)  
<http://www.fao.org/newsroom/en/news/2006/1000448/index.html> (dec. 2007): 1 str.
- Farmatan - naraven izvleček pridobljen iz zdravega kostanjevega lesa. 2003. Sevnica, Tanin Sevnica.  
[http://www.tanin.si/slo/04-01\\_farmatan.html](http://www.tanin.si/slo/04-01_farmatan.html) (28. okt. 2007): 5 str.
- Getachew G., Blümmel M., Makkar H.P.S., Becker K. 1998. *In vitro* gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 72: 261-281
- Grm S. 2006. Vpliv kostanjevega tanina na rast in encimske aktivnosti vampnih bakterij *Streptococcus bovis* in *Selenomonas ruminantium*. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 62 str.
- Harborne J.B.1999. An overview of antinutritional factors in higher plants. II: Secondary plant products: antinutritional and beneficial actions in animal feeding. Caygill J.C., Mueller-Harvey I. (eds.). Nottingham, Nottingham University Press: 7-16
- Haslam E. 1989. Plant polyphenols: vegetable tannins revisited. Cambridge, Cambridge University Press: 230 str.

Hervás G., Frutos P., Javier Giráldez F., Mantecón A.R., Álvarez Del Pino M.C. 2003. Effect of different doses of quebracho tannins extract on rumen fermentation in ewes. *Animal Feed Science and Technology*, 109: 65-78

Hobson P.N. 1997. *The rumen microbial ecosystem*. 2<sup>nd</sup> ed. London, Blackie Academic & Profesional: 719 str.

Ishida A., Yoshikawa T., Nakazawa T., Kamidate T. 2002. Enhanced firefly bioluminescence assay of ATP in the presence of ATP extractants by using diethylaminoethyl-dextran. *Analytical Biochemistry*, 305: 236–241

Jansman A.J.M. 1993. Tannins in feedstuffs for simple-stomached animals. *Nutrition Research Review*, 6: 209-236

Jones G.A., McAllister T.A., Muir A.D., Cheng K.J. 1994. Effect of sainfoin (*Onobrychis vicifolia* Scop.) condensed tannins on growth and proteolysis by four strains of ruminal bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 1374-1378

Kamra D.N. 2005. Rumen microbial ecosystem. *Current Science*, 89: 124-135

Kos T. 2007. Vpliv taninov na tvorbo kratkoverižnih maščobnih kislin in metana pri *in vitro* fermentaciji v vavnem soku. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 66 str.

Krumholz L.R., Bryant M.P. 1986. *Eubacterium oxidoreducens* sp. nov. requiring H<sub>2</sub> or formate to degrade gallate pyrogallol, phloroglucinol and quercetin. *Archives of Microbiology*, 144: 8-14

Kumar R., Vaithyanathan S. 1990. Occurrence, nutritional significances and effect on animal productivity of tannins in tree leaves. *Animal Feed Science and Technology*, 30: 21-38

Lavrenčič A. 2009. Koncentracija taninov v praksi. Domžale, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko (osebni vir, april 2009)

Liu Y.-J., De Vico L., Lindh R. 2008. *Ab initio* investigation on the chemical origin of the firefly bioluminescence. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 194: 261–26

Lowry J.B., McSweeney C.S., Palmer B. 1996. Changing perceptions of the effect of plant phenolics on nutrient supply in the ruminant. *Australian Journal of Agricultural Research*, 47: 829-842

Lundin A. 2000. Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. *Methods in Enzymology*, 305: 346–370

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

Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 2003. Brock biology of microorganisms. 10<sup>th</sup> ed. London, Pearson Prentice Hall: 1019 str.

Makkar H.P.S. 2003. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. Small Ruminant Research, 49: 241-256

Makkar H.P.S., Singh B., Dawra R.K. 1988. Effect of tannin-rich leaves of oak (*Quercus incana*) on various microbial enzyme activities of the bovine rumen. British Journal of Nutrition, 60: 287-296

Mangan J.L. 1988. Nutritional effects of tannins in animal feeds. Nutrition Research Reviews, 1: 209-231

McElroy W.D. 1947. The energy source for bioluminescence in an isolated system. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 33: 342-345

McLeod M.N. 1974. Plant tannins – their role in forage quality. Nutrition Abstracts Reviews, 11: 803-815

McSweeney C.S., Palmer B., McNeill D.M., Krause D.O. 2001. Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. Animal Feed Science and Technology, 91: 83-93

Menke K.H., Steingass H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. Animal Research and Development, 28: 7-55

Methane. 2001. V: The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 13<sup>th</sup> ed. O'Neil M.J., Smith A., Heckelman P.E. Budavari S. (eds.). Whitehouse Station, Merck & Co.: 1064-1064

Miller T.L., Wolin M.J. 2001. Inhibition of growth of methane-producing bacteria of the ruminant forestomach by hydroxymethylglutaryl SCoA reductase inhibitors. Journal of Dairy Science, 84, 6: 1445-1448

Min K.L., Steghens J.P. 1999. The emitting species dissociated from the enzyme can emit the light in *Photinus pyralis* luciferase system. Biochemical and Biophysical Research Communications, 265: 273-278

Moss A.R., Jouany J.-P., Newbold J. 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. Annales de Zootechnie, 49: 231-253

Mueller-Harvey I. 1999. Tannins: Their nature and biological significance III: Secondary plant products: antinutritional and beneficial actions in animal feeding. Caygill J.C., Mueller-Harvey I. (eds.). Nottingham, Nottingham University Press: 17-39

Nelson K.E., Thonney M.L., Woolston T.K., Zinder S.H., Pell A.N. 1998. Phenotypic and phylogenetic characterization of ruminal tannin-tolerant bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 10: 3824-3830

Nelson K.E., Pell A.N., Schofield P., Zinder S. 1995. Isolation and characterization of an anaerobic ruminal bacterium capable of degrading hydrolyzable tannins. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 9: 3293-3298

Orešnik A. 1996. The effect of chestnut tannins of milk protein content in dairy cattle. *Krmiva*, 38, 1: 21-24

Osawa R. 1992. Tannin-protein complex-degrading enterobacteria isolated from the alimentary tracts of koalas and a selective medium for their enumeration. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 5: 1754-1759

Otto Dille. 2000. Vegetable extracts. Norderstedt, Otto Dille  
<http://www.otto-dille.de/english/quebracho.html> (13. feb. 2008): 1 str.

Roy Wilson Dickson. 2003. Quebracho. Staffordshire, Roy Wilson Dickson  
<http://www.r-w-d.co.uk/Quebracho.html> (28. jul. 2006): 1 str.

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

Russell J.B. 1998. The importance of pH on the regulation of ruminal acetate to propionate ratio and methane production *in vitro*. *Journal of Dairy Science*, 81: 3222-3230

SAS Institute Inc. 2001. The SAS system for windows: Release 8.02. Cary, NC, USA: software

Sigma. 2004. Product information. Adenosine 5'-triphosphate (ATP) Bioluminescent assay kit. Technical Bulletin. St. Louis, Sigma-Aldrich.  
<http://www.sigmaaldrich.com/sigma/bulletin/FLAAbul.pdf> (28. okt. 2007) : 3 str

Sigma. 2003. Product information. Tannic acid. St. Louis, Sigma-Aldrich.  
<http://www.sigmaaldrich.com/sigma/product%20information%20sheet/t0125pis.pdf> (28. okt. 2007): 2 str.

Silanikove N., Perevolotsky A., Provenza F.D. 2001. Use of tannin-binding chemicals to assay for tannins and their negative postingestive effects in ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 91: 69-81

Skubic B., Vengušt M. 1993. Prebava in presnova kostanjevega tanina pri sesalcih in njegovi vplivi na prebavne encime. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta: 32 str.

Sliwinski B.J., Soliva C.R., Machmüller A., Kreuzer M. 2002. Efficacy of plant extracts rich in secondary constituents to modify rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*, 101: 101-114

Stanley P.E. 1986. Extraction of adenosine triphosphate from microbial and somatic cells. *Methods in Enzymology*, 133: 14–22

Steinfeld H., Gerber P., Wassenarr T., Castel V., Rosales M., de Haan C. 2006. Livestock's long shadow: Environmental issues and options. FAO, Rome.  
<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/A0701E/A0701E00.pdf> (dec. 2008): 10 str.

Tavendale M.H., Meagher L.P., Pacheco D., Walker N., Attwood G.T., Sivakumaran S. 2005. Methane production from *in vitro* rumen incubations with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa*, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. *Animal Feed Science and Technology*, 123-124: 403-441

Thore A. 1979. Technical aspects of bioluminescent firefly luciferase assay of ATP. *Science Tools*, 26, 2:30–34

Thore A., Ansehn S., Lundin A., Bergman S. 1975. Detection of bacteriuria by luciferase assay of adenosine triphosphate. *Journal of Clinical Microbiology*, 1,1: 1–8

University of Wisconsin. 2007. Methane. Wisconsin, University of Wisconsin  
<http://scifun.chem.wisc.edu/chemweek/methane/methan0e.html> (dec. 2007): 1 str.

Unitan. 2007. Quebracho colorado tree. Buenos Aires, Unitan  
<http://www.unitan.net/english/quebracho.html> (28. okt. 2007): 1 str.

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

Verbič J., Sušin J., 2004. Viri toplogrednih plinov v kmetijstvu in možnosti za zmanjšanje izpustov V: Zbornik predavanj 13. posvetovanja o prehrani domačih živali "Zdravčevi-Erjavčevi dnevi", Radenci, 4. in 5. nov. 2004. Pen A. (ur.). Murska Sobota: Kmetijsko gozdarska zbornica Slovenije, Kmetijsko gozdarski zavod: 27-37

Zrimec A. 2001. Uporaba modela elektrokonformacijske sklopitve pri študiju vpliva spremenljivega električnega polja na delovanje membranskih proteinov. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 152 str.

Waghorn G.C., McNabb W.C. 2003. Consequences of plant phenolic compounds for productivity and health of ruminants. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62: 383-392

Wahlen M. 1993. The global methane cycle. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 21: 407-426

Whitford M. F., Teather R. M., Forster R. J. 2001. Phylogenetic analysis of methanogens from the bovine rumen. *BMC Microbiology*, 1-5

Wolin M.J. 1960. A theoretical rumen fermentation balance. *Journal of Dairy Science*, 43: 1452-1459

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



## ZAHVALA

Iskrena hvala mentorici Romani Marinšek Logar za vso pomoč, potrpežljivost in nasvete ter obilico vzpodbudnih besed.

Hvala prof. dr. Gorazdu Avguštinu za hitro in strokovno recenzijo diplomskega dela.

Zahvaljujem se doc. dr. Andreju Lavrenčiču za nasvete pri izdelavi diplomske naloge, statistično obdelavo rezultatov in za pripravljenost ter pomoč pri izvedbi poskusa, kadarkoli je bilo potrebno.

Zahvalila bi se tudi Marku Kodri, ki je vsakič poskrbel za strokoven odvzem vampnega soka in me kljub zgodnji uri vedno spravil v dobro voljo.

Zahvaljujem se tudi vsemu tehničnemu osebju v laboratorijih na Katedri za mikrobiologijo in mikrobo biotehnologijo in Katedri za prehrano Oddelka za zootehniko, ki so mi pomagali pri izvajanju poskusa.

Hvala Tini Kos, ki mi je s svojimi nasveti prizanesla marsikatero ponovitev poskusa in me večkrat nasmejala, ... skratka hvala za vso pomoč!

Hvala Sani Fajdiga za napotke in pomoč pri izvedbi ATP - luciferaznega testa.

Največja zahvala pa gre moji mami, Jelki Šentjerc. S svojo ljubeznijo in odrekanjem mi je omogočila študij. Hvala za vzpodbudo, podporo in pomoč tako v dobrih kot slabih trenutkih študentskega življenja. Hvala tudi sestri Branki in nečakinji Nataliji za vse vzpodbudne besede in še enkrat hvala Branki za finančne prilive tekom študija.

Hvala pa tudi Diani in Nataši ter ostalim prijateljem za čudovita študentska leta v Rožni Dolini.

Nazadnje bi se zahvalila Roku, ki me je s svojo ljubeznijo, smehom in ogromno potrpežljivosti spremljal v teh študentskih letih. Hvala za koristne računalniške nasvete.

## PRILOGE

PRILOGA A: Vsebnost hlapnih maščobnih kislin (HMK), metana in razmerji med C2 in C3 ter prostornino metana in vsoto HMK v vampnem soku po 24 urah *in vitro* fermentacije celuloze ob dodatku različnih taninskih izvlečkov (Kos, 2007, preglednica 13)

Opazovana lastnost	Konc. TI (mg/ml medija)	F75	QUE	TAK
Ocetna kislina (mmol/g SS)	0	10,5±0,4 <sup>aA</sup>	10,5±0,4 <sup>aA</sup>	10,5±0,4 <sup>aA</sup>
	0,33	10,3±1,2 <sup>aA</sup>	8,0±0,0 <sup>bB</sup>	9,4±0,3 <sup>bAB</sup>
	0,67	-	6,5±1,0 <sup>bA</sup>	7,1±0,6 <sup>cA</sup>
	1,33	3,7±0,1 <sup>bB</sup>	3,6±0,0 <sup>cB</sup>	4,7±0,3 <sup>dA</sup>
Propionska kislina (mmol/g SS)	0	5,6±0,4 <sup>aA</sup>	5,6±0,4 <sup>aA</sup>	5,6±0,4 <sup>aA</sup>
	0,33	5,0±0,2 <sup>aB</sup>	5,7±0,1 <sup>aA</sup>	3,3±0,2 <sup>bC</sup>
	0,67	-	4,9±0,1 <sup>bA</sup>	3,0±0,0 <sup>cB</sup>
	1,33	1,2±0,1 <sup>bA</sup>	1,3±0,1 <sup>cA</sup>	1,2±0,1 <sup>dA</sup>
Maslena kislina (mmol/g SS)	0	1,0±0,0 <sup>aA</sup>	1,0±0,0 <sup>aA</sup>	1,0±0,0 <sup>aA</sup>
	0,33	1,0±0,0 <sup>aA</sup>	1,2±0,2 <sup>aA</sup>	0,9±0,0 <sup>bA</sup>
	0,67	-	0,9±0,0 <sup>abA</sup>	0,7±0,0 <sup>cB</sup>
	1,33	0,5±0,0 <sup>bA</sup>	0,6±0,0 <sup>bA</sup>	0,5±0,0 <sup>dA</sup>
Vsota HMK (mmol/g SS)	0	17,1±0,8 <sup>aA</sup>	17,1±0,8 <sup>aA</sup>	17,1±0,8 <sup>aA</sup>
	0,33	16,3±1,4 <sup>aA</sup>	14,8±0,3 <sup>bA</sup>	14,1±0,6 <sup>bA</sup>
	0,67	-	12,3±0,9 <sup>cA</sup>	10,8±0,4 <sup>cA</sup>
	1,33	5,4±0,2 <sup>bB</sup>	5,5±0,1 <sup>dB</sup>	6,4±0,4 <sup>dA</sup>
C2 : C3	0	1,9±0,1 <sup>bA</sup>	1,9±0,1 <sup>bA</sup>	1,9±0,1 <sup>cA</sup>
	0,33	2,0±0,2 <sup>bB</sup>	1,4±0,0 <sup>bC</sup>	2,4±0,1 <sup>bA</sup>
	0,67	-	1,3±0,2 <sup>bB</sup>	2,3±0,2 <sup>bA</sup>
	1,33	3,1±0,1 <sup>aB</sup>	2,8±0,3 <sup>aB</sup>	4,0±0,1 <sup>aA</sup>
Metan (ml/g SS)	0	11,4±0,8 <sup>bA</sup>	11,4±0,8 <sup>aA</sup>	11,4±0,8 <sup>aA</sup>
	0,33	14,2±1,0 <sup>aA</sup>	8,7±0,6 <sup>bB</sup>	8,9±0,7 <sup>bB</sup>
	0,67	-	4,3±0,1 <sup>cA</sup>	3,0±0,8 <sup>cA</sup>
	1,33	0,3±0,0 <sup>cB</sup>	3,0±0,3 <sup>cA</sup>	0,3±0,0 <sup>dB</sup>
Metan (vol %)	0	3,8±0,2 <sup>aA</sup>	3,8±0,2 <sup>aA</sup>	3,8±0,2 <sup>aA</sup>
	0,33	4,2±0,4 <sup>aA</sup>	2,8±0,2 <sup>bB</sup>	3,5±0,3 <sup>aAB</sup>
	0,67	-	1,8±0,0 <sup>dA</sup>	1,9±0,2 <sup>bA</sup>
	1,33	0,6±0,0 <sup>bB</sup>	2,3±0,0 <sup>cA</sup>	0,5±0,0 <sup>cC</sup>
Razmerje metan/vsota HMK	0	0,7±0,1 <sup>aA</sup>	0,7±0,1 <sup>aA</sup>	0,7±0,1 <sup>aA</sup>
	0,33	0,9±0,1 <sup>aA</sup>	0,6±0,0 <sup>aB</sup>	0,6±0,0 <sup>aAB</sup>
	0,67	-	0,4±0,0 <sup>bA</sup>	0,3±0,1 <sup>bA</sup>
	1,33	0,1±0,0 <sup>bB</sup>	0,5±0,0 <sup>aA</sup>	0,1±0,0 <sup>cB</sup>

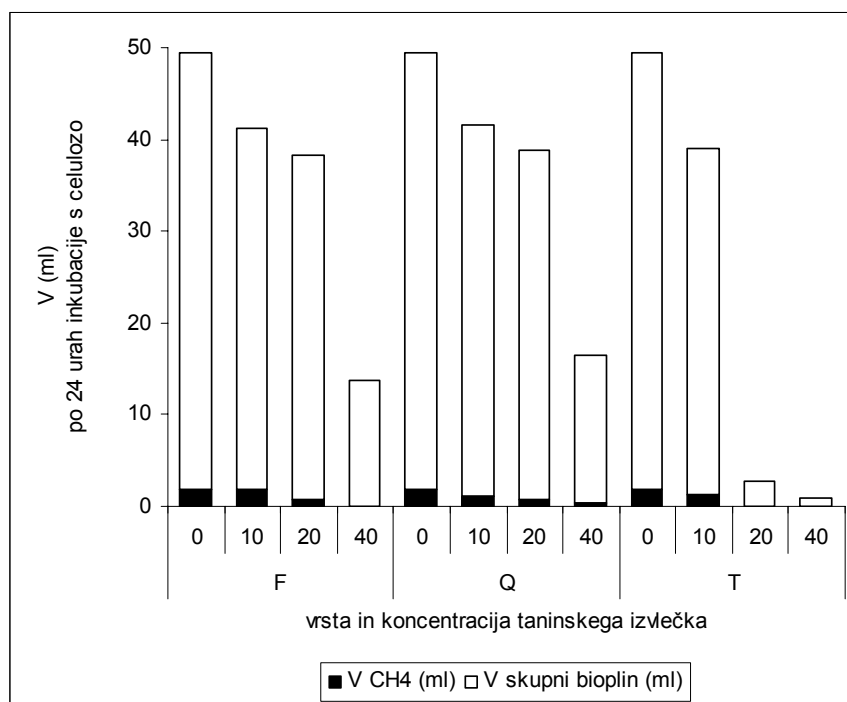
\*a b c = vrednosti v stolpcih znotraj posameznih HMK, prostornine in volumskih deležev metana ter razmerij med C2 in C3, označene z malimi črkami, se statistično značilno razlikujejo ( $p < 0,05$ ), A B C = vrednosti v vrsticah, označene z velikimi črkami, se statistično značilno razlikujejo ( $p < 0,05$ ), C2 : C3 = razmerje med koncentracijami oetne in propionske kisline, Konc. TI = koncentracija taninskega izvlečka, Razmerje metan/vsota HMK = razmerje med prostornino metana in vsoto HMK

PRILOGA B: Vsebnost hlapnih maščobnih kislin (HMK), metana in razmerji med C2 in C3 ter prostornino metana in vsoto HMK v vampnem soku po 24 urah *in vitro* fermentacije škroba ob dodatku različnih taninskih izvlečkov (Kos, 2007, preglednica 14,)

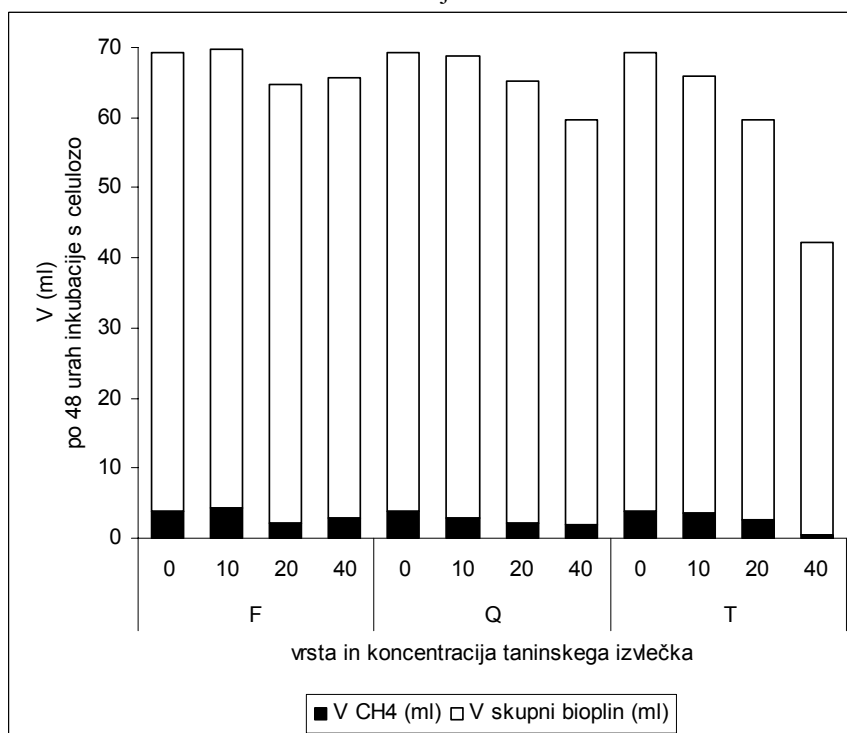
Opazovana lastnost	Konc. TI (mg/ml medija)	F75	QUE	TAK
Ocetna kislina (mmol/g SS)	0	10,3±0,3 <sup>aA</sup>	10,3±0,3 <sup>bA</sup>	10,3±0,3 <sup>abA</sup>
	0,33	11,8±1,7 <sup>aA</sup>	11,9±0,6 <sup>aA</sup>	11,4±0,7 <sup>aA</sup>
	0,67	10,2±0,2 <sup>abA</sup>	11,2±0,2 <sup>abA</sup>	9,8±1,0 <sup>abA</sup>
	1,33	7,8±0,1 <sup>bA</sup>	7,7±0,4 <sup>cA</sup>	8,7±0,3 <sup>bA</sup>
Propionska kislina (mmol/g SS)	0	6,1±0,1 <sup>aA</sup>	6,1±0,1 <sup>aA</sup>	6,1±0,1 <sup>aA</sup>
	0,33	6,5±0,2 <sup>aA</sup>	6,0±0,0 <sup>abA</sup>	6,0±0,4 <sup>aA</sup>
	0,67	6,2±0,3 <sup>aA</sup>	5,6±0,2 <sup>bA</sup>	5,3±0,4 <sup>aA</sup>
	1,33	5,4±0,0 <sup>bA</sup>	4,6±0,3 <sup>cA</sup>	4,5±1,0 <sup>aA</sup>
Maslena kislina (mmol/g SS)	0	1,1±0,0 <sup>aA</sup>	1,1±0,0 <sup>aA</sup>	1,1±0,0 <sup>aA</sup>
	0,33	1,0±0,0 <sup>bA</sup>	1,0±0,0 <sup>bA</sup>	1,0±0,1 <sup>abA</sup>
	0,67	0,8±0,0 <sup>cA</sup>	0,9±0,0 <sup>cA</sup>	0,9±0,1 <sup>bA</sup>
	1,33	0,6±0,0 <sup>dB</sup>	0,8±0,0 <sup>dA</sup>	0,7±0,0 <sup>cB</sup>
Vsota HMK (mmol/g SS)	0	17,5±0,2 <sup>aA</sup>	17,5±0,2 <sup>aA</sup>	17,5±0,2 <sup>aA</sup>
	0,33	19,3±1,9 <sup>aA</sup>	18,9±0,6 <sup>aA</sup>	18,4±1,1 <sup>aA</sup>
	0,67	17,3±0,1 <sup>aA</sup>	17,7±0,3 <sup>bA</sup>	15,9±1,5 <sup>abA</sup>
	1,33	13,8±0,1 <sup>bA</sup>	13,1±0,2 <sup>cA</sup>	14,1±1,3 <sup>bA</sup>
C2 : C3	0	1,7±0,1 <sup>abA</sup>	1,7±0,1 <sup>aA</sup>	1,7±0,1 <sup>aA</sup>
	0,33	1,8±0,2 <sup>aA</sup>	2,0±0,1 <sup>aA</sup>	1,9±0,0 <sup>aA</sup>
	0,67	1,6±0,1 <sup>abB</sup>	2,0±0,0 <sup>aA</sup>	1,9±0,0 <sup>aAB</sup>
	1,33	1,4±0,0 <sup>bA</sup>	1,7±0,2 <sup>aA</sup>	1,9±0,3 <sup>aA</sup>
Metan (ml/g SS)	0	18,9±0,0 <sup>aA</sup>	18,9±0,0 <sup>aA</sup>	18,9±0,0 <sup>aA</sup>
	0,33	18,7±0,6 <sup>aA</sup>	15,2±0,7 <sup>bB</sup>	18,6±0,4 <sup>aA</sup>
	0,67	16,6±0,3 <sup>bB</sup>	18,0±0,3 <sup>aA</sup>	18,4±0,5 <sup>aA</sup>
	1,33	13,5±0,2 <sup>cA</sup>	13,7±0,9 <sup>bA</sup>	10,6±5,4 <sup>bA</sup>
Metan (vol %)	0	4,8±0,1 <sup>aA</sup>	4,8±0,1 <sup>aA</sup>	4,8±0,1 <sup>aA</sup>
	0,33	4,7±0,0 <sup>bA</sup>	4,9±0,3 <sup>aA</sup>	4,8±0,1 <sup>aA</sup>
	0,67	4,5±0,0 <sup>cA</sup>	4,7±0,2 <sup>abA</sup>	4,8±0,1 <sup>aA</sup>
	1,33	4,2±0,0 <sup>dA</sup>	4,1±0,3 <sup>bA</sup>	4,2±0,2 <sup>bA</sup>
Razmerje metan/vsota HMK	0	1,1±0,0 <sup>aA</sup>	1,1±0,0 <sup>aA</sup>	1,1±0,0 <sup>aA</sup>
	0,33	1,0±0,1 <sup>abA</sup>	0,8±0,0 <sup>bB</sup>	1,0±0,0 <sup>aA</sup>
	0,67	1,0±0,0 <sup>bB</sup>	1,0±0,0 <sup>aAB</sup>	1,2±0,1 <sup>aA</sup>
	1,33	1,0±0,0 <sup>abA</sup>	1,1±0,1 <sup>aA</sup>	0,7±0,3 <sup>aA</sup>

\*a b c = vrednosti v stolpcih znotraj posameznih HMK, prostornine in volumskih deležev metana ter razmerij med C2 in C3, označene z malimi črkami, se statistično značilno razlikujejo ( $p < 0,05$ ), A B C = vrednosti v vrsticah, označene z velikimi črkami, se statistično značilno razlikujejo ( $p < 0,05$ ), C2 : C3 = razmerje med koncentracijami očetne in propionske kisline, Konc. TI = koncentracija taninskega izvlečka, Razmerje metan/vsota HMK = razmerje med prostornino metana in vsoto HMK

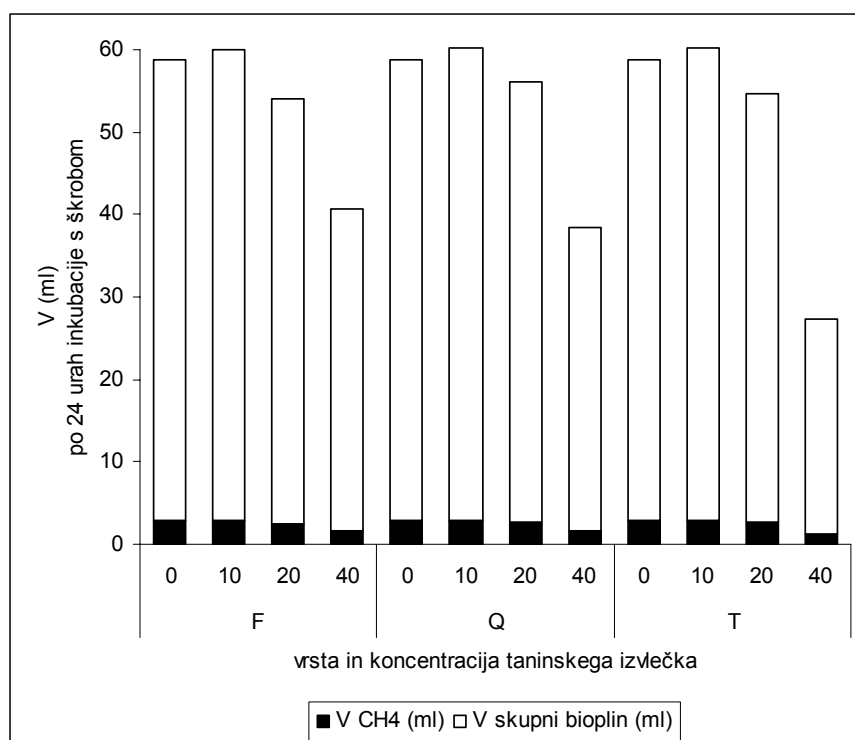
PRILOGA C: Vpliv različnih koncentracij taninov na količino CH<sub>4</sub> in količino bioplina v vampnem soku po 24 in 48 urah inkubacije s celulozo oz. škrobom



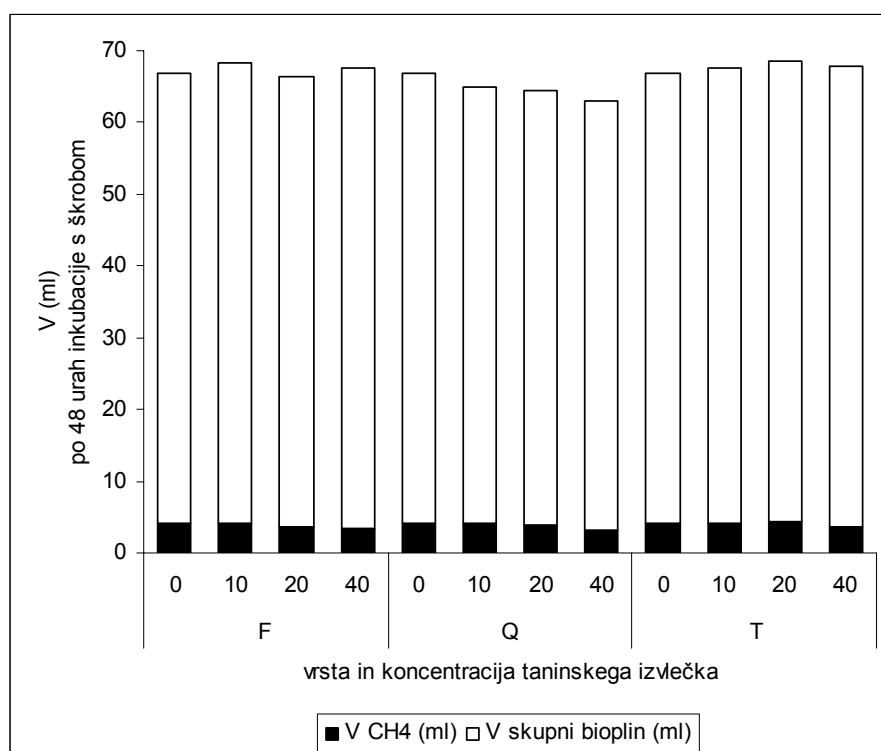
Slika 1: Vpliv različnih koncentracij taninov na količino CH<sub>4</sub> in količino bioplina v vampnem soku po 24 urah inkubacije s celulozo



Slika 2: Vpliv različnih koncentracij taninov na količino CH<sub>4</sub> in količino bioplina v vampnem soku po 48 urah inkubacije s celulozo



Slika 3: Vpliv različnih koncentracij taninov na količino CH<sub>4</sub> in količino bioplina v vampnem soku po 24 urah inkubacije s škrobom



Slika 4: Vpliv različnih koncentracij taninov na količino CH<sub>4</sub> in količino bioplina v vampnem soku po 48 urah inkubacije s škrobom