

# ZNAČENJE MIKROPOPULACIJE BURAGA PREŽIVAČA

---

Pastuović, Kristian

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of agriculture / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:151:461483>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-26**



Sveučilište Josipa Jurja  
Strossmayera u Osijeku

**Fakultet  
agrobiotehničkih  
znanosti Osijek**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Agrobiotechnical  
Sciences Osijek - Repository of the Faculty of  
Agrobiotechnical Sciences Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
**POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU**

Kristian Pastuović

Preddiplomski studij smjera Zootehnika

**ZNAČENJE MIKROPOPULACIJE BURAGA PREŽIVAČA**

Završni rad

**Osijek, 2015.**

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

**POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU**

Kristian Pastuović

Preddiplomski studij smjera Zootehnika

## **ZNAČENJE MIKROPOPULACIJE BURAGA PREŽIVAČA**

Završni rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu završnog rada:

1. Prof. dr. sc. Marcela Šperanda, predsjednik
2. Doc. dr. sc. Mislav Đidara, dr. vet. med., mentor
3. Prof. dr. sc. Matija Domaćinović, član

**Osijek, 2015.**

## SADRŽAJ

1. Uvod.....	1
2. Mikroorganizmi buraga.....	3
2.1. Bakterije.....	3
2.2. Protozoa.....	9
2.3. Anaerobne gljivice buraga.....	18
2.4. Archaea.....	23
3. Uloga mikroorganizama u razgradnji hrane u buragu.....	26
3.1. Mikroorganizmi i razgradnja vlakana.....	26
3.2. Mikroorganizmi i razgradnja bjelančevina.....	32
3.3. Lipidi i mikrobiološka probava u buragu.....	35
4. Zaključak.....	39
5. Sažetak.....	40
6. Summary.....	41
7. Popis literature.....	42
8. Popis slika.....	57

# 1. Uvod

Probavni sustav životinja obuhvaća čitav niz različitih organa, od usne šupljine do analnog otvora. Njegova osnovna zadaća je razgradnja hranjivih tvari do jednostavnijih sastojaka koji se mogu resorbirati i metabolizirati u tkivima. Početak probavnog sustava su usta u kojima se nalaze jezik i zubi za prihvaćanje i žvakanje hrane. Goveda tek uzetu hranu žvaču površno, a kasnije ju detaljnije sažvaču tijekom procesa preživljanja. Na usta se nastavlja ždrijelo koje predstavlja zajednički prolaz za hranu i zrak. Izgrađuju ga mišići ždrijela, a obložen je sluznicom u probavnom dijelu od mnogoslojnog pločastog epitela koji u nekih životinja može orožati, a u dišnom dijelu sluznica je od pseudovišeslojnog prizmatičnog epitela. Hrana u jednjak putuje refleksnim zatvaranjem grkljana. Jednjak je mišićna cijev koja započinje na aboralnoj stijenci ždrijela otvorom jednjaka, prolazi kroz otvor na ošitu i završava otvorom u želucu. Hrana u jednjaku se pomiče zbog kontrakcije njegovih mišića. Želudac preživača dijeli se na četiri odjeljka: burag, kapura, knjižavci i sirište. U tankom crijevu se obavlja daljnja razgradnja i resorpcija hranjivih tvari preko crijevnih resica. Sastoji se od tri dijela: dvanaesnik (*duodenum*), prazno crijevo (*jejunum*) i vito crijevo (*ileum*). Na tanko crijevo se nastavlja debelo crijevo koje se sastoji od četiri dijela: slijepo crijevo (*caecum*), debelo crijevo u užem smislu (*colon*), ravno crijevo (*rectum*) i čmar (*anus*). U debelom crijevu se obavlja resorpcija vode iz sadržaja, bakterijska razgradnja ostatka hrane i formiranje izmeta. Debelo crijevo završava anusom, koji čine dva mišićna sfinktera koji se mogu kontrolirati. Treba još napomenuti i jetru i gušteraču čiji su probavni sokovi bitni za probavu hrane u tankom crijevu.

Burag je najveći predželudac (zapremnine 120-220 l), smješten na lijevoj strani i oblika je velike vreće, koja se dijeli na dorzalnu i ventralnu. U unutrašnjosti se nalaze sluznicom presvučene mišićne grede, te dio presvučen orožalim višeslojnim epitelom (mnoštvo bradavica). Kapura se nalazi kranijalno od buraga i loptastog je oblika. Sluznica ima oblik peterokutnih i šesterokutnih stanica koje izgledaju kao saće. Na kapuru se nastavlja knjižavac koji je loptastog oblika, a nalazi se s desne strane buraga. Sluznica je građena u obliku listova različite veličine. U knjižavcu se resorbira velika količina vode i hlapljivih masnih kiselina, kloridi, Na i K. Za probavu u predželucima je najznačajniji burag. Sluznica buraga ne posjeduje žlijezde koje izlučuju probavne sokove, pa su za probavu hrane odgovorni mikroorganizmi. Od mikroorganizama u buragu može se pronaći anaerobne bakterije, protozoa i gljivice. Najviše ima saharolitičkih vrsta mikroorganizama zato što su ugljikohidrati, celuloza i drugi polisaharidi najčešća hrana preživača. Osim što razgrađuju i

fermentiraju celulozu, mikroorganizmi služe i kao izvor proteina za preživača jer se uvijek jedan dio mikropopulacije protokom tekućine odnosi iz buraga i razgrađuje.

## 2. Mikroorganizmi buraga

### 2.1. Bakterije

Bakterije buraga dio su mikrobne populacije koja čini simbiotski odnos sa preživućem kao domaćinom. Bakterije buraga imaju nekoliko uloga:

1. Vlakna i druge polimerne biljne materijale koji se ne mogu razgraditi pomoću enzima domaćina fermentiraju u hlapljive masne kiseline, ugljični dioksid i metan. Te masne kiseline prolaze kroz stijenku buraga u kardiovaskularni sustav i oksidiraju se u jetri, osiguravajući domaćinu veliku količinu potrebne energije.
2. Iskorištavajući dušik iz amonijaka, bakterije izgrađuju vlastiti organizam, a stanični proteini postaju glavni izvor proteina za domaćina.
3. Mikroorganizmi buraga sintetiziraju određene vitamine koje može iskoristiti domaćin.
4. Neke bakterije buraga razgrađuju toksične komponente hrane. Najpoznatiji primjer je razgradnja toksične aminokiseline mimosina i njezinih derivata, koji su sastavni dio krmnih leguminoza *Leucaena*, a razgrađuju je neke bakterije buraga (Dominguez-Bello i Stewart, 1990.).

Najveći broj bakterija buraga su strogi anaerobi. Prilagođene su životu u prividnom nedostatku kisika, barem što se tiče njegova korištenja kao završnog akceptora protona, ali u drugim pogledima su jednako kompleksni kao i aerobni prokarioti (Gottschalk, 1981.). To je jasno vidljivo iz njihove prilagodbe na preživljavanje i rast u takvim uvjetima. Bakterije buraga upotrebljavaju različite strategije preživljavanja koje uvelike ovise o uvjetima u buragu.

### Okolišni uvjeti u buragu i njegov utjecaj na bakterijsku populaciju

Uobičajeno je mišljenje da su uvjeti u buragu stabilni. Temperatura se kreće oko 39°C s prisutnošću vrlo malo kisika, a pH je stabilan kod životinja hranjenih krmnim biljem. Iako obroci mogu biti raznoliki mikrobna populacija je vrlo dobro prilagođena probavljanju hrane koja je neprobavljiva za monogastrične životinje. U stvarnosti moderni sustavi hranidbe mogu izazvati brzu fermentaciju viška supstrata što dovodi do promjene mikroflore, acidoze te čak i

uginuća (Hungate, 1966.). U burag mogu dospjeti toksični sastojci, ne samo biljnog podrijetla, nego i antibiotici ili druge tvari namjerno dodane u hranu da reduciraju metanogenezu.

Anaerobno stanje onemogućava korištenje kisika kao terminalnog akceptora elektrona. Istraživanja su pokazala da mikrobne populacije koje prijanjaju na stijenke buraga sadrže visok udio fakultativnih organizama sposobnih koristiti kisik koji difundira iz krvotoka (Cheng i sur., 1979.). Takve populacije čine mali dio ukupne bakterijske populacije, dok većina bakterija raste u uvjetima iznimno niske razine kisika.

Kao i drugi mikroorganizmi, bakterije buraga stvaraju energiju putem supstratne i oksidativne fosforilacije ADP-a u ATP. Osnovne reakcije supstratne fosforilacije su vrlo dobro poznate. Ukratko, one uključuju prijenos fosfatne skupine s 1,3-difosfoglicerata, fosfoenolpiruvata, acetil-fosfata i butiril-fosfata na ADP pomoću fosfoglicerat-, piruvat-, acetat- i butirat kinaze (Prins, 1977.). Većina bakterija buraga izvodi prve 3 navedene reakcije, dok pojedine vrste kao što su *Butyrivibrio fibrisolvens* posjeduju butirat kinazu.

Međutim, uvjeti u buragu nameću ograničenje na reakcije prijenosa elektrona povezane sa stvaranjem ATP-a. U nedostatku kisika te prisutnosti male količine nitrata i sulfata, fumarat-sukcinat je najelektropozitivniji redukcijski par dostupan velikom broju bakterija buraga kao akceptor elektrona za elektrontransportni lanac fosforilaze. Stvaranje ATP-a povezanog s redukcijom fumarata ( $\text{fumarat} + \text{H}_2 = \text{sukcinat}$ ) je dokazano kod bakterija *Vibrio (Wolinella) succinogenes* (Kroger, 1977.). U okolini u kojoj su nitrati ili sulfati prisutni u visokim koncentracijama redukcija tih tvari konkurira redukciji  $\text{CO}_2$  u  $\text{CH}_4$  (Gibson i sur., 1990.). Međutim, koncentracije nitrata i sulfata u buragu su niske u usporedbi s koncentracijom ugljičnog dioksida, a metanogeneza je kvantitativno važniji način rješavanja viška elektrona.

## **Metanogeneza**

Prisutnost metanogena u buragu ima dalekosežan učinak na sudbinu organskog ugljika i vodika tijekom fermentacije. Iako određeni broj bakterijskih vrsta može iskoristiti vodik prilikom rasta u čistoj kulturi (Henderson, 1980.), metanogeni posjeduju hidrogenaze koje vežu vodik u vrlo maloj koncentraciji. Transfer vodika u metanogene rezultira kompeticijom za reducirajuće ekvivalente u drugim reakcijama kao što je redukcija piruvata u laktat ili etanol, te povećanim protokom supstratnog ugljika u acetat. Budući da je stvaranje acetata iz



acetyl-CoA povezano sa stvaranjem ATP-a preko acetyl kinaze, prisutnost H<sub>2</sub> može biti energetski pogodnije za organizme poput *Ruminococcus albus* koji proizvode acetat i vodik zajedno s laktatom i/ili etanolom u čistoj kulturi (Wolin i Miller, 1980.).

Istraživanja utjecaja dodanih prekursora propionata u hranu na *in vitro* fermentaciju pokazala su da dodavanjem natrijeva fumarata i natrijeva akrilata dolazi do značajnog smanjenja proizvodnje metana i porasta proizvodnje propionata pri inkubacijama s visokim udjelom voluminoznih krmiva te visokim udjelom koncentriranih krmiva (Newbold i sur., 2005.).

### **Vrijeme ostanka supstrata u buragu**

Pasaža sadržaja kroz burag s izmjenom tekuće komponente svakih 12 sati i zadržavanjem čvrstih tvari kroz 48 sati ili manje, predstavlja ograničenje za neke reakcije. Neke vrlo spore reakcije kao što su stvaranje metana iz acetata, ne događaju se u značajnoj mjeri u buragu. Nadalje, vrijeme ostanka celuloznih hranjivih materijala može biti važan limitirajući čimbenik u buragu (Hungate, 1975.), iako se male čestice mogu dodatno razgraditi u debelom crijevu.

### **Toksični sastojci**

Uz biljne tvari koje su toksične za životinje kao što su mimosin, brojne druge tvari koje su potencijalno toksične za mikroorganizme mogu biti prisutne u buragu. Hlapljive masne kiseline u njihovom nedisociranom obliku toksične su za mnoge crijevne bakterije, ali bakterije buraga relativno su otporne na te tvari pri normalnoj pH vrijednosti u buragu (Stewart, 1975.). Neke biljne fenolne kiseline imaju antimikrobno djelovanje (Chesson i sur., 1982.), i misli se da kumarin i drugi supstituirani fenolni sastojci biljnog podrijetla mogu djelovati toksično (Cansunar i sur., 1990.).

Argininski analog, kanavanin, sastojak leguminoze *Canavalia ensiformis*, inhibitorno djeluje na neke bakterije buraga, dok druge bakterije razgrađuju kanavanin (Dominguez-Bello i Stewart, 1990.).

### **Promjene u opskrbi supstratom**

Pretpostavlja se da je kod preživača koji pasu i brste voluminozna krmiva fermentacija ograničena relativno sporom razgradnjom polimera (celuloze i hemiceluloze) koji čine glavni izvor energije za rast mikroorganizama buraga. Pod tim uvjetima rastu vrste kao što su

*Bacteroides*, *Selenomonas*, *Ruminococcus* i druge koje su sposobne održati visoku stopu rasta sintetiziranjem 3 ili više mola ATP-a po molu fermentiranog supstrata. U slučaju bakterije *Ruminococcus albus* kojoj nedostaje sposobnost fosforilacije vezane uz transportni lanac elektrona, visoki prirasti ovise o prisutnosti metanogena. U stvarnosti čak ni divlji preživači koji pasu bogatu pašu ne konzumiraju hranu kontinuirano, a bakterije u buragu se moraju prilagoditi razdobljima nedostatka supstrata. Mnoge bakterije buraga skladište višak šećera intracelularno u obliku glikogenskih granula (Hungate, 1966.), koji mogu koristiti kao izvor energije tijekom takvih razdoblja.



**Slika 1:** *Diplodinium sp.* pronađen u buragu (dostupno na:

<http://commtechlab.msu.edu/sites/dlc-me/zoo/zac0281.html>, 14.7.2015.)

Iskorištavanje proizvodnih kapaciteta preživača u modernoj proizvodnji rezultiralo je hranjenjem krmivima bogatim škrobom i sličnim krmivima koja sadrže velike količine lakoprobavljivih ugljikohidrata, koji značajno utječu na mikropopulaciju buraga. U prisutnosti viška supstrata selekcijski pritisak na visoke stanične prinose po molu supstrata manje je važan za preživljenje nego što je brz rast. Pod najekstremnijim uvjetima konzumacije velikih količina škroba mikropopulacijom buraga dominiraju bakterije mliječnoga vrenja kao što su *Streptococcus bovis* koji proizvede svega 2 mola ATP-a po molu iskorištenog supstrata (Russell i Hino, 1985.). Međutim, *S. bovis* je sposoban za vrlo brz rast, s vremenom dijeljenja od oko 20 minuta (Hungate, 1966.). Proliferacija streptokoka rezultira akumulacijom mliječne kiseline, što snižava pH vrijednost buraga ispod razine koju toleriraju obične laktat iskorištavajuće bakterije kao što su *Megasphaera*, *Veillonella* i *Selenomonas*, a što u najekstremnijim slučajevima može rezultirati uginućem životinje domaćina (Counotte i sur., 1981.).

Prisutnost viška izvora energije može biti popraćeno različitim energetski rastrošnim reakcijama kod bakterija (Russell i Wallace, 1988.). Dodavanje viška glukoze u glukozom limitirane kulture *Bacteroides ruminicola* rezultira povećanom proizvodnjom topline iz hidrolize ATP-a koja nije povezana s rastom (Russell, 1986.). *Streptococcus bovis* je također sposoban za slične energetski rasipne reakcije (Russell i Strobel, 1989.). Pretpostavlja se da je značaj tih reakcija u potrošnji viška supstrata te smanjenju raspoloživosti supstrata za rast kompetitivnih vrsta (Jouany, 1991.).

### **Kolonizacija buraga i sastav bakterijske populacije**

Na razvoj mikroflore buraga utječe smještaj mladunčadi, kontakt s drugim životinjama i hranidba. Velik broj anaerobnih bakterija ( $10^9$ /ml) pronađen je u buragu janjadi držane u stadu te u janjadi zatvorene s majkama 2 dana nakon janjenja (Fonty i sur., 1986.). Populacija bakterija se povećava tijekom prvog tjedna života i nakon početka hranjenja čvrstom hranom. U početku aerobna i fakultativna flora čine između 1 i 10 % ukupne populacije, ali kod odraslih životinja broj tih bakterija (oko  $10^4$ /ml) se smanjuje u odnosu na ukupan broj (od  $10^{10}$  do  $10^{11}$ /ml). Čini se da na mikropopulaciju mladih preživača utječe prisutnost bakterija kao što su streptokoki, stafilokoki i laktobacili u hrani i stelji (Ziolecki i Briggs, 1959.).

Istraživanja su pokazala da mikropopulacija mladih životinja sadrži veću raznolikost vrsta nego što je to kod odraslih životinja, a da su te promjene sastava mikropopulacije, povezane sa sazrijevanjem i hranidbom. Dokazane su progresivne promjene u broju i nadmoćnosti vrsta laktobacila i streptokoka kao što su *Clostridium ramosum*, *C. clostridiforme*, *C. sartagoforum* i *C. hastiforme* te određenih *Bifidobacteria* kao što su *B. adolescentis*, *B. boum*, *B. globosum* i *B. thermophyllum*, te da je njihova izolacija učestalija kod mlađih nego kod starijih preživača. Kako se razvija flora buraga postaje jasnije da je pričvršćivanje za stijenku buraga te kolonizacija čestica hrane koje dospijevaju u burag bitno obilježje prostornog rasporeda bakterija. Stijenka buraga (Mueller i sur., 1984.) i površina biljnog materijala žarište su razvoja specijaliziranih rodova koji sudjeluju u razgradnji odljuštenih stanica epitela buraga, ili razgradnji celuloze i hemiceluloze (Cheng i sur., 1984.).

Proučavanjem sadržaja buraga mikroskopom ukazalo je na prisutnost mnogih organizama koji se ne mogu lako uzgojiti. Nekoliko od njih su veliki organizmi, često Gram negativni koji rastu u ovalnoj formi, okrugloj formi i formi rozete. Uloga tih organizama u fermentaciji u buragu nije jasna, ali se smatra da *Lamprospira*, *Oscillospira* i ovalni oblici mogu iskoristiti šećere oslobođene iz biljnog materijala tijekom probave (Clarke, 1979.).

Vicini i sur. (1987.) su utvrdili bujanje ovalnih oblika kod teladi hranjene hranom bogatom šećerima.

### **Karakteristike dominantnih bakterija buraga koje je moguće kultivirati**

Eubakterije buraga (prave bakterije) se uobičajeno identificiraju po njihovoj morfologiji i reakcijama bojanja po Gramu, proizvodima fermentacije, vrsti fermentiranog supstrata, molarnom postotku gvanina i citozina u DNA, te sastavu masnih kiselina u fosfolipidima. Bakterije variraju značajno s obzirom na njihovu metaboličku raznolikost. Neke koriste samo ograničene vrste supstrata, pa tako *Veillonella parvula* raste uglavnom na laktatu, a *Anaerovibrio* raste samo na glicerolu (oslobođenom iz lipida pomoću lipaze) i fruktozi. Celulozne bakterije kao što su *Ruminococcus* i *Fibrobacter* rastu uglavnom na celulozi i iako većina sojeva tih vrsta hidrolizira hemicelulozu, one često ne koriste proizvode hidrolize (Dehorty, 1973.). Čini se da neke bakterije koje imaju specifičnu ulogu u funkciji buraga variraju u geografskoj distribuciji. U Australiji hranjenje preživača krmnom leguminozom *Leucaena* rezultira pojavom simptoma trovanja koji uključuju gubitak dlake, gušavost i smrt. To je uzrokovano toksičnom aminokiselinom mimozin koja je prisutna kod biljaka. Mimozin se u buragu metabolizira na dva toksična spoja, 3-hidroksi-4-hidroksipiridon i 2,3-dihidroksipiridin. Otkriće da koze na Havajima konzumiraju *Leucaenu* bez razvoja toksičnih simptoma pokazalo je da toksične tvari u buragu mogu razgraditi određene bakterije (Gram negativni štapići) koji nisu prisutni u australskih preživača (Allison i sur., 1987.). U Venezueli su pronađeni različiti sojevi tih bakterija u ovcama koje nikad nisu hranjene leguminozama iz roda *Leucaena* (Dominguez-Bello i Stewart, 1990.). Stoga, smatra se da su „detoksicirajuće“ bakterije dio prirodene mikropopulacije buraga.

### **Utjecaj hranidbe na bakterijsku floru buraga**

Uzimajući u obzir da u buragu postoje vrste bakterija koje su se specijalizirale za razgradnju različitih supstrata, nije iznenađujuće da promjena obroka utječe na promjenu flore u buragu. Najveće promjene se uočavaju pri zamjeni voluminoznih krmiva krmivima bogatim škrobom, pri čemu dolazi do proliferacije streptokoka. Zamjena sijena ječmenim posijama ili kukuruznim posijama u hranidbi goveda dovodi do redukcije broja celulolitičkih bakterija i *Butyrvibria*, ali i povećanja broja streptokoka, laktobacila i *Megasphaera* koje

koriste laktat. Proliferaciju *Lachnospira* u buragu pri hranidbi leguminoznom krmom otkrili su Bryant i sur. (1960.)

## 2.2. Protozoa

Protozoa s bakterijama i gljivicama čine prirodnu mikrobnu populaciju u predželucima preživača. Iako njihov izostanak ne dovodi do drastičnih promjena u fiziologiji buraga, protozoa buraga su dobro poznati primjer simbioze (endokomenzalizam) između jednostaničnih organizama i metazoa (Jouany, 1991.).

Kao i kod drugih trepetljikaša, tako i kod onih u buragu postoje dvije vrste jezgara (mikro i makronukleus). Površina stanice kod roda *Isotricha* je gusto prekrivena brojnim redovima trepetljika, dok je kod *Entodiniomorpha* većina stanice gola. Unutar citoplazme mogu se diferencirati dvije stanične zone: kortikalna ektoplazma i unutrašnja endoplazma. Strukturalne i biokemijske analize su pokazale odvojenost tih zona neaktinskim filamentima (Vigues i Groliere, 1985.). U *Isotricha* mikrofilamentni putevi (kariofori) okružuju jezgru. U *Entodiniomorpha*, kao i kod roda *Polyplastron*, citoskelet ispod površine stanične membrane je mnogo kompleksniji i sadrži tri glavna sloja fibroznih elemenata: vanjsku epiplazmu, longitudinalnu nakupinu mikrotubula i unutrašnji sloj poredanih neaktinskih filamenata s kalcij vezujućim proteinom (Vigues, Metenier i Senaud, 1984.). Takva citoskeletna struktura omogućava elastičnost i kontrolu oblika stanice.

Nekoliko vrsta trepetljikaša iz rodova *Isotricha*, *Dasytricha*, *Polyplastron*, *Eudiplodinium*, *Epidinium*, kojima nedostaju morfološki prepoznatljivi mitohondriji posjeduju specijalizirane organele odnosno hidrogenosome (Paul, Butler i Williams, 1989.). Njihova osnovna funkcija je oksidacija piruvata pri čemu nastaju acetat i vodik.

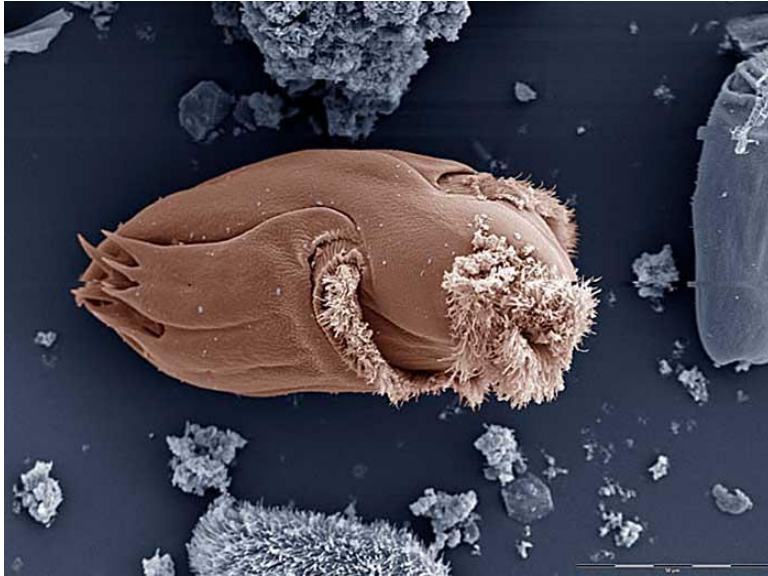
U svih trepetljikaša buraga na vestibulum se nadovezuje citofarinks s diferenciranim citoskeletnim elementima građenim od mikrofilamenata, mikrotubularnih traka i mikrotubularnih nakupina.

## Rasprostranjenost protozoa kod preživaca

Neki trepetljikaši su prisutni u svih preživaca, dok se druge vrste ne susreću tako često. Uglavnom pronalazimo 5-6 različitih rodova u istom domaćinu, ali sa značajnim varijacijama s obzirom na geografski smještaj preživaca.

Protozoa su normalni sudionici fermentacije u buragu i oni čine značajni, ali varijabilni dio populacije mikroorganizama u buragu domaćih preživaca. Brojne skupine biljojeda (divlji preživaci, deve, konji, slonovi, nosorozi, itd) imaju anaerobne protozoa u crijevima uz prisustvo drugih mikroorganizama (gljivice, mikoplazme, bakteriofagi). Geografska izolacija je omogućila neovisnu evoluciju tih skupina životinja i stoga se njihova crijevna mikropopulacija razlikuje. To je najbolje utvrđeno kod protozoa koji pokazuju karakteristične razlike u morfologiji, koje omogućavaju laganu i brzu identifikaciju (Dehority, 1986.). Neki od rodova protozoa su široko rašireni među preživcima dok druge nalazimo samo kod nekih vrsta. Mikrofauna domesticiranih goveda i ovaca je vrlo slična, vjerojatno zbog njihove blizine tijekom domestikacije. Slični rodovi, ali različite vrste pojavljuju se u svih jedinki određenih vrsta preživaca, ali većina jedinki u krdu preživaca na određenoj lokaciji ima približno sličnu mikrofaunu. Postoje ogromne razlike u pojavnosti i distribuciji protozoa vrsta i u njihovoj koncentraciji u buragu, čak i između blizanaca (Jouany, 1991.).

Na populaciju trepetljikaša utječu mnogi čimbenici kao što su predacija, kompeticija za iste supstrate ili odnosi između vrsta koji su do danas ostali nepoznati. Postoji antagonizam između dvije glavne entodiniomorfne grupe: tip A (*Polyplastron*, *Diplodinium* i *Ophryoscolex*) i tip B (*Eudiplodinium* i *Epidinium*). Biomasa trepetljikaša je podložna velikim oscilacijama, ovisno o hranidbi (neke mogu voditi potpunoj defaunizaciji), broju i učestalosti obroka i fizičko-kemijskim uvjetima (Jouany, 1978.). Trepetljikavi protozoa buraga mogu se podijeliti u dvije skupine ovisno o njihovim morfološkim karakteristikama (holotrihi i entodiniomorfni protozoa). Oni se dalje mogu podijeliti na one koji koriste topive šećere, one koje razgrađuju škrob i one koji hidroliziraju lignocelulozu. Holotrihe predstavlja 15 rodova. Od tih 15 rodova, *Isotricha*, *Dasytricha*, *Buetschlia* and *Charonina* su široko rasprostranjeni u buragu domaćih i divljih preživaca (Kamra, 2005.).



**Slika 2:** Trepetljikavi protozoa roda *Ophryscolex* (dostupno na: <http://www.morning-earth.org/Graphic-E/SymbiosisCrossKingProtists.html>, 14.7.2015.)

### **Hranidbene navike protozoa buraga**

Svi trepetljikaši mogu progutati bakterije. *Isotricha* i *Dasytricha* koriste topive šećere te je kod njih detektirana velika aktivnost enzima koji razgrađuju šećere (Dauvrin, 1988.). Jedan od najvažnijih otkrića je da su velike *Entodiniomorfne* vrste sposobne progutati biljni materijal, i posljedično tome se smatraju celulolitičkim mikroorganizmima. Brojna istraživanja su se fokusirala na tu temu. Kolonizacija supstrata ovisi o prisutnoj mikrobnjoj populaciji, vrsti biljnog supstrata i vremenu boravka čestica hrane odnosno supstrata u samome buragu (Jouany, 1991.).

U nekoliko *in vivo* eksperimenata koristeći metodu *in sacco* najlonske vrećice, trepetljikavi protozoa su otkriveni nedugo nakon uranjanja najlonske vrećice u burag. Primjerice, *Epinidiumi* su otkriveni nakon 15 minuta na fragmentima lucerne (Senaud i sur., 1986-87.) te na medularnom parenhimu slame i lisnim površinama slame (Benyahya i sur., 1986.). U svim slučajevima kolonizacija supstrata ovisila je o kemijskoj prirodi i/ili anatomskoj organizaciji biljnog materijala; klorofilna i celulozna tkiva su najranije kolonizirana. Slični rezultati su dokazani *in vitro* (Orpin, 1985.).

## Unutarstanična probava biljnog materijala kod protozoa

Hranidbene navike nisu iste kod svih entodiniomorfnih vrsta. *Entodinium* nije nikada vezan za staničnu stijenkicu već se slobodno kreće među oštećenim biljnim stanicama. Rod *Epinidium* ne samo da je sposoban progutati male slobodne biljne čestice u tekućini buraga nego i veće fragmente. U oba slučaja postoji „aktivna“ fiksacija budući da su vezanje i gutanje dva povezana procesa. To je drugačiji proces od „pasivnog vezanja“ pri kojem se *Epinidium* pričvršćuje na biljni supstrat bez gutanja (Grain i Senaud, 1985.).

Kolonizacija biljaka vrstama *Polyplastron multivesiculum* i *Eudiplodinium maggi* je manje intenzivna. Neki su trepetljikaši pronađeni na supstratu talijanskog ljuļa (medularni parenhim i list), ali nikad na fragmentima slame, čak ni nakon dužeg vremena inkubacije. U drugu ruku, ta dva velika trepetljikaša mogu aktivno proždirati velike čestice biljaka poput epidermalnih dlačica lucerne (Bohatier i sur., 1990.).

Proždiranje biljnog materijala je slično u svih proučavanih velikih entodiniomorfa: fagocitoza uključuje netrepetljikavu apikalnu vestibularnu zonu stanice gdje se odvija ameboidno kretanje, vestibularne usne i obrazne trepetljike (Benyahya i sur., 1989.). Mali biljni fragmenti, izolirane stanične organele (poput kloroplasta) i škrobne nakupine obično se prinose ustima putem cilija, a gutanje nekoliko stanice nefleksibilnog materijala uključuje stanične usne koje otvaraju nekoliko kutikularnih navoja radi ostvarivanja kontakta s česticama hrane.

Unutarstanična probava celuloznih supstrata se odvija unutar primarne hranidbene vakuole ili vezikule. Možemo razlikovati dva načina razgradnje, jedan za stanične stijenkice i drugi za ostala celulozna vlakna. Kod rodova *Epidinium*, *Polyplastron*, *Eudiplodinium* i najvećih pripadnika roda *Entodinium* razgradnja stanične stijenkice supstrata lucerne i slame događa se u primarnoj hranidbenoj vakuoli koja je jako razgranata i delaminirana, te u ispupčenim sekundarnim vezikulama. Razgradnja supstrata je više vezana uz fizikalnu prirodu progutanog celuloznog materijala nego uz vrstu trepetljikaša. U svim slučajevima, rezerve glukoze se spremaju u male vezikule koje napuštaju endoplazmu i idu prema perifernom korteksu u područje polisaharoznih skeletnih pločica ili granula (Jouany, 1991.).

Različiti celulitički procesi su opisani za celulozna vlakna u rodova *Polyplastron* i *Eudiplodinium*. Primarna hranidbena vakuola ne izvede potpuno lateralno pupanje, polimerni fibrili se progresivno liziraju, a proizvodi katabolizma se nikad ne spremaju kao zaliha.



Vjerojatno se male molekularne pričuve direktno iznose van preko vakuolarne membrane u susjednu citoplazmu (Bohatier i sur., 1990.). Stoga se ne može definirati jedan uobičajeni način unutarstanične razgradnje celuloze u *entodiniomorfa*. Dodatno, nijedan način nije specifičan za određenu vrstu. Dokazi ukazuju na to da to ovisi najviše o strukturi progutanog materijala, stupnju polimerizacije ili kristalizacije ili količine drugih povezanih molekula kao što su hemiceluloza i lignin.

Biljnu staničnu stijenku mogu razgraditi neki *entodiniomorfni* trepetljikaši bez bakterija i to primjerice vlakna pamuka (Abou Akkada i sur., 1963.) ili celuloze (Coleman i sur., 1976.). To nam govori da su celulolitički enzimi prisutni u citoplazmi trepetljikaša, no još traje rasprava da li oni potječu od samih trepetljikaša ili bakterija koje kontaminiraju njihovu citoplazmu. U svom je radu Coleman (1978.) dokazao da 70% celulitičke aktivnosti u roda *Eudiplodinium* nije bakterijskog porijekla. Istraživanja elektronskim mikroskopom pokazuju da se istovremeno progutane bakterije i biljni materijal odvajaju u različite vakuole i da većina njih biva izbačena kroz citoprokt (Bohatier i sur., 1990.).

Više od 20 glikozidnih hidrolaza otkriveno je na celularnim ekstraktima u tekućini buraga ili kultiviranim trepetljikašima (*Epinidium*, *Polyplastron*, *Ophrysolex*, *Diploplastron*, *Ostracodinium*, *Eudiplodinium*, *Entodinium*). Najzastupljenije su  $\alpha$ -L-arabinofuranoze,  $\beta$ -D-fukozidaze,  $\beta$ -D-galaktozidaze,  $\beta$ -D-glukozidaze,  $\beta$ -D-celobiozidaze i  $\beta$ -D-ksilozidaze (Williams i sur., 1984.). Endogena celulolitička aktivnost je utvrđena kod *Polyplastron multivesiculatum* uzgojenom u čistoj kulturi (Bonhomme i sur., 1986.). Većina *entodiniomorfni* vrsta je sposobna hidrolizirati i celulozne i hemicelulozne materijale (Williams i Coleman, 1985.).

Celulaze, hemicelulaze, glikozidne hidrolaze i kisele fosfataze pronađene su kod roda *Polyplastron* u malim lizosomalnim vezikulama (Williams i Ellis, 1985.). Ultrastrukturalna biokemijska vizualizacija celulaza i kiselih fosfataza napravljena je kod roda *Eudiplodinium*, enzimatska aktivnost lokalizirana je u malim Golgijevim vezikulama, a njihov sadržaj se otpušta u hranidbene vakuole (Benyahya i sur., 1990.).

### **Uloga protozoa buraga u fermentaciji**

Protozoa buraga sudjeluju u probavi biljne hrane i sposobni su hidrolizirati i/ili fermentirati hranjive tvari kao što su ugljikohidrati, proteini i lipidi. Na taj način pomažu regulirati

fermentaciju sastojaka hrane, poput topljivih ugljikohidrata u hrani (*holotrihi*) i čestičnih proteinskih materijala (*oligotrihi*).

Ugljikohidrati su glavni supstrat za bakterije, gljivice i protozoa u buragu. Svi ugljikohidrati ulaze u metaboličke reakcije stvarajući ATP i piruvat, koje u različitim anaboličkim reakcijama stvaraju druge molekule te konačno sudjeluju u izgradnji stanica. Proizvodi fermentacije protozoa nisu jedinstveni (acetat, butirat, laktat), a sastav stanice protozoa je drukčiji u odnosu na sastav stanica bakterija buraga. Stoga protozoa domaćina opskrbljuju jedinstvenim hranjivim tvarima.

Sustavi za unos hranjivih tvari kod bakterija lokalizirani su u staničnoj membrani te je velika površina očigledna prednost. To dolazi do izražaja u okolišu siromašnom hranjivim tvarima. U prirodi, gladovanje dovodi do smanjivanja veličine bakterijske stanice. Trepeljikaši posjeduju različite mehanizme iskorištavanja hrane. Oni obujme i progutaju čestice hranjivih tvari i probavljaju ih u brojnim hranidbenim vakuolama, što čini volumen njihovih stanica važnim fiziološkim parametrom (Jouany, 1991.).

Češće hranjenje ovaca povećava koncentraciju protozoa (Hungate i sur., 1971.). Nakon jednodnevnog gladovanja ovaca i ponovne uspostave normalne hranidbe, nakon početnog smanjenja broja dolazi do razmnožavanja i rasta broja protozoa svih vrsta do maksimalnog broja. Utjecaj hranjenja i gladovanja može se oponašati *in vitro* (Reichl i sur., 1972.).

Među holotrihnim vrstama *Isotricha prostoma*, *I. intestinalis* i *Dasytricha ruminantium* su najčešće proučavani. Ti su organizmi specijalizirani za razgradnju topljivih ugljikohidrata kao izvora ugljika i energije. Fermentiraju topljive šećere, fruktozane ili male granule škroba (*I. intestinalis*), dok višak spremaju kao amilopektin. Nasuprot njima, oligotrihne vrste su specijalizirane za različite vrste čestica, npr. velike oligotrihne *Eudiplodinium* i *Ophryscolex* vrste se hrane na česticama staničnih stijenki biljaka i kloroplastima. Otkriveno je da veličina malih *Entodinium* vrsta ograničava veličinu granula škroba koju mogu progutati. Svi protozoa buraga zadovoljavaju svoje potrebe za dušikom (esencijalne aminokiseline, purini, pirimidini) i ostalim posebnim nutritivnim tvarima (steroli), hranjenjem biljnom hranom, bakterijama i gljivicama (predacija) ili drugim protozoa (predacija i kanibalizam).

Promjene vrste hrane, količine hrane i učestalosti hranjenja tokom dana dovode do promjena u mikrobnj populaciji. Ako su te promjene pretjerano velike i ako se dogode u kratkom vremenu posljedice za domaćina mogu biti katastrofalne. Najčešće su takve promjene prilikom hranjenja obrokom bogatim lakoprobavljivim ugljikohidratima, a u kojem je udjel struktura stanične stijenke smanjen. Najpoznatiji primjer je poremećaj fiziologije domaćina koji se događa kod akutne indigestije zbog prevelike količine žitarica odnosno lakoprobavljivih ugljikohidrata u obroku. Zbog toga što topljivi šećeri više nisu ograničeni, brzorastuće bakterije mliječnog vrenja (*Streptococcus bovis*, *Lactobacillus sp.*) nadrastu normalnu mikrofloru. Dolazi do pada pH te mliječna kiselina ulazi u krvotok i tkiva domaćina. Nešto od L(+) laktata se metabolizira u tkivu domaćina, ali D(-) laktat se ne može brzo metabolizirati i skuplja se uzrokujući akutnu i često letalnu acidozu životinje. Ako je prijelaz u hranidbi žitaricama odnosno lakoprobavljivim ugljikohidratima postupan i koncentracija topljivih ugljikohidrata u buragu ostane niska, normalna mikroflora je sposobna za samoodržanje, prilagodbom novim uvjetima. Nakon vremena tranzicije u kojem se formira mliječna kiselina i posljedično fermentira, nastaju octena, propionska i maslačna kiselina, te CO<sub>2</sub> i CH<sub>4</sub> kao nusproizvodi u adaptaciji životinje (Jouany, 1991.).

Protozoa buraga su naročito važni u adaptaciji na obroke bogate škrobom. Ako je količina škroba u obroku umjerena razmnožavaju se postupno te u dobro prilagođenih životinja populacija protozoa iskorištava većinu škroba kojeg životinja konzumira. Tada u svom organizmu skladište velike količine šećera i škroba te fermentiraju škrob i amilopektin pa na taj način sprječavaju naglo stvaranje mliječne kiseline u buragu. U buragu ovaca hranjenih koncentratom postoji obrnuti odnos između broja *Entodiniuma* i broja škrob i laktat fermentirajućih bakterija (Wakita i Hoshino, 1989.).

Dobra mjera za adaptaciju na koncentrirani obrok je mikroskopski pregled sadržaja buraga. Velika populacija protozoa indikator je dobre adaptacije. Adaptacija na koncentriranu hranu treba biti postupna inače promjene u pH buraga i/ili osmolaritet mogu uništiti trepetljikaše. Goveda kod kojih dođe do nagle promjene obroka mogu biti defaunizirana. Kod defauniziranih goveda dolazi do većeg pada pH buraga nakon obroka nego kod životinja s normalnom populacijom protozoa. To se ne događa zbog povećanja koncentracije mliječne kiseline nego zbog veće koncentracije hlapljivih masnih kiselina u buragu defauniziranih životinja.

## **Proizvodi fermentacije protozoa buraga**

Nusproizvodi fermentacije svih proučavanih anaerobnih trepetljikaša su više-manje slični i uključuju: acetat, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, maslačnu kiselinu i laktat. U normalnim okolnostima u buragu vodik se brzo pretvara u metan, a kao rezultat te pretvorbe parcijalni tlak vodika ostaje izrazito nizak. Slobodnoživući srodnici trepetljikaša buraga su *sapropelični* anaerobni trepetljikaši koji imaju metanogene endosimbionte (Goosen, 1990.). Nasuprot njima, trepetljikaši buraga imaju samo *epibiotske* metanogene, posebno kada je fermentacija u buragu slaba (Jouany, 1991.).

Manje laktata i manje butirata (Hillman i sur., 1988.) i više acetata se stvara kod protozoa u miješanoj mikrobnj populaciji nego u slučaju kada se pročišćena suspenzija trepetljikaša inkubira sa šećerima. Iako se, u jednu ruku, smatra da protozoa umanjuju rizik od acidoze buraga, oni doprinose stvaranju mliječne kiseline u buragu neposredno nakon obroka bogatog lakofermentirajućim ugljikohidratima (Counotte, 1981.).

Holotrihni trepetljikaši stvaraju oba izomera mliječne kiseline iz različitih koncentriranih krmiva, ali njihov sveukupni učinak je redukcija brzine stvaranja mliječne kiseline pri hranidbi koncentratima (Clarke i sur., 1979.). Značajno je spomenuti da propionat nije proizvod fermentacije što znači da protozoa povećavaju ketogenu vrijednost mješavine hlapljivih masnih kiselina buraga i doprinose povećanju relativnog nedostatka glukoznih prekursora.

Stanice protozoa će konačno probaviti domaćin i tako će postati visoko probavljivi izvori esencijalnih nutrijenata (aminokiselina, nezasićenih masnih kiselina, vitamina). Biološka vrijednosti njihovih proteina je visoka.

## **Osjetljivost protozoa na štetne tvari**

Protozoa svojim hidrolitičkim i reducirajućim enzimima kemijski mijenjaju brojne toksične sastojke koji se nalaze u hrani. Primjerice, redukcija nitro skupina u organskim spojevima poput kloramfenikola, metil-parationa, nitrofenola odvija se u buragu te na taj način njihovi metaboliti gube svoju biološku aktivnost. Protozoa buraga reduciraju aromatske nitro skupine parationa na manje toksični aminoparation koji se izlučuje (Williams i sur.,

1963.). Navedeni spojevi se detoksiciraju, ali u drugu ruku postoji i toksično djelovanje metronidazola na protozoa.

Sve vrste saponina koje se nalaze u hrani inhibiraju aktivnost protozoa u buragu ovisno o njihovoj koncentraciji u obroku. Saponini lucerne, izolirani metanolnom ekstrakcijom i djelomičnom kiselom hidrolizom, uzrokovali su smanjenje broja protozoa u buragu ovce za 34-66% pri visokim koncentracijama od 2-4% u suhoj tvari. Istraživanja utjecaja saponina biljaka na protozoa buraga također pokazuju slične rezultate. Druga istraživanja pokazuju da se inhibicija protozoa u buragu ne mora dogoditi ako se saponini doziraju u malim količinama zbog prilagodbe mikropopulacije buraga na saponine (Patra i Saxena, 2009.).

Iz literature se može vidjeti da su protozoa manje osjetljivi na pesticide i antibiotike u odnosu na bakterije buraga (Prins, 1978.). Protozoa su jako osjetljivi na soli bakra, organska otapala i deterdžente, te na niski pH u buragu ( $\text{pH} < 5,0$ ). Utvrđeno je da im njihova sposobnost razgradnje netopljivih proteina hrane, nudi djelomičnu zaštitu protiv trovanja bakrom (Ivan, 1988.). Probavljanje netopljivih proteina u organizmu protozoa dovodi do povećanja količine peptida i aminokiselina dostupnih bakterijskom metabolizmu. To rezultira stvaranjem sulfida koji u interakciji s bakrom u hrani pretvaraju netopljivi bakrov sulfid ( $\text{CuS}$ ) u bakrov (I) sulfid ( $\text{Cu}_2\text{S}$ ) koji se slabo apsorbira. Drugi razlog bi mogao biti nastanak bakrovih kelata koji se teško apsorbiraju u tankom crijevu.

### **Utjecaj protozoa na populaciju bakterija i gljivica u buragu**

Brojna istraživanja su dokazala da je koncentracija bakterija u buragu niža u prisutnosti protozoa (Nolan i sur., 1988.). Iz literature se može zaključiti da defaunizacija dovodi do povećanja u ukupnom broju anaerobnih bakterija te bakterija koje koriste škrob i šećere, posebice prilikom hranidbe koncentratima. Broj (hemi)celulolitičkih bakterija se ne mijenja ili može biti povećan, pogotovo kod hranjenja voluminoznom hranom. Razlog tome leži u činjenici da su bakterije koje iskorištavaju vlakna manje sklone predaciji i da je u tim uvjetima okoliš za njih povoljniji.

Kada se u burag inokuliraju vrste iz roda *Entodinium* dolazi do smanjenja u ukupnom broju bakterija kao i bakterija koje iskorištavaju škrob i celulozu, dok broj bakterija koje fermentiraju šećere raste. Smanjenje broja celulitičkih bakterija nije utvrđeno u slučajevima

inokuliranja *Polyplastron sp.* u kombinaciji s *Entodinium sp.* Inokulacija *Isotricha* dovodi do smanjenja ukupnih bakterija, bakterija koje fermentiraju šećere i celulolitičkih bakterija, a takav utjecaj je izraženiji pri hranidbi voluminoznim krmivima. Predacija protozoa na bakterije dovodi do povećanja koncentracije nutrijenata (amonijaka, fosfata) u tekućini buraga.

Predacijom protozoa povećava se brzina i učinkovitost rasta bakterija. Povećana brzina rasta preostalih bakterija javlja se kao rezultat predacije, ako se poboljša nutritivna situacija za preostale bakterije. U odsutnosti protozoa, hranjive tvari su imobilizirane u stanicama rastućih bakterijskih populacija te su stoga nedostupne hranjive tvari, ali je i učinkovitost rasta manja zbog energetski rasipnih reakcija kod bakterija. Stoga predacija zbog povećanja dostupnosti hranjivih tvari povećava brzinu i učinkovitost bakterijskog rasta.

Predacija također može promijeniti sastav bakterijske i gljivične flore u buragu. Dostupni dokazi potvrđuju da predacija protozoa buraga nije selektivna, već nasumična i ovisi o koncentraciji bakterija. Bakterije koje se pojavljuju u većem broju bit će češće konzumirane. Na taj način trepetljikaši mogu utjecati na izgled mikropopulacije buraga što dovodi do povećanja bakterijske raznolikosti i time metaboličke raznolikosti u buragu. To je važno zbog prilagodbe bržem metabolizmu ili brže adaptacije na nagle promjene hranidbe (Jouany, 1991.).

### **2.3. Anaerobne gljivice buraga**

Sve vrste gljivica koje žive u buragu rastu u uskom temperaturnom pojasu (33-41°C) i striktni su anaerobi (Lowe i sur., 1987.). Izostanak citokroma, menakinona i mitohondrija znači da su gljivice u potpunosti ovisne o fermentacijskim procesima za proizvodnju energije. Životni ciklus anaerobnih gljivica predstavlja pokretni stadij (zoospora) koja se pretvara u vegetativni stadij (sporangij) tijekom kojeg se gljivica pričvršćuje rizoidom na biljne čestice. Rizoidi prodiru kroz biljnu staničnu stijenku te na taj način gljivica dolazi do ugljikohidrata koje koristi u fermentaciji te razvija sporangij koji otpušta zoospore. Zoospore se mogu lako uočiti u tekućem sadržaju buraga (Joblin, 1981.), a sporangij gljivičnog talusa na biljnim fragmentima se može promatrati svjetlosnim ili elektronskim mikroskopom (Bauchop, 1981.). U monocentričnih vrsta rizoid nosi jedan sporangij dok kod policentričnih vrsta nekoliko sporangija je povezano s rizoidom. Policentrične gljivice se također razlikuju od

monocentričnih organizama u prisutnosti jezgre u rizoidnom sustavu (Gaillard i sur., 1989.). Monocentrične gljivice izolirane iz buraga se mogu podijeliti na tri morfološka tipa: *Neocallimastix sp.* sa poliflagelatnom sporom i jako razgranatim rizoidom (Orpin, 1975.), *Piromonas sp.* sa monoflagelatnom sporom i razgranatim rizoidom (Orpin, 1977.) i *Sphaeromonas sp.* sa zoosporom i bulbusnim rizoidom (Orpin, 1976.).

### **Potrebe za energijom i hranjivim tvarima**

Gljivice buraga su sposobne koristiti širok raspon topljivih šećera kao izvora energije. Sposobne su koristiti različite biljne polisaharide, s izuzetkom pektina i poligalakturonata. Sve *Neocallimastix* vrste koriste, s nekoliko iznimaka, iste polimere: celulozu, ksilan, pululan, inulin i škrob. *Piromonas* vrste pokazuju veću varijabilnost u iskorištavanju polisaharida. *Sphaeromonas* koristi ograničeniji raspon polisaharida nego *Neocallimastix* i *Piromonas* vrste. Sve dosad proučene *Sphaeromonas* vrste koriste ksilan, a samo neki razgrađuju čistu celulozu (Bernalier i sur., 1990.).

Gljivice proizvode sve potrebne enzime za depolimerizaciju celuloze i hemiceluloze, te hidrolizu slobodnih oligosaharida. Sve gljivične vrste proizvode iznimno velik raspon enzima za razgradnju polisaharida: endo- $\beta$ -1,4-glukanaze, ekzoglukanaze, ksilanaze, celodekstrinaze; i glikozidaze:  $\beta$ -glukozidaze,  $\beta$ -fruktozidaze,  $\beta$ -ksilozidaze,  $\beta$ -L-arabinofuranozidaze itd. (Gordon i Phillips, 1989.). Ti enzimi uglavnom su izvanstanični i proizvode se tijekom vegetativne faze i faze zoospora (Williams i Orpin, 1987.). Aktivni su unutar velikog raspona pH i temperatura. Vrsta *N. frontalis* uzgojena u prisutnosti metanogenih bakterija proizvodi izvanstaničnu celulazu, koja ima veću aktivnost na kristalnu celulozu u odnosu na *Trichoderma reesei*, koja proizvodi jednu od najaktivnijih celulaza (Wood i sur., 1986.). Celulaze i ksilanaze proizvode određene vrste gljivica buraga (Williams i Orpin, 1987.), ali mogu biti suprimirane u prisutnosti glukoze i ksiloze (Hebraud i Fevre, 1988.). Gljivice također proizvode izvanstanične metaloproteaze (Wallace i Joblin, 1985.).

Ugljikohidrate fermentiraju anaerobne gljivice kiselim tipom fermentacije (Borneman i sur., 1989.). U slučaju *N. patriciarum*, glikoliza čini jedini mehanizam fermentacije heksoze (Yarlett i sur., 1986.). Krajnji produkti (format, acetat, laktat, etanol, CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>) slični su kod svih istraženih sojeva. *N. patriciarum* ne proizvodi etanol i format (Orpin i Munn, 1986.), a sukcinat je pronađen samo kod nekih sojeva (Borneman i sur., 1989.). Kod vrste *N.*

*patriciarum* proizvodnja vodika se događa u specijaliziranim organelama nazvanim hidrogenosomi (Yarlett i sur., 1987.), sličnima onim kod protozoa koji proizvode vodik.

Malo se zna o hranidbenim zahtjevima gljivica u buragu. Dušik im se može dozirati u obliku amonijevih iona ili aminokiselina. No, rast u prisutnosti amonijevih iona je znatno slabiji nego u slučaju prisutnosti mješavine aminokiselina. U *in vitro* uvjetima rast je stimuliran širokim rasponom aminokiselina, a zahtjevi za sumporom su iz sulfida, ali ne iz sulfata (Orpin i Greenwood, 1986.). Iako je rast *N. patriciarum* stimuliran octenom, izobutiričnom i 2-metil-butiričnom kiselinom nijedna od njih nije esencijalna za rast (Orpin i Greenwood, 1986.). Vitamini i niske koncentracije dugolančanih masnih kiselina (C:14 do C:18) također stimuliraju rast. Zahtjevi za hemom za rast vrste *N. patriciarum* koja ne može sintetizirati porfirinski prsten zadovoljeni su derivatima hema (Orpin i Greenwood, 1986.) i hem induciranom zoosporogenezom.

### **Uloga gljivica u razgradnji stanične stijenke biljaka**

Gljivice su sposobne otopiti veliki udio suhe tvari čak i kod najlignificiranijih biljnih fragmenata. Miješana populacija gljivica može razgraditi do 60% biljnog materijala. Učinkovitost razgradnje biljnog materijala od strane gljivičnih populacija možda je jednaka ili čak veća od ostatka mikrobne populacije buraga (Akin i sur., 1989.). Vjerojatno zbog njihovih rizoida, koji su sposobni penetrirati biljno tkivo vrste iz rodova *Neocallimastix* i *Piromonas* su bolji u razgradnji stanične stijenke *in vitro* nego nefilamentna rizoidna vrsta *Sphaeromonas communis*. Transmisijsko elektronsko mikroskopiranje pokazalo je da tkiva stabljike kukuruza i slame slično razgrađuju čiste gljivične kulture *N. frontalis*, *P. communis*, *N. joyonii* i glavne celulolitičke bakterije buraga *Ruminococcus flavefaciens* i *Fibrobacter succinogenes* (Grenet i sur., 1989.).

### **Kolonizacija i prisutnost u buragu**

Anaerobne gljivice se pojavljuju u buragu 8-10 dana nakon janjenja kod janjadi držane u stadu, a prije konzumiranja čvrste hrane. Naknadni razvoj i preživljavanje tih gljivica ovisi o sastavu obroka. One nestaju kod 80% janjadi hranjene koncentriranom hranom, ali ostaju kod one hranjene dehidriranom lucernom (Fonty i Gouet, 1989.).



Kod odraslih preživača, što je veći udio vlaknine u obroku brojnija je gljivična populacija buraga. Livadno i lucernino sijeno osobito je pogodno za rast gljivičnih populacija (Grenet i sur., 1989.). Nasuprot tome, gljivice su nađene u malom broju kod životinja hranjenih šećernom repom (Grenet i sur., 1989.), svježom pašom, mekanim lisnatim biljkama (Bauchop, 1989.) ili žitaricama (Grenet i sur., 1989.). Slabo su prisutne kod životinja na ispaši (Bauchop, 1989.), životinja hranjenih morskom travom (Greenwood i sur., 1983.) i kod životinja hranjenih slamom tretiranom natrijevim kloritom (Elliot i sur., 1987.).

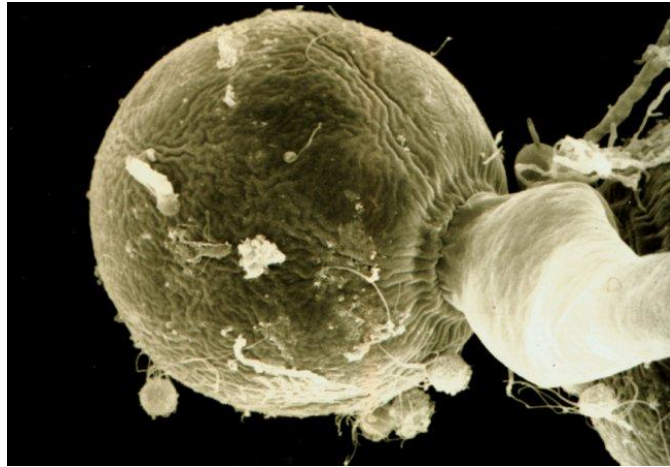
### **Kolonizacija i razgradnja biljnog tkiva**

Nakon gutanja biljnog materijala dolazi do otpuštanja zoospora sa sporangija na biljnim česticama već prisutnim u tekućini buraga. One se pričvršćuju na oštećeno tkivo i puči (Fonty i sur., 1988.). Nakon germinacije zoospore stvaraju rizoide koji penetriraju biljno tkivo, te na taj način fermentabilni ugljikohidrati postaju dostupni bakterijama. Mehanizam koji omogućuje prodiranje gljivicama je proteolitički (Wallace i Joblin, 1985.). To vjerojatno olakšava rizoidima penetraciju proteinskog sloja biljnog materijala. Gljivice koloniziraju najčešće lignificirana tkiva: sklerenhim, ksilem, vaskularne nakupine, odnosno ona koja se najduže zadržavaju u buragu (Akin i sur., 1989.).

Iako gljivice najčešće koloniziraju lignocelulozna tkiva, njihova uloga u razgradnji lignina nije jasna. *In vitro*, one mogu otopiti dio lignina biljne stanične stijenke (Gordon i Phillips, 1989.), ali nema dokaza da mogu iskoristiti lignin kao izvor ugljika. Kvantitativno, malo se zna o doprinosu gljivica u razgradnji stanične stijenke i u fermentativnim procesima. Eliminiranjem gljivica iz buraga značajno se smanjuje probavljivost suhe tvari slame i rezultira povećanim udjelom propionske kiseline u tekućini buraga (Ford i sur., 1987.).

Wallace i Joblin (1985.) su proučavali proteolitičku aktivnost vrste *Neocallimastix frontalis* izoliranog iz buraga ovce. Maksimalna proteolitička aktivnost postignuta je oko 3 dana nakon inokulacije. U ranom stadiju rasta proteolitička aktivnost kultura je uglavnom vezana s biljnim česticama dok je nakon 7 dana 84% aktivnosti bilo izvanstanično. Ta aktivnost je uglavnom vezana uz metaloproteaze. Rezultati *in vitro* istraživanja pretpostavljaju da gljivice buraga značajno doprinose proteolizi *in vivo*. Izvanstanične proteaze gljivica su potrebne za hidroliziranje ekstenzina, uobičajenog proteina stanične stijenke pa se pretpostavlja da je proteoliza možda važna u kolonizaciji biljnog tkiva gljivičnim rizoidima

(Wallace i Joblin, 1985.). Proteoliza možda daje ekološku prednost gljivicama budući da celulolitičke bakterije nisu i proteolitičke.



**Slika 3:** Zoospora gljivice vrste *Neocallimastix* sp. pričvršćena na supstrat (dostupno na: <http://www.bsu.edu/classes/ruch/msa/wubah/10-5.jpg>, 14.7.2015.)

Malo se zna o metabolizmu lipida kod gljivica buraga. Kemp i sur. (1984.) primijetili su da se sinteza masnih kiselina odvija iz  $^{14}\text{C}$ -acetata i  $^{14}\text{C}$ -glukoze i da se dugački lanci iz kultura mogu ugraditi u kompleksne lipide. Anaerobne gljivice mogu utjecati na opskrbu dugolančanim mononezasićenim masnim kiselinama. Pri određenoj hranidbi gljivice mogu utjecati na razgradnju kolina, ali i osigurati izvor kolina za novu sintezu (Kemp i sur., 1984.). Gljivice mogu zaštititi esencijalne masne kiseline, linolensku i linolnu kiselinu, od hidrogenacije u buragu. Analize sastava esencijalnih aminokiselina raznih sojeva anaerobnih gljivica uzgojenih u kulturi pokazuje da one imaju visoku razinu nekih esencijalnih aminokiselina kao što su lizin, izoleucin, fenilalanin i sumporne aminokiseline (Gulati i sur., 1989.). Taj osobiti sastav čini se povezanim s neobično visokim sadržajem adenina i timina u gljivičnom genomu (Brownlee, 1989.). Proteini gljivica su visoko probavljivi u buragu ovce (Gulati i sur., 1989.).

### **Interakcije s ostalim mikroorganizmima buraga**

Zbog visoke proizvodnje vodika gljivice mogu formirati stabilne kokulture s metanogenim bakterijama (Stewart i Richardson, 1989.). Povezivanje gljivica i metanogena vodi do povećanja gljivične biomase (Bernalier i sur., 1991.) i povećanja brzine hidrolize i

sadržaja razgrađene celuloze (Fonty i sur., 1988.). Gljivična celulazna aktivnost je viša u kokulturi nego u monokulturi (Wood i sur., 1986.). U kokulturi s metanogenima, metabolizam gljivica je usmjeren prema većoj proizvodnji acetata uz utrošak više reduciranih sastojaka (laktat, etanol) (Joblin i sur., 1989.). U kokulturi s celulolitičkim bakterijama *R. flavefaciens* ili *R. albus* celulolitička aktivnost vrsta *N. frontalis* (Bernalier i sur., 1988.) i *P. communis* (Bernalier, 1991.) je djelomično inhibirana. Nasuprot tome, u prisutnosti *F. succinogenes* gljivična celulolitička aktivnost ostaje nepromijenjena (Bernalier i sur., 1988.).

Često velik udio mikrobne biomase u buragu čine trepetljikaši, a poznato je da protozoa mogu značajno smanjiti bakterijsku populaciju u buragu. Malo se toga zna o interakciji između protozoa i gljivica. Trepetljikavi protozoa mogu progutati bakterije veličine zoospora pa je vjerojatna i predacija protozoa na zoospore (Coleman, 1989.). Nema pravog dokaza za to, ali istraživanja o defaunizaciji otkrivaju da uklanjanjem trepetljikavih protozoa iz buraga dolazi do povećanja broja gljivičnih zoospora (Orpin, 1977.). Prilikom snimanja elektronskim mikroskopom gljivične kolonizacije biljnih čestica iz buraga ovce, *entodiniomorfni* protoza su bili često primijećeni blizu gljivičnih sporangija. To može biti slučajnost ili može upućivati da u *in vivo* uvjetima protozoa privlače mjesta gljivične razgradnje biljnog materijala, prisutnošću šećera koje otpuštaju gljivice ili bakterije (Jouany, 1991.).

## 2.4. Archaea

*Archaea* predstavljaju metanogenu populaciju buraga. U staničnim stijenkama metanogenih *Archaea* nedostaje peptidoglikan, ali je prisutan pseudomurein. Druga diferencijalno dijagnostička obilježja *Archaeobacteria* u odnosu na klasične bakterije buraga uključuju jedinstveni sastav membranskih lipida, strukturu RNA polimeraze i neobične modifikacijske uzorke RNA baza (Archer i Harris, 1986.). Varijacije u svojstvima izoliranih *Methanobrevibacteria* pretpostavlja postojanje više od jedne vrste. Preferirani supstrat za metanogenezu u buragu je  $H_2/CO_2$ , ali većina izoliranih metanogena može koristiti i mravlju kiselinu. Iako izolirane *Methanosarcine* mogu koristiti acetat (Patterson i Hespell, 1979.) ta reakcija se ne smatra važnom u buragu.

Metanogeni su podijeljeni u 28 rodova i 113 vrsta (Garrity i sur., 2007.). Metanogeni iz buraga koji su kultivirani čine samo sedam vrsta. To su: *Methanobacterium formicicum*, *Methanobacterium bryantii*, *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanobrevibacter millerae*,

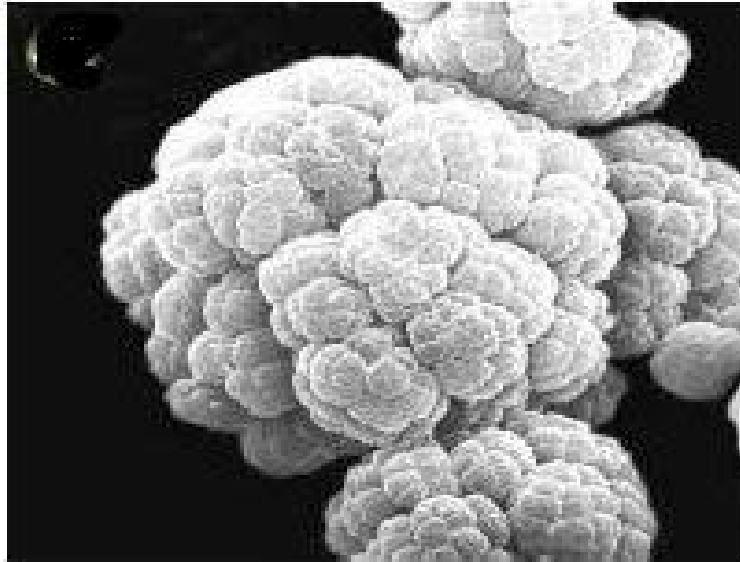
*Methanobrevibacter olleyae*, *Methanomicrobium mobile* i *Methanoculleus oletangyi*. *Methanosarcina spp* je također kultivirana iz buraga, ali ne čini veliki dio *Archea* populacije. Unutar roda *Methanobrevibacter* klonirane sekvence ukazuju na dvije glavne grane. Jedna grana, u koju spadaju *Methanobrevibacter gottschalki*, *Methanobrevibacter thaueri* i *Methanobrevibacter millerae*, čine najveći dio *Methanobrevibacter* klonova (33,6% *Archea* buraga). Druga glavna grana, u koju spadaju *M. ruminantium* i *M. olleyae*, čini 27,3% *Archea* buraga. Drugi članovi roda *Methanobrevibacter* uključuju *M. smithii* i *M. wolinii* se rijede pojavljuju. Članovi drugih skupina metanogena uključuju *Methanimicrococcus*, *Methanosphaera* i *Methanobacterium* vrste. Postoje i dvije skupine nekultiviranih *Archea*, označenih Qld26 i grana *Crenarcheota*.

U buragu koji normalno funkcionira proteine i ugljikohidrate fermentira miješana mikrobiološka zajednica do hlapljivih masnih kiselina, metana, ugljikovog dioksida i vodika. Vodik metaboliziraju metanogeni. Hlapljive masne kiseline se apsorbiraju kroz stijenku buraga te se koriste kao izvor ugljika i energije za preživača. Dio hlapljivih masnih kiselina, neprobavljeni dijelovi hrane i stanice mikroorganizama napuštaju burag i ulaze u ostale dijelove domaćinovog probavnog sustava. Iako metanogene *Archeae* čine mali dio mikropopulacije u buragu one su vrlo bitne za normalno funkcioniranje buraga i hranidbu životinje. Učinkovito uklanjanje vodika vodi prema hranidbeno povoljnijem uzorku stvaranja hlapljivih masnih kiselina i povećanju brzine fermentacije uklanjanjem inhibitornog efekta vodika na mikrobiološku fermentaciju (Janssen i Kirs, 2008.).

Metanogeni su poznati po simbiotskim odnosima koji uključuju prijenos vodika iz drugih mikroorganizama buraga, posebno s protozoa. Uobičajeni protozoe pronađeni u buragu goveda koji imaju takav odnos s metanogenima su iz rodova *Entodinium*, *Polyplastron*, *Epidinium* i *Ophrysclex*, dok metanogeni povezani s njima dolaze iz rodova *Methanobacteriales* i *Methanomicrobiales*. Otkriveno je i da anaerobne gljivice kao što je *Neocallimastix frontalis* imaju odnose s metanogenima koji uključuju prijenos vodika pri čemu se povećava enzimatska aktivnost, a metabolizam se pomiče prema proizvodnji acetata (Hook i sur., 2010.). Procjenjuje se da između 9 i 25% metanogena buraga povezano s protozoama, a 37% proizvedenog metana potječe od istih (Belanche i sur., 2014.).

Protozoa gutaju bakterije buraga koje su im glavni izvor proteina, ali je dokazano da progutane bakterije mogu preživjeti duži vremenski period unutar vezikula protozoa i tako postaju endosimbionti. Istraživanja su pokazala da značajan dio endosimbionata čine metanogene *Archaea* vrste. Čini se da se brojni metanogeni endosimbionti prilagođavaju metabolizmu protozoa. Uzevši u obzir da protozoa buraga pridonosi idealnim uvjetima za rast

metanogena (nizak pritisak kisika i visoka dostupnost vodika), dokazana je i kemotaksija između metanogena i protozoa *in vitro*. Moguće je da metanogeni imaju pozitivan tropizam prema protozoama što dovodi do duljeg preživljavanja metanogena u citoplazmi protozoa (Belanche i sur., 2014.).



**Slika 4:** *Methanosarcina acetivorans* (dostupno na : <https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Methanosarcina>, 14.7.2015.)

### **3. Uloga mikroorganizama u razgradnji hrane u buragu**

#### **3.1. Mikroorganizmi i razgradnja vlakana**

Obrok preživača sadrži značajne količine celuloze, hemiceluloze, škroba i topivih ugljikohidrata. Svi ugljikohidrati, osim lignina, se razgrađuju do jednostavnijih oblika koji se koriste kao izvor energije za potrebe životinje i mikroorganizama. Razgradnja ugljikohidrata se odvija u nekoliko etapa do hlapljivih masnih kiselina. Stupanj razgradnje ugljikohidrata ovisi o stupnju lignifikacije biljnog materijala. Biljke starenjem povećavaju količinu lignina u staničnim stijenkama, pa je posljedično tome stupanj razgradnje takvog biljnog materijala manji. U hranidbi životinja uobičajeno je koristiti termin „vlakna“ za označavanje najmanje probavljive frakcije hrane. Preživač nema sposobnost probavljanja netaknutih staničnih stijenki, nego te stanične stijenke zajedno sa polisaharidima koje sadrže služe kao supstrat za rast mikroorganizama u buragu (Domaćinović i sur., 2015.).

#### **Organizacija biljne stanice**

Kao i životinjske stanice, biljna stanica sadrži citoplazmu okruženu plazmalemom, no sadrži i stijenku građenu od polisaharida sa zajedničkim središnjim slojem, središnjom lamelom. Biljne stanice imaju tri istaknute karakteristike: prisutnost plastida koji sadrže klorofil, veliki udio vakuola i čvrstu staničnu stijenku.

Tri glavna sloja stanične stijenke se uobičajeno razlikuju kod zrele stanice. Središnja lamela je građena uglavnom od pektina, ali kod lignificiranih tkiva ona sadrži lignin. U tkivu je teško razlikovati središnju lamelu od primarne stanične stijenke. Primarna stanična stijenka je tanka zasebna stijenka formirana u ranijim stadijima biljnog rasta. Ona je, barem kada su stanice mlade, savitljiva i rastezljiva. Sadrži celulozu, pektinske tvari i hemiceluloze. Kasnije postaje lignificirana. Sekundarna stanična stijenka sadrži slojeve različite debljine koji su nerastezljivi, te je često vrlo tvrda. Sadrži uglavnom celulozu, hemiceluloze i lignin. Sekundarnu staničnu stijenku se može smatrati dodatnom stijenkom koja ima mehaničku funkciju. Struktura stanične stijenke je uglavnom konstantna: vlaknasta komponenta čiji je okvir uvijek izgrađen od celuloznih mikrovlakana okruženih amorfnim matriksom izgrađenim uglavnom od polisaharida. U svojoj završnoj fazi ona može biti pojačana dodatnim sastojcima

koje još više stabiliziraju strukturu. Osnovni primjer je lignifikacija koja vodi do smrti stanice i nestanka staničnog sadržaja (Jouany, 1991.).

### **Građevne tvari stanične stijenke**

**Pektin** ima relativno malu molekularnu masu od 20 000 do 360 000 daltona. Najčešće pronađeni kiseli pektinski polimeri su ramnogalakturonani. Oni su građeni od  $\alpha$ -(1-4)-D-galakturonske kiseline povezane s ramnozom. Kisele skupine mogu biti esterificirane metanolom i/ili neutralizirane kalcijevim, natrijevim ili kalijevim ionima. Pektini se uglavnom nalaze u središnjoj lameli. Njihov udio se smanjuje od primarne do sekundarne stanične stijenke. Oni služe kao cement između stanica i između drugih sastojaka stanične stijenke. Njihova koncentracija je približno deset puta manja kod monokotiledona nego kod dikotiledona, kod kojih mogu činiti i više od 20 % suhe tvari u nekim tkivima (Dey i Brinson, 1984.).

**Hemiceluloze** su bitne za fleksibilnost i savitljivost stanične stijenke. Njihov udio se smanjuje od primarne do sekundarne stijenke. Postoje varijacije u sadržaju i strukturi hemiceluloze među tkivima. Razlike u sadržaju hemiceluloze su velike između trava (visok udio, 70-90 % celuloze) i leguminoza (nizak udio, mnogo manje nego celuloze).

**Celuloza** se kontinuirano sintetizira u rastućoj stanici. Njen sadržaj raste od primarne do sekundarne stijenke. Celuloza svojom snagom i tvrdoćom doprinosi čvrstoći stanice. Udio celuloze jako varira ovisno o rodu biljke, ali malo unutar i između porodica zrelih krmnih biljaka.

**Strukturalne fenolne tvari. Monomerne i dimerne tvari** poput hidroksicitrične kiseline su ili prekursori polifenola ili imaju ulogu u izgradnji stanične stijenke. Zbog njihove dvostruke uloge oni mogu i eterificirati i esterificirati lignin ili neutralne i kisele skupine hemiceluloze. Neke od njih mogu spojiti lignine i hemiceluloze (Hartley i sur., 1988.). **Lignini** se sintetiziraju na kraju rasta stanice. Sadržaj lignina je visok u središnjoj lameli, a smanjuje se prema sekundarnoj staničnoj stijenci. Njihov sadržaj i udio variraju u tkivima s obzirom na botaničko porijeklo, dob biljke i okolišne čimbenike. Lignini lucerne se čine gušćima nego oni kod trava. Sadržaj lignina u krmivima varira ovisno o stupnju zrelosti (3-11% suhe tvari), ali kod istog stupnja zrelosti leguminoze imaju više lignina nego trave (Jarrige, 1980.).

**Osnovni nestrukturani dijelovi** su neprobavljivi i/ili ometaju celulitičku aktivnost mikroorganizama buraga. Silicij se koristi kao strukturalni element stanične stijenke, dopunjuje lignin i nalazi se uskladišten u dlačicama na biljnoj površini i rubovima kutikule (Van Soest, 1982.). Voskovi, kutin i suberin su uglavnom građeni od dugolančanih alkohola i kiselina hidroliziranih do različitog stupnja i potpuno esterificiranih (Kolattukudy, 1980.).

### **Adhezija mikroorganizama na biljne čestice**

Mikroorganizmima koje susrećemo u buragu moraju naći hranjive tvari koje im trebaju i izbjegavati odnošenje iz buraga probavnim tokom. Organizmi koji koriste polisaharide stanične stijenke kao osnovni izvor energije preživljavaju u bliskoj povezanosti s česticama hrane koja dospijeva u burag i stoga su sposobni ostati u buragu dokle god ima hrane. Sposobnost celulolitičkih mikroorganizama da se pričvrste na biljno tkivo je iznimno važna, a adhezija je prvi stupanj razgradnje.

Bakterije, gljivice i protozoa koloniziraju gotovo sve biljne čestice koje ulaze u burag. Glavni putevi kolonizacije su lezije na epidermisu ili puči na listovima. Glavne bakterijske vrste koje se pričvršćuju na čestice su celulolitičke bakterije *Ruminococcus albus*, *R. flavofaciens* i *Fibrobacter succinogenes*. Vrste iz roda *Ruminococcus* se relativno slabo pričvršćuju na stijenke na kojima se *Fibrobacter succinogenes* čvrsto spoji i mijenja oblik da bi se prilagodio površini materijala koji razgrađuje. Stijenke parenhima, koje se brzo razgrađuju, kolonizira veliki broj bakterija dok se deblje stijenke vaskularnih tkiva ili sklerenhima slabo koloniziraju (Cheng i sur., 1983/1984.).

Gljivice i protozoa također koloniziraju biljne fragmente (Akin, 1986.), ali način na koji se pričvršćuju je manje jasan. Zoospore gljivica se najčešće pričvršćuju na puči i oštećena područja čestica, čiji topivi šećeri difundiraju u okolinu i privlače zoospore kemotaksijom. Zoospore plivaju u tekućini buraga do mjesta kolonizacije, izlaze iz cisti i razviju talus koji probija tkiva pomoću rizoida (Bauchop, 1984.).



## Enzimi koje proizvode mikroorganizmi buraga

Većina celulolitičkih bakterija u buragu proizvodi celulaze. *R. albus* proizvodi celulazu čija je aktivnost najveća pri pH 6.0 – 6.8 i temperaturi 45°C (Smith i sur., 1973.). *R. albus* također proizvodi i ekstracelularnu celobiozidazu (Ohmiya i sur., 1982.) i β-glukozidaze (Ohmiya i sur., 1985.). *Fibrobacter succinogenes* ima visoku hidrolitičku aktivnost na celuloze. Proizvodi velike količine endoglukanaza i β-glukozidaza (Groleau i Forsberg, 1981.) čija aktivnost može biti intracelularna ili ekstracelularna. Također su otkrivene i izvanstanične celobiozidaze i periplazmatske celodekstrinaze kod *F. succinogenes*.

Trepetljikavi protozoa (Jouany i Ushida, 1990.) i gljivice (Fonty i Joblin, 1991.) također posjeduju celulaze i hemicelulaze (Chesson i Forsberg, 1988.). Pektolitičke enzime, esteraze i liaze također proizvode bakterije i protozoa, ali ne anaerobne gljivice (Williams i Orpin, 1987.).

## Razgradnja građevnih tvari stanične stijenke

**Razgradnja celuloze.** Tri glavna enzima koja hidroliziraju celulozu su endo-1-4-β-glukanaza, celobiohidrolaza i β-glukozidaza. Endoglukanaze nasumično napadaju celulozu, brzo smanjujući duljinu lanca otpuštanjem celo-oligosaharida. Celobiohidrolaze razgrađuju celulozu otpuštanjem jedinica celobioza na nereducirajućim krajevima lanca. β-glukozidaze hidroliziraju celobiozu i topive oligosaharide s niskim stupnjem polimerizacije u glukozu.

**Razgradnja hemiceluloze.** Hemiceluloze hidroliziraju L-arabinoze, D-galaktanaze, D-mananaze i D-ksilanaze (Dekker, 1976.). Endo-D-ksilanaze razgrađuju supstrate napadajući unutrašnjost molekula. Egzo-D-ksilanaze hidroliziraju polimere ksiloze povratno od njihovog nereducirajućeg kraja. One hidroliziraju ksilane uglavnom u ksiloze, ksilobioze i oligomere ksiloze i otpuštaju L-arabinoze (Williams i sur., 1984.).

**Razgradnja pektina.** Pektolitički enzimi se dijele u dvije osnovne skupine: esteraze, koje kataliziraju odvajanje metanola, i hidrolaze ili liaze, koje depolimeriziraju pektin (Chesson, 1980.). Neki od tih enzima su endoenzimi dok su drugi egzoenzimi koji imaju povratnu akciju od reducirajućeg ili nereducirajućeg kraja supstrata, otpuštajući pritom galakturonsku kiselinu ili dimere galakturonske kiseline. Pektolitička aktivnost je prepoznata kod glavnih bakterija i protozoa (Wojciechowicz i sur., 1982.).

## **Krajnji proizvodi razgradnje stanične stijenke**

Hidrolizom stanične stijenke nastaju monomeri koji se zatim fermentiraju u piruvat po Embden-Meyerhofovom i pentoza fosfatnom putu. To je intermedijarni proizvod, koji se brzo iskorištava. On se metabolizira i formira kratkolančane masne kiseline nazvane hlapljive masne kiseline i plinove ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_4$ ,  $\text{H}_2$ ). Energiju oslobođenu tijekom tih reakcija u obliku topline i metana životinja ne može iskoristiti. Energija koja se pojavljuje u obliku ATP-a koristi se za osiguravanje rasta mikroorganizama i njihovih uzdržnih potreba.

## **Čimbenici koji utječu na razgradnju stanične stijenke**

Veliki udio površine čestica koje dolaze u burag je pokriven epidermisom koji štiti nadzemne dijelove krmnih biljaka. Epidermis sprječava prodor mikroorganizama. Mikroorganizmi mogu kolonizirati tkiva samo na polomljenim rubovima čestica i preko prirodnih otvora (puči).

Fina struktura polisaharida može utjecati na brzinu i trajanje njihove razgradnje putem enzima mikroorganizama. Pretpostavlja se da kristaliničnost celuloze može biti ograničavajući faktor razgradnje stijenke. Mjerenja izvedena u buragu pokazala su da se kristalna struktura celuloze razgrađuje istom brzinom kao i amorfnja celuloza (Beveridge i Richards, 1975.).

Primarna stijenka ima mali udio fenolnih dijelova, a kod monokotiledona ti sastojci su uglavnom monomeri fenolnih kiselina, aldehida i fenolnih polimera male molekularne mase (Hartley i Keene, 1984.). Sekundarna stijenka trava sadrži oko 11% fenolnih kiselina (Salomonsson i sur., 1978.). Fenolne kiseline su zanimljive zato što je njihova struktura slična onoj koju imaju prekursori lignina (Mueller-Harvey i sur., 1986.).

Lignini su osnovni sastojci sekundarne stanične stijenke. Usko su povezani s matriksom polisaharida u stijenci. Barem dvije kategorije lignin-ugljikohidratnih kompleksa su poznate: jedna s pentozama, druga s pentozama i heksozama. Struktura tih kompleksa varira ovisno o biljci i dijelu biljke (Ford, 1986.). Lignificirane stijenke vjerojatno nisu dovoljno porozne da omoguće slobodnu difuziju enzima, posebno celulolitičkih. Kao rezultat toga, mikroorganizmi mogu napadati samo površinu stanične stijenke.

Razgradnja lignificiranih stijenki odvija na način da polisaharidi dostupni mikroorganizmima bivaju eliminirani sa površine stanične stijenke. Bakterije naposljetku dopiru do sloja lignina, koji spriječava daljnju razgradnju. Takav lignin ostaje povezan sa ostalim dijelovima stanične stijenke i ne može difundirati u tekućinu buraga. No kompleksi lignina i ugljikohidrata pronađeni u tekućini buraga pokazuju da se i takva stijenka može razgraditi do određene mjere (Jouany, 1991.).

### **Razgradnja pojedinih tkiva**

**Stabljika trava:** stanice parenhima počinju se razgrađivati nakon 12 sati u buragu. Nakon 21 sat one su razgrađene, epidermis postaje odvojen kao rezultat razgradnje kortikalnog parenhima, a od provodnog tkiva jedino ksilemske žile, koje su lignificirane, ostaju netaknute. Floem se razgrađuje. Sklerenhim ostaje netaknut.

**List trava:** mezofil je djelomično razgrađen nakon 12 sati u buragu. Nakon 21 sat epidermis je probavljen, a mezofil razgrađen, ostavljajući jedino kutikulu.

**Stabljika leguminoza:** epidermis, kortikalni parenhim i medularni parenhim počinju se razgrađivati nakon 6 sati u buragu. Nakon 12 sati, osim ksilema, sva ostala tkiva su nestala.

**List leguminoza:** list se vrlo brzo razgrađuje. Nakon 3 sata u buragu većina mezofila je probavljena i netaknute ostaju jedino žile.

### **Hranidbena vrijednost krmiva**

Razgradnja vlaknine u buragu ovisi isključivo o tome koliko su stanične stijenke lignificirane. Probavljivost stijenki, koja iznosi 0,90 u mladog engleskog ljuja, pada na 0,40 kod slame. Probavljivost staničnog sadržaja je vrlo visoka i malo varira, tako da neprobavljena organska tvar krmiva ovisi isključivo o neprobavljivom udjelu stanične stijenke.

Probava u buragu ovisi o aktivnosti mikroorganizama, koji trebaju energiju (ATP), dušik (amonijak, peptidi, aminokiseline), minerale (sumpor) i okolinu u kojoj je pH od 6-6.5. Voluminozna krmiva loše kvalitete kao što je slama, ima veliki udio staničnih stijenki, ali

malo staničnog sadržaja. Sadržaj dušika, šećera, škroba i minerala u takvim krmivima nije dovoljan za potrebe mikroorganizama i stoga ih treba nadopunjavati kvalitetnijim krmivima.

Određena voluminozna krmiva loše kvalitete, čak i ako je probava u buragu optimalna, nije dovoljna za uzdržne potrebe životinje (energija, dušik). Tada se daju koncentracije kao dodatak. Da bi ti koncentracije bili učinkoviti ne smiju ometi razgradnju voluminoznih krmiva nego osigurati životinji esencijalne elemente i hranjive tvari, koje se ne dobiju fermentacijom voluminoze u buragu (Jouany, 1991.).

### **3.2. Mikroorganizmi i razgradnja bjelančevina**

Proteolitičke bakterije i protozoa razgrađuju većinu bjelančevina koje dođu u burag. Proizvodi mikrobiološke razgradnje bjelančevina u buragu su aminokiseline koje se mogu dalje razgrađivati do organskih kiselina, amonijaka i ugljikovog dioksida. Dio aminokiselina i amonijak mogu dalje koristiti mikroorganizmi za izgradnju vlastitih bjelančevina. Mikroorganizmi i nerazgrađene bjelančevine razgrađuju se u tankom crijevu preživača što im omogućava neovisnost o kvaliteti bjelančevina u hrani (Domaćinović i sur., 2015.).

Osnovna svrha buraga i kapure, u evolucionarnom smislu, je usporiti pasazu vlaknastog materijala kroz probavni sustav, tako da je on izložen fibrolitičkoj aktivnosti mikroorganizama kroz duže vrijeme. Ti mikroorganizmi posjeduju enzimatsku aktivnost koja omogućava probavljanje biljnog materijala bogatog celulozom. Smještaj buraga kao prvog probavnog organa omogućava životinji iskorištavanje ne samo fermentacijskih produkata male molekularne mase dobivenih fermentacijom biljnih staničnih stijenki nego i mikroorganizama kao izvora proteina i drugih hranjivih tvari. Takav sustav je posebno učinkovit kod neadekvatnih hranidbenih uvjeta kada obrok ima veliki udio celuloze, a malo proteina. Sinteza proteina mikroorganizama iz neproteinskog dušika osigurava životinji proteine prihvatljive kvalitete i omogućava iskorištavanje dušika iz ureje.

#### **Razgradnja proteina do amonijaka**

Budući da se proteolitička aktivnost mikroorganizama buraga većinom odvija na staničnoj razini (Kopečný i Wallace, 1982.), prvi korak u razgradnji proteina je interakcija mikroorganizama i supstrata. Topljive proteine kao što su frakcija I proteina lista i kazein

razgrađuju bakterije (Kopečný i Wallace, 1982.), a resorpcija proteina na stanični omotač je preduvjet za hidrolizu (Wallace, 1985.). Bakterije se također pričvršćuju na netopljive proteine, a protozoa također doprinose razgradnji proteina gutajući čestice proteina odgovarajuće veličine (Ushida i sur., 1991.).

Proteolitičkim djelovanjem oslobađaju se oligopeptidi koji se zatim razgrađuju na dipeptide i aminokiseline. Neke se ugrađuju u protein mikroorganizama, ali većina aminokiselina se deaminacijom pretvara u amonijak (Nolan, 1975.). Značajni udio amonijaka se ugrađuje u protein mikroorganizama, ali se određeni dio apsorbira kroz stijenku buraga. Akumulacija peptida i aminokiselina ovisi o prirodi proteina prisutnog u hrani. Važno je zapamtiti da se katabolizam peptida i aminokiselina odvija brzinama koje su slične onima kod razgradnje proteina.

### **Čimbenici koji utječu na razgradnju proteina**

Nužni preduvjet razgradnje proteina je to da mikroorganizmi i njihovi proteolitički enzimi imaju pristup supstratu. Topivi proteini su stoga podložniji razgradnji nego netopivi proteini (Hendricks, 1976.). Neki proteini koje bi inače mogli razgraditi mikroorganizmi buraga vjerojatno mogu biti maskirani (skriveni) prisustvom škroba, lignoceluloze ili drugih polimera stanične stijenke (Varvikko, 1986.).

Kazein, koji se često koristi kao eksperimentalni supstrat, je u određenom smislu neprikladan kao model jer se razgrađuje puno brže nego većina topivih proteina, uključujući frakciju I proteina lista. Albumini životinjskog i biljnog porijekla se sporije hidroliziraju (Spencer i sur., 1988.). Umrežavanje ima velik utjecaj na razgradivost proteina. Kada se različiti proteini tretiraju merkaptanolom ili hidroperoksid formaldehidom dolazi do cijepanja disulfidnih veza, a brzina razgradnje se značajno povećava u odnosu na netretirane materijale (Wallace, 1983.). Primjerice, albumini tretirani hidroperoksid formaldehidom hidroliziraju se jednako brzo kao i kazein. Brzina hidrolize kazeina ne povećava se zato što nema disulfidnih veza. Nasuprot tome, kada se u protein uvode disulfidne veze kemijskim tretmanom, njihova brzina razgradnje se smanjuje (Nugent i sur., 1983.).

Istraživanja razgradivosti dušika *in vitro* pokazala su da se razgradivost dušika kretala od 19 do 40% u hrani koja sadrži tanine te 40-80% kod hrane koja sadrži tanine i polietilen glikol. Ta otkrića dokazala su dvije stvari: dodavanjem polietilen glikola povećava se

dostupnost dušika za mikroorganizme u buragu za 100% te da tanin smanjuje sposobnost mikroorganizama da razgrađuju bjelančevine (Getachew i sur., 2000).

Proteinski dodaci se razlikuju od čistih proteina po tome što sadržavaju mješavinu različitih proteina, a ti proteini mogu biti povezani s drugim polimerima koji mogu utjecati na razgradive osobine proteina. Proteinski dodaci mogu se podijeliti u dvije kategorije, one životinjskog podrijetla i one biljnog podrijetla. Prethodnu skupinu uglavnom čine riblje brašno, mesno i koštano brašno, brašno od perja i krvno brašno. Ti proteini su odlični zato što njihov uravnoteženi aminokiselinski sastav odgovara potrebama životinja (Asplund, 1986.) i zato što većina proteina izbjegne fermentaciju u buragu (Orskov i sur., 1983.). No zbog pojave goveđe spongioformne encefalopatije upotreba im je zabranjena. Bez obzira na njihovu veću razgradivost, aminokiselinski sastav biljnog proteina je manje vrijedan nego onaj animalnih proteina zbog niske količine lizina i metionina (Harvey, 1970.).

### **Mikrobiološka razgradnja proteina u buragu**

**Proteoliza.** Svojstvo proteolize posjeduju mnoge vrste bakterija, protozoa i gljivica u buragu (Wallace i Cotta, 1988.). Ključna osobina proteolize u buragu je ta da je vrlo varijabilna i uključen je velik broj različitih vrsta mikroorganizama. Osnovna proteolitička bakterija buraga je *Bacteroides ruminicola* (Wallace i Brammal, 1985.) te vrste *Butyvirbio fibrisolvens*, *Clostridium sp.*, *Eubacterium ruminantium*, *Fusobacterium sp.*, *Ruminobacter amylophilus*, *Selenomonas ruminantium* i *Streptococcus bovis* (Wallace, 1988.). Bakterijske proteaze iz miješanih populacija su većinom cisteinske proteaze s prisutnim serinskim i metaloproteazama (Kopečný i Wallace, 1982.). Miješani protozoa buraga imaju različitu proteinsku aktivnost, a najvažnije su cisteinska i aspartatska proteaza (Forsberg i sur., 1984.). Mnoge vrste posjeduju unutarstanične proteaze (Lockwood i sur., 1988.). Gljivice buraga imaju specifičnu izvanstaničnu metaloproteaznu aktivnost (Wallace i Joblin, 1985.). Što se tiče doprinosa protozoa u proteolizi, značajno je to da defaunizacija smanjuje razgradnju biljnoga proteina i uzrokuje povećan odljev dušika iz buraga (Ushida i sur., 1986.).

**Razgradnja aminokiselina** se događa sporije od razgradnje peptida. Protozoa ovdje imaju veliku važnost jer je njihova aktivnost deaminacije oko tri puta veća nego kod bakterija (Hino i Russell, 1988.). Većina vrsta protozoa proizvodi amonijak iz proteina, najviša aktivnost je kod *Entodinium caudatum* i *Entodinium simplex* (Williams, 1986.). Deaminacija

reduciranih aminokiselina (alanin, leucin, izoleucin, valin) ovisi o aktivnosti hidrogenaze te biva potisnuta inhibitorima metanogeneze (Hino i Russell, 1985.).

### **Potrebe mikroorganizama za dušikom**

Mikropopulacija buraga također ima potrebe za dušikom za svoje procese biosinteze. Ako je protein glavni izvor dušika važno je da je barem dio dostupan razgradnji i asimilaciji u mikroorganizme. Mnoge vrste bakterija buraga mogu rasti s amonijakom kao jedinim izvorom dušika dok god su dostupni neki izvori ugljika kao što su hlapljive masne kiseline.

Amonijak je esencijalan za rast mnogih vrsta bakterija buraga (Allison, 1970.). On se asimilira NAD- i NADP- povezanom glutamat dehidrogenazom. Bakterije posjeduju druge enzime za asimilaciju amonijaka, ali su oni važni kod koncentracija koje nadilaze uobičajene količine u buragu. Glutamin sintetaza – glutamat sintetaza (GS-GOGAT) ima nisku koncentraciju pri normalnim koncentracijama amonijaka u buragu, a postaje važna za bakterijsko preživljavanje kod nižih koncentracija amonijaka (Wallace i Cotta, 1988.), dok alanin dehidrogenaza može iskoristiti neobično veliku količinu amonijaka (Blake i sur., 1983.).

Većina bakterijskih i protozoalnih vrsta može iskoristiti već formirane aminokiseline za rast, u obliku peptida ili slobodnih aminokiselina (Wallace i Cotta, 1988.). Peptidi se bolje asimiliraju nego ekvivalentna mješavina aminokiselina u miješanoj populaciji (Prins i sur., 1979.), a pojedinačne vrste bakterija buraga rastu brže ako su peptidi prisutni u mediju (Chen i sur., 1987.).

### **3.3. Lipidi i mikrobiološka probava u buragu**

Masti hrane se u buragu metaboliziraju što ima veliki utjecaj na profil masnih kiselina koje su dostupne za resorpciju u tankom crijevu. Masti u buragu podliježu procesu hidrolize i biohidrogenizacije. U tanko crijevo najviše dolazi stearinska, a zatim linolna nezasićena masna kiselina. Obroci preživača ne smiju sadržavati više od 50 g masti/kg ST inače dolazi do smanjenja aktivnosti mikroorganizama (Domaćinović i sur., 2015.).

Lipidi su organske tvari netopljive u vodi koje se nalaze u stanicama, ekstrahiraju se nepolarnim otapalima kao što su kloroform, eter ili benzen. Postoji nekoliko vrsta lipida, kao što su trigliceridi, fosfolipidi i voskovi. Strukturni lipidi su pronađeni u zaštitnom površinskom sloju (površina lista- voskovi, membrane- glikolipidi i fosfolipidi). Listovi viših biljaka sadrže oko 7% suhe tvari u strukturnim lipidima. Skladišni lipidi se pojavljuju kod sjemenki i uglavnom su prisutni kao trigliceridi (Gurr, 1984.).

Neke sjemenke uljarica sadrže i do 50% mase suhe tvari u obliku skladišnih lipida. Strukturni i skladišni lipidi su također pronađeni i kod životinja. Osim jetre, koja ima 2-3%, većina životinjskih tkiva sadrži manje od 1% strukturnih lipida. Skladišni lipidi mogu činiti i do 95% masnog tkiva kod debelih životinja (McDonald i sur., 1988.).

Lipidi služe kao nosioci elektrona (fosfolipidi), nosioci supstrata u enzimatskim reakcijama (glikolipidi i lipoproteini), komponente su bioloških membrana (fosfolipidi često s nezasićenim masnim kiselinama) i za skladištenje energije (uglavnom trigliceridi). Njihova energetska gustoća je gotovo dva puta veća od one ugljikohidrata (Palmquist i Jenkins, 1980.). I fizikalna i metabolička svojstva lipida ovise o duljini njihovih lanaca, stupnju zasićenja, razgranatosti i rasporedu masnih kiselina kod triglicerida (Enser, 1984.). Važne karakteristike su topivost i točka topljenja. Topivost u vodi je obično niska i smanjuje se s povećanjem duljine lanca. Točka topljenja masnih kiselina i lipida određuje njihov stupanj fluidnosti i njihovu pokretljivost (Jouany, 1991.).

### **Hidroliza i biohidrogenacija lipida u buragu**

Nakon hidrolize lipida hrane, masne kiseline se adsorbiraju na čestice hrane, membrane protozoa i bakterija. Bakterije mogu iskorištavati masne kiseline i mogu ih koristiti kao strukturne lipide ili kao skladišne lipide (Bauchart i sur., 1990.).

**Hidroliza** lipida hrane prvi je korak u njihovom metabolizmu u buragu. Lipaze su izolirane iz različitih sojeva bakterija; protozoa u velikom dijelu ne sudjeluju u hidrolizi, osim hidrolizi fosfolipida. Završni produkti hidrolize su slobodne masne kiseline u buragovu sadržaju. Nisu pronađeni nikakvi intermedijerni sastojci kao što su mono- ili digliceridi. Hidrolizom lipida također nastaju glicerol i galaktoze koje se pretvaraju u hlapljive masne kiseline (uglavnom propionsku i maslačnu) (Hazlewood i Dawson, 1975.).



**Biohidrogenacija** se događa kod različitih vrsta bakterija, jedino na slobodnim masnim kiselinama adsorbiranim na čestice hrane i stijenke mikroorganizama, a počinje izomerizacijom pomoću bakterijskih enzima nakon čega je redukcija moguća samo u strogo anaerobnim uvjetima (Harfoot, 1981.). Linolenska kiselina se često biva potpuno hidrogenirana u stearinsku kiselinu. Biohidrogenacija linolne kiseline nije potpuna, ona daje stearinsku kiselinu i različite izomere C 18:1, od kojih je transvaksenska masna kiselina (n-7) karakteristična za probavu u buragu.

### **Iskorištavanje lipida od strane mikroorganizama**

Mikroorganizmi zbog nedostatka kisika u mediju buraga vjerojatno ne koriste masne kiseline kao energetski supstrat. Jedini dokaz razgradnje masnih kiselina u buragu je njihovo metaboliziranje do ketonskih tijela u epitelu buraga, možda pomoću bakterija pričvršćenih na stijenke.

Bakterije sintetiziraju dugolančane masne kiseline iz hlapljivih masnih kiselina. Krajnji proizvodi nisu samo zasićene i nezasićene 16- i 18-C masne kiseline nego i razgranate masne kiseline s 15- i 17 ugljikovih atoma. Razgradnja ugljikohidrata vodi do acetil-CoA, propionil-CoA i butiril-CoA. Svaka od tih molekula može se koristiti kao prekursor te se ugraditi u masne kiseline mikroorganizama. Ugradnja propionil-CoA daje masne kiseline s neparnim brojem C atoma. Kao posljedica razgradnje aminokiselina nastaju hlapljive masne kiseline, koje se koriste kao prekursori za sintezu razgranatih masnih kiselina. Reduciranjem duljine lanca masnih kiselina kroz alfa oksidaciju nastaju masne kiseline s neparnim brojem ugljikovih atoma (Emmanuel, 1978.).

### **Probava i metabolizam lipida**

Obično količina lipida koja dolazi u tanko crijevo nadmašuje količinu konzumiranu hranom za 10-90% (Bauchart i sur., 1985.). Smatra se da je razlog tome sinteza lipida mikroorganizama u buraga. Osim u slučaju hranjenja zaštićenim mastima, lipidi koji ulaze u tanko crijevo preživača sadržavaju uglavnom neesterificirane zasićene masne kiseline koje se nalaze na česticama hrane, zbog lipolize i biohidrogenacije u buragu. Prisutni su i fosfolipidi i drugi složeni lipidi oslobođeni razgradnjom mikroorganizama. Nakon što uđu u tanko crijevo

dolazi do velikog priljeva lipida žuči kojih može biti 25-30% od ukupne količine koja ulazi u tanko crijevo iz sirišta (Moore i Christie, 1984.). Apsorpciji masnih kiselina prethodi otapanje u micelarnu otopinu, za koju su potrebni i žučni i gušteračini sokovi. U žuči su prisutni taurin i glicin konjugirane žučne kiseline. Na početku tankog crijeva gdje je pH još relativno nizak taurinske konjugirane kiseline su vrlo važne.

Apsorptivni kapacitet tankog crijeva preživača je velik, ali nije neograničen: za odraslu mliječnu kravu on je 2000 g masnih kiselina dnevno (Van Der Honing i Tamminga, 1986.). Probavljivost u tankom crijevu varira između 80-90%. Probavljivost se postupno smanjuje kada se dosegne navedeni kapacitet. U endotelnim stanicama tankog crijeva u transportu od membrana mikrovila do glatkog endoplazmatskog retikuluma vjerojatno posreduje specifični protein (Moore i Christie, 1984.). U endoplazmatskom retikulumu se sintetiziraju trigliceridi i fosfolipidi, a vjerojatno i kolesterol. Tijekom sinteze masne kiseline se selektivno raspodjeljuju: zasićene kiseline se raspodjeljuju u trigliceride, polinezasićene u fosfolipide i kolesterolske estere, a mononezasićene masne kiseline uglavnom u kolesterolske estere. Prije nego što je sljedeći transport moguć trigliceridi, fosfolipidi, kolesterolski esteri i kolesterol moraju se ponovno složiti u lipoproteinske čestice: hilomikrone i lipopteone vrlo male gustoće (VLDL) (Jouany, 1991.).

Masne kiseline mogu se iskoristiti kao izvor energije, prekursori za sintezu triglicerida u masnom tkivu te kao prekursori za sintezu mliječne masti. Kada se masne kiseline koriste kao prekursori, često zadržavaju svoja svojstva, odnosno ostaju zasićene ili nezasićene. To je osobito važno kod mliječnih proizvoda zato što mijenjaju konzistenciju mlijeka, ali je njihova osjetljivost na oksidaciju također povećana (Badings i sur., 1976.).

## 4. Zaključak

Burag je poseban ekosustav koji je omogućio simbiozu mikroorganizama i preživača. Mikroorganizmi ovise o preživaču koji im osigurava fiziološke uvjete potrebne za njihov opstanak, a zauzvrat oni fermentiraju i razgrađuju vlaknastu hranu koju preživač sam ne bi mogao. Krajnji proizvodi fermentacije mikrobiološke fermentacije te sami mikroorganizmi buraga postaju hrana za preživače kojom podmiruju svoje potrebe za energijom i proteinima. Svaka od skupina mikroorganizama koje se mogu naći u buragu ima svoju funkciju i mjesto koje se razvijalo milijunima godina evolucije u posebnim uvjetima buraga. Bakterije su najbrojnija skupina, i sposobne su razgrađivati vlakna, škrob, proteine, šećere i masti. Produkti njihove fermentacije, hlapljive masne kiseline, te njihov stanični protein i B-vitamine koristi preživač za proizvodnju mlijeka. Protozoa su poslije bakterija najbrojnija skupina u buragu. Razgrađuju vlakna, kontroliraju brzinu fermentacije škroba i broj bakterija u buragu. Gljivice buraga imaju važnu ulogu u razgradnji vlaknine čime omogućavaju bakterijama i protozoa pristup hranjivim tvarima biljnog materijala. Organizmi iz kraljevstva Archaea predstavljaju metanogene mikroorganizme koji nemaju veliku ulogu u fermentaciji hrane, ali korištenjem vodika, koji je proizvod fermentacije, za redukciju ugljikovog dioksida u metan potpomažu održavanje odgovarajućih uvjeta u buragu.

## 5. Sažetak

Mikroorganizmi koje možemo pronaći u buragu spadaju u četiri skupine: bakterije, protozoa, gljivice i *Archaea*. Bakterije i gljivice su najbrojnija skupina mikroorganizama i čine 40-60% ukupnog broja mase mikroorganizama u buragu. Oni se mogu podijeliti u nekoliko funkcionalnih skupina: fibrolitičku, amilolitičku, proteolitičku. Protozoa uzimaju hranjive tvari fagocitozom. Iako protozoa nisu esencijalno važni za funkcioniranje buraga, njihovo prisustvo ima izražen utjecaj. Gljivice buraga čine 5-10% mikropopulacije, a ima ih jako malo prilikom hranidbe siromašne vlakninom. Unatoč njihovom broju gljivice imaju važnu ulogu kod hidroliziranja esterskih veza između lignina i hemiceluloze ili celuloze što pomaže razgradnji čestica hrane. *Archeae* čine oko 3% mikropopulacije buraga. Vodik koji ostale skupine mikroorganizama proizvode *Archaea* koriste za redukciju ugljikovog dioksida u metan. Održavanje niskog parcijalnog pritiska vodika pomoću metanogena životno je važno za pravilno funkcioniranje buraga. Mikroorganizmi otječu iz buraga dalje u probavni sustav i tada oni postaju izvor hranjivih tvari za preživača.

Ključne riječi: mikroorganizmi, burag, bakterije, protozoa, anaerobne gljivice

## 6. Summary

Microorganisms found in rumen can be divided in four groups: bacteria, protozoa, fungi and *Archaea*. Bacteria and protozoa are predominant groups of microorganisms and make 40-60% of total microbial mass in rumen. They can be categorized into few functional groups: fibrolytic, amylolytic and proteolytic. Protozoa digest food particles by fagocytosis. Even though protozoa aren't essentially important for rumen functioning, their presence have pronounced effects. Fungi make 5-10% of microbe population and are absent when low fibre diets are fed. Despite their low numbers, fungi have important role in hydrolysing ester bonds between lignine and hemicellulose or cellulose which helps degradation of food particles. *Archaea* make 3% of total micropopulatin of the rumen. Other groups of microorganisms produce hydrogen that *Archaea* use for reduction of CO<sub>2</sub> in CH<sub>4</sub>. The maintenance of low pressure of hydrogen by methanogens is essential for proper functioning of the rumen. Eventually, microorganisms leave rumen with flow of rumen fluid and become major source of amino acids for ruminant.

Keywords: rumen flora, rumen bacteria, protozoa, anaerobic fungi

## 7. Popis literature:

1. Akkada, A., A. R., Eadie, J. M., Howard, B. H. (1963.): The biochemistry of rumen protozoa: 7- The carbohydrases of *Polyplastron multivesiculatum*. *Biochem. J.*, 89: 268-272.
2. Akin, D. E. (1986.): Chemical and biological structure in plants as related to microbial degradation of forage cell walls. Control of digestion and metabolism in ruminants. U: Milligan, L. P., Grovum, W. L., Dobson, A. Preentice-Hall, Englewood Cliffs, 139-157.
3. Akin, D. E., Lyon, C. E., Windham, W. R., Rigsby, L. L. (1989.): Physical degradation of lignified stem tissues by ruminal fungi. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55: 611-616.
4. Allison, M. J. (1970.): Nitrogen metabolism of ruminal micro-organisms. Physiology of digestion and metabolism in the ruminant. U: Phillipson, A. T. Oriel Press, Newcastleupon-Tyne, 456-473.
5. Allison, M. J., Cook, H. M., Stahl, D. A. (1987.): Characterisation of rumen bacteria that degrade dihydroxypyridine compounds produced from mimosine. *Proc. Int. Symp. Nutr. Herb. Univ. Qld.*, Brisbane, 55-56.
6. Archer, D. B., Harris, J. E. (1986.): Methanogenic bacteria and methane production in various habitats in anerobic bacteria in habitats other than man. U: Barnes, E. M., Mead, G. C. Blackwell Scientific Pubis., Oxford, 185-223.
7. Asplund, J. M. (1986.): Somatic requirements of ruminants. *Ann. Rev. Nutr.*, 6: 95-112.
8. Badings, H. T., Tamminga, S., Schaap, J. E. (1976.): Production of milk with a higher content of polyunsaturated fatty acids. 2. Fatty acids composition of milk relation to the quality of pasteurized milk, butter and cheese. *Neth. Milk J.*, 30: 118-131.
9. Bauchart, D., Doreau, M., Legay-Carmier, F. (1985.): Utilization des lipides et consequences de leur introduction sur la digestion du ruminant. *Bull. Tech. C. R. Z. V. Theix, I. N. R. A.*, 61: 65-77.
10. Bauchart, D., Legay-Carmier, F., Doreau, M., Gaillard, B. (1990.): Lipid metabolism of liquid-associated and solid-adherent bacteria in rumen contents of dairy cows offered lipid supplemented diets. *Br. J. Nutr.*, 63: 563-578.
11. Bauchop, T. (1981.): The anaerobic fungi in rumen digestion. *Agric. Environ.*, 6: 339-348.

12. Bauchop, T. (1989.): Colonisation of plant fragments by protozoa and fungi. In The roles of protozoa and fungi in ruminant digestion. U: Nolan, J. V., Leng, R. A., Demeyer, D. I. Penambul books, Armidale, 83-95.
13. Belanche, A., Fuente, G., Newbold, C. J. (2014.): Study of methanogen communities associated with different protozoal populations. FEMS Microbiol. Ecol., 90: 663-677.
14. Benyahya, M., Bohatier, J., Senaud, J. (1986.): Attaque par les microorganismes du rumen (Bacteries et Protozoaires) de fragment de paille: etude *in sacco*. J protozool., 33: 235.
15. Benyahya, M., Senaud, J., Bohatier, J. (1990.): Digestion de la cellulose par *Eudiplodinium maggi* (Cilie entodiniomorphe du rumen du mouton): approche cytochimique. J. Protozool., 37: 30.
16. Bernalier, A., Fonty, G., Gouet, Ph. (1990.): Fermentation properties of four strictly anaerobic rumen fungal species; H<sub>2</sub>- producing microorganisms. FEMS Symposium, Marseille, 361-361.
17. Bernalier, A., Fonty, G., Gouet, Ph. (1988.): Degradation de la cellulose par *Neocallimastix sp.* MCH3 seul ou associe a quelques especes bacteriennes du rumen. Reprod. Nutr. Develop., 28: 75-76.
18. Bernalier, A., Fonty, G., Gouet, Ph. (1991.): Cellulose degradation by two rumen anaerobic fungi in monoculture or in coculture with rumen bacteria. Anim. Feed Sci. Technol., 32: 131-136.
19. Beveridge, R. J., Richards. G. N. (1975.): Investigation of the digestion of cell wall polysaccharide of spear grass and of cotton cellulose by viscometry and X-ray diffraction. Carbohydr. Res., 43: 163-172.
20. Blake, J. S., Salter, D. N., Smith, R. H. (1983.): Incorporation of nitrogen into rumen bacterial fractions of steers given protein- and urea-containing diets. Ammonia assimilation into cellular bacterial amino acids. Br. J. Nutr., 50: 769-782.
21. Blaxter, K. L., Graham, N. McC., Wainman, F. W. (1956.): Some observations on the digestibility of food by sheep and on related problems. Br. J. Nutr., 10: 69-91.
22. Bohatier, J., Senaud, J., Benyahya, M. (1990.): *In situ* degradation of cellulose fibres by the entodiniomorph rumen ciliate *Polyplastron multivesiculatum*. Protoplasma, 154: 122-131.

23. Bonhomme, A., Fonty, G., Foglietti, M. J., Robic, D., Weber, M. (1986.): Endo 1,4  $\beta$ -glucanase and  $\beta$  glucosidase of the ciliate *Polyplastron multivesiculatum* free of cellulolytic bacteria. *Can. J. Microbiol.*, 32: 219-225.
24. Borneman, W. S., Akin, D. E., Ljungdahl, L. G. (1989.): Fermentation products and plant cell degrading enzymes produced by monocentric and polycentric anaerobic ruminal fungi. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55: 1066-1073.
25. Brownlee, A. G. (1989.): A genus-specific repetitive DNA probe for *Neocallimastix*. In *The roles of protozoa and fungi in ruminant digestion*. U: Nolan, J. V., Leng, R. A., Demeyer, D. I. Penambul books, Armidale, 251-253.
26. Bryant, M. P., Barrentine, B. F., Sykes, J. F., Robinson, I. M., Shawver, C. B., Williams, L. W. (1960.): Predominant bacteria in the rumen of cattle fed bloat-provoking ladino clover. *J. Dairy Sci.*, 43: 1435-1444.
27. Bryant, M. P., Barrentine, B. F., Sykes, J. F., Robinson, I. M., Shawver, C. B., Williams, L. W. (1960.): Predominant bacteria in the rumen of cattle fed bloat-provoking ladino clover. *J. Dairy Sci.*, 43: 1435-1444.
28. Cansunar, E., Richardson, A. J., Wallace, G., Stewart, C. S. (1990): Effect of coumarin and p-coumaric acid on anaerobic rumen fungi in the presence and absence of *Methanobrevibacter smithii*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 58: 157-160.
29. Chen, G., Russell, J. B., Sniffen, C. J. (1987.): A procedure for measuring peptides in rumen fluid and data suggesting that peptide uptake is a rate-limiting step in ruminal protein degradation. *J. Dairy Sci.*, 70: 1211-1219.
30. Cheng, K-J., McCowan, R. P., Costerton, J. W. (1979.): Adherent epithelial bacteria in ruminants and their roles in digestive function. *Am. J. Clin. Nutr.*, 32: 139-148.
31. Cheng, K-J., Stewart, C. S., Dinsdale, D., Costerton, J. W. (1984.): Electron microscopy of bacteria involved in the digestion of plant cell walls. *Anim. Fd. Sci. Technol.*, 10: 93-120.
32. Chesson, A. (1980.): Maceration in relation to the post-harvest handling and processing of plant material. *J. Appl. Bacteriol.*, 48: 1-45.



33. Chesson, A., Forsberg, C. W. (1988.): Polysaccharide degradation by rumen microorganisms. The rumen microbial ecosystem. U: Hobson, P. N. Elsevier appl. Sci., London, 251-284.
34. Chesson, A., Stewart, C. S., Wallace, R. J. (1982.): Influence of plant phenolic acids on growth and cellulolytic activity of rumen bacteria. Appl. Environ. Microbiol., 44: 597-603.
35. Clarke, R. T. J. (1979.): Niche in pasture-fed ruminants for the large bacteria *Oscillospira*, *Lampropedia*, and Quin's and Eadie's ovals. Appl. Environ. Microbiol., 37: 654-657.
36. Clarke, R. T. J., Counotte, G. H. M., Lankhorst, A., Prins, R. A. (1979.): Rumen holotrich ciliates and lactic acid production from concentrate feedstuff components. Neobjavljen rukopis.
37. Coleman, G. S. (1978.): The metabolism of cellulose, glucose and starch by the rumen ciliate protozoan *Eudiplodinium maggi*. J. Gen. Microbiol., 107: 359-366.
38. Coleman, G. S. (1989.): Protozoal-bacterial interaction in the rumen. In The roles of protozoa and fungi in ruminant digestion. U: Nolan, J. V., Leng, R. A., Demeyer, D. I. Penambul books, Armidale, 13-26.
39. Coleman, G.S., Laurie, J. I., Bailey, J. E., Holdgate, S. A. (1976.): The cultivation of cellulolytic protozoa isolated from the rumen. J. Gen. Microbiol., 95: 144-150.
40. Counotte, G. H. M. (1981.): Regulation of lactate metabolism in the rumen. PhD Thesis. University of Utrecht, The Netherlands.
41. Counotte, G. H. M., Prins, R. A., Janssen, R. H. A. M., Debie, M. J. A. (1981.): Role of *Megasphaera elsdenii* in the fermentation of DL-lactate in the rumen of dairy cattle. Appl. Environ. Microbiol., 42: 649-655.
42. Dauvrin, T. (1988.): La caractérisation de l'invertase du Cilie du rumen *Isotricha prostoma*, revele certaines propriétés originales. These Université Catholique de Louvain, 110.
43. Dehority, B. A. (1986.): Protozoa in the digestive tract of herbivorous mammals. Insect Sci. Appl., 7: 279-296.

44. Dehorty, B. A. (1973.): Hemicellulose degradation by rumen bacteria. Fed. Proc., 32: 1819-1825.
45. Dekker, R. F. H. (1976.): Hemicellulose degradation in the ruminant. Carbohydrate research in plant and animals, miscellaneous papers 12. U: Veenman, H., Zonen, B. V. Landbouwhogeschool, Wageningen, 43-54.
46. Dey, P. M., Brinson, K. (1984.): Plant cell-walls. Adv. Carbohyd. Chem. Biochem., 42: 265-394.
47. Domaćinović, M., Antunović, Z., Džomba, E., Opačak, A., Baban, M., Mužić, S. (2015.): Specijalna hranidba domaćih životinja. Poljoprivredni fakultet, Osijek.
48. Dominguez-Bello, M. G., Stewart, C. S. (1990.): Characteristics of a rumen *Clostridium* capable of degrading mimosine, 3(hydroxy)-pyridone and 2,3 dihydroxypyridine. Syst. Appl. Microbiol., 14: 67-71.
49. Dominguez-Bello, M. G., Stewart, C. S. (1990.): Degradation of mimosine, 2-3 dihydroxypyridine and 3-hydroxy-4(IH)-pyridone by bacteria from the rumen of sheep in Venezuela. FEMS Microbiol. Lett., 73: 283-290.
50. Dominguez-Bello, M. G., Stewart, C. S. (1990.): Effect of feeding *Canavalia ensiformis* on the rumen flora of sheep and of the toxic amino acid canavanine on rumen bacteria. Syst. Appl. Microbiol., 13: 388-393.
51. Elliot, R., Ash, A. J., Calderon-Cortes, F., Norton, B. W., Bauchop, T. (1987.): The influence of anaerobic fungi on rumen volatile fatty acids concentrations *in vivo*. J. Agr. Sci. Camb., 109: 13-17.
52. Emmanuel, B. (1978.): The relative contribution of propionate and long-chain evennumbered fatty acids to the production of long-chain odd-numbered fatty acids in rumen bacteria. Bioch. Biophys. Acta., 528: 239-246.
53. Enser, M. (1984.): The chemistry, biochemistry and nutritional importance of animal fats. Fats in animal nutrition. U: Wiseman, J. Butterworths, London, 23-52.
54. Fonty, G., Gouet, Ph. (1989.): Establishment of microbial populations in the rumen. Utilization of an animal model to study the role of different cellulolytic microorganisms *in*

*vivo*. In The role of protozoa and fungi in ruminant digestion. U: Nolan, J. V., Leng, R. A., Demeyer, D. I. Penambul books, Armidale, 39-49.

55. Fonty, G., Gouet, Ph., Jouany, J. P., Rieu, F., Senaud, J., Citron, A., Breton, A. (1986.): Microbial colonisation of the rumen in young lambs. In Biology of anaerobic bacteria. U: Dubourgier, H. C., Albagnac, G., Montreuil, J., Romond, C., Sautier, P., Guillame, J. Elsevier, Amsterdam, 40-46.

56. Fonty, G., Gouet, Ph., Sante, V. (1988.): Influence d'une bacterie methanogene sur l'activite cellulolytique de deux especes de champignons du rumen, *in vitro*. Resultats preliminaires. Repr. Nutr. Develop., 28: 133-134.

57. Fonty, G., Joblin, K. N. (1991.): Rumen anaerobic fungi: their role and interactions with other rumen micro-organisms in relation to fibre digestion. Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants. U: Tsuda, T., Sasaki, Y. Academic Press, New York, 655-680.

58. Ford, C. W. (1986.): Comparative structural studies of lignin-carbohydrate complexes from *Digitaria decumbens* (Pangola grass) before and after chlorite delignification. Carbohydr. Res., 147: 101-117.

59. Ford, C. W., Elliot, R., Maynard, P. J. (1987.): The effect of chlorite delignification on digestability of some grass forage and on intake and rumen microbial activity in sheep fed barley straw. J. Agric. Sci. Camb., 108: 129-136.

60. Gaillard, B., Breton, A., Bernalier, A. (1989.): Study of molecular cycle of four species of strictly anaerobic rumen fungi by fluorescent microscopy. Curr. Microbiol., 19: 103-107.

61. Garrity, G. M., Lilburn, T. G., Cole, J. R., Harrison, S. H., Euzéby, J., Tindall, B. J. (2007.): Taxonomic outline of the *Bacteria* and *Archea*. Part 1. The *Archea*, phyla *Crenarcheota* and *Euryarcheota*. Release 7.7. Michigan State University, Lansing, MI. [www.taxonomicoutline.org](http://www.taxonomicoutline.org). Pristupljeno 6. srpnja 2015.

62. Getachew, G., Makkar, H. P. S., Becker, K. (2000.): Effect of polyethylene glycol on *in vitro* degradability of nitrogen and microbial protein synthesis from tannin-rich bowse and herbaceous legumes. British Journal of Nutrition, 84: 73-83.

63. Gibson, G. R., Cummings, J. H., MacFarlane, G. T., Allison, C., Vorster, H. H., Walker, A. R. P. (1990.): Alternative pathways for hydrogen disposal during fermentation in the human colon. *Gut*, 32: 679-683.
64. Goosen, N. (1990.): Hydrogenosomes and methanogenic endosymbionts in sapropelic ciliates. PhD Thesis, University of Nijmegen, The Netherlands.
65. Gordon, G. L. R., Phillips, M. W. (1989.): Comparative fermentation properties of anaerobic fungi from the rumen. In *The role of protozoa and fungi in ruminant digestion*. U: Nolan, J. V., Leng, R. A., Demeyer, D. I. Penambul books, Armidale, 127-128.
66. Gottschalk, G. (1981.): The anaerobic way of life of prokaryotes. In *The Prokaryotes, a Handbook on habitats isolation and identification of bacteria*. U: Starr, M. P., Stolp, H., Truper, H. G., Balows, A., Schlegel, H. G. Springer Verlag, Berlin, 1415-1424.
67. Grain, J., Senaud, J. (1985.): Degradation de fragments de luzerne fraiche par le Cilie du rumen *Epidinium ecaudatum*: attachment, ingestion et digestion. *Protistologica*, 21: 447-466.
68. Greenwood, Y., Hall, F. J., Orpin, C. G., Paterson, N. I. W. (1983.): Microbiology of seaweed digestion in Orkney sheep. *J. Physiol.*, 343: 121.
69. Grenet, E., Breton, A., Barry, P., Fonty, G. (1989.): Rumen anaerobic fungi and plant substrates colonisation as affected by diet composition. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 26: 55-70.
70. Groleau, D., Forsberg, C. W. (1981.): Cellulolytic activity of the rumen bacterium *Bacteroides succinogenes*. *Can. J. Microbiol.*, 27: 517-530.
71. Gulati, S. K., Ashes, J. R., Gordon, G. L. R., Rogers, P. L. (1989.): Batch culture of the rumen fungus *Neocallimastix* and the digestibility of its amino acids. In *The roles of protozoa and fungi in ruminant digestion*. U: Nolan, J. V., Leng, R. A., Demeyer, D. I. Penambul books, Armidale, 281-283.
72. Gurr, M. I. (1984.): The chemistry and biochemistry of plant fats and their nutritional importance. *Fats in animal nutrition*. U: Wiseman, J. Butterworths, London, 3-22.
73. Harfoot, C. G. (1981.): Lipid metabolism in the rumen. *Lipid metabolism in ruminant animals*. U: Christie, W. W. Pergamon Press, Oxford, 21-55.

74. Hartley, R. D., Keene, A. S. (1984.): Aromatic aldehyde constituents of graminaceous cell walls. *Phytochem.*, 23: 1305-1307.
75. Hartley, R. D., Whatley, F. R., Harris, P. J. (1988.): 4,4' Dihydroxytruxilic acid as a component of cell walls of *Lolium multiflorum*. *Phytochem.*, 27: 349-351.
76. Harvey, D. (1970.): Tables of the amino acids in foods and feedingstuffs. Second edition, Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, Bucks, England.
77. Hazlewood, G. P., Dawson, R. M. C. (1975.): Isolation and properties of a phospholipid hydrolysing bacterium from ovine rumen fluid. *J. Gen. Microbiol.*, 89: 163-174.
78. Hebraud, M., Fevre, M. (1988.): Characterisation of glycosides and polysaccharide hydrolases secreted by the rumen anaerobic fungi *Neocallimastix frontalis*, *Sphaeromonas communis* and *Piromonas communis*. *J. Gen. Microbiol.*, 134: 1123-1129.
79. Henderson, C. (1980.): The influence of extracellular hydrogen on the metabolism of *Bacteroides ruminicola*, *Anaerovibrio lipolytica* and *Selenomonas ruminantium*. *J. Gen. Microbiol.*, 119: 485-491.
80. Hendrickx, H. K. (1976.): Quantitative aspects of the use of non-protein nitrogen in ruminant feeding. *Cuban J. Agric. Sci.*, 10: 1-18.
81. Hillman, K., Lloyd, D., Williams, A. G. (1988.): Interactions between the methanogenic *Methanosarcina barkeri* and rumen holotrich ciliate protozoa. *Letters in Appl. Microbiol.*, 7: 49-53.
82. Hino, T., Russell, J. B. (1985.): Effect of reducing-equivalent disposal and NADH/NAD on deamination of amino acids by intact rumen micro-organisms and their cell extracts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50: 1368-1374.
83. Hino, T., Russell, J. B. (1986.): Relative contributions of ruminal bacteria and protozoa to the degradation of protein *in vitro*. *J. Anim. Sci.*, 64: 261-270.
84. Hook, S. E., Wright, A-DG., McBride, B. W. (2010.): Methanogens: methane producers of the rumen and mitigation strategies. *Archea*, 1: 1-11.
85. Hungate, R. E. (1966.): The rumen and its microbes. Academic Press, New York.
86. Hungate, R. E. (1975.): The rumen microbial ecosystem. *Ann. Rev. Syst.*, 6: 39-66.

87. Janssen, P. H., Kirs, M. (2008.): Structure of *Archeal* community of the rumen. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74: 3619-3625.
88. Jarrige, R. (1980.): Chemical methods for predicting the energy and protein value of forages. *Ann. Zootech.*, 29: 299-323.
89. Jouany, J.-P. (1991.): Rumen microbial metabolism and ruminant digestion. INRA, Paris.
90. Jouany, J. P., Ushida, K. (1990.): Protozoa and fibre digestion in the rumen. The rumen microbial ecosystem: the microbial metabolism and its regulation. U: Hoshino, S., Onodera, R., Minato, H., Hitabashi, H. Japan Scientific Societies Press, Springer-Verlag, 139-150.
91. Joblin, K. N. (1981.): Isolation, enumeration and maintenance of rumen anaerobic fungi in roll tubes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 42: 119-122.
92. Joblin, K. N., Campbell, G. P., Richardson, A. J., Stewart, C. S. (1989.): Fermentation of barley straw by anaerobic rumen bacteria and fungi in a xenic culture and in co-culture with methanogens. *Lett. Appl. Microbiol.*, 9: 195-199.
93. Jouany, J. P. (1978.): Contribution a l'étude des protozoaires ciliés du rumen: leur dynamique, leur rôle dans la digestion et leur intérêt pour le ruminant. These de doctorat, Université de Clermont II, no. D'ordre 256, 2 volumes.
94. Kamra, D. N. (2005.): Rumen microbial ecosystem. *Current Science*, 89: 124-135.
95. Kemp, P., Lander, D. J., Orpin, C. G. (1984.): The lipids of the rumen fungus *Piromonas communis*. *J. Gen. Microbiol.*, 130: 27-37.
96. Kolattukudy, P. E. (1980.): Cutin, suberin and waxes. The biochemistry of plants. U: Stumpf, P. K., Conn, E. E. New York Academic, 4: 571-645.
97. Kopečný, J., Wallace, R. J. (1982.): Cellular location and some properties of proteolytic enzymes of rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43: 1026-1033.
98. Kroger, A. (1977.): Phosphorylative electron transport with fumarate and nitrate as terminal hydrogen acceptors. In *Microbial Energetics*. U: Haddock, B. A., Hamilton, W. A. Camb. Univ. Press, Cambridge, 61-93.
99. Lockwood, B. C., Coombs, G. H., Williams, A. G. (1988.): Proteinase activity in rumen ciliate protozoa. *J. Gen. Microbiol.*, 134: 2605-2614.

100. Lowe, S. E., Griffith, C. G., Milne, A., Theodorou, M. K., Trinci, A. P. J. (1987.): The life cycle growth kinetics of an anaerobic rumen fungus. *J. Gen. Microbiol.*, 133: 1815-1827.
101. McDonald, P., Edwards, R. A., Greenhalgh, J. F. D. (1988.): Lipids. Animal nutrition. Longman Group UK Ltd, Essex, 26-41.
102. Moore, J. H., Christie, W. W. (1984.): Digestion, absorption and transport of fats in ruminant animals. Fats in animal nutrition. U: Wiseman, J. Butterworths, London, 123-149.
103. Mueller, R. E., Asplund, J. M., Ianotti, E. L. (1984.): Successive changes in the epimural bacterial community of young lambs as revealed by scanning electron microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47: 715-723.
104. Mueller-Harvey, I., Hartley, R. D., Harris, P. J., Curzon, E. H. (1986.): Linkage of p-coumaroyl and feruloyl groups to cell-wall polysaccharides of barley straw. *Carbohydr. Res.*, 148: 71-85.
105. Newbold, C. J., Lopez, S., Nelson, N., Ouda, J. O., Wallace, R. J., Moss, A. R. (2005.): Propionate precursors and other metabolic intermediates as possible alternative electronic acceptors to methanogenesis in ruminal fermentation *in vitro*. *British Journal of Nutrition*, 94: 27-35.
106. Nolan, J. V. (1975.): Quantitative models of nitrogen retention in sheep. Digestion and metabolism in the ruminant. U: McDonald, I. W., Warner, A. C. I. University of New England Publishing Unit, Armidale, 416-431.
107. Nolan, J. V., Leng, R. A., Demeyer, D. I. (1988.): The roles of protozoa and fungi in ruminant digestion. Penambul Books, Armidale, 357.
108. Nugent, J. H. A., Jones, W. T., Jordan, D. J., Mangan, J. L. (1983.): Rates of proteolysis in the rumen of the soluble proteins casein, fraction I (18S) leaf protein, bovine serum albumin, and bovine submaxillary mucoprotein. *Br. J. Nutr.*, 50: 357-368.
109. Ohmiya, K., Masatoshi, S., Taya, M., Shoichi, S. (1982.): Purification and properties of a cellobiase from *Ruminococcus albus*. *J. Bacteriol.*, 150: 407-409.
110. Ohmiya, K., Shirai, M., Kurachi, Y., Shimizu, S. (1985.): Isolation and properties of  $\beta$ -glucosidase from *Ruminococcus albus*. *J. Bacteriol.*, 161: 432-434.

111. Orpin, C. G. (1975.): Studies on rumen flagellate *Neocallimastix frontalis*. J. Gen. Microbiol., 91: 249-262.
112. Orpin, C. G. (1976.): Studies on the rumen *Sphaeromonas communis*. J. Gen. Microbiol., 94: 270-280.
113. Orpin, C. G. (1977.): The rumen flagellate *Piromonas comunis*. Its life- history and invasion of plant material in rumen. J. Gen. Microbiol., 99: 107-117.
114. Orpin, C. G. (1985.): Asociation of rumen ciliate populations with plant particles in vitro. Microb. Ecol., II: 59-69.
115. Orpin, C. G., Greenwood, Y. (1986.): The role of haems and related compounds in the nutrition and zoosporogenesis of the rumen chytridiomycete *Neocallimastix frontalis* H8. J. Gen. Microbiol., 132: 2179-2185.
116. Orpin, C. G., Munn, E. A. (1986.): *Neocallimastix patriciarum* sp. nov., a new member of the *Neocallimasticaceae* inhabiting the rumen of sheep. Trans. Brit. Myc. Soc, 86: 178-181.
117. Orskov, E. R., Hughes-Jones, M., Eliman, M. E. (1983.): Studies on degradation and outflow rate of protein supplements in the rumen of sheep and cattle. Livestock Prod. Sci., 10: 17-24.
118. Palmquist. D. L., Jenkins, T. C. (1980.): Fat in lactation rations: a review. J. Dairy Sci., 63: 1-14.
119. Patra, A. K., Saxena, J. (2009.): The effect and mode of action of saponins on the microbial populations and fermentation in the rumen and ruminant production. British Journal of Nutrition, 22: 204-219.
120. Patterson, J. A., Hespell, R. B. (1979.): Trimethylamine and methylamine as growth substrates for rumen bacteria and *Methanosarcina barkeri*. Curr. Microbiol., 3: 79-83.
121. Paul, R. G., Butler, R. D., Williams, A. G. (1989.): Hydrogenosomes in rumen ciliate protozoa. VII intern. Cong. Protozool., Tsukuba, 55.
122. Prins, R. A. (1977.): Biochemical activities of gut micro-organisms. In Microbial Ecology of the Gut. U: R. T. J. Clarke, T. Bauchop. 73-183.



123. Prins, R. A. (1978.): Nutritional impact of intestinal drug-microbe interactions. In Nutrition and drug interrelationships. U: Hathcock, J. N., Coon, J. J. Academic Press, New York, 189-251.
124. Prins, R. A., Van Hal-Van Gestel, J. C., Counotte, G. H. M. (1979.): Degradation of amino acids and peptides by mixed rumen micro-organisms. Z. Tierphysiol. Tierernhr. Futtermittelkde, 42: 333-339.
125. Reichl, J. R., Hungate, R. E., Prins, R. A. (1972): Sheep rumen ciliates: kinds and numbers in the animal and in culture. Neobjavljen rukopis.
126. Russell, J. B. (1986.): Heat production by ruminal bacteria in continuous culture and its relationship to maintenance energy. J. Bacteriol., 168: 694-701.
127. Russell, J. B., Hino, T. (1985.): Regulation of lactate production in *Streptococcus bovis*: a spiralling effect that contributes to lactic acidosis. J. Dairy Sci., 68: 1712-1721.
128. Russell, J. B., Wallace, R. J. (1988.): Energy yielding and consuming reactions. In the rumen microbial ecosystem. U: Hobson, P. N. Elsevier Applied Science, London, 185-215.
129. Salomonsson, A. C., Theander, O., Man, P. (1978.): Quantitative determination by G. L. C. of phenolic acids as ethyl derivatives in cereal straws. Agric. Food Chem., 26: 830-835.
130. Senaud, J., Bohatier, J., Benyahya, M., Grain, J. (1986-1987.): Etude ultrastructurale de l'attaque de particules de luzerne fraiche par *Polyplastron multivesiculum*, Cilie entodiniomorphe du rumen: ingestion et degradation intracellulaire. Ann. Sci. Nat. Zool., 13: 61-74.
131. Smith, W. R., Yu, I., Hungate, R. E. (1973.): Factors affecting cellulolysis by *Ruminococcus albus*. J. Bacteriol., 414: 729-737.
132. Spencer, D., Higgins, T. J. V., Dove, H., Coombe, J. B. (1988.): Monitoring the fate of dietary proteins in rumen fluid using gel electrophoresis. Br. J. Nutr., 60: 241-248.
133. Stewart, C. S. (1975.): Some effects of phosphate and volatile fatty acids salts on the growth of rumen bacteria. J. Gen. Microbiol., 89: 319-326.

134. Stewart, C. S., Richardson, A. J. (1989.): Enhanced resistance of anaerobic rumen fungi to the ionophores monensin and lasalocid in the presence of methanogenic bacteria. *J. Appl. Bacteriol.*, 66: 85-93.
135. Ushida, K., Jouany, J. P., Demeyer, D. I. (1991.): Effect of presence or absence of rumen ciliate protozoa on the utilization of fibrous and concentrate diets. *Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants*. U: Tsuda, T., Sasaki, Y., Kawashima, R. Academic Press, London, 625-654.
136. Ushida, K., Jouany, J.-P. (1986.): Influence des protozoaires sur la dégradation des protéines mesurée *in vitro* et *in sacco*. *Reprod. Nutr. Develop.*, 26: 293-294.
137. Van Der Honing, Y., Tamminga, S. (1986.): Effect of fat on rumen fermentation and gastrointestinal absorption. *Agriculture: new developments and future perspectives in research on rumen function*. EEC, Brussels, 55-68.
138. Van Soest, P. J. (1982.): *Nutritional ecology of the ruminant*. O. and B. Books, Corvallis, Oregon, U. S. A., 373.
139. Varvikko, T. (1986.): Microbially corrected amino acid composition of rumen-undegraded feed protein and amino acid degradability in the rumen of feeds enclosed in nylon bags. *Br. J. Nutr.*, 56: 131-140.
140. Vicini, J. L., Brulla, W. J., Davies, C. L., Bryant, M. P. (1987.): Quin's oval and other microbiota in the rumen of molasses-fed sheep. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53: 1273-1276.
141. Vignes, B., Groliere, C. A. (1985.): Evidence for a  $Ca^{2+}$  binding protein associated to nonactin microfilamentous systems in two ciliated protozoans. *Exp. Cell Res.*, 159: 366-376.
142. Vignes, B., Metenier, G., Senaud, J. (1984.): The sub-surface cytoskeleton of the ciliate *Polyplastron multivesiculum*: isolation and major protein components. *Europ. J. Cell Biol.*, 35: 336-342.
143. Wakita, M., Hoshino, S. (1989.): Quantitative relationship between *Entodinium* ciliates and viable starch-utilizing bacteria in the rumen of sheep. *Jap. J. Zootech. Sci.*, 60: 627-631.
144. Wallace, R. J. (1983.): Hydrolysis of  $^{14}C$ -labelled proteins by rumen micro-organisms and by proteolytic enzymes prepared from rumen bacteria. *Br. J. Nutr.*, 50: 345-355.

145. Wallace, R. J. (1985.): Absorption of soluble proteins to rumen bacteria and the role of adsorption in proteolysis. *Br. J. Nutr.*, 53: 399-408.
146. Wallace, R. J. (1988.): Ecology of rumen micro-organisms: protein use. Aspects of digestive physiology in ruminants. U: Dobson, A., Dobson, M. J. Cornell University Press, Ithaca, 99-122.
147. Wallace, R. J., Brammall, M. L. (1985.): The role of different species of bacteria in the hydrolysis of protein in the rumen. *J. Gen. Microbiol.*, 131: 821-832.
148. Wallace, R. J., Cotta, M. A. (1988.): Metabolism of nitrogen-containing compounds. The rumen microbial ecosystem. U: Hobson, P. N. Elsevier, London, 217-249.
149. Wallace, R. J., Joblin, K. N. (1985.): Proteolytic activity of a rumen anaerobic fungus. *FEMS Microbiol. Lett.*, 29: 19-25.
150. Williams, A. G., Coleman, G. S. (1985.): Hemicellulose-degrading enzymes in rumen ciliate protozoa. *Curr. Microbiol.*, 12: 85-90.
151. Williams, A. G., Ellis, A. B. (1985.): Subcellular distribution of glycoside hydrolase and polysaccharide depolymerase enzymes in the rumen entodiniomorphid ciliate *Polyplastron multivesiculatum*. *Curr. Microbiol.*, 12: 172-182.
152. Williams, A. G., Withers, S. E., Coleman, G. S. (1984.): Glycoside hydrolases of rumen bacteria and protozoa. *Curr. Microbiol.*, 10: 287-294.
153. Williams, A., Orpin, G. C. (1987.): Polysaccharide-degrading enzymes by three species of anaerobic rumen fungi on a range of carbohydrate substrates. *Can. J. Microbiol.*, 33: 418-426.
154. Williams, P. P., Robbins, J. D., Gutierrez, J., Davis, R. E. (1963.): Rumen bacterial and protozoal responses to insecticide substrates. *Appl. Microbiol.*, 11: 517-522.
155. Wojciechowitz, M., Heinrichova, K., Ziolecki, A. (1982.): An exo-pectate lyase of *Butyrivibrio fibrisolvens* from the bovine rumen. *J. Gen. Microbiol.*, 128: 2661-2665.
156. Wolin, M. J., Miller, T. L. (1988.): Microbe-microbe interactions. In the rumen microbial ecosystem. U: Hobson, P. N. Elsevier Applied Science, London, 343-359.

157. Wood, T. M., Wilson, C. A., McCrae, S. I., Joblin, K. N. (1986.): A highly active extracellular cellulase from the anaerobic rumen fungus *Neocallimastix frontalis*. FEMS Microbiol. Lett., 34: 37-40.
158. Yarlett, N., Orpin, C. G., Munn, E. A., Yarlett, N. C., Greenwood, C. A. (1986.): Evidence for hydrogenosomes in the rumen fungus *Neocallimastix patriciarum*. Biochem. J., 236: 729-739.
159. Yarlett, N., Rowlands, C., Yarlett, N. C., Evans, J. C., Lloyd, D. (1987.): Respiration of the hydrogenosome containing fungus *Neocallimastix patriciarum*. Arch. Microbiol, 148: 25-28.
160. Zirolecki, A., Briggs, C. A. E. (1961.): The microflora of the rumen of the young calf. II Source, nature and development. J. Appl. Bacteriol., 24: 148-163.

## 8. POPIS SLIKA

Slika 1. <i>Diplodinium sp.</i> pronađen u buragu.....	6
Slika 2. Trepetljikavi protozoa roda <i>Ophryscolex</i> .....	11
Slika 3. Zoospora gljivice vrste <i>Neocallimastix sp.</i> pričvršćena na supstrat.....	22
Slika 4. <i>Methanosarcina acetivorans</i> .....	25

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Poljoprivredni fakultet u Osijeku

Završni rad

ZNAČENJE MIKROPOPULACIJE BURAGA PREŽIVAČA

MICROPOPULATION IN RUMEN

Kristian Pastuović

Sažetak:

Mikroorganizmi koje možemo pronaći u buragu spadaju u četiri skupine: bakterije, protozoa, gljivice i *Archaea*. Bakterije i gljivice su najbrojnija skupina mikroorganizama i čine 40-60% ukupnog broja mase mikroorganizama u buragu. Oni se mogu podijeliti u nekoliko funkcionalnih skupina: fibrolitičku, amilolitičku, proteolitičku. Protozoa uzimaju hranjive tvari fagocitozom. Iako protozoa nisu esencijalno važni za funkcioniranje buraga, njihovo prisustvo ima izražen utjecaj. Gljivice buraga čine 5-10% mikropopulacije, a ima ih jako malo prilikom hranidbe siromašne vlakninom. Unatoč njihovom broju gljivice imaju važnu ulogu kod hidroliziranja esterskih veza između lignina i hemiceluloze ili celuloze što pomaže razgradnji čestica hrane. *Archeae* čine oko 3% mikropopulacije buraga. Vodik koji ostale skupine mikroorganizama proizvode *Archaea* koriste za redukciju ugljikovog dioksida u metan. Održavanje niskog parcijalnog pritiska vodika pomoću metanogena životno je važno za pravilno funkcioniranje buraga. Mikroorganizmi otječu iz buraga dalje u probavni sustav i tada oni postaju izvor hranjivih tvari za preživača.

Ključne riječi: mikroorganizmi, burag, bakterije, protozoa, anaerobne gljivice

Summary:

Microorganisms found in rumen can be divided in four groups: bacteria, protozoa, fungi and *Archaea*. Bacteria and protozoa are predominant groups of microorganisms and make 40-60% of total microbial mass in rumen. They can be categorized into few functional groups: fibrolytic, amylolytic and proteolytic. Protozoa digest food particles by fagocytosis. Even though protozoa aren't essentially important for rumen functioning, their presence have pronounced effects. Fungi make 5-10% of microbe population and are absent when low fibre diets are fed. Despite their low numbers, fungi have important role in hydrolysing ester bonds between lignine and hemicellulose or cellulose which helps degradation of food particles. *Archaea* make 3% of total micropopulation of the rumen. Other groups of microorganisms produce hydrogen that *Archaea* use for reduction of CO<sub>2</sub> in CH<sub>4</sub>. The maintenance of low pressure of hydrogen by methanogens is essential for proper functioning of the rumen. Eventually, microorganisms leave rumen with flow of rumen fluid and become major source of amino acids for ruminant.

Keywords: rumen flora, rumen bacteria, protozoa, anaerobic fungi

Datum obrane: