

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Ada VARGA

**ANALIZA VPLIVA RASTLINSKIH IZVLEČKOV NA  
IZBRANE VAMPNE BAKTERIJE**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Ada VARGA

**ANALIZA VPLIVA RASTLINSKIH IZVLEČKOV NA IZBRANE  
VAMPNE BAKTERIJE**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**THE ANALYSIS OF PLANT EXTRACTS AND THEIR EFFECT ON  
SELECTED RUMEN BACTERIAL STRAINS**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija kmetijstva – zootehniške. Analize so bile opravljene v laboratorijih Katedre za mikrobiologijo in mikrobnobiotehnologijo na Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

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

Recenzent: doc. dr. Dragomir KOMPAN

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Antonija HOLCMAN  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

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

Član: doc. dr. Dragomir KOMPAN  
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.

Ada VARGA

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 579:636.2=163.6
- KG mikrobiologija/bakterije/govedo/vamp/rastlinski izvlečki/monenzin/adaptacija
- KK AGRIS L50/5214
- AV VARGA, Ada
- SA AVGUŠTIN, Gorazd (mentor)
- KZ SI-1230 Domžale, Groblje 3
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
- LI 2009
- IN ANALIZA VPLIVA RASTLINSKIH IZVLEČKOV NA IZBRANE VAMPNE BAKTERIJE
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP X, 58 str., 6 pregl., 20 sl., 61 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI V intenzivni živinoreji so bili zaradi težnje po čim bolj ekonomični prireji antibiotiki dolga leta najpogosteje uporabljeni krmni dodatki. Zaradi strahu pred nesmotrno uporabo antibiotikov in nekontroliranega širjenja odpornosti so njihovo uporabo v prehranske namene v Evropski uniji prepovedali, hkrati pa se je pojavila potreba po alternativnih učinkovinah. Namen diplomskega dela je bil preučiti vpliv izvlečka česna (dialil sulfid), cimeta (cinamaldehyd) in nageljnovih žbic (eugenol) ter ionofornega antibiotika (monenzin) na nekatere bakterijske seve v vampu goveda. Z merjenjem optične gostote smo spremljali rast izbranih bakterijskih sevov v prisotnosti različnih koncentracij preučevanih učinkovin ter preučevali možnost adaptacije dveh sevov (*Prevotella ruminicola* 23 in *Ruminococcus flavefaciens* 007 S/6) na dve izbrani učinkovini (monenzin in cinamaldehyd). Ugotovili smo tri načine delovanja učinkovin, in sicer podaljšanje faze prilagajanja rasti bakterij, zmanjšanje obsega in zmanjšanje hitrosti rasti. Česnov dialil sulfid je v vseh primerih vplival le na podaljšanje faze prilagajanja rasti bakterij, pri preostalih učinkovinah pa so se pojavljali vsi trije načini delovanja. Pri preučevanju adaptacije sevov na učinkovine smo ugotovili, da je adaptirana različica seva *Prevotella ruminicola* 23 sposobna rasti pri osemkrat višji koncentraciji monenzina v gojišču kot divja različica ter da se noben izmed preučevanih sevov ni sposoben prilagoditi na povišano koncentracijo cinamaldehyda v gojišču.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDC 579:636.2=163.6

CX microbiology/bacteria/cattle/rumen/plant extracts/monenzin/adaptation

CC AGRIS L50/5214

AU VARGA, Ada

AA AVGUŠTIN, Gorazd (supervisor)

PP SI-1230 Domžale, Groblje 3

PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of Animal Science

PY 2009

TI THE ANALYSIS OF PLANT EXTRACTS AND THEIR EFFECT ON  
SELECTED RUMEN BACTERIAL STRAINS

DT Graduation thesis (University studies)

NO X, 58 p., 6 tab., 20 fig., 61 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Antibiotics were commonly used as animal feed additives in intense animal production systems. Their use was banned in the European Union in 2006 due to the increased fear of uncontrolled antibiotic use and spreading of resistance. At the same time a need for alternatives emerged. The purpose of this work was to examine the effects of diallyl sulfide, cinnamaldehyd, eugenol and monensin on certain ruminal bacterial strains. The growth of bacterial strains in the presence of various concentrations of active ingredients was monitored by optical density measurements. The ability of *Prevotella ruminicola* 23 and *Ruminococcus flavefaciens* 007 S/6 adaptation to monensin and cinnamaldehyd was also investigated. Three different effects of the studied ingredients were observed: the prolongation of bacterial growth phase, the reduction of total growth and the reduction of growth rates. In all studied strains the diallyl sulfide from garlic affected the prolongation of growth phase only. The other three components induced all three different effects. Examining adaption we found out that the adapted strain *Prevotella ruminicola* 23 is capable to grow in eight fold higher concentration as the wild type. However, the strains were not capable to adapt to higher concentrations of cinamaldehyd.

## KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VII
Okrajšave in simboli	X
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	<b>2</b>
2.1 POSEBNOST PREŽVEKOVALCEV	2
2.2 MIKROORGANIZMI V VAMPU	3
<b>2.2.1 Vampne bakterije</b>	<b>4</b>
<b>2.2.2 Vampne arheje</b>	<b>6</b>
<b>2.2.3 Vampne glive</b>	<b>6</b>
<b>2.2.4 Vampne praživali</b>	<b>7</b>
<b>2.2.5 Virusi v vampu</b>	<b>7</b>
2.3 METABOLNI PROCESI V VAMPU	8
2.4 MODIFIKACIJA METABOLNIH PROCESOV V VAMPU	9
<b>2.4.1 Posegi na nivoju krme</b>	<b>9</b>
<b>2.4.2 Posegi na nivoju fiziologije živali</b>	<b>10</b>
<b>2.4.3 Posegi na nivoju mikroorganizmov</b>	<b>10</b>
2.4.3.1 Ionoformi antibiotiki	10
2.4.3.1.1 Monenzin	11
2.4.3.2 Rastlinski izvlečki	12
2.4.3.2.1 Izvleček česna	13
2.4.3.2.2 Izvleček cimeta	15
2.4.3.2.3 Izvleček klinčevca	17
<b>3 MATERIAL IN METODE</b>	<b>19</b>
3.1 MATERIAL	19

<b>3.1.1</b>	<b>Bakterijski sevi</b>	<b>19</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Gojišče M2</b>	<b>20</b>
<b>3.1.3</b>	<b>Monenzin in rastlinski izvlečki</b>	<b>22</b>
<b>3.2</b>	<b>METODE</b>	<b>22</b>
<b>3.2.1</b>	<b>Gojenje čistih bakterijskih kultur</b>	<b>22</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Preverjanje čistosti kultur z metodo barvanja po Gramu</b>	<b>22</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Merjenje optične gostote</b>	<b>23</b>
<b>3.2.4</b>	<b>Shema poskusa</b>	<b>23</b>
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b>	<b>27</b>
<b>4.1</b>	<b>VPLIV PREUČEVANIH UČINKOVIN NA RAST IZBRANIH BAKTERIJSKIH SEVOV</b>	<b>27</b>
<b>4.1.1</b>	<b>Ugotavljanje vpliva preučevanih učinkovin v širšem območju koncentracij na rast izbranih bakterijskih sevov</b>	<b>27</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Ugotavljanje vpliva preučevanih učinkovin v ožjem območju koncentracij na rast izbranih bakterijskih sevov</b>	<b>29</b>
<b>4.1.3</b>	<b>Adaptacija izbranih sevov na preučevane učinkovine</b>	<b>35</b>
4.1.3.1	Poskus adaptacije seva <i>Ruminococcus flavefaciens</i> 007 S/6	35
4.1.3.1.1	Poskus adaptacije na monenzin	35
4.1.3.1.2	Poskus adaptacije na cinamaldehyd	37
4.1.3.2	Adaptacija seva <i>Prevotella ruminicola</i> 23	38
4.1.3.2.1	Poskus adaptacije na monenzin	38
4.1.3.2.2	Poskus adaptacije na cinamaldehyd	42
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	<b>44</b>
<b>5.1</b>	<b>RAZPRAVA</b>	<b>44</b>
<b>5.1.1</b>	<b>Vpliv inhibitorjev rasti v širšem in ožjem koncentracijskem rangu na izbrane bakterijske seve</b>	<b>45</b>
<b>5.1.2</b>	<b>Adaptacija vampnih bakterij na preučevane učinkovine</b>	<b>457</b>
<b>5.2</b>	<b>SKLEPI</b>	<b>50</b>
<b>6</b>	<b>POVZETEK</b>	<b>52</b>
<b>7</b>	<b>VIRI</b>	<b>54</b>
	<b>ZAHVALA</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Osnovne značilnosti sevov, ki smo jih uporabili v poskusu	20
Preglednica 2: Sestavine modificiranega gojišča M2 za vampne anaerobe	21
Preglednica 3: Koncentracije preučevanih učinkovin v drugem delu poskusa	25
Preglednica 4: Vpliv preučevanih učinkovin rasti v širšem koncentracijskem območju na rast izbranih bakterijskih sevov	28
Preglednica 5: Vpliv inhibitorjev rasti v ožjem koncentracijskem območju na rast izbranih bakterijskih sevov	30
Preglednica 6: Koncentracije MIC in IC <sub>50</sub> za vse preučevane seve in krmne dodatke	35



## KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Štiridelni želodec prežvekovalcev (Prirejeno po: Digestive Anatomy in Ruminants, 2003 )	2
Slika 2: Celična stena Gram-pozitivne in Gram-negativne bakterijske celice (prirejeno po: The Gram Stain, 2007)	4
Slika 3 : Kemijska formula monenzina (prirejeno po Wikimedia Commons, 2007b.)	11
Slika 4: Stroki česna	14
Slika 5 : Cimetove paličice in mleti cimet	16
Slika 6 : Cinamaldehyd (C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O)	16
Slika 7: Nageljnovе žbice ali klinčki	17
Slika 8: Eugenol (C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub> ) (Prirejeno po Wikimedia Commons, 2007a.)	18
Slika 9: Rast <i>P. bryantii</i> B <sub>14</sub> v prisotnosti različnih koncentracij monenzi	31
Slika 10: Rast <i>B. fibrisolvens</i> 3071 <sup>T</sup> pri različnih koncentracijah monenzina	31
Slika 11: Rast seva <i>P. bryantii</i> B <sub>14</sub> v prisotnosti različnih koncentracij dialil sulfida	33
Slika 12: Rast seva <i>B. fibrisolvens</i> 3071 <sup>T</sup> v prisotnosti različnih koncentracij cinamaldehyda	33
Slika 13: Rast seva <i>P. ruminicola</i> 23 v prisotnosti različnih koncentracij cinamaldehyda	34
Slika 14: Grafični prikaz poskusa adaptacije na monenzin seva <i>R. flavefaciens</i> 007 S/6	36
Slika 15: Grafični prikaz poskusa adaptacije na cinamaldehyd seva <i>R. flavefaciens</i> 007 S/6	37
Slika 16: Grafični prikaz poskusa adaptacije na monenzin seva <i>P. Ruminicola</i> 23 (prvih 7 pasaž)	39
Slika 17: Grafični prikaz poskusa adaptacije na monenzin seva <i>P. ruminicola</i> 23 (vzgajanje treh različic adaptiranega seva)	40
Slika 18: Rast sevov MM5, MM6, MM7 pri treh različnih koncentracijah monenzina	41
Slika 19: Rast divjega (CTR) in adaptiranega seva v gojiščih z monenzinom in brez njega	41

Slika 20: Grafični prikaz poskusa adaptacije seva *P. ruminicola* 23 na povišano koncentracijo cinamaldehida

43

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

IC <sub>50</sub>	koncentracija snovi, ki zmanjša mikrobno rast na polovico (angl. <i>half inhibitory concentration</i> ).
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija
MON	monenzin
Das	dialil sulfid (aktivna substanca česnovega izvlečka)
CIN	cinamaldehyd (izvleček cimeta)
EVG	eugenol (izvleček nagelnovih žbic)
mg/l	miligram na liter
ml	mililiter ( $10^{-3}$ litra)
mM	milimol
nm	nanometer ( $10^{-9}$ metra)
OD	optična gostota; angl. optical density
SV/ kg SS	surova vlaknina na kg suhe snovi
ut.%	utežni odstotek [w/v]
vol.%	volumski delež [v/v]
μl	mikroliter ( $10^{-6}$ litra)
μm	mikrometer ( $10^{-6}$ metra)

## 1 UVOD

Z naraščanjem prebivalstva v svetu se vsakodnevno pojavlja tudi potreba po večji pridelavi hrane. Ključni dejavnik bolj ali manj povsod po svetu še vedno predstavlja cena hrane na trgu, ki naj bi bila čim nižja. Zaradi želje po večji pridelavi za manj vložka ter posledično nižji ceni končnega produkta se v reji živali uvajajo novi postopki, s katerimi bi omogočili bolj ekonomično prirejo. Eden od najbolj znanih postopkov za povečevanje prireje, predvsem mesa in mleka v govedoreji, je uvajanje različnih krmnih dodatkov v prehrano, s čimer neposredno posežemo v ključni segment prebave pri prežvekovalcih, v mikrobnobno prebavo v vampu. S spodbujanjem zaželenih in zaviranjem nezaželenih (energijsko potratnih) ali celo škodljivih procesov v mikrobnobni prebavi pa vplivamo na končno prirejo. Najbolj razširjena je bila do nedavnega tudi pri nas uporaba ionofornih antibiotikov (predvsem monenzina), z uporabo katerega so rejci ob manjšem zauživanju krme pri živalih beležili večjo ali vsaj enako prirejo. Ker pa je dandanes poleg ekonomskega vidika vse bolj pomembno, da je hrana, ki jo uživamo, kakovostna, zdrava in pridelana na okolju čim prijaznejši način, je uporaba antibiotikov v prehrani živali postala sporna. Zaradi številnih dejavnikov tveganja so v Evropski uniji januarja 2006 uporabo le teh prepovedali in tako se je pojavila potreba po alternativnih učinkovinah z učinki, podobnimi antibiotikom. Številne možnosti, ki jih človeštvo že stoletja s pridom izkorišča, so znanstveniki videli v rastlinah in njihovih izvlečkih.

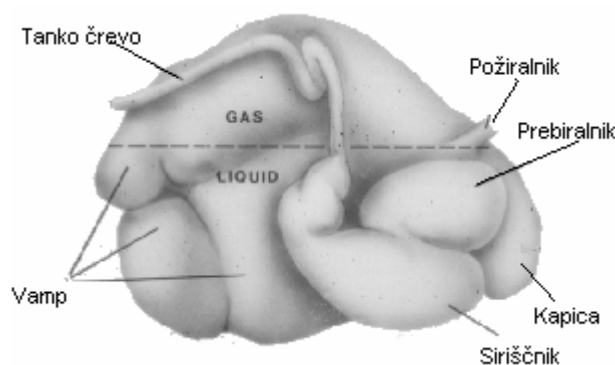
Namen diplomske naloge je bil preučiti vpliv ionofornega antibiotika monenzina in treh rastlinskih izvlečkov (česnovoga dialil sulfida, cinamaldehida in eugenola) na rast šestih izbranih bakterijskih sevov (*Prevotella ruminicola* 23<sup>T</sup>, *Prevotella bryantii* B<sub>14</sub>, *Butyrivibrio fibrisolvens* 3071<sup>T</sup>, *Ruminococcus albus* 20455, *Ruminococcus flavefaciens* 007 S/6 in *Fibrobacter succinogenes* S85) ter preveriti možnost adaptacije dveh izmed njih (*Prevotella ruminicola* 23<sup>T</sup>, *Ruminococcus flavefaciens* 007 S/6) na povišano koncentracijo monenzina in cinamaldehida.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 POSEBNOST PREŽVEKOVALCEV

Prežvekovalci so rastlinojedi sesalci, ki so razvili posebno učinkovit način prebave voluminozne krme oziroma surove vlaknine. Osnovni vir krme tako prostoživečih (srnjadi) kot tudi domačih prežvekovalcev (govedo in drobnica) je paša. Za krmljenje porabijo kar dve tretjini dneva, od česar je le tretjina namenjena dejanskemu zauživanju, preostali del pa prežvekovanju (Žgajnar, 1990), ki navadno poteka stran od pašne površine, v zavetju pred plenilci in neugodnimi vremenskimi razmerami (Štuhec, 1997).

Tak način prehranjevanja prežvekovalcem omogoča posebno prilagojen prebavni trakt, katerega najpomembnejši del predstavlja štiridelni želodec. Sestavljajo ga trije predželodci, vamp (rumen), kapica (reticulum) in prebiralnik (omasum), ter pravi, žlezni želodec ali siriščnik (abomasum) (slika 1). Skupaj zavzemajo kar tri četrtine trebušne votline. V predželodcih potekajo mehčanje in mešanje grobe rastlinske krme (Cestnik in sod., 2004) ter razgradnja nekaterih pomembnih hranljivih snovi, predvsem celuloze, s pomočjo mikroorganizmov in njihovih encimov (Orešnik in Kermauner, 2002).



Slika 1: Štiridelni želodec prežvekovalcev (prirejeno po: Digestive Anatomy in Ruminants, 2003)

Prežvekovalci krmo zaužijejo razmeroma hitro, slabo prežvečijo in požrejo. Krma nato potuje v vamp, kjer se s pomočjo krčenj stene vampa in kapice (ruminacija) pomeša z drugo vsebino. Drobni delci krme potujejo dalje proti siriščniku, grobi, večji deli pa sprožijo proces vračanja zalogaja v ustno votlino (regurgitacija) na ponovno prežvekovanje. Pri tem se sproščajo velike količine sline, pri govedu tudi do 150 litrov na

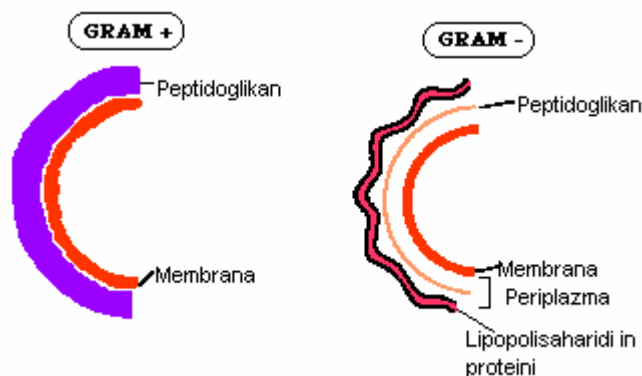
dan (MacDonald, 1995). Slina vsebuje za mikroorganizme pomembne hranilne snovi (sečnino – dušik, rudninske snovi) in obenem deluje kot bikarbonatno-fosfatni pufer, saj preprečuje, da bi pH v vampu padel pod 5,5. Pri ponovnem žvečenju se poveča tudi površina delcev, na katere delujejo mikrobi (Orešnik in Kermauner, 2002). Največji in s stališča mikrobne razgradnje krme najpomembnejši del prebavnega trakta pri prežvekovalcih je vamp. V osnovi je razdeljen na dorzalne in ventralne vampove vreče, katerih notranjost poraščajo jezičaste in ostrostožčaste papile, ki močno povečajo njegovo absorpcijsko površino (Žgajnar, 1990). Plini, ki so stranski produkt prebave, se zadržujejo v dorzalni vampovi vreči in jih žival z izrigavanjem izloči iz telesa (Cestnik in sod., 2004). Kapica je med prepono in spodnjo vampovo vrečo. Znotraj jo pokriva kutana sluznica v obliki satja, katere naloga je ločevanje grobih in drobnih delcev. Slednji zapustijo kapico in gredo dalje v prebiralnik, kjer se vsebina med listi prebiralnika ožame in odpotuje po prebiralnikovem žlebu v siriščnik. Od tu dalje poteka prebava hranljivih snovi s pomočjo prebavnih sokov enako kot pri monogastričnih živalih.

## 2.2 MIKROORGANIZMI V VAMPU

Osnovni obrok prežvekovalcev je, kot že omenjeno, voluminozna krma, sestavljena iz strukturnih ogljikovih hidratov. Sesalci le teh z lastnimi encimi niso sposobni razgraditi, zato jim pri tem pomagajo številni vampni mikroorganizmi. Sorazmerno dolgo zadrževanje krme (9–12 ur), konstantna visoka temperatura (okoli 37 stopinj Celzija), pH (med 5,7 in 7,3) in odsotnost kisika zagotavljajo ugodne pogoje za rast različnih anaerobnih vrst bakterij, arhej, praživali in gliv v vampu prežvekovalcev (MacDonald, 1995). Krma se z njihovo pomočjo razgradi do hlapnih maščobnih kislin (predvsem očetne, propionske in maslene), ki prehajajo skozi steno vampa in jih prežvekovalci uporabljajo v svoji presnovi. Za organizem gostitelja je pomembna tudi sinteza mikrobnih beljakovin ter vitaminov, predvsem vitamina K in vitaminov B-skupine. Stranska produkta mikrobne razgradnje sta metan in ogljikov dioksid, ki ju žival izruga.

### 2.2.1 Vampne bakterije

Bakterije so najštevilnejši predstavniki vampne mikrobne združbe. V mililitru vampnega soka jih je več kot 10 milijard in pripadajo več kot 200 različnim vrstam (Hespel in sod., 1997). Število bakterij v vampu močno niha glede na vrsto zaužite krme in frekvenco krmljenja, zato so nagle spremembe obroka za prežvekovalce lahko usodne. Glede na substrat, ki ga razgrajujejo, jih delimo na celololitične (celuloza), ksilanolitične (ksilani), amilolitične (škrob), pektinolitične (pektini), proteolitične (beljakovine) in lipolitične (maščobe), po tipu celične stene pa na po Gramu negativne (G-) in po Gramu pozitivne (G+) bakterijske vrste. Celična stena G- bakterij je večplastna struktura, sestavljena iz celične membrane, tanke plasti peptidoglikana (daje trdnost celici) in zunanjega lipopolisaharidnega sloja ter proteinov, ki otežuje prehod različnih potencialno škodljivih snovi v celico. Steno G+ bakterij sestavlja debelejša peptidoglikanska oziroma mureinska plast, običajno sestavljena iz enega tipa molekul (slika 2) (Madigan in sod., 2003).



Slika 2: Celična stena Gram-pozitivne in Gram-negativne bakterijske celice (prirejeno po: The Gram Stain, 2007).

Številčno najbolj zastopane v vampu so bakterije iz rodu *Prevotella*. So striktno anaerobni, Gram-negativni kokobacili, katerih glavna naloga je razgradnja različnih polisaharidov, škroba, ksilanov, dekstrinov in pektinov (Hespel in sod., 1997), celuloze pa zaradi odsotnosti celulaznih encimov niso sposobne razgrajevati. Pomembno vlogo igrajo pri razgradnji proteinov in fermentaciji peptidov. *Prevotella ruminicola* ima edina med vampnimi bakterijami tako imenovano dipeptidil-peptidazo aktivnost (DAP1), ki je zelo pomembna pri razgradnji proteinov v vampu (Wallace in sod., 1997). Prvotno so bili vsi sevi iz današnjega rodu *Prevotella* uvrščeni v eno vrsto, *Bacteroides ruminicola*. Nato so

to vrsto najprej prenesli v rod *Prevotella* (Shah in Collins, 1990). Ko so z nadaljnjimi raziskavami ugotovili številne genotipske in fenotipske razlike med sevi te vrste, so jo razdelili v štiri vrste, in sicer *Prevotella ruminicola*, *Prevotella brevis*, *Prevotella albensis* in *Prevotella bryantii* (Avguštin in sod., 1994, cit. po Hobson, 1997). Glavni fermentacijski produkti prevotel v vampu so jantarna, maslena in očetna kislina.

Med najbolj aktivne bakterijske vrste sodijo s stališča razgradnje surove vlaknine v vampu vrste iz rodu *Ruminococcus* (Dehority, 1986, cit. po Hobson, 1997). Tako *Ruminococcus flavefaciens* kot tudi *Ruminococcus albus* sta striktno anaerobni celulolitični bakterijski vrsti s kokoidno obliko celic in z Gram-pozitivno strukturo celične stene. Slednja se pogosto pojavlja v obliki diplokokov, *R. flavefaciens* pa tvori krajše verižice. Najdemo ju v prebavnem traktu domačih (govedo, drobnica) in prostoživečih prežvekovalcev (vodni bivol, severni jelen) ter monogastričnih živali, nekatere netipične oblike ruminokokov pa tudi pri glodalcih (Dehority, 1977). *R. flavefaciens* v vampu razgrajuje celulozo, vključno s težje razgradljivimi oblikami (Stewart in sod., 1990), ter celobiozo in ksilane. Redkeje razgrajujejo preostale sladkorje. Pri razgradnji celuloze tvorijo celice značilen rumen pigment. Glavna produkta fermentacije sta očetna in jantarna kislina. Številčno bolj zastopana vrsta je *Ruminococcus albus*, ki tako kot *Ruminococcus flavefaciens* razgrajuje komponente rastlinske celične stene, predvsem celulozo in celobiozo. Nastali produkti razgradnje so metanojska in očetna kislina, etanol, ogljikov dioksid in vodik. Nekateri sevi vrste *R. albus* celulazne aktivnosti nimajo (Morris in Cole, 1987). Ruminokoki imajo sicer dokaj preproste prehranske zahteve (Bryant in Robinson, 1963, cit. po Hobson, 1997), so pa izredno občutljivi na prisotnost ionofornega antibiotika monenzina (Bryant, 1986, cit. po Hobson, 1997) ter padec pH-vrednosti. V primeru padca le te pod 6,1 *R. flavefaciens* popolnoma preneha rasti (Russel in Dombrowski, 1980). Poleg ruminokokov imajo pomembno vlogo pri razgradnji celuloze tudi bakterije iz vrste *Fibrobacter succinogenes*. So Gram-negativne paličaste celice, ki se pritrdijo na celulozna vlakna in s pomočjo periplazemske celulaze razgrajujejo celulozo na glukozne enote (Madigan in sod., 2003). Sposobne so razgraditi tudi težje razgradljiva kristalinično zgrajena celulozna vlakna (Halliwell in Bryant, 1963, cit. po Hobson, 1997). Vsi sevi razgrajujejo celulozo, celobiozo, glukozo in laktozo, nekateri pa tudi trehalozo, maltozo in škrob. V procesu fermentacije



nastanejo hlapne maščobne kisline (Madigan in sod, 2003). *F. succinogenes* je tudi dokaj odporen na antibiotike v prehrani (monenzin) (Stewart in Duncan, 1985).

Bakterije iz rodu *Butirivibrio* pogosto najdemo v prebavnem traktu živali. Bakterije vrste *Butirivibrio fibrisolvens* uvrščamo glede na strukturo celične stene med Gram-pozitivne bakterije (Hespel in sod., 1993, cit. po Hobson, 1997), vendar se po Gramu barvajo negativno. So majhne, rahlo ukrivljene paličaste celice. Pojavljajo se posamezno ali v verigah. *B. fibrisolvens* fermentira različne vrste sladkorjev, predvsem hemiceluloze in ksilane, ter je ena izmed pomembnejših bakterij s stališča razgradnje strukturnih polisaharidov pa tudi škroba in pektinov. Večina sevov lahko razgrajuje več kot 20 različnih enostavnih sladkorjev, disaharidov in oligosaharidov, iz katerih tvorijo glavni produkt, masleno kislino (butirat), ter druge produkte, kot sta očetna in mlečna kislina. Z ekstracelularnimi proteazami bakterije iz vrste *B. fibrisolvens* aktivno sodelujejo v procesih proteolize (Cotta in Hespell, 1986), nekateri sevi pa tudi hidrogenirajo nekatere nenasičene maščobne kisline, na primer linolensko (Kepler in sod., 1966).

### **2.2.2 Vampne arheje**

Metan v vampu tvorijo metanogene arheje v popolni odsotnosti kisika. Poznamo več rodov vampnih arhej (*Methanobacterium*, *Methanobrevibacter*, *Methanosarcina*, *Methanomicrobium*), ki se razlikujejo po genotipu, fenotipskih značilnostih, na primer sestavi celične stene, in po substratu, ki ga uporabljajo za tvorbo metana (Stewart in sod., 1997). Številčno najbolj zastopana sta rodova *Methanobrevibacter* in *Methanobacterium*. Največ metana v vampu sintetizirajo arheje iz vodika in ogljikovega dioksida. Tvorba metana lahko poteka tudi iz drugih razpoložljivih substratov, kot so mravljična in očetna kislina, metilamin ter metanol. Ti nastanejo pri bakterijski razgradnji hranljivih snovi v vampu.

### **2.2.3 Vampne glive**

Glive igrajo v vampu pomembno vlogo pri razgradnji surove vlaknine in lignificiranih delov rastlinskih celičnih sten (Madigan in sod., 2003). So obligatni anaerobi s hitinsko

celično steno in verjetno edini organizmi, ki so zmožni razgraditi površinsko zaščitno plast (kutikulo) listov in stebel pri rastlinah ter tako prodreti do notranjih rastlinskih tkiv (Akin in sod., 1989). Z izredno učinkovitimi celulazami so sposobne razgraditi tudi težko razgradljivo kristalinično celulozo, hemicelulozo in ksilane (Mountfort in Asher, 1989). Poleg razgradnje hranljivih snovi sodelujejo še v procesih sinteze nekaterih vitaminov ter aminokislin. Količina gliv v vampu se močno spreminja v odvisnosti od sestave krme. V prebavnem traktu živali, krmljenih z vlakninsko bogato krmo, je vampnih gliv več.

#### **2.2.4 Vampne praživali**

V vampu živi približno milijon praživali na mililiter vampove vsebine. V večini so to migetalkarji, ki so striktno anaerobni organizmi, kar je za evkarionte dokaj redko (Madigan in sod., 2003). Zaradi svoje velikosti so bili eni prvih opisanih vampnih mikroorganizmov. Najdemo jih v prebavnem traktu vseh domačih prežvekovalcev. So plenilci vampnih bakterij, poleg tega pa imajo pomembno vlogo pri presnovi beljakovin (Arakaki in sod., 2000). Čeprav za presnovo v vampu niso odločilnega pomena, sodelujejo pri fermentaciji škroba in celuloze ter produkciji hlapnih maščobnih kislin, podobno kot bakterije (Madigan in sod., 2003). Po prebavi v siriščniku in tankem črevesju so pomemben vir kakovostnih beljakovin, ki jih gostitelj zaradi njihove dobre prebavljivosti lahko izkoristi (Arakaki in sod., 2000).

#### **2.2.5 Virusi v vampu**

Poleg bakterij, gliv in praživali vamp naseljuje tudi veliko število virusov (bakteriofagov). Ti naseljujejo bakterijske celice, jih lizirajo in na tak način sprostijo proteine, ki postanejo dostopni gostitelju. V mililitru vampove vsebine naj bi bilo prisotnih okoli  $10^9$  bakteriofagov, ki morfološko ustrezajo 26–40 različnim tipom ter trem različnim družinam (Myoviridae, Siphoviridae, Podoviridae) (Rachie in sod., 1970, cit. po Klieve in sod., 2004; Klieve in Bauchop, 1988, cit. po Klieve in sod., 2004). V splošnem je vloga vampnih bakteriofagov še razmeroma slabo raziskana.

### 2.3 METABOLNI PROCESI V VAMPU

Krma, pomešana s slino, vstopi v vamp, kjer se s pomočjo krčenja vampne stene pomeša z vampnim sokom, nato se lahko začne mikrobna razgradnja. Vampni mikroorganizmi razgradijo ogljikove hidrate do enostavnih sladkorjev (glukoze) in jih porabijo za svojo presnovo. Pri tem tvorijo hlapne maščobne kisline, predvsem očetno, propionsko in masleno, ter ogljikov dioksid in metan. Hlapne maščobne kisline se absorbirajo skozi vampno sluznico v kri, kjer so organizmu prežvekovalca na razpolago za nadaljnje presnovne procese. Poleg enostavnih sladkorjev in škroba se v predželodcih razgradijo tudi celuloza, hemiceluloze, pektini in fruktozani. Razmerja med nastalimi hlapnimi maščobnimi kislinami se razlikujejo glede na sestavo obroka. Če žival zauživa večje količine surove vlaknine, nastaja večja količina očetne, če je obrok bogat s škrobom, pa propionske kisline. V vampu pride praviloma tudi do razgradnje maščobe, vendar mora biti le ta v obroku malo, sicer lahko močno pade aktivnost vampnih mikroorganizmov, poslabša se izkoriščanje celuloze, zmanjša se tudi zauživanje krme. Nižje maščobne kisline se absorbirajo skozi steno vampa, višje pa šele v tankem črevesu (Orešnik in Kermauner, 2000). Beljakovine v glavnem razgradijo proteolitični encimi mikrobov do aminokislin. Te se deloma absorbirajo, deloma pa iz njih nastanejo amonijak ter organske kisline, iz katerih se nato »*de novo*«*»* tvorijo aminokisliline. Lahko se razgradijo tudi do hlapnih maščobnih kislin. Del beljakovin preide predželodce in se razgradi šele v nižjih delih prebavnega trakta, v siriščniku in tankem črevesju (Žgajnar, 1990). Amonijak je za mikrobno proteinsko sintezo in razgradnjo ključnega pomena. Pri krmah, ki so revne z beljakovinami ali so le te slabo razgradljive, in majhni vsebnosti amonijaka v vampu je rast mikrobov zmanjšana, zatorej je zmanjšana tudi razgradnja ogljikovih hidratov, predvsem celuloze (Orešnik in Kermauner, 2002).

Vamp zagotavlja konstantno okolje za organizme, ki živijo v njem. Prežvekovalci na različnih koncih sveta imajo zelo podobno mikrobno sestavo vampove vsebine, ki variira predvsem glede na sestavo zaužite krme. Razmerja med hlapnimi maščobnimi kislinami in proizvedenim ogljikovim dioksidom in metanom so enaka pri različnih vrstah prežvekovalcev. Nagla sprememba sestave bakterijske populacije v vampu lahko povzroči

bolezen ali celo smrt živali, zato morajo biti spremembe obroka postopne (Madigan in sod., 2003).

## 2.4 MODIFIKACIJA METABOLNIH PROCESOV V VAMPU

V idealnih razmerah bi žival izkoristila vse oziroma skoraj vse zaužite hranljive snovi, česar pa ni mogoče doseči. Krma, ki jo zaužije prežvekovalac, je izpostavljena tako mikrobni kot žlezni prebavi, zato moramo za optimalno prirejo najti ustrezno ravnotežje med njima. Mikrobna fermentacija je ključnega pomena pri razgradnji tistih hranljivih snovi, ki jih organizem z lastnimi encimi ni sposoben razgraditi, vendar predstavljajo večinski del obroka prežvekovalcev (strukturni ogljikovi hidrati). S pospeševanjem ugodnih ter zaviranjem neugodnih, neučinkovitih ali celo gostitelju škodljivih procesov lahko vplivamo na povečanje izkoriščanja zaužite krme in s tem na večjo prirejo. Običajno želimo povečati razgradnjo surove vlaknine ter tvorbo mikrobnih beljakovin iz neproteinskega dušika, fermentacijo beljakovin, absorpcijo amonijaka ter tvorbo metana, ki vodijo v izgube energije, pa skušamo omejiti. Zaradi delovanja vampa kot celotnega integriranega sistema se takšna manipulacija poleg pozitivnih lahko odrazi tudi z negativnimi posledicami (Nagaraja in sod., 1997).

Na vampno fermentacijo lahko vplivamo na treh ravneh:

- s krmo (obrokom),
- s fiziologijo živali,
- z mikroorganizmi.

### 2.4.1 Posegi na nivoju krme

Poseg na ravni krmnega obroka je bil eden prvih načinov povečevanja prireje. Osnovna cilja sta povečanje razgradljivosti strukturnih polisaharidov in zaščita beljakovin pred mikrobno razgradnjo v vampu. To dosežemo z različnimi kemijskimi, biološkimi in fizikalnimi postopki, s katerimi obdelamo manj kakovostno, celulozno in lignificirano krmo, ki tako postane za vampne mikrobe lažje razgradljiva. Za zaščito beljakovin najpogosteje uporabljamo toplotno in kemijsko obdelavo (Schwab, 1995). Na delovanje

vampnih simbiotov lahko vplivamo tudi s frekvenco krmljenja. Povečanje le te se odrazi v manjšem nihanju pH-vrednosti vampa ter zato večji celulolitični aktivnosti mikrobov.

#### **2.4.2 Posegi na nivoju fiziologije živali**

Žival običajno zaužije manj krme, kot je njena dejanska metabolna in fiziološka zmožnost. Povečanje zauživanja ob enaki presnovni učinkovitosti bi lahko vodilo v povečanje prireje. S povečanjem apetita lahko izzovemo večje slinjenje pri živali in tako posredno vplivamo na aktivnost mikroorganizmov v vampu (Nagaraja in sod., 1997).

#### **2.4.3 Posegi na nivoju mikroorganizmov**

Z vampnimi modifikatorji lahko neposredno posežemo v mikrobovo združbo vampa. Večina teh snovi deluje nespecifično in na različna mesta v mikrobnih fermentacijah. Za modifikacijo mikrobne populacije v vampu lahko uporabljamo različne pufre (soda bikarbona, kalcijev karbonat), rastne faktorje (vitamine, maščobne kisline), maščobe, mikrobne krmne dodatke in encime, inhibitorje metana (kloral hidrat, amikloral), inhibitorje proteolize, peptidolize in deaminacije ter antibiotike (Nagaraja in sod., 1997). Uporaba slednjih je bila še pred nedavnim zelo razširjena po vsem svetu.

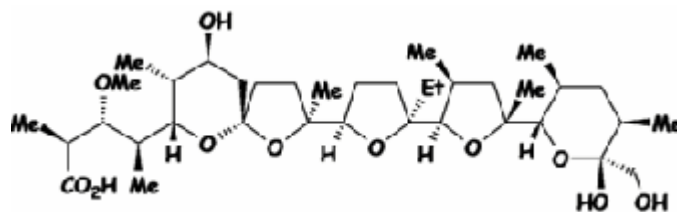
##### **2.4.3.1 Ionoforni antibiotiki**

Z dodajanjem ionofornih antibiotikov prehrani prežvekovalcev je bilo ugotovljeno manjše zauživanje krme, prirast živali pa je ostal enak oziroma se je povečal (Russel in Strobel, 1989). Zaradi inhibicije specifičnih delcev mikrobne populacije namreč pride do sprememb v procesih fermentacije, poveča se tvorba propionata ter zavrejo procesi metanogeneze, kar se odraža v učinkovitejšem energijskem metabolizmu vampa oziroma gostiteljskega organizma (Callaway in sod., 2003). Ionofori vplivajo tudi na zmanjšanje proteinske razgradnje in deaminacije aminokislin ter posledično na izboljšanje dušičnega metabolizma (Van Nevel in Demeyer, 1977). Z zaviranjem produkcije mlečne kisline tudi znižujejo možnost pojavnosti različnih bolezni predželodcev (zakisanje, napihovanje).

Ionoformni antibiotiki učinkovito delujejo predvsem na Gram-pozitivna rodova (*Butirivibrio* in *Ruminococcus*) in manj na Gram-negativne vrste bakterij, kar je posledica različne strukture celične stene. Pri slednjih lipopolisaharidni sloj celične stene preprečuje dostop ionoforom do membrane in notranjosti celice. Kljub temu obstajajo tudi Gram-negativne bakterijske vrste, ki so občutljive na višje koncentracije ionoformnih antibiotikov. Delovanje ionoforov je bakteristatično (Nagaraja in Taylor, 1987). Njihovo učinkovitost izražamo z najnižjo koncentracijo antibiotika, ki še zavre rast občutljivih bakterij, imenovano minimalna inhibitorna koncentracija (MIC, angl. minimum inhibitory concentration). S povečano rabo antibiotikov so se kmalu pojavili na antibiotike odporni sevi bakterij. Bakterije so razvile različne načine obrambe, najpogosteje pa gre za enega od treh mehanizmov: (i) sintezo encimov, ki so sposobni razgraditi antibiotik, (ii) spremembo celične komponente, na katero deluje antibiotik, ali (iii) spremembo prepustnosti celice za antibiotik.

#### 2.4.3.1.1 Monenzin

Monenzin (slika 3) je bil do prepovedi uporabe, to je januarja 2006, v Evropi najbolj uporabljan ionoformni antibiotik. Že v 70. letih prejšnjega stoletja ga je kot prehranski dodatek h krmi prežvekovalcev v ZDA odobrila Food and Drug Administration (Russel in Strobel, 1989). Sintetizirajo ga bakterije iz vrste *Streptomyces cinnamonensis* in spada med karboksilne polieterske ionoforme antibiotike (Pressman, 1976; Westley, 1983).



Slika 3 : Kemijska formula monenzina (prirejeno po: Wikimedia Commons, 2007b.).

Sprva so ga nameravali uporabljati le kot kokcidiostatik v perutninarstvu, vendar se je zaradi učinkovanja na različnih mestih vampne mikrobnе fermentacije in posledično ugodnih učinkov na produkcijo kmalu uveljavil tudi v reji prežvekovalcev (Russel in Strobel, 1989). Monenzin vpliva na metabolizem ogljikovih hidratov in dušika v vampu ter

spreminja vampno mikrobno združbo, saj inhibira rast mlečnokislinskih bakterij in producentov vodika ter pospešuje vrste, ki tvorijo propionsko in jantarno kislino (Kahn in sod., 2006). Kljub številnim ugodnim učinkom na prirejo so zaradi strahu pred škodljivimi stranskimi učinki uporabe antibiotikov uporabo le teh v prehranske namene v Evropi 1. januarja 2006 prepovedali. Eno izmed možnih alternativ antibiotikom predstavljajo snovi iz rastlinskih izvlečkov, ki jih bomo podrobneje opisali v naslednjih poglavjih.

#### 2.4.3.2 Rastlinski izvlečki

Rastline so človeštvu od nekdaj predstavljale pomemben vir hrane in prva zdravila. Domnevamo lahko, da je človek že zelo zgodaj spoznal, s katerimi rastlinami blažiti določene bolečine. Z odkritjem penicilina ter pozneje preostalih antibiotikov so rastlinske zdravilne učinkovine precej izgubile pomen. Sprva so antibiotike uporabljali le v humani medicini, pozneje pa tudi v veterini za zdravljenje mastitisa in drugih bolezni. Kmalu so odkrili, da dodatek antibiotika v prehrani pri različnih vrstah živali pospešuje rast in zmanjša porabo krme. Množična uporaba antibiotikov kot pospeševalcev rasti je močno zmanjšala izgube v reji zaradi bolezni ter hkrati povečala produktivnost (Gustafson in Bowen, 1997).

Sodobna reja živali je bila do nedavnega še tesno povezana z uporabo zdravil, predvsem antibiotikov, z namenom povečevanja prireje. Nevarnost pojava bakterijske rezistence, možnost akumulacije v hrani živalskega izvora ter možnost okužbe vodnih virov z ostanki antibiotikov je leta 2006 privedla do prepovedi uporabe antibiotikov kot prehranskih dodatkov živalim na področju EU (Jouany in Moragavi, 2007). Alternativo antibiotikom v prehrani živali lahko predstavljajo rastline in njihovi izvlečki. Rastline sintetizirajo številne sekundarne metabolite, kot so fenoli in fenolske kisline, tanini, kinoni, flavonoli, flavoni, flavonoidi, alkaloidi in drugi. Ti služijo rastlini kot obrambne snovi pred herbivori, insekti in mikroorganizmi, dajejo rastlinam pigment (kinoni in tanini) ter vonj (terpeni). Terpenoid kapsaicin daje čiliju značilen pekoč okus. Fenolni substanci cinamaldehyd in kofeinska kislina v cimetu, materini dušici, pehtranu in drugih rastlinah delujeta antivirusno, antibakterijsko in antifungicidno. Kofeinska kislina naj bi imela celo antikancerogeno delovanje. Posebna oblika fenolnih substanc s podobnim antibakterijskim učinkom so tudi

eterična olja (eugenol) (Cowan, 1999). Zaradi lipofilnega značaja eteričnih olj pride do interakcije z membrano bakterijske celice. Uničenje membrane povzroči porušenje koncentracijskega gradienta in onemogoči normalen prenos protonov v celico in iz nje (Burt, 2004). Gram-negativne bakterije so zaradi zunanje zaščitne kapsule manj občutljive na olja rastlin kot Gram-pozitivne (Griffin in sod., 1999, cit. po Cowan, 1999). Dovolj majhne molekule esencialnih olj lahko kljub temu prodrejo skozi steno Gram-negativnih bakterij in jo uničijo. Na podoben način prizadenejo tudi praživali in glive (Cowan, 1999). Učinek rastlinskih izvlečkov na mikrobno združbo je odvisen od občutljivosti posamezne bakterijske vrste na te učinkovine (Wallace in sod., 1994).

#### 2.4.3.2.1 Izvleček česna

Česen (*Allium sativum*) je starodavna rastlina, katere pozitivni učinki na zdravje in dobro počutje so znani že več kot 5000 let. Izvira iz Azije, kjer je bil del vsakodnevne prehrane, predvsem v kombinaciji s surovim mesom (Moyers, 1996, cit. po Rivlin, 2001). V stari kitajski medicini so ga predpisovali pri težavah z dihalo in prebavo, črevesnih zajedavcih ter driski. Z njim naj bi lajšali tudi glavobole, žalost in depresijo (Woodward, 1996, cit. po Rivlin, 2001). Zdravilni učinki česna so bili poznani povsod po svetu. Pogosto se je znašel na jedilniku težkih fizičnih delavcev (Moyers, 1996, cit. po Rivlin, 2001) in judovskih sužnjev v Egiptu, saj naj bi pripomogel k moči in vzdržljivosti, potrebni za gradnjo piramid. V stari Grčiji so ga uporabljali pri zdravljenju pljučnih bolezni ter novotvorb v maternici in trebušni votlini, dodajali pa so ga celo obroku atletov v zgodnjih začetkih olimpijskih iger. Tako velja za enega prvih dodatkov za izboljšanje nastopa v tekmovalni atletiki. Predstavljal je nepogrešljiv del obroka mornarjev in vojakov v starem Rimu. Česen je bil pogost predvsem na jedilniku delavskega razreda takratnega prebivalstva. V času renesanse se je njegova uporaba razširila tudi med višjimi sloji. Francoski kralj Henrik IV. naj bi bil krščen v blagoslovljeni vodi z dodatkom česna. Raziskovalci in mornarji so česen in njegove številne zdravilne učinke ponesli prek oceana v Ameriko. Med drugo svetovno vojno so česnovе obkladke polagali na rane kot nadomestilo za takrat dokaj redke antibiotike.



Danes je česen zelo znana in razširjena rastlina, ki jo pri nas najdemo na skoraj vsakem vrtu. Je trajnica in spada v družino lukovk (*Alliaceae*). Spoznamo jo po pokončnem razvejenem stebelu, ki ga pokrivajo suličasti ploščati zeleni listi. Cveti vse poletje, cvetovi pa so belo zelenkaste do rdečkaste barve. Zraste lahko celo do meter visoko. V zemlji ima čebulo, sestavljeno iz do 30 manjših ukrivljenih krljev, obdanih s tanko luskasto ovojnico in lupino (slika 4). Pogosto ga uporabljamo v kulinariki, pomemben pa je tudi v zdravilstvu, kjer je cenjen kot naravni antibiotik, ki naj bi posebno dobro učinkoval proti povzročiteljem različnih bolezni dihal (Saupe, 1994). Sicer naj bi česen širil žile, zniževal krvni tlak, redno uživanje pa naj bi pomagalo preprečevati bolezni srca in ožilja ter celo raka (Amagase in sod., 2001).



Slika 4: Stroki česna

V česnu je mnogo različnih snovi, ki v osnovi služijo za obrambo rastline pred vdorom patogenih mikroorganizmov iz zemlje. V strokih česna najdemo približno en odstotek aliina in nekaj manj kot en odstotek gama glutamil cisteinov, iz katerih se s hidrolizo in oksidacijo prav tako tvori aliin (Amagase in sod., 2001). Žveplo vsebujoča aminokislina aliin je prisotna v strokih česna, vendar sama nima antimikrobnih učinkov (Ankri in Mirelman, 1999). Z rezanjem, žvečenjem ali sušenjem stroka se sprosti vakuolarni encim alinaza, s pomočjo katerega iz aliina nastane citotoksična spojina alicin. Izjemno nestabilni alicin hitro razpade na več različnih spojin, kot so dialil sulfid (DAS), dialil disulfid (DADS), dialil trisulfid (DAT) in alil merkaptan, zato ga že nekaj minut po zaužitju ali vbrizganju, tudi večjih količin česna, ne moremo več odkriti v krvi in urinu (Lawson in sod, 1992, cit. po Amagase in sod., 2001; Freeman in Kodera, 1995, cit. po Amagase in sod., 2001). Dialil sulfid in alil merkaptan dajeta značilen močan vonj in sta tudi prvi odkriti substanci v česnu (Laakso in sod., 1989, cit. po Amagase in sod., 2001). Vse našteje

substanc so bistveno obstojnejše od alicina, zato je verjetno, da prav te »*in vivo*« delujejo antimikrobno. Poleg aliina se iz gama glutamil cisteina sintetizira še S-alil cistein. Ta naj bi imel pomembno vlogo pri zniževanju holesterola in trigliceridov v krvi ter številne druge ugodne učinke na zdravje (Amagase in sod. 2001).

Izvlečki česna delujejo proti vsem vrstam mikroorganizmov, bakterijam, glivam, praživalim in virusom, že dolgo pa je poznana tudi njihova protiparazitska funkcija. Česnovi pripravki, naj bi učinkovali na po Gramu negativne in po Gramu pozitivne bakterije iz vrst *Salmonella*, *Staphilococcus*, *Bacillus* in *Clostridium* ter na nekatere na antibiotike odporne seve vrst *Escherichia coli* in *Staphilococcus aureus*. Zavirajo rast gliv in preprečujejo tvorbo mikotoksinov (aflatoksina) ter so učinkoviti proti različnim vrstam virusov (različni tipi virusa herpes, influenza B) (Ankri in Mirelman, 1999).

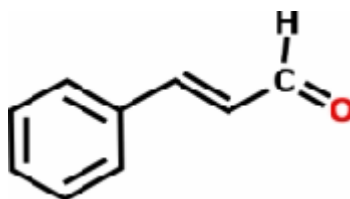
#### 2.4.3.2.2 Izvleček cimeta

Cimet je ena najstarejših znanih začimb, ki jo pridobivajo iz skorje zimzelenega cimetovega drevesa. Njegova domovina je Šrilanka, v Evropo pa je prišel v srednjem veku z beneškimi trgovci, ki so ga kupovali v Egiptu od Arabcev. Veljal je za dragoceno in izredno cenjeno začimbo. Še danes najkakovostnejši cimet prihaja s Šrilanke, pridelujejo pa ga tudi na Kitajskem, v Indoneziji, Egiptu in drugod po svetu. Poznamo dve vrsti dreves, cejlonsko ali »pravo« (*Cinnamomum zeylanicum*) in kitajsko (*Cinnamomum cassia*) cimetovo drevo. Pravi cimetovec zraste 10 do 15 metrov v višino. Veliki ovalni listi so sprva živo rdeči, s staranjem pa postanejo zeleni. Kot začimba se uporablja tanka posušena skorja cimetovca, lahko v obliki prahu ali paličastih zvitkov (slika 5). V kulinariki ga uporabljajo tako za pripravo sladkih kot slanah jedi ter za pripravo vročih zimskih napitkov.



Slika 5 : Cimetove paličice in mleti cimet

V kitajski medicini naj bi cimet zaradi številnih zdravilnih in blažilnih učinkov uporabljali za zdravljenje prehlada, driske in artritisa. Imel naj bi izjemen učinek pri zdravljenju diabetesa tipa II. Cimetovo olje je zaradi svoje sestave tudi odlično sredstvo za odganjanje mrčesa, predvsem komarjev (Beck, 2006). Vonj in okus cimeta pogojuje sestava esencialnega olja. Sestavljajo ga številne spojine, značilen aromatičen vonj ter okus po cimetu pa mu daje učinkovina cinamaldehyd (slika 6). V naravi je prisoten kot trans cinamaldehyd, možna pa je tudi njegova kemična sinteza. Z destilacijo skorje cimetovega drevesa pridobijo viskozno oljnato rumeno tekočino z vreliščem pri 246 stopinjah Celzija. Znani so antibakterični, antiglivni in antivirusni učinki cinamaldehyda, deloval pa naj bi tudi kot pesticid (Burnham, 2008).



Slika 6 : Cinamaldehyd (C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O)

Cinamaldehyd učinkoviteje zavira rast po Gramu pozitivnih bakterij, vendar so študije pokazale, da očiščena učinkovina deluje inhibitorno tudi na po Gramu negativne vrste (Helander in sod., 1998). V periplazmo in globlje plasti celice naj bi cinamaldehyd prodril skozi porinske proteine v celični steni po Gramu negativnih bakterijskih celic (Nikaido in Nakae, 1979). Mehanizem učinkovanja cinamaldehyda je sicer slabo raziskan, vendar znanstveniki pomembno vlogo pripisujejo karbonilni skupini (Helander in sod., 1998). Pri visokih koncentracijah cinamaldehyda se zmanjša tvorba hlapnih maščobnih kislin in amonijskega dušika (Busquet in sod., 2005). Učinek cinamaldehyda je močno odvisen tudi od pH-vrednosti vampa. Pri nizkih pH-vrednostih (manj kot šest) so aktivnejše amilolitične

bakterije, zato se tvorba propionske kisline poveča. Pri višjih pH-vrednostih (več kot šest) pa fibrolitične bakterije tvorijo več očetne in maslene kisline (Wollin in Miller, 1988). V odvisnosti od pH se poleg razmerja med posameznimi maščobnimi kislinami spreminjata tudi skupna količina hlapnih maščobnih kislin in tvorba amonijskega dušika.

#### 2.4.3.2.3 Izvleček klinčevca

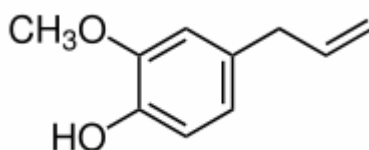
Dišeči klinčevca (*Syzygium aromaticum*), imenovan tudi žbičevca (*Eugenia caryophyllata*), je zimzeleno drevo, doma iz Indonezije (Moluški otoki) in s Filipinov. Zraste do 20 metrov visoko, ima ovalne usnjate liste ter škrlatne močno dišeče cvetove. Dandanes ga gojijo v številnih tropskih državah, saj je posušene popke, poznane tudi pod imenom klinčki ali nageljnovca žbice (slika 7), mogoče uporabiti v različne, tako kulinarčne kot medicinske namene. Največ nageljnovca žbic pridelajo v Tanzaniji na otoku Zanzibar, pridelujejo pa jih tudi na Madagaskarju, Šrilanki, v Indiji in drugje. Klinčke so že od nekdaj uporabljali v indijski kuhinji, saj so sestavni del znane indijske začimbe curry. Najdemo jih v jedeh mehiške kuhinje v kombinaciji s kumino. V naših krajih so nageljnovca žbice nepogrešljiv dodatek h kuhanemu vinu. Cenjene so v kozmetični industriji in pri izdelavi parfumov. V Indoneziji so poznane celo posebne klinčkove cigarete. V stari indijski in kitajski medicini ter v zahodnem zdravilstvu so bile nageljnovca žbice pogosto uporabljane v raznolike namene. Njihove pripravke so predpisovali za zdravljenje bolečin v zobeh, proti črevesnim in želodčnim krčem in kot naravni antihelmintik. Eterično olje nageljnovca žbic naj bi odlično delovalo proti kašlju, saj razkužuje dihala in olajša izkašljevanje (Špringer, 2003).



Slika 7: Nageljnovca žbice ali klinčki

Glavno komponento eteričnega olja nageljnovca žbic predstavlja eugenol (slika 8). Rumeno do rjavo oljnato tekočino pridobivajo z destilacijo iz cvetnih popkov, kjer se

nahaja največ olja, pa tudi iz listov in stebel rastline. Spada med fenilpropanoide, je dobro topen v organskih topilih in daje značilen aromatičen vonj po klinčkih. Deluje antimikrobno tako na po Gramu pozitivne (*Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus sp.* ...) kot tudi na po Gramu negativne bakterije (*Eschericia coli*, *Enterobacter sp.* ...) in glive (*Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.*) (Gill in Holley, 2004).



Slika 8: Eugenol (C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>) (prirejeno po:Wikimedia Commons, 2007a.).

Princip delovanja eugenola temelji na povečanju občutljivosti membrane bakterijske celice, zaradi česar se prepustnost le te močno poveča. Že koncentracija 10 mM eugenola pri celicah *E. coli*, *Listeria monocytogenes* in *Lactobacillus sakei* popolnoma zavre rast. Zaradi povečane prepustnosti se poruši membranski elektrokemijski gradient in ioni prek membrane prehajajo s pomočjo difuzije. Gill in Holley (2006) sta izmerila znatno nižjo koncentracijo tako intracelularnega kot ekstracelularnega ATP pri celicah, ki so rasle v prisotnosti eugenola, kar kaže na inhibicijo ATP-aktivnosti.

### **3 MATERIAL IN METODE**

#### **3.1 MATERIAL**

##### **3.1.1 Bakterijski sevi**

V poskus smo vključili šest bakterijskih sevov, *Prevotella ruminicola* 23<sup>T</sup>, *Prevotella bryantii* B<sub>14</sub>, *Butyrivibrio fibrisolvens* 3071<sup>T</sup>, *Ruminococcus albus* 20455, *Ruminococcus flavefaciens* 007 S/6 in *Fibrobacter succinogenes* S85, ki so enostavno dostopni in jih znamo gojiti »*in vitro*«, zato so njihove lastnosti dokaj dobro preučene (preglednica 1). Trije izmed njih imajo po Gramu negativno strukturo celične stene, dva po Gramu pozitivno, *B. fibrisolvens* 3071<sup>T</sup> pa ima po Gramu pozitivno strukturo celične stene, čeprav se po Gramu obarva negativno. Izbrani bakterijski sevi so v vampu pomembni bodisi zaradi svoje številčnosti bodisi zaradi pomembne vloge pri razgradnji posameznih substratov (celuloze, hemiceluloze, pektinov ...) in tvorbe vodika. Sev *P. bryantii* B<sub>14</sub> kaže na možnost razvoja ultrarezistence na ionoforni antibiotik monenzin (Callaway in Russel, 1999), kar smo v našem poskusu želeli podrobneje preučiti.

Preglednica 1: Osnovne značilnosti sevov, ki smo jih uporabili v poskusu

Sev	Morfologija	Celična stena	Substrat	Produkti fermentacije
<i>Prevotella ruminicola</i> sev 23 <sup>T</sup>	Kokoidne in paličaste celice	Gram–	Sladkor, škrob, pektini, ksilani	Mravljična, očetna, propionska in jantarna kislina
<i>Prevotella bryantii</i> sev B <sub>14</sub>	Paličaste celice	Gram–	Sladkor, škrob, pektini, ksilani	Mravljična, očetna, propionska in jantarna kislina
<i>Butirivibrio fibrisolvens</i> sev 3071 <sup>T</sup>	Paličaste celice	Morfološko G– Fiziološko G+	Sladkor, škrob, pektini, ksilani, hemiceluloze	Mravljična, očetna in maslena kislina, H <sub>2</sub>
<i>Fibrobacter succinogenes</i> sev S85	Ukrivljene paličaste celice	Gram–	Celuloza	Mravljična, očetna in jantarna kislina
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> sev 007 S/6	Kokoidne celice	Gram+	Celuloza, hemiceluloze	Mravljična, očetna in jantarna kislina
<i>Ruminococcus albus</i> sev 20455	Kokoidne celice	Gram+	Celuloza, hemiceluloze	Mravljična in očetna kislina, etanol, H <sub>2</sub>

Gram–: Gram-negativna struktura celične stene, G+: Gram-pozitivna struktura celične stene

### 3.1.2 Gojišče M2

Vse bakterijske seve smo gojili v modificiranem gojišču za anaerobne vampne mikroorganizme M2 (Hobson, 1997). Svež goveji vampni sok smo najprej precedili in nato 30 minut centrifugirali (centrifuga Sorvall<sup>®</sup>-RC5C, Nemčija) pri 10000 rpm in 15 stopinjah Celzija. Supernatant smo avtoklavirali ter do uporabe shranili pri štirih stopinjah Celzija. Tik pred pripravo gojišča smo centrifugiranje vampnega soka ponovili, da pozneje zaradi prisotnosti delcev ne bi prišlo do napak pri spektrofotometričnih analizah.

Preglednica 2: Sestavine modificiranega M2 gojišča za vampne anaerobe

Sestavine	Koncentracija (ut. %)
NaHCO <sub>3</sub>	0,4
Bakto tripton	1,0
Kvasni izvleček	0,25
Glukoza	0,2
Celobioza	0,2
Topni škrob	0,2
Resazurin	0,001
L-Cistein HCL	0,1
Mineralna raztopina I	15,0 (vol. %)
Mineralna raztopina II	15,0 (vol. %)
Vampni sok	30,0 (vol. %)
Deionizirana voda	30,0 (vol. %)

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

Gojišče za anarobne vampne bakterije smo pripravili iz sestavin v preglednici 2. Natrijev hidrogen karbonat, bakto tripton, kvasni ekstrakt, glukozo, celobiozo ter topni škrob smo zatehtali po navodilih ter jim dodali obe mineralni raztopini, deionizirano vodo in centrifugiran vampni sok. Dodali smo raztopino resazurina, ki deluje kot indikator, saj ob prisotnosti kisika gojišče obarva rožnato. Vse sestavine smo ob stalnem mešanju segreti do vretja, nato pa dodali še L-cistein HCl kot dodatni reducent. Gojišče smo preprihovali s čistim ogljikovim dioksidom brez primesi kisika. Po približno 15 minutah je barva iz rožnate prešla v rjavkasto, kar je pomenilo, da kisik v gojišču ni več prisoten. Gojišče smo ob stalnem preprihovanju s CO<sub>2</sub> razlili v steklene »Hungate« epruvete (Bellco Glass, USA), jih nepredušno zaprli, avtoklavirali in shranili na sobni temperaturi do uporabe. Kadar smo bakterije gojili v mikrotitrskih ploščah v anaerobni komori (Coy Laboratories, ZDA), smo mikrotitrsko ploščo (format 8x12) predinkubirali v komori, da smo se znebili vsega molekularnega kisika, ki bi se lahko vezal na plastiko. Nato smo gojišče M2 v anaerobnih 100 mililitrskih steklenicah prinesli v komoro in 300 µl gojišča vnesli v vsako jamico mikrotitrsko ploščo z avtomatsko pipeto. Mikrotitrsko ploščo, napolnjeno z gojiščem, so bile ves čas, razen med inokulacijo in merjenjem rasti, pokrite s plastičnimi pokrovi.



Za pripravo poltrdega M2-gojišča, ki smo ga uporabljali za shranjevanje sevov pri –20 stopinjah Celzija, smo že pripravljenemu gojišču dodali še 0,75 ut. odstotka agarja.

### **3.1.3 Monenzin in rastlinski izvlečki**

V poskusu smo uporabili štiri učinkovine, in sicer ionoforni antibiotik monenzin ter tri rastlinske izvlečke. Uporabili smo aktivno snov česnovnega izvlečka dialil sulfid (Acros Organics, 97-odstotni allyl sulfide, kataloška številka 592-88-1), izvleček nageljnovih žbic – eugenol (Merck®, Nemčija) ter izvleček cimeta – cinamaldehyd (Merck®, Nemčija). Rastlinske izvlečke smo pred uporabo sterilizirali s filtracijo skozi 0,22 µm membranski filter (Millipore®, Irska). S posameznimi izvlečki smo inokulirali sterilno tekoče M2 gojišče. Do porasta optične gostote gojišča pri rastlinskih izvlečkih ni prišlo, zato smo sklepali, da so sterilni in jih lahko uporabimo v poskusu.

## **3.2 METODE**

### **3.2.1 Gojenje čistih bakterijskih kultur**

Pred začetkom poskusa smo odmrznili seve, ki so bili shranjeni v zamrzovalniku pri –20 stopinjah Celzija. V anaerobnih razmerah smo jih s cepilno zanko sterilno precepili v sveža, tekoča in sterilna M2-gojišča v steklenih »Hungate« epruvetah. Za gojenje smo uporabili Bryantovo modifikacijo Hungatove tehnike za gojenje anaerobnih mikroorganizmov (Bryant, 1972). Seve smo inkubirali pri 37 stopinjah Celzija. Prekonočne kulture smo uporabili za inokulum v poskusu. Kulture za nadaljevanje poskusa smo precepili v sveža poltrda (sloppy) gojišča, jih čez noč inkubirali na 37 stopinjah Celzija ter nato zamrznili.

### **3.2.2 Preverjanje čistosti kultur z metodo barvanja po Gramu**

Z barvanjem po Gramu in mikroskopiranjem smo med poskusom večkrat preverili čistost kultur.

Postopek barvanja po Gramu:

- kulturo razmažemo po objektnem stekelcu in jo fiksiramo nad plamenom,
- prelijemo z barvilom kristal vijoličasto, počakamo eno minuto in speremo z vodovodno vodo,
- preparat prelijemo z lugolom, speremo, ponovno prelijemo z lugolom, počakamo eno minuto, speremo z vodovodno vodo,
- preparat razbarvamo z mešanico 90-odstotnega etanola in 10-odstotnega acetona ter speremo z vodovodno vodo,
- prelijemo razmaz z barvilom safranin, speremo z vodovodno vodo in posušimo.

### **3.2.3 Merjenje optične gostote**

Rast tekočih bakterijskih kultur smo med poskusom spremljali z merjenjem motnosti ali optične gostote (OD). OD kultur v Hungatovih epruvetah smo merili s spektrofotometrom pri 654 nm, v kulturah v mikrotitrskih ploščah pa v anaerobni komori s čitalcem mikrotitrskih plošč pri valovni dolžini 620 nm. Za umeritev instrumentov smo v obeh primerih uporabili čisto M2-gojišče iz iste serije, ki smo jo uporabili v poskusu.

### **3.2.4 Shema poskusa**

Poskus smo razdelili na tri dele:

- 1. del – ugotavljanje širšega območja koncentracij, pri katerih je delovanje monenzina in rastlinskih izvlečkov opazno.
- 2. del – ugotavljanje ožjega območja koncentracij, pri katerih je delovanje monenzina in rastlinskih izvlečkov opazno.
- 3. del – adaptacija sevov na monenzin in nekatere preučevane rastlinske izvlečke.

Celoten poskus, tako inkubacija kot spremljanje rasti mikrobnih kultur z merjenjem optične gostote s čitalcem mikrotitrskih plošč, je potekal v anaerobni komori. V prvem delu poskusa smo za vsak izvleček določene koncentracije pripravili tri paralelke. Eno

kolono jamic v mikrotitrski plošči, s katero smo razmejili različne seve, smo napolnili s sterilnim gojiščem, da bi preprečili navzkrižne kontaminacije. Pri vseh štirih uporabljenih učinkovinah smo testirali sedem različnih koncentracij, ki so bile enake za vse seve. Pri monenzinu (MON) smo pripravili najvišjo koncentracijo 100  $\mu\text{M}$  ter iz nje v sterilnih epruveh napravili štirikratno redčitveno vrsto do najnižje koncentracije 0,02  $\mu\text{M}$  (glej rezultati, preglednica 4). Redčitvene vrste smo pripravili tudi za vse tri rastlinske učinkovine. Koncentracije so se pri vseh razlikovale za faktor 2 in so pri dialil sulfidu (Das) tekle od najvišje, 20000 mg/l, do najnižje, 312,5 mg/l, pri cinamaldehydu (CIN) in evgenolu (EVG) pa od 1280 mg/l, do 20 mg/l) (glej rezultati, preglednica 4). Vse učinkovine smo najprej dodali v večji volumen M2-gojišča ter jih dobro premešali na mešalu vorteks. Posebno smo pazili pri izvlečku česna (Das), saj se je le ta počasneje raztapljal kot preostali in smo morali večkrat mešati. Iz vsake epruvete (7 epruveh – 7 koncentracij) smo po en mililiter gojišča z dodano učinkovino odpipetirali v sterilne minicentrifugirke. Kot kontrolo smo odpipetirali en mililiter čistega M2-gojišča ter nato vsem dodali trikratni inokulum ustreznega seva prekonočne kulture in zopet dobro premešali. Inokulirano gojišče z dodatkom učinkovine ustrezne koncentracije (za kontrolo – inokulirano čisto gojišče) smo iz minicentrifugirk sterilno prenesli na mikrotitrsko plošče. Rast bakterij smo spremljali z merjenjem OD pri 620 nm, pri MON in Das 94 ur, pri CIN in EVG pa 52 ur.

Osrednji namen drugega dela poskusa je bil določitev ožjega koncentracijskega območja delovanja preučevanih učinkovin, pri čemer smo izhajali iz rezultatov prvega dela. Želeli smo določiti najnižjo koncentracijo, ki že inhibira rast določenega seva bakterij, oziroma tako imenovano minimalno inhibitorno koncentracijo (MIC) ter koncentracijo, ki zavre bakterijsko rast približno za polovico ( $\text{IC}_{50}$ ). Pozneje smo ugotovili, da zaradi načina inhibicije rasti iskanih koncentracij ne moremo določiti v vseh primerih, saj nekatere učinkovine vplivajo zgolj na podaljšanje faze prilagoditve bakterij (tako imenovane lag faze), na končni obseg njihove rasti pa nimajo vpliva. Za MON, CIN in EVG smo testirali sedem koncentracij v treh paralelkah, pri Das pa tri koncentracije v šestih paralelkah. Koncentracije so bile različne za vsak sev in so prikazane v preglednici 3. Rast bakterij v prisotnosti Das in MON smo v drugem delu spremljali 96 ur, v prisotnosti CIN in EVG pa 120 ur.

Preglednica 3: Koncentracije preučevanih učinkovin v drugem delu poskusa

	PB	PR	RA	RF	BF	FS		PB	PR	RA	RF	BF	FS
MON1	140	50	1,56	3,12	0,024	1,56	CIN1	400	180	175	600	310	310
MON2	120	25	0,78	1,56	0,012	0,78	CIN2	360	160	160	500	280	280
MON3	100	12,5	0,39	0,78	0,006	0,39	CIN3	320	140	145	400	250	250
MON4	80	0,20	0,20	0,39	0,003	0,20	CIN4	280	120	130	320	220	220
MON5	60	0,10	0,10	0,20	0,0015	0,10	CIN5	240	100	115	280	190	190
MON6	40	0,05	0,05	0,10	0,0008	0,05	CIN6	200	80	100	240	160	160
MON7	20	0,02	0,02	0,05	0,0004	0,02	CIN7	160	60	85	200	130	130
	PB	PR	RA	RF	BF	FS		PB	PR	RA	RF	BF	FS
EVG1	660	580	600	1140	1080	1160	Das	40000	30000	40000	50000	40000	40000
EVG2	620	520	560	1040	980	1040	Das	30000	20000	30000	40000	30000	30000
EVG3	580	460	520	940	880	920	Das	20000	10000	20000	30000	20000	20000
EVG4	540	400	480	840	780	800							
EVG5	500	340	440	740	680	680							
EVG6	460	280	400	640	580	560							
EVG7	420	220	360	540	480	440							

PB – *Prevotella bryantii*, PR – *Prevotella ruminicola*, RA – *Ruminococcus albus*, RF – *Ruminococcus flavefaciens*, BF – *Butirivibrio fibrisolvens*, FS – *Fibrobacter succinogenes*, MON – monenzin, CIN – cinamaldehyd, EVG – eugenol, Das – dialil sulfid

Kot smo že omenili, preučevane učinkovine na različne načine vplivajo na bakterijsko rast, kar se je pokazalo tudi v drugem delu našega poskusa. Opazili smo prilagoditve nekaterih sevov na nekatere učinkovine. Callaway in Russel (1999) sta poročala o pojavu ultrarezistence *P. bryantii* B<sub>14</sub> na monenzin, zato smo želeli ugotoviti, ali kateri izmed sevov razvije podoben mehanizem prilagajanja na katero izmed uporabljenih rastlinskih učinkovin. V primerih, ko je inhibitor vplival le na podaljšanje prilagoditvene faze bakterij, koncentracij IC<sub>50</sub> in MIC nismo mogli določiti, zato smo za tretji del poskusa izbrali le dva seva – *P. ruminicola* 23 in *R. flavefaciens* 007 S/6, ter dve učinkovini, MON in CIN, kjer smo slednji dve koncentraciji lahko pri obeh določili.

Pri sevu *P. ruminicola* 23 smo izbrali začetno koncentracijo za monenzin **0,39** µM in za cinamaldehyd **80** mg/l, pri *R. flavefaciens* 007 S/6 pa **0,78** µM za monenzin in **360** mg/l za cinamaldehyd. Izbrane koncentracije so bile bodisi IC<sub>50</sub> ali s podobnim potekom rastne krivulje kot pri IC<sub>50</sub>. Nanašale so se na rezultate spremljanja rasti izmerjene v mikrotitrskih ploščah, zato je tudi nadaljnji poskus potekal v mikrotitrskih ploščah. Zaradi lažjega in natančnejšega mešanja ter manjše možnosti napak pri pipetiranju smo vedno najprej pripravili večjo količino preučevane učinkovine v višji koncentraciji, ki smo jo nato redčili z gojiščem. Na mikrotitrskih ploščah smo pripravili osem paralelek za vsak sev in vse koncentracije učinkovin ter kontrolo (sterilno gojišče). Za inokulum smo uporabili

prekonočne tekoče kulture sevov iz Hungatovih epruвет. Prva in vse naslednje pasaže so si sledile v razmaku dveh dni. Inokulum za nadaljevanje poskusa smo dobili z združevanjem dveh paralelk na plošči.

Vzgajali smo kontrolo – sev, ki je rasel brez prisotnosti učinkovine, neadaptiran sev, ki smo ga precepljali v gojišče z določeno koncentracijo učinkovine (CTR-MON/CIN), ter adaptiran sev, ki je že rasel pri določeni koncentraciji učinkovine in smo ga nato precepili v višjo koncentracijo le te ( $MON_n/CIN_n$ - $MON_{n+1}/CIN_{n+1}$ ) in vzgajali naprej. Adaptiran sev smo precepili še v gojišče z enako koncentracijo inhibitorja ( $MON_n/CIN_n$ - $MON_n/CIN_n$ ) ter v čisto gojišče, da smo ohranili živega, če pri naslednji koncentraciji ne bi več rasel. Ko je bila rast popolnoma inhibirana, smo napravili še eno pasažo, s čimer smo se prepričali, da je rast zagotovo ustavljena, sev pa smo dalje precepljali v čisto gojišče ter v gojišče z nižjo koncentracijo učinkovine. Preverili smo tudi, ali se adaptacija ohranja, če prej adaptirani sev nekaj časa gojimo v čistem gojišču in nato zopet izpostavimo različno visokim koncentracijam preučevane učinkovine.

## 4 REZULTATI

### 4.1 VPLIV PREUČEVANIH UČINKOVIN NA RAST IZBRANIH BAKTERIJSKIH SEVOV

#### 4.1.1 Ugotavljanje vpliva preučevanih učinkovin v širšem območju koncentracij na rast izbranih bakterijskih sevov

V prvem delu poskusa smo preučevali učinke monenzina ter treh rastlinskih učinkovin, česnovnega dialil sulfida, cinamaldehida in eugenola, v širšem koncentracijskem območju na rast vseh šestih izbranih bakterijskih sevov. Kot prikazuje preglednica 4, smo ugotovili tri osnovne načine delovanja izbranih krmnih dodatkov:

- podaljšanje faze prilagajanja (lag faze) bakterij,
- zmanjšanje obsega rasti bakterij,
- zmanjšanje hitrosti rasti bakterij.

Ionoforni antibiotik monenzin je bodisi popolnoma preprečil rast bodisi vplival na zmanjšanje obsega in hitrosti rasti pri vseh sevih, pri *B. fibrisolvens* 3071<sup>T</sup>, ki se je izkazal kot na MON najboljčutljivejši sev, pa je bila rast že pri najnižji koncentraciji MON (0,024 $\mu$ M) skoraj popolnoma inhibirana. Najodpornejši na MON je bil sev *P. bryantii* B<sub>14</sub>, ki je rasel tudi pri najvišji testirani koncentraciji (100  $\mu$ M). Podobno sta na obseg in hitrost rasti bakterij vplivala tudi CIN in EVG. Ugotovili smo, da imata ti učinkovini dokaj ozko koncentracijsko območje delovanja, zato predvsem pri kombinacijah CIN/RA, EVG/PB in EVG/RA načina vpliva nismo mogli določiti. Pri nekaterih koncentracijah monenzina (MON1/PB, MON5,6/RA, MON5,6,7/FS), cinamaldehida (CIN3/RF, CIN4/FS) in eugenola (EVG2/FS) se je podaljšana faza prilagoditve pojavila v kombinaciji z zmanjšanjem obsega in hitrosti rasti (preglednica 4).

Preglednica 4: Vpliv preučevanih učinkovin rasti v širšem koncentracijskem območju na rast izbranih bakterijskih sevov

MONENZIN							
Konc. (µM)/sev	PB	PR	RA	RF	BF	FS	
1. 100	hitrost obseg	in	sev ne raste	sev ne raste	sev ne raste	sev ne raste	
2. 25			sev ne raste				
3. 6,25			sev ne raste				
4. 1,56	vpliv minimalen	je	hitrost obseg	in	hitrost obseg	in	
5. 0,39							lag faza, hitrost in obseg
6. 0,097							hitrost in obseg
7. 0,024							min. rast
Dialil sulfid							
Konc. (mg/l)/sev	PB	PR	RA	RF	BF	FS	
1. 20.000	lag faza	lag faza napaka	lag faza	ni vpliva	lag faza	lag faza	
2. 10.000		lag faza					
3. 5000		lag faza					
4. 2500		lag faza					
5. 1250	ni vpliva	ni vpliva	ni vpliva	ni vpliva	ni vpliva	ni vpliva	
6. 625							
7. 312,5							
CINAMALDEHID							
Konc. (mg/l)/sev	PB	PR	RA	RF	BF	FS	
1. 1280	sev ne raste	sev ne raste	sev ne raste	sev ne raste	sev ne raste	sev ne raste	
2. 640				lag faza, hitrost obseg			
3. 320				hitrost			
4. 160	ni vpliva	in	vpliv je minimalen	vpliv minimalen	je	ni vpliva	
5. 80							obseg hitrost
6. 40							ni vpliva
7. 20							ni vpliva
EUGENOL							
Konc. (mg/l)/sev	PB	PR	RA	RF	BF	FS	
1. 1280	sev ne raste	sev ne raste	sev ne raste	sev ne raste	sev ne raste	sev ne raste	
2. 640				hitrost			
3. 320				obseg in hitrost			
4. 160	ni vpliva	in	ni vpliva	ni vpliva	ni vpliva	ni vpliva	
5. 80							obseg
6. 40							ni vpliva
7. 20							ni vpliva

PB – *Prevotella bryantii*, PR – *Prevotella ruminicola*, RA – *Ruminococcus albus*, RF – *Ruminococcus flavefaciens*, BF – *Butirivibrio fibrisolvens*, FS – *Fibrobacter succinogenes*

V splošnem so bile preučevane bakterije bolj odporne na EVG kot na CIN. Dialil sulfid je pri vseh sevih vplival le na podaljšanje faze prilagajanja rasti (lag faze), razen pri sevu *R. flavefaciens* 007/S6, kjer pri izbranih koncentracijah nismo zabeležili nobenega vpliva na rast.

#### **4.1.2 Ugotavljanje vpliva preučevanih učinkovin v ožjem območju koncentracij na rast izbranih bakterijskih sevov**

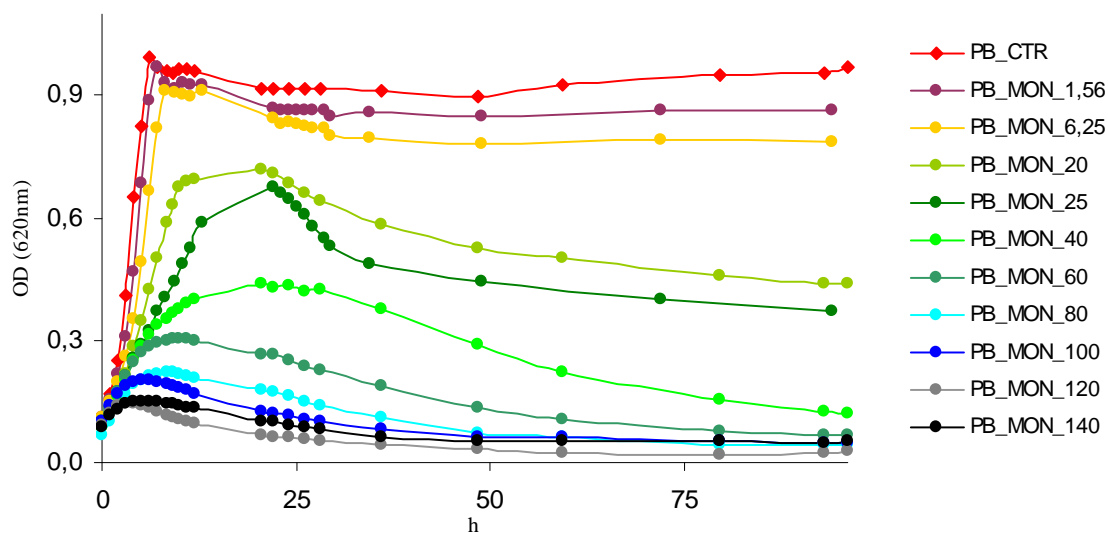
V prvem delu nismo mogli določiti vpliva nekaterih učinkovin na izbrane seve, ker so bile koncentracije učinkovin bodisi previsoke in so rast popolnoma zavrle, bodisi prenizke in rasti niso ovirale. Zato smo v nadaljevanju izbrali sedem za vsak sev specifičnih koncentracij v ožjem območju. Pri določanju koncentracij učinkovin smo izhajali iz rezultatov iz prvega dela poskusa.

Podobno kot v prvem delu smo ugotovili, da dodatek monenzina pri vseh bakterijskih sevih zmanjša obseg oziroma obseg in hitrost rasti bakterij, pri sevih *R. albus* 20455 ter *F. succinogenes* S85 pa je pri nekaterih višjih koncentracijah prišlo tudi do podaljšanja faze prilagajanja. Rast na monenzin najodpornejše bakterije seva *P. bryantii* B<sub>14</sub> smo testirali še pri dveh višjih koncentracijah (140 in 120  $\mu\text{M}$ ) kot v prvem poskusu, vendar je bila rast v teh primerih popolnoma inhibirana (slika 9). Ugotovljena minimalna inhibitorna koncentracija je za *P. bryantii* B<sub>14</sub> 100  $\mu\text{M}$  (preglednica 5). Dokaj odporen na monenzin je bil tudi sev *P. ruminicola* 23 z MIC 12,5  $\mu\text{M}$ , sledili so *R. flavefaciens* 007 S/6 (MIC = 3,12  $\mu\text{M}$ ), *R. albus* 20455 (MIC = 1,56  $\mu\text{M}$ ), *F. succinogenes* S85 (MIC = 0,78  $\mu\text{M}$ ). Pri na monenzin najobčutljivejšem sevu *B. fibrisolvens* 3071<sup>T</sup> je MIC 0,98  $\mu\text{M}$  (slika 10).



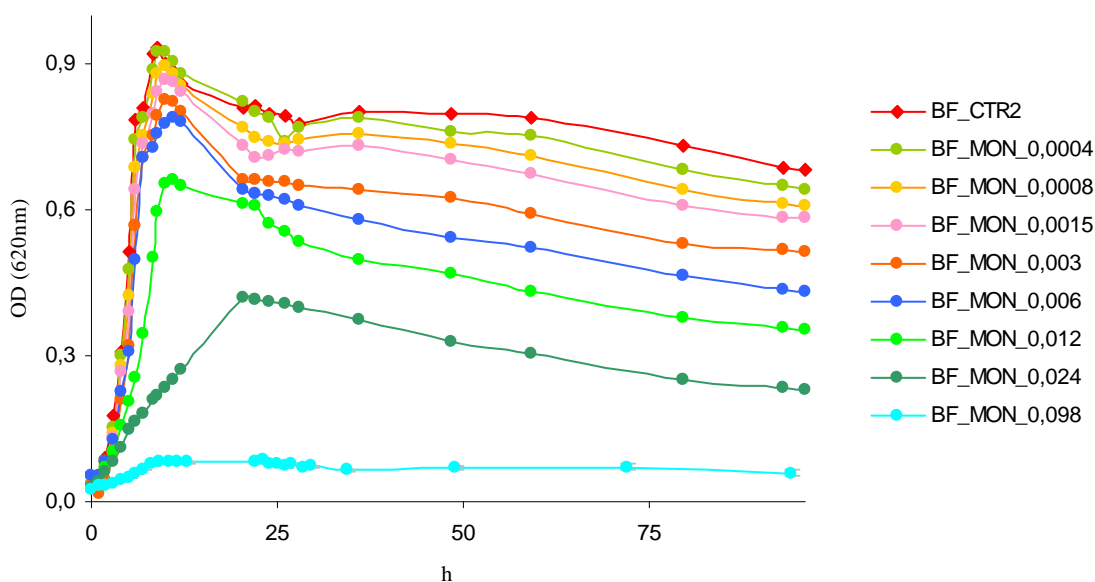
Preglednica 5: Vpliv inhibitorjev rasti v ožjem koncentracijskem območju na rast izbranih bakterijskih sevov

<i>Prevotella bryantii</i> B <sub>14</sub> <sup>1</sup>							
Monenzin (µM)		Dialil sulfid (mg/l)		Cinamaldehyd (mg/l)		Eugenol (mg/l)	
140		40000		400		660	
120		30000	lag faza	360	MIC	620	
100	MIC	20000		320	lag faza, obseg, hitrost	580	MIC
80	minimalna rast	/	/	280	lag faza	540	lag faza, hitrost, obseg
60	minimalen vpliv	/	/	240		500	
40	obseg, hitrost	/	/	200	lag faza, hitrost	460	
20	IC <sub>50</sub> = 20-40 µM	/	/	160		420	
<i>Prevotella ruminicola</i> 23 <sup>1</sup>							
Monenzin (µM)		Dialil sulfid (mg/l)		Cinamaldehyd (mg/l)		Eugenol (mg/l)	
50		30000	lag faza	180		580	
25		20000		160		520	
12,5	MIC	10000		140	MIC	460	
0,20	hitrost, obseg IC <sub>50</sub> = 0,05-0,1 µM	/	/	120	minimalna rast	400	
0,10		/	/	100	obseg, rast	340	MIC
0,05		/	/	80	IC <sub>50</sub> = 80 µM	280	min. rast
0,02		/	/	60		220	min. inhibicija
<i>Ruminococcus albus</i> 20455							
Monenzin (µM)		Dialil sulfid (mg/l)		Cinamaldehyd (mg/l)		Eugenol (mg/l)	
1,56	MIC	40000	lag faza	175		600	MIC
0,78	lag faza, obseg rasti	30000		160		560	
0,39		20000		145	lag faza, obseg, hitrost	520	lag faza, obseg, hitrost
0,20	lag faza, hitrost, obseg, IC <sub>50</sub> = 0,20 µM	/	/	130		480	
0,10	hitrost, obseg	/	/	115		440	
0,05	obseg	/	/	100	minimalen vpliv	400	lag faza, obseg
0,02		/	/	85		360	obseg
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> 007 S/6							
Monenzin (µM)		Dialil sulfid (mg/l)		Cinamaldehyd (mg/l)		Eugenol (mg/l)	
3,12	MIC	50000	ni vpliva	600	MIC	1140	
1,56	hitrost, obseg IC <sub>50</sub> = 0,39-0,78 µM	40000		500	lag faza, hitrost, obseg	1040	lag faza, hitrost
0,78		30000		400		940	
0,39		/	/	320		840	
0,20		/	/	280	hitrost, obseg	740	
0,10		/	/	240		640	hitrost
0,05		/	/	200	minimalen vpliv	540	
<i>Butirivibrio fibrisolvens</i> 3071 <sup>1</sup>							
Monenzin (µM)		Dialil sulfid (mg/l)		Cinamaldehyd (mg/l)		Eugenol (mg/l)	
0,024	hitrost, obseg	40000	lag faza	310	lag faza, hitrost	1080	
0,012	IC <sub>50</sub> = 0,12-0,024 µM	30000		280		980	MIC
0,006		20000		250	hitrost	880	lag faza, hitrost, obseg
0,003	obseg	/	/	220		780	
0,0015		/	/	190		680	
0,0008	minimalen vpliv	/	/	160		580	hitrost, obseg
0,0004		/	/	130	minimalen vpliv	480	
<i>Fibrobacter succinogenes</i> S85							
Monenzin (µM)		Dialil sulfid (mg/l)		Cinamaldehyd (mg/l)		Eugenol (mg/l)	
1,56		40000	lag faza,	310	MIC	1160	
0,78	MIC	30000		280		1040	
0,39	lag faza,	20000		250	lag faza	920	MIC
0,20	hitrost, obseg	/	/	220		800	lag faza, obseg
0,10	IC <sub>50</sub> = 0,10 µM	/	/	190		680	
0,05	hitrost, obseg	/	/	160		560	
0,02		/	/	130	minimalen vpliv	440	min. vpliv



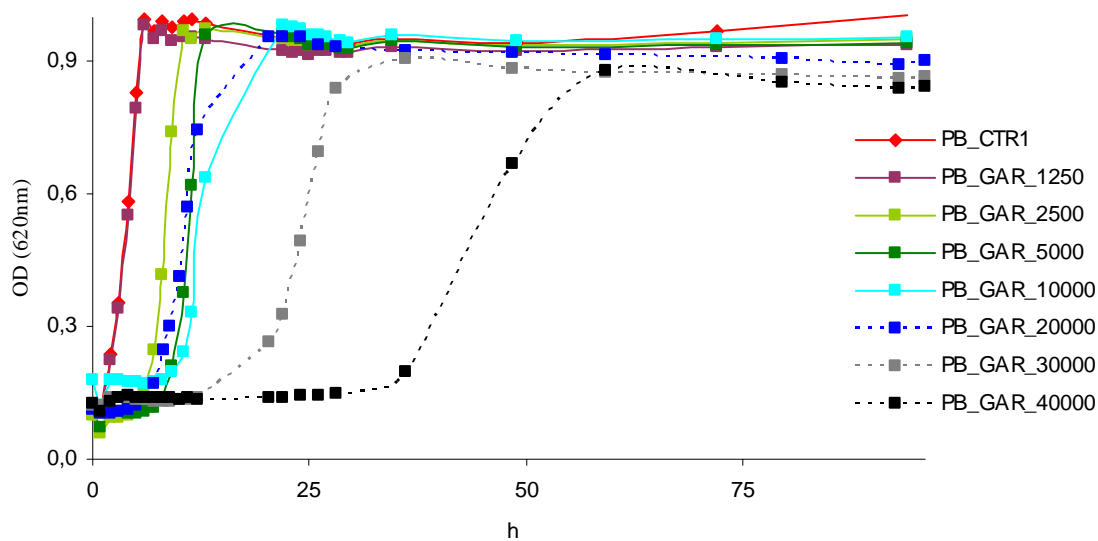
Slika 9: Rast *P. bryantii* B<sub>14</sub> (PB) v prisotnosti različnih koncentracij monenzina (MON)

Zaradi načina inhibicije rasti monenzina smo pri vseh sevih lahko določili tudi koncentracije IC<sub>50</sub>, ki so bile naslednje: *P. bryantii* B<sub>14</sub> – med 20 in 40  $\mu$ M, *P. ruminicola* 23 – med 0,05 in 0,1  $\mu$ M, *R. albus* 20455 – 0,20  $\mu$ M, *R. flavefaciens* 007 S/6 – med 0,39 in 0,78  $\mu$ M, *B. fibrisolvens* 3071<sup>T</sup> – med 0,12 in 0,024  $\mu$ M, *F. succinogenes* S85 – 0,10  $\mu$ M.

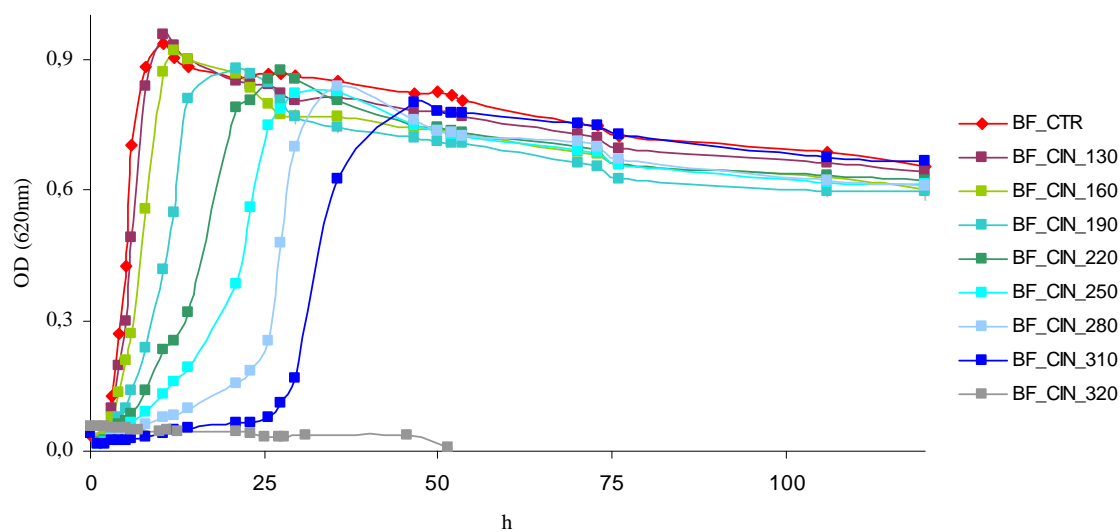


Slika 10: Rast *B. fibrisolvens* 3071<sup>T</sup> (BF) pri različnih koncentracijah monenzina (MON)

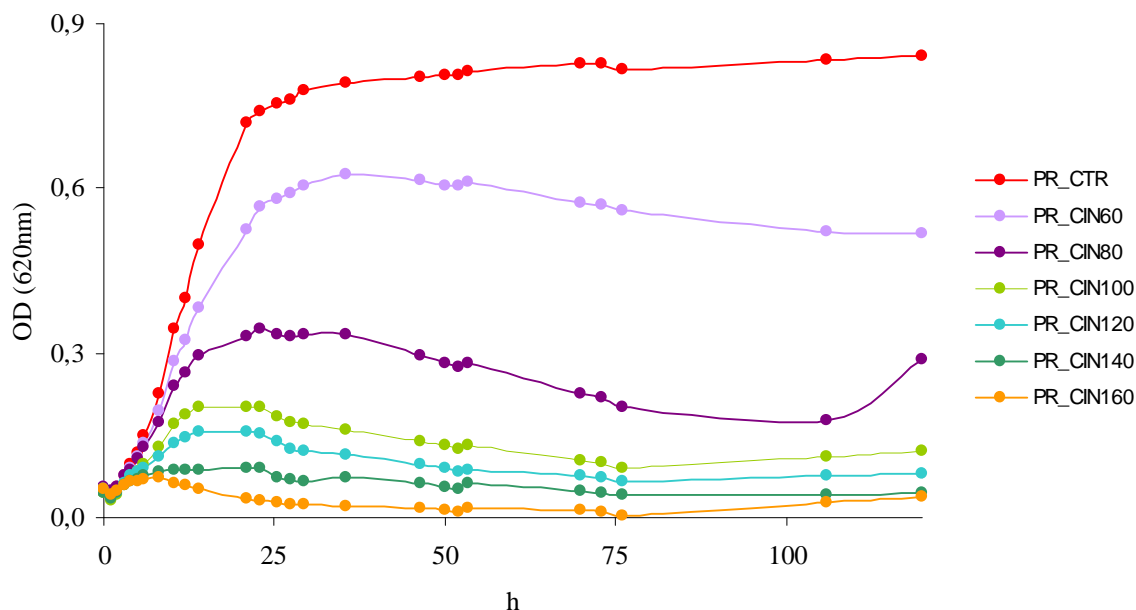
Dialil sulfid je tudi v drugem delu poskusa pri vseh sevih podaljšal fazo prilagajanja rasti bakterij (primer: *P. bryantii* B<sub>14</sub>, slika 11). Koncentracij MIC in IC<sub>50</sub> za Das zato ni bilo možno določiti. Pri sevu *R. flavefaciens* 007 S/6 tudi pri najvišji koncentraciji Das (50000 mg/l) nismo zabeležili nobenega vpliva na rast. Cinamaldehyd je pri *P. bryantii* B<sub>14</sub> podaljšal fazo prilagajanja, pri nekaterih koncentracijah pa tudi povečal hitrost rasti. Pri sevu *P. ruminicola* 23 je vplival na zmanjšanje obsega in hitrost rasti, zato smo le pri tem sevu lahko določili koncentracijo IC<sub>50</sub>, ki je bila 80 mg/ml. Na sev *R. albus* 20455 je CIN vplival z zmanjšanjem obsega in hitrosti rasti ter hkrati s podaljšano fazo prilagajanja, pri sevu *R. flavefaciens* 007 S/6 pa je prišlo do zmanjšanja hitrosti in obsega rasti, le pri višjih koncentracijah pa tudi do podaljšanja faze prilagajanja. Podobno je CIN vplival tudi na sev *B. fibrisolvens* 3071<sup>T</sup>, le da se je tu zmanjšala zgolj hitrost rasti. Pri sevu *F. succinogenes* S85 je pri vseh koncentracijah prišlo le do podaljšanja faze prilagajanja. Najobčutljivejši na CIN je bil sev *P. ruminicola* 23, pri katerem je bil MIC 140 mg/ml, obseg in hitrost rasti pa sta bila zmanjšana že pri koncentraciji 60 mg/ml. Na CIN najodpornejši je bil *R. flavefaciens* 007 S/6 z MIC 600 mg/ml, sledila sta *P. bryantii* B<sub>14</sub> (MIC = 360 mg/ml) ter *F. succinogenes* S85, pri katerem je bil MIC 310 mg/ml, nižje koncentracije CIN pa so vplivale le na podaljšanje faze prilagajanja bakterij. MIC pri sevu *B. fibrisolvens* 3071<sup>T</sup> smo določili s pomočjo prvega dela poskusa in je bil 320 mg/ml. Koncentraciji 310 in 280 mg/ml sta vplivali na podaljšanje faze prilagajanja in zmanjšano hitrost rasti, druge nižje koncentracije inhibitorja pa so, kot je razvidno s slike 12, zgolj upočasnile bakterijsko rast. Koncentracijo IC<sub>50</sub> smo lahko določili le pri sevu *P. ruminicola* 23 in je bila 80 mg/ml.



Slika 11: Rast seva *P. bryantii* B<sub>14</sub> (PB) v prisotnosti različnih koncentracij dialil sulfida (GAR)



Slika 12: Rast seva *B. fibrisolvens* 3071<sup>T</sup> (BF) v prisotnosti različnih koncentracij cinamaldehida (CIN)



Slika 13: Rast seva *P. ruminicola* 23 (PR) v prisotnosti različnih koncentracij cinamaldehida (CIN)

Način inhibicije rasti pri eugenolu je bil podoben kot pri cinamaldehydu, vendar so bili v primerjavi s cinamaldehydom na eugenol odpornejši vsi izbrani sevi. MIC pri najbolj občutljivem in najodpornejšem sevu, *P. ruminicola* 23 in *R. flavefaciens* 007 S/6, je bil več kot dvakrat višji kot pri cinamaldehydu, in sicer 340 mg/l ter 1260 mg/ml. Sicer je eugenol pri *P. brianthii* B<sub>14</sub> podaljšal fazo prilagajanja ter zmanjšal obseg in hitrost rasti, pri sevu *P. ruminicola* 23 pa je inhibiral le hitrost rasti. Na seva *R. albus* 20455 ter *B. fibrisolvans* 3071<sup>T</sup> je eugenol vplival z inhibicijo tako obsega kot tudi rasti, pri višjih koncentracijah pa se je podaljšala tudi faza prilagajanja. Pri drugem ruminokoku (*R. flavefaciens* 007 S/6) je pri vseh koncentracijah EVG prišlo do inhibicije hitrosti rasti in pri višjih koncentracijah tudi do podaljšanja faze prilagajanja. Pri sevu *F. succinogenes* S85 je prišlo do podaljšanja faze prilagajanja in zmanjšanja obsega bakterijske rasti.

V preglednici 6 smo povzeli MIC in IC<sub>50</sub> za vse učinkovine in seve, pri katerih smo omenjene parametre lahko določili. Koncentracije smo potrebovali v nadaljevanju poskusa, kjer smo želeli ugotoviti, ali so se bakterije zmožne prilagoditi na določeno učinkovino, in če so se, ali adaptacijo tudi ohranijo.

Preglednica 6: Koncentracije MIC in IC<sub>50</sub>, za vse preučevane seve in krmne dodatke

	MON	Das	CIN	EVG
<i>P. bryantii B<sub>14</sub></i>	MIC = 100 µM IC <sub>50</sub> = 20-40 µM		MIC = 360 mg/l IC <sub>50</sub> = /	MIC = 580 mg/l IC <sub>50</sub> = /
<i>P. ruminicola 23</i>	MIC = 12,5 µM IC <sub>50</sub> = 0,05-0,1 µM		MIC = 140 mg/l IC <sub>50</sub> = 80 mg/l	MIC = 340 mg/l IC <sub>50</sub> = /
<i>R. albus 20455</i>	MIC = 1,56 µM IC <sub>50</sub> = 0,20 µM			MIC = 600 mg/l IC <sub>50</sub> = /
<i>R. flavefaciens 007 S/6</i>	MIC = 3,12 µM IC <sub>50</sub> = 0,39 - 0,78 µM		MIC = 600 mg/l IC <sub>50</sub> = /	
<i>B. fibrisolvans 3071<sup>f</sup></i>	MIC = / IC <sub>50</sub> = 20-40 µM			MIC = 980 mg/l IC <sub>50</sub> = /
<i>F. succinogenes S85</i>	MIC = 0,78 µM IC <sub>50</sub> = 0,1 µM		MIC = 310 mg/l IC <sub>50</sub> = /	MIC = 920 mg/l IC <sub>50</sub> = /

\* Senčena polja predstavljajo kombinacije tistih sevov in inhibitorjev, kjer ni bilo mogoče določiti nobene izmed omenjenih koncentracij.

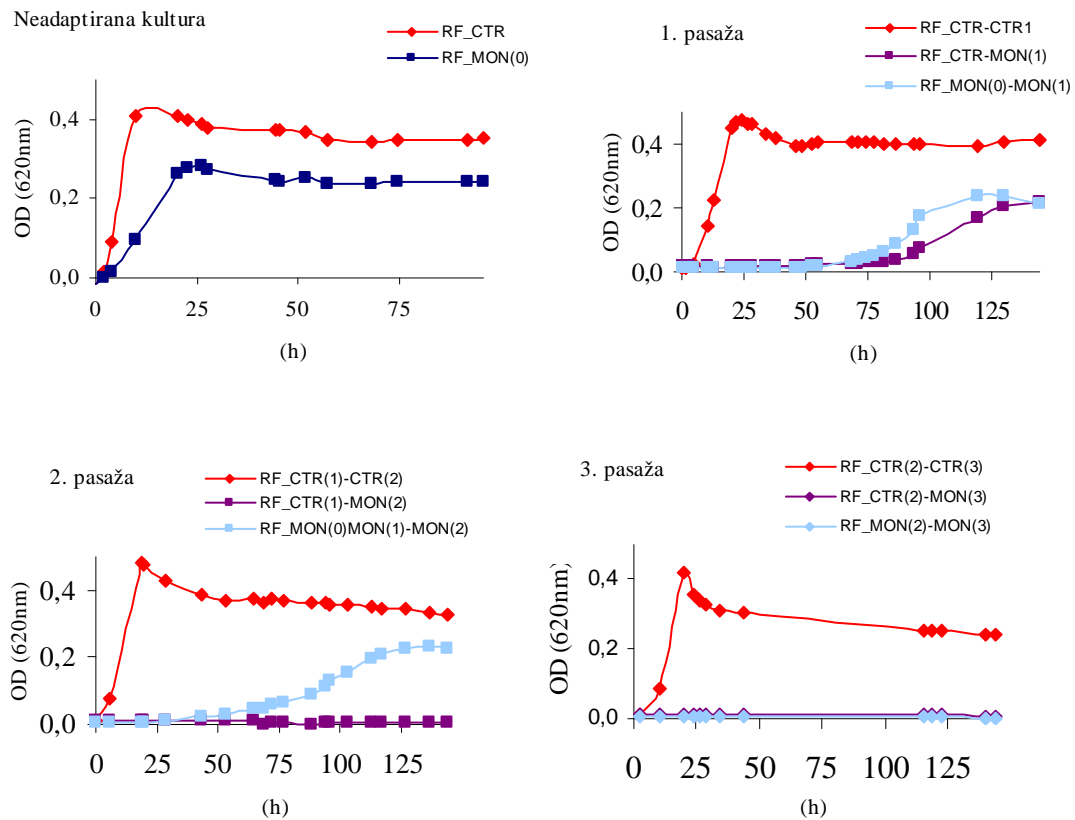
#### 4.1.3. Adaptacija izbranih sevov na preučevane učinkovine

Pri preučevanju adaptacijskih sposobnosti na izbrane učinkovine smo se osredotočili le na dva seva, in sicer *P. ruminicola 23* in *R. flavefaciens 007 S/6*, torej na en po Gramu negativen in en po Gramu pozitiven sev. Izbrali smo dve učinkovini, in sicer antibiotik monenzin ter rastlinski izvleček cinamaldehyd kot enega izmed možnih nadomestkov za antibiotike. Izhajali smo iz podatkov, pridobljenih v prvem in drugem delu poskusa.

##### 4.1.3.1. Poskus adaptacije seva *Ruminococcus flavefaciens 007 S/6*

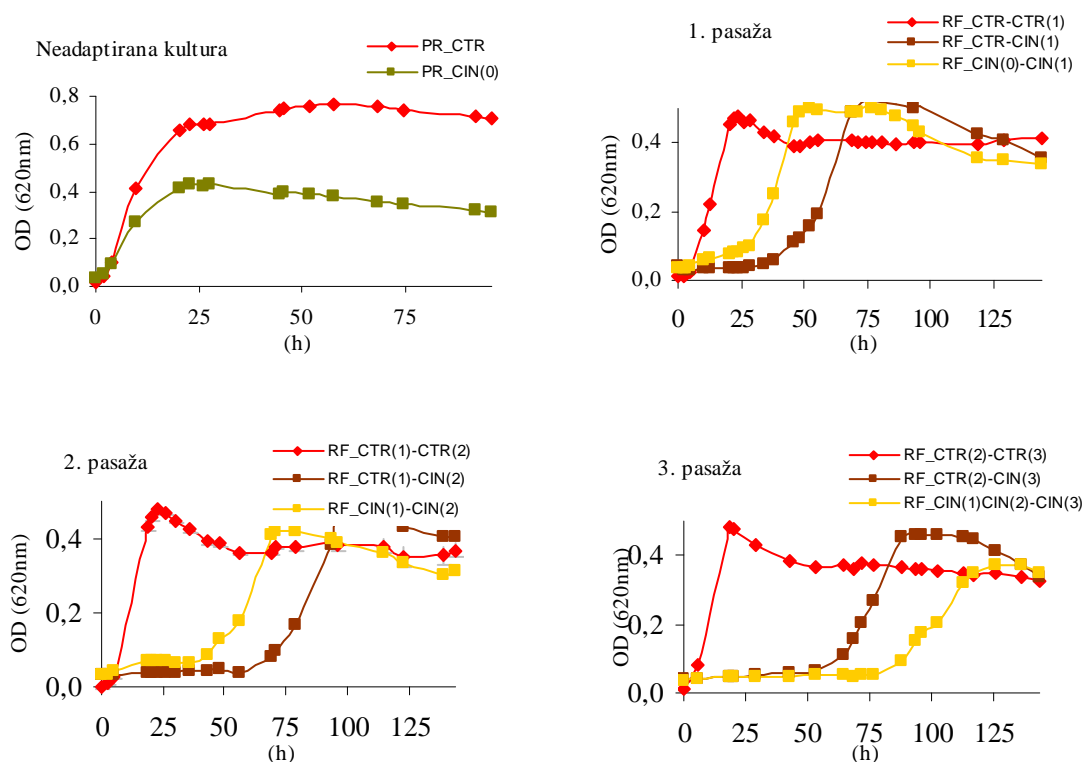
###### 4.1.3.1.1 Poskus adaptacije na monenzin

Izbrana začetna koncentracija za monenzin (MON0) je bila 0,78µM. V prvi pasaži smo tako kontrolni sev kot sev, ki je rasel v prisotnosti monenzina, precepili v gojišče z ustrežno višjo koncentracijo monenzina (MON1). Opazili smo istočasen pojav začetka rasti pri obeh sevih ter nekoliko večji obseg rasti pri poskusni različici seva. Pri drugi in tretji pasaži smo napravili podobno še za koncentraciji MON2 in MON3. Rast divjega (seva, ki je rasel brez prisotnosti inhibitorja) seva je bila pri koncentraciji MON2 že popolnoma inhibirana, poskusna različica pa je po približno 75 urah začela rasti. Pri koncentraciji MON3 je bila rast obeh sevov popolnoma inhibirana.



Slika 14: Grafični prikaz poskusa adaptacije na monenzin (MON) seva *R. flavefaciens* 007 S/6 (RF)

#### 4.1.3.1.2 Poskus adaptacije na cinamaldehyd



Slika 15: Grafični prikaz poskusa adaptacije na cinamaldehyd (CIN) seva *R. flavefaciens* 007 S/6 (RF)

Enako kot za monenzin smo ponovili še z rastlinskim izvlečkom cinamaldehydom. Izbrana začetna koncentracija (CIN0) je bila 80 mg/ml, vsaka naslednja (CIN1, CIN2 IN CIN3) pa je bila za 40 mg/ml višja od prejšnje. V vseh treh pasažah se je, kot kaže slika 15, tako pri divjem kot pri poskusnem sevu pojavila podaljšana faza prilagajanja (lag faza), nekoliko pa se je zmanjšala tudi hitrost rasti. Obseg rasti je bil pri obeh različicah približno enak kontrolnemu sevu. V prvi in drugi pasaži se je rast najprej začela pri divjem sevu, v tretji pasaži pa je prej začela rasti poskusna različica seva. Hitrost rasti je bila pri divjem sevu v tretji pasaži nekoliko manjša kot pri poskusni različici.

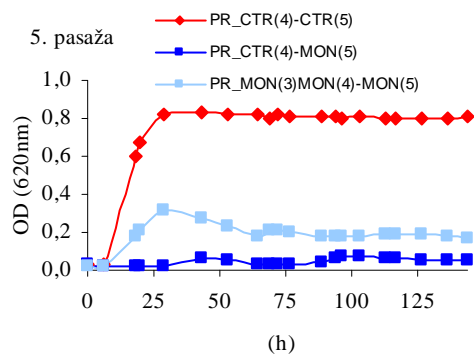
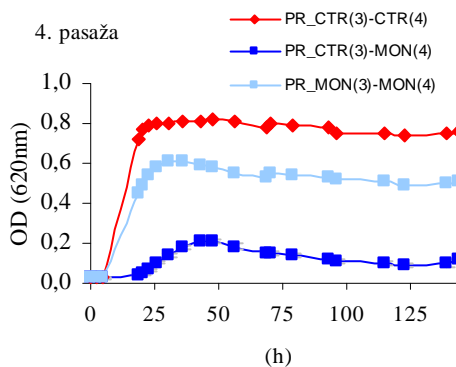
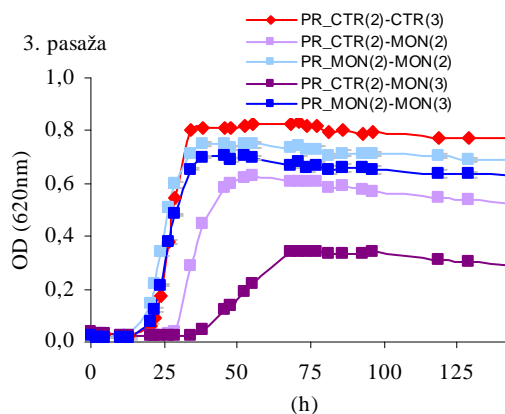
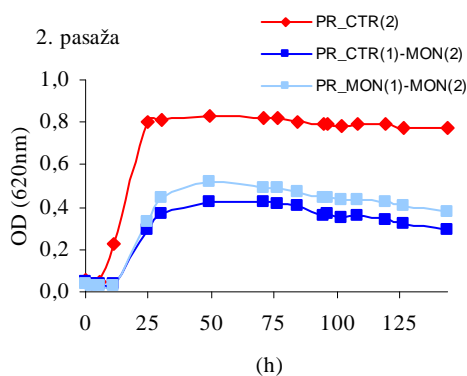
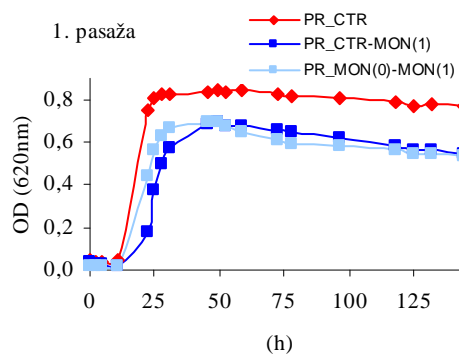
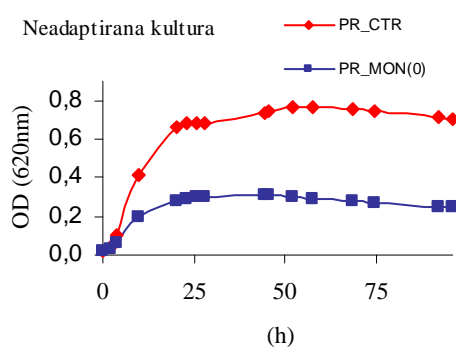
Rast poskusne različice se pri različnih koncentracijah učinkovin (monenzina in cinamaldehyda) ni bistveno razlikovala od rasti divjega seva, zato smo sklepali, da se sev



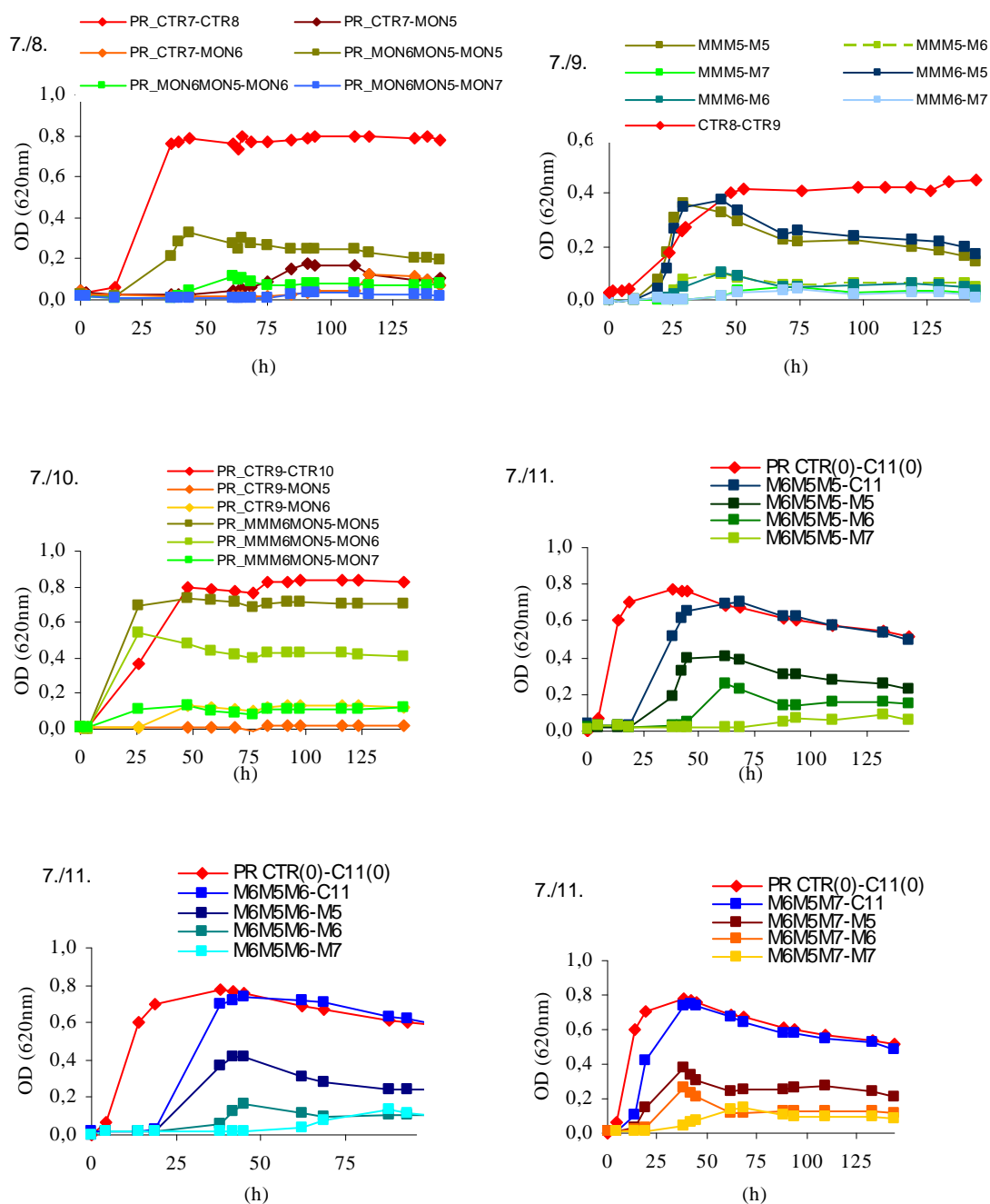
*Ruminococcus flavefaciens* 007 S/6 ni sposoben prilagoditi na povišane koncentracije uporabljenih učinkovin.

#### 4.1.3.2 Adaptacija seva *Prevotella ruminicola* 23

##### 4.1.3.2.1 Poskus adaptacije na monenzin



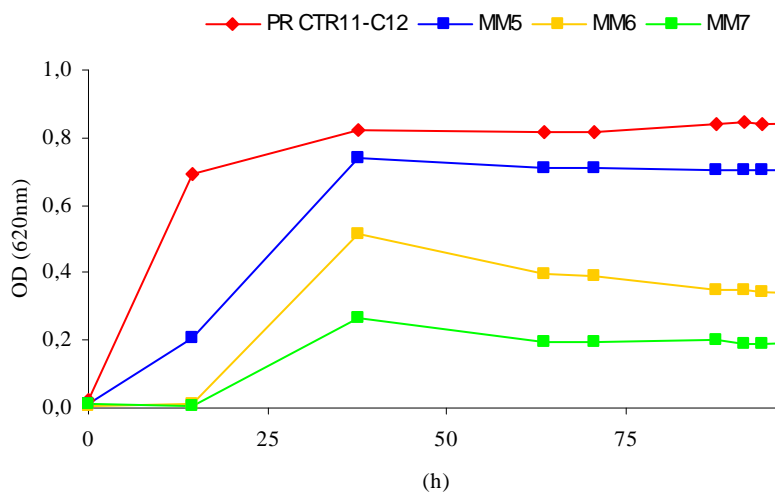




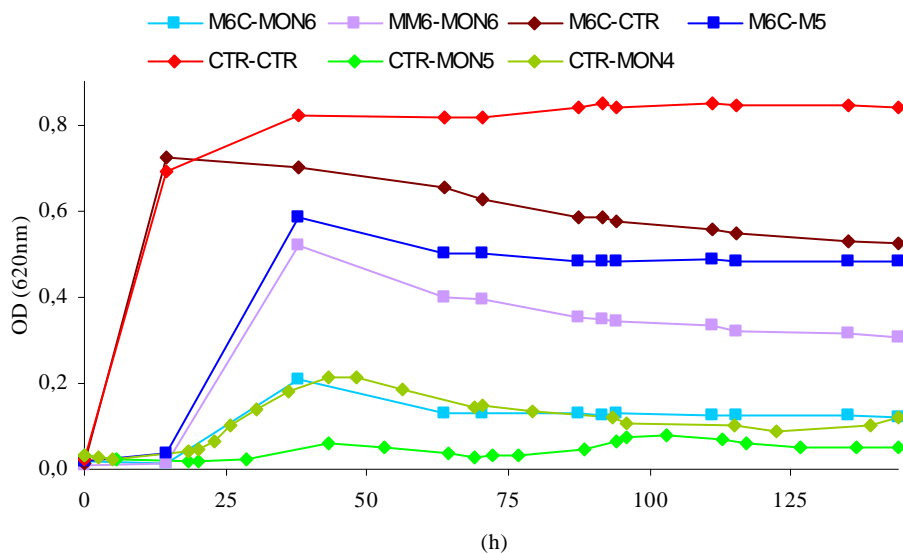
Slika 17: Grafični prikaz poskusa adaptacije na monenzin (MON) seva *P. ruminicola* 23 (PR) – vzgajanje treh različic adaptiranega seva

S slik 16 in 17 je razvidno postopno prilagajanje seva na različno visoke koncentracije monenzina. Pri visokih koncentracijah inhibitorja se je rast začela zmanjševati, zato smo pri naslednji pasaži sev precepili v gojišče z ustrežno nižjo koncentracijo monenzina ter v gojišče brez dodanega monenzina. Tako smo ohranili sev živ in dali kulturi še nekaj časa,

da se je prilagodila na povišano koncentracijo monenzina in je tako v naslednji pasaži lahko rasla pri višji koncentraciji. Različica MM5 je rasla dobro še pri koncentraciji 12,5  $\mu\text{M}$ , različica MM6 pri koncentraciji 25  $\mu\text{M}$  in različica MM7 pri koncentraciji 50  $\mu\text{M}$  (slika 18).



Slika 18: Rast sevov MM5, MM6, MM7 pri treh različnih koncentracijah monenzina (MON)

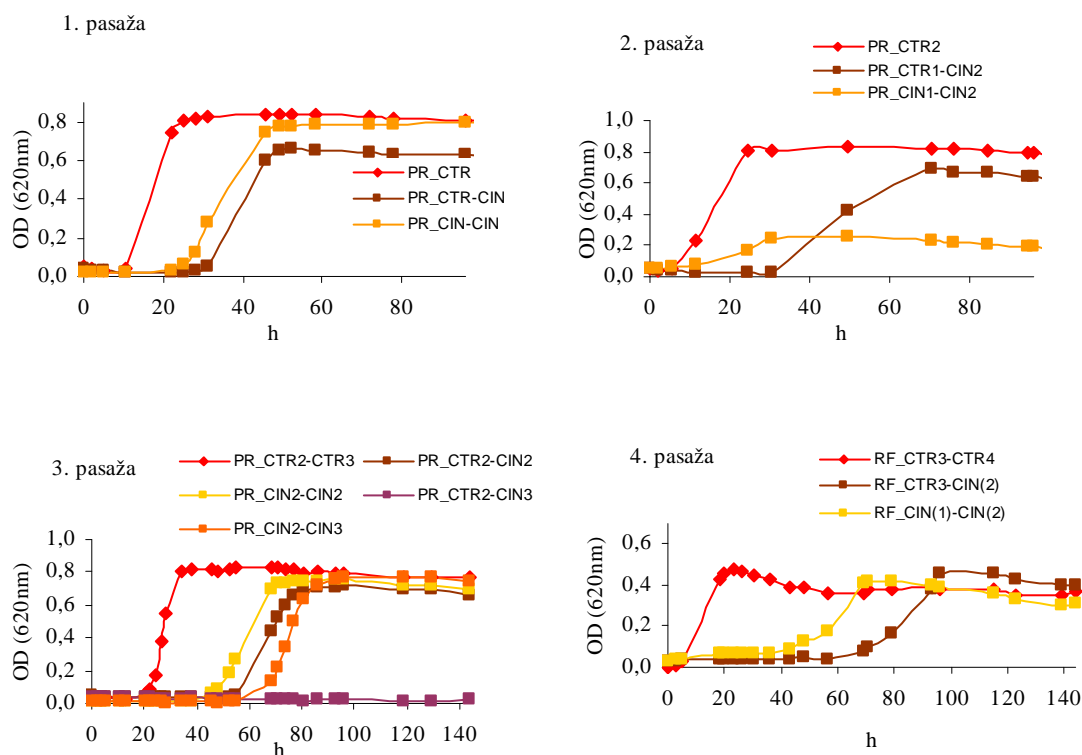


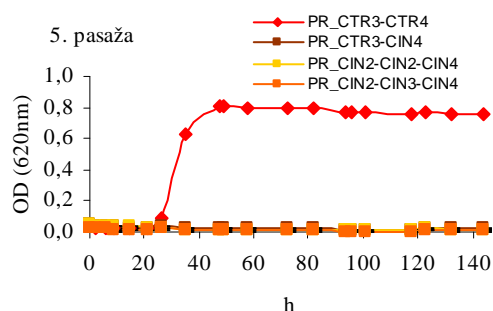
Slika 19: Rast divjega (CTR) in adaptiranega seva v gojiščih z monenzinom (MON) in brez njega

Želeli smo še preveriti, ali se adaptacija ohranja ali ne, zato smo sev MM6 precepljali v čisto gojišče brez dodatka monenzina. To različico seva smo poimenovali M6C. S slike 19 vidimo, da se je adaptacija tudi po nekajkratnem precepljanju v čisto gojišče ohranila. Sev M6C je dokaj dobro rasel pri koncentraciji monenzina 12,5  $\mu\text{M}$  (MON5), saj je dosegel okoli 75 odstotkov obsega rasti v primerjavi s sevom, ki je rasel v kontroli (M6C-CTR). Rasel je tudi pri koncentraciji 50  $\mu\text{M}$ , vendar bistveno slabše, saj je dosegel le okoli 1/3 obsega v primerjavi z adaptiranim sevom, ki je rasel v gojišču brez monenzina. Divji sev je rasel še pri koncentraciji monenzina 6,25  $\mu\text{M}$  (MON4), pri 12,5  $\mu\text{M}$  (MON5) pa je bila rast popolnoma inhibirana.

#### 4.1.3.2.2 Poskus adaptacije na cinamaldehyd

Pri preverjanju zmožnosti adaptacije seva *P. ruminicola* 23 na cinamaldehyd smo izbrali začetno koncentracijo cinamaldehyda 80 mg/l ( $\text{IC}_{50}$  koncentracija seva *P. ruminicola* 23 za CIN). Slika 20 prikazuje potek poskusa adaptacije seva na povišano koncentracijo cinamaldehyda.





Slika 20: Grafični prikaz poskusa adaptacije seva *P. ruminicola* 23 (PR) na povišano koncentracijo cinamaldehida (CIN)

V prvi pasaži sta divja in poskusna različica seva rasli podobno, pri drugem precepljanju pa je poskusna različica rasla presenetljivo bolje kot divji sev pri enaki koncentraciji inhibitorja. V tretji pasaži smo gojili dve poskusni različici, eno v koncentraciji, enaki kot v predhodni pasaži (CIN2), in eno v za 20 mg/l višji (CIN3). Divja seva smo gojili pri enakih koncentracijah. Obe poskusni različici in divji sev so pri koncentraciji CIN2 dosegli enak obseg rasti kot kontrolni sev, le faza prilagajanja je bila pri poskusnih sevih nekoliko daljša kot pri divjem. Divji sev pri koncentraciji CIN3 ni več kazal znakov rasti. Zaradi nasprotujočih si rezultatov 2. in 3. pasaže smo 2. pasažo ponovili še enkrat (4. pasaža) in ugotovili, da rastni krivulji poskusnega in divjega seva dosežeta podoben obseg rasti, faza prilagajanja pa je v primerjavi s kontrolo pričakovano podaljšana. V 5. pasaži smo gojili dve poskusni ter divjo različico seva pri koncentraciji CIN4 (160 mg/l), vendar je bila rast pri vseh treh popolnoma inhibirana. Ugotovili smo, da se sev *P. ruminicola* 23 na povišano koncentracijo cinamaldehida ni sposoben prilagoditi.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

V idealnih razmerah bi žival izkoristila vse zaužite hranljive snovi iz krme. V praksi izkoristek seveda ne more biti stodonten, kljub temu pa rejci težijo k čim boljšemu izkoriščanju (tako imenovani konverziji) krme. Na izboljšanje izkoriščanja krme in s tem povečanje prireje lahko vplivamo tudi z modifikacijo mikrobne populacije v vampu, saj tam poteka poglaviten del prebave pri prežvekovalcih. Do nedavnega je bil v svetu (predvsem ZDA) in tudi v Evropi eden najbolj poznanih in razširjenih krmnih dodatkov iz skupine tako imenovanih vampnih modifikatorjev ionoforni antibiotik monenzin. Kljub številnim pozitivnim učinkom monenzina na prirejo so njegovo uporabo v Evropski uniji zaradi strahu pred pojavom navzkrižne rezistence za prehranske namene prepovedali. Nadomestek krmnim antibiotikom so znanstveniki želeli poiskati med drugim v rastlinskih snoveh, saj je zdravilna moč rastlinskih učinkovin poznana že stoletja. McIntosh in sodelavci (2003) so tako poročali o inhibitornem učinku nekaterih esencialnih rastlinskih olj na rast številnih bakterijskih vrst. V našem poskusu smo preučevali vpliv ionofornega antibiotika monenzina ter treh možnih rastlinskih krmnih dodatkov (česnovoga dialil sulfida, cinamaldehida in eugenola) na šest izbranih bakterijskih sevov: *Prevotella ruminicola* 23<sup>T</sup>, *Prevotella bryantii* B<sub>14</sub>, *Butyrivibrio fibrisolvens* 3071<sup>T</sup>, *Ruminococcus albus* 20455, *Ruminococcus flavefaciens* 007 S/6 in *Fibrobacter succinogenes* S85. Izbrali smo tako seve z Gram-pozitivno (*R. albus*, *R. flavefaciens*) kot seve z Gram-negativno (*P. ruminicola* in *P. bryantii*, *F. succinogenes*) ultrastrukturo celične stene ter sev *B. fibrisolvens*, ki se po Gramu barva negativno, vendar ima strukturo po Gramu pozitivne celične stene. Izbrani sevi so v vampu pomembni s stališča razgradnje določenih substratov, tvorbe vodika oziroma zaradi svoje številčne zastopanosti. Pri sevu *P. bryantii* sta Callaway in Russel (1999) ugotovila pojav ultrarezistence na monenzin, zato smo želeli v naši nalogi preveriti tudi možnost pojava rezistence proti preučevanim učinkovinam pri katerem od preučevanih sevov. Poskuse v diplomski nalogi smo razdelili na tri dele. V prvem delu smo ugotavljali vpliv inhibitorjev v širšem koncentracijskem območju, v drugem delu pa vpliv v ožjem koncentracijskem območju na vseh šest izbranih sevov. V tretjem delu poskusa smo se osredotočili na dva seva, *P. ruminicola* 23 in *R. flavefaciens*

007 S/6, ter poskušali ugotoviti, ali sta se omenjena seva sposobna prilagoditi na povišano koncentracijo monenzina oziroma cinamaldehida.

### 5.1.1 Vpliv inhibitorjev rasti v širšem in ožjem koncentracijskem rangju na izbrane bakterijske seve

Preučevali smo vpliv vseh štirih preučevanih učinkovin na šest izbranih bakterijskih sevov. Posebnost poskusov, ki smo jih izvedli, je bila v načinu gojenja in spremljanju rasti preučevanih bakterij. Kolikor nam je znano, smo med prvimi gojili vampne bakterije v mikrotitrskih ploščah v anaerobni komori, v kateri smo tudi spremljali rast s čitalcem mikrotitrskih plošč pri 620 nm. Na tak način smo lahko spremljali rast večjega števila sevov in paralelno istočasno ter bolj pogosto opravljali meritve rasti. Ugotovili smo tri osnovne načine delovanja izbranih krmnih dodatkov, in sicer (i) podaljšanje faze prilagajanja bakterij na gojišče z višjo koncentracijo učinkovine, (ii) zmanjšanje obsega rasti ter (iii) zmanjšanje hitrosti rasti. Možne so bile tudi kombinacije med navedenimi učinki. V drugem delu poskusa smo poskušali določiti minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) učinkovin in koncentracije, ki do polovice zavrejo bakterijsko rast ( $IC_{50}$ ).

Ionoforni antibiotik **monenzin** je pri vseh sevih vplival na zmanjšanje obsega in hitrosti rasti, pri sevih *P. brianthii* B<sub>14</sub>, *R. albus* 20455 ter *F. succinogenes* S85 je pri nekaterih koncentracijah tudi podaljšal fazo prilagajanja, kar sta v svoji raziskavi ugotovila tudi Callaway in Russel (1999). Kot na monenzin najbolj občutljivejši sev se je v drugem delu poskusa pokazal *B. fibrisolvans* 3071<sup>T</sup>, katerega rast je bila popolnoma inhibirana že pri koncentraciji 0,1  $\mu$ M. Podobno trditev sta v svoji študiji podala tudi Russel in Strobel (1989). Zaradi načina inhibicije smo lahko pri vseh sevih določili koncentraciji MIC in  $IC_{50}$ . Glede na slednje se je kot najodpornější pokazal sev *P. brianthii* B<sub>14</sub>, ki je rasel še pri koncentraciji 100  $\mu$ M,  $IC_{50}$  pa je bila okoli 25  $\mu$ M. Odpornost bakterij na monenzin naj bi bila tesno povezana z zgradbo celične stene, saj sta Russel in Houlihan (2003) ugotovila večjo odpornost Gram-negativnih bakterij na monenzin, zato je presenetljivo, da se je kot drugi najmanj občutljiv sev izkazal *R. flavefaciens* 007 S/6 s pozitivno ultrastrukturo celične stene in z okoli 40-krat manjšo koncentracijo  $IC_{50}$  kot *P. brianthii* B<sub>14</sub>. Sledila sta seva *R. albus* 20455 (G-pozitiven,  $IC_{50}=0,20$   $\mu$ M) in *F. succinogenes* S85 (G-negativen,



IC<sub>50</sub>=0,10 µM) in nazadnje, nepričakovano, še sev *P. ruminicola* 23, katerega IC<sub>50</sub> je znašal med 0,05 in 1 µM. *F. succinogenes* S85 je prenehal rasti že pri koncentraciji monenzina (0,78 µM), kar ni v skladu z ugotovitvijo Russla in Strobla (1989), da naj bi slednji dobro rasel še pri koncentraciji 2,5 µM. Chen in Wolin (1979) sta dokazala, da se je faza prilagoditve pri sevu *F. succinogenes* s povišano koncentracijo monenzina podaljševala, kar smo delno ugotovili tudi v našem poskusu. Faza prilagoditve se je začela podaljševati pri koncentracijah 0,39 µM in 0,78 µM, vendar pa se pri koncentraciji 1,56 µM rast niti po 96 urah ni začela, zato ni verjetno, da bi pri daljšem opazovanju sev začel rasti.

Chen in Wolin (1979) sta poročala tudi o veliki občutljivosti bakterij iz rodu *Ruminococcus* na povišano koncentracijo monenzina. Pri obeh sevih naj bi bila rast pri 4 µM (2,5 mg/ml) popolnoma inhibirana. V našem poskusu se je pokazalo, da znaša minimalna inhibitorna koncentracija za *R. albus* 20455 1,56 µM, za *R. flavefaciens* 007 S/6 pa 3,12 µM.

Pri preučevanju vpliva česnovnega izvlečka **dialil sulfida** smo pri vseh sevih opazili le podaljšanje faze prilagajanja, zato nismo mogli določiti koncentracije IC<sub>50</sub>. Najodpornejši na Das je bil sev *R. flavefaciens* 007 S/6 (ki je bil tudi drugi najodpornejši na monenzin), pri katerem tudi pri najvišji koncentraciji (50000 mg/L) dialil sulfid ni vplival na rast. Sledili so sevi *P. bryantii* B<sub>14</sub>, *B. fibrisolvens* 3071<sup>T</sup> in *F. succinogenes* S85, še nekoliko manj odporen je bil *R. albus* 20455, najdaljšo fazo prilagajanja pa je imel sev *P. ruminicola* 23.

Pri **cinamaldehydu** in **eugenolu** smo pri ugotavljanju vpliva preučevanih učinkovin v širšem koncentracijskem območju opazili večinoma pri vseh sevih bipolaren učinek. Rast je bila bodisi popolnoma inhibirana, bodisi vpliva na rast sploh ni bilo. Sklepali smo, da imata tako cinamaldehyd kot eugenol precej ozko območje učinkovanja, zato smo v drugem delu poskusa testirali več vmesnih koncentracij. Ugotovili smo, da učinkovini na različne seve različno vplivata. Cinamaldehyd je pri sevih *P. bryantii* B<sub>14</sub>, *R. albus* 20455, *R. flavefaciens* 007 S/6 in *B. fibrisolvens* 3071<sup>T</sup> inhibiral obseg in hitrost rasti, pri nekaterih koncentracijah pa tudi podaljšal fazo prilagajanja bakterij. Najodpornejši na cinamaldehyd in eugenol je bil enako kot pri dialil sulfidu *R. flavefaciens* 007 S/6 z MIC 600 mg/ml, najobčutljivejši pa *P. ruminicola* 23, pri katerem smo lahko določili tudi koncentracijo

IC<sub>50</sub>, ki je bila okoli 80 mg/ml. Eugenol je učinkoval podobno kot cinamaldehyd, vendar pa so bili vsi sevi na eugenol v splošnem bolj odporni (zaradi enakih testiranih koncentracij smo primerjavo lahko napravili). Tudi pri eugenolu smo lahko določili IC<sub>50</sub> le za sev *P. ruminicola* 23. Koncentracija je znašala okoli 320 mg/ml.

### 5.1.2 Adaptacija vampnih bakterij na preučevane učinkovine

Znano je, da so nekatere vampne bakterijske vrste sposobne prilagoditve na povišane koncentracije različnih vrst inhibitorjev. Callaway in Russel (1999) sta poročala o pojavu na monenzin ultrarezistentne podpopulacije *P. brianii* B<sub>14</sub>. Številne bakterijske vrste, kot so *Clostridium sticklandii*, *Clostridium aminophilum*, *Streptococcus bovis*, *Prevotella brevis*, *Prevotella albensis*, *Butirivibrio fibrisolvens*, *Prevotella brianii*, *Prevotella ruminicola*, *Ruminococcus albus*, *Rumonococcus flavefaciens* in druge, naj bi bile sposobne razviti rezistenco tudi na učinkovine rastlinskih esencialnih olj (McIntosh in sod., 2003).

Občutljivost in rezistenca na antibiotike sta tesno povezana z zgradbo bakterijske celične stene (Russel in Strobel, 1989). Gram-negativne bakterijske vrste so običajno odpornejše na antibiotike kot Gram-pozitivne, vendar najdemo tudi med po Gramu negativnimi občutljivejše vrste, ki potrebujejo daljše obdobje prilagajanja, da razvijejo rezistenco (Chen in Wolin, 1979). Te trditve so potrdili tudi Newbold in sod. (1987), ki so ugotovili večjo občutljivost po Gramu pozitivnih sevov, pri čemer se je *R. flavefaciens* 007 pokazal kot izjema, saj je rasel pri koncentraciji, ki je bila stokrat višja od minimalne inhibitorne za starševski sev (adaptacija na tetronazin). Dawson in Boling (1983) sta spremljala vpliv monenzina na bakterije pri teletih in ugotovila, da je bilo skoraj 60 odstotkov bakterijske populacije rezistentne na monenzin pred začetkom dodajanja le tega v krmo in da je dodatek monenzina zanemarljivo povečal rezistentnost bakterijske populacije, kar kaže, da je odpornost na ionofore verjetno posledica fenotipskih značilnosti bakterijske celične stene (Russel in Houlihan, 2003).

V našem poskusu smo preučevali en po Gramu negativen (*Prevotella ruminicola* 23) in po Gramu pozitiven sev (*R. flavefaciens* 007 S/6) ter dve učinkovini, in sicer monenzin in

cinamaldehyd. V ZDA monenzin še danes s pridom uporabljajo, medtem ko je v EU od leta 2006 prepovedan, zato smo se odločili preučiti tudi delovanje rastlinskega izvlečka cinamaldehyda kot alternativno možnost uporabe monenzina. Za zgoraj omenjena seva in učinkovini smo se odločili tudi zato, ker smo v drugem delu poskusa le za ta seva in ti učinkovini lahko določili koncentracijo  $IC_{50}$  ter tako določili izhodiščne koncentracije pri vzgajanju adaptiranih različic sevov. Velja omeniti, da je imel sev *P. ruminicola* 23 obe koncentraciji  $IC_{50}$  (iz katerih običajno sklepamo na odpornost seva na določen inhibitor) nižji, in sicer za monenzin približno osemkrat nižjo in za cinamaldehyd okoli trikrat nižjo kot sev *R. flavefaciens* 007 S/6, čeprav ima slednji po Gramu pozitivno strukturo celične stene.

Med poskusom adaptacije smo ugotovili, da se sev *R. flavefaciens* 007 S/6 ni sposoben prilagoditi na povišano koncentracijo ionofornega monenzina, kar je v nasprotju s študijo Newbold in sod. (1987), ki so trdili, da se je omenjeni sev sposoben adaptirati na ionoforne antibiotike (adaptiral se je na tetronazin). *R. flavefaciens* 007 S/6 se prav tako ni uspelo adaptirati na povišano koncentracijo cinamaldehyda, kar so v svoji študiji ugotovili tudi McIntosh in sod. (2003).

V našem poskusu smo ugotovili tudi, da se sev *P. ruminicola* 23 prav tako ni adaptiral na povišano koncentracijo cinamaldehyda. McIntosh in sodelavci (2003) so ugotovili nasprotno, vendar pa je uporabljena mešanica esencialnih olj, ki so jo uporabili v poskusu vsebovala tudi druge učinkovine (timol, vanilin, eugenol, limonen), ne pa cinamaldehyda. Smo pa v skladu s študijo o pojavu na monenzin ultrarezistentne podpopulacije *P. brianthii* B<sub>14</sub> (Callaway in Russel, 1999) dokazali, da se je sev *P. ruminicola* 23 sposoben adaptirati na povišano koncentracijo monenzina.

Vzgojili smo tri na monenzin adaptirane različice seva *P. ruminicola* 23 oziroma tri podpopulacije omenjenega seva, ki smo jih poimenovali MM5, MM6 in MM7 in so rasle pri različno visokih koncentracijah monenzina. Podpopulacija MM5 je rasla pri 12,5  $\mu$ M (MON5), MM6 pri 25  $\mu$ M (MON6) in MM7 pri 50  $\mu$ M (MON7) monenzina. Najvišja koncentracija, pri kateri je rasel divji (neadaptiran) sev, je bila 6,25  $\mu$ M (MON4), kar smo ugotovili že v drugem delu poskusa, kjer smo določali minimalne inhibitorne koncentracije. Tudi pri poskusu adaptacije se je izkazalo, da znaša MIC za neadaptiran sev

*P. brianii* B<sub>14</sub> 12,5 µM. Adaptirana podpopulacija MM5 je torej rasla pri dvakrat višji koncentraciji, MM7 pri štirikrat višji koncentraciji in MM7 pri osemkrat višji koncentraciji monenzina, ki je še dopuščala rast pri neadaptirani varianti seva *P. ruminicola* 23. Ultrarezistentna populacija *P. brianii* 23, ki sta jo opisala Callaway in Russel (1999), je rasla pri 16-krat višji koncentraciji kot divji sev, kar je dvakrat več kot v primeru seva *P. ruminicola* 23.

Obseg rasti se je med tremi adaptiranimi variantami nekoliko razlikoval. MM5 v MON5 in MM6 v MON6 sta rasli zelo dobro, saj sta dosegli okoli 80 odstotkov obsega rasti v primerjavi s kontrolo. MM7, ki je rasla pri najvišji koncentraciji monenzina (pri MON8 je bila rast vseh sevov popolnoma inhibirana), je rasla nekoliko slabše. Dosegla je okoli 40 odstotkov obsega rasti v primerjavi s kontrolo. Slabša rast adaptiranega seva pri najvišji koncentraciji je dokaj pričakovana, saj ima monenzin pri visokih koncentracijah toksičen učinek na večino vampnih bakterij, tako Gram-pozitivnih kot Gram-negativnih (Nagaraja in Taylor, 1987). Poleg tega bakterije niso sposobne neomejene adaptacije na povišane koncentracije inhibitorja.

Bakterije smo med poskusom precepljali v stacionarni fazi, kjer se na videz s celicami ne dogaja veliko. To stanje je zgolj navidezno, saj prihaja, predvsem kadar je prisoten stresni faktor (na primer inhibitor rasti), do odmiranja nekaterih celic. Celice, ki preživijo, se na različne načine prilagodijo novim pogojem v okolju. Pride do oblikovanja številnih, med seboj fenotipsko različnih podpopulacij, katerih različni fenotipi so posledica različnih tipov mutacij (delecij, insercij, inverzij duplikacij) (Finkel, 2006; Zambrano in Kotler, 1996 cit. po Ferme in sod., 2008). Takšne podpopulacije običajno propadejo, razen v primeru, ko mutacija vodi do izboljšanja podpopulacije in ji tako nudi selekcijsko prednost (Hall, 1990; Torkelson in sod., 1997, cit. po Ferme in sod., 2008). Callaway in Russel (1999) sta ugotovila, da gre pri ultrarezistentni subpopulaciji *P. brianii* B<sub>14</sub> za spremembo v sestavi celične membrane. Podobno so za sev *P. albensis* M384, ki je bil rezistenten na ionoforni antibiotik tetonazin, ugotovili tudi Newbold in sod. (1992).

Ker smo tudi v našem poskusu želeli preveriti, ali se adaptacija ohranja, smo eno izmed adaptiranih variant (MM6) osemkrat precepili v gojišče brez dodatka inhibitorja. Ugotovili smo, da različica M6C, ki je rasla osem pasaj brez prisotnosti inhibitorja, še vedno raste

pri povišani koncentraciji monenzina, kar je v skladu s študijo o rezistenci *P. brianthii* B<sub>14</sub> na monenzin (Callaway in Russel, 1999). Obseg rasti variante M6C v MON6 v našem poskusu, ki smo ga izvajali na mikrotitrskih ploščah, je bil sicer le še okoli 35 odstotkov v primerjavi z adaptirano podpopulacijo MM6, vendar so Ferme in sod. (2008) v nadaljnji študiji ugotovili, da pri gojenju v »Hungate« epruветah M6C različica doseže okoli 75 odstotkov obsega rasti v primerjavi s kontrolo, kar je podoben obseg kot pri podpopulaciji MM6 pri koncentraciji MON6. Do razlike je verjetno prišlo zaradi tehničnih težav, saj pri mikrotitrskih ploščah lažje pride do izhlapevanja, možnost neizogibne eksperimentalne napake pa je zaradi manjših volumnov večja kot pri gojenju v »Hungate« epruветah.

Callaway in Russel (1999) sta za sev *P. brianthii* B<sub>14</sub> poročala o upadu rezistence ravno po osmih pasajah, kar kaže na fiziološko adaptacijo, in ne nujno na spremembo v genotipu, zato ne moremo zagotovo trditi, kaj bi se v našem primeru zgodilo s sevom *P. ruminicola* 23, če bi poskus nadaljevali. Kljub temu zaradi pojava treh različic seva, prilagojenih na različne koncentracije monenzina, sklepamo, da je bolj verjetno, da gre za tri med sabo genetsko različne bakterijske podpopulacije seva *P. ruminicola* 23.

## 5.2 SKLEPI

V sklopu diplomske naloge smo ugotovili, da:

- preučevane učinkovine, monenzin, dialil sulfid, cinamaldehyd in eugenol, vplivajo na rast bakterij tako, da zmanjšujejo obseg in/ali hitrost rasti bakterij oziroma podaljšujejo fazo prilagajanja (lag fazo) bakterij;
- česnov dialil sulfid pri vseh sevih podaljša fazo prilagajanja bakterij, na hitrost in obseg rasti pa ne vpliva, zato koncentracij MIC in IC<sub>50</sub> za ta izvleček pri nobenem sevu nismo mogli določiti;
- se pri preostalih učinkovinah (monenzinu, eugenolu in cinamaldehydu) pojavljajo vsi trije zgoraj omenjeni načine delovanja (ter kombinacije med njimi);
- imata eugenol in cinamaldehyd izredno ozko območje delovanja ter da so bili sevi v splošnem bolj odporni na eugenol kot na cinamaldehyd;

- sev *R. flavefaciens* 007 S/6 ni sposoben prilagoditve na povišano koncentracijo tako monenzina kot cinamaldehida;
- je sev *P. ruminicola* 23 sposoben prilagoditve na povišano koncentracijo monenzina v gojišču, na povišano koncentracijo cinamaldehida pa ne;
- tri fenotipsko različne podpopulacije seva *P. ruminicola* 23, ki smo jih z adaptacijo pridobili, rastejo pri treh različnih koncentracijah monenzina. Adaptirana podpopulacija MM5 pri dvakrat višji, adaptirana podpopulacija MM6 pri štirikrat višji in adaptirana podpopulacija MM7 pri osemkrat višji koncentraciji monenzina, kot je zadnja, pri kateri je še rasla divja različica seva;
- se adaptacija tudi po določenem času rasti seva brez prisotnosti inhibitorja ohranja.

## 6 POVZETEK

Prežvekovalci so skupina rastlinojedih sesalcev, ki je razvila posebno učinkovit način prebave voluminozne krme. Poglavitni del prebavnega trakta predstavlja štiridelni želodec, kjer (predvsem v vampu) poteka prebava hranljivih snovi s pomočjo mikroorganizmov in njihovih encimov. Najštevilnejši in hkrati za prebavo najpomembnejši predstavniki vampne mikrobne združbe so bakterije, poleg njih pa najdemo v vampu tudi številne glive, praživali, arheje in viruse. Mikrobna fermentacija je ključnega pomena pri razgradnji tistih hranljivih snovi, ki jih prežvekovalec z lastnimi encimi ni sposoben razgraditi, obenem pa predstavljajo poglavitni del njegovega obroka (strukturni ogljikovi hidrati). Glavni produkt mikrobne razgradnje so hlapne maščobne kisline, CO<sub>2</sub> in metan. Z modifikacijo metabolnih procesov v vampu lahko vplivamo na izkoriščanje krme in s tem na večjo prirejo. Z uporabo različnih, tako imenovanih vampnih modifikatorjev lahko posežemo neposredno v vampno mikrobno združbo. Kot izjemno učinkovit dodatek k prehrani so se pokazali ionoforni antibiotiki (monenzin), saj se je z dodajanjem le teh v krmo zmanjšalo zauživanje krme, medtem ko je prirast živali ostal enak ali se je celo povečal. Do prepovedi v Evropski uniji (januar 2006) je bil monenzin eden najbolj uporabljenih antibiotikov v prehrani prežvekovalcev, vendar so zaradi strahu pred pojavom navzkrižne rezistence njegovo uporabo v Evropi prepovedali. Alternativne učinkovine so znanstveniki začeli iskati v rastlinah in njihovih izvlečkih. V našem poskusu smo se osredotočili na tri rastlinske izvlečke, česnov dialil sulfid, cinamaldehyd in eugenol, ter za primerjavo na najbolj uporabljen ionoforni antibiotik – monenzin. Preučevali smo vpliv vseh štirih učinkovin na šest izbranih bakterijskih sevov: *Prevotella ruminicola* 23, *Prevotella bryantii* B<sub>14</sub>, *Butyrivibrio fibrisolvens* 3071<sup>T</sup>, *Ruminococcus albus* 20455, *Ruminococcus flavefaciens* 007 S/6 in *Fibrobacter succinogenes* S85, ki smo jih gojili v modificiranem M2-gojišču za vampne anaerobe z Bryantovo modifikacijo Hungatove tehnike za gojenje anaerobnih vampnih mikroorganizmov. V prvem in drugem delu poskusa smo ugotavljali vpliv inhibitorjev v širšem in ožjem koncentracijskem območju ter ugotovili tri osnovne načine delovanja le teh: podaljšanje faze prilagajanja (lag faze), zmanjšanje obsega rasti in zmanjšanje hitrosti rasti bakterij. Ionoforni antibiotik monenzin je pri vseh sevih vplival na zmanjšanje obsega in hitrosti rasti, podobno pa sta vplivala tudi cinamaldehyd in eugenol. Slednja dva sta imela zelo ozko območje delovanja, zato smo njune učinke lahko nekoliko

podrobneje preučevali le v drugem delu poskusa (ožje koncentracijsko območje). Sevi so bili v splošnem bolj odporni na eugenol kot na cinamaldehyd. Česnov dialil sulfid je na vse seve vplival s podaljšanjem faze prilagajanja bakterij. V tretjem delu poskusa smo ugotavljali možnost adaptacije sevov na povišane količine preučevanih učinkovin v gojišču. Izbrali smo le dva seva (*Prevotella ruminicola* 23 in *Ruminococcus flavefaciens* 007 S/6) ter dva inhibitorja (monenzin in cinamaldehyd), kjer smo pri obeh lahko določili tudi koncentraciji MIC in IC<sub>50</sub>. Ugotovili smo, da se sev *Ruminococcus flavefaciens* 007 S/6 ni sposoben prilagoditi na povišano koncentracijo monenzina in cinamaldehyda, prav tako se na povišano koncentracijo cinamaldehyda ni uspelo prilagoditi sevu *Prevotella ruminicola* 23. Slednji je razvil adaptacijo na povišano koncentracijo monenzina, pri čemer smo dobili tri različne podpopulacije, ki so rasle pri različni koncentraciji monenzina. Adaptirana podpopulacija MM5 je rasla pri dvakrat višji, adaptirana podpopulacija MM6 pri štirikrat višji in adaptirana podpopulacija MM7 pri osemkrat višji koncentraciji monenzina, kot je zadnja, pri kateri je še rasla divja različica seva. Ugotovili smo še, da se adaptacija tudi po večkratnem precepljanju v gojišče brez prisotnosti inhibitorja ohrani.



## 7 VIRI

- Amagase H., Petesch B.L., Matsuura H., Kasuga S., Itakura Y. 2001. Recent Advances on the Nutritional Effects Associated with the Use of Garlic as a Supplement. Intake of Garlic and Its Bioactive Components. American Society for Nutritional Sciences, 131: 955S–962S
- Akin D.E., Lyon.C.E., Windham W.R., Rigsby L.L. 1989. Physical degradation of lignified stem tissues by ruminal fungi. Applied and Environmental Microbiology, 55, 3: 611–616
- Ankri S., Mirelman D. 1999. Antimicrobial properties of allicin from garlic. Microbes and Infection, 2: 125–129
- Arakaki L.C., Stahringer L.C., Garret J.E., Dehority B.A. 2000. The effects of feeding monensin and yeast culture alone or in combination, on the concentration and generic composition of rumen protozoa in steers fed on low-pasture supplemented with increasing level of concentrate. Animal Feed Science and Tehnology, 84: 121–127
- Beck L. Cinnamon-December 2006's Featured Food. Leslie Beck, RD. Reliable information from Canada's leading nutritionist (dec. 2006). [http://www.lesliebeck.com/ingredient\\_index.php?featured\\_food=80](http://www.lesliebeck.com/ingredient_index.php?featured_food=80) (30. nov. 2008)
- Bryant M.P. 1972. Commentary on the Hungate technique for anaerobic bacteria. American Journal of Clinical Nutrition, 15: 1324–1328
- Burnham P.M. Cinnamaldehyde. The smell and flavour of cinnamon. University of Bristol. School of Chemistry. <http://www.chm.bris.ac.uk/motm/cinnamaldehyde/cinn.html> (20. okt. 2008)
- Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. International Journal of Food Microbiology, 94: 223–253
- Busquet M., Calsamiglia S., Ferrret A., Kamel C. 2005. Screening for effects of plant extracts and active compounds of plants on dairy cattle rumen microbial fermentation in a continuous culture system. Animal Feed Science and Tehnology, 123–124: 597–613
- Callaway T.R., Edrington T.S., Rychlik J.L., Genovese K.J., Pool T.L., Jung Y., Bischoff K.M., Anderson R.C., Nisbet D.J. 2003. Ionophores: Their use as ruminant growth promotants and impact on food safety. Current Issues in Intestinal Microbiology, 4: 43–51
- Callaway T.R., Russel J.B. 1999. Selection of a Highly Monensin-Resistant *Prevotella Bryantii* Subpopulation with Altered Outer Membrain Characteristic. Applied and Environmental Microbiology, 65, 11: 4753–4759

- Cestnik V., Pogačnik A., Fazarinc G. 2004. Fiziologija z anatomijo domačih živali. Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta: 89–98
- Chen M., Wolin M.J. 1979. Effect of monensin and lasalocid-sodium on the growth of methanogenic and rumen saccharolytic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 38, 1: 72–77
- Cotta M.A., Hespell R.B. 1986. Proteolytic activity of the ruminal bacterium *Butirivibrio fibrisolvens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 52, 1: 51–58
- Cowan M.M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12: 564–582
- Dawson K.A., Boling J.A. 1983. Monensin resistant bacteria in the rumens of calves on monensin-containing and unmedicated diets. *Applied and Environmental Microbiology*, 46, 1: 160–164
- Dehority B.A. 1977. Cellulolytic Cocci isolated from the Cecum of Guinea Pigs (*Cavia porcellus*). *Applied and Environmental Microbiology*, 33, 6: 1278–1283
- Digestive Anatomy in Ruminants. 2003. Hypertexts for biomedical sciences (23. nov. 2003).  
[http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/digestion/herbivores/rumen\\_anat.html](http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/digestion/herbivores/rumen_anat.html)  
(23. okt. 2008)
- Ferme D. 2008. Vpliv izvlečkov česna in cimeta ter kostanjevih taninov na strukturo mikrobne združbe iz prebavnega trakta prežvekovalcev in kuncev. Doktorska disertacija. Domžale, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za zootehniko: 261 str.
- Gill A.O., Holley R.A. 2004. Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* of eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 10: 5750–5755
- Gill A.O., Holley R.A. 2006. Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. *International Journal of Food Microbiology*, 111: 170–174
- Gustafson R.H., Bowen R.E. 1997. Antibiotic use in animal agriculture. A review. *Journal of Applied Microbiology*, 83: 531–541
- Helander I.M., Alakomi H.L., Latva-Kala K., Sandholm T.M., Pol I., Smid E.J., Gorris L.G.M., von Wright A. 1998. Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 46, 9: 3590–3595

- Hespe R.B., Akin D.E., Dehority A. 1997. Bacteria, Fungi, and Protozoa of the Rumen. V: Gastrointestinal microbiology. Vol. 1, Gastrointestinal ecosystems and fermentations. Mackie R.I. (ed.). New York, Chapman & Hall: 59–103
- Hobson P.N. 1997. Introduction. V: The rumen microbial ecosystem. 2<sup>nd</sup> edition. Hobson P.N., Stewart C.S. (eds.). London, Blackie Academic & Professional: 1–9
- Jouany J.P., Moragavi D.P. 2007. Use of natural products as alternatives to antibiotic feed additives in ruminal production. *The Animal Consortium*, 1, 10: 1443–1466
- Kahn C.M., Line S., Aiello S.E. 2006. *The Merck Veterinary Manual*. 9th edition. New Jersey, Merck and Co.: 2712 str.
- Kepler C.R., Hirons K.P., McNeill J.J., Tove S.B. 1966. Intermediates and products of biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens* A38. *The Journal of Biological Chemistry*, 241, 6: 1350–1354
- Klieve A.V., Bain P.A., Yokoyama M.T., Ouwerkerk D., Forster R.J., Turner A.F. 2004. Bacteriophages that infect the cellulolytic ruminal bacterium *Ruminococcus albus* AR67. *Letters in Applied Microbiology*, 38: 333–338
- MacDonald P. 1995. *Animal nutrition*. New York, J. Wiley and Sons: 607
- Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 2003. *Brock Biology of Microorganisms*. 10<sup>th</sup> edition. Upper Saddle River, Prentice Hall: 1019 str.
- McIntosh F.M., Williams P., Losa R., Wallace R.J., Beaver D.A., Newbold C.J. 2003. Effects of Essential Oils on Ruminal Microorganisms and Their Protein Metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 8: 5011–5014
- Morris E.J., Cole O.J. 1987. Relationship between cellulolytic activity and adhesion to cellulose in *Ruminococcus Albus*. *Journal of General Microbiology*, 133, 4: 1023–1032
- Mountfort D.O., Asher R.A. 1989. Production of xylanase by the ruminal anaerobic fungus. *Applied and Environmental Microbiology*, 49: 1324–1322
- Nagaraja T.G., Newbold C.J., Van Nevel C.J., Demeyer D.I. 1997. Manipulation of ruminal fermentation. V: The ruminal microbial ecosystem. Hobson P.N., Stewart C.S. (eds.) 2nd edition. London, Blackie Academic and Professional, an imprint of Chapman and Hall: 523–632
- Nagaraja T.G., Taylor M.B. 1987. Susceptibility and resistance of ruminal bacteria to antimicrobial feed additives. *Applied and Environmental Microbiology*, 53: 1620–1625

- Newbold C., Wallace R.J., Watt N.D., Richardson A.J. 1987. Effect of the novel ionophore tetronasin (ICI 139603) on ruminal microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 2: 544–547
- Newbold C., Wallace J.R., Watt N.D. 1992. Properties of ionophore-resistant *Bacteroides rumenicola* enriched by cultivation in the presence of tetronasin. *The Journal of Applied Bacteriology*, 72, 1: 65–70
- Nikaido H., Nakae T. 1979. The outer membrane of Gram-negative bacteria. *Advances in Microbial Physiology*, 20: 164–251
- Orešnik A., Kermauner A. 2002. Splošna prehrana živali. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za zootehniko: 40–74
- Pressman B.C. 1976. Biological applications of ionophores. *Annual Review of Biochemistry*, 45: 501–530
- Rivlin R.S. 2001. Recent Advances on the Nutritional Effects Associated with the Use of Garlic as a Supplement. Historical perspective on the Use of Garlic. *The Journal of Nutrition*, 131: 951–954
- Russel J.B., Dombrowski D.B. 1980. Effect of pH on the growth of rumen bacteria in continuous culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 39: 604–610
- Russel J.B., Houlihan A.J. 2003. Ionophore resistance of ruminal bacteria and its potential impact on human health. *FEMS Microbiology Reviews*, 27: 65–74
- Russel J.B., Strobel H.J. 1989. Effect of ionophores on ruminal fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 55: 1–6
- Saupe J. 1994. *Naravni zdravnik*. Ljubljana, Slovenska knjiga: 272 str.
- Schwab C.H. 1995. Protected proteins and amino acids for ruminants. V: *Biotechnology in Animal Feeds and Animal Feeding*. Wallace R.J., Chesson A. (eds.). New York, VCH Publishers: 115–141
- Shah H.N., Collins D.M. 1990. *Prevotella*, a New Genus To Include *Bacteroides melaninogenicus* and Related Species Formerly Classified in the Genus *Bacteroides*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 40, 2: 205–208
- Stewart C.S., Duncan S.H. 1985. The effect of avoparicin on cellulolytic bacteria of the ovine rumen. *Journal of General Microbiology*, 131: 427–435
- Stewart C.S., Duncan S.H., McPherson C.A., Richardson A.J., Flint H.J. 1990. The implications of the loss and regain of cotton-degrading activity for the degradation of straw by *Ruminococcus flavefaciens* strain 007. *Journal of Applied Bacteriology*, 68: 349–356

- Stewart C.S., Flint H.J., Bryant M.P. 1997. The rumen bacteria. V: The rumen microbial ecosystem. 2<sup>nd</sup> edition. Hobson P.N., Stewart, C.S. (eds.). London, Blackie Academic & Professional: 10–72
- Špringer J. 2003. Klinčevc, dišeči (*Syzygium aromaticum*). Pomurske lekarne (mar.2003). <http://www.pomurske-lekarne.si/si/index.cfm?id=1516> (30. okt. 2008)
- Štuhec I. 1997. Etologija domačih živali. Domžale, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za zootehniko: 53 str.
- The Gram Stain, 2007. Microbiologybytes. <http://www.microbiologybytes.com/video/Gram.html> (23. okt. 2008)
- Van Nevel C.J., Demeyer D.I. 1977. Effect of monensin on rumen metabolisem *in vitro*. Applied and Environmental Microbiology, 34: 251–257
- Wallace R., Mckain N., Broderick G.A., Rode L.M., Walker N.D., Newbold C.J., Kopečný J. 1997. Peptidases of the Rumen Bacterium *Prevotella Ruminicola*. Anaerobe, 3: 35–42
- Wallace R.J., Arthaud L., Newbold C.J. 1994. Influence of *Yucca schidigera* on ruminal ammonia concentrations and ruminal organisms. Applied and Environmental Microbiology, 60: 1762–176
- Westley J.W. 1983. Notation and clasification V: Polyether Antibiotics. Westley J.W. (ed.) New York, Marcel Dekker: 1–20
- Wikimedia Commons. 2007a. Chemical structure of Eugenol (mar. 2007). [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Eugenol\\_acsv.svg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Eugenol_acsv.svg) (23. okt. 2008)
- Wikimedia Commons. 2007b. Structure of Monensin A metyl ester. [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Monensin\\_A\\_metyl\\_ester.png](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Monensin_A_metyl_ester.png) (23. okt. 2008)
- Wollin M.J., Miller T.L. 1988. Microbe interactions in the rumen microbial ecosystem.V: The Rumen Microbial Ecosystem. Hobson P.N. (ed). New York, Elsevier Applied Science: 343–359
- Žgajnar J. 1990. Prehrana in krmljenje goved. Ljubljana, Kmečki glas: 564 str.

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se vsem, ki so kakorkoli sodelovali pri izdelavi diplomske naloge. Posebej pa bi se zahvalila prof. dr. Gorazdu Avguštinu in Darji Ferme, za vso pomoč in podporo.