

# Uloga praživotinja u probavilu preživača

---

Vugrinec, Tina

Undergraduate thesis / Završni rad

2010

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:047932>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**PRIRODOSLOVNO - MATEMATIČKI FAKULTET**  
**BIOLOŠKI ODSJEK**

**ULOGA PRAŽIVOTINJA U PROBAVILU PREŽIVIAČA**  
**THE ROLE OF CILIATE PROTOZOA IN RUMINANTS DIGESTION**

**SEMINARSKI RAD**

Tina Vugrinec

Preddiplomski studij biologije

(Undergraduate study of biology)

Mentor: doc.dr.sc. Renata Matonić ikin Kepić

Zagreb, 2010.

## Sadržaj:

1. Uvod .....	4
2. Građa i funkcija praživotinja .....	5
2.1 Ciliophora – trepetljikaši .....	6
2.2 Razmnožavanje i dioba .....	7
2.3 Ekologija praživotinja .....	7
2.4 Raznolikost praživotinja u buragu .....	8
2.5 Faktori koji utječu na veličinu populacije trepetljikaša .....	10
3. Preživači .....	11
3.1 Građa i funkcija probavnog sustava u preživaču .....	11
3.2 Motilitet predželuca .....	12
3.3 Preživljavanje .....	12
3.4 Probava u predželucima .....	13
3.5 Mikroflora predželuca .....	14
3.5.1 Praživotinje buraga .....	14
3.5.2 Bakterije buraga .....	14
3.5.3 Odnos bakterija i praživotinja .....	15
4. Metabolizam i uloga praživotinja u buragu .....	16
4.1 Entodiniomorfne praživotinje .....	16
4.1.1 Razgradnja proteina .....	17
4.1.2 Razgradnja škroba .....	17
4.1.3 Razgradnja celuloze i hemiceluloze .....	18
4.1.4 Razgradnja nukleinskih kiselina .....	19
4.2 Holotrihne praživotinje .....	20
4.2.1 Metabolizam razgradnje biljnog materijala .....	21
4.2.2 Razgradnja celuloze, hemiceluloze i pektina .....	21
4.2.3 Karbohidrate holotrihnih praživotinja .....	22
4.2.4 Iskorištavanje topivih šećera .....	22
4.2.5 Produkti fermentacije ugljikohidrata .....	23
4.2.6 Produktivnost i iskoristivost rezervnih ugljikohidrata .....	23
4.2.7 Razgradnja amilopektina .....	24
4.2.8 Razgradnja proteina .....	25

4.2.9	Razgradnja nukleinskih kiselina .....	25
4.2.10	Metabolizam lipida .....	26
5.	Važnost praživotinja i uloga u metabolizmu buraga .....	27
6.	Literatura .....	28
7.	Sažetak .....	29
8.	Summary .....	29

## 1. Uvod

Protozoa, odnosno praživotinje, je pojam koji uključuje jednostanične primarno heterotrofne eukariotske organizme. Stari su preko 500 milijuna godina i danas je poznato oko 45 000 vrsta. To su mikroorganizmi čiji naziv potječe od grčke riječi *protos*, što znači prvi i *zoon*, što znači životinja. Prvi ih je otkrio Antoni van Leeuwenhoek, te ih je nazvao *Animalcula*. 1818. godine Goldfuss je prvi upotrijebio naziv protozoa. 1838. godine Ehrenberg je prvi opisao više od 500 vrsta protozoa, njihovo razmnožavanje i probavu u protozoa, a Dujardin je 1841. god. objavio sustav klasifikacije za praživotinje. 1870. god. Pasteur je otkrio da su protozoa uzročnici različitih bolesti. Predstavljaju polifiletički takson s nejasnom granicom između pojedinih skupina. Praživotinje danas zauzimaju značajno mjesto i igraju važnu ulogu u prirodnim zajednicama. Rasprostranjeni su po svitavoj biosferi. Imaju kozmopolitsku distribuciju, te stoga razlikujemo morske, slatkovodne, terestričke i simbiotske praživotinje, od kojih su neki opasni patogeni. Danas se često upotrebljavaju kao modelni organizmi u laboratorijskim istraživanjima. Prema različitim autorima postoji niz podjela u različite taksonomske skupine. Prije su bili klasificirani kao carstvo *Protista*. Haeckel prvi spominje 1866. godine *Protista* kao carstvo. Od Haeckelovog vremena do danas sistematika *Protista* se jako promijenila zahvaljujući genetskim istraživanjima, elektronskoj mikroskopiji i novim biokemijskim metodama. Protozoa se općenito mogu klasificirati prema načinu ishrane i pokretanju. Tradicionalno se *Protista* dijele na: Protozoa (praživotinje) i Protophyta (alge). Protozoa (praživotinje) se dijeli na: Mastigophora ili Flagellata (bicaelari), Ciliophora (trepetljikaši), Sarcodina (sluzavci), Sporozoa ili Apicomplexa (truskovci).

Protozoa u buragu prvi puta su otkrivena u 19. st. (Gruby i Delafond, 1843). Do 1940. god. nisu rađena značajnija istraživanja na tom području. No nakon 1940. god. znanstvenici pokazuju interes za identifikacijom, morfologijom i biokemijskim karakteristikama praživotinja u buragu. Do danas je na tom području provedeno niz istraživanja i objavljeno je mnogo radova.

## 2. Građa i funkcija praživotinja

Praživotinje se sastoje od jedne stanice, a neke tvore i kolonije. Sve životne funkcije praživotinja odvijaju se na razini stanice. Veličina stanice kreće se od 10  $\mu\text{m}$  do nekoliko centimetara. Tijelo protozoa okruženo je staničnom membranom. Stanična membrana ima zaštitnu funkciju, sudjeluje u kretanju, te služi za primanje i prijenos podražaja. Fleksibilnost i rigidnost tijela, te njegov oblik ovise o fibrilarnoj strukturi koja se naziva citoskelet. Smješten je ispod membrane i zajedno s njom u nekih skupina tvori pelikulu. Pelikula predstavlja vanjski „zid“ koji im daje stalni oblik. Citoskelet se sastoji od fibrilarnih proteina, mikrotubula ili alveola ili pak oboje sudjeluju u njegovoj građi. Alveoli su vezikule, smještene ispod membrane, a nalazimo ih npr. u dinoflagelata, truskovaca i trepetljikaša. Prazni alveoli imaju svojstvo turgescencije i daju potporu stanici. Mogu sadržavati i ione kalcija koji služe kao signal za stanični odgovor. Skelet protozoa može biti endo – ili egzoskelet. Skelet daje zaštitu, a može biti vanjski ili unutarnji. Vanjski skeleti nazivaju se različito, ovisno o skupini pa postoje lorike, teke, kuke i sl.

Citoplazma ispunjava unutrašnjost stanice i dijeli se na vanjsku, gušću ektoplazmu i unutrašnju, rjeđu endoplazmu. Ispunjena je brojnim organelima kao što su mitohondriji, kloroplasti, jezgra, Golgijev aparat, endoplazmatski retikulum, ribosomi, lizosomi, hidrogenosomi, peroksisomi, plastidi itd. Lokomotorni sustav se sastoji od bičeva i trepetljika ili privremenih izdužetaka stanice kakve imaju amebe - „lažne nožice“ ili pseudopodiji. Bičevi i trepetljike im omogućuju pokretanje i pomažu pri hranjenju. Koordiniranim udaranjem trepetljikama pokretima natrag – naprijed stanica se pokreće kroz tekućinu ili pokreće tekućinu preko površine stanice. Trepetljike su duljine oko 10  $\mu\text{m}$ , dok bičevi mogu biti dugački i do 200  $\mu\text{m}$  te imaju valovita udaranja. Broj bičeva na stanici je različit. Mogu biti glatki ili imaju redove flagelarnih dlaka, mastigonema, koji modificiraju kretanje vode.

U protozoa postoje različiti tipovi prehrane. Neki imaju sposobnost fotosinteze, neki uzimaju gotovu organsku tvar, a neki su amfitrofne vrste, što znači da se mogu hraniti i autotrofno i heterotrofno. Protozoa koji se hrane otopljenim organskim tvarima, uzimaju hranu procesom pinocitoze dok se veće hrane hrane procesom fagocitoze. Čestice hrane se probavljaju u hranidbenim vakuolama koje se spajaju s lizosomima, te stvaraju probavni mjehurić. Difuzija je vrlo važna u unutarnjem transportu. Probava je u slobodno živu im protozoama primarno intracelularna. Egzocitozom se odvajaju neprobavljeni ostaci tako da se

membrana probavnog mjehurića a stapa se s staničnom membranom na mjestu koje se zove citoprokt. Većina protozoa su aerobi, no postoje i obligatni anaerobi, osobito simbionti koji žive u probavnom traktu životinja. Fakultativni anaerobi koriste kisik kada je prisutan, a kada ga nema sposobni su za anaerobnu respiraciju. Osmoregulacija se postiže aktivnim transportom iona kroz staničnu membranu. Praživotinje imaju sustav pomoću u kojeg pumpaju vodu i ione. Sastoji se od kontraktilnih vakuola i spogioma koji ih omeđuje, a potonji se sastoji od mjehurića i vezikula. Uloga spogioma je sakupljanje viška tekućine iz okolne citoplazme i provođenje do kontraktilne vakuole. Kontraktilne vakuole eliminiraju višak vode kontrakcijom i pražnjenjem kroz privremene ili trajne pore. Stopa pražnjenja vakuole ovisi o koncentraciji u okolnom mediju. Mehanizam pražnjenja vakuola je važan za slatkovodne praživotinje, jer u protivnom dolazi do njihovog bubrenja. Aktivnost kontraktilnih vakuola je povezana s promjenama u osmotskoj ravnoteži između stanice i izvanstaničnog okoliša. Ekstrusomi su sekretorna tijela koja su povezana sa pelikulom i sadrže materijal koji brzo izbacuju na površinu stanice. Nalaze se neposredno ispod stanične membrane u ektoplazmi. Vidljivi su svjetlosnim mikroskopom, osobito u stadiju izbacivanja sadržaja. Služe za obranu i omamljivanje plijena ili za zastrašivanje predatora. Najpoznatiji oblici su trihociste, mukociste, haptociste, toksiciste, nematociste trepetljikaša i bičica, kinetociste sunašca te roptirji truskovaca.

## **2.1 Ciliophora – trepetljikaši**

Trepetljikaši su monofiletskog podrijetla. Danas je poznato oko 8000 vrsta. Rasprostranjeni su u slatkim vodama, moru ili okolištu tla u vodi koja ih okružuje. Svi trepetljikaši su heterotrofi, a jedna trećina su ekto- ili endokomenzali ili pak paraziti. Većina ih je asimetrična unatoč tome što su dobro pokretljivi i imaju anteriorno – posteriorni polaritet. Većinom su slobodni iako ima i onih koji tvore kolonije i koji su sedentarni. Većina njihove stanice se kreće od 10 μm do 4 - 5 cm. Površinu tijela i područje oko usta prekrivaju brojne trepetljike dok kod specijaliziranih vrsta trepetljike pokrivaju samo određene regije ili su potpuno reducirane. Korteks – in površinski sloj stanice i sastoji od pelikule i infracilijature. Pelikula se sastoji od stanične membrane i sustava vakuola koje mogu imati specifičan raspored ovisno o vrsti te sadrže ione kalcija koji sudjeluju u staničnom odgovoru. Infracilijatura se sastoji od kinetida koji su vrlo složene građe. Građeni su od bazalnog tijela ili kinetosoma koji ima pridružena vlakna i dvije mikrotubularne vrpce koje povezuju kinetosome te su zbog toga kinetidi poredani jedan za drugim, u uzdužnim redovima koje nazivamo kinetima. Korteks se može podijeliti na dva područja. Somatično područje

služi za pokretanje, pri vršivanju za podlogu, za primanje podražaja i kao zaštitu, dok oralno područje služi za pribavljanje i unos hrane. Trepetljikaši su najbrže praživotinje. Trepetljike udaraju u metakronim valovima a smjer i intenzitet udaranja ovise o promjeni razine kalijevih i kalcijevih iona. Neki rodovi kao što su *Stentor* i *Vorticella* imaju spazmoneme i mioneme – proteinska vlakna koja se mogu kontrahirati i tako skratiti cijelo tijelo.

Slobodni oblici protozoa mogu biti detritovori, bakteriovori, herbivori ili predatori. Većina trepetljikaša sadrži citostom položen posteriorno. Citostom se nalazi direktno iznad citofarinksa. Hrana se unosi preko citostoma u citofarinks i tu se oblikuje hranidbena vakuola. U većini trepetljikaša ispred citostoma nalazi se preoralna komorica koja ima ulogu u sakupljanju i manipulaciji hrane a naziva se vestibulum ili predvorje. Vestibulum je obrubljen jednostavnim trepetljikama. Složeni trepetljikaši imaju složene trepetljikave organele, polikinetide i tvore bukalnu šupljinu ili peristom. Za ekskreciju se služe kontraktilne vakuole. Za razliku od drugih protozoa, trepetljikaši posjeduju dva tipa jezgara; mikronukleus i makronukleus. Mikronukleusi su manji i diploidni, te su odgovorni za razmnožavanje. Makronukleusi su poliploidni i veći, te se u njima odvija sinteza RNA. Tijekom razmnožavanja mikronukleus se pravilno mejoti ili mitotički dijeli, dok makronukleus degenerira i kasnije se razvija iz promijenjenog mikronukleusa.

## **2.2 Razmnožavanje i dioba**

Razmnožavanje u protozoa može biti nespolno i spolno. Nespolno razmnožavanje je razmnožavanje staničnim dijeljenjem i svi nastali potomci su klonovi jedinke od koje su nastali. U nespolno razmnožavanje ubrajamo binarnu diobu, višestruku diobu i pupanje. Binarnom diobom iz stanice roditelja nastaju dvije stanice kćeri, te roditelj kao jedinka išezava. Pupanjem se odvajaju jedna ili više stanica kćeri od roditeljske stanice. Ono može biti egzogeno, pupovi se stvaraju na površini majinske stanice ili endogeno, gdje dolazi do uvrata membrane majinske stanice. Uvratom se obuhvati citoplazma i makronukleus koji tvore komoricu iz koje se razviti stanica kćeri. Višestrukim dijeljenjem nastaje mnogo potomaka i to je estični oblik diobe u nametnikih oblika.

Glavna značajka spolnog razmnožavanja jest spajanje dvije haploidne jezgre u diploidnu jezgru. Spolno razmnožavanje obuhvaća nekoliko tipova razmnožavanja: gametogamiju ili singamiju, autogamiju ili samooplodnju i konjugaciju koja je specifična za



trepetljikaše. Kod konjugacije se dvije jedinke spoje, mikronukleusi se dijele mejozom te razmijene haploidne gametne jezgre nakon čega slijedi binarna dioba.

### 2.3 Ekologija praživotinja

Praživotinje su široko rasprostranjene iako su simbionti ograničeni na svoje domaćine. Ukoliko se radi o staništima ili ekološkim nišama, mnoge su vrste rasprostranjene u velikom broju širom svijeta. Osim heterotrofa, mogu imati i ulogu fototrofa - primarnih producenata ili mogu biti saprotrofni kao što je većina gljiva. Uloga praživotinja u regulaciji ekosustava se temelji na njihovoj raznolikosti i brojnosti. Slobodno žive i oblici su široko rasprostranjeni te zauzimaju čitav niz različitih staništa s velikom raznolikošću u biotičkim i abiotičkim čimbenicima.

Mnoge su praživotinje predatori unutar svoje skupine. Često se upotrebljavaju u laboratorijima za izučavanje odnosa predatora i plijena, zbog lako manipulacije i kratkih životnih ciklusa. Praživotinjama se hrane mnoge druge životinje te su važne u mrežama ishrane kao poveznica prema metazoa.

Simbionte nalazimo u beskrležnjacima i kralježnjacima, domestikiranim i divljim životinjama. Nalazimo ih i u pticima kao i u ostalim sisavcima. Simbioza između protozoa i domaćina može biti različita. To je koegzistencija dva organizma; uključuje različite odnose ili koristi za pojedine organizme te se može podijeliti na komenzalizam, mutualizam i parazitizam. Komenzalizam je odnos u kojem jedan član ima koristi a drugi ne trpi nikakvu štetu dok u mutualističkom odnosu oba člana imaju koristi. Parazitizam je oblik odnosa u kojem jedan član ima koristi (parazit), ali na štetu drugog (domaćin). Postoji još jedan oblik simbioze – forezija – u kojem se jedan simbiot uhvati za svog domaćina isključivo radi transporta. Utjecaj na domaćina tada ne mora biti niti pozitivan a niti negativan. Poznato je oko 14000 simbiotskih vrsta *Protista*. Mnogi su paraziti i imaju štetan utjecaj na domaćina za razliku od mutualističke simbioze između protozoa i preživaca koja je itekako pozitivna i za jedne i za druge. Praživotinje kao predatori u buragu kontroliraju veličinu populacije nekih štetnih prokariota. Heterotrofne praživotinje su tipični konzumenti koji se hrane drugim organizmima i otpuštaju neasimilirane organske tvari i produkte katabolizma. Direktno pridonose mineralizaciji i regeneraciji nutrijenata u okolišu.

## 2.4 Raznolikost praživotinja u buragu

Budu i da su praživotinje široko rasprostranjene u biosferi samim time su i vrlo raznolike kao posljedica prilagodbe na različita staništa. Raznolikost protozoa u buragu je nešto manja od bakterijske, ali još uvijek ima velik udio mikroflore u buragu u kojem se nalaze dvije glavne skupine trepetljikaša, holotrihni i entodiniomorfni (Hungate, 1966). Njihova klasifikacija ovisi o morfološkim karakteristikama ili se klasificiraju na temelju ishrane u buragu i specifičnih tvari koje razgrađuju. Njihova raznolikost prikazana je u tablici 1.

[Tablica 1]: Raznolikost protozoa u buragu u domaćih i divljih životinja (preuzeto iz Kamra 2005)

Protozoa	Host	Ref.
<b>Holotrich protozoa</b>		
<i>Isotricha prostoma</i>	Sheep	146
	Zebu cattle	147
	Blackbuck	148
	Water buffalo	54
	Red deer	149
<i>I. intestinalis</i>	Goat	150
	Cattle	151
	Bison	146
<i>Dasytricha ruminantium</i>	Mouse deer	147
	Red deer	149
	Sheep	152
<i>Oligoisotricha bubali</i>	Blackbuck	148
	Water buffalo	54
	Cattle	61
<b>Entodiniomorphid protozoa</b>		
<i>Entodinium bovis</i>	Yugoslavian cattle	153
	Zebu cattle and water buffalo	154
<i>E. bubalum</i>	Water buffalo	59
<i>E. bursa</i>	Cattle sheep and goat	92
<i>E. caudatum</i>	Cattle sheep and goat	155
<i>E. chatterjeei</i>	Indian goat	150
	Water buffalo	154
<i>E. longinucleatum</i>	Cattle, water buffalo	154
<i>Diplopidinium dendatum</i>	Widely distributed	151
<i>D. indicum</i>	Indian cattle	156
<i>Eremoplastron asiaticus</i>	Indian cattle	156
<i>E. bubalus</i>	Brazilian cattle and water buffalo	54
	Widely distributed	157
<i>Eudiplopidinium maggii</i>	Widely distributed	157
<i>Ostracodinium trivacuolatum</i>	Cattle and water buffalo	54
<i>Polyplastron multivesiculatum</i>	Cattle, sheep, goat, blackbuck	148, 158–160
	Widely distributed	148, 158–160
<i>Metadinium medium</i>	Cattle	161
	Water buffalo	54
	African reedbuck	162
<i>Epidinium caudatum</i>	Cattle, sheep, goat	161
<i>Ophryoscolex caudatus</i>	Widely distributed	150, 158, 161
<i>Caloscolex camelicus</i>	Dromedary camel	163

## 2.5 Faktori koji utječu na veličinu populacije trepetljikaša

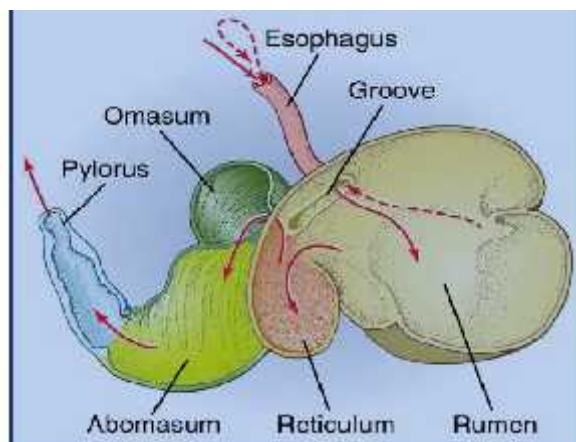
Opći sastav i sveukupna količina trepetljikaša u rumenu određuje se prema različitim faktorima koji su u interakciji, npr. o kojem tipu domaćina se radi, gdje je geografski lociran, kakvu hranu konzumira, i o interspecijskim odnosima protozoa i antagonista. Ukupan broj trepetljikaša u rumenu prilično varira. Hrana visoke probavljivosti, koja osigurava lako dostupne izvore dušika i energije, utječe na pojavnost velike populacije trepetljikaša, iako u stalost i količina konzumirane hrane od strane domaćina, dnevni ciklus u rumenu, veličina estica hrane, koncentracija soli i dodaci prehrani s antibioticima ili drugim aditivima, također utječu na veličinu populacije trepetljikaša. Kako bi razumjeli biološku važnost protozoa u rumenu važno je razumjeti biološke procese koji se odvijaju unutar njih. Na broj i odnos mikroorganizama znatno utječe izbor hrane, npr. prebacivanje na obrok s velikim količinama lako probavljivih ugljikohidrata. U tom slučaju povećava se broj bakterija koje proizvode laktat (*Lactobacillus*, *Eubacterium* i *Streptococcus*) i također se povećava broj konzumenata laktata koji podnose niži pH (*Anaerovibrio*, *Propionibacterium* i *Megasphaera*). Dolazi do pojave mliječne acidoze. Smanjuje se aktivnost celulozolitika i metanogenih bakterija, te broj protozoa koji su također jako osjetljivi na pad pH ispod 5,5.

### 3. Preživa i

Preživa i su podred reda parnoprstaša koji su pak red viših sisavaca i obuhvaćaju oko 220 vrsta. Kod različitih vrsta životinja probavni sustav se sastoji od istih dijelova, ali veličina i funkcija pojedinih odjeljaka se razlikuju, ovisno o karakteristikama ishrane. Preživa i su biljojedi u njihovom želucu se nalaze mikroorganizmi i enzimi koji vrše probavu biljne hrane.

#### 3.1 Građa i funkcija probavnog sustava u preživača

Probavni sustav sastoji se od usta, ždrijela, jednjaka, želuca, tankog i debelog crijeva te analnog otvora. U probavi sudjeluju i žlijezde slinovnice, jetra, gušterača i slezena. Žlijezde slinovnice izlučuju velike količine sline (govedo 108 – 178 l /dnevno, ovca 6 – 16 l / dnevno, konj 5 – 50 l / dnevno, svinje oko 15 l /dnevno). Slina u preživača je izrazito alkalna, a funkcija joj je da vlaži i natapa, pomaže pri stvaranju zalogaja i otapanju lako topivih sastojaka. Također slina neutralizira niže masne kiseline koje se stvaraju prilikom probave. Velike količine sline se luče prilikom hranjenja. Preživači imaju složen želudac koji se sastoji od 4 odjeljaka: burag (rumen), kapura (reticulum), knjižavci (omasum) i sirište (abomasus). Povezani su rumino – retikularnim, retikulo – omazalnim i omasoabomazalnim otvorom. Želudac zauzima 2/3 trbušne šupljine. Prva tri odjeljaka nazivaju se predželucima, nemaju žljezdane elemente i s unutrašnje strane presvučeni su kutanom sluznicom. Burag je najveći predželudac i ispunjava lijevu polovicu trbušne šupljine. Volumen buraga je 120 – 180 l. Kapura je najmanji odjeljak. Knjižavci služe prolazu tekućine i usitnjene hrane iz kapure u sirište, a smješten je u desnoj rebranoj slabini. Sirište predstavlja pravi želudac. Na sirište se nastavlja tanko i debelo crijevo koje završava rektumom.

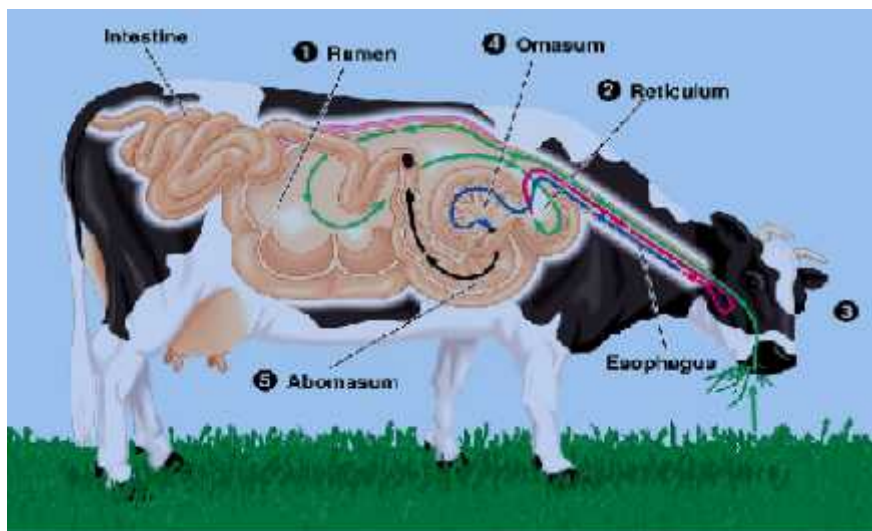


Slika 1: Građa složenog želuca u preživača

([http://www.pfos.hr/~dsego/ispitna\\_literatura/skripta.pdf](http://www.pfos.hr/~dsego/ispitna_literatura/skripta.pdf))

### 3.2 Motilitet predželuca

Usitnjavanje hrane događa se u usnoj šupljini. Za aktivnost predželuca važne su kontrakcije kapure i buraga koje pomažu u miješanju hrane, regurgitaciji, eruktaciji i u prebacivanju hrane u knjižavac. Zadržavanje i miješanje hrane važno je za mikrobnu razgradnju, nakon koje slijedi obilna resorpcija. Hrana koja dopijeva na dno kapure prolazi kroz retikulo-omazalni otvor u knjižavac. Prolaz hrane omogućuje motorika kapure, sfinkter retikulo-omazalnog ušća i tlak u knjižavcu. Tijekom druge kontrakcije kapure napetost sfinktera popušta, smanji se tlak u knjižavcu, i hrana biva usisana u šupljinu knjižavca. Nakon toga se zatvara retikulo – omazalno ušće. Kontrakcijama knjižavca kontrahira se trup knjižavca, te se otvara ulaz u sirište u koje ulazi tekuća i polutekuća hrana. Kompaktna hrana dopijeva među listatne nabore u knjižavcu, te se tu dalje usitnjava. U knjižavcu se odvijaju probavni procesi, resorpcija vode, elektrolita i hlapivih masnih kiselina. Glikolitička aktivnost knjižavca je 50% manja od one u buragu.



Slika 2: Smjer kretanja hrane kroz probavni sustav

([http://www.pfos.hr/~dsego/ispitna\\_literatura/skripta.pdf](http://www.pfos.hr/~dsego/ispitna_literatura/skripta.pdf))

### 3.3 Preživanje

Termin preživa i potječe od toga, da ove životinje u razdobljima mirovanja preprobavljenu kašu hrane ponovo vraćaju u usta i još jednom ju žva u prije nego tako dodatno usitnjenu hranu ponovo progutaju i odvedu ju na stvarnu probavu. Time postižu jače usitnjavanje hrane i stvara se velika površina na koju djeluju bakterije. Odraslo govedo dnevno preživa 7 – 10,5 sati, podijeljeno u pojedine periode dužeg i kraćeg trajanja.

Preživanje se sastoji se od četiri radnje: rejekcija ili regurgitacija (vratanje hrane u obrocima iz buraga u usnu šupljinu), remastifikacija (ponovno žvakanje), reinsalivacija (ponovno natapanje slinom) i redegluticija (ponovno gutanje). Nakon ponovnog prežvakavanja, hrana putuje u knjižavac. Eruktacija je podrigivanje velikih količina plinova. To je u preživača neujna pojava. Izlazni plinovi u većoj količini ulaze u dušnik i pluća, nego što izlaze kroz nos i usta. Unos plinova pojačava proces eruktacije, a inhibira nakupljanje hrane i vode u području oko kardije.

### **3.4 Probava u predželucima**

Umjesto žlijezda koje bi razgradile visokomolekularne spojeve, u složenim predželucima koji osiguravaju visoko specijaliziranu anaerobnu okolinu smješteni su mikroorganizmi. Fizikalna okolina i odli na opskrba nutritivnim tvarima podupiru veliku raznolikost mikroorganizama koji uključuju bakterije, protozoa, anaerobne gljive, arheobakterije, mikoplazme i bakteriofage. Burag je ekosustav u kojem prevladava mikropopulacija. Stalnim uzimanjem hrane, preživača osigurava mikroorganizmima supstrat. Topivi dijelovi hrane se brzo reasorbiraju u buragu, dok se oni teže razgradivi duže zadržavaju te bivaju podvrgnuti djelovanju enzima mikroorganizama. U buragu najviše nalazimo saharolitičkih bakterija, zbog toga jer se najveći udio hrane koji preživača i unose sastoji od ugljikohidrata, celuloze i drugih polisaharida. Količina kisika u buragu je niska kao i oksidacijsko – redukcijski potencijal. U buragu prevladavaju anaerobni ili fakultativno anaerobni mikroorganizmi. Kvantitativni i kvalitativni sastav plinova u buragu je: 65% CO<sub>2</sub>, 27% CH<sub>4</sub>, 7% N, 0,6% O<sub>2</sub>, 0,2% H<sub>2</sub> i 0,01% H<sub>2</sub>S. Temperatura se kreće između 38 – 42 °C. Sastojci u probavnom traktu su dobro puferirani sa salivarnim sekretima (slina sadrži fosfate i karbonate) i apsorpcijom kiselih metabolita koji održavaju pH (6 ili 7) blizu neutralnog. Zbog teže kultivacije, uloga i biokemijske sposobnosti protozoa nisu u potpunosti utvrđene. Kao rezultat fizičkog i mikrobiološkog djelovanja u buragu dolazi do fermentacije dijelova hrane. Fermentacijom mogu nastati korisni produkti, hlapljive masne kiseline, bjelančevine, vitamin B, i produkti koje životinja ne koristi, metan i ugljični dioksid. Također mogu nastati i štetni produkti, amonijak i nitrati. Produkti razgradnje celuloze su: octena, propionska i masla na kiselina, te nešto manje mravlje, valerijanske i kapronske kiseline. Prisutna je i mliječna kiselina. Najviše koncentracije kiseline su 2 – 4 sata nakon hranjenja. Rast mikroorganizama ovisi o dostupnosti ATP-a. Ako ima kisika, sinteza ATP-a i mikrobna masa se povećavaju, ali time se povećava udio konačnih produkata CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>O. Ako je manja sinteza ATP-a, ima više hlapljivih masnih kiselina koje su glavni izvor energije za domaćina. Glukoza je važan izvor

energije iji višak mikroorganizmi mogu pohraniti u obliku polisaharida. Oni predstavljaju energetska rezervu koja se može razgraditi do glukoze te se dalje može biti iskorištena u metaboli kim procesima. Predželuci su važni u probavi. U njima se hrana zadržava, kvasi, miješa i macerira te u kona nci razgra uje do produkata koji se koriste u metabolizmu preživa a i služe za sintezu mlijeka i masti te doprinose dobrobiti preživa a.

### 3.5 Mikroflora predželuca

Mladi preživa i koji su se tek okotili sišu maj ino mlijeko, koje probavljaju različite kiseline i enzimi u želucu i tankom crijevu. Postupno, osim maj ina mlijeka, mladi preživa po inje se hraniti esticama hrane iz svoje okoline. Hrana i mlijeko predstavljaju pogodan supstrat za daljnji razvoj mikroflora. Mikroflora se razvije odmah nakon ro enja, jer majka i okolina inokuliraju mladog preživa a. Tako er inokulacija se vrši i preko maj ine sline i fecesa.

#### 3.5.2 Bakterije buraga

U buragu se nalazi oko 60 vrsta bakterija. 1 g sadržaja buraga ih sadrži  $10^{10}$  -  $10^{11}$ . Naj eša je *Streptococcus bovis*. Bakterije se dijele u funkcionalne skupine prema supstratu na koji djeluju. U prehrani je najzastupljeniji biljni materijal koji sadrži najviše celuloze. Hemiceluloza i lignin koji su tako er prisutni, ograni avaju probavu biljne stanice, pa je prema tome probavljivost proporcionalna udjelu ligno – hemiceluloze. Najaktivnije celuloliti ke bakterije su: *Ruminococcus flavefacians*, *Ruminococcus albus*, *Bacteroides succinogenes*, *Butyrivibrio fibrisolvens*. Celulaza koja izaziva celulolizu sastoji se od tri enzima. Cl enzim smanjuju otpornost celuloznih vlakana, ime ona postaju dostupnija za drugi enzim C<sub>x</sub> koji celulozu prevodi u topiv oblik, dalje ju razgra uje te nastaje supstrat koji koristi celobiazu i nastaje glukoza. Škrob razgra uju: *B. fibrisolvens*, *B. succinogenes*, *Succinomonas amylolytica* i *Succinomonas dextrinosolvens*. Najaktivnije su neceluloliti ke bakterije: *Bacteroides amylophilus*, *S. bovis*, *Bacteroides rumenicola*. Ako u prehrani dominira bujna trava i topivi škrob može do i do porasta populacije *S. bovis* koja proizvodi velike koli ine mlijeka i kiseline koja se nakuplja u buragu. Nezrela, mlada, visokokvalitetna krma može sadržavati pektin koji razgra uju pektinoliti ke bakterije: *B. rumenicola*, *Lachnospira multiarus*, *B. fibrisolvens*. Bakterije u buragu hidroliziraju i trigliceride i vrše hidrogenaciju nezasi enih masnih kiselina. Tako er prisutne su i proteoliti ke bakterije koje razgra uju proteine. Sa celuloti kim bakterijama i praživotinjama povezane su i metanogene arhebakterije.

### 3.5.1 Praživotinje buraga

Praživotinje u buragu je manje nego bakterija. 1 gram sadržaja buraga ima  $10^5 - 10^6$  praživotinja. Najzastupljeniji su holotrihni i entodiniomorfn trepetljikaši. Obje skupine se svrstavaju u podrazred Trichostomatia, a razlikuju po smještaju trepetljika. Holotriha imaju raspoređene trepetljike po cijelom tijelu, a entodiniomorfa samo na određenim mjestima. Ove dvije skupine trepetljikaša zauzimaju različite metaboličke niše. Holotriha primarno koriste topljive ugljikohidrate dok entodiniomorfa bolje fermentiraju škrobna zrnca. Entodiniomorfa su obično brojnije u probavnom traktu i boljih su biokemijskih karakteristika u odnosu na holotriha. Osim što koriste hranu koju unose preživljavaju, hrane se i bakterijama. Njihove bjelancevine mogu razgraditi ili asimilirati. Vrlo su važni za stabilnost fermentacije jer kontroliraju brojnost bakterijskih populacija. Preživljavanje je ovisan o fermentaciji hranidbenih tjestica mikroorganizmima u buragu. U buragu preživljavaju a nalaze se i biolozi, među kojima su najpoznatiji rodovi *Trichomonas*, *Monoceromonas*, *Chilomastix*, no o njihovom metabolizmu se zna vrlo malo.

### 3.5.3 Odnos bakterija i praživotinja

Bakterije se prihvaćaju za trepetljike holotrihnih protozoa i tamo rastu, to su ektobionti, ili su smještene u citoplazmi, endobionti. Prema istraživanju kod *Isotricha prostoma* i *Isotricha intestinalis* na  $200 \mu\text{m}^2$  nalazi se 10 do 20 bakterija. Većina ektobionata su metanogene bakterije, dok intracelularne metanogene bakterije nalazimo samo kod nekih entodiniomorfa i holotriha. Bakterije, nakon što su progutane, nalaze se u probavnim vakuolama unutar stanice protozoa. Bakterije preživljavaju unutar vakuola jer su otporne na njihove probavne enzime. Mogu metabolizirati otopljene komponente koje su unesene ili otpuštene iz stanica protozoa. Izlučuju i polisaharolitičke enzime koji razgrađuju polimere prisutne u staničnoj stijenci biljnog materijala. Bakterijska razgradnja služi i kao važan izvor dušika praživotinjama. Bakterijske aminokiseline koje nastaju njihovom razgradnjom, protozoa direktno ugrađuju nepromijenjene u svoje proteine. Otpuštene aminokiseline koriste i ostale bakterije i smanjuje se koncentracija amonijaka koji je slabi izvor dušika za praživotinje. Probava bakterija trepetljikašima u buragu važna je za kruženje dušika u buragu. Entodiniomorfa mogu imati bakterije s vanjske strane pelikule. Broj i raznolikost tih bakterija je znatno veći od intracelularnih bakterija. Neke vrste, kao što je *Entodinium caudatum*, može pojesti bilo koju bakteriju, dok su neke vrste vrlo selektivne u izboru bakterija.



#### 4. Metabolizam i uloga praživotinja u buragu

Budu i da su protozoa brzorastu i lako se kultiviraju u laboratoriju, njihov metabolizam je detaljno proučen. Unos, rast, respiracija, iznos i drugi parametri su mjereni ili procjenivani i bilježeni u studijama. Fenchel (1964) je primijetio, promatraju i odnose tjelesne veličine i stupnja rasta populacije organizma, bržu stopu rasta manjih organizama u odnosu na veće. Praživotinje su vrlo učinkovite u pretvorbi energije. Pod određenim uvjetima prehrane protozoa čini gotovo polovicu ruminalne biomase i značajno doprinosi ukupnoj produkciji hlapljivih masnih kiselina (VFA – volatile fatty acid). VFA je produkt mikrobiološke fermentacije buraga kojim se osigurava ugljik i energija potrebna domaćinu za normalnu funkciju probavnog sustava.

##### 4.1 Entodiniomorfni protozoa

Evolucijski razvoj entodiniomorfnih trepetljikaša temelji se na pretpostavci da su složeniji oblici nastali iz jednostavnijih, kao npr. *Ophryoscolex* koji se razvio iz *Entodiniuma*.

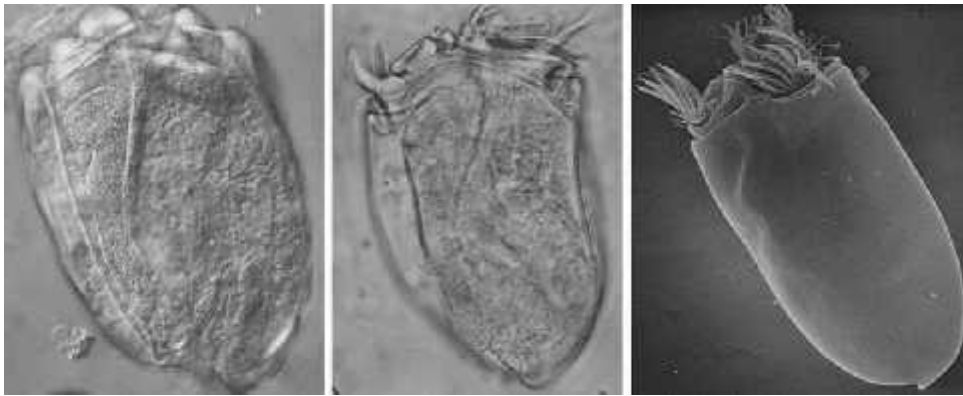


Slika 3: *Ophryoscolex* spp.

([www.ars.usda.gov/.../feb06/animal0206.htm](http://www.ars.usda.gov/.../feb06/animal0206.htm))

*Entodinium* je strukturno i biokemijski jednostavan organizam koji ne posjeduje celulazu i endopektat – lijazu. Prvi se nastanjuje u buragu mladih preživača i posljednji nestaje te je djelotvorniji u proždiranju čestica škroba, za razliku od većih trepetljikaša. Entodiniomorfa se dijele binarnom diobom i konjugacijom. Važnost konjugacije u rumenu nije do kraja istražena. Njihova ishrana se uglavnom temelji na proždiranju većih čestica hrane. Male neprobavljive čestice izlaze u uđu se kroz citoprokt. Osim njih, izbacuju se i zrnca škroba i kloroplasti. Ne uzimaju se svi probavni fragmenti jednakom brzinom, npr. čestice škroba bivaju progutane vrlo brzo i u potpunosti ispunjavaju organizam za nekoliko sekundi. Svi

entodiniomorfa imaju kontraktilne vakuole, ali njihova funkcija nije do kraja objašnjena. Hrane se i otopljenim esticama. Samo je oko dvadeset od stotinjak poznatih entodiniomorfnih protozoa kultivirano *in vitro*. Svi su obligatni anaerobi. Uvjeti prilikom kultivacije ukljuuju topli okoliš konstantne temperature, kojem nedostaju komponente koje se lako metaboliziraju, a bogat je esticama kao što su bakterije, zrnca škroba, kloroplasti i vlakna celuloze. Prema nekim autorima, – sitosteroli i ostali povezani steroli koji se normalno nalaze u travi, kolin koji je povezan sa zncima škroba i vitamin B<sub>12</sub> su esencijalni za rast trepetljikaša u buragu. Svi entodiniomorfnih protozoa u svojim vezikulama u endoplazmi sadrže bakterije. Entodiniomorfa ne rastu baš uspješno u pominim kulturama jer se teško hrane esticama koje se brzo kreću.



Slika 4: *Eudiplodinium maggi*

([www.microscopy-uk.org.uk/.../dfrumen.html](http://www.microscopy-uk.org.uk/.../dfrumen.html))

#### 4.1.1 Razgradnja proteina

Postoji malo informacija o uzimanju slobodnih proteina, iako su *Onodera* i *Kandatsu* (1970) pokazali da je netopiv kazein probavljiv. Svi entodiniomorfa sadrže proteolitičke enzime, međutim nema jasnog stava koji pH je optimalan za njihovu aktivnost. Neki autori smatraju da je za razgradnju kazeina optimalan pH 6,5 – 7 (Abou Akkada i Howard, 1961), a za endogene proteine 5,8 (Forsberg i sur., 1984). *Nagasawa i sur.* (1994) su pronašli dvije proteaze kod *Entodinia*. Optimalni pH za njihovo djelovanje je 3,0 i 8,0 i vjeruje da imaju značajnu ulogu u razgradnji hrane i bakterijskih proteina. Svi trepetljikaši imaju leucin aminopeptidaze i većinom egzopeptidaze. Entodiniomorfa uzimaju aminokiseline aktivnim ili pasivnim procesom. Aktivni proces rezultira ugradnjom nepromijenjenih aminokiselina u proteine protozoa. Stopa ugradnje aminokiselina najniža je kod rodova *Entodinium* i *Epidinium*, a najviša je kod *Eudiplodinium maggi* i *Polyplastron multivesiculatum* (Coleman, 1967; Coleman i Laurie, 1974, 1977; Owen i Coleman, 1977; Coleman i Sanford, 1980;

Coleman i Reynolds 1982). Mnoge aminokiseline su acetilirane ili preoblikovane prije otpuštanja u okolni medij. Sposobnost protozoa da razgrade aminokiseline je vrlo ograničena. Neki oblici trepetljikaša posjeduju triptofaze.

#### 4.1.2. Razgradnja škroba

Entodiniomorfa se hrane zrnima škroba koje polako razgrađuju na vodik, octenu kiselinu, butansku kiselinu i glicerol. To ne vrijednosti ovise o koncentraciji kisika i ugljičnog dioksida (Ellis i sur., 1991). Stopa uzimanja zrnaca škroba kod različitih vrsta je različita, pa se tako *Entodinium* u početku hrani zrnima škroba vrlo brzo ( $770\mu\text{g (mg protein)}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ), kasnije sporije (približno oko 3% od početne stope). Većina protozoa uzimaju zrnca škroba znatno sporije konstantnom stopom tokom nekoliko sati (Coleman, 1992). Stopa razgradnje škroba kod entodiniomorfa je ugrubo proporcionalna inicijalnoj koncentraciji škroba ili amilopektina unutar protozoa. Najviša aktivnost amilaze zabilježena je kod *Eremoplastron bovis*, *Diploplastron affine*, *Ophryoscolex caudatus* i *P. multivesiculatum*, a najniža kod *Ostracodinium obtusum bilobum*, *E. caudatum* i u *Entodinium bursa*. Škrob se razgrađuje na maltozu i glukozu koja se fosforilira u glukozu – 6 – fosfat, koja se dalje najvjerojatnije koristi u klasičnoj glikolizi za proizvodnju energije ili se eventualno koristi u ektoplazmi za stvaranje rezervnog amilopektina. U buragu ovaca s prirodnim A – ili B – tipom populacije, 35 - 57% ukupne amilaze nalazi se u citoplazmi protozoa. *E. caudatum* kod ovaca u svojoj citoplazmi posjeduje samo od 2 – 15 % amilaze, dok ostala amilaza potječe od bakterija kojima se hrane (Coleman, 1986). Metabolizam u *O. caudatus* je drugačiji, aktivnost maltaze je niska, dok je aktivnost maltoze fosforilaze znatno viša (Gyulai i Coleman, 1991). Dio glukoze i maltoze koriste intracelularne bakterije kao izvor energije i u, npr. *Klebsiella aerogenes* u kulturi s *E. caudatum*, produkciji polisaharidnih kapsula koje ih štite od probavnih, odnosno proteolitičkih enzima koje izlučuju protozoa (Coleman, 1969, 1975).

#### 4.1.3 Razgradnja celuloze i hemiceluloze

Entodiniomorfa se hrane celulozom koju razgrađuju i koriste u sintezi intrastanih polisaharida (Hungate, 1942, 1943; Coleman, 1992). Postoji nekoliko studija o razgradnji celuloznih vlakana i čini se da je mehanizam razgradnje različit kod različitih vrsta (Bohatier et al., 1990; Benyahya i sur., 1992). Prema istraživanju, *E. maggii* može pojesti oko 148 ng celuloze i probaviti je pri stopi  $320 \text{ pg protozoa}^{-1} \text{ min}^{-1}$ . Probavni produkti mogu se upotrijebiti za sintezu amilopektina. Ako su pronađene jednake količine škroba i celuloze, *E. maggii* je 25 puta brže konzumirati celulozu, nego škrobna zrnca. Iako je otopljena celuloza

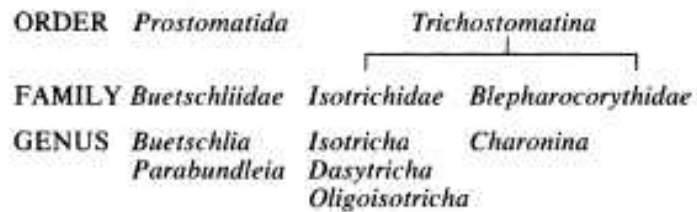
prisutna u celulozi tih protozoa, nema jasnih dokaza da li potječe od protozoa ili od bakterija (Coleman, 1992). No ipak postoje indirektni dokazi, temeljeni na uvođenju antibiotika i izostanku bakterija koje se drže biljnih vlakana, da neki enzimi potječu od protozoa (Coleman, 1978; Coleman i Hall, 1980; Bonhomme, 1988; Bonhomme i sur., 1986; Clayet i sur., 1992). Svi entodiniomorfa u buragu sadrže celulaze, osim roda *Entodinium*. Najvišu aktivnost celulaza posjeduju *E. maggii*, *Epidinium ecaudatum caudatum* i *O. obtusum bilobum* (Coleman, 1985). Koriste i koncentraciju karboksimetilceluloze, otpuštene iz različitih frakcija buraga kao parametar, ukupna celuloza u ovaca koje sadrže samo *E. maggii* je 2,9 – 4,2 puta veća nego kod životinja koje ne sadrže trepetljikaše, i preko 70% aktivnosti enzima povezano je sa protozom. U ovaca koje sadrže necelulozitičku *E. caudatum*, 65% celulaze potječe od bakterija. Stopa sinteze intracelularnog amilopektina iz celuloze je kod *E. maggii* tolika da se svaki dan u buragu može sintetizirati 9 g amilopektina (Coleman, 1986). Distribucija endopektat lijaza u entodiniomorfa koje razgrađuju poligalakturonsku kiselinu, hemicelulazu B i ksilazu, su slične celulozi sa niskim aktivnošću u rodu *Entodinium* osim endopektat lijaze u *P. multivesiculatum* i u većini organizama. Svi trepetljikaši, osim roda *Entodinia*, sadrže glikozidne hidrolaze koje su potrebne za razgradnju primarnih probavnih produkata do monosaharida (Coleman i sur., 1980; Williams i Coleman 1985; Williams i sur., 1984). Entodiniomorfa mogu koristiti galakturonsku kiselinu i ksilan u vrlo ograničavajućim mjeri. Fruktaza i fruktozani se obično nikad ne iskoriste. Optimalni pH za endopektat lijazu iznosi 8,5 (sa 14% maksimalne aktivnosti pri pH 6,0), u usporedbi s celulozama za koju aktivnost optimalni pH iznosi 5,0 – 7,5, 6,0 za amilazu, između 3,0 i 8,0 za proteaze i pH unutar vezikula najvjerojatnije iznosi 6,0.

#### **4.1.4 Razgradnja nukleinskih kiselina**

Konstituente koji su potrebni za sintezu nukleotida i nukleinskih kiselina sadrže bakterije, iako protozoa mogu koristiti i slobodne purine, pirimidine, fosfate i ribozu. Postoje nejasnoće o ugradnji purina u nukleinsku kiselinu protozoa, ostaci se razgrađuju kroz hipoksantin i ksantin. Uracil se ugrađuje kao uracil ili citozin, a slobodni uracil i tiamin brzo prelaze u svoje dihidroenergetske derivate. Slobodna riboza prelazi u glukozu koja se ugrađuje u polisaharide protozoa (Coleman, 1968, 1969; Coleman i Sanford 1979).

## 4.2. Holotrihne praživotinje

Holotriha su praživotinje široko rasprostranjene i u doma ih i u divljih životinja. Nastanjuju probavni trakt preživa a i sudjeluju u fermentaciji estica hrane. Danas postoje dva taksonomska reda podrazreda Holotricha. Klasifikacija nije konzistentna, no prema izvještaju nekih autora glasi (Clark, 1977; Hungate 1966; Ogimoto i Imai, 1981) :



Preuzeto iz lanaka „Rumen Holotrich Ciliate Protozoa“ , (Kamra, 2005)

Tri su glavne vrste podrazreda Holotrichia koje nalazimo u preživa a su: *I. intestinalis*, *I. prostoma* i *Dasytrichia ruminantium*. Ostale vrste imaju nižu frekvenciju pojavljivanja.



Slika 5: *Isotricha intestinalis*

([fr.academic.ru/dic.nsf/frwiki/369728](http://fr.academic.ru/dic.nsf/frwiki/369728))

Holotriha su primitivni trepetljikaši koji imaju trepetljike smještene po cijelom tijelu. Granule polisaharida nalaze se u endoplazmi. Unešene estice hrane i bakterije pojavljuju se u vakuolama u citoplazmi i imaju enzimatsku aktivnost. Dva roda *Holotrichia* imaju hidrogenosome koji transformiraju piruvat u acetat i hidrogen u anaerobnim uvjetima. Rodovi *Dasytrichia* i *Isotricha* široko su rasprostranjene u preživa ima. U mladih preživa a holotriha se pojavljuju kasnije u buragu za razliku od entodiniomorfa, iako se rod *Isotricha* može pojaviti prije u teladi i janjadi. Holotriha se pojavljuju u ve em broju kada su otopljeni ugljikohidrati lako dostupni u hrani (Clarke, 1977; Hungate, 1966; Valdez, Alvarez, Ferreira, Guerra, Lopez, Priego, Blackburn, Leng, Preston, 1977). Kada su prisutna obje vrste, tada je

*D. ruminantium* brojnija od *Isotricha spp.* Izvještaj o pojavljivanju trepetljikaša u razli itim doma inima upu uje da su rodovi *Dasytrichia* i *Isotricha* eš i u domestificiranih nego divljih životinja (Clarke, 1977; Ogimoto i Imai, 1981). Holotrihni protozoa mogu biti kultivirani kra e vrijeme, oko 20 – 60 dana (Clarke i Hungate, 1966; Gutierrez, 1955; Purser i Weiser, 1963; Sugden i Oxford, 1952). Medij koji se koristi za kultivaciju je kompleksan i sadrži teku ine koje se nalaze u buragu, te ekstrakte (biljni dijelovi, bakterije, protozoa) nespecifi nog sastava i funkcije, iako su elementi u tragovima i neophodni vitamini jasno odre eni. Istraživanja metabolizma holotrihnih trepetljikaša temelje se na izolaciji stanica iz konvencionalnih životinja ili životinja koje sadrže vrste koje su naknadno unesene nakon što su se protozoa koji ine normalnu floru buraga odstranili kemijskima agensima.

#### **4.2.1. Metabolizam razgradnje biljnog materijala**

U buragu trepetljikaši su odgovorni za razgradnju 30 – 40 % biljnih vlakana. Smatra se da su entodiniomorfni protozoa koji se hrane esticama uklju enu u razgradnju biljnih polimera, dok su holotrihni protozoa i *Entodinium spp.* uklju eni u iskorištavanje rezervnih polimera i otopljenih še era. Brza kolonizacija i velik broj entodiniomorfa razgra uju tanja tkiva, npr. mezofil, parenhim i epidermu. U odsutnosti roda *Epidinium* biljni materijal brzo koloniziraju *D. ruminantium*, *I. intestinalis* i *I. prostoma*.

#### **4.4.2 Razgradnja celuloze, hemiceluloze i pektina**

Holotrihni protozoa posjeduju enzime koji razgra uju pohranjenje biljne polimere, – glukane i fruktane, te inulin. Brzo fermentiraju biljne fruktane i oligomere koji sadrže fruktozu. Posjeduju i invertaze koje razgra uju fruktane i saharozu, te su odgovorni za razgradnju celuloze. Karboksimetil celuloza stimulira produkciju plinova kod *D. ruminantium* (Williams i Harfoot, 1976). Ekstrakt slobodnih stanica *D. ruminantium* i *Isotricha spp.* otpuštaju reduciraju i še er karboksimetil celuloze. Njegova aktivnost je niska i može utjecati na aktivnost nekih polisaharidnih depolimeraza ili glikozidnih hidrolaza. Iako holotrihne celulaze nisu dokraja razjašnjene, ini se da oba roda imaju hemicelulotike i pektolitike enzime. Istraživanja pokazuju da holotriha ne mogu iskorištavati ksilozu i arabinozu (Abou Akkada, 1965; Prins i Van Hoven, 1977; Van Hoven i Prins, 1977; Williams i Harfoot, 1976). Ipak uo ena je prisutnost niske koncentracije hemicelulaza. *D. ruminantium*, *I. intestinalis* i *I. protostoma* sadrže glikozidne hidrolaze koje su uklju ene u razgradnju hemiceluloze; - L - arabinofuranozidaza i - D - ksilozidaza (Williams, Withers i Coleman, 1984). Ovi enzimi sudjeluju u razgradnji polimera hemiceluloze B engleskog ljlja (*Lolium perenne*) i

arabinoksilana zubi do oligomera topljivih u alkoholu i monosaharida (Williams i Coleman; 1985). Holotriha, iako imaju sposobnost razgradnje arabinoksilana, ipak ne mogu iskoristiti njegove komponente, arabinozu i ksilozu (Prins i Van Hoven, 1977; Sugden i Oxford, 1952; Van Hoven i Prins, 1977; Williams i Harfoot, 1976) . *D. ruminantium* (Van Hoven i Prins, 1977; Williams i Harfoot, 1976) i *I. prostoma* (Prins i Van Hoven, 1977) fermentiraju pektin, ali ne i poligalakturonsku kiselinu, oligalakturonide ili galakturonsku kiselinu. Eksperimentalno stanica *D.ruminantium* (Coleman, Sandford i Beahon, 1980) i *Isotricha spp.* sadrže pektin esteraze i poligalakturonaze. Kao kona ni produkt, kod oba roda pojavljuje se metanol. Holotriha mogu depolimerizirati polisaharide, pektin i hemicelulozu, ali ne mogu metabolizirati produkte njihove razgradnje. Nemogućnost metaboliziranja produkata razgradnje može predstavljati evolucijski degenerativni gubitak enzima ili enzimskog puta.

#### 4.2.3 Karbohidraze holotriha

Postoji nekoliko istraživanja o karbohidraznim enzimima koje posjeduju *D. ruminantium* i *Isotricha spp.* Holotrihni protozoa sadrže invertaze (Bailey i Howard, 1963; Howard, 1959; Thomas, 1960; Howard, 1957; Christie i Porteous, 1957; Carnie i Porteous, 1959) sa optimalnom aktivnošću u pri pH 5,5. Invertaza posjeduju transglikozilaznu aktivnost i prenosi polovice fruktozila pri višoj koncentraciji saharoze, produciraju i trisaharide (Howard, 1959; Christie i Porteous, 1957; Carnie i Porteous, 1959) Glavna uloga glikozidaznih enzima je razgradnja polisaharida. Glikozidni enzimi imaju dvostruku ulogu u metabolizmu ugljikohidrata. Uklanjaju postrane lance od osnovnog lanca polisaharida i razgrađuju oligomerne fragmente koji su nastali depolimerizacijom uzrokovanu enzimima koji razgrađuju polisaharide. Iz holotriha su izolirane i α i β glikozidne hidrolaze (Delfosse – Debusscher, Van Hoof, Hellings i Thines – Sempoux, 1979; Williams, Withers i Coleman, 1984). Istraživanja holotriha, upotrebom disaharida kao supstrata, pokazala su da oba roda sadrže maltaze, celobiazze, laminaribioze i invertaze (Bailey i Howard, 1963; De Meyer, 1981; Howard, 1959; Howard, 1957), a istraživanja sa derivatima p – nitrofenila i disaharida kao supstrata pokazala su da oba roda imaju enzime koji djeluju na pentoze, heksoze, heksozamine i askorbinsku kiselinu (Williams, Withers i Coleman, 1984; Yarlett, Lloyd i Williams, 1985; Yarlett, Hann, Lloyd i Williams, 1985) . *D. ruminantium* posjeduje maltazu, to nije α – glukozidazu koja djeluje na maltotrioze i ima svojstva transferaza (Mould i Thomas, 1958; Williams, Withers i Coleman, 1984). *Isotricha spp.* posjeduje nisku koncentraciju α – glukozidaze, a nema celobiazze, za razliku od *D. ruminantium* koji ima i celobiazze i β – glukozidaze više aktivnosti nego ona kod *Isotricha spp.* Na aktivnost

glikozidnih hidrolaza mogu djelovati i okolišni uvjeti. Holotrihni protozoa su važan izvor invertaza u buragu preživača. Razina karbohidraza ovisi o dostupnim supstratima.

#### 4.2.4 Iskorištavanje topivih šećera

Holotrihni protozoa iskorištavaju monosaharide, glukozu, fruktozu i galaktozu, i topive oligomere, te polisaharide nastale njihovom polimerizacijom. Opseg fermentacije šećera ovisi o rodu. *Isotricha spp.*, za razliku od *D. ruminantium*, može iskoristiti zrnca škroba prikladne veličine (Gutierrez, 1955; Howard, 1959; Howard, 1957), dok maltoza i celobioza nisu uinkoviti supstrati za *Isotricha spp.* (Gutierrez, 1955; Howard, 1959; Prins i Van Hoven, 1977), iako sadrži  $\alpha$ -glukozidaznu, celobiaznu i  $\beta$ -glukozidaznu. *D. ruminantium* također fermentira saharozu, fruktozu, D-glukozu, rafinozu i inulin. Ugljikohidrati koji sadrže fruktozu se iskorištavaju brže. Pojedini di- i trisaharidi koji sadrže glukozu i galaktozu su također metabolizirani gdje L-glukoza, glukozna fosfat, deglukoronska kiselina, pentoza, hemicelulozni polisaharidi i derivati celuloze ne potiču stvaranje metaboličkih plinova (Van Hoven i Prins, 1977; Williams i Harfoot, 1976). Stopa iskorištavanja ugljikohidrata i njihovo porijeklo ovise o supstratu. Prins i Van Hoven (1977) su proučavali *I. prostoma* te su potvrdili da se glukozna, fruktoza i ugljikohidrati koji sadrže fruktozu (saharozna i rafinoza) najbrže metaboliziraju. Entodiniomorfnih trepetljikaša, npr. *E. caudatum caudatum*, unose glukozu i maltozu različitim mehanizmima (Coleman i Laurie, 1976), kao i *D. ruminantium* galaktozu. Unos galaktoze raste u prisutnosti lako asimiliranih supstrata, što upućuje na postojanje energijski ovisnog mehanizma uzimanja galaktoze. Čini se kako je ekološka uloga holotriha brza asimilacija otopljenih šećera. Na stopu iskorištavanja šećera kod *D. ruminantium* ne utječe samo priroda i koncentracija supstrata već i različiti okolišni faktori, uključujući i pH i temperaturu. Neki ugljikohidrati imaju neželjeni učinak na stanicu. U istraživanjima kultiviranih holotrihnih trepetljikaša pokazano je da manozna, glukozamin i galaktozamin djeluju toksično na njih. *D. ruminantium* ima nisku stopu uzimanja manoze i dolazi do produžene stanične razgradnje u inkubaciji sa tim monosaharidom (Howard, 1959; Williams i Harfoot, 1976). Oblici ostalih produkata fermentacije su također oslabljeni. Protozoa ne mogu kontrolirati unos šećera, i prisutnost lako asimiliranih monosaharida ne sprečava unos i posljedica ni utjecaj toksičnih monomera. Također manozna negativno utječe i na metabolizam glukoze kod *Isotricha spp.* koja također ne može kontrolirati unos šećera (Prins i Van Hoven, 1977; Sugden i Oxford, 1952). Mehanizam toksičnog djelovanja heksozamina i manoze na holotrihne trepetljikaše nije poznat.



#### 4.2.5 Produkti fermentacije ugljikohidrata

Produkti fermentacije topivih ugljikohidrata koje formiraju *Isotricha* i *Dasytricha* su mlije na kiselina, masla na i octena kiselina (Gutierrez, 1955; Howard, 1959; Prins i Van Hoven, 1977; Van Hoven i Prins, 1977; Williams i Harfoot, 1976) sa tragovima propionske kiseline (Gutierrez, 1955). Kod višeg stupnja fermentacije može se formirati i mravlja kiselina (Van Hoven i Prins, 1977), kao i vodik, ugljik dioksid i rezervni polisaharidi. Kod *D. ruminantium* stopa produkcije plina i kiseline, te omjer formiranih produkata ovise o supstratu (Williams i Harfoot, 1976). Stopa stvaranja produkata je niža kada su supstrati toksi ni, npr. manoza, ili siromašni, npr. galaktoza. Glavni produkti metabolizma glukoze kod *I. prostoma* su vodik, ugljik dioksid, butirat, laktat i amilopektin (Prins i Van Hoven, 1977). Stopa stvaranja produkata fermentacije kod *I. prostoma* raste s porastom koncentracije glukoze, dok stvaranje butirata ovisi o po etnoj koncentraciji supstrata. *I. prostoma* slabije fermentira galaktozu nego glukozu i ne fermentira manozu.

#### 4.2.6 Produktivnost i iskoristivost rezervnih ugljikohidrata

Važna odlika holotrihnih protozoa je njihova sposobnost da sintetiziraju i pohrane polisaharide tijekom perioda kada su im dostupni u ve o j koli ini. Oko 75 – 80 % pojedениh ugljikohidrata može se pretvoriti u rezervne polimere (Gutierrez, 1955; Williams i Harfoot, 1976). Polimer koji se pojavljuje je glikogen (Certes, quoted by R.E.Hungate, 1966). Holotriha koji sadrže ugljikohidrate bogate glukozom i fruktozom mogu poslužiti kao rezerva za stvaranje amilopektina (Prins i Van Hoven, 1977). Kao prekursori za sintezu amilopektina mogu poslužiti vodik ili acetat (Williams i Harfoot, 1976). Razgradnja i sinteza amilopektina odvijati e se samo ako su prisutni u inkoviti supstrati (Heald i Oxford, 1953; Prins i Van Hoven, 1977). Galaktoza, za razliku od glukoze, je najmanje u inkovit supstrat za sintezu amilopektina (Prins i Van Hoven, 1977; Van Hoven i Prins, 1977; Williams i Harfoot, 1976). *D. ruminantium* fermentacijom galaktoze dobiva svega 30% energije koju koristi za sintezu amilopektina, za razliku od fermentacije glukoze gdje se 90 % nastalog ATP-a koristi za sintezu amilopektina (Van Hoven i Prins, 1977). Holotrihni protozoa sintetiziraju škrob mehanizmom koji se temelji na djelovanju fosforilaza, sli no kao i u biljaka i životinja (Mould i Thomas, 1958).

#### 4.2.7 Razgradnja amilopektina

*Isotricha* i *Dasytricha* posjeduju amilolitičke polisaharidne depolimeraze i glikozidne hidrolaze, a – amilaza specifična je za oba roda (Mould i Thomas, 1958; Williams, Withers i Coleman, 1984; Mould i Thomas, 1957). Optimalni pH za djelovanje amilaza kod *Isotricha* je 4,8, dok je kod *Dasytricha* optimalni pH 5 i 6 (Mould i Thomas, 1958). Amilaze inhibiraju maltotrioze, ali oba roda mogu razgraditi niže malto – oligosaharide (maltoze, maltotrioze, izomaltoze) iako je *D. ruminantium* uspješnija u tome nego *Isotricha spp.* (Mould i Thomas, 1958). Endogena fermentacija rezervnih polisaharida je važna jer stabilizira period nakon hranjenja. Uklanjanje polisaharida je indirektno povezano s nadutošću u životinja. Nadutost je stanje u kojem životinje ne mogu izbaciti plinove iz probavnog trakta nastale fermentacijom i karakterizirano je potencijalnim porastom tlaka u buragu. U prisutnosti prevelike količine ugljikohidrata holotrihni protozoa propadaju, a raspadanje u normalnim uvjetima nakon hranjenja *in vivo* je iskorišteno kako bi se objasnio postprandijalni pad populacije holotriha. Stanični sadržaj raspadnutih holotriha ima svojstva poput „pjene“ koja uzrokuje nadutost.

#### 4.2.8 Razgradnja proteina

Sposobnost protozoa da asimiliraju proteine u buragu važna je zbog kruženja dušika. Još uvijek nema dovoljno podataka o metabolizmu aminokiselina i proteina u holotriha. U istraživanjima koja su provedena na izmiješanim populacijama holotriha istražuje se metabolizam proteaza (Forsberg, Lovelock, Krumholz i Buchanan – Smith, 1984; Onodera i Kandatsu, 1968; Shinchi i Kandatsu, 1980; Shinchi i Kandatsu, 1981; Shinchi i Kandatsu, 1983) uključujući i metabolizam određenih aminokiselina, npr. metabolizam lizina, triptofana, arginina, prolina, ornitina, citrulina, treonina i metionina te je potvrđena ugradnja i sinteza aminokiselina *de novo*. Uz dodatak amonijaka kod izmiješane populacije trepetljikaša u metabolizmu dušika došlo je do otpuštanja aminokiselina (alanin, prolin, glutamat, lizin, valin), male količine peptida (Onodera i Kandatsu, 1968; Onodera i Kandatsu, 1970; Onodera, Shinjo i Kandatsu, 1974) te produkata razgradnje: L-pipecolinska kiselina, – aminovalerijanska kiselina i 2 – aminobutanonska kiselina. Holotrihnim protozoama za ugradnju aminokiselina u svoje proteine potrebni su ATP, gvanozin 5' – trifosfat i energija i prisutnost nekih kationa, npr.  $Mg^{2+}$ ,  $K^{+}$  i  $Mg^{2+}$ . Ugradnju aminokiselina može inhibirati kloramfenikol. Holotriha su u mogućnosti sintetizirati aminokiseline i iskoristiti one koje su nastale proteolitičkom razgradnjom bakterija ili biljnog materijala. Bakterije kojima se hrane brzo se razgrade i nepromijenjene aminokiseline mogu se direktno ugraditi u proteine praživotinja. Isto tako,

holotriha mogu uzimati i nerazgrađene aminokiseline iz svoje okoline. *D. ruminantium* i *Isotricha spp.* sadrže proteaze, iako se o njima ne zna mnogo.

#### 4.2.9 Razgradnja nukleinskih kiselina

Ne postoje konkretni dokazi o sintezi i razgradnji purina i pirimidina u holotrihnih protozoa. Također i entodiniomorfni trepetljikaši ne mogu sintetizirati purine i pirimidine *de novo*. Holotrihni protozoa unose i iskorištavaju bakterijske nukleinske kiseline koje razgrađuju, a nukleotide ugrađuju u svoje nukleinske kiseline. Također asimiliraju slobodne baze i nukleotide.

#### 4.2.10 Metabolizam lipida

Holotrihni protozoa zadovoljavaju svoje potrebe za lipidima tako što iskorištavaju lipide bakterija i biljnog materijala. Sposobni su *de novo* sintetizirati masne kiseline i fosfolipide koriste i monosaharide i acetat kao prekursor (Harmeyer i Hekimoglu, 1968; Emmanuel 1974; Demeyer i sur., 1978). Dugolanane masne kiseline ugrađuju se direktno u fosfolipide i sterolne estere (De Meyer i sur. 1978; Girard i Hawke 1979). Glavni sterol je kolestanol (Katz i Keeney 1967; Williams i Dinusson 1973) koji se dobiva modifikacijom sterola koji se nalaze u prehrani, a od sterola su prisutni još i stigmastenol i kampestenol. Dugolanane masne kiseline holotrihni protozoa ugrađuju u svoje lipidne komponente. Analiza sastava lipida u trepetljikaša potvrđuje njihovu potencijalnu nutritivnu vrijednost. Lipidna frakcija pripravka izmiješanih protozoa sastoji se od 70% fosfolipida i 30% nefosfolipida. Glavna masna kiselina u lipidima je palmitinska kiselina ( $C_{16:0}$ ), a nešto manje ima stearinske kiseline ( $C_{18:0}$ ), oleinske ( $C_{18:1}$ ), linolna ( $C_{18:2}$ ) i linolenska kiselina ( $C_{18:3}$ ). Fosfolipidi su slični fosfolipidima bakterija. U pripravku miješanih protozoa pronađena je neobična aminokiselina, 2-aminoetilfosforna kiselina koja sadrži ugljik – fosfornu vezu te je povezana sa ceramidom u kompleks koji se naziva ciliatin (Abou Akkada, Mesmer, Fina i Bartley, 1968). Ova kiselina detektirana je kod *E. caudatum* i u miješanom pripravku *Isotricha spp.* u različitim omjerima. U izmiješanoj suspenziji holotrihnih protozoa pokazano je da se dugolanane masne kiseline formiraju iz prekursora kao što su acetat, propionat, butirat, izoleucin (Emmanuel 1974; Saini, Ahuja i Bhatia 1977). Acetat, propionat i butirat uz malonil – koenzim A služe kao začetnice za sintezu proteina. Viviani i Borgatti (1970) su pokazali da holotrihni protozoa mogu ugraditi acetat u linolnu i linolensku kiselinu.

## 5. Važnost protozoa i uloga u metabolizmu rumenu

U inak trepetljikaša na mikrobiološki ekosistem u rumenu, njihovo zdravlje, ishrana i produktivnost tema su mnogih rasprava. Protozoa utječu na dobrobit preživača, produktivnost i na odnos domaćina i njegovog okoliša kroz svoje metaboličke aktivnosti. Unatoč metaboličkoj različitosti i njihovoj velikoj biomasi u buragu, za razliku od bakterija nisu esencijalni za rast i preživljavanje preživača. Čak u nekim određenim uvjetima prehrane defaunizacija, odnosno eliminacija populacije trepetljikaša, može rezultirati pojačanim životinjskim rastom i produktivnošću. Defaunizacija je imala široko primjenu, kako bi se to nije procjenila uloga protozoa u preživača. Uklanjanje protozoa postiže se dodavanjem različitih agensa. Agensi bi u pravilu trebali djelovati na točno specifičnu vrstu protozoa, dok na ostale mikroorganizme ne bi smjeli utjecati, međutim takav agens do danas nije pronađen. Najčešći agensi koji se koriste su kiseline, bakar, sulfati itd. Najinkovitaniji način izostanka protozoa u buragu je izolacija tek rođenih preživača od preživača koji sadrže takvu faunu, kako bi se spriječio njihov kontakt i inokulacija praživotinjama. Trepetljikaši su sposobni preinstiti osnovne prehrambene komponente, koje konzumiraju preživaci, u različite metabolite, te ih kasnije iskorištavaju. U odsutnosti protozoa smanjena je probava organske tvari u buragu. Dokazano je da protozoalna probava zrnaca škroba (Lloyd, Williams, Yarlett i Williams, 1982) i otopljenih celuloza (Heald i Oxford, 1953) povoljnija za preživača, jer alternativna bakterijska fermentacija uzrokuje nakupljanje lakтата u buragu i snižuje se pH što za posljedicu ima nepovoljan učinak – acidozu. Kada životinja konzumira hranu sa većim udjelom ugljikohidrata, protozoa mogu spriječiti acidozu mliječnom kiselinom tako da brzo pretvaraju otopljene ugljikohidrate u amilopektin. Coleman (1979) smatra da se 1/3 konzumiranih ugljikohidrata pretvara u amilopektin. Približno, 1/4 do 1/3 razgradnje biljnih vlakana otpada na trepetljikaše. Ukupna koncentracija i omjer produkata fermentacije je različit u fauniziranih i defauniziranih životinja. Postoje razlike u razini metabolita u krvi kod defauniziranih i fauniziranih životinja. Protozoa su umiješane u etiologiju različitih poremećaja. U preživaču u kojih su prisutne praživotinje utvrđena je smanjena pojavnost dijareje. Smatra se, da se prilikom razgradnje proteina pojačano razgrađuju aminokiseline koje sadrže sumpor i povećavaju dostupnost sumpora u buragu. Sulfati tvore spojeve s bakrom i drugim elementima u tragovima te su netopivi i nedostupni za apsorpciju u vitalnim organima preživača. Trepetljikaši su aktivni i u redukciji nitrata i nitrita i u razgradnji mikotoksina. Doprinosi smanjenju nadutosti u preživaču ispuštanjem plinova i pridonosi povećanju stabilnosti u buragu.

## 6. Literatura:

- Abou Akkada A. R., 1965. The metabolism of ciliate protozoa in relation to rumen function, p. 335-345. In R. W. Dougherty, R. S. Allen, W. Burroughs, N. L. Jacobson, A. Abou Akkada A. R., D. A. Mesmer, L. Fina, C. E. Bartley, 1968. Distribution of 2, aminoethylphosphonic acid in some rumen microorganisms. *J. Dairy Sci.* **51**, 78-81.
- Abou Akkada A. R., A. R. Howard. 1961. The biochemistry of rumen protozoa, 4. Decomposition of pectic substances. *Biochem. J.* **78**, 512-17.
- Bailey R. W., B. H. Howard. 1963. The biochemistry of rumen protozoa. 6. The maltases of *Dasytricha ruminantium*, *Epidinium ecaudatum* (Crawley) and *Entodinium caudatum*. *Biochem. J.* **86**, 446-452.
- Benyahya *et al.*, 1992. Colonisation et dégradation de fragments de paille de blé par les ciliés du rumen *Epidinium*, *Entodinium* et *Isotricha* étude en microscopie électronique, *Ann. Sci. Nat. Zool.* **13**, 103-19.
- Bohaiter *et al.*, 1990. In situ degradation of cellulose fibres by the entodiniomorphid rumen ciliate *Polyplastron multivesiculatum*, *Protoplasma.* **154**, 123-31.
- Bonhomme A., 1988. Endo - 1,4 – – glucanase and endo -1,4 – – xylanase of the ciliate *Epidinium caudatum* free of cellulolytic and hemicellulolytic bacteria, *Jap. J. Vet. Sci.* **50**, 543-7.
- Bonhomme *et al.*, 1986. Endo - 1,4 – – glucanase and – glucosidase of the ciliate *Polyplastron multivesiculatum* free of cellulolytic bacteria, *Can. J. Microbiol.* **32**, 219-25.
- Carnie J. A., J. W. Proteous, 1959. The kinetic properties of invertase obtained from different genera of sheep rumen holotrich protozoa. *Biochem. J.* **73**, 47P – 48P.
- Christie A. O., and J. W. Porteous, 1957. An invertase from the holotrich protozoa of sheep rumen liquor. *Biochem. J.* **67**, 19P.
- Clarke R. T. J., 1977. Protozoa in the rumen ecosystem, p. 251-275. In R. T. J. Clarke and T. Bauchop (ed.), *Microbial ecology of the gut.* Academic Press, Inc., New York.
- Clarke R. T. J., R. E. Hungate, 1966. Culture of the rumen holotrich ciliate *Dasytricha ruminantium* Schuberg. *Appl. Microbiol.* **14**, 340-345.
- Clayet *et al.*, 1992. Chromatographic separation of some cell wall polysaccharide degrading enzymes of the sheep rumen ciliate *Epidinium caudatum*, *Ann. Zootech.* **41**, 81.
- Coleman G. S., 1992. The rate of uptake and metabolism of starch grains and cellulose particles by *Entodinium* species, *Eudiplodinium maggii*, some other entodiniomorphid

- protozoa and natural protozoal populations taken from the ovine rumen, *J. Pp. Bacteriol.* **73**, 507-13
- Coleman G. S., 1986. The distribution of carboxymethyl cellulose between fractions taken from the rumens of sheep containing no protozoa or one of five different protozoal populations, *J. Agric. Sci.* **106**, 121 – 7.
- Coleman G. S., 1986. The amylase activity of 14 species of entodiniomorphid protozoa and the distribution of amylose in rumen digesta fraction of sheep containing no protozoa or one of seven different protozoal populations, *J. Agric. Sci.* **107**, 709-21.
- Coleman G. S., 1985. The cellulase content of 15 species of entodiniomorphid protozoa, mixed bacteria and plant debris isolated from the ovine rumen. *J. Agric. Sci.* **104**, 349-360.
- Coleman G. S., 1979. The role of rumen protozoa in the metabolism of ruminants given tropical feeds. *Trop. Anim. Prod.* **4**, 199-213.
- Coleman G. S., 1978. Rumen entodiniomorphid protozoa, p. 39-54. In A. E. R. Taylor and J. R. Baker (ed.), *Methods of cultivating parasites in vitro*. Academic Press, London.
- Coleman G. S., 1975. In Symbiosis, ed. D. H. Jennings and D. L. Lee, symp. *Soc. Exp. Biol.* **29**, 533-58
- Coleman G. S., 1969. The metabolism of starch, maltose, glucose and some other sugars by the rumen ciliate *Entodinium caudatum*. *J. Gen. Microbiol.* **57**, 303-332.
- Coleman G. S., 1968. The metabolism of bacterial nucleic acid and of free components of nucleic acid by the rumen ciliate *Entodinium caudatum*, *J. Gen. Microbiol.* **54**, 83-96.
- Coleman G. S., 1967. The metabolism of free amino acids by washed suspensions of the rumen ciliate *Entodinium caudatum*, *J. Gen. Microbiol.* **47**, 433-47.
- Coleman G. S., D. J. Reynolds, 1982. The effects of sterols and haemin on the growth of the rumen ciliate *Ophryoscolex caudatus* and some other entodiniomorphid protozoa. *J. Appl. Bacteriol.* **52**, 129-134.
- Coleman G. S., F. J. Hall, 1980. The digestion of grass particles by the rumen cellulolytic protozoa. *Soc. Gen. Microbiol. Q.* **7**, 87.
- Coleman G. S., D. C. Sandford, S. Beahon, 1980. The degradation of polygalacturonic acid by rumen ciliate protozoa. *J. Gen. Microbiol.* **120**, 295-300.
- Coleman G. S., J. I. Laurie, 1977. The metabolism of starch, glucose, amino acids, purines, pyrimidines and bacteria by the rumen ciliate *Polyplastron multivesiculatum*. *J. Gen. Microbiol.* **98**, 29-37.

- Coleman G. S., J. I. Laurie, 1976. The uptake and metabolism of glucose, maltose and starch by the rumen ciliate *Epidinium ecaudatum caudatum*. *J. Gen. Microbiol.* **95**, 364-374.
- Coleman G. S., J. I. Laurie, 1974. The metabolism of starch, glucose, amino acids, purines, pyrimidines and bacteria by three *Epidinium spp.* isolated from the rumen. *J. Gen. Microbiol.* **85**, 244-56.
- Corliss J. O., 2002. Biodiversity and Biocomplexity of the Protists and an Overview of Their Significant Roles in Maintenance of Our Biosphere, *Review Article.* **41**, 199 – 219
- Delfosse-Debusscher J, F. Van Hoof, P. Hellings, D. Thines-Sempoux, 1979. Hydrolytic activities of rumen ciliates. *Ann. Rech. Vet.* **10**, 258-260.
- De Meyer D. I., 1981. Rumen microbes and digestion of plant cell walls. *Agric. Environ.* **6**, 295-337.
- De Meyer D. I., C. Henderson, R. A. Prins, 1978. Relative significance of exogenous and de novo synthesized fatty acids in the formation of rumen microbial lipids in vitro. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**, 24-31.
- Ellis *et al.*, 1991. Influence of CO<sub>2</sub> and low concentrations of O<sub>2</sub> on fermentative metabolism of the rumen entodiniomorphid ciliate *Polyplastron multivesiculatum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 1400-7.
- Emmanuel B., 1974. On the origin of rumen protozoan fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta.* **337**, 404-413.
- Forsberg, C. W., L. K. A. Lovelock, L. Krumholz, J. G. Buchanan-Smith, 1984. Protease activities of rumen protozoa. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**, 101-110.
- Girard V., J. C. Hawke, 1978. The role of holotrichs in the metabolism of dietary linoleic acid in the rumen. *Biochim. Biophys. Acta.* **528**, 17-27.
- Gruby D., Delafond H. M. O., 1843. Recherches sue des animalcules se developant en grand nombre dans l'estomac et dans lesintestines pendant la digestion des animaux herbivores et carnivores. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci., Paris.* **17**, 1304–1308.
- Gutierrez J., 1955. Experiments on the culture and physiology of holotrichs from the bovine rumen. *Biochem. J.* **60**, 516-522.
- Gyulai F., G. S. Coleman, 1991. Some enzymes of the starch degradation pathway in rumen protozoa with special reference to *Ophryoscolex caudatus*. *Acta Protozoal.* **30**, 33-7.
- Harmeyer J., H. Hekimoglu, 1968. Incorporation of acetate by species of protozoa isolated from the rumen. *Zentralbl. Veterinaermed. Reihe A.* **15**, 242-254.

- Heald P. J., A. E. Oxford, 1953. Fermentation of soluble sugars by anaerobic holotrich ciliate protozoa of the genera *Isotricha* and *Dasytricha*. *Biochem. J.* **53**, 506-512.
- Hobson P. N., Stewart N. C., 1997. The Rumen microbial ecosystem. 73 – 119.
- Howard B. H., 1959. The biochemistry of rumen protozoa. 1. Carbohydrate fermentation by *Dasytricha* and *Isotricha*. *Biochem. J.* **71**, 671-675.
- Howard B. H., 1957. The biochemistry of rumen protozoa. 2. Some carbohydrases in cell-free extracts of *Dasytricha* and *Isotricha*. *Biochem. J.* **71**, 675-680.
- Hungate R. E., 1966. The rumen and its microbes. *Academic Press*, London.
- Hungate R. E., 1943. Further experiments on cellulose digestion by protozoa in the rumen of cattle. *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab. Woods Hole.* **84**, 157-63
- Hungate R. E., 1942. The culture of *Eudiplodinium neglectum* with experiments on the digestion of cellulose. *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab. Woods Hole.* **83**, 303-19
- Kamra D. N., 2005. Rumen microbial ecosystem, Special section: Microbial ecosystem, vol. **89**. No. 1, 124 – 135
- Katz I., M. Keeney, 1967. The lipids of some rumen holotrich protozoa. *Biochim. Biophys. Acta.* **144**, 102-112.
- Lloyd D., J. Williams, N. Yarlett, A. G. Williams, 1982. Oxygen affinities of the hydrogenosome-containing protozoa *Tritrichomonas foetus* and *Dasytricha ruminantium*, and two aerobic protozoa determined by bacterial bioluminescence. *J. Gen. Microbiol.* **128**, 1019-1022.
- Mould D. L., G. J. Thomas, 1958. The enzymic degradation of starch by holotrich protozoa from sheep rumen. *Biochem. J.* **69**, 327-337.
- Nagasawa T, et al., 1994. High molecular weight protease in rumen ciliate protozoa. *Biosci. Biotech.* **58**, 2020-3.
- Ogimoto K, S. Imai, 1981. Atlas of rumen microbiology. *Japan Scientific Societies Press, Tokyo.*
- Onodera R., T. Shinjo, M. Kandatsu, 1974. Formation of lysine from α,E-diaminopimelic acid contained in rumen bacterial cell walls by rumen ciliate protozoa. *Agric. Biol. Chem.* **38**, 921-926.
- Onodera R., M. Kandatsu, 1972. Conversion of lysine to pipercolic acid by rumen ciliate protozoa. *Agric. Biol. Chem.* **36**, 1989-1995.
- Onodera R., M. Kandatsu, 1970. Amino acid and protein metabolism of rumen ciliate protozoa. 4. Metabolism of casein. *Jpn. J. Zootechnol. Sci.* **41**, 307-313.



- Onodera R., M. Kandatsu, 1968. Amino acid and protein metabolism of rumen ciliate protozoa. 1. Consumption of amino acids. *Jpn. J. Zootechnol. Sci.* **39**, 206-211.
- Owen R. W., G. S. Coleman, 1977. The uptake and utilization of bacteria, amino acids and carbohydrate by the rumen ciliate *Entodinium longinucleatum* in relation to the sources of amino acids for protein synthesis. *J. Appl. Bacteriol.* **43**, 67-74.
- Princ Habdija B., 2006. Carstvo: Protista, Protozoa (praživotinje), interna skripta
- Prins R. A., W. Van Hoven. 1977. Carbohydrate fermentation by the rumen ciliate *Isotricha prostoma*. *Protistologica*. **13**, 549-556.
- Purser D. B., H. H. Weiser, 1963. Influence of time of addition of antibiotic on the life of rumen holotrich protozoa in vitro. *Nature (London)* **200**, 290.
- Ruppert E. E., R. S. Fox, R. D. Barnes, 2006. Invertebrate zoology. 22 – **24**:30 – 43
- Saini R, S. P. Ahuja, I. S. Bhatia, 1977. In vitro incorporation of 2-14C-acetate, 1-4C-butyrate, U-4C-glucose and 32P-disodium hydrogen phosphate into protozoal lipids. *Zentralbl. Veterinaermed. Reihe A.* **24**, 580-590.
- Shinchi S., M. Kandatsu, 1983. On some properties of extracellular proteolytic activity of rumen ciliate protozoa. *Nippon Chikusan Gakkai Ho.* **54**, 290-296.
- Shinchi S., M. Kandatsu, 1981. On some properties of extracellular and intracellular proteolytic activity of rumen ciliate protozoa. *Nippon Chikusan Gakkai Ho.* **52**, 861-868.
- Shinchi S., M. Kandatsu, 1980. The extracellular proteolytic activity of rumen ciliate protozoa. 1. Proteolytic activity of cell free rumen liquid, incubation medium of rumen ciliate protozoa and their extracts. *Azabu Daigaku Juigakubu Kenkyu Hokoku.* **1**, 47-53.
- Sugden B., A. E. Oxford, 1952. Some cultural studies with holotrich ciliate protozoa of the sheep's rumen. *J. Gen. Microbiol.* **7**, 145-153.
- Šperanda M., 2008. Anatomija i fiziologija kardiovaskularnog sustava, limfnog sustava, probavnog sustava domaćih životinja (odabrana poglavlja), interna skripta
- Thomas G. J., 1960. Metabolism of the soluble carbohydrates of grasses in the rumen of sheep. *J. Agric. Sci.* **54**, 360-372.
- Valdez R. E., F. J. Alvarez, H. M. Ferreira, F. Guerra, J. Lopez, A. Priego, T. H.
- Blackburn R. A. Leng, T. R. Preston, 1977. Rumen function in cattle given sugar cane. *Trop. Anim. Prod.* **2**, 260-272.
- Van Hoven W., R. A. Prins, 1977. Carbohydrate fermentation by the rumen ciliate *Dasytricha ruminantium*. *Protistologica*. **13**, 599-606.

- Viviani R., 1970. Metabolism of long-chain fatty acids in the rumen. *Adv. Lipid Res.* **8**, 267-346.
- Williams A. G., G. S. Coleman, 1985. Hemicellulosedegrading enzymes in rumen ciliate protozoa. *Curr. Microbiol.* **12**, 85-90.
- Williams A. G., S. E. Withers, G. S. Coleman, 1984. Glycoside hydrolases of rumen bacteria and protozoa. *Curr. Microbiol.* **10**, 287-294.
- Williams A. G., C. G. Harfoot, 1976. Factors affecting the uptake and metabolism of soluble carbohydrates by the rumen ciliate *Dasytricha ruminantium* isolated from ovine rumen contents by filtration. *J. Gen. Microbiol.* **96**, 125-136.
- Williams P. P., W. E. Dinusson, 1973. Amino acid and fatty acid composition of bovine ruminal bacteria and protozoa. *J. Anim. Sci.* **36**, 151-155.
- William D. Taylor. 2001. Protozoa, *Academic Press*, 43 – 71
- Yarlett N., A. C. Hann, D. Lloyd, A. G. Williams, 1981. Hydrogenosomes in the rumen protozoon *Dasytricha ruminantium*. *Schuberg. Biochem. J.* **200**, 365-372.
- Yarlett N., A. C. Hann, D. Lloyd, A. G. Williams, 1983. Hydrogenosomes in a mixed isolate of *Isotricha prostoma* and *Isotricha intestinalis* from ovine rumen contents. *Comp. Biochem. Physiol. B* **74**, 357-364.
- <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/480488/protozoan/32615/Evolution-and-paleontology>
- [http://www.pfos.hr/~dsego/ispitna\\_literatura/skripta.pdf](http://www.pfos.hr/~dsego/ispitna_literatura/skripta.pdf)
- <http://www.springerlink.com/content/p8755282413k720h>
- <http://bs.wikipedia.org/wiki/Protozoa>
- <http://hr.wikipedia.org/wiki/Protista>

## 7. Sažetak

Uloga protozoa u metabolizmu i probavi preživača je neupitno velika, iako još uvijek nedovoljno istražena unato brojnim istraživanjima i objavljenim znanstvenim radovima. Budući da praživotinje nisu esencijalne u buragu, potrebno je provesti dodatna istraživanja s obzirom na mnogo nepoznanica u biokemijskim procesima i ponašanju ove jedinstvene grupe mikroorganizama. Mikrobiološki ekosustav probavnog sustava, odnosno samog buraga je složena zajednica različitih mikrobioloških skupina koje žive u simbiozi s domaćinom, djeluju sinergistički u biokonverziji hrane bogate celulozom u masne kiseline koje služe kao glavni izvor energije za domaćina. Sinergizam i antagonizam među različitim grupama mikroorganizama ili čak među rodovima iste skupine je toliko velik i složen da je teško odrediti ulogu određenih skupina u buragu. Takav mikrobiološki ekosustav pridonosi stabilnosti u fermentaciji i razgradnji čestica hrane, te nedvojbeno pridonosi općem dobrom stanju domaćina. Mikroorganizmi u buragu općenito su bolje proučeni u domaćih životinja, nego u divljih životinja.

## 8. Summary

The role of protozoa in metabolism and ruminant digestion is certainly huge although still not enough explored despite, present research and published studies. Microbial ecosystem of digestive system with respect rumen itself is complex community of different microbiologic groups which lives in symbiosis with host, works synergistically in cellulose rich food bioconversion into fat acids, which are used as main energy resource for host. Synergism and antagonism between different groups of microorganism or even different genus from same groups is so enormous and complex that it is very hard to determine the role of certain groups in rumen. Such microbiologic ecosystem contributes to stability in fermentation and degradation of food particles and undoubtedly conduce general well being of host. Generally, the microorganisms in rumen are better studied in household than wild animals.

