

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Peter ZAJC

**VPLIV EVGENOLA NA NEKATERE FENOTIPSKE ZNAČILNOSTI
IZBRANIH BAKTERIJSKIH SEVOV IZ VAMPA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**EFFECTS OF EUGENOL ON SOME PHENOTYPIC
CHARACTERISTICS OF SELECTED BACTERIAL STRAINS FROM
RUMEN**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2007

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija kmetijstva – zootehnike. 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: prof. dr. Romana MARINŠEK-LOGAR

Komisija za oceno in zagovor:

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

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

Član: prof. dr. Romana MARINŠEK-LOGAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

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

Peter Zajc

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 579(043.2)=863
KG mikrobiologija/bakterije/vamp/rastlinski izvlečki/evgenol
KK AGRIS /
AV ZAJC, Peter
SA AVGUŠTIN, Gorazd (mentor)
KZ SI-1230 Domžale, Groblje 3
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
LI 2007
IN VPLIV EVGENOLA NA NEKATERE FENOTIPSE ZNAČILNOSTI
IZBRANIH BAKTERIJSKIH SEVOV IZ VAMPA
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP IX, 51 str., 11 pregl., 14 sl., 59 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Alternativa krmnim antibiotikom, ki so zaradi možnosti akumulacije v mleku in mesu prežvekovalcev ter razvoja širjenja bakterijskih rezistenc v EU prepovedani, so nadomestne snovi z ustreznim učinkom na vampno mikrobioto. Namen diplomskega dela je bil proučiti vpliv evgenola, t.j. izvlečka nageljnovih žbic (*Eugenia caryophyllata*), na fenotipske lastnosti izbranih bakterijskih sevov iz vampa. Proučevali smo vpliv evgenola na hitrost in obseg mikrobne rasti z ugotavljanjem optične gostote in pH bakterijskih kultur, koncentracije celičnih proteinov po Lowryju, ugotavljanjem nastajanja kratkoverižnih maščobnih kislin in vodika. Ugotovili smo, (i) da evgenol v nižji koncentraciji (100 mg/l) nima vpliva na celično rast in mikrobno aktivnost izbranih sevov, (ii) v višjih koncentracijah (750 in 1000 mg/l) pa popolnoma inhibira celično rast in mikrobno aktivnost izbranih sevov. Pri sevu *R. flavefaciens* 007 S/6 smo poleg tega ugotovili delno inhibitoryn učinek evgenola s koncentracijo 500 mg/l. Za sev *R. albus* 20455 je bila ta koncentracija popolnoma inhibitorna, pri drugih sevih pa vpliva srednje koncentracije nismo ugotavljali.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 579(043.2)=863
CX microbiology/bacteria/rumen/plant extracts/eugenol
CC AGRIS /
AU ZAJC, Peter
AA AVGUŠTIN, Gorazd (supervisor)
PP SI-1230 Domžale, Groblje 3
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Zootechnical department
PY 2007
TI EFFECTS OF EUGENOL ON SOME PHENOTYPIC CHARACTERISTICS OF
SELECTED BACTERIAL STRAINS FROM RUMEN
DT Graduation thesis (University studies)
NO IX, 51 p., 11 tab., 14 fig., 59 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The alternative to feed antibiotics, banned in EU due to possible accumulation in milk and meat products from ruminants, and to the possible expansion of antibiotic resistances, are surrogate substances exerting appropriate effects on microbial population in rumen. The aim of this work was to study the effect of eugenol, i.e. the extract of cloves (*Eugenia caryophyllata*) on some phenotypic characteristics of selected ruminal bacterial strains. The rate and extent of microbial growth was studied by assessment of optical density and pH, Lowry method for the determination of total cell protein concentration, and estimation of produced short chain fatty acids and hydrogen. We concluded that (i) eugenol in lower tested concentration (100 mg/l) exerts no effect on cell growth and microbial activity of selected strains, but (ii) eugenol in higher tested concentration (1000 mg/l) completely inhibits cell growth and microbial activity of some of the selected strains. With the study of intermediate concentrations of eugenol, observed at two of the selected bacterial strains (*R. albus* 20455 and *R. flavefaciens* 007 S/6), we can conclude that (iii) eugenol in lower medium tested concentration (250 mg/l) exerts no effect on either of two, that (iv) eugenol in medium tested concentration (500 mg/l) exerts total inhibitory effect on *R. albus* 20455 but only partial inhibitory effect on growth and microbial activity of *R. flavefaciens* 007 S/6, and that (v) eugenol in higher medium tested concentration (750 mg/l) exerts total inhibitory effect on both.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Okrajšave in simboli	IX
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 POSEBNOST PREŽVEKOVALCEV	2
2.2 MIKROBNI SIMBIONTI V VAMPU	4
2.2.1 Vampne bakterije	5
2.2.2 Vampne arheje	6
2.2.3 Drugi vampni mikroorganizmi	7
2.3 METABOLNI PROCESI V VAMPU IN NJIHOV POMEN ZA PREŽVEKOVALCE	7
2.3.1 Presnova ogljikovih hidratov v vampu	8
2.3.2 Presnova dušika v vampu	9
2.3.3 Presnova maščob v vampu	11
2.3.4 Nastanek plinov	11
2.3.5 Metabolizem vitaminov	12
2.4 MANIPULACIJA VAMPNEGA METABOLIZMA	12
2.4.1 Cilji vampne modifikacije	13
2.4.2 Vampni modifikatorji	13
2.4.2.1 Rastlinski izvlečki	14
2.4.2.1.1 Evgenol	14
3 MATERIAL IN METODE	19
3.1 MATERIAL	19
3.1.1 Bakterijski sevi	19
3.1.2 M2 gojišče	20
3.1.3 Evgenol	21
3.1.4 Pufri in raztopine	21
3.2 METODE	22
3.2.1 Gojenje čistih bakterijskih kultur	22
3.2.2 Dodajanje evgenola in inokulacija	22
3.2.3 Merjenje optične gostote	23

3.2.4	Merjenje pH	24
3.2.5	Ugotavljanje koncentracije celičnih proteinov po Lowryju	25
3.2.6	Ekstrakcija KMK in plinska kromatografija za njihovo določanje	26
3.2.6.1	Protokol za etrsko ekstrakcijo kratkoverižnih maščobnih kislin	
26		
3.2.7	Plinska kromatografija za ugotavljanje produkcije KMK in vodika	27
3.2.8	Statistična obdelava rezultatov s Studentovim t-testom	28
3.2.9	Shema eksperimenta	28
4	REZULTATI	31
4.1	GOJENJE ČISTIH BAKTERIJSKIH KULTUR ZA UMERITEV RASTNIH KRIVULJ	31
4.2	RAST IZBRANIH BAKTERIJSKIH SEVOV V GOJIŠČIH Z IN BREZ EVGENOLA	32
4.2.1	Merjenje optične gostote	32
4.2.2	Merjenje pH	34
4.2.3	Ugotavljanje koncentracije celičnih proteinov po Lowryju	36
4.3	EKSTRAKCIJA KMK IN PLINSKA KROMATOLOGRAFIJA ZA DOLOČANJE VODIKA	38
4.3.1	Ugotavljanje koncentracije kratkoverižnih maščobnih kislin	38
4.3.2	Plinska kromatografija za določanje vodika	40
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	41
5.1	RAZPRAVA	41
5.2	SKLEPI	43
6	POVZETEK	45
7	VIRI	47
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Ključni podatki in lastnosti evgenola (Bremness, 1996)	15
Preglednica 2: Splošen pregled bakterijskih sevov uporabljenih v poskusu	19
Preglednica 3: Sestavine za modificirano anaerobno gojišče M2	20
Preglednica 4: Pregled in sestava pufrov in raztopin uporabljenih v poskusu	21
Preglednica 5: Kalibracijska raztopina št. 3 uporabljena pri plinski kromatografiji za ugotavljanje koncentracije KMK	21
Preglednica 6: Preglednica koncentracij izvlečka v prvem eksperimentu	22
Preglednica 7: Preglednica koncentracij izvlečka v drugem eksperimentu	23
Preglednica 8: Priprava umeritvene krivulje za merjenje koncentracij celičnih proteinov po Lowryju	26
Preglednica 9: Kontrolne točke posameznih faz celične rasti izbranih sevov	28
Preglednica 10: Tabela celokupnih koncentracij KMK pri izbranih sevih	39
Preglednica 11: Tabela razmerij parcialnih volumnov KMK pri izbranih sevih	40

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Prerez predželodcev (vamp, kapica, prebiralnik) in pravega želodca s strani (prirejeno po: Fibrolytic Ruminant Bacteria, 2006)	3
Slika 2: Plasti vampove vsebine in potovanje krme (prirejeno po: Basic physiology, 2006)	4
Slika 3: Proces razgradnje ogljikovih hidratov v vampu	9
Slika 4: Ruminohepatično kroženje amoniaka (Lavrenčič, 2002)	10
Slika 5: Razčlenjena strukturna formula molekule evgenola (Cvar, 1998)	16
Slika 6: Klinčevец (<i>Eugenia caryophyllata</i> , <i>Syzygium aromaticum</i> – staro ime) (Adams, 2006)	17
Slika 7: Shema eksperimenta	29
Slika 8: Rastne krivulje sevov	31
Slika 9: Rast (OD_{654}) v odvisnosti od časa za seve <i>P. ruminicola</i> 23 ^T , <i>P. bryantii</i> B ₁₄ , <i>B. fibrisolvans</i> 3071 ^T , <i>F. succinogenes</i> S85 pri dveh koncentracijah evgenola	32
Slika 10: Rast (OD_{654}) v odvisnosti od časa za seva <i>R. flavefaciens</i> 007 S/6 in <i>R. albus</i> 20455 pri treh koncentracijah evgenola	33
Slika 11: pH in rast (OD_{654}) v odvisnosti od časa za seve <i>P. ruminicola</i> 23 ^T , <i>P. bryantii</i> B ₁₄ , <i>B. fibrisolvans</i> 3071 ^T , <i>F. succinogenes</i> S85 pri dveh koncentracijah evgenola	34
Slika 12: pH in rast (OD_{654}) v odvisnosti od časa za seva <i>R. flavefaciens</i> 007 S/6 in <i>R. albus</i> 20455 pri treh koncentracijah evgenola	35
Slika 13: Koncentracija celičnih proteinov in rast (OD_{654}) v odvisnosti od časa za seve <i>P. ruminicola</i> 23 ^T , <i>P. bryantii</i> B ₁₄ , <i>B. fibrisolvans</i> 3071 ^T , <i>F. succinogenes</i> S85 pri nižji koncentraciji evgenola	36
Slika 14: Koncentracija celičnih proteinov in rast (OD_{654}) v odvisnosti od časa za seva <i>R. flavefaciens</i> 007 S/6 in <i>R. albus</i> 20455 pri nižjih koncentracijah evgenola	37

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A ₆₅₄	absorbanca pri valovni dolžini 654 nm
AK	aminokislina
BSA	goveji serumski albumin; angl. <i>bovine serum albumin</i>
DNK	deoksiribonukleinska kislina
KMK	kratkoverižna maščobna kislina; angl. <i>short chain fatty acid (SCFA)</i>
IC ₅₀	koncentracija snovi, ki zmanjša mikrobnost na polovico (angl. <i>half inhibitory concentration</i>). ledocetna kisl. očetna kislina brez prisotnosti vode; angl. <i>glacial acetic acid</i>
mg/l	miligram na liter
MK	maščobna kislina
ml	mililiter (10 ⁻³ litra)
mM	milimol
mOsm	miliosmol (osmol = mol·kg ⁻¹)
nm	nanometer (10 ⁻⁹ metra)
NPN	neproteinski dušik; angl. <i>non-protein nitrogen</i>
OD	optična gostota; angl. <i>optical density</i>
PBS	fosfatno zapufrena slana raztopina; angl. <i>phosphate-buffered saline</i>
ρ	gostota, masna koncentracija [kg/m ³]
RNK	ribonukleinska kislina
rpm	rotations per minute (število obratov v minuti)
RSCC	kontinuirana kultura, ki posnema vamp; angl. <i>rumen stimulating continuous culture system</i>
SS	suha snov
SV/ kg SS	surova vlaknina na kg suhe snovi
ut.%	utežni odstotek [w/v]
V	volumen [L]
VNC	živo, a se ne da gojiti; angl. <i>viable but not culturable</i>
vol.%	volumski delež [v/v]
μl	mikroliter (10 ⁻⁶ litra)
μm	mikrometer (10 ⁻⁶ metra)

1 UVOD

V predželodcih prežvekovalcev so značilne razmere, ki omogočajo hitro rast in razmnoževanje velikemu številu mikrobnih simbiotov. Ti so s svojimi encimi sposobni razgraditi celične stene rastlinskih celic. Večji del krme prežvekovalcev namreč predstavljajo polisaharidi, ki so zaradi β -glikozidnih vezi za gostitelja neprebavljivi in neizkoristljivi, njegovo preživetje in uspešnost produkcije pa omogočajo simbiotski vampni mikroorganizmi, ki razgrajujejo rastlinske polimere in jih pretvarjajo v kratkoverižne maščobne kisline. Te po absorpciji skozi steno vampa in distalnih delov prebavnega trakta dnevno krijejo približno 75 % energetskih potreb gostitelja. Poleg tega predstavljajo vampni simbionti tudi pomemben vir beljakovin in vitaminov, ki postanejo dostopni po lizi mikrobnih celic v siriščniku.

Pretvorba nizko kvalitetne krme v prehransko bogat proizvod je zaradi velikega števila različnih mikrobnih vrst s specifičnimi potrebami ter prehranskim sinergizmom zelo kompleksen proces. Vsakršne presnovne anomalije v vampu se odražajo na učinkovitosti produkcije živali. Iz tega razloga ter delno tudi z namenom zmanjšanja emisij toplogrednih plinov posegamo v vampni metabolizem in želimo s spreminjanjem sestave obroka, vplivanjem na apetit, predvsem pa z dodajanjem prehranskih dodatkov povečati učinkovitost pretvorbe krme in tako optimizirati produkcijo mleka, mesa ali volne. Neposredna modifikacija mikrobnega fermentacijskega vzorca je mogoča z uporabo t.i. vampnih modifikatorjev, vendar je zaradi kompleksnosti vampnega ekosistema njihovo delovanje dokaj slabo razumljeno.

Uporaba t.i. krmnih antibiotikov je zaradi nevarnosti akumulacije v mleku in mesu ter možnosti za razvoj bakterijskih rezistenc od 1.1.2006 v EU prepovedana, zato so evropski živinorejci prisiljeni uporabljati ne-antibiotične krmne dodatke, kot so probiotiki in encimi, alternativne krmne dodatke pa iščemo tudi med rastlinskimi izvlečki.

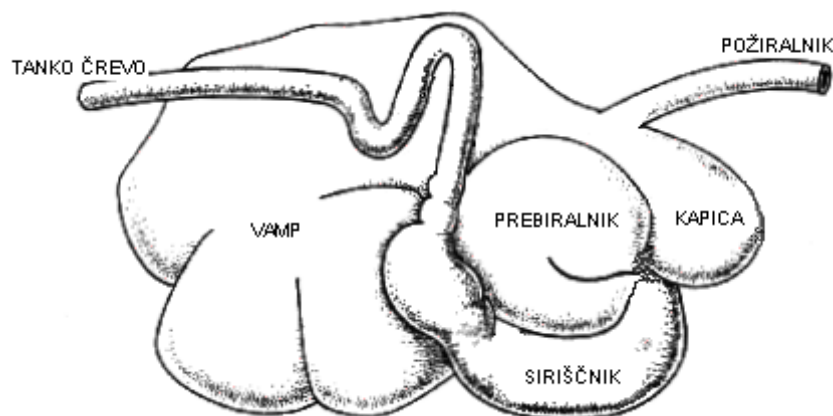
Namen tega diplomskega dela je bil proučiti vpliv evgenola, t.j. esencialnega olja nageljnovih žbic, na fenotipske lastnosti, kot so hitrost rasti, fermentativna tvorba maščobnih kislin in plinov ter tvorba celičnih beljakovin pri izbranih bakterijskih sevih iz vampa. Cilj naloge je bil ugotoviti na katere vrste vampnih mikroorganizmov, kako in v kakšni meri evgenol vpliva.

2 PREGLED OBJAV

2.1 POSEBNOST PREŽVEKOVALCEV

Prežvekovalci so rastlinojedi sesalci, ki imajo zaradi specifičnega načina prebave selektivno prednost pred tistimi rastlinojedi, ki slabše izrabljajo krmo bogato s celulozo in revno z beljakovinami (Ramšak, 2000). Moderni prežvekovalci (*Ruminantia*) so se v Afriki pojavili pred približno 2 milijonoma let. Danes poznamo 155 vrst, ki so razvrščene v šest družin: žirafe in okapi (*Giraffidae*), jeleni (*Cervidae*), vilorogi (*Antilocapridae*), goveda (*Bovidae*), pritlikavi pižmarji (*Tragulidae*) in polprežvekovalci (*Camelidae*) (Cestnik, 2004). Med evropske domače prežvekovalce sodijo drobnica, govedo, bivola in severni jelen, med avtohtone divje vrste pa so uvrščeni zober, gams, muflon, alpski in pirinejski kozorog, moškatno govedo, navadni jelen, srnjak, damjak, koza bezoarka in los.

Predželodci (*proventriculi*) so nežlezni del prebavnega trakta pred siriščnikom in so značilni za prežvekovalce. Tu se krma zadržuje dalj časa, z vračanjem krme v usta (regurgitacija) in prežvekovanjem (remastikacija) pa se učinkovito sklene krog mehansko-kemičnih procesov prebave (maceriranje, raztapljanje, gnetenje, mešanje, drobljenje, reinsalivacija ipd.). Daljši čas zadrževanja krme v predželodcih ima za posledico boljšo prebavljivost krme ter boljši izkoristek energije in večjo sintezo beljakovin ter vitaminov iz krme bogate s celulozo in revne z beljakovinami (Vatovec, 1971). Poleg mehanskih procesov prebave se v predželodcih vrši tudi mikrobna razgradnja strukturnih polisaharidov (celuloza, hemiceluloze, pektini idr.), ki so za encime gostitelja zaradi β -glikozidnih vezi nerazgradljivi, vsebina celic materiala krme pa zato neizkoristljiva. Poleg vampa poteka manjši del mikrobne prebave tudi v kapici (skupaj tvorita funkcionalno enoten prostor *reticulo-rumen*) ter debelem in slepem črevesu. T.i. sestavljeni želodec prežvekovalcev ima štiri dele: tri predželodce (vamp – *rumen*, kapica – *reticulum* in prebiralnik – *omasum*) ter siriščnik (*abomasum*) (Slika 1).



Slika 1: Prerez predželodcev (vamp, kapica, prebiralnik) in pravega želodca s strani (prirejeno po: Fibrolytic Ruminal Bacteria, 2005)

Glavnino predželodcev predstavlja vamp, ki zavzema večji del leve strani trebušne votline (ovca do 30, govedo do 230 litrov prostornine). Prežvekovalci krmo zauživajo relativno hitro, pri čemer jo le delno navlažijo s slino in požro. Sluznica predželodcev je nežlezna in posuta s papilami, ki povečajo absorpcijsko površino. V vampu se krma premeša z ostalo vsebino, kar omogočajo močne mišične kontrakcije vampa in kapice (*ruminatio*). Le te se sprožijo pod vplivom mehaničnih dražljajev grobih delcev (strukturna surova vlaknina), ki jih sprejemajo receptorji sluznice predželodcev. Pomanjkanje strukturne vlaknine v obroku bi onemogočilo procese prežvekovanja ter privedlo do zakisanja vampa (acidoza). Pomembno je tudi kopičenje plinov, ki se izločajo z izrigavanjem (*eructatio*). V vampu goveda nastane v eni uri okrog 30 l plinov (Orešnik in Kermauner, 2002). Stabilna anaerobna atmosfera vampa z nizkimi redoks potenciali je posledica aktivnosti vampnih simbiotov. Sestavlja jo 65 % CO₂, 26 % metana, 7 % dušika, vodik, vodikov sulfid v sledovih ter 0,5-1 % kisika (Hobson, 1997).

Prežvekovanje se začne okrog pol ure po zaužitem obroku, za sam proces pa žival porabi dobro tretjino dneva, pri čemer je prežvekovanje najpogostejše ponoči. Živali so tedaj dremave, vsakršno vznemirjenje pa sili v prekinitvev prežvekovanja. Vampna vsebina se med krmljenjem nalaga v plasteh (Slika 2), pri čemer se trdna in tekoča faza zaradi izmeničnega krčenja vampovih vreč mešata, vrhnja faza pa je plinasta in se sproti izrigava. Kontrakcije vampnega mišičja potekajo po določenem vrstnem redu in se ritemsko ponavljajo (Vatovec, 1971). Prežvekovanje zaužite krme, ki se po običajnem vzorcu ponovi do 500-krat dnevno, povzroči zmanjšanje delcev in povečanje površine delcev vampne vsebine, ki je na razpolago mikrobom (Mackie in sod., 2001).



Slika 2: Plasti vampove vsebine in potovanje krme (prirejeno po: Basic physiology, 2006)

Le dovolj majhnim delcem (<2 mm) je omogočen nadaljni prehod prežvečka (*bolus*) iz vampa naprej v kapico, prebiralnik in nato v siriščnik. V kapici je vsebina redkejša in tekoča, gmoto med gubami prebiralnika pa sestavljajo dobro zdobljeni deli krme, a je vsebina bolj suha (absorpcija odvečne vode). Zadostna količina zaužite vode je za procese v vampu izrednega pomena. Govedo namreč iz treh žlez dnevno izloča do 250 litrov sline (*saliva*). Ta kot bikarbonatno-fosfatni pufer (pH 8,4 do 8,6) vzdržuje optimalen pH anaerobnih predželodcev (pH 6,5 do 6,8). Slina sodeluje tudi pri hepatoruminalnem kroženju dušika (Orešnik in Kermauner, 2002).

2.2 MIKROBNI SIMBIONTI V VAMPU

Ključni del prebave pri prežvekovalcih je razgradnja strukturnih polisaharidov rastlinske krme, ki jo zagotovijo encimi mikrobnih simbiotov v predželodcih. Za mikrobnе simbiote je značilna visoka stopnja prilagojenosti na specifične življenske razmere, kot so relativno visoka temperatura, nevtralni pH, anaerobne razmere in intenzivnost biokemičnih procesov (Cestnik, 2004). Dobra polovica vse suhe snovi se prebavi v predželodcih (Orešnik in Kermauner, 2002). Od velikega števila različnih vampnih mikroorganizmov so nekateri le prehodni prebivalci. Ti prihajajo v vamp z neprestano inokulacijo iz različnih virov in so prisotni le v manjšem številu. Pogosto so to aerobni organizmi, ki s porabo kisika ustvarjajo anaerobne razmere v vampu. Večji del vampne mikrobiote predstavljajo stalni – indigeni mikroorganizmi, ki so lahko prostoplavajoči, naseljujejo rastlinske delce krme ali pa so pritrjeni na steno vampa (Mackie in sod., 2001).

Sintrofija oz. prehranski sinergizem vampnih simbiotov omogoča razgradnjo voluminozne krme, izgradnjo mikrobnih proteinov iz krmnih proteinov ali neproteinskega dušika, predvsem amoniaka kot prekursorja, sintezo vitaminov skupine B in K ter detoksikacijo fitotoksinov in mikotoksinov. Po drugi strani gostitelj z rednim krmljenjem ohranja visok nivo hranljivih snovi (10-18 % suhe snovi), termostatirano okolje (37-41°C), pH (6-7), osmoregulacijo (250-350 mOsm) ter odstranjuje inhibitorne produkte prebave (Mackie in sod., 2001). V retikulumu se mikrobi nenehno razmnožujejo in umirajo ter vzajemno preskrbujejo s svojimi metabolnimi produkti. Ko živijo, so ustvarjalci,

predelovalci in potrošniki hranljivih snovi, po smrti pa so po razgradnji v siriščniku hranljiva snov za gostitelja (Vatovec, 1971).

Razmere, ki pospešujejo razvoj ene skupine mikrobov, lahko zaradi kompeticije indirektno zavrejo rast druge. V glavnem pa metaboliti ene mikrobne skupine (nižje maščobne kisline, monosaharidi, amoniak, aminokisline idr.) predstavljajo hrano drugim (t.i. sintrofija, prehranski sinergizem oz. navzkrižno prehranjevanje; angl *cross-feeding*). Na ta način se mikrobi v svojih aktivnostih podpirajo, če pa posameznih snovi zmanjka, med seboj konkurirajo in se onemogočajo (Hobson, 1997).

Vampno mikrobioto sestavljajo bakterije, arheje, glive, praživali in virusi. Število vampnih simbiontov variira z vrsto krme in časom po krmljenju oziroma ruminatornim ciklom. 2-4 ure po krmljenju je njihovo število največje. Celotna mikrobna biomasa znaša 5-10 % vampove vsebine ali 3-7 kg pri govedu (Orešnik in Kermauner, 2002). V vampu prevladujejo po številu bakterije (10^{11} celic/ml), po biomasi pa so pomembne tudi praživali (10^4 - 10^6 celic/ml) ter anaerobne filamentozne glive (do 10^5 CFU/ml), ki predstavljajo 10 % mikrobne populacije (Orpin in Joblin, 1997; Stewart in sod., 1997; Williams in Coleman, 1997). V predželodcih sesnih mladičev najdemo le zelo majhno število v večini aerobnih bakterij, ki so s slino prispele naključno. Že po mesecu dni se vamp okuži s krmo in lizanjem telesa ter predmetov iz okolice z obilico mikroorganizmov, ki uspevajo v anaerobnih razmerah. Sestava mikrobne združbe v vampu se spreminja s starostjo živali, dokler se nekje v polni zrelosti, nihajoč znotraj precej širokih meja zaradi vrste in sestave obroka, nekako ustali (Vatovec, 1971).

2.2.1 Vampne bakterije

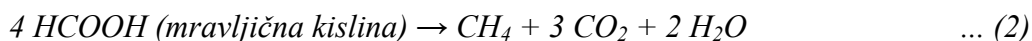
V vampnem ekosistemu prevladujejo bakterije. Te so morfološko, taksonomsko in filogenetsko zelo raznolike. Danes je znanih preko 200 vrst vampnih bakterij (Mackie in sod., 2001), raziskovalci pa sklepajo, da jih živi v vampu vsaj še nekajkrat toliko (Lipoglavšek, 2006). Zastopanost posameznih vrst se spreminja s tipom krme. Pri težko razgradljivi surovi vlaknini se namnožijo Gram-negativne bakterijske vrste (*Prevotella*, *Fibrobacter*, *Ruminobacter*, *Succinivibrio* idr.), pri močnih krmilih pa Gram-pozitivne (*Ruminococcus*, *Streptococcus*, *Clostridium* in *Eubacterium*) (Mackie in sod., 2001; Madigan in sod., 2003; Wolin in sod., 1997). Netipična zgradba bakterijske celične stene pri nekaterih bakterijah otežuje razvrščanje po Gramu. Takšen primer je *Butyrivibrio fibrisolvens*, ki se zaradi tanjše celične stene obarva kot Gram negativna bakterija, v resnici pa sodi med Gram pozitivne bakterije z nizko vsebnostjo gvanina in citozina (Hobson, 1997).

Vampne bakterije s svojimi encimi razgrajujejo rastlinske delce in jih glede na njihovo funkcionalno vlogo delimo na amilolitične, saharolitične, celulozitične, proteolitične in lipolitične vrste (Cestnik, 2004). Nekatere so specializirane le za en tip rastlinskih polimerov (*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminobacter amylophilus*), druge pa lahko hidrolizirajo več vrst polimerov (*Prevotella*, *B. fibrisolvens*, *Ruminococcus*). Nekatere vrste imajo šibko izraženo sposobnost hidrolize večine polimerov in zato izrabljajo že nastale hidrolitične produkte (Hobson, 1997).

Nekatere vrste vampnih bakterij (*B. fibrisolvens* in *Ruminococcus albus*) producirajo vodik. Z inhibicijo rasti teh bakterij (*B. fibrisolvens* je po nekaterih raziskavah slabo odporen na krmne antibiotike; Nagaraja in Taylor, 1987) se produkcija vodika zmanjša, posredno pa produkcija metana, ki ga sintetizirajo vampne metanogene arheje. Metan predstavlja surovno in energetsko izgubo, vendar pa metanogene arheje igrajo pomembno vlogo pri vzdrževanju nizkega parcialnega tlaka vodika v vampu, ki bi sicer lahko deloval inhibitorno (Madigan in sod., 2003).

2.2.2 Vampne arheje

Metanogene vrste so edini predstavniki kraljestva arhej, ki živijo v vampu prežvekovalcev. So izjemno striktni anaerobi, kar otežuje izolacijo in *in vitro* proučevanje. V vampu prevladujeta družini *Methanobrevibacter* in *Methanobacterium* (Mackie in sod., 2001). Kot prekursor v procesu metageneze arheje za proizvodnjo metana uporabljajo vodik, zato jih med drugim najdemo tudi vezane na površino anaerobnih ciliatnih praživali, ki vodik tudi proizvajajo. Za redukcijo CO₂ do metana (CH₄) večina metanogenih arhej koristi le vodik, nekatere pa še mravljično kislino (format) in acetat (Madigan in sod., 2003). Značilni kemijski reakciji omenjenega bio-kemijskega procesa sta prikazani v spodnjih dveh formulah:



Produkcijo metana lahko zmanjšamo z redukcijo proizvodnje vodika, ki ga metanogene arheje uporabljajo kot prekursor pri sintezi CH₄. Vsekakor so metanogene arheje v vampu tudi koristne, ker sintetizirajo nekatere vitamine (Czerkawski, 1986, cit. po Ferme, 2003), z nižanjem parcialnega tlaka vodika pa omogočajo reoksidacijo NADH in s tem rast drugih fermentativnih vampnih simbiotov in tudi potek nekaterih na nižji pH občutljivih procesov, kot je celuloza (Wolin in sod., 1997).

2.2.3 Drugi vampni mikroorganizmi

Praživali (*Protozoa*) v vampu so v glavnem proteolitične in predatorske in ohranjajo ravnotežje med različnimi bakterijskimi vrstami. So največji prebivalci vampa in zasedajo okrog 50 % mase vampne mikrobiote (Cestnik, 2004). Pomembni so s stališča pretvarjanja rastlinskih beljakovin v živalske in povečanja hitrosti metabolnega kroženja bakterijskih proteinov (angl. *turnover*) v vampu. Vplivajo na fermentacijo krme in produkcijo bakterijskih metabolitov (Mackie in sod., 2001).

Pomembno vlogo pri porabi kisika in ohranjanju anaerobnih razmer v vampu imajo aerobne glive. Zanje je značilna tudi sinteza aminokislin in vitaminov, a so le prehodni organizmi in ne nudijo veliko koristi gostiteljskim živalim (Cestnik, 2004). Stalno naseljene glive v vampu so striktno anaerobne filamentozne glive, katerih prostoplavajoče običkane spore se pritrdijo na rastlinske delce in vzklijejo v saprofitski micelij. Po spolni diferenciaciji nekaterih hif v sporangijih nastajajo nove zoospore, ki ob dozoritvi začenejajo nov življenjski krog. Uvrščamo jih v razred *Chytridiomycetes*, red *Neocallimasticales* (Mackie in sod., 2001). Glive v vampu razgrajujejo rastlinske strukturne polisaharide in sodelujejo pri procesih sinteze aminokislin, nižjih dušičnih spojin in nekaterih vitaminov. Povečajo biomaso in mikrobnost v vampu, prav tako pa lahko s svojimi produkti (mikotoksini) vplivajo na delovanje drugih vampnih simbiotov (Madigan in sod., 2003).

V vampu je bilo identificiranih več kot 100 morfološko različnih oblik virusnih delcev, katerih večina je temperentnih bakteriofagov, njihova vloga pa je v glavnem še nepojasnjena (Mackie in sod., 2001).

2.3 METABOLNI PROCESI V VAMPU IN NJIHOV POMEN ZA PREŽVEKOVALCE

V procesih razgradnje in izgradnje organske snovi se v anaerobnem ekosistemu vampa večina energije zadrži v fermentacijskih produktih in gradnikih mikrobnih celic. Glavni produkti fermentacije so kratkoverižne maščobne kisline (KMK; angl. SCFA – *short chain fatty acids*), ki krijejo 60-80 % dnevnih energetskih potreb gostitelja (Mackie in sod., 2001). KMK se skozi steno vampa resorbirajo v kri in koristijo kot glukogene substance ali kot material za biosintezo celičnih komponent. S stališča mikrobne biomase je glavni vir beljakovin in vitaminov zagotovljen po lizi mikrobnih celic v siriščniku.

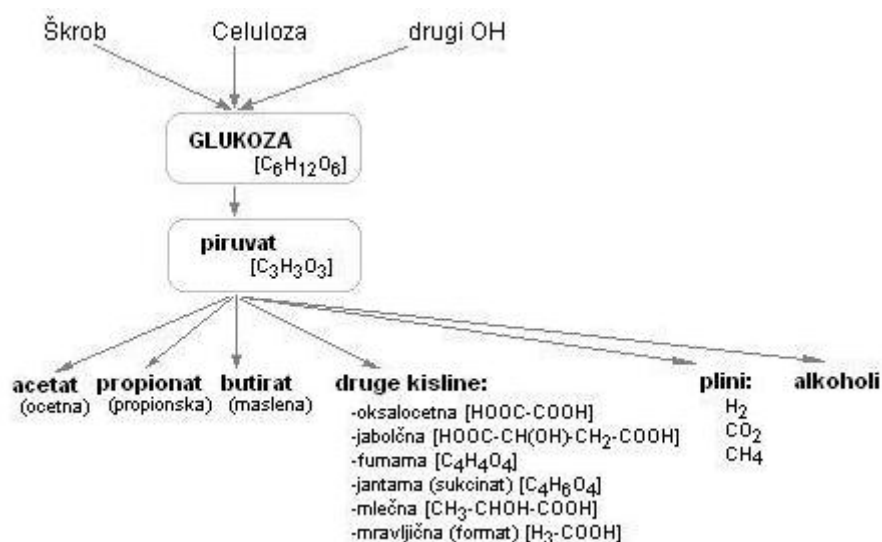
2.3.1 Presnova ogljikovih hidratov v vampu

Strukturni polisaharidi celične stene rastlinskih celic predstavljajo večino rastlinske krme in so zaradi β -glikozidnih vezi za prežvekovalca popolnoma neprebavljivi. Za izkoriščanje tovrstne krme so prežvekovalci v celoti odvisni od sinergizma mikrobnih simbiotov, ki postopoma razgradijo kompleksne polisaharide do enostavnih sladkorjev. Posamezne vrste mikrobov so sposobne razgradnje različnih, večinoma pa samo ene vrste polisaharidov. Pomembnejše vrste celulozitičnih vampnih bakterij so *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* in *Ruminococcus albus* (Weimer in sod., 1999; Koike in Kobayashi, 2001). Celulozo razgrajujejo tudi praživali in anaerobne glive, na samo razgradnjo pa vpliva stopnja lignifikacije substrata. Lignin je kompleksen aromatski polimer, ki je tudi za mikrobne hidrolitične encime v večini nerazgradljiv. Njegova vsebnost se povečuje s starostjo rastlinskega tkiva. Dostop do strukturnih polisaharidov omejujejo tudi tanini, ki tvorijo komplekse s polisaharidi in tako inhibirajo delovanje hidrolaz. Gradniki rastlinske celične stene so tudi hemiceluloze (ksilan, manan idr), ki so za večino mikrobov (*Butyrivibrio fibrisolvens*) lažje prebavljive (Chesson in Forsberg, 1979) ter pektini, katere razgrajujejo številne vampne bakterije in praživali (Mackie in sod., 2001).

Škrob in enostavni sladkorji so najlažje razgradljivi za večino vampnih mikroorganizmov. Hiter prehod na krmo bogato s škrobom lahko zaradi hitre razrasti vrste *Streptococcus bovis*, producenta desnosučne mlečne kisline, povzroči zakisanje vampa (acidoza) in padec pH, ki ga žival s svojim puferskim sistemom vampa ne more popraviti. Pri tem se ob pretvorbah beljakovin pri nizkem pH ustvarjajo amini, toksični produkti razkroja beljakovin, ki skupaj z mlečno kislino škodljivo vplivajo na jetra. Prehod na drugačno krmo mora biti zaradi dovzetne vampne mikrobiote postopen. Acidoza poleg zmanjšanja mikroorganizemskih beljakovin pomeni tudi manjšo produkcijo KMK, to pa ima za posledico manj glukogenih snovi, kar pa je vzrok za manjšo količino mlečne maščobe. Ob pretiranem krmljenju s škrobom le ta prehaja prebavo v predželodcih in vodi v acidozo debelega črevesa (*colon*). Po drugi strani pa celuloza ugodno vpliva na motoriko prebavil, nase veže vodo in omogoča iztrebljanje ter redči hranljive snovi (ob uživanju na primer hiperkaloričnih obrokov) in s tem upočasni prebavo. Vlajnina je nujna za učinkovito fermentacijo mikrobov, pri čemer med drugim nastaja tudi maslena kislina, ki ohranja črevesno sluznico vlažno (Orešnik in Kermauner, 2002).

Pomemben vmesni produkt razgradnje ogljikovih hidratov je glukoza. Ta se se v vampu z nadaljnimi biokemičnimi procesi pretvori v piruvat, ta pa v kratkoverižne maščobne kisline – v glavnem v očetno, propionsko in masleno kislino (Slika 3). V celicah se lahko glukoza razgradi za tvorbo energije, ali pa se shranjuje v obliki glikogena ali škroba oziroma se v

času laktacije v mlečni žlezi pretvori v laktozo (mlečni sladkor). Kratkoverižne maščobne kisline imajo 2 do 5 C atomov in lahko prav tako prehajajo skozi steno vampa v kri. Hitrost absorpcije je odvisna od razlik v koncentraciji KMK v krvi in v vampu (Orešnik in Kermauner, 2002).



Slika 3: Proces razgradnje ogljikovih hidratov v vampu (prirejeno po: Ferme, 2003)

V procesu fermentacije rastlinske krme v vampu se stvarjajo tudi plini, v glavnem metan, ogljikov dioksid in amoniak (Mackie in sod., 2001). Manjši delež (5-20 %) energije krme se v procesu fermentacije ogljikovih hidratov porabi za produkcijo metana (pri govedu 30 l/h), ki se neizkoriščen sprotno odstranjuje z izrigavanjem (Orešnik in Kermauner, 2002).

Če je surove vlaknine premalo, krma prehitro prehaja skozi prebavila, nasprotno pa presežek lahko povzroči zaprtje. Slama vsebuje veliko celuloze, ki jo mikroorganizmi pretvarjajo v enostavne sladkorje in naprej tudi v ocetno kislino, ta pa je glavni vir za sintezo mlečne maščobe. Mlada trava z malo vlaknine in veliko topnih ogljikovih hidratov pomeni manjšo produkcijo ocetne in več propionske kisline, kar ima za posledico padec maščobe v mleku. Enak učinek imajo krmni koncentradi oziroma neprimerna struktura krme (drobno mleta krma ipd.) (Orešnik in Kermauner, 2002). Pri krmljenju z voluminozno krmo je tipično razmerje ocetna:propionska:maslena 70:20:10, pri koncentrirani krmi pa 50:40:10 (Siciliano-Jones in Murphy, 1989).

2.3.2 Presnova dušika v vampu

Proteolitična aktivnost vampnega soka (proteoliza, peptidoliza in deaminacija) je praviloma neodvisna od načina krmljenja, a kadar je obrok bogat z lahkotopnimi ogljikovimi hidrati, se razgradnja beljakovin zmanjša zaradi znižanega pH. Pri nizkem pH vampa lahko z dekarboksilacijo posameznih aminokislin nastajajo toksični amini. Večina

beljakovin krme se pod vplivom proteolitičnih encimov simbiotov razgradi že v vampu. Beljakovine se razgradijo do peptidov in prostih aminokislin, nekatere aminokislino pa se z intracelularnimi mikrobnimi encimi razgradijo še naprej do KMK, amoniaka in CO_2 . Amoniak se v obliki amonijevega iona (NH_4^+) izkoristi kot prekursor mikrobne sinteze proteinov (60-80 % bakterijskih beljakovin se sintetizira iz amoniaka, ostali del pa iz oligopeptidov in aminokislin) ali pa se resorbira skozi steno vampa v kri (Mackie in sod., 2001). Amoniak s krvjo potuje v jetra, kjer se veže s CO_2 v sečnino (*urea*). Ta prehaja nazaj v kri in se v večji meri izloča skozi ledvice s sečem, deloma pa preko žlez slinavk s slino prehaja nazaj v vamp (hepatoruminalno kroženje dušika; Slika 4). Neproteinski dušik (NPN; angl. *non-protein nitrogen*) v obliki sečnine lahko tudi krmimo, bakterijska ureaza v vampu pa sečnino ponovno razgradi do amoniaka in CO_2 (Orešnik in Kermauner, 2002).



Slika 4: Ruminohepatično kroženje amoniaka (Lavrenčič, 2002)

Nastali mikrobni proteini predstavljajo za gostitelja glavni proteinski vir ko postanejo dostopni po lizi mikrobnih celic v sirišniku. Prevladujoči proteoliti so bakterije (*Prevotella ruminicola*, *B. fibrisolvens*), praživali in anaerobne glive (Mackie in sod., 2001).

Veliko beljakovin vsebuje spomladanska paša, a je zato revnejša z vlakninami (<180 g surove vlaknine na kilogram suhe snovi; v nadaljevanju: SV/kg SS). Prehitra razgradnja beljakovin iz krme glede na razgradnjo surove vlaknine, kot vira energije za sintezo mikrobnih proteinov, vodi v prekomerno produkcijo amoniaka, ki se izgublja z urinom in s tem zmanjšuje vrednost beljakovin krme. Prav tako lahko prepočasen padec pH med postopkom siliranja omogoči neželjeno razgradnjo beljakovin do amoniaka s strani klostridijev in silaža postane z vidika krmnih beljakovin nezadovoljiva. Nenadna visoka razgradljivost beljakovin ima podoben učinek kot prevelika količina beljakovin v obroku. Posledica obeh je večja produkcija amoniaka → več sečnine, ta pa obremenjuje jetra in ledvice. Prekomerno količino beljakovin v obroku lahko posredno merimo s povečanjem količine sečnine v mleku. Za sočasnost sproščanja energije in dušika iz krme je zelo pomembno ustrezno razmerje med voluminozno in koncentrirano krmo v obroku (Orešnik in Kermauner, 2002).

Učinkovito izkoriščanje neorganskega dušika v anabolne namene postavlja prežvekovalce med najučinkovitejše herbivore, vendar pogosto težavo predstavljajo nitrati (NO_3), ki se v anaerobnih pogojih vampa pretvorijo v toksičen nitrit (NO_2) in preidejo v kri. Problem lahko omilimo s stimulacijo aktivnosti nitritne reduktaze, ki nitrit reducira do amoniaka (NH_3). Prav tako je zaželjena splošna inhibicija redukcije nitrata do nitrita (Orešnik in Kermauner, 1982).

2.3.3 Presnova maščob v vampu

Pri prežvekovalcih se maščoba iz krme (trigliceridi, glikolipidi in fosfolipidi) delno razgradi že v vampu. Glicerol se porabi za nadaljno fermentacijo, višje maščobne kisline pa se zaradi anaerobnih razmer, ki ne favorizirajo njihove oksigenacije, absorbirajo v tankem črevesu. Mikroorganizmi v vampu so precej občutljivi na višje koncentracije maščob v krmi. Če je v suhi snovi obroka (v nadaljevanju: SS) več kot 10 % maščob, se aktivnost vampnih mikroorganizmov močno zmanjša. Težavo lahko rešujemo s krmljenjem zaščitene maščob, ki se razgradijo šele pod vplivom encimov trebušne slinavke in tankega črevesa, vsekakor pa voluminozna krma prežvekovalcev že sama po sebi vsebuje malo lipidov, le 2-3 %, kar je za vampno mikrobioto dokaj ugodno. Mrva (tudi slama) vsebuje precej linolne in linolenske kisline, ki sta večkrat nenasičeni maščobni kislini, zato kljub delni hidrogenaciji v vampu pri odrasli živali le redko pride do pomanjkanja esencialnih maščobnih kislin (Orešnik in Kermauner, 2002). Pri procesih lipolize in hidrogenacije sodelujejo predvsem bakterije in praživali (Harfoot, 1978, cit. po Ferme, 2003).

2.3.4 Nastanek plinov

Plini nastajajo s procesom fermentacije ogljikovih hidratov in dekarboksilacijo aminokislin. Pri redukciji CO_2 do metana (CH_4) s strani metanogenih arhej se kot prekursor koristi vodik. Ta nastaja pri razgradnji mravljične kisline in se v večini porabi za sintezo metana v razmerju $\text{H}_2:\text{CH}_4 = 4:1$ (Cestnik, 2004). Glavna proizvajalca vodika sta *Butyrivibrio fibrisolvens* in *Ruminococcus albus* (Russel in Rychlik, 2001). Večje količine vodika nastajajo pri ponovnem krmljenju po daljšem stradanju, v nekaj dneh pa količina vodika močno upade in se nadomesti s produkcijo metana. 10 % sinteze metana pri prežvekovalcih poteka v debelem črevesu (Cestnik, 2004).

Z vrsto krme in ciklom prehranjevanja vplivamo neposredno na hitrost biokemičnih procesov v vampu, posredno s tem pa na količino novonastalih plinov (Orešnik in Kermauner, 2002).

2.3.5 Metabolizem vitaminov

Vitamine skupine K, B in C sintetizirajo mikrobi sami, skupini D in A se tvorita v živalskem organizmu, z dodatkom koncentriranih krmil pa poskrbimo za vnos vitamina E in provitaminov A (karoteni, karotenoidi, ksantofili). Hipovitaminoza utegne povzročiti resne motnje v presnovi (Orešnik in Kermauner, 2002). Vsi mikrobi ne sintetizirajo vseh esencialnih vitaminov za lastno rast in razmnoževanje, zato se za zadostitev potreb po vitaminih kot ključen zopet izkaže sinergizem simbiotov v obliki navzkrižnega prehranjevanja (Hobson, 1997).

2.4 MANIPULACIJA VAMPNEGA METABOLIZMA

Zaradi anaerobnih razmer v vampu in navzkrižnega prehranjevanja je vampne mikroorganizme težko izolirati in proučevati. To je tudi razlog za le delno poznavanje delovanja večine vampnih simbiotov, ki jih poznamo in jih lahko gojimo v *in vitro* razmerah – ti pa predstavljajo očitno manjšino v vampni mikrobnii združbi. Obenem je tudi vse bolj očitno dejstvo, da moramo vampne biokemične reakcije razumeti kot posamezne dele vzajemne sintrofije, katere posledica je popolna fermentacija hranilnih snovi. Vsakršno poseganje v vampni metabolizem inhibira oziroma spodbuja določen člen v presnovni verigi in se posledično odraža v zmanjšani ali povečani količini končnega produkta. Ker mikrobne fermentacije predstavljajo integriran sistem, se vsakršen poseg v vampni ekosistem odraža s serijo pozitivnih in negativnih učinkov (Hobson, 1997).

Vsako krmilo vpliva na prebavljivost drugih krmil v obroku. Sestava obroka lahko zato bistveno vpliva na rast vampnih mikroorganizmov. Poleg tega lahko s spreminjanjem krme vplivamo na okus in posledično na konzumacijo ter na prebavljivost krme. Prebavljivost izboljšujemo s spreminjanjem fizikalno-kemičnih lastnosti krme (estrugiranje, toplotna obdelava, obdelava z antioksidanti, dodajanje celulolitičnih encimov ipd.) s čemer postanejo hranilne snovi krme lažje dostopne mikrobni razgradnji (Orešnik in Kermauner, 2002). Krmne proteine lahko tudi dodatno raščitimo (toplotna obdelava, kemični agensi: aldehidi, tanini, alkoholi, kisline in drugi), da s tem preidejo mikrobno prebavo predželodcev in se direktno izkoristijo šele v tankem črevesu. Kemične spremembe so zaradi pH odvisnosti v kislem mediju siriščnika in dvanajstnika reverzibilne (Schwab, 1995).

2.4.1 Cilji vampne modifikacije

Z namenom izboljšanja produktivnosti živali v intenzivnih produkcijskih sistemih želijo živinorejci modificirati vampni metabolizem. Izraba hranilnih snovi v vampu bo najučinkovitejša ob optimalni fermentaciji s strani vampnih simbiontov. Nekatere biokemične procese v vampu želimo stimulirati. Takšni so: pretvorba neproteinskega dušika v mikrobne proteine, mikrobna razgradnja surove vlaknine, aktivnost nitritne reduktaze in fermentacija mlečne kisline. Spet drugi biokemični procesi v vampu so nezaželeni in jih želimo inhibirati. To so: mikrobna razgradnja krmnih proteinov, biohidrogenacija nenasičenih maščobnih kislin, intenzivna fermentacija škroba in prekomerna proizvodnja metana. Poleg tega je zaželena tudi preventiva pred metabolnimi motnjami, kot sta acidoza in ketoza (Hobson, 1997).

2.4.2 Vampni modifikatorji

Za gospodarnost prireje se za manipulacijo vampnega metabolizma v krmo dodajajo različni prehranski dodatki (angl. *feed additives*) oziroma vampni modifikatorji. Najpogosteje so to antibiotiki (npr. monenzin – produkt aktinomicete *Streptomyces cinnamonensis*) in druge kemične spojine za direktno manipulacijo vampne mikroflore, ki se ne uporabljajo v humani medicini. Zaradi celovitosti vampnega ekosistema je večina modifikatorjev nespecifičnih in istočasno vplivajo na različna mesta vampne fermentacije (Hobson, 1997). Zaradi nevarnosti akumulacije antibiotikov v mleku in mesu ter zaradi potenciala za razvoj in horizontalni genski prenos bakterijske rezistence na uporabljene antibiotike pa je uporaba antibiotikov vprašljiva, zato so s 1. januarjem leta 2006 v EU prepovedali uporabo krmnih antibiotikov v živinoreji. Zato so živinorejci za ohranitev trga prisiljeni uporabljati ne-antibiotične krmne dodatke, kot so probiotiki, encimi in druge naravne snovi, na primer rastlinski izvlečki. Delovanje slednjih je še slabo proučeno, zato pa so raziskave na tem področju zaradi prepovedi uporabe krmnih antibiotikov nujne.

2.4.2.1 Rastlinski izvlečki

Rastline, danes poznamo okrog 422.000 vrst cvetlic (Bramwell, 2002), so zaradi sinteze sekundarnih metabolitov z najrazličnejšim bioaktivnim delovanjem zaloga potencialno uporabnih snovi za manipulacijo vampnega metabolizma. Mnoge že tisočletja izkoriščamo v etno-medicinske in veterinarske namene. Učinkovine najdemo v različnih delih rastlin (listi, korenine, lubje, cvet) oziroma v eteričnih in esencialnih oljih, grenčinah, čreslovinah, dišavah in drugih izvlečkih (Dano in Bogh, 1999, cit. po Ferme, 2003).

Trend zmanjševanja uporabe krmnih antibiotikov spodbuja raziskave na področju vpliva rastlinskih izvlečkov na prebavo živali, fermentacijo v vampu, sestavo mleka in produkcijo mleka, mesa ali volne oz. na metabolizem mikroorganizmov. Študije v glavnem temeljijo na kratkoročnem *in vitro* gojenju (McIntosh in sod., 2003; Cardozo in sod., 2004; Benchaar in sod., 2006; Molero in sod., 2004; Newbold in sod., 2004). Mnoge dokazujejo inhibicijo mikrobne aktivnosti, ki je povezana s terpenoidnimi ali fenolnimi sestavinami esencialnih olj (Helander, 1998; Sivropoulou in sod., 1995, 1996). Nekatere sestavine rastlinskih izvlečkov učinkujejo na celično membrano tako, da povzročijo porušitev ionskih gradientov, kar vodi v izgubo kemiosmotske kontrole (Ultee in sod., 1998; Cox, 2000). Esencialna olja kot sekundarni metaboliti rastlinskih celic izkazujejo antimikrobno aktivnost tako pri Gram pozitivnih kot Gram negativnih bakterijskih vrstah (Helander in sod., 1998). Na splošno so Gram pozitivne bakterije občutljivejše na antimikrobno delovanje rastlinskih izvlečkov (Smith-Palmer in sod., 1998). S stimulacijo ali inhibicijo določenih vampnih mikroorganizmov lahko z rastlinskimi izvlečki posredno vplivamo na vampni metabolizem, izločanje prebavnih sokov in s tem na vampni pH, absorpcijo metabolitov ter prebavljivost. Različni rastlinski izvlečki lahko delujejo sinergistično ali pa antagonistično (Cowan, 1999).

2.4.2.1.1 Evgenol

Evgenol (Slika 5) je glavna sestavina esencialnega olja nageljnovih žbic. Nageljnovе žbice so posušeni cvetni popki tropskega drevesa klinčevca (tudi žbičevca - *Eugenia caryophyllata*, *Syzygium aromaticum* - staro ime; mirtovke - *Myrtaceae*). Popki vsebujejo esencialno olje, ki ga pridobivamo z destilacijo z vodno paro, čemur sledi ekstrakcija olja iz destilata z diklorometanom (CH_2Cl_2) in odparevanje topila pod vakuumom. Večino esencialnega olja vsebujejo stbla in listi klinčevca, cvetni popki pa nekoliko manjšo količino. Količino evgenola v esencialnem olju lahko ocenimo z acetiliranjem, to je kemičnim ali encimskim dodajanjem acetilne skupine (Cvar, 1998).

Preglednica 1: Ključni podatki in lastnosti evgenola (Bremness, 1996)

EVGENOL; ime po IUPAC: 1-hidroksi-2-metoksi-4-propenilbenzen	
molekulska formula	C ₁₀ H ₁₂ O ₂
vrsta spojine	fenol
molska masa (g/mol)	164,204
tališče (°C)	-9,2 do -9,1
vrelišče (°C)	248 (254)
gostota (g/l)	1,064 do 1,068
topnost	voda: <1 mg/ml pri 20°C 95 % etanol: ≤100 mg/ml pri 21°C aceton: ≤100 mg/ml pri 21°C kloroform: se meša eter: se meša benzen: >10% eterična olja: topen ledocetna kislina: topen vodne raztopine alkalij: topen
nevarnost in toksičnost	draži kožo, LD ₅₀ (podgane) 1930 mg/kg

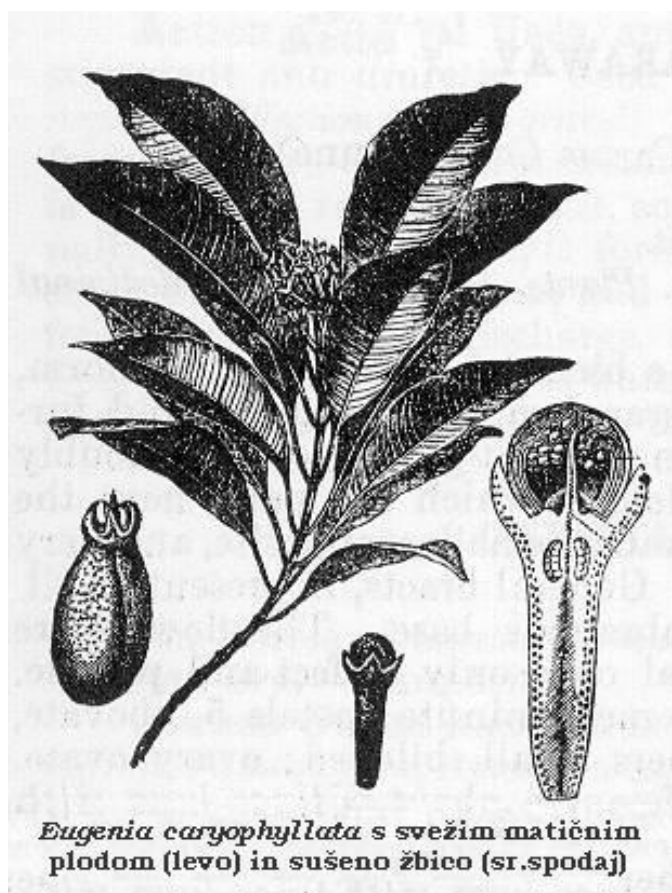
Poleg klinčevca se evgenol na podoben način pridobiva še iz listov in lubja cimeta (*Cinnamomum zeylanicum*) ter listov in vejic lovorja (*Laurus nobilis*) (Bremness, 1996). Evgenol redkeje izdelujejo tudi sintetično iz glukoze baze (Eugenol, 2007).

Evgenol vsebujejo tudi esencialna olja nekaterih drugih zeli, kot na primer navadna melisa (*Melissa officinalis*) (Melissa, 2006), afriška bazilika (*Ocimum gratissimum*) (Basil, 2006) in navadna sretena (*Geum urbanum*) (Galle-Toplak, 2002).



Slika 5: Razčlenjena strukturna formula molekule evgenola (Cvar, 1998)

Klinčevca (Slika 6), ki je glavna surovina za pridobivanje evgenola, je zimzelena drevesna vrsta, endemit Moluškega otočja (Indonezija). Njegova življenjska doba je približno 100 let, povprečna sezonska pridelava svežih žbic na drevo pa znaša okrog 5 kilogramov. Nizozemski kolonisti so zadrževali kultivacijo dragocene začimbe na indigenem območju, z razdrtjem Holandskega monopola v 18. stoletju pa so Francozi razširili drevo klinčevca še v druge azijske države. Danes najpomembnejši pridelovalec nageljnovih žbic kot kulinarične začimbe je otok Pemba (Tanzanija), ki je ves prekrit z vrtovi klinčevca in za katerega mornarji mimooidoče plovbe trdijo, da ga lahko izsledijo po značilnem vonju po žbicah. Klinčevca v dobršnji meri gojijo še na Madagaskarju, Filipinih in v Braziliji, v Indoneziji pa je po depresiji druge svetovne vojne gojenje klinčevca zopet v porastu, vendar ga le malo izvozijo, saj je večinski pridelek usmerjen v proizvodnjo aromatiziranega tobaka (Kretek, Gudang garam idr.). Prve omembe nageljnovih žbic so zapisane v kitajski literaturi tretjega stol. p. št. kot "chicken-tongue spice" – sredstvo proti zobobolu (Bowens, 2006).



Slika 6: Klinčevец (*Eugenia caryophyllata*, *Syzygium aromaticum* - staro ime) (Adams, 2006)

Danes klinčke – nageljnovе žbice (angl. *clove* iz lat. *clavus* – žebelj – nem. *Nagel*) uporabljamo predvsem kot dišavo ali začimbo, ki kot stomachik spodbudi izločanje želodčnega soka in spodbudi peristaltiko, kot karminativ zavre nastajanje črevesnih plinov, kot spazmolitik pa blaži krče gladkih mišic. V fitomedicini je iz istega razloga priložnostna sestavina želodčno-črevesnih zdravil ter zdravil proti kašlju, ker esencialno olje razkužuje dihala ter olajša dihanje in izkašljevanje. Ima zelo dobre anestetične pa tudi protikužne lastnosti zoper bakterije, viruse in glivice, zato se uporablja nerazredčeno kot antiseptik in analgetik v zobozdravstvu, z 1 do 5 odstotno raztopino pa se izpirata vneta ustna in žrelna sluznica (Špringer, 2003).

Poleg antiseptičnega, antivirusnega in antihelmintičnega delovanja (vermicidno sredstvo proti glistam) učinkuje evgenol kot antioksidant, antibiotik, fungicid, baktericid, larvicid in antihistaminik. Ima široko antimikrobno delovanje proti Gram-pozitivnim (*Staphylococcus aureus*, *Lysteria monocytogenes*, *Lactobacillus* sp., *Actinomyces* sp., *Streptococcus* sp.), Gram-negativnim bakterijam (*Eschericia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* sp., *Aeromonas* sp., *Pseudomonas* sp.) in glivam (*Candida albicans*, *Aspergillus* sp. in *Penicillium* sp.) (Grill in Holley, 2004). Mehanizem antimikrobnega delovanja temelji na

inhibiciji rasti mikroorganizmov zaradi akumulacije evgenola v fosfolipidnem dvosloju, kar povzroči povečano permeabilnost celične membrane in izhajanja intracelularnih komponent. Evgenol ima biocidno aktivnost že pri nizkih koncentracijah (Cvar, 1998). Nenadna inhibicija metabolizma glukoze je bila ugotovljena pri uporabi 5 mM evgenola pri bakterijah vrste *Listeria monocytogenes* in 6 mM evgenola pri vrsti *Lactobacillus sakei* (Grill in Holley, 2004). Ob 10 mM koncentraciji evgenola (0,15 vol.%) je bilo doseženo 50-70 % zmanjšanje proizvodnje kratkoverižnih maščobnih kislin kot fermentativnih produktov v govejem in svinjskem fecesu. Potencialno zmanjšanje fermentativne mikrobne aktivnosti ima za posledico zmanjšanje emisij toplogrednih plinov ter okrnitev prenosa patogenov z govejimi in svinjskimi iztrebki. S koncentracijo 16,75 mM evgenola (0,25 vol.%) je bila po 6-8 tednih dodatno ugotovljena še stimulacija proizvodnje laktata (Varel in Miller, 2004).

Strukturno precej podobna evgenolu sta vanilin (pridobiva se iz vanilije; *Vanilla planifolia*) in kapsaicin (učinkovina feferonov; *Capsicum annuum* in *Capsicum frutescens*) (Zakaj feferoni pečejo, 2006).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Bakterijski sevi

Za poskus smo izbrali naslednje seve vampnih bakterij: *Prevotella ruminicola* 23^T, *Prevotella bryantii* B₁₄, *Butyrivibrio fibrisolvens* 3071^T, *Ruminococcus albus* 20455, *Ruminococcus flavefaciens* 007 S/6 in *Fibrobacter succinogenes* S85. Za naš poskus smo izbrali seve, ki (i) jih znamo gojiti *in vitro*, (ii) so dosegljivi in so dokaj dobro proučeni, (iii) imajo v vampu bolj ali manj znano ter pomembno vlogo, (iv) so pomembni s stališča produkcije H₂ (*B. fibrisolvens*, *R. albus*) ter posledično možnosti vpliva na zmanjšanje produkcije metana kot snovne in energetske izgube prežvekovalcev, (v) s svojo morfološko zgradbo izkazujejo predvideno ne/rezistenco na evgenol (nekateri G⁺, drugi G⁻, sev *B. fibrisolvens* pa kot posebnost z zgradbo G⁻ in fiziologijo G⁺).

Preglednica 2: Splošen pregled bakterijskih sevov uporabljenih v poskusu

sev	morfološke značilnosti	substrat	fermentacijski produkti
<i>Prevotella ruminicola</i> sev 23 ^T	G ⁻	sladkor, škrob, pektin, ksilani	mravljična, očetna, propionska, jantarna kislina
<i>Prevotella bryantii</i> sev B ₁₄	G ⁻	sladkor, škrob, pektin, ksilani	mravljična, očetna, propionska, jantarna kislina
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> sev 3071 ^T	morfološko G ⁻ fiziološko G ⁺	sladkor, škrob, hemiceluloze, pektin, celuloza	mravljična, očetna, maslena kislina, H ₂
<i>Fibrobacter succinogenes</i> sev S85	G ⁻	celuloza	mravljična, očetna, jantarna kislina
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> sev 007 S/6	G ⁺	hemiceluloze, celuloza	mravljična, očetna, jantarna kislina
<i>Ruminococcus albus</i> sev 20455	G ⁺	hemiceluloze, celuloza	mravljična, očetna kislina, etanol, H ₂

Od naštetih vampnih simbiotov v našem poskusu med najaktivnejše celulolite in hemicelulolite sodijo: *B. fibrisolvens*, *R. flavefaciens* in *F. succinogenes*. Zelo prilagodljiva in v vampu ena številčno dominantnejših bakterijskih populacij je *P. ruminicola*. Pripisujemo ji pomembno vlogo pri hidrolizi peptidov v vampu. *P. bryantii* sev B₁₄ pripisujemo pomembno vlogo v metabolizmu dušika in je v primerjavi z ostalimi manj občutljiva na padec pH (Russell in Rychlik, 2001).

3.1.2 M2 gojišče

Striktno anaerobne bakterijske seve smo gojili v modificiranem anaerobnem gojišču za vampne bakterije M2 (Hobson, 1997). Goveji vampni sok smo takoj po odvzetju precedili in 30 minut centrifugirali (centrifuga Sorvall®-RC5C, Nemčija) pri 10.000 rpm in 15°C. Supernatant smo avtoklavirali in ga do uporabe shranili pri 4°C. Da smo pred pripravo M2 tekočega gojišča odstranili še preostale večje delce, ki v primeru bolj gostega vampnega soka ostanejo v supernatantu po začetnem centrifugiranju, smo supernatant ponovno 30 minut centrifugirali pri enakih pogojih ter ga takoj uporabili za pripravo gojišča. Supernatant, ki smo ga dobili po ponovnem centrifugiranju vampnega soka, je bil bister in zato ni motil kasnejših meritev OD tekočih kultur tekom poskusa.

Preglednica 3: Sestavine za modificirano anaerobno gojišče M2

sestavina	koncentracija (ut.%)
NaHCO ₃	0,4
bakto tripton	1,0
kvasni izvleček	0,25
glukoza	0,2
celobioza	0,2
topni škrob	0,2
resazurin	0,001
L-cistein HCl	0,1
mineralna raztopina I	15,0 (vol.%)
mineralna raztopina II	15,0 (vol.%)
vampni sok	30,0 (vol.%)
deonizirana voda	40,0 (vol.%)

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

Pri pripravi tekočega M2 gojišča smo NaHCO₃, triptonu, kvasnemu ekstraktu, glukozi, celobiozi in topnemu škrobu dodali mineralni raztopini I in II, centrifugirani in avtoklavirani goveji vampni sok, destilirano vodo ter raztopino resazurina. Resazurin deluje kot indikator oksigenacije gojišča (rožnata barva pomeni oksigenirano, brezbarvna pa reducirano gojišče). Ob mešanju smo gojišče zavreli, odstavili, dodali L-cistein HCl (dodatni reductent, ki omogoča pripravo ustrezno reduciranega gojišča) ter začeli

prepihavati s CO₂ brez primesi kisika (CO₂ potuje skozi bakreno kolono segreto na 350°C in se pri tem očisti primesi kisika). Po desetih minutah oz. po razbarvanju smo gojišča ob prepihavanju razlili v steklene »Hungate« epruvete (Bellco Glass, USA), jih zaprli in avtoklavirali.

3.1.3 Evgenol

Pred začetkom poskusa smo preverili sterilnost evgenola (Merck[®], Nemčija), tako da smo ga dodali v sterilno M2 tekoče gojišče, tega inkubirali pri 37°C in spremljali optično gostoto pri 654 nm v času. Ker je gojišče postalo motno, smo sklepali, da izvleček ni sterilen. To smo preverili tudi z barvanjem po Gramu in opazovanjem vzorcev pod mikroskopom. Nesterilen izvleček je vseboval Gram pozitivne koke. Evgenol smo zato sterilizirali s filtracijo skozi 0,22 µm membranski filter (Millipore[®], Irska). Sterilnost filtrata smo ponovno preverili z inokulacijo v sterilno M2 tekoče gojišče. Ker ni prišlo do porasta optične gostote, smo filtrat uporabili v poskusu.

3.1.4 Pufri in raztopine

Preglednica 4: Pregled in sestava pufrov in raztopin uporabljenih v poskusu

ime	sestava
1M Na-fosfatni pufer (pH 6,5)	1M Na-hidrogenfosfat (Na ₂ HPO ₄) + 1M Na-dihidrogenfosfat (NaH ₂ PO ₄) v ustreznem razmerju
Lowry A	5 % Na ₂ CO ₃
Lowry B	1 % NaK tartrat + 0,5 % CuSO ₄ x 5H ₂ O, pH 7
Folin-Ciocalteu reagent	57,5 % H ₂ O 15 % Li ₂ SO ₄ 10 % Na volfram dihidrat 10 % HCl (25 %) 85 ut. % H ₃ PO ₄ 2,5 % Molibdenova kislina Na dihidrat

Preglednica 5: Kalibracijska raztopina št. 3 uporabljena pri plinski kromatografiji za ugotavljanje koncentracije KMK

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

3.2 METODE

3.2.1 Gojenje čistih bakterijskih kultur

Bakterijske seve smo pred poskusom hranili v poltrdem agarskem gojišču (z 0,75 ut.% agarja) M2 pri -20°C . Odtaljene smo jih sterilno in anaerobno precepili s cepilno zanko v tekoče M2 gojišče in gojili po Bryantovi modifikaciji Hungatove tehnike za gojenje anaerobnih mikroorganizmov (Bryant, 1972) v inkubatorju pri 37°C . Preko noči inokulirane kulture so služile kot vir inokuluma za poskus.

3.2.2 Dodajanje evgenola in inokulacija

Poskus smo glede koncentracije izvlečka razdelili na dva dela. V prvem delu poskusa smo evgenol dodali vsem gojiščem v dveh različnih koncentracijah: 100 mg/l in 1000 mg/l (Preglednica 6). Za volumen dodanega evgenola smo uporabili izračun:

$$V_Z = \frac{\rho_K \cdot V_K}{\rho_Z} = \frac{100\text{mg} \cdot 140\text{ml} \cdot \text{ml}}{1000\text{ml} \cdot 1070\text{mg}} = 13,08\mu\text{l} \text{ oz. } 130,8\mu\text{l}$$

za višjo koncentracijo evgenola ... (3)

kjer je:

$$\rho_K = 100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$$

$$V_K = 140 \text{ ml}$$

$$\rho_Z = 1070 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$$

V 140 ml gojišča smo dodali 13,08 μl evgenola za nižjo koncentracijo (t.j. 100 mg/l) oziroma 130,8 μl evgenola za višjo koncentracijo (t.j. 1000 mg/l).

Preglednica 6: Preglednica koncentracij izvlečka v prvem eksperimentu

sev	koncentracija izvlečka (mg/l)		
	nizka	srednja	visoka
<i>P. ruminicola</i> 23 ^T	100	/	1000
<i>P. bryantii</i> B14	100	/	1000
<i>B. fibrisolvens</i> 3071 ^T	100	/	1000
<i>F. succinogenes</i> S85	100	/	1000
<i>R. albus</i> 20455	100	/	1000
<i>R. flavefaciens</i> 007 S/6	100	/	1000

V drugem delu poskusa smo proučevali le seva *R. albus* 20455 in *R. flavefaciens* 007 S/6. Tu smo evgenol dodali v treh različnih koncentracijah: 250 mg/l, 500 mg/l in 750 mg/l (Preglednica 7) med nizko in visoko koncentracijo iz prvega dela poskusa, ker smo želeli zožati koncentracijsko območje, v katerem leži tista koncentracija evgenola, ki do polovice inhibira rast (t.j. zmanjša OD_{max} na polovico) proučevanih sevov (t.i. IC₅₀; angl. *half inhibitory concentration*).

Preglednica 7: Preglednica koncentracij izvlečka v drugem eksperimentu

sev	koncentracija izvlečka (mg/l)		
	nizka	srednja	visoka
<i>R. albus</i> 20455	250	500	750
<i>R. flavefaciens</i> 007 S/6	250	500	750

3.2.3 Merjenje optične gostote

Rast mikroorganizmov v tekočem gojišču lahko ocenimo posredno z merjenjem optične gostote (angl. *optical density*) s spektrofotometrom pri določeni valovni dolžini. Optično gostoto gojišč smo v našem poskusu uporabili kot mero za oceno rasti proučevanih mikroorganizmov in vpliva evgenola na njihovo rast. Višja absorbanca pomeni gostejšo kulturo (intenzivnejšo rast mikroorganizmov), pri čemer pa ne gre zanemariti možnosti kopičenja celičnih produktov v raztopini, spreminjanja velikosti posameznih celic, spreminjanja števila mrtvih celic in gibanja koloidne raztopine.

Absorbcijske metode temeljijo na zmanjšanju intenzitete svetlobnega žarka, ki prehaja skozi vzorec. Absorbcija in transmisija svetlobe sta fizikalen pojav, katerega matematični količini sta absorbanca in transmitanca. Absorbanca (A) je definirana kot desetiški logaritem recipročne vrednosti transmitance za monokromatsko svetlobo. Transmitanca (T) je frakcija vpadne svetlobe ob specifični valovni dolžini, ki potuje skozi vzorec (Spektroskopske metode):

$$T = \frac{I}{I_0} \quad \dots(4)$$

kjer je:

I_0 = intenziteta vpadle svetlobe

I = intenziteta prepuščene svetlobe

Transmitanca je v zvezi z absorbanco (A) kot:

$$A = -\log T = -\log \frac{I_{\text{raztopina}}}{I_{\text{topilo}}} = \log \frac{I_{\text{raztopina}}}{I_{\text{topilo}}} = \log \frac{1}{T} \quad \dots(5)$$

Beer-Lambertov zakon pravi, da je v odsotnosti drugih fizikalno-kemijskih parametrov izmerjena absorbanca sorazmerna dolžini poti žarka (b) in koncentraciji topljenca (c):

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot b \quad \dots(6)$$

kjer je:

ε = molarni absorpcijski koeficient [$l/(\text{mol}\cdot\text{cm})$], kadar je b izražen v [cm] in c v [mol/l].

Optično gostoto pri 654 nm smo izmerili dvakrat: prvič za pripravo rastnih krivulj (pred poskusom) in drugič za opazovanje celične rasti v poskusu. Faze rasti smo časovno ločili na štiri dele (Preglednica 9), ob katerih smo opravili meritve. Čas meritve smo sproti določili glede na naraščanje OD v kontrolnih vzorcih poskusa. Slep kontrolni vzorec za umeritev spektrofotometra (Novaspec[®] II, Švedska) je bilo tekoče M2 gojišče iz iste serije kot gojišče, ki smo ga uporabili za poskus. Pred meritvami smo vzorce hranili v inkubatorju na 37°C.

3.2.4 Merjenje pH

Izraz pH-vrednost izvira iz latinskega izraza *potentia hydrogenii*. Vrednost pH je merilo za kislost ali bazičnost raztopin. Po definiciji je pH negativni dekadski logaritem koncentracije oksonijevih (H_3O^+) ionov (Bukovec in Brenčič, 2000).

Fermentacijski produkti rasti anaerobnih bakterij (KMK, H_2 idr.) povzročijo zakisanje gojišča, zato je merjenje pH vrednosti tekočih kultur med rastjo lahko eden izmed načinov za spremljanje hitrosti in obsega bakterijske rasti. pH lahko merimo na različne načine, npr. s pH indikatorji (lakmusov papir) ali pa elektrokemično s pH elektrodo, ki omogoča precej bolj natančno merjenje (Bukovec in Brenčič, 2000)

Po meritvah optične gostote smo tekoče kulture v Hungate epruveh centrifugirali (Janetzki[®] TM23, Nemčija) 30 minut pri 3000 rpm in sobni temperaturi (25°C). Supernatant posameznega vzorca smo uporabili za meritev pH z elektrodo (Orion[®] 520A, ZDA), pelet pa resuspendirali v 1 ml 50 mM Na-fosfatnega pufra (pH 6,5), prelili iz epruveh v minicentrifugirke, in ponovno centrifugirali (Hettich[®] Mikro 200R, Nemčija), tokrat 10 minut pri 12.000 g in 4°C. Sprane pelete smo za nadaljno analizo določanja celičnih proteinov po Lowry-ju hranili v zmrzovalniku pri -20°C.

3.2.5 Ugotavljanje koncentracije celičnih proteinov po Lowryju

Poleg merjenja optične gostote in spremembe pH vrednosti gojišča oz. kulture lahko hitrost in obseg rasti bakterij v tekoči kulturi spremljamo tudi z ugotavljanjem skupne koncentracije oz. s porastom koncentracije celičnih proteinov v kulturi. Namen ugotavljanja koncentracije celičnih proteinov po Lowryjevi metodi (Lowry in sod., 1951) je ocenjevanje uspešnosti rasti mikrobnih celic. Manjša kot je izmerjena koncentracija proteinov, manjše je število celic. Iz tega lahko npr. sklepamo na večji inhibitorski učinek proučevanega rastlinskega izvlečka ter obratno. Koncentracija proteinov je torej neposreden pokazatelj števila mikrobnih celic v vzorcu. Rezultat lahko služi za primerjavo z rezultati drugih metod za ocenjevanje hitrosti in obsega bakterijske rasti (npr. merjenje optične gostote) ali pa ga uporabimo za kvantifikacijo različnih vzorcev celičnih proteinov, ki jih želimo primerjati oz. analizirati z zahtevnejšimi biokemijskimi tehnikami (SDS-PAGE, 2D SDS-PAGE).

Vzorci (pelete) za ugotavljanje celičnih proteinov po Lowryjevi metodi (Lowry in sod., 1951) smo predhodno odmrznili in nato resuspendirali v 1 ml 50 mM Na-fosfatnega pufru (pH 6,5). Suspenzijo smo nato uporabili po naslednjem protokolu, ki smo ga modificirali (t.j. ustrezno zmanjšali volumne reagentov) tako, da je delo lahko potekalo v mikrocentrifugirkah in mikrotitrskih ploščah:

1. Celične pelete resuspendiramo v 1 ml Na-fosfatnega pufru (50 mM, pH 6,5).
2. Prenesemo 40 µl suspenzije v mikrocentrifugirke (neredčen) ter napravimo ustrezne redčitve (20x in 100x) in njihove paralelke.
3. Vmešamo 40 µl NaOH (1 M). Poteče hidroliza vzorca.
4. Mikrocentrifugirke zapremo in kuhamo 5 minut na 100°C ter ohlajamo 15 minut. Poteče denaturacija proteinov.
5. Dodamo 80 µl biuretne reagenta (Lowry A+B v razmerju 50:1) ter inkubiramo 15 minut na sobni temperaturi.
6. Dodamo 16 µl Folin-Ciocalteujevega reagenta (mešan z destilirano vodo v razmerju 1:1) ter inkubiramo 10 minut na sobni temperaturi. Intenziteta barve je odvisna od koncentracije proteinov v vzorcu.
7. Vzorce z multikanalno pipeto prenesemo na mikrotitrsko ploščo in izmerimo absorbanco (Novaspec[®] II, Švedska) pri 650 nm.

Poleg hidrolize vzorca v alkalni raztopini ter termični in kemični obdelavi smo za meritev koncentracije celičnih proteinov skupaj z vzorci na enak način pripravili še umeritveno krivuljo z različnimi koncentracijami govejega serumskega albumina (BSA; angl. *bovine serum albumin*).

Preglednica 8: Priprava umeritvene krivulje za merjenje koncentracij celičnih proteinov po Lowryju

koncentracija (mg/ml)	volumen BSA raztopine (mg/ml)	volumen destilirane vode (mg/ml)
0,40	0,40	0,00
0,32	0,32	0,08
0,24	0,24	0,16
0,16	0,16	0,24
0,08	0,08	0,32
0,00	0,00	0,40
0,00 (BLANK) za kalibracijo aparata	0,00	0,40

Vzorci sevov z različnimi koncentracijami izvlečka smo za Lowryjevo metodo pripravili v redčeni (20x in 100x) in neredčeni obliki, pri rezultatih pa smo upoštevali tisto redčitev, ki je bila znotraj območja umeritvene krivulje. Obe paralelki posameznega vzorca in njegovih redčitev smo na mikrotitrski plošči pripravili v duplikatu.

Za meritev absorbance po končanem protokolu določanja celičnih proteinov po Lowryju smo uporabili merilni aparat ELx 808 (Bio-Tek, ZDA) ter računalniški program KC junior.

3.2.6 Ekstrakcija KMK in plinska kromatografija za njihovo določanje

Pri vseh sevih smo po zadnji t.j. četrti meritvi optične gostote odvzeli 1 ml vzorca, naredili etrsko ekstrakcijo kratkoverižnih maščobnih kislin ter ugotoviti vsebnost KMK s plinskim kromatografom (5890A, Hewlett Packard[®], ZDA). Preostanek vzorca (~7 ml) smo nadalje uporabili za meritev pH ter pripravo peleta za ugotavljanje celičnih proteinov po Lowryju. Manjši volumen (7 ml namesto 8 ml) smo upoštevali pri izračunu koncentracije proteinov ter KMK na ml tekoče kulture.

3.2.6.1 Protokol za etrsko ekstrakcijo kratkoverižnih maščobnih kislin

1. V Hachovo epruveto dodamo 0,4 g NaCl, ki nase veže vodo.
2. Dodamo 1 ml homogenega vzorca in epruveto zapremo, da preprečimo izhlapevanje.
3. Vzorce zakisamo z 200 µl 50 % H₂SO₄.
4. Dodamo 100 µl IS (interni standard je krotonska kislina s koncentracijo 1g/100 ml).
5. Dodamo 1 ml etra (dietileter; Merck[®], Nemčija).
6. Zapremo epruveto in jo 20x premešamo z obračanjem.
7. Centrifugiramo do 2000 rpm (nato centrifugo ustavimo) pri sobni temperaturi (Janetzki[®] TM23, Nemčija).
8. V novo Hachovo epruveto odpipetiramo zgornjo etrsko fazo.
9. V prvo epruveto ponovno dodamo 1 ml etra in ponovimo 6. in 7. korak.
10. Odpipetiramo zgornjo etrsko fazo in jo združimo s prvo.
11. Dodamo 1 spatulo CaCl₂ granulata, ki nase veže vodo.
12. Analiziramo s plinskim kromatografom oziroma do analize hranimo pri -20°C največ 14 dni.

3.2.7 Plinska kromatografija za ugotavljanje produkcije KMK in vodika

Plinska kromatografija je pri analizi vzorcev iz vampa zelo uporabna za ugotavljanje vrste in stopnje mikrobne produkcije KMK ter plinskih fermentacijskih produktov. Razmerje in količino KMK ali plinskih produktov spremljamo npr. takrat, ko želimo ugotoviti, kako neka snov, ki vpliva na hitrost ali obseg bakterijske rasti, vpliva tudi na sam metabolizem občutljivih bakterij (t.j. razmerje KMK ali celokupno koncentracijo KMK ter količino plinov, kar poleg vpliva na stopnjo rasti lahko odraža tudi vpliv na metabolizem).

Koncept plinskega kromatografa sta zasnovala Martin in Synge (1941) in temelji na eluiranju vzorca z mobilno fazo skozi votlo kolono s stacionarno fazo medija. Mobilna faza se glede na stik s stacionarno fazo pomika skozi sistem s pomočjo kapilarnega vleka, gravitacijske sile ali pa nadtlaka pri čemer je stacionarna faza nameščena na votli koloni. Mobilna faza je plin, zajet neposredno iz plinskega dela vzorca (plinska kromatografija za detekcijo plinov) ali pa plin odparjen iz tekočega vzorca (tekočinska kromatografija za detekcijo KMK). V primeru plinske mobilne faze poteka eluiranje vzorca z inertnim plinom, ki je nereaktiven (npr. argon) in služi le transportu vzorca skozi kolono s kontrolirano temperaturo. Glede na termično prevodnost znanega nosilnega plina detektor selektivno prepozna plin vzorca po času zadrževanja v koloni im. retencijskem času. Pri istih razmerah se določena spojina eluira vedno v istem času od vbrizga do stika z detektorjem. Plin vzorca je v plinskem kromatografu detektiran s toplotno prevodno celico (TCD; angl. *thermal conductivity detector cell*), za prepoznavnost pa je potrebno sistem kalibrirati s plinskim standardom (plini znanih molskih mas v določenem volumskem razmerju). Tekoče vzorce (kratkoverižne maščobne kisline ekstrahirane v dietiletru) injicirane v votlo kolono plinskega kromatografa detektira plamenski ionizirajoči detektor (FID; angl. *flame ionization detector*), sistem pa kalibriramo s kalibrirno raztopino z znanimi količinami znanih maščobnih kislin (Preglednica 6). Različni retencijski časi se izrazijo v spremembi električnega signala, ki zaznava komponente vzorca in jih izpiše v obliki kromatograma (Skoog in sod., 1998).

Pri sevih *R. albus* 20455 in *B. fibrisolvans* 3071^T smo po zadnji meritvi optične gostote najprej izmerili še prisotnost plinov v plinskem delu vzorca (odvzem dela atmosfere nad kulturo v Hungate epruveti skozi zamašek) s plinskim kromatografom (GC 14A, Shimadzu[®], Japonska), ki smo ga pred začetkom dela umerili s standardno mešanico plinov (H₂ 14,92 vol.%, N₂ 20,29 vol.%, CH₄ 20,12 vol.% in CO₂ 44,67 vol.%). Pri obeh sevih nas je zanimala produkcija vodika oz. vpliv evgenola na stopnjo produkcije, kar je pomembno s stališča vplivanja na produkcijo metana v vampu.

3.2.8 Statistična obdelava rezultatov s Studentovim t-testom

Rezultate plinske kromatografije (za ugotavljanje KMK in za ugotavljanje H₂) smo statistično ovrednotili s Studentovim t-testom in 95 % stopnjo zaupanja oz. 5 % dvostranskim tveganjem ($\alpha = 5\%$ oz. $p = 0,05$). Ta test se uporablja za statistično ovrednotenje razlik (t.j. s 95 % zaupanjem poda sklep, da je razlika statistično značilna oz. neznačilna) med dvema povprečjema (v našem primeru med povprečjem paralelk vzorca z dodanim evgenolom in povprečjem paralelk kontrolnega vzorca za posamezen sev) glede na to, kakšna je variabilnost samih vrednosti oz. podatkov. Uporablja se v primeru, ko je vzorcev malo, t.j. ko imamo za vsak poskus majhno število paralelk ($n_1 \dots$ število paralelk prvega vzorca (v našem primeru vzorca z evgenolom) in $n_2 \dots$ število paralelk drugega vzorca (v našem primeru kontrolnega vzorca) ter velja $n_1 + n_2 < 30$; v našem primeru je $n_1 + n_2 = 2 + 2 = 4$). Iz tabele percentilnih vrednosti za Studentovo t-porazdelitev z n stopinjami prostosti odčitamo t-vrednost, ki določi meje, pri katerih razlika med povprečjema postane statistično značilna. V našem primeru smo imeli $n_1 + n_2 - 2 = 2$ stopinji prostosti (od $n_1 + n_2$ odštejemo vrednost 2, ker gre za vzorčni porazdelitvi), zato pri 5 % tveganju iz tabele odčitamo t-vrednost $\pm 4,30$. Če je s Studentovim testom izračunana t-vrednost večja od t-vrednosti iz tabele, potem lahko podamo sklep, da sta povprečji dveh vzorcev statistično značilno različni.

3.2.9 Shema eksperimenta

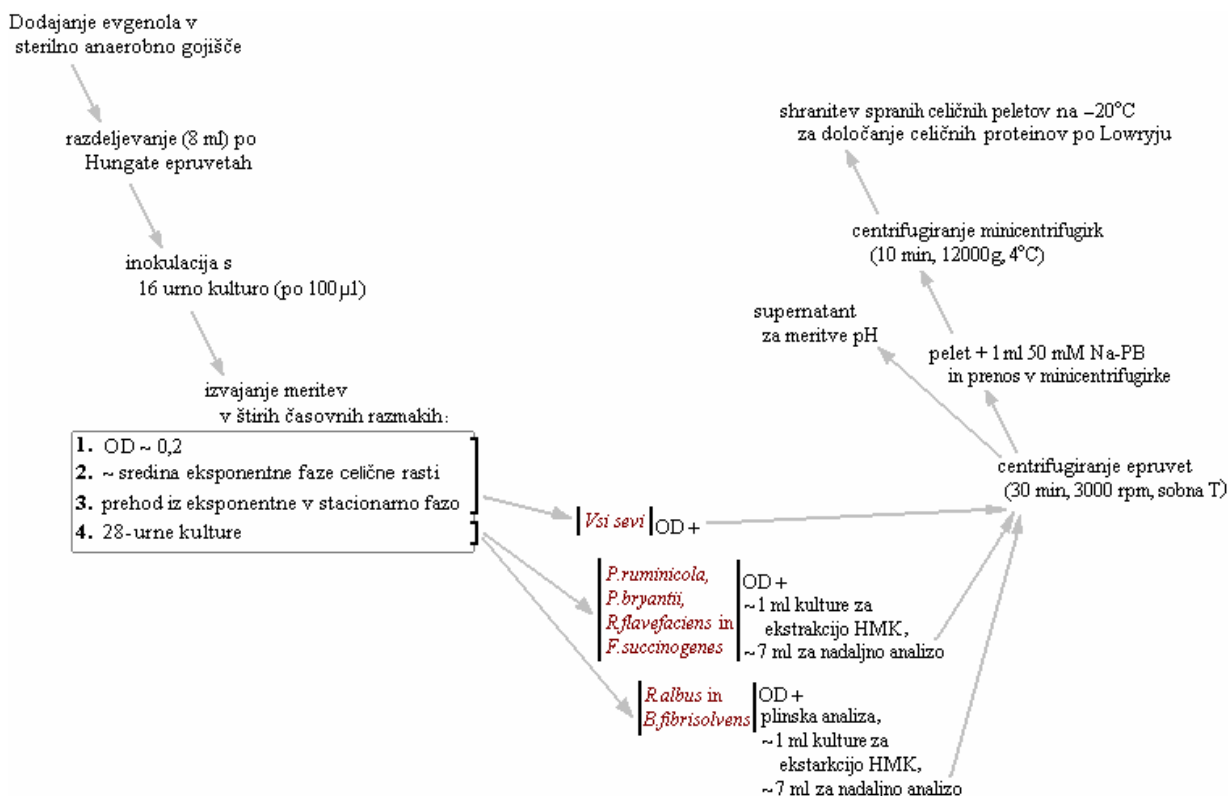
Meritve poskusa (merjenje pH, priprava celičnih peletov za ugotavljanje koncentracije celičnih proteinov po Lowryju, določanje produkcije KMK in plinov) smo za vsak sev opravili v 4 fazah rasti: (i) ob začetku eksponentne faze rasti (OD $\sim 0,2$ relativnih enot), (ii) v sredini eksponentne faze rasti (OD $\sim \frac{1}{2} OD_{max}$, ki je specifičen za posamezen sev), (iii) ob koncu eksponentne faze rasti (OD $\sim OD_{max}$, ki je specifičen za posamezen sev) in (iv) pri 28-urnih kulturah (v stacionarni fazi celične rasti).

Preglednica 9: Kontrolne točke posameznih faz celične rasti izbranih sevov

časovna oznaka	faza celične rasti	kontrolna točka
1.	začetek eksponentne faze celične rasti	OD $\sim 0,2$
2.	sredina eksponentne faze celične rasti	OD $\sim \frac{1}{2} OD_{max}$
3.	konec eksponentne faze celične rasti	OD max
4.	stacionarna faza celične rasti	28-urne kulture

Potem, ko smo pripravili rastne krivulje za vseh šest sevov smo pričeli s poskusom – proučevanjem vpliva evgenola na rast in nekatere druge lastnosti izbranih sevov vampnih bakterij. Poskus smo začeli z dodajanjem izvlečka v sterilizirano in avtoklavirano M2 gojišče. Volumen gojišča smo določili tako, da je zadostoval za poskus z dvema sevoma naenkrat za določeno testirano koncentracijo evgenola, t.j. 2 seva x 2 paralelki x 4 meritve

x 8 ml = 128 ml, kar smo zaokrožili na 140 ml. Večji volumen je koristil tudi v izogib potencialnim eksperimentalnim napakam pri pipetiranju majhnih volumnov evgenola. Gojišče z ustrežno koncentracijo evgenola smo v anaerobni komori sterilno razdelili po steriliziranih Hungate epruvetah ter vsako epruveto inokulirali s 100 µl čeznočne kulture ustreznega seva. Epruvete smo zaprli s steriliziranimi zamaški ter jih iz anaerobne komore prenesli v inkubator, kjer smo vzorce do meritve inkubirali pri 37°C. Testirali smo dve oz. tri koncentracije evgenola (poglavje 3.2.2), ki smo jih določili glede na predhodne raziskave (Busquet Solé, 2005). Ves potreben material (Hungate epruvete, zamaške za Hungate epruvete, gojišča in drugo) smo predhodno sterilizirali z avtoklaviranjem. Filtersko steriliziran rastlinski izvleček evgenol, z gostoto 1'07 g/cm³, smo v anaerobni komori sterilno dodali gojišču v transfuzijskih stekleničkah (140 ml M2 gojišča).



Slika 7: Shema eksperimenta

Glede koncentracije dodanega evgenola smo poskus razdelili na dva eksperimenta. V prvem smo proučevali vse seve, v drugem pa zaradi časovne zahtevnosti le seva *R. albus* 20455 in *R. flavefaciens* 007 S/6. Za prvi eksperiment smo potrebovali 2 (proučevali smo 2 seva naenkrat) x 2 (2 paralelki) x 2 (2 koncentraciji evgenola) x 4 (za 4 meritve, ki smo jih določili iz rastnih krivulj) = 32 Hungate epruvet ter za vsak sev še dve kontroli (rast v gojišču brez evgenola), torej 36 epruvet oz. vzorcev za dva seva. V drugem eksperimentu smo namesto dveh proučevali tri različne koncentracije evgenola, kar je pomenilo 2 x 2 x 3 x 4 = 48 epruvet ter za vsak sev še dve kontroli, torej 52 Hungate epruvet oz. vzorcev za

analizo. Vsako epruveto z 8 ml gojišča (kontrola) oz. z 8 ml gojišča in dodatkom evgenola v ustrezni koncentraciji smo v anaerobni komori inokulirali s 100 μ l čeznočne (~16-urne) kulture posameznega seva (~1,25 vol.%), spremljali naraščanje OD vrednosti v kontrolnih vzorcih posameznih sevov ter ob ustreznih vrednostih za kontrolne vzorce in vzorce z dodanim evgenolom izvedli načrtovane meritve, kar je potekalo v štirih za sev specifičnih časih tekom poskusa.

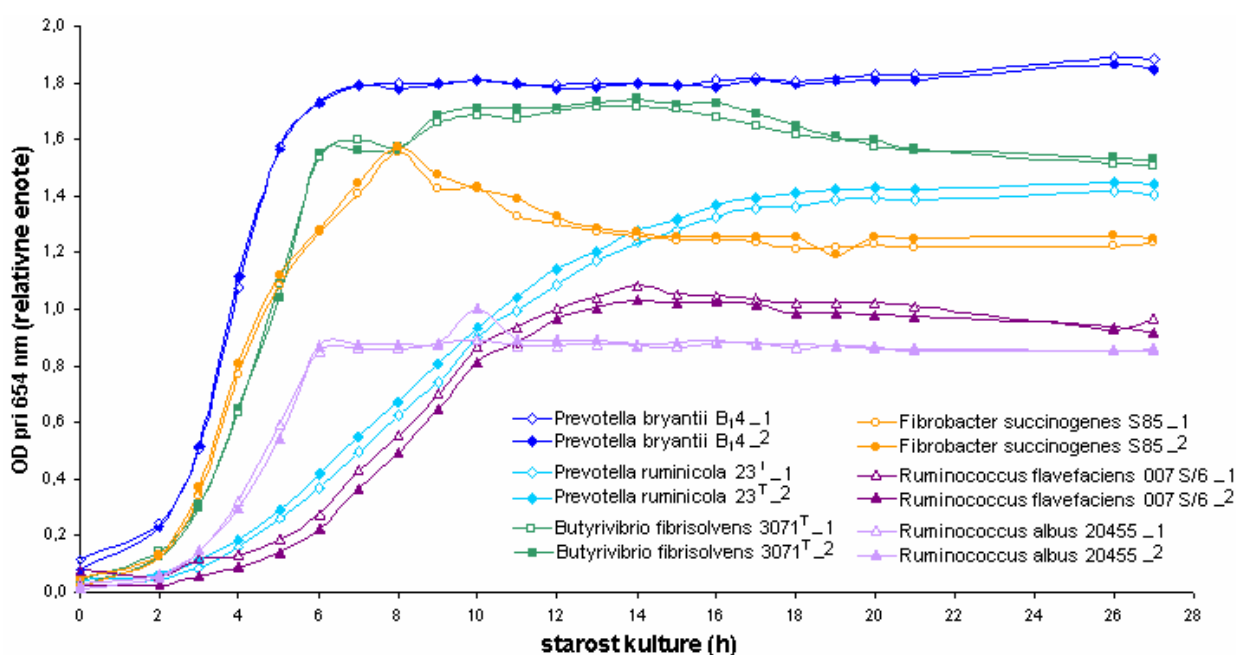
Prve tri meritve so potekale v eksponentni fazi rasti, kjer smo izmerili optično gostoto tekočih kultur, pH in določili koncentracijo celičnih proteinov po Lowryju. Pri četrti meritvi, ki je potekala v stacionarni fazi rasti, pa smo naredili še plinsko analizo atmosfere med kulturami (za seva *B. fibrisolvens* 3071^T in *R. albus* 20455) ter ekstrakcijo kratkoveržnih maščobnih kislin in njihovo analizo (za vse seve). Kljub različni hitrosti celične rasti posameznih sevov smo z določitvijo štirih meritvenih točk glede na rastne krivulje rezultate med sevi lahko primerjali.

4 REZULTATI

4.1 GOJENJE ČISTIH BAKTERJSKIH KULTUR ZA UMERITEV RASTNIH KRIVULJ

Iz meritev OD smo pripravili rastne krivulje za vseh šest proučevanih sevov v M2 gojišču brez dodatka evgenola (Slika 8). Iz rastnih krivulj sevov pred poskusom smo lahko določili začetek, sredino in konec eksponentne faze rasti posameznega seva ter tako določili čas inkubacije, po katerem smo nato v poskusu rast zaustavili in opravili opisane meritve.

Na Sliki 8 vidimo, da sta rastni krivulji obeh paralelk posameznega seva primerljivi, vidimo pa tudi razlike v hitrosti in maksimumu rasti za posamezne seve. Glede na prikazane krivulje smo izbrali po dva seva s podobno hitrostjo rasti (*P. ruminicola* 23^T in *R. flavefaciens* 007 S/6, *R. albus* 20455 in *F. succinogenes* S85 ter *P. bryantii* B₁₄ in *B. fibrisolvens* 3071^T), ki smo ju skupaj proučevali pri poskusu z nizko in visoko koncentracijo evgenola.



Slika 8: Rastne krivulje sevov

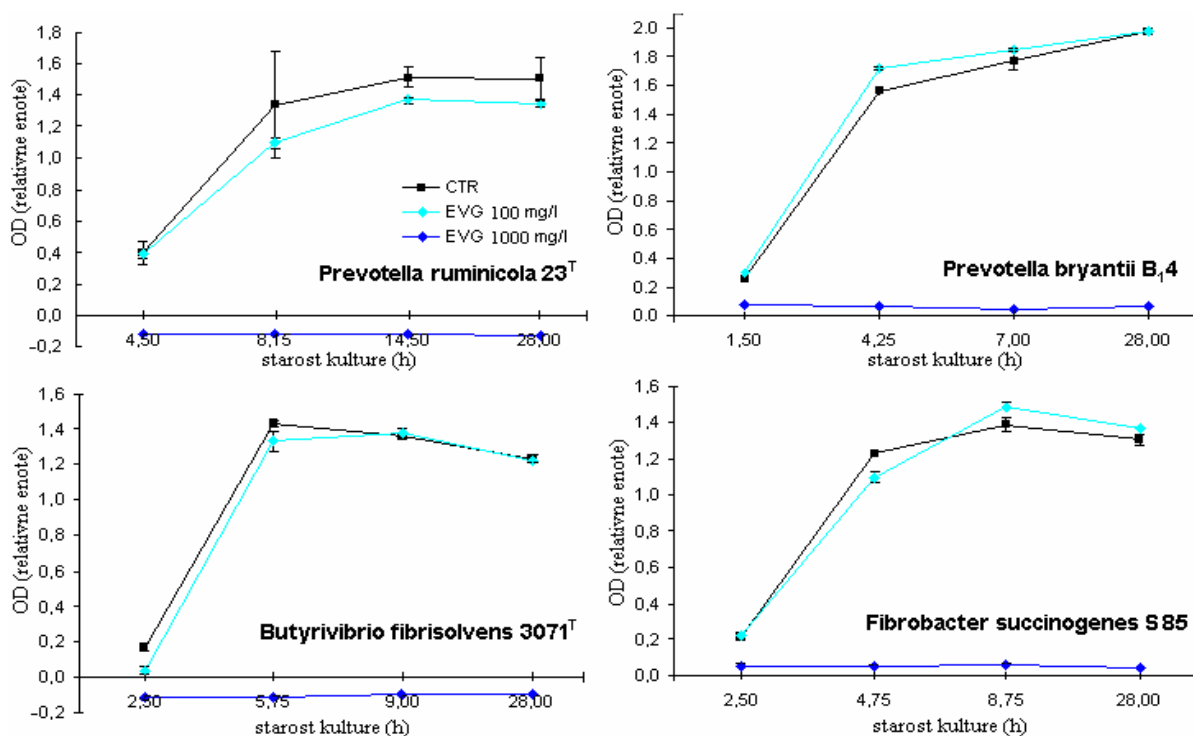
Hitro rast smo zabeležili pri sevih *R. albus*, *B. fibrisolvens*, *P. bryantii* in *F. succinogenes*. Našteti sevi so eksponentno fazo celične rasti zaključili v 6 do 8 urah po inokulaciji v tekoče M2 gojišče. Pri tem so vsi sevi prvo uro do dve po inokulaciji potrebovali za adaptacijo na rastne razmere. Počasnejšo celično rast sta izkazala seva *R. flavefaciens* in *P. ruminicola*, ki sta za nastop stacionarne faze celične rasti potrebovala dlje časa, točno starost ali maksimalno OD₆₅₄ vrednost kultur ob prehodu v stacionarno fazo pa je bilo

zaradi položne oblike krivulje težko natančno določiti. Četrto – zadnjo meritev poskusa smo opravili pri 28 ur starih kulturah in iz krivulj rasti vidimo, da so po tem času inkubacije vsi sevi gotovo v stacionarni fazi rasti.

4.2 RAST IZBRANIH BAKTERIJSKIH SEVOV V GOJIŠČIH Z IN BREZ EVGENOLA

4.2.1 Merjenje optične gostote

Z merjenjem optične gostote smo spremljali rast mikroorganizmov glede na različne koncentracije evgenola v gojišču v primerjavi s kontrolo, kjer v gojišče nismo dodali evgenola. Naslednji grafikoni (Slika 9) prikazujejo meritve optične gostote različnih sevov pri koncentraciji evgenola 100 in 1000 mg/l. Prikazane so tudi vrednosti standardnih odklonov med dvema paralelkama posameznih meritev.

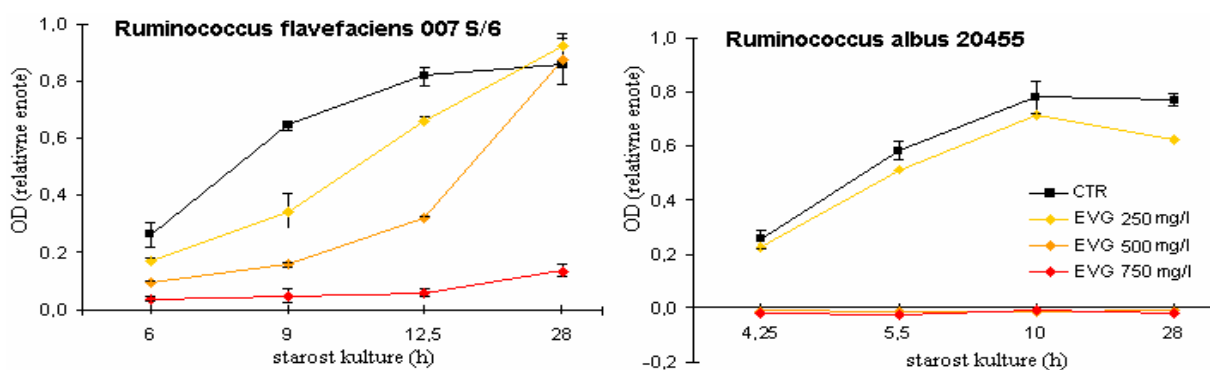


Slika 9: Rast (OD₆₅₄) v odvisnosti od časa za seve *P. ruminicola* 23^T, *P. bryantii* B₁₄, *B. fibrisolvens* 3071^T in *Fibrobacter succinogenes* S85 pri dveh koncentracijah evgenola

Z meritvami optične gostote smo ugotovili, da je evgenol v koncentraciji 1000 mg/l popolnoma inhibiral rast sevov *P. ruminicola* 23^T, *P. bryantii* B₁₄, *B. fibrisolvens* 3071^T in *F. succinogenes* S85 (Slika 9). Evgenol v nižji koncentraciji (100 mg/l) na celično rast omenjenih sevov ni imel vpliva oz. je le delno inhibiral obseg rasti pri sevu *P. ruminicola* 23^T. Stacionarna faza celične rasti je bila pri vzorcih z nižjo koncentracijo evgenola dosežena v podobnem času kot pri kontrolnem vzorcu. Celična rast se je nato z ustalitvijo

rastne krivulje ustavila. Negativne OD vrednosti so posledica minimalnih razlik v absorbanci med gojiščem s katerim smo umerili spektrofotometer ter vzorci, čeprav so bila vsa gojišča iz iste serije.

Za podrobnejšo analizo bi bile potrebne meritve celične rasti pri vmesnih koncentracijah evgenola v vzorcu, kar smo napravili za seva *R. flavefaciens* 007 S/6 in *R. albus* 20455. Tu smo testirali tri vmesne koncentracije evgenola: 250, 500 in 750 mg/l. Rezultati merjenja optične gostote za seva *R. flavefaciens* 007 S/6 in *R. albus* 20455 pri treh vmesnih koncentracijah evgenola so z vrednostmi standardnih odklonov med dvema paralelkama poskusa prikazani v spodnjih grafikonih (Slika 10).

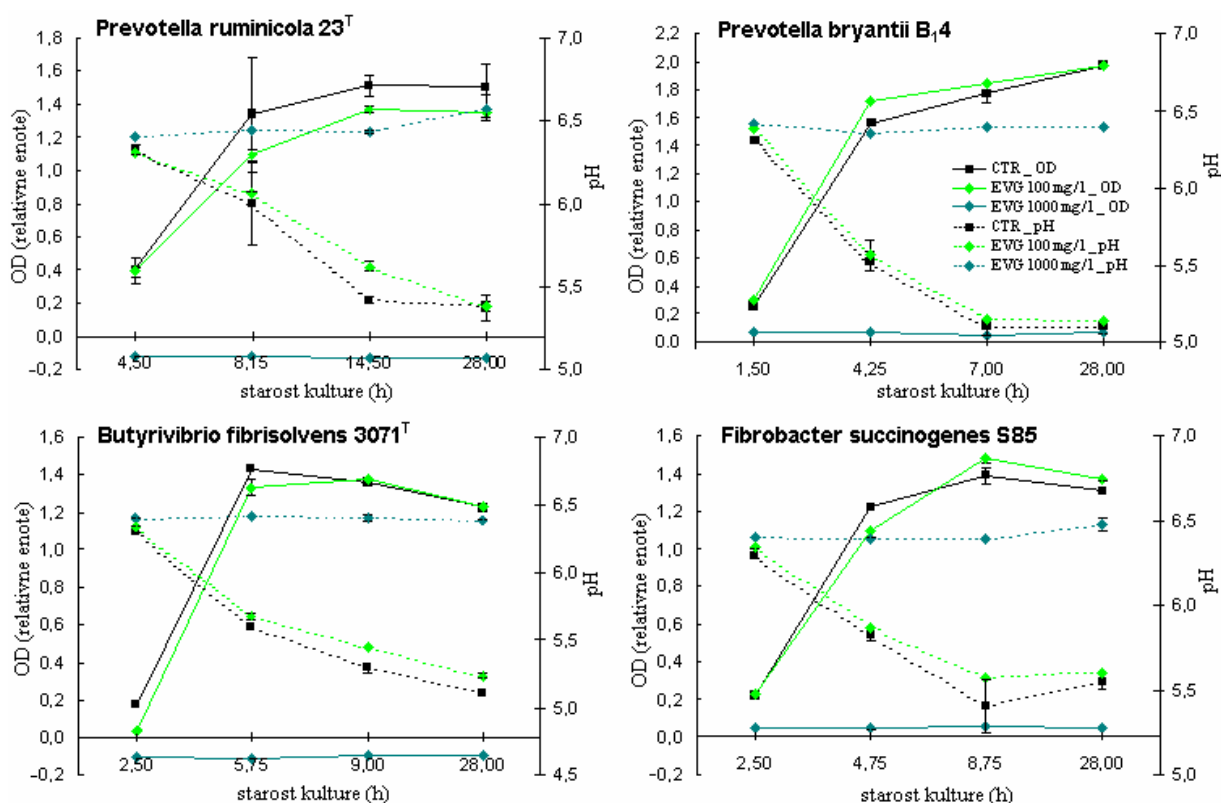


Slika 10: Rast (OD₆₅₄) v odvisnosti od časa za seva *R. flavefaciens* 007 S/6 in *R. albus* 20455 pri treh koncentracijah evgenola

Pri vzorcih z višjo koncentracijo evgenola (750 mg/l) je bila celična rast seva *R. albus* 20455 popolnoma inhibirana, pri sevu *R. flavefaciens* 007 S/6 pa sta bila delno inhibirana hitrost in obseg celične rasti (Slika 10). Faza prilagajanja je bila pri sevu *R. flavefaciens* 007 S/6 podaljšana, nadaljni potek celične rasti pa bi bilo potrebno spremljati dlje časa, t.j. več kot 28 ur. Rasti sevov po tem času nismo spremljali. V vzorcih s srednje visoko koncentracijo evgenola (500 mg/l) smo pri sevu *R. albus* 20455 še vedno beležili popolno inhibicijo rasti, pri sevu *R. flavefaciens* 007 S/6 pa le delno inhibicijo hitrosti in obsega celične rasti. V vzorcih z nižjo koncentracijo evgenola (250 mg/l) celična rast ni bila inhibirana oz. je bil le delno inhibiran obseg rasti pri sevu *R. flavefaciens* 007 S/6. V izbranem koncentracijskem območju (med 0 in 750 mg/l) je bil odnos med koncentracijo evgenola in inhibicijo hitrosti celične rasti seva *R. flavefaciens* 007 S/6 sorazmeren, t.j. večja koncentracija evgenola je ustrezno bolj inhibirala hitrost rasti kot manjša koncentracija evgenola. O vplivu na obseg njegove rasti pa bi lahko več sklepali, če bi merili OD tudi pri starejših kulturah. Pri sevu *R. albus* 20455 je bil odnos med koncentracijo evgenola in inhibicijo rasti v izbranem koncentracijskem območju evgenola nesorazmeren. Potrebno bi bilo testirati še vmesne koncentracije evgenola med 250 in 500 mg/l.

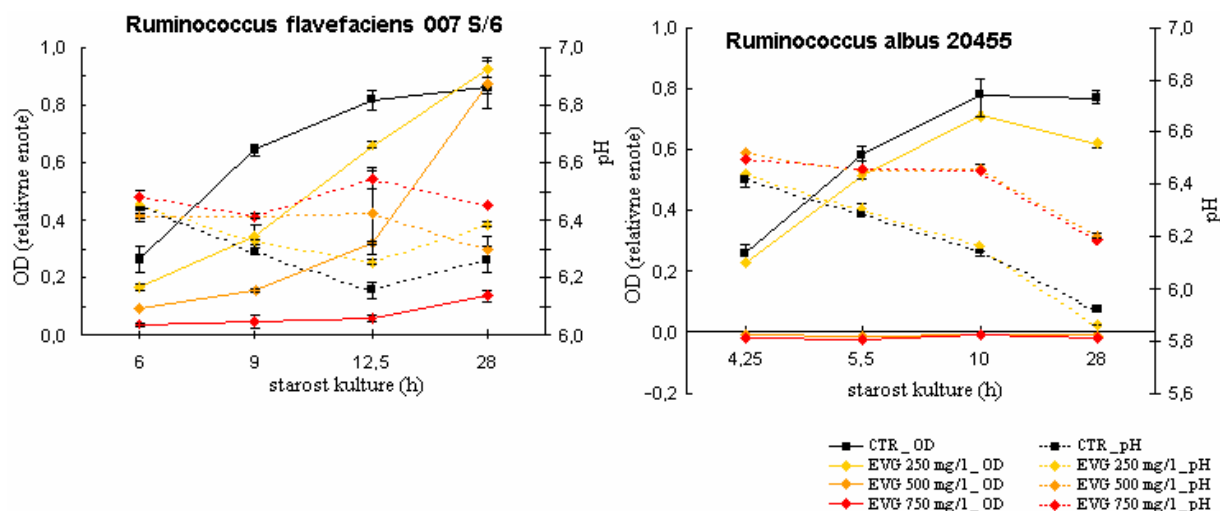
4.2.2 Merjenje pH

Ob pojavu mikrobne rasti smo pri vseh vzorcih zaznali padec pH vrednosti v gojišču, kar smo pripisali mikrobni produkciji kislin, mikrobna nedejavnost pa je povzročila ustalitev pH vrednosti. Iz tega smo sklepali na dogajanje v vzorcu, natančneje na mikrobno aktivnost ali neaktivnost. Ugotovili smo tudi, da meritve pH zaradi majhnih sprememb vrednosti niso zelo informativne pri vrednotenju rezultatov celične rasti. Rezultati so prikazani v spodnjih grafikonih (Sliki 11 in 12).



Slika 11: pH in rast (OD₆₅₄) v odvisnosti od časa za seve *P. ruminicola* 23^T, *P. bryantii* B₁₄, *B. fibrisolvens* 3071^T in *F. succinogenes* S85 pri dveh koncentracijah evgenola

Ob popolni inhibiciji rasti v vzorcih z evgenolom v koncentraciji 1000 mg/l pri sevih *P. ruminicola* 23^T, *P. bryantii* B₁₄, *B. fibrisolvens* 3071^T in *F. succinogenes* S85 se tudi pH vrednosti niso spreminjale (Slika 11). To je dokazovalo mikrobno nedejavnost. Nasprotno, evgenol v nižji koncentraciji (100 mg/l) pri naštetih sevih ni imel inhibitornega učinka in je mikrobno aktivnost izkazovalo postopno padanje pH vrednosti. Pri tem se krivulje vzorcev z evgenolom v nižji koncentraciji in krivulje kontrolnega vzorca niso dosti razlikovale. Padec pH vrednosti je bil sorazmeren glede na mikrobno rast v gojišču. Večja kot je bila inhibicija rasti, manjša je bila sprememba pH gojišča oz. kulture. Rezultati meritev pH vrednosti za seva *R. flavefaciens* 007 S/6 in *R. albus* 20455, kjer smo upoštevali tri zaporedne koncentracije evgenola, so prikazani v spodnjih grafikonih (Slika 12).



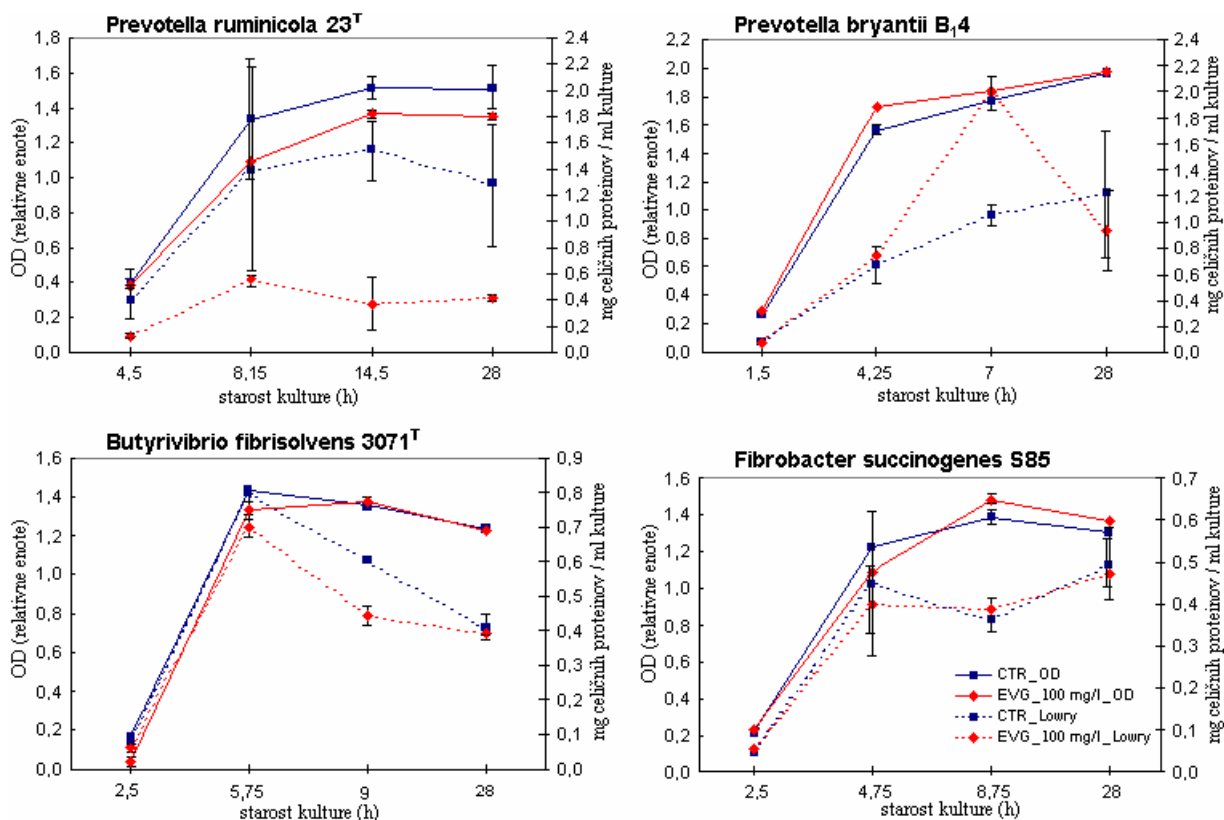
Slika 12: pH in rast (OD₆₅₄) v odvisnosti od časa seva *R. flavefaciens* 007 S/6 in *R. albus* 20455 pri treh koncentracijah evgenola

Evgenol je v višji koncentraciji (750 mg/l) popolnoma inhibiral celično rast sevov *R. flavefaciens* 007 S/6 in *R. albus* 20455 (Slika 12), pri čemer se pH vrednosti niso dosti spreminjale. Evgenol v srednje visoki koncentraciji (500 mg/l) je imel pri obeh sevih prav tako inhibitoren učinek. Pri obeh sevih smo ob srednje visoki in visoki koncentraciji evgenola padec pH vrednosti v zadnji meritvi pripisali možnosti posledice lize mikrobnih celic in izlivu celičnih komponent v fazi odmiranja. V vzorcih z nižjo koncentracijo evgenola (250 mg/l) celična rast seva *R. albus* 20455 ni bila inhibirana, pri sevu *R. flavefaciens* 007 S/6 pa je bil delno inhibiran obseg rasti. Pri slednjem smo v zadnji meritvi beležili porast pH vrednosti kar smo pripisali posledici zmanjšane mikrobne aktivnosti po nastopu stacionarne faze rasti.

Ugotovili smo, da je padec pH ustrezen pokazatelj mikrobne rasti v gojišču.

4.2.3 Ugotavljanje koncentracije celičnih proteinov po Lowryju

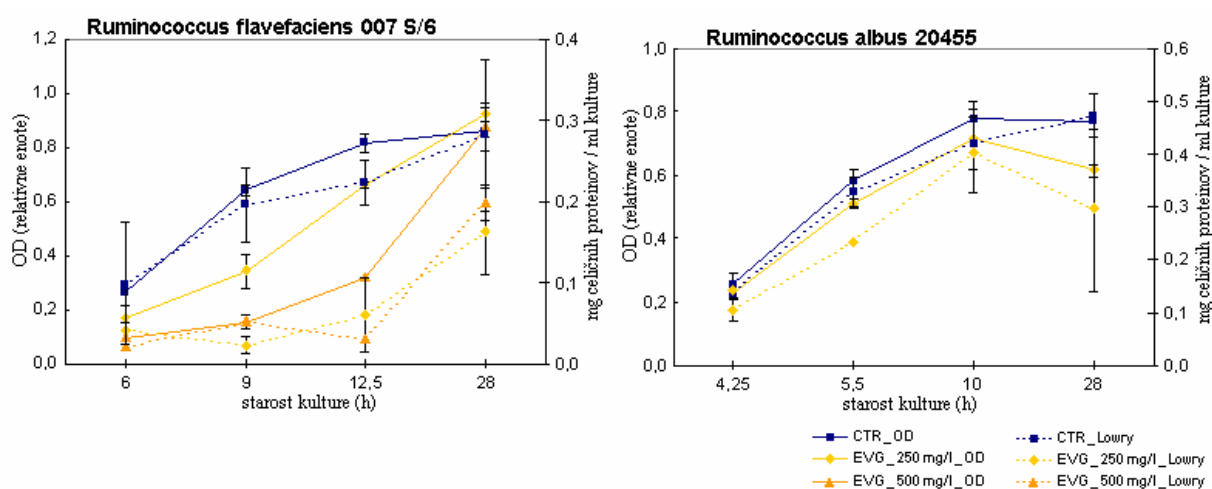
Celokupno koncentracijo celičnih proteinov, ki smo jo ugotovili z metodo po Lowryju, smo določili le pri tistih vzorcih, kjer mikrobnost rast ni bila popolnoma inhibirana. Rezultati meritev celokupnih koncentracij celičnih proteinov so grafično prikazani skupaj z rezultati meritev optične gostote (Sliki 13 in 14).



Slika 13: Koncentracija celičnih proteinov in rast (OD₆₅₄) v odvisnosti od časa za seve *P. ruminicola* 23^T, *P. bryantii* B₁₄, *B. fibrisolvens* 3071^T in *F. succinogenes* S85 pri nižji koncentraciji evgenola

Evgenol v nižji koncentraciji (100 mg/l) ni bistveno vplival na rast sevov *P. ruminicola* 23^T, *P. bryantii* B₁₄, *B. fibrisolvens* 3071^T in *F. succinogenes* S85 (Slika 13). Krivulje koncentracij celičnih proteinov vzorcev z evgenolom se niso dosti razlikovale od krivulj kontrolnih vzorcev, razen pri sevu *P. ruminicola* 23^T, kjer so bile izmerjene koncentracije celičnih proteinov opazno nižje. Dejstvo smo pripisali delni inhibiciji obsega celične rasti seva *P. ruminicola* 23^T z evgenolom v koncentraciji 100 mg/l. Rezultati meritev celokupne koncentracije celičnih proteinov po Lowryju so bili iz tega vidika v primerjavi z rezultati meritev optične gostote zanimiv odziv mikrobne rasti na izbrano koncentracijo evgenola. Do neke mere podoben fenomen smo opazili pri sevih *B. fibrisolvens* 3071^T in *F. succinogenes* S85, kjer smo po nastopu stacionarne faze rasti ugotovili zmanjšanje celokupne koncentracije celičnih proteinov v primerjavi z rezultati meritev optične gostote. Zaradi spreminjanja števila in velikosti celic ter lize mikrobnih celic v fazi odmiranja in

izliva celičnih komponent so lahko OD vrednosti manj zanesljive od dejanskih vrednosti celokupnih koncentracij celičnih proteinov, ki so v neposredni povezavi z uspešnostjo celične rasti. Od pričakovane koncentracije je odstopala tudi krivulja celokupnih koncentracij celičnih proteinov seva *P. bryantii* B₁₄ z evgenolom v nižji koncentraciji. Tu smo sklepali, da je prišlo do analitske napake, in bi bilo potrebno, preden podamo zaključke, analizo za ta vzorec ponoviti. Rezultati meritev ugotavljanja celokupnih koncentracij celičnih proteinov po Lowryju za seva *R. flavefaciens* 007 S/6 in *R. albus* 20455, kjer smo upoštevali tri zaporedne koncentracije evgenola, so prikazani v spodnjih grafikonih (Slika 14).



Slika 14: Koncentracija celičnih proteinov in rast (OD₆₅₄) v odvisnosti od časa za seva *R. flavefaciens* 007 S/6 in *R. albus* 20455 pri nižjih koncentracijah evgenola

Rezultati meritev celokupnih koncentracij celičnih proteinov po Lowryju so pri sevu *R. flavefaciens* 007 S/6 izkazali delno inhibicijo hitrosti in obsega celične rasti pri obeh merjenih koncentracijah evgenola t.j. 250 in 500 mg/l (Slika 14). Krivulji meritev celokupnih koncentracij vzorcev z evgenolom pri sevu *R. flavefaciens* 007 S/6 bolj odstopata od pričakovane krivulje kontrolnega vzorca. Pri sevu *R. albus* 20455 je to odstopanje manjše. Mikrobna rast pri sevu *R. albus* 20455 z evgenolom v koncentraciji 250 mg/l, glede rezultatov meritev celokupnih koncentracij celičnih proteinov, ni bila inhibirana.

Ugotovili smo, da je padeč celokupne koncentracije celičnih proteinov tudi do neke mere ustrezen pokazatelj manjše mikrobne aktivnosti v gojišču ter da za razliko od meritev optične gostote pokaže določene spremembe v proučevanih rezultatih.

4.3 EKSTRAKCIJA KMK IN PLINSKA KROMATOGRAFIJA ZA DOLOČANJE VODIKA

4.3.1 Ugotavljanje koncentracije kratkoverižnih maščobnih kislin

Glavni mikrobní produkti kratkoverižnih maščobnih kislin proučevanih bakterijskih sevov so naslednji: acetat (ocetna kislina), propionat (propionska kislina) in butirat (i-maslena in n-maslena kislina). Ocetna kislina ima izmed naštetih kislin v poskusu najkrajšo verigo, zato je tudi najbolj hlapna, meritve pa zato najbolj nezanesljive. Del ekstrahiranih KMK v vseh vzorcih izhaja iz samega M2 gojišča in ni posledica mikrobne produkcije proučevanih sevov, kar smo upoštevali (odšteli) pri izračunu končnih rezultatov. Parcialni volumen ocetne in propionske kisline je pri večih vzorcih tik pred meritvijo popolnoma izhlapel in je po odštetju celokupne koncentracije KMK M2 gojišča zato izkazal negativno vrednost. Analiza in interpretacija rezultatov meritev KMK je bila zaradi eksperimentalnih napak otežkočena in je zato vprašljiva. Eksperimentalne napake so bile najverjetneje večinoma posledica ne dovolj hitrega izvajanja etrske ekstrakcije v obdobju in intenzivnega izhlapevanja vzorca ter neenakomerno razporejenih volumnov paralelnih vzorcev, ki so posledica mehurčkov v pipeti pri pipetiranju ipd. Pri tem smo težko določili sam vpliv posledice spreminjanja velikosti mikrobnih celic, spreminjanja vsebine vzorčne raztopine zaradi lize mikrobnih celic ipd. Rezultate smo statistično ovrednotili s Studentovim t-testom. Rezultate meritev KMK smo analizirali le pri neinhibitornih koncentracijah evgenola. V nadaljevanju sta prikazani tabela meritev celokupnih koncentracij KMK in tabela razmerij parcialnih volumnov KMK izbranih sevov (Preglednici 10 in 11).

Preglednica 10: Tabela celokupnih koncentracij KMK pri izbranih sevih

sev \ HMK		acetat (g/l)	propionat (g/l)	butirat (g/l)	skupaj (g/l)
<i>Prevotella ruminicola</i> sev 23 ^T	CTR	1.555	0.190	0.010	1.755
	100 mg/l	1.116	0.081	0.000	1.197
	1000 mg/l	/	/	/	0.000
<i>Prevotella bryantii</i> sev B ₁₄	CTR	2.855	0.000	0.000	2.855
	100 mg/l	0.750	0.000	0.000	0.750
	1000 mg/l	/	/	/	0.000
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> sev 3071 ^T	CTR	0.000	0.000	1.135	1.135
	100 mg/l	1.034	0.000	1.195	2.229
	1000 mg/l	/	/	/	0.000
<i>Fibrobacter succinogenes</i> sev S 85	CTR	0.000	0.000	1.458	1.458
	100 mg/l	0.000	0.000	1.304	1.304
	1000 mg/l	/	/	/	0.000
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> sev 007 S/6	CTR	0.000	0.000	0.000	0.000
	250 mg/l	0.000	0.000	0.000	0.000
	500 mg/l	0.000	0.000	0.000	0.000
	750 mg/l	/	/	/	0.000
<i>Ruminococcus albus</i> sev 20455	CTR	0.096	0.000	0.000	0.096
	250 mg/l	0.970	0.000	0.000	0.970
	500 mg/l	/	/	/	0.000
	750 mg/l	/	/	/	0.000

Polja označena s poševnico označujejo popolno inhibicijo celične rasti in mikrobnе produkcije KMK zaradi inhibitorne koncentracije dodanega evgenola, medtem ko so vrednosti meritev celokupnih koncentracij KMK, označene z "0,000", posledica eksperimentalne napake zaradi intenzivnega izhlapevanja vzorca in neenakomerno razporejenih volumnov paralelnih vzorcev (Preglednici 10 in 11). Obarvane vrednosti izkazujejo statistično značilnost. Tu so bili rezultati meritev glede na kontrolni vzorec statistično značilno različni. Zaradi majhnega števila paralelnih vzorcev so bili rezultati statistično pomanjkljivi.

Pri sevu *P. ruminicola* 23^T z evgenolom v koncentraciji 100 mg/l smo z meritvami optične gostote določili delno inhibicijo obsega celične rasti (Slika 9). Temu primerno manjša je tudi celokupna koncentracija KMK (Preglednica 10). Vse meritve seva *P. ruminicola* 23^T so bile statistično značilne razen meritve volumna maslene maščobne kisline, ki pa je bila z majhnim odstopanjem zelo blizu mejnemu območju statistično značilnih razlik. Pri sevu *P. ruminicola* 23^T smo ugotovili, da je z inhibicijo mikrobnе rasti ustrezno zmanjšana tudi mikrobnа aktivnost in s tem produkcija KMK. Evgenol v koncentraciji 100 mg/l na rast seva *P. bryantii* B₁₄ ni imel bistvenega vpliva, kar smo dokazali z meritvami optične gostote (Slika 9). Manjšega celokupnega volumna KMK v vzorcu z evgenolom v primerjavi s kontrolnim vzorcem zato nismo pripisali posledici zmanjšane mikrobnе aktivnosti pač pa eksperimentalni napaki. Glede na kritične mejne vrednosti Student t-testa so bile meritve statistično značilne. Pri sevu *R. albus* 20455 je bila posledica

eksperimentalne napake nižja celokupna koncentracija KMK kontrolnega vzorca, pri sevih *B. fibrisolvans* 3071^T, *F. succinogenes* S85 in *R. flavefaciens* 007 S/6 pa meritve niso presegle statistično kritične meje (t-vrednosti so bile blizu "0" ali negativne) oz. so zaradi eksperimentalnih napak izkazale negativno vrednost.

Preglednica 11: Tabela razmerij parcialnih volumnov KMK pri izbranih sevih

sev \ razmerje HMK	acetat (g/l)	propionat (g/l)	butirat (g/l)	
<i>Prevotella ruminicola</i> sev 23 ^T	CTR	1.00	0.18	0.13
	100 mg/l	1.00	0.17	0.00
	1000 mg/l	/	/	/
<i>Prevotella bryantii</i> sev B ₁₄	CTR	1.00	0.00	0.00
	100 mg/l	1.00	0.00	0.00
	1000 mg/l	/	/	/
<i>Butyrivibrio fibrisolvans</i> sev 3071 ^T	CTR	0.00	0.00	1.00
	100 mg/l	1.00	0.00	0.56
	1000 mg/l	/	/	/
<i>Fibrobacter succinogenes</i> sev S 85	CTR	0.00	0.00	1.00
	100 mg/l	0.00	0.00	1.00
	1000 mg/l	/	/	/
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> sev 007 S/6	CTR	0.00	0.00	0.00
	250 mg/l	0.00	0.00	0.00
	500 mg/l	0.00	0.00	0.00
	750 mg/l	/	/	/
<i>Ruminococcus albus</i> sev 20455	CTR	1.00	0.00	0.00
	250 mg/l	1.00	0.00	0.00
	500 mg/l	/	/	/
	750 mg/l	/	/	/

Razmerja parcialnih volumnov KMK (Preglednica 11) so bila posledično zaradi eksperimentalnih napak pri merjenju in nezmožnosti ugotovitve mikrobne ne/aktivnosti neopredeljena. Za natančnejšo določitev produkcije kratkoverižnih maščobnih kislin in njihovih razmerij bi v poskusu potrebovali več paralelnih vzorcev oz. več ponovitev. S tem bi zmanjšali potencialno vrednost razlik med paralelkami in eksperimentalnih napak pri pipetiranju in merjenju KMK.

4.3.2 Plinska kromatografija za določanje vodika

Produkcijo vodika smo določili za seva *R. albus* 20455 in *B. fibrisolvans* 007 S/6 pri neinhibitornih koncentracijah evgenola. Neinhibitorna koncentracija evgenola je za sev *R. albus* 20455 znašala 250 mg/l, za sev *B. fibrisolvans* 007 S/6 pa 100 mg/l. V tem koncentracijskem območju celična rast in produkcija plinov nista bili ovirani, zato smo v vzorcih beležili povečanje parcialnega tlaka vodika, vendar pri obeh produkcija vodika glede na Student t-test v primerjavi s kontrolnim vzorcem ni bila statistično značilno različna. V višjem koncentracijskem območju produkcije plinov zaradi inhibicije celične rasti in mikrobne neaktivnosti nismo pričakovali in merili.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Z izolacijo in gojenjem čistih kultur lahko na podlagi različnih mikrobioloških in biokemijskih metod seve fenotipsko proučujemo in opredelimo. Sposobnost *in vitro* gojenja večine mikroorganizmov iz ekoloških vzorcev je zaradi nepoznavanja rastnih dejavnikov in s tem neusteznih gojitvenih razmer omejena (Amann in sod., 1995). Vpliv proučevanih učinkovin lahko proučujemo le pri tistih vampnih bakterijah, ki jih znamo gojiti. Razmer, ki bi omogočale rast vseh vampnih mikroorganizmov, še ne poznamo dobro, zato je njihovo gojenje v obliki čistih kultur težavna (Hobson, 1997). Proučevanje še dodatno otežujejo anaerobne razmere in prehranska soodvisnost mikrobnih simbiotov ter sposobnost specifičnega fiziološkega stanja, ki omogoča preživetje, ne pa tudi rasti na gojišču (VNC; angl. *viable but not culturable*) (Savage, 1995). Vpliv evgenola na čiste seve je v primerjavi z mešanimi *in vitro* kulturami oz. *in vivo* sistemi zaradi sinergizma najverjetneje različen (Cvar, 1998).

Ob meritvah optične gostote vzorcev smo pri sevu *P. ruminicola* 23^T ugotovili, da je evgenol pri nižji koncentraciji (100 mg/l) že delno inhibiral obseg celične rasti, pri čemer pa hitrost celične rasti še ni bila zavirana. Popolno inhibicijo seva *P. ruminicola* 23^T smo dosegli z evgenolom v višji koncentraciji (1000 mg/l). Ostali sevi (*P. bryantii* B₁₄, *B. fibrisolvens* 3071^T in *F. succinogenes* S85), testirani z nizko in visoko koncentracijo evgenola, so bili na evgenol v koncentraciji 100 mg/l neobčutljivi, ob dodatku evgenola s koncentracijo 1000 mg/l pa smo beležili popolno inhibicijo rasti. Za seva *R. flavefaciens* 007 S/6 in *R. albus* 20455 smo delno inhibitorne učinke na obseg celične rasti dosegli z dodatkom evgenola v koncentraciji 250 mg/l. S povečevanjem koncentracije evgenola smo pri sevu *R. albus* 20455 ob koncentraciji evgenola 500 in 750 mg/l dosegli popolnoma inhibitorne učinke, pri sevu *R. flavefaciens* 007 S/6 pa le delno inhibitorne učinke na hitrost in obseg celične rasti. Za nadaljno raziskavo bi bilo potrebno daljše opazovanje seva *R. flavefaciens* 007 S/6, pri katerem je bila ob prisotnosti evgenola v koncentraciji 750 mg/l faza prilagajanja podaljšana. Dvig optične gostote v zadnji meritvi (28 ur po inokulaciji) je nakazoval začetek celične rasti. Pri ostalih proučevanih sevih bi bila potrebna podrobnejša preiskava učinka inhibicije za natančnejšo določitev območja učinka evgenola s testiranjem zaporednih koncentracij med inhibitornim in neinhibitornim učinkom evgenola.

Glede meritev pH je ob mikrobni dejavnosti pri neinhibitornih koncentracijah evgenola pri vseh sevih vrednost pH v raztopini padala do nastopa stacionarne faze celične rasti, nato pa se je ustalila oziroma je pričela polagoma naraščati. Porast pH vrednosti v fazi odmiranja

smo pripisali posledici lize mikrobnih celic in izlitju celične vsebine. Ob inhibitornih koncentracijah evgenola se pH vrednost ni veliko spreminjala. Merjenje pH zaradi majhnih odstopanj ni preveč uporabno za spremljanje mikrobne rasti. Rezultati meritev pH so se pokazali kot zanesljivi a nenatančni in smo jih uporabili le za primerjavo z rezultati meritev optične gostote v analizi uspešnosti celične rasti.

Meritve celokupne koncentracije celičnih proteinov po Lowryju so potrdile oceno uspešnosti rasti mikrobnih celic posameznega vzorca s strani rezultatov meritev optične gostote in meritev pH vrednosti. Padec celokupne koncentracije celičnih proteinov kot posledica inhibitorne dejavnosti evgenola je bil sorazmeren padcu optične gostote ali pH vrednosti. Evgenol je v koncentraciji 1000 mg/l pri sevih *P. ruminicola* 23^T, *P. bryantii* B₁₄, *B. fibrisolvans* 3071^T in *F. succinogenes* S85 popolnoma inhibiral celično rast, zaradi česar koncentracije celičnih proteinov nismo ugotavljali. Mikrobno neaktivnost in popolno inhibicijo rasti smo beležili tudi pri vzorcih z evgenolom v koncentraciji 750 mg/l pri sevu *R. flavefaciens* 007 S/6 in vzorcih z evgenolom v koncentraciji 500 in 750 mg/l pri sevu *R. albus* 20455. Pri slednjih dveh sevih smo izmerili tudi vpliv dveh vmesnih koncentracij evgenola (250 mg/l oz. 250 in 500 mg/l oz.). Pri sevu *R. flavefaciens* 007 S/6 je evgenol pri obeh vmesnih koncentracijah delno inhibiral celično rast, kar smo dokazali z zmanjšanjem celokupne koncentracije celičnih proteinov v vzorcu. Pri sevu *R. albus* 20455 pa evgenol v koncentraciji 250 mg/l na celično rast ni imel bistvenega vpliva. Dejstvo smo dokazali s podobnimi celokupnimi koncentracijami celičnih proteinov vzorca z evgenolom in kontrolnega vzorca. Pri sevu *R. albus* 20455 in *R. flavefaciens* 007 S/6 vpliva evgenola v koncentraciji 100 mg/l nismo merili. Pri ostalih sevih evgenol v koncentraciji 100 mg/l ni imel inhibitornega učinka na celično rast in proizvodnjo celičnih proteinov, razen pri sevu *P. ruminicola* 23^T, kjer so bile izmerjene koncentracije celičnih proteinov opazno nižje v primerjavi s kontrolnim vzorcem brez evgenola. Tu smo sklepali na možnost neustreznosti manj natančnih izbranih metod za ugotavljanje uspešnosti mikrobne rasti oz. na delno inhibitoren učinek pri evgenolu v koncentraciji 100 mg/l. Za padec celokupne koncentracije celičnih proteinov namreč ne moremo natančno sklepati ali je to posledica proteolize v samih celicah in izhajanje oligopeptidov v raztopino ter izguba le teh v procesu ugotavljanja koncentracije celičnih proteinov po Lowryju ali pa posledica eksponentne napake.

Pri merjenju volumna kratkoverižnih maščobnih kislin smo z višanjem koncentracije evgenola v vzorcu beležili pričakovani trend upadanja produkcije KMK ter iz tega sklepali na mikrobno ne/aktivnost in uspešnost celične rasti. Vendar je bila analiza in interpretacija rezultatov meritev KMK zaradi pogostih eksperimentalnih napak in statistične neznačilnosti vprašljiva in s tem neopredeljena. Edini zadovoljiv rezultat pri meritvah celokupne koncentracije KMK smo dosegli pri sevu *P. ruminicola* 23^T z evgenolom v

koncentraciji 100 mg/l, kjer smo glede na meritve optične gostote dokazali delno inhibicijo obsega celične rasti z ustreznim zmanjšanjem celokupne koncentracije KMK v vzorcu. Vse meritve seva *P. ruminicola* 23^T so bile tudi statistično značilne razen meritve volumna maslene maščobne kisline, ki pa je bila z majhnim odstopanjem zelo blizu mejnemu območju statistično značilnih razlik.

Meritve koncentracij plinov pri producentih vodika (*B. fibrisolvans* 3071^T in *R. albus* 20455), ki je prekursor za proizvodnjo metana, glede na Student t-test v primerjavi s kontrolnim vzorcem niso bile statistično značilno različne. Merili smo produkcijo H₂ pri neinhibitornih koncentracijah evgenola: 100 mg/l za sev *B. fibrisolvans* 3071^T in 250 mg/l za sev *R. albus* 20455 ter pri obeh beležili povečanje parcialnega tlaka vodika s statistično neznačilnimi rezultati. Pri višjih – inhibitornih koncentracijah evgenola mikrobnosti nismo analizirali.

V splošnem je evgenol v višji koncentraciji popolnoma inhibiral hitrost in obseg celične rasti ter mikrobnost in produkcijo kratkoverižnih maščobnih kislin in plinov. Nasprotno evgenol v nižji koncentraciji ni imel inhibitornega učinka, kar smo beležili s podobnim potekom krivulj meritev izbranih metod za ugotavljanje uspešnosti mikrobnosti rasti v primerjavi s krivuljami kontrolnih vzorcev. Celična rast in mikrobnost je v tem koncentracijskem območju potekala neovirano. Z inhibicijo celične rasti mikrobnosti ob dodatku evgenola v zadostni koncentraciji smo dokazali nespecifično antimikrobno delovanje evgenola glede izbranih sevov v poskusu (Gram pozitivnih in Gram negativnih).

Vmesne koncentracije vplivnega območja delovanja evgenola smo določevali le pri sevu *R. albus* 20455 in *R. flavefaciens* 007 S/6, vendar je bil odnos med koncentracijo evgenola in inhibicijo hitrosti celične rasti sorazmeren le pri sevu *R. flavefaciens* 007 S/6. Za natančnejše poznavanje vpliva evgenola bi bilo potrebno proučiti več zaporednih koncentracij evgenola med neinhibitornim in inhibitornim učinkom, t.j. med 100 in 100 mg/l oz. 100 in 750 mg/l.

Raziskave, ki smo jih opravili v tem diplomskem delu na čistih sevih, bi lahko nadaljevali z raziskavami na mešanih kulturah v zaprtem fermentorju, pretočnem fermentorju ter z *in vivo* poskusom na živalih. Šele *in vivo* poskusi bi omogočili vpogled v dejanski način delovanja evgenola na vampne mikroorganizme v njihovem naravnem okolju, kjer na rast poleg inhibitornih substanc vpliva tudi prehranski sinergizem, sestava krmnih obrokov, zdravstveno stanje živali ter drugi dejavniki. Lahko bi tudi prenesli poskusni sistem iz epruvet na mikrotitrsko plišče in tako povečali število paralelk in vzorčenj ter s tem utrdili statistično obdelavo.

5.2 SKLEPI

V našem diplomskem delu smo z nekaterimi tradicionalnimi mikrobiološkimi metodami proučevali vpliv evgenola na celično rast in aktivnost izbranih bakterijskih sevov (Preglednica 2) v tekočem modificiranem M2 gojišču. Iz sorodnih raziskav smo sklepali na neselektivno antimikrobno delovanje evgenola v zadostni koncentraciji. Večje odpornosti Gram pozitivnih oz. Gram negativnih bakterij na vpliv evgenola nismo dokazali. Z analizo celične rasti in mikrobne aktivnosti smo dokazali: (i) popolnoma inhibitoren vpliv evgenola v višji koncentraciji (1000 mg/l) pri sevih *P. ruminicola* 23^T, *P. bryantii* B₁₄, *B. fibrisolvens* 3071^T in *F. succinogenes* S85, (ii) popolnoma inhibitoren vpliv evgenola v koncentraciji 750 mg/l za seva *R. flavefaciens* 007 S/6 in *R. albus* 20455, (iii) popolnoma inhibitoren vpliv evgenola v koncentraciji 500 mg/l za sev *R. albus* 20455, (iv) delno inhibitoren vpliv evgenola v koncentraciji 500 in 250 mg/l na hitrost in obseg celične rasti za sev *R. flavefaciens* 007 S/6, (v) delno inhibitoren vpliv evgenola v koncentraciji 250 mg/l na obseg celične rasti za sev *R. albus* 20455, (vi) delno inhibitoren vpliv evgenola v koncentraciji 100 mg/l na obseg celične rasti za sev *P. ruminicola* 23^T ter (vii) neinhibitoren vpliv evgenola v koncentraciji 100 mg/l pri sevih *P. bryantii* B₁₄, *B. fibrisolvens* 3071^T in *F. succinogenes* S85.

Opisane tradicionalne mikrobiološke metode so primerne za proučevanje mikrobne rasti, vendar so zaradi opravljanja z majhnimi vzorčnimi volumni podvržene eksperimentalnim napakam pri redčenju, obdelovanju in merjenju vzorcev. Za zmanjšanje eksperimentalnih napak bi bilo potrebno povečati število paralelnih vzorcev, s tem pa bi tudi utrdili statistično obdelavo rezultatov. Podrobnejši nazor o mikrobni rasti bi lahko dosegli tudi s primerjavo rezultatov nekaterih drugih mikrobioloških metod za ugotavljanje uspešnosti mikrobne rasti, kot npr. pretočna citometrija s pretočnim citometrom za štetje in spremljanje karakteristik mikrobnih celic v vzorcu.

6 POVZETEK

Predželodci so sestavni del prebavil prežvekovalcev. So nežlezni del prebavil, ki omogoča razrast velikemu številu mikrobnih simbiotov, ki so s svojimi encimi sposobni razgraditi celične stene rastlinskih celic. Kompleksni polisaharidi namreč sestavljajo večji del krme prežvekovalcev, ki pa so za endogene encime zaradi β -glikozidnih vezi nerazgradljivi in neizkoristljivi. Simbiotski vampni mikroorganizmi pretvarjajo rastlinske polimere v kratkoverižne maščobne kisline, te pa po absorpciji skozi steno vampa in distalnih delov prebavnega trakta dnevno krijejo večino energetskih potreb gostitelja. Poleg tega predstavljajo vampni simbionti tudi pomemben vir beljakovin in vitaminov, ki postanejo dostopni po lizi mikrobnih celic v siriščniku.

Da bi izboljšali produktivnost živali v intenzivnih produkcijskih sistemih poskušajo živinorejci vampni metabolizem modificirati. Ena od možnosti je uporaba krmnih antibiotikov, ki vplivajo na strikturo mikrobnih združbe vampa in tako na učinkovitejšo fermentacijo hranilnih snovi, vendar je uporaba krmnih antibiotikov s 1. januarjem 2006 zaradi možnosti akumulacije le teh v mleku in mesu prežvekovalcev ter potenciala za razvoj in horizontalni genski prenos bakterijskih rezistenc v EU prepovedana. Zato so evropski kmetje za ohranitev konkurenčnosti na trgu primorani v iskanje alternativnih krmnih dodatkov z ustreznim učinkom na mikrobnost populacije v vampu. Takšen primer so tudi rastlinski izvlečki kot npr. evgenol – esencialno olje nageljnovih žbic, ki se v glavnem pridobiva iz tropskega drevesa klinčevca (*Eugenia caryophyllata*).

Evgenol izkazuje široko antimikrobno delovanje proti Gram-pozitivnim in Gram-negativnim bakterijam. Mehanizem antimikrobnega delovanja temelji na inhibiciji rasti mikroorganizmov zaradi akumulacije evgenola v fosfolipidnem dvosloju, kar povzroči povečano permeabilnost celične membrane in izhajanja intracelularnih komponent. Biocidna aktivnost evgenola je dosežena že pri nizkih koncentracijah. Potencialno zmanjšanje fermentativne mikrobnosti ima za posledico tudi zmanjšanje emisij toplogrednih plinov s strani vampnih arhej. Produkcijo metana lahko zmanjšamo z redukcijo proizvodnje vodika, ki ga metanogene arheje uporabljajo kot prekurzor pri sintezi CH_4 . Vodik proizvajajo nekatere vrste vampnih bakterij (*Butyrivibrio fibrisolvens* in *Ruminococcus albus*) in ciliatnih praživali.

Namen diplomskega dela je bil proučiti vpliv evgenola na fenotipske lastnosti izbranih bakterijskih sevov iz vampa (*Prevotella ruminicola* 23^T, *Prevotella bryantii* B₁₄, *Butyrivibrio fibrisolvens* 3071^T, *Ruminococcus albus* 20455, *Ruminococcus flavefaciens* 007 S/6 in *Fibrobacter succinogenes* S85). Seve smo gojili v tekočem modificiranem anaerobnem gojišču M2 za vampne bakterije z ali brez dodatka evgenola v ustrezni

koncentraciji. Ugotavljali smo vpliv visoke (1000 mg/l) in nizke koncentracije evgenola (100 mg/l) pri sevih *Prevotella ruminicola* 23^T, *Prevotella bryantii* B₁₄, *Butyrivibrio fibrisolvens* 3071^T in *Fibrobacter succinogenes* S85, oziroma vpliv višje (750 mg/l), srednje (500 mg/l) in nižje koncentracije (250 mg/l) pri sevih *Ruminococcus albus* 20455 in *Ruminococcus flavefaciens* 007 S/6. Nizko in visoko koncentracijo evgenola (100 in 1000 mg/l) smo prevzeli po že objavljenih študijah, kjer so bile ugotovljene tudi potrebe po preiskusu vmesnih koncentracij evgenola za natančnejšo določitev delovanja. Hitrost in stopnjo mikrobne rasti smo proučevali z ugotavljanjem optične gostote in pH tekočih bakterijskih kultur, koncentracije celičnih proteinov po Lowryju, nastajanja kratkoverižnih maščobnih kislin (ocetna, propionska in maslena kislina) ter parcialnega tlaka vodika.

Ugotovili smo, (i) da evgenol v enaki koncentraciji različno vpliva na izbrane bakterijske seve ter (ii) da evgenol v nižji koncentraciji (100 mg/l) nima vpliva na celično rast in mikrobno aktivnost izbranih sevov, (iii) da evgenol v višjih koncentracijah (750 in 1000 mg/l) popolnoma inhibira celično rast in mikrobno aktivnost izbranih sevov, razen pri sevu *R. flavefaciens* 007 S/6, kjer smo dopustili možnost delno inhibitornega učinka evgenola v koncentraciji 750 mg/l. Tu smo namreč v zadnji meritvi (28 ur po inokulaciji gojišča) zabeležili porast vrednosti optične gostote, kar je pomenilo zaključek faze prilagajanja, vendar zaradi prostorskih omejitev poskusa nismo nadaljevali. Pri sevu *R. flavefaciens* 007 S/6 smo poleg tega ugotovili delno inhibitoren učinek evgenola s koncentracijo 500 mg/l. Za sev *R. albus* 20455 je bila ta koncentracija popolnoma inhibitorna, pri drugih sevih pa vpliva srednje koncentracije nismo ugotavljali.

7 VIRI

- Adams D. 2006. The Healing Heritage: Clove oil. International Masters Publishers.
<http://belladonna.hypermart.net/Aromatherapedia/clove.htm> (13. jul. 2006)
- Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 59, 1: 143-169
- Barvanje po Gramu. 2007. Univerza v Novi Gorici.
<http://www.p-ng.si/~mavri/mikr/v2.pdf> (9. jan. 2007)
- Basic physiology. 2006. DeLaval: Dairy Knowledge.
http://www.delavalus.com/Dairy_Knowledge/EfficientFeeding/Basic_Physiology.htm
(30. mar. 2006)
- Basil (*Ocimum basilicum* L.). 2006. Gernot Katzer's Spice Pages.
http://www.unigratz.at/~katzer/engl/Ocim_bas.html (13. jul. 2006)
- Benchaar C., Petit H.V., Berthiaume R., White T.D., Chouinard P.Y. 2006. Effect of Addition of Essential Oils and Monensin Premix on Digestion, Ruminant Fermentation, Milk Production and Milk Composition in Dairy Cows. *American Dairy Science Association*, 89: 4352-4364
- Bowens S. 2006. All about cloves. A pinch of...
<http://www.apinchof.com/cloves1074.html> (24. maj 2006)
- Bramwell D. 2002. How many plant species are there. *Plant Talk* 28. *Plant Talk*.
<http://www.plant-talk.org/stories/28bramw.html> (8. mar. 2007)
- Bremness L. 1996. Velika knjiga o zeliščih. Ljubljana, Mladinska knjiga.
<http://www.ntfkii.uni-lj.si/etolja/> (9. jan. 2007)
- Bryant M.P. 1972. Commentary on the Hungate technique for anaerobic bacteria. *American Journal of Clinical Nutrition*, 15: 1324-1328
- Bukovec N., Brenčič J. 2000. Kemija za gimnazije 1. Ljubljana, DZS: 160 str.
- Busquet Solé M. 2005. Extractos de Plantas como Modificadores de la Fermentación Microbiana Ruminant. Tesis Doctoral. Bellaterra, Universitat Autònoma de Barcelona, Departament de Ciència Animal i dels Aliments: 179 str.
- Cardozo P.W., Calsamiglia S., Ferret A., Kamel C. 2004. Effects of plant extracts on ruminal protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. *Journal of Animal Science*, 82: 3230-3236

- Cestnik V. 2004. Repetitorij fiziologije domačih živali 2. Fiziologija prebave. Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta.
www.studentinfo.net/vf/fgg/baza/student/uni2/11202/datoteke/kopija3.pdf
(17. apr. 2006)
- Chalupa W. 1981. Rumen fermentation and modification. *Developments in Industrial Microbiology*, 22: 277-293
- Chesson A., Forsberg C.W. 1979. Polysaccharide degradation by rumen microorganisms. V: *The rumen microbial ecosystem*. Hobson P.N. (ed.) London, Elsevier Applied Science: 251-284
- Counting Chambers from Hausser. 2006. *Electron Microscopy Sciences*. Electron Microscopy Sciences.
<http://www.emsdiasum.com/microscopy/products/magnifier/counting.aspx?mm=16>
(13. jul. 2006)
- Cowan M.M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 4: 564-582
- Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C., Gustafson J.E., Warmington J.R., Wyllie S.G. 2000. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*, 88, 1: 170-175
- Cvar S. 1998. Eterično olje nageljnovih žbic. Seminarska tema iz seminarja Izbirne vsebine v kurikularni prenovi kemije: Barve in vonj. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo.
<http://www.ntfkii.uni-lj.si/etolja/eksnag.htm> (9. maj 2006)
- Eugenol (allyl guaiacol, eugenic acid, C₁₀H₁₂O₂). 2007. Online Encyclopedia. 11th edition.
http://encyclopedia.jrank.org/EUD_FAT/EUGENOL_allyl_guaiacol_eugenic_.html
(9. jan. 2007)
- Ferme D. 2003. Vpliv rastlinskih izvlečkov in monenzina na strukturo vampne mikrobne združbe v kontinuirani kulturi. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo: 72 str.
- Fibrolytic Rumenal Bacteria. 2005. The North American Consortium for Genomics. TIGR – The Institut for Genomic Research.
<http://www.tigr.org/tdb/rumenomics/> (30. mar. 2006)
- Galle-Toplak K. 2002. Zdravilne rastline na Slovenskem. Ljubljana, Mladinska knjiga: 310 str.

- Grill 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
- Helander I.M., Alakomi H.L., Latva-Kala K., Mattila-Sandholm T., Mol I., Smid E.J., Gorris L.G., von Wright A. 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 3590-3595
- Hobson P.N. 1997. Introduction. V: The rumen microbial ecosystem. 2nd edition. Hobson P.N., Stewart C.S. (eds.). London, Blackie Academic & Professional: 1-9
- Koike S., Kobayashi Y. 2001. Development and use of competitive PCR assay for the rumen cellulolytic bacteria: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*. *FEMS Microbiology Letters*, 204: 361-366
- Lavrenčič A. 2002. Prehrana prežvekovalcev (neobjavljeno gradivo s predavanj). Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za zootehniko
- Lipoglavšek L. 2006. Primerjava treh molekularnih metod za odkrivanje in ugotavljanje števila anaerobnih bakterij iz rodu *Prevotella* v vampnem soku. Magistrsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za zootehniko: 94 str.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275
- Mackie R.I., McSweeney C.S., Aminov R.I. 2001. Rumen. V: *Encyclopedia of Life Sciences*. London, Nature Publishing Group: 1-11
- Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 2003. *Brock Biology of Microorganisms*. 10th edition. London, Pearson Education International: 1019 str.
- McIntosh F.M., Williams P., Losa R., Wallace R.J., Beaver D.A., Newbold C.J. 2003. Effects of Essential Oils on Ruminant Microorganisms and Their Protein Metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 8: 5011-5014
- Melissa. 2006. Viable Herbal Solutions.
<http://www.viable-herbal.com/combos/herbs/c485.htm> (13. jul. 2006)
- Molero R., Ibara M., Calsamiglia S., Ferret A., Losa R. 2004. Effects of a specific blend of essential oil compounds on dry matter and crude protein degradability in heifers fed diets with different diet forage to concentrate ratios. *Animal Feed Science and Technology*, 114: 91-104
- 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.J, McIntosh F.M., Williams P., Losa R., Wallace R.J.. 2004. Effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*: 114: 105-112
- Orešnik A., Kermauner A. 1982. Prehrana in plodnost krav. Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 90 str.
- Orešnik A., Kermauner A. 2002. Splošna prehrana živali. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za zootehniko: 40-74
- Orpin C.G., Joblin K.N. 1997. The rumen anaerobic fungi. V: The rumen microbial ecosystem. 2nd edition. Hobson P.N., Stewart C.S. (eds.). London, Blackie Academic & Professional: 140-195
- Ramšak A. 2000. Z analizo 16S rRNA ugotovljena raznolikost bakterijske populacije v vzorcu iz vampa goveda. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 196 str.
- Russell J., Rychlik J. 2001. Factors that alter rumen microbial ecology. *Science*, 292, 5519: 1119-1122.
<http://www.sciencemag.org/cgi/content/full/292/5519/1119> (28. apr. 2006)
- Schwab C.G. 1995. Protected proteins and amino acids for ruminants. V: *Biotechnology in Animal Feeds and Animal Feeding*. Wallace R.J., Chesson A. (eds.). New York, VCH Publishers: 115-141
- Siciliano-Jones J., Murphy M.R. 1989. Production of volatile fatty acids in the rumen and caecum-colon of steers as affected by forage-concentrate and forage physical form. *Journal of Dairy Science*, 72: 485-492
- Sivropoulou A., Kokkini S., Lanaras T., Arsenakis M. 1995. Antimicrobial activity of mint essential oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 2384-2388
- Sivropoulou A., Papanikolaou E., Nikolau C., Kokkini S., Lanaras T., Arsenakis M. 1996. Antimicrobial and cytotoxic activities of origanum essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 1202-1205
- Skoog D.A., Holler F.J, Nieman T.A. 1998. *Principles of Instrumental Analysis*. 5th ed. Saunders Colege Publishing: 674-676
- Smith-Palmer A., Stewart J., Fyfe L. 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 26, 2: 118-122

- Spektroskopske metode. Kromatografija. Vaje iz Analize in nadzora zdravil 2005/06. Ljubljana, Fakulteta za farmacijo.
www.ffa.unilj.si/.../print/content/download/1618/6401/file/Seminarspektroskopija&kromatografija.pdf (17. jan. 2007)
- Stewart C.S., Flint H.J., Bryant M.P. 1997. The rumen bacteria. V: The rumen microbial ecosystem. 2nd edition. Hobson P.N., Stewart C.S. (eds.). London, Blackie Academic & Professional: 10-72
- Špringer J. 2003. Klinčevce, dišeči (*Syzygium aromaticum*). Pomurske lekarne.
<http://www.pomurske-lekarne.si/si/index.cfm?id=1516> (9. maj 2006)
- Ultee A., Gorris L.G.M., Smid E.J. 1998. Bactericidal activity of carvacrol towards the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. Journal of Applied Microbiology, 85, 2: 211-218
- Varel V.H., Miller D.L. 2004. Eugenol stimulates lactate accumulation yet inhibits volatile fatty acid production and eliminates coliform bacteria in cattle and swine waste. Journal of Applied Microbiology, 97: 1001-1005
- Vatovec S. 1971. Fiziologija prebave v predželodcih prežvekovalcev. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za zootehniko: 23-27
- Weimer P.J., Waghorn G.C., Mertens D.R. 1999. Effect of diet on population of three species of ruminal cellulolytic bacteria in lactating dairy cows. Journal of Dairy Science, 82: 122-134
- Williams A.G., Coleman G.S. 1997. The rumen protozoa. V: The rumen microbial ecosystem. 2nd edition. Hobson P.N., Stewart C.S. (eds.). London, Blackie Academic & Professional: 73-139
- Wolin M.J., Miller T.L., Stewart C.S. 1997. Microbe-microbe interactions. V: The rumen microbial ecosystem. 2nd edition. Hobson P.N., Stewart C.S. (eds.). London, Blackie Academic & Professional: 467-491
- Zakaj feferoni pečejo. 2006. Slovenski Kemijski Portal.
<http://www.kemija.org/> (9. maj 2006)

ZAHVALA

Kolegom za ezoterično pomoč in profesorjem za nenadomestljivo interpretacijo stroke, predvsem pa svojim staršem za vsakodnevno podporo in potrpežljivost.

Iz srca najlepša hvala, Peter