

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Helena ŠEME

**ODZIV IZBRANIH SEVOV *Lactobacillus plantarum*  
NA KISLO OKOLJE IN STACIONARNO FAZO  
RASTI**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Helena ŠEME

**ODZIV IZBRANIH SEVOV *Lactobacillus plantarum* NA KISLO  
OKOLJE IN STACIONARNO FAZO RASTI**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**RESPONSE OF SELECTED *Lactobacillus plantarum* STRAINS TO  
ACIDIC ENVIRONMENT AND TO STATIONARY GROWTH  
PHASE**

DISSERTATION THESIS

Ljubljana, 2015

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa 31. Seje Komisije za doktorski študij Univerze v Ljubljani z dne 19. 9. 2012 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Bioznanosti, znanstveno področje biotehnologija. Za mentorico je bila imenovana viš. znan. sod. Bojana Bogovič Matijašić.

Raziskovalno delo je bilo opravljeno v podjetju Acies Bio d.o.o., qPCR analize so bile opravljene na Katedri za mlekarstvo, Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, liofilizacija pa v Laboratoriju za tehnologijo antibiotikov, encimov, pribiotikov in starterskih kultur na Fakulteti za živilsko tehnologijo in biotehnologijo v Zagrebu (Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura, Prehrambeno-Biotehnički fakultet, Sveučilište u Zagrebu).

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Sonja Smole Možina  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Hrvoje Petković  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Jagoda Šušković  
Univerza v Zagrebu, Prehrambeno-Biotehnički fakultet

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reprodukcijo ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Helena ŠEME

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dd
DK	UDK 579(043.3)=163.6
KG	mikrobiologija/laktobacili/ <i>Lactobacillus plantarum</i> /kislo okolje/stacionarna faza rasti
KK	AGRIS /
AV	ŠEME, Helena, univ. dipl. bioteh.
SA	BOGOVIČ MATIJAŠIĆ, Bojana (mentorica)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študij Bioznanosti, področje biotehnologije
LI	2015
IN	ODZIV IZBRANIH SEVOV <i>Lactobacillus plantarum</i> NA KISLO OKOLJE IN STACIONARNO FAZO RASTI
TD	Doktorska disertacija
OP	XIII, 123 str., 6 pregl., 47 sl., 175 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Namen doktorskega dela je bil raziskati vpliv stresnih razmer v kislem okolju in v stacionarni fazi rasti na izbrane seve <i>Lactobacillus plantarum</i> . Tem vrstam stresa so probiotiki izpostavljeni v svojem naravnem okolju, med industrijskim gojenjem in po zaužitju. Zanimal nas je tudi pojav fenotipa GASP – prednost rasti v stacionarni fazi (ang. »Growth Advantage in Stationary Phase«), ki pri laktobacilih še ni bil opisan, ter pojav navzkrižne odpornosti proti različnim stresom. Pri šestih sevih <i>L. plantarum</i> smo opazili velike razlike v sposobnosti rasti na štirih različnih sladkorjih. Med dolgotrajno izpostavljenostjo stacionarni fazi rasti so se pokazale tudi razlike med posameznimi bakterijami v kulturi, saj so nekatere izgubile sposobnost rasti na določenem sladkorju, najpogosteje na lakozi in rafinozi, ali pa so rasle slabše. V poskusih GASP z mešanimi kulturami <i>E. coli</i> K17 in <i>L. plantarum</i> smo opazili sobivanje. Pri tem ima korist predvsem <i>L. plantarum</i> , ki v mešani kulturi preživi tudi do 30 dni v večjem številu, kot bi v čisti kulturi. K boljšemu preživetju prispeva, razen višjega pH, ob sočasni kultivaciji tudi še neznan mehanizem, ki je povezan s fizičnim stikom med bakterijami dveh vrst. Pri poskusih z mešanimi kulturami <i>E. faecalis</i> S1-17 in <i>L. plantarum</i> smo ugotovili večje razlike med sevi. Nekateri so uspeli popolnoma prerasti enterokoke ( <i>L. plantarum</i> KR3 in SF9). Pri sevu <i>L. plantarum</i> 299v je pokazala to sposobnost samo 30 dni starja kultura, pri čemer večjih genetskih premostitev nismo opazili. Seva M5 in KR6 sta izkazala dobro odpornost proti nizkemu pH (2,3 oz. 2,4) in sposobnost prilagoditve na nizek pH. Sev KR6 se je izkazal za odpornejšega proti nizkemu pH, pa tudi prilagoditev je imela manj večji učinek. V izražanju štirih izbranih genov je bila med sevoma največja razlika v izražanju gena <i>cfa1</i> , katerega izražanje je bilo pri sevu KR6 več kot 3-krat povečano. Seva <i>L. plantarum</i> M5 in KR6 sta zelo občutljiva za žolčne soli, pri čemer prilagoditev na nizek pH ni pomagala, so pa bolje preživele celice v stacionarni fazi rasti. Pri sevu M5 je na preživetje dodatno pozitivno vplivala dolgotrajna izpostavitev stacionarni fazi rasti. Prilagoditev na nizek pH je zaščitila celice pri liofilizaciji, če smo kot zaščitno sredstvo uporabili prebiotik inulin. Prilagoditev na nizek pH celic ni zaščitila pred nizkimi temperaturami (4 °C) in oksidativnim stresom.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd  
DC UDK 579(043.3)=163.6  
CX microbiology/lactobacilli/*Lactobacillus plantarum*/acidic environment/stationary growth phase  
CC AGRIS /  
AU ŠEME, Helena  
AA BOGOVIČ MATIJAŠIĆ, Bojana (supervisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral Programme in Biosciences, Field: Biotechnology  
PY 2015  
TI RESPONSE OF SELECTED *Lactobacillus plantarum* STRAINS TO ACIDIC ENVIRONMENT AND TO STATIONARY GROWTH PHASE  
DT Doctoral Dissertation  
NO XIII, 123 p., 6 tab., 47 fig., 175 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB The aim of this study was to investigate effect of stress conditions in acidic environment and stationary growth phase on selected strains of *Lactobacillus plantarum*. Probiotics are exposed to these types of stress in their natural environment, during industrial fermentation and after consumption. We were also interested in the occurrence of the phenotype GASP (Growth Advantage in Stationary Phase), which has not been described in lactobacilli yet. 6 different *L. plantarum* strains showed vast diversity in their ability to grow on 4 different sugars. During the prolonged exposures to stationary phase, there was also diversity among individual bacteria in the culture, as some of them lost the ability to grow on specific sugar, usually lactose and raffinose, or the growth was diminished. In GASP experiments with mixed cultures of *E. coli* K17 and *L. plantarum*, we observed coexistence which was beneficial mostly for *L. plantarum*, which survived in mixed cultures up to 30 days in greater numbers than in pure culture. Beside higher pH, an unknown mechanism, associated with physical contact between bacteria of two species, contributed to for the better survival in cocultures. In experiments with mixed cultures of *E. faecalis* S1-17 and *L. plantarum* greater differences among strains were observed. Some strains showed ability to completely overgrow enterococci (*L. plantarum* KR3 and SF9). In the case of *L. plantarum* 299v, only 30 days-old culture showed strong GASP phenotype, while no genetic differences were observed. Strains *L. plantarum* M5 and KR6 proved to be acid resistant (pH 2,3 or 2,4) and were also able to adapt to low pH. Strain KR6 was found to be more acid resistant and the adaptation had greater effect on this strain. Expression study of 4 selected genes showed the main difference in expression of gene *cfa1* which was more than 3-times overexpressed in strain KR6. Strains KR6 and M5 were sensitive to bile salts. Acid adaptation did not improve the resistance, while stationary growth phase did. In strain M5 the additional positive effect of prolonged stationary phase exposure was also observed. Acid adaptation protected the cells during lyophilisation, when prebiotic inulin was used as protection agent. Acid adaptation, however, did not protect the cells against stress of low temperatures (4 °C) or oxidative stress.

## KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	str. III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
1.1 OPREDELITEV RAZISKOVALNEGA PROBLEMA	1
1.2 RAZISKOVALNE HIPOTEZE	2
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	<b>3</b>
2.1 BAKTERIJE IZ RODU <i>LACTOBACILLUS</i>	3
2.1.1 Splošne lastnosti laktobacilov	3
2.1.2 Vrsta mlečnokislinskih bakterij <i>Lactobacillus plantarum</i>	5
2.1.2.1 Variabilnost vrste <i>L. plantarum</i>	6
2.1.3 Tradicionalna uporaba laktobacilov v prehrani	7
2.1.4 Laktobacili kot probiotiki	8
2.1.4.1 Pomembne lastnosti kandidatnih sevov za probiotike	9
2.1.4.2 Bakterije vrste <i>Lactobacillus</i> kot probiotiki	12
2.1.4.3 Vrsta <i>Lactobacillus plantarum</i> kot probiotik	12
2.2 ODZIV BAKTERIJ NA STRESNE RAZMERE	13
2.2.1 Stres, fiziološki in biotehnološki pomen	13
2.2.2 Odziv laktobacilov na različne stresne dejavnike	16
2.2.2.1 Vpliv nizkih temperatur	16
2.2.2.2 Vpliv liofilizacije	16
2.2.2.3 Vpliv oksidativnega stresa	18
2.2.2.4 Vpliv kisle vrednosti pH	19
2.2.2.5 Vpliv žolčnih soli	20
2.2.2.6 Vpliv stresa prehoda skozi prebavila	22
2.2.3 Navzkrižna odpornost proti stresnim dejavnikom	22
2.3 PREDNOST RASTI V STACIONARNI FAZI – GASP	23
2.3.1 Razmere v stacionarni fazi rasti	23
2.3.2 Prednost rasti v stacionarni fazi rasti in njen evolucijski pomen	24
2.3.3 Mutacije, ki omogočajo GASP	26
2.3.4 Dosedanja spoznanja o pojavu GASP	27
<b>3 MATERIAL IN METODE</b>	<b>29</b>
3.1 MATERIALI	29
3.1.1 Gojišča in raztopine	29
3.1.1.1 Raztopine	29
3.1.1.2 Uporabljena gojišča	29
3.1.2 Antibiotiki in indikatorji	30
3.1.3 Bakterijski sevi	31
3.2 METODE	31
3.2.1 Osamitev in ugotavljanje lastnosti novih sevov laktobacilov	31

3.2.1.1	Osamitev novih sevov, gojenje in shranjevanje	31
3.2.1.2	Izolacija genomske DNK in določanje vrste s sekvenciranjem dela gena za 16S rRNK	31
3.2.1.3	Primerjava sevov z gelsko elektroforezo v pulzirajočem polju (PFGE)	33
3.2.1.4	Odpornost proti antibiotikom	33
<b>3.2.2</b>	<b>Stres, povezan s stacionarno fazo rasti</b>	34
3.2.2.1	Pridobitev kultur v stacionarni fazi rasti	34
3.2.2.2	Rast na različnih gojiščih	35
3.2.2.3	Postavitev GASP poskusov	35
3.2.2.4	Preživetje v simuliranih razmerah prebavil	36
<b>3.2.3</b>	<b>Odpornost proti nizkim vrednostim pH</b>	37
3.2.3.1	Testiranje odpornosti proti nizkim vrednostim pH	37
3.2.3.2	Prilagoditev na kisel pH	37
3.2.3.3	Izolacija RNK, obdelava z DNazo in prepis v cDNA	37
3.2.3.4	PCR v realnem času (qPCR)	38
3.2.3.5	Ugotavljanje živosti in integritete celične membrane	39
<b>3.2.4</b>	<b>Poskusi za ugotavljanje navzkrižne odpornosti</b>	40
3.2.4.1	Odpornost proti žolčnim solem	40
3.2.4.2	Preživetje v simuliranih razmerah prebavil ob prilagoditvi na nizek pH	40
3.2.4.3	Ugotavljanje preživetja liofilizacije ob prilagoditvi na nizek pH	41
3.2.4.4	Ugotavljanje preživetja nizkih temperatur ob prilagoditvi na nizek pH	41
3.2.4.5	Ugotavljanje odpornosti proti vodikovemu peroksidu ob prilagoditvi na nizek pH	41
<b>3.2.5</b>	<b>Statistična obdelava rezultatov</b>	41
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b>	42
4.1	IZBOR, KARAKTERIZACIJA IN PRIMERJAVA SEVOV <i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i>	42
4.1.1	Določanje vrste pri sevih <i>L. plantarum</i> KR3 in <i>L. plantarum</i> KR6	42
4.1.2	Primerjava makrorestrikcijskih profilov različnih sevov <i>L. plantarum</i> z metodo PFGE	43
4.1.3	Sposobnost rasti izbranih sevov <i>L. plantarum</i> na različnih sladkorjih kot glavnih virih ogljika	44
4.1.4	Odpornost izbranih sevov <i>L. plantarum</i> proti antibiotikom	45
4.2	STRES STACIONARNE FAZE RASTI	47
4.2.1	Sevi, pridobljeni v dolgotrajni stacionarni fazi	47
4.2.2	Rast sevov iz dolgotrajne stacionarne faze na gojiščih z različnimi sladkorji kot glavnimi viri ogljika	47
4.2.3	Prednost rasti izbranih sevov <i>L. plantarum</i> pred <i>E. coli</i> in <i>E. faecalis</i> v stacionarni fazi – GASP	50
4.2.3.1	Mešane kulture seva <i>Escherichia coli</i> K17 in izbranih sevov <i>L. plantarum</i>	51
4.2.3.2	Mešane kulture seva <i>Enterococcus faecalis</i> S1-17 in izbranih sevov <i>Lactobacillus plantarum</i>	63
4.2.4	Restrikcijski profil kultur seva <i>L. plantarum</i> 299v iz bakterij, izpostavljenih dolgotrajni stacionarni fazi	73
4.2.5	Preživetje kultur stacionarne faze v simuliranih razmerah prebavil	74
4.3	STRES, POVEZAN Z NIZKIM pH	75
4.3.1	Odpornost izbranih sevov <i>L. plantarum</i> proti nizkemu pH	75

<b>4.3.2</b>	<b>Prilagoditev na nizek pH</b>	<b>77</b>
<b>4.3.3</b>	<b>Spremembe v izražanju genov <i>atpA</i>, <i>cfaI</i>, <i>hisD</i> in <i>mleS</i> ob izpostavitvi izbranih sevov <i>L. plantarum</i> nizkemu pH</b>	<b>79</b>
<b>4.3.4</b>	<b>Vpliv nizkega pH na preživetje in integriteto celične membrane</b>	<b>80</b>
<b>4.3.5</b>	<b>Navzkrižna odpornost sevov <i>L. plantarum</i>, prilagojenih na nizek pH, na druge dejavnike stresa</b>	<b>82</b>
4.3.5.1	Vpliv prilagoditve na nizek pH na odpornost proti simuliranim razmeram prebavil	82
4.3.5.2	Vpliv prilagoditve na nizek pH na odpornost proti žolčnim solem	84
4.3.5.3	Vpliv prilagoditve na nizek pH na preživetje med liofilizacij	85
4.3.5.4	Vpliv prilagoditve na nizek pH na preživetje pri nizkih temperaturah	87
4.3.5.5	Vpliv prilagoditve na nizek pH na odpornost proti oksidativnemu stresu	90
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	<b>93</b>
5.1	PRIMERJAVA RAZLIČNIH SEVOV <i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i>	93
5.2	VPLIV STRESNIH RAZMER STACIONARNE FAZE RASTI NA IZBRANE SEVE <i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i>	93
<b>5.2.1</b>	<b>Sočasna kultivacija sevov <i>L. plantarum</i> z <i>E. coli</i> ali <i>E. faecalis</i></b>	<b>94</b>
5.3	ODPORNOST IN PRILAGODITEV IZBRANIH SEVOV NA NIZEK pH	96
5.4	NAVZKRIŽNA ODPORNOST	98
<b>5.4.1</b>	<b>Preživetje izbranih sevov v simuliranih razmerah prebavilih</b>	<b>98</b>
<b>5.4.2</b>	<b>Preživetje bakterijskih celic, prilagojenih na nizek pH, med liofilizacijo</b>	<b>100</b>
5.4.3	Temperurni in oksidativni stres	100
5.5	SKLEPI	101
<b>6</b>	<b>POVZETEK (SUMMARY)</b>	
<b>102</b>		
6.1	POVZETEK	102
6.2	SUMMARY	104
<b>7</b>	<b>VIRI</b>	<b>107</b>
<b>ZAHVALA</b>		

## KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Pregl. 1: Seznam uporabljenih antibiotikov in indikatorjev	30
Pregl. 2: Bakterijski sevi in njihove lastnosti	31
Pregl. 3: Seznam začetnih oligonukleotidov za vrsto <i>L. plantarum</i> , uporabljenih v reakcijah qPCR	38
Pregl. 4: Reakcijski parametri za qPCR	38
Pregl. 5: Odpornost šestih izbranih sevov <i>L. plantarum</i> proti devetim antibiotikom, ugotovljena z E-test®	46
Pregl. 6: Koncentracija bakterij (KE/ml), pridobljenih po dolgotrajni inkubaciji v stacionarni fazi	47

## KAZALO SLIK

	str.
Sl. 1: Filogenetsko drevo, ki prikazuje razmerja med nukleotidnimi zaporedji 16S rDNK izbranih vrst <i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i> in <i>Paralactobacillus selangorensis</i> (Dellaglio in Felis, 2005: 30)	4
Sl. 2: Shematski prikaz homofermentativnega in heterofermentativnega metabolizma mlečnokislinskih bakterij (Axelsson, 2004: 20)	5
Sl. 3: Sestava, naloge in poselitev črevesja odraslega (Iannitti in Palmieri, 2010: 702)	8
Sl. 4: Shema postopka pridobitve probiotika ter kriterijev, ki jim mora sev zadoščati	9
Sl. 5: Povezave med fiziološkimi stanji celice ob izpostavitvi stresu (Yousef in Courtney, 2003: 3).	14
Sl. 6: Shematski prikaz različnih vrst stres, ki so jim izpostavljene starterske in probiotične kulture med industrijskim procesom (Bron in sod., 2011: 370).	15
Sl. 7: Spremembe temperature in tlaka med tremi fazami liofilizacije (Common misconceptions in...2012)	17
Sl. 8: Kemijska struktura glavnih žolčnih kislin v človeškem črevesju (Begley in sod., 2005: 628)	21
Sl. 9: Rastna krivulja za nesporulirajoče bakterije s petimi fazami rasti (Bačun-Družina in sod., 2011: 14).	25
Sl. 10: Mehanizmi, ki zmanjšujejo učinkovitost popravljanja DNK in omogočajo povečanje števila mutacij v stresnih razmerah (Kivisaar, 2003: 817)	27
Sl. 11: Štirje možni izidi poskusa GASP	28
Sl. 12: Ugotavljanje antibiotične odpornosti s pomočjo E-testa®	34
Sl. 13: Ugotavljanje števila preživelih bakterij <i>L. plantarum</i> s štetjem KE na gojišču MRS	35
Sl. 14: Primer izgleda kolonij <i>L. plantarum</i> (modre kolonije) in <i>E. faecalis</i> S1-17 (bele kolonije) na gojišču MRS z laktozo in X-gal	36
Sl. 15: Primer umeritvene krivulje, ki jo dobimo s fluorescenčno spektroskopijo (Molecular Probes, 2004: 4)	40
Sl. 16: Poravnavo delnih 16S rRNK sekvenc sevov KR3 in KR6 s sekvencama iz referenčnega genoma seva <i>L. plantarum</i> WCFS1	43

Sl. 17: Makrorestrikcijski profil PFGE izbranih sevov <i>L. plantarum</i> po restikciji s <i>SfiI</i>	44
Sl. 18: Krivulje rasti <i>L. plantarum</i> KR3, KR6, M5, SF9, B-4496 in 299v v gojišču brez sladkorja, z glukozo, fruktozo, rafinozo ali laktozo	45
Sl. 19: Rast seva KR6 in kultur iz bakterijskih celic, izpostavljenih dolgotrajni stacionarni fazi, v različnih gojiščih	48
Sl. 20: Sposobnost rasti <i>L. plantarum</i> KR3, KR6, SF9, 299v in M5 v prisotnosti različnih sladkorjev	50
Sl. 21: Rastne krivulje v mešanih kulturah sevov <i>L. plantarum</i> 299v in <i>E. coli</i> K17	53
Sl. 22: Vrednost pH med kultivacijo mešanih kultur <i>L. plantarum</i> 299v in <i>E. coli</i> K17	54
Sl. 23: Rastne krivulje mešanih kultur sevov <i>L. plantarum</i> KR6 in <i>E. coli</i> K17	56
Sl. 24: Vrednost pH med kultivacijo mešanih kultur <i>L. plantarum</i> KR6 in <i>E. coli</i> K17	57
Sl. 25: Rastne krivulje mešanih kultur <i>L. plantarum</i> KR6 in <i>E. coli</i> K17, ločenih z membrano ali ne	59
Sl. 26: Rastne krivulje mešanih kultur <i>L. plantarum</i> KR3 in <i>E. coli</i> K17	60
Sl. 27: Rastne krivulje mešanih kultur <i>L. plantarum</i> SF9 in <i>E. coli</i> K17	61
Sl. 28: Rastne krivulje mešanih kultur <i>L. plantarum</i> M5 in <i>E. coli</i> K17	62
Sl. 29: Rastne krivulje mešanih kultur <i>L. plantarum</i> KR6 in <i>E. faecalis</i> S1-17	65
Sl. 30: Rastne krivulje mešanih kultur <i>L. plantarum</i> M5 in <i>E. faecalis</i> S1-17	66
Sl. 31: Rastne krivulje mešanih kultur <i>L. plantarum</i> KR3 in <i>E. faecalis</i> S1-17	68
Sl. 32: Rastne krivulje mešanih kultur <i>L. plantarum</i> SF9 in <i>E. faecalis</i> S1-17	69
Sl. 33: Vrednost pH med kultivacijo mešanih kultur <i>L. plantarum</i> SF9 in <i>E. faecalis</i> S1-17	70
Sl. 34: Rastne krivulje mešanih kultur <i>L. plantarum</i> 299v in <i>E. faecalis</i> S1-17	72
Sl. 35: Vrednost pH med kultivacijo mešanih kultur <i>L. plantarum</i> 299v in <i>E. faecalis</i> S1-17	73

Sl. 36: Makrorestrikcijski profil PFGE seva <i>L. plantarum</i> 299v po restrikciji s <i>SfiI</i>	74
Sl. 37: Preživetje sevov <i>L. plantarum</i> KR6, M5 in 299v, odvzeteih v dolgotrajni stacionarni fazi, v simuliranih razmerah prebavil	75
Sl. 38: Vpliv izpostavitve zelo nizkemu pH (od 2,1 do 2,6) na viabilnost sevov KR6 in M5 po 1,5 oziroma 3 urah inkubacije	77
Sl. 39: Vpliv prilagoditve na nizek pH pri različnih vrednosti (pH 2-7) na preživetje sevov <i>L. plantarum</i> KR6 in <i>L. plantarum</i> M5 med inkubacijo pri letalno nizkem pH (pH 2)	78
Sl. 40: Spremembe izražanja štirih izbranih genov ( <i>atpA</i> , <i>cfa1</i> , <i>mleS</i> , <i>hisD</i> ) pri sevih <i>L. plantarum</i> KR6 in M5 po 30 min inkubacije pri prilagoditvenem pH	80
Sl. 41: Preživetje sevov KR6 in M5 pri nizkem pH, ugotovljeno z metodo diferencialnega barvanja (Live/Dead® Baclight™) in štetjem na ploščah	81
Sl. 42: Preživetje sevov <i>L. plantarum</i> M5 in KR6 v simuliranih gastrointestinalnih razmerah	83
Sl. 43: Preživetje sevov KR6 in M5 med 120 min inkubacijo v prisotnosti žolčnih soli v različnih koncentracijah	85
Sl. 44: Preživetje sevov KR6 in M5 med liofilizacijo, izraženo v % preživetja, v odvisnosti od uporabljenega zaščitnega sredstva	87
Sl. 45: Preživetje sevov <i>L. plantarum</i> KR6 in M5 med izpostavitvijo nizkim temperaturam (4 °C)	89
Sl. 46: Vrednost pH med 60-dnevno izpostavitvijo sevov <i>L. plantarum</i> KR6 in M5 nizkim temperaturam (4 °C)	90
Sl. 47: Preživetje sevov <i>L. plantarum</i> KR6 in M5 med izpostavitvijo vodikovemu peroksidu	92

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

2TY	Gojišče (ang. »tryptone yeast extract medium«)
A <sub>280</sub>	Absorbanca pri 280 nm
AM	Ampicilin
ATCC	Ameriška zbirka tipskih kultur (ang. »American Type Culture Collection«)
ATP	Adenozin trifosfat
BLAST	Osnovno programsko orodje za iskanje in poravnava zaporedij (ang. »Basic Local Alignment Search Tool«)
bp	Bazni par
BSH	Hidrolaza žolčnih soli (ang. »Bile salt hydrolase«)
cDNK	Komplementarna DNK
CL	Kloramfenikol
CM	Klindamicin
CSP	Proteini ohladitvenega šoka (ang. »cold shock proteins«)
dH <sub>2</sub> O	Deionizirana voa
DMSO	Dimetilsulfoksid
DNaza	Deoksiribonukleaza
DNK	Deoksiribonukleinska kislina
dNTP	Deoksinukleotid trifosfat
EDTA	Etilen diaminotetraocetna kislina
EFSA	Evropska agencija za varnost hrane
EM	Eritromicin
EMP	Emden-Meyerhof-Parnasova pot glikolize
GASP	Prednost rasti v stacionarni fazi
GM	Gentamicin
GRAS	Splošno prepoznani kot varni (ang. »generally regarded as safe«)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Vodikov peroksid
HCl	Klorovodikova kislina
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kislina
IPTG	Izopropil-β-D-tiogalaktopiranozid
kb	Kilobaza
kDa	Kilodalton
KE	Kolonijska enota
KM	Kanamicin
MIK	Minimalna inhibitorna koncentracija
MKB	Mlečnokislinske bakterije
MOPS	3-(N-morpholino)propansulfonska kislina
mRNK	Informacijska ribonukleinska kislina (ang. »messenger RNA«)
MRS	Gojišče De Man, Rogosa, Sharp
NaCl	Natrijev klorid
NaOH	Natrijev hidroksid
OD	Optična gostota
PCR	Verižna reakcija s polimerazo
PFGE	Elektroforeza v pulzirajočem električnem polju
qPCR	Verižna reakcija s polimerazo v realnem času
QPS	ang. »Qualified Presumption of Safety«
RNaza	Ribonukleaza

RNK	Ribonukleinska kislina
rpm	Obrati na minuto
rRNK	Ribosomska ribonukleinska kislina (ang. »ribosomal RNA)
SM	Streptomycin
TC	Tetraciklin
Tris	2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiol
UV	Ultravijolična svetloba
VA	Vankomicin
WT	Divji tip
X-gal	5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopiranozid

## 1 UVOD

### 1.1 OPREDELITEV RAZISKOVALNEGA PROBLEMA

Vrsto *Lactobacillus plantarum* uvrščamo v rod *Lactobacillus*, ki je eden izmed rodov po Gramu pozitivnih mlečnokislinskih bakterij (MKB). MKB so po Gramu pozitivne bakterije, ki med fermentacijo ogljikovih hidratov proizvajajo predvsem mlečno kislino. Tako kot večina MKB laktobacili veljajo kot varni za prehrano, zato imajo status GRAS (ang. »generally regarded as safe«). Vrsta *L. plantarum* je ena izmed najbolj razširjenih, saj jo najdemo v številnih ekoloških nišah, od zelenjave, mesa, rib, fermentiranih mlečnih izdelkih do prebavnega trakta ljudi in živali (Siezen in van Hylckama Vlieg, 2011). To lahko pripišemo velikosti genoma, ki presega 3 Mb in je tako en izmed večjih genomov med MKB (Kleerebezem in sod., 2003). Številni sevi te vrste imajo tudi probiotične lastnosti (Ducrotté in sod., 2012; Goossens in sod., 2006; Johansson in sod., 1998; Sen in sod., 2002).

Bakterije so nenehno izpostavljene spremembam v svojem okolju in občasno tudi neugodnim razmeram, ki so za celice stresne. Dejavniki stresa so po svojem izvoru lahko kemični, fizikalni ali biološki, vir stresa pa je lahko tudi organizem sam. Probiotične bakterije se s stresom srečujejo že med gojenjem, kakor tudi med industrijsko proizvodnjo kultur in probiotičnih izdelkov, med hranjenjem izdelkov in po zaužitju. Med proizvodnjo so navzoči stresni dejavniki, kot so visoka ali nizka temperatura, nizke vrednosti pH, oksidativni stres, osmotski stres in dehidracija. Omeniti velja tudi stres v bioreaktorju in pri liofilizaciji (Vorob'eva, 2004). Med prehodom skozi prebavila pa na probiotične bakterije negativno vplivajo predvsem izpostavljenost kislemu okolju želodca in žolčnim solem. Bakterijski odziv na stres celicam omogoča preživetje v neugodnih razmerah, s katerimi se srečajo v svojem okolju. Odzivi na stres so pri bakterijah evolucijsko relativno dobro ohranjeni. Glede na vrsto stresa se v bakterijah aktivirajo različni regulatorni geni in faktorji sigma polimeraze RNK, kar sproži prepisovanje skupin genov, ki zagotovijo ustrezni odziv na stresni dejavnik (van de Guchte in sod., 2002).

Specifično obliko stresa predstavljajo razmere v stacionarni fazi rasti. Bakterijske kulture preidejo v stacionarno fazo, ko celicam zmanjka hrani in/ali zaradi drugih neugodnih okoljskih razmer. V naravnem okolju je bakterijska rast pogosto omejena, zato bakterijske kulture večinoma ostajajo v stacionarni fazi. Ob tem so celice podvržene stradanju, odpadnim produktom in odmrliim celicam. Preživetje v stacionarni fazi je zato povezano s prilagoditvijo na različne oblike stresa. Če se celice niso sposobne prilagoditi spremenjenim razmeram v okolju, vstopijo v fazo smrti, pri manjšini pa pride do genskih, morfoloških in fizioloških sprememb ter vzpostavitve mehanizmov hitrejšega prilagajanja na stres. Genetska variabilnost in naravna selekcija ugodnih mutant sta pomembni za bakterijsko evolucijo (Bačun-Družina in sod., 2011). Pri *E. coli*, kasneje pa tudi pri predstavnikih drugih vrst bakterij, so opisali pojavi, ki mu rečemo prednost rasti v stacionarni fazi ali GASP (ang. »Growth Advantage in Stationary Phase«). GASP je povezan s sposobnostjo dolgotrajno staranih celic, da prerastejo mlajše kulture, kar se dokazuje s poskusi, v katerih skupaj gojimo različno stare kulture.

Pri razvijanju novih probiotičnih izdelkov pa je zlasti pomembna njihova prilagoditev na kislo okolje oziroma nizke vrednosti pH, katerim so lahko izpostavljeni že med gojenjem na začetku proizvodnega procesa, ko same proizvajajo mlečno kislino, kot tudi med prehodom skozi želodec. Boljše razumevanje prilagoditve različnih vrst/sevov laktobacilov na stresne razmere lahko bistveno pripomore k izbiri primernih probiotičnih sevov in tudi izboljša optimizacijo razmer gojenja sevov v velikem merilu.

V študiji smo se osredotočili na dva stresna dejavnika, in sicer na dolgotrajno stacionarno fazo rasti, ki je pogosto prisotna v naravi, kjer mikroorganizmom primanjkuje hranil, ter na stres, povezan z nizkim pH. Preverjali smo, ali različni sevi *L. plantarum* preživijo dolgotrajno gojenje ter kako to vpliva na njihovo rast na različnih substratih. Zanimal nas je pojav GASP, ki še ni dokazan pri laktobacilih. Na drugi strani pa smo se osredotočili tudi na stres, povezan z nizkim pH, ki je pomemben dejavnik za izbor probiotičnih sevov. Testirali smo toleranco in prilagoditev na nizek pH ter kako to vpliva na izražanje štirih različnih genov, povezanih z različnimi mehanizmi obrambe proti kislemu pH.

## 1.2 RAZISKOVALNE HIPOTEZE

Namen doktorskega dela je bil raziskati vpliv stresnih razmer, pogojenih s kislim okoljem in z razmerami v stacionarni fazi rasti, na izbrane seve vrste *Lactobacillus plantarum*. Zastavili smo naslednje hipoteze:

- a) Različni sevi *L. plantarum* se bodo različno odzvali na izpostavljenost kislemu okolju. Razlike bodo vidne v zmanjšanju viabilnosti (KE/ml), zmanjšanju integritete celične membrane in v izražanju različnih genov (*mleS*, *atpA*, *HISD*, *cfa*).
- b) Z izpostavljanjem sevov *L. plantarum* dolgotrajni kultivaciji v stacionarni fazi bo prišlo do sprememb v sposobnosti rasti na različnih substratih in do fenomena GASP.
- c) Izpostavitev sevov *L. plantarum* nizkim vrednostim pH ali dolgotrajni rasti v stacionarni fazi bo povečala sposobnost preživetja sevov v simuliranih razmerah prehoda skozi prebavila.
- d) Pri nekaterih sevih *L. plantarum* se bo pod vplivom izpostavljanja nizkemu pH ali dolgotrajni rasti v stacionarni razvila navzkrižna odpornost proti nizkim temperaturam.
- e) Pri sevih *L. plantarum* bo pod vplivom izpostavljanja kislemu okolju ali dolgotrajni rasti v stacionarni fazi prišlo do sprememb v sposobnosti rasti na različnih substratih.

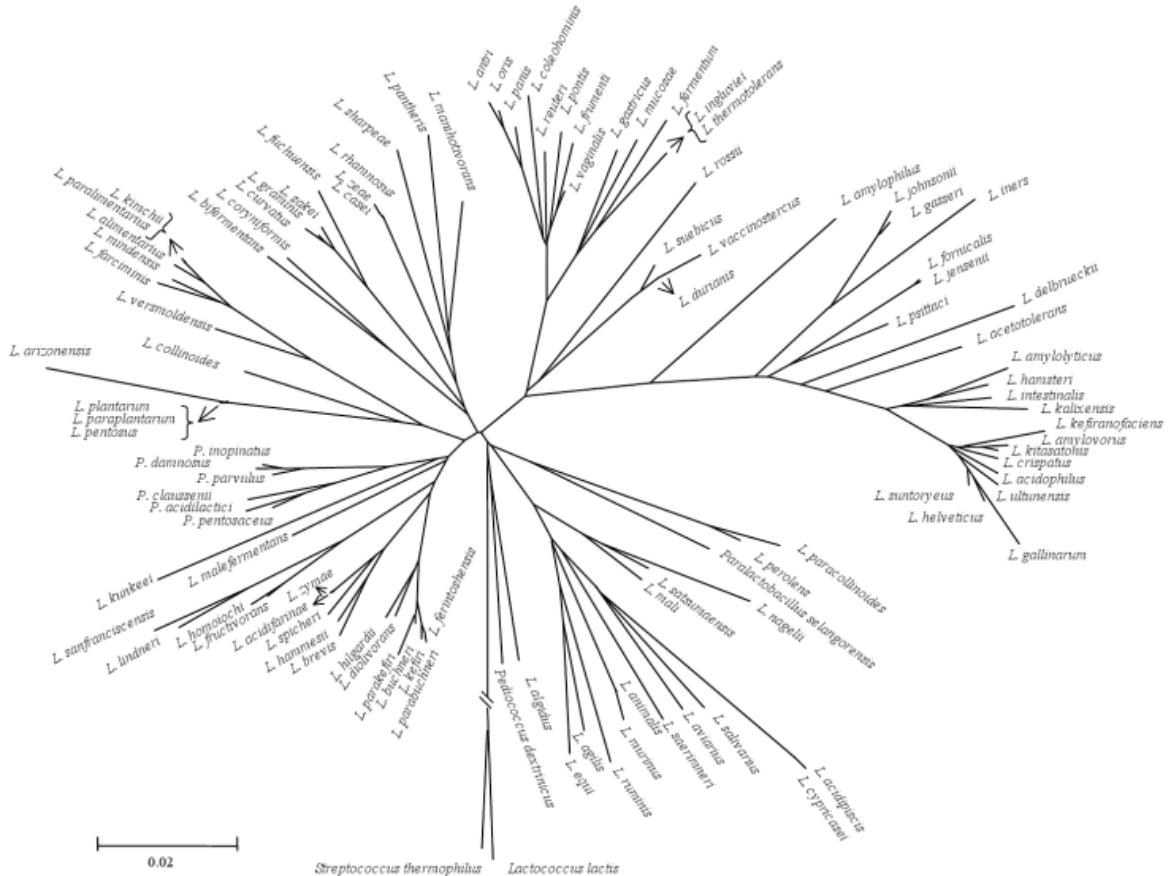
## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 BAKTERIJE IZ RODU *LACTOBACILLUS*

#### 2.1.1 Splošne lastnosti laktobacilov

Laktobacili so en izmed največjih rodov mlečnokislinskih bakterij (MKB), ki se z novoodkritimi vrstami še povečuje. Spadajo med po Gramu pozitivne bakterije, ki ne sporulirajo, so fakultativno anaerobne ter imajo status GRAS (ang. »generally recognized as safe«). Heterogenost rodu je vidna tudi v širokem razponu vsebnosti C+G, ki znašajo med 32–53 %. Skupna metabolna značilnost vseh laktobacilov je nastajanje mlečne kisline kot glavnega končnega produkta fermentacije ogljikovih hidratov. Temperaturni optimum rasti je med 30 in 40 °C, območje pH za rast pa med 3 in 7. Najdemo jih v različnih bioloških nišah, vendar večinoma v habitatih, bogatih z ogljikovimi hidrati (Axelsson, 2004). Običajno so zahtevni glede hrani, saj za svojo rast poleg ogljikovih hidratov potrebujejo tudi aminokisline, peptide, soli in vitamine. Ker so med bolj odpornimi proti nizkemu pH, pogosto odigrajo ključno vlogo proti koncu spontanih mlečnokislinskih fermentacij. Najdemo pa jih tudi v celotnem prebavnem traktu ljudi in živali. Zaradi številnih zanimivih lastnosti so uporabni tudi v živilski industriji kot starterske kulture za jogurt, sir, fermentirano zelenjavo, meso in kisli kruh (Margolles in sod., 2009).

Pravilna identifikacija bakterijskih vrst in sevov sta pomembni ne samo za taksonomske študije, ampak tudi za industrijske aplikacije. Tradicionalne identifikacijske metode so temeljile na morfologiji kolonij in celic, barvanju po Gramu in biokemijskih testih, ki so vključevali izkoriščanje različnih ogljikovih hidratov, sposobnost rasti na različnih temperaturah, odpornost proti soli in drugih. Tradicionalne metode so dolgotrajne ter jih je težko standardizirati, razen tega pa se taksonomija laktobacilov nenehno spreminja na osnovi vse boljšega poznavanja genomov. Zaradi omenjenih pomanjkljivosti tradicionalnih metod in vse večje dostopnosti molekularnih, se slednje vse bolj uveljavljajo. Nekatere vrste laktobacilov so glede na nukleotidno zaporedje 16S rDNK med seboj zelo različne (slika 1). S filogenetskimi analizami tako dobimo mešana filogenetska drevesa, kjer se laktobacili uvrščajo v iste veje s predstavniki drugih rodov (Dellaglio in Felis, 2005; Lee, 2009). S primerjavo celotnih genomov so ugotovili, da so nekatere vrste laktobacilov (*L. salivarius*, *L. plantarum*) celo bolj sorodne vrsti *E. faecalis* kot drugim laktobacilom (Canchaya in sod., 2006).

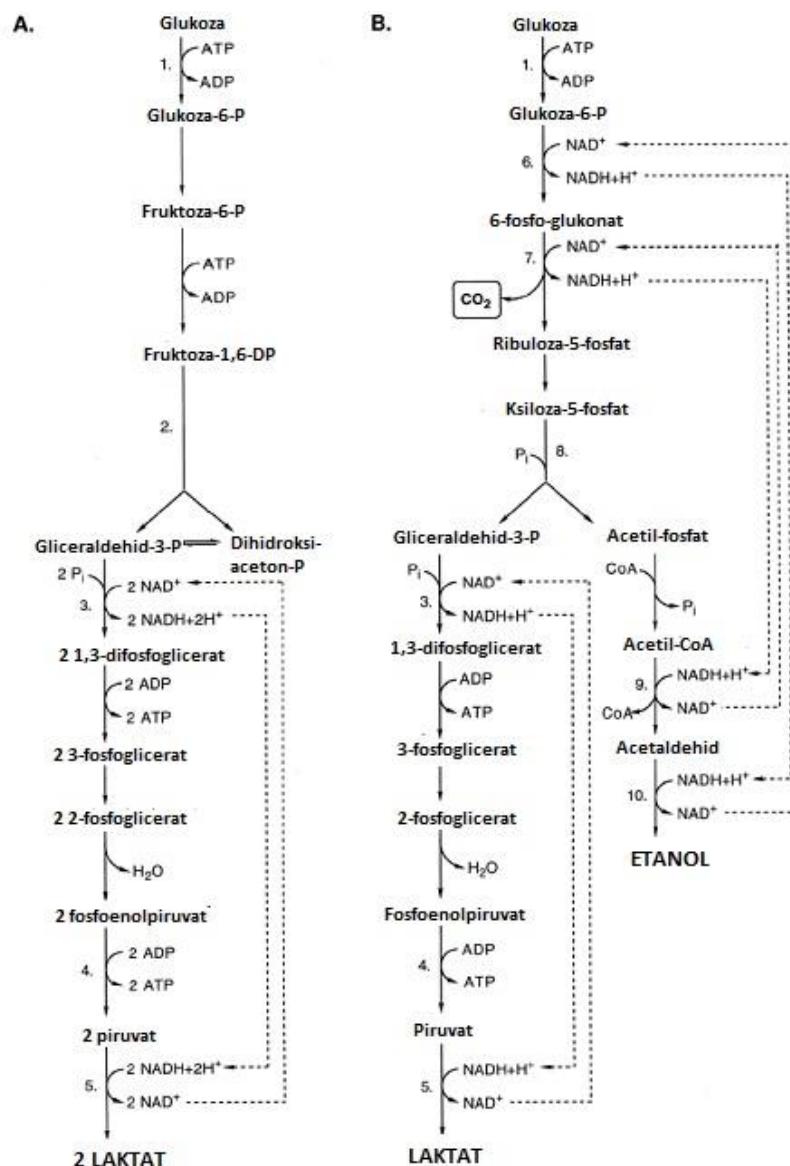


Slika 1: Filogenetsko drevo, ki prikazuje razmerja med nukleotidnimi zaporedji 16S rDNK izbranih vrst *Lactobacillus* (L.), *Pediococcus* (P.) in *Paralactobacillus selangorensis* (Dellaglio in Felis, 2005: 30), ki je od 2011 reklasificirana kot *L. selangorensis* (Haakensen in sod., 2011).

Figure 1: Phylogenetic tree showing the relationship of the 16S rDNA sequences of selected *Lactobacillus* (*L.*), *Pediococcus* (*P.*) and *Paralactobacillus selangorensis* (Dellaglio in Felis, 2005: 30), which is since 2011 reclassified as *L. selangorensis* (Haakensen *et al.*, 2011).

Glede na tip fermentacije ogljikovih hidratov laktobacile delimo v tri skupine:

- a) **Obligatno homofermentativni laktobacili** fermentirajo heksoze, sladkorje s šestimi ogljikovimi atomi, po Embden-Meyerhof-Parnasovi (EMP) poti. Končni produkt je mlečna kislina. Od laktobacilov drugih skupin se razlikujejo po tem, da nimajo fosfoketolaze in imajo konstitutivno FDP aldolazo, kar vodi do drugačnih končnih produktov fermentacije (nastaja samo mlečna kislina) ter nezmožnosti homofermentativnih laktobacilov za fermentacijo pentoz ter glukonata (slika 2a).
  - b) **Obligatno heterofermentativni laktobacili** za fermentacijo heksoz uporabljajo 6-fosfo-glukonatno/fosfoketolazno pot, katere končni produkti so poleg mlečne kisline tudi  $\text{CO}_2$  in etanol ali ocetna kislina (slika 2b).
  - c) **Fakultativno heterofermentativni laktobacili** pa uporabljajo obe metabolni poti. Za fermentacijo heksoz pot EMP, za fermentacijo pentoz pa 6-fosfo-glukonatno/fosfoketolazno pot z inducibilno fosfoketalazo (Margolles in sod., 2009).



Slika 2: Shematski prikaz homofermentativnega (a) in heterofermentativnega (b) metabolizma mlečnokislinskih bakterij (Axelsson, 2004: 20).

Figure 2: Schematic presentation of homofermentative (a) and heterofermentative (b) metabolism of lactic acid bacteria (Axelsson, 2004: 20).

### 2.1.2 Vrsta mlečnokislinskih bakterij *Lactobacillus plantarum*

Vrsta *Lactobacillus plantarum* je ena izmed raznovrstnejših vrst laktobacilov, ki jo najdemo v številnih ekoloških nišah, od zelenjave, mesa, rib, fermentiranih mlečnih izdelkih do prebavnega trakta (Siezen in van Hylckama Vlieg, 2011). To lahko pripišemo enemu izmed večjih genomov med mlečnokislinskimi bakterijami, saj presega 3 Mb. Ta vrsta je edina med laktobacili, ki lahko sama sintetizira vse aminokisline z izjemo levcina, izolevcina in valina (Kleerebezem in sod., 2003), medtem ko so vrste kot je *L. johnsonii* (Pridmore in sod., 2004) in *L. acidophilus* avksotrofi za večino aminokiselin (Altermann in sod., 2005). *L. plantarum* spada med

fakultativno heterofermentativne laktobacile, njegove najbližje sorodne vrste so *L. paraplanatum*, *L. pentosus* in *L. fabifermentans*. Tako kot druge bakterije rodu *Lactobacillus* so predstavnice te vrste sposobne produkcije protimikrobnih snovi, med katerimi so tudi bakteriocini, plantaricini (Chen in sod., 2014; Müller in sod., 2009).

### 2.1.2.1 Variabilnost vrste *L. plantarum*

Z analizo celotnega genoma seva *L. plantarum* WCFS1 (Kleerebezem in sod., 2003) so ugotovili, da ta vsebuje zelo veliko število genov za transport sladkorjev. Ima kar 25 popolnih encimskih kompleksov PTS II in precejšnje število nepopolnih, kar presega vse druge bakterijske vrste, z izjemo *Listeria monocytogenes* s podobnim številom (Glaser in sod., 2001). Poleg tega ima še 30 dodatnih transportnih sistemov, za katere domnevajo, da so vpleteni v transport virov ogljika. Glede na veliko število genov, povezanih s privzemom in razgradnjo sladkorjev, so prišli do sklepa, da je vrsta *L. plantarum* genetsko prilagojena za učinkovito razgradnjo različnih virov ogljika, čemur lahko pripisemo uspešno poseljevanje različnih niš. Za genom seva WCFS1 je tudi značilno, da se veliko genov, vpletenih v transport in metabolizem sladkorjev, nahaja blizu mesta začetka podvojevanja (ORI). Ta regija ima tudi nižjo vsebnost G+C kot preostanek genoma (41,5 % proti 44,5 %) in veliko število nenavadnih baz, iz česar so prišli do hipoteze, da so geni pridobljeni s horizontalnim prenosom. Ta regija kromosoma naj bi sodelovala pri prilagoditvi na okolje, ki jih poseljujejo bakterije te vrste, zato je bolj spremenljiva (Kleerebezem in sod., 2003).

Raznolikost vrste *L. plantarum* je bila že večkrat dokazana. Siezen in sod. (2010) so v svoji raziskavi raziskali 185 naravnih izolatov vrste *L. plantarum*. Prišli so do ugotovitve, da so si sevi, osamljeni iz istega vira (določena hrana), fenotipsko zelo podobni, medtem ko so izolati iz človeškega prebavnega trakta raznoliki, kar nakazuje na njihov izvor iz različne hrane, ki so jo posamezniki zaužili. Molenaar in sod. (2005) so se proučevanja genomske raznolikosti 20 sevov *L. plantarum* lotili s pomočjo mikromrež. Kot referenco so uporabili sev WCFS1, čigar genom je bil prvi objavljen, in ugotovili, da je genotipska raznolikost v regiji blizu mesta ORI zelo velika, zato temu območju pravijo tudi regija prilagoditve na živiljenjski stil. Vsebnost genov v tej regiji naj bi variirala glede na nišo, ki jo sev poseljuje. Sietzen in van Hylckama Vlieg (2011) sta naredila analizo 6-ih znanih genomov različnih sevov *L. plantarum*. Trije genomi so bili popolni, ostali trije pa delni. Sev WCFS1 ima kar 50 genov, ki so specifični samo zanj, ostali sevi pa vsebujejo kar 9–20 % manj genov. Našli so več zelo variabilnih regij, v katerih so se sevi razlikovali. Opažena variabilnost med profagi, insercijskimi zaporedji in transpozazami je bila pričakovana. Velika variabilnost pa se je pokazala tudi med geni za sintezo plantaricinov. Geni so združeni v gručo 25-ih genov za sintezo več različnih bakteriocinov, katerih aktivnost je zelo različna. Razlike med sevi *L. plantarum* so tudi med geni za biosintezo eksopolisaharidov CPS/EPS. V isti raziskavi so potrdili tudi visoko variabilnost področja blizu mesta ORI, kjer se v glavnem nahajajo geni, povezani s transportom in metabolizmom sladkorjev. Geni so organizirani v kasete, v katerih je povezanih 3 do 18 genov z enako biokemijsko funkcijo. Pri različnih sevih se kasete razlikujejo.

### 2.1.3 Tradicionalna uporaba laktobacilov v prehrani

Eden izmed pomembnih kriterijev, ki je omogočil nastanek civilizacije, je bila sposobnost produkcije in shranjevanja velike količine hrane, kar pa je vedno povezano s kvarjenjem. Prvi zapisi dolgotrajnega shranjevanja živil segajo v leta 15.000–10.000 p. n. š., prvi zapisi o spontani fermentaciji pa v leta 6.000–1.000 p. n. š., ko so že opisali izdelavo piva, kruha, vina, kisa, jogurta, sira in masla. Pri fermentaciji gre za oksidacijo ogljikovih hidratov s pomočjo mikroorganizmov (kvasovke, bakterije ali plesni), pri čemer nastajajo kisline, alkohol in CO<sub>2</sub>. Pri vseh omenjenih postopkih so vpletene tudi različne vrste rodu *Lactobacillus*. Naravno prisotni laktobacili sodelujejo tudi pri nastajanju silaže (Soomro in sod., 2002). Bakterije rodu *Lactobacillus* tako s fermentacijo poskrbijo za inhibicijo rasti škodljivih ali potencialno patogenih mikroorganizmov, saj z njimi tekmujejo za hranila, s produkcijo mlečne kisline pa zakisajo okolje, da postane neugodno za mnoge bakterije. Nekateri med njimi proizvajajo tudi bakteriocine, antibiotikom podobne molekule, ki zavirajo rast drugih bakterij (Caplice in Fitzgerald, 1999).

Zaradi industrializacije izdelave fermentiranih izdelkov je nastala potreba po vedno istem okusu in teksturi končnega izdelka, kakor tudi zanesljivi zaščiti pred kvarjenjem. V spontanih fermentacijah, ki so bile odkrite še pred poznanjem obstoja mikroorganizmov, so vpleteni različni mikroorganizmi, senzorične lastnosti pa med šaržami variirajo. Z industrializacijo se je začela uporaba starterskih kultur, kjer se uporablja majhno število sevov z znanimi lastnostmi (Ross in sod., 2002).

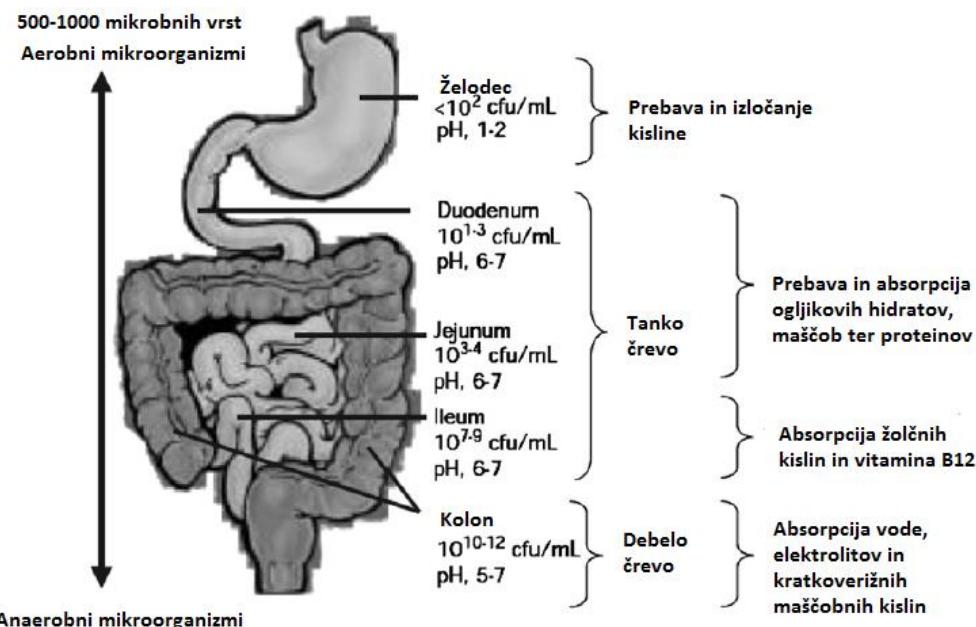
Kot že omenjeno, bakterije rodu *Lactobacillus* najdemo v številnih izdelkih. Raznolikost vrst, ki jih najdemo pri spontanih fermentacijah, je večja kot pri industrijskih. Fermentirana živila lahko razdelimo v tri skupine:

- a) Mlečni izdelki so med najbolj razširjenimi fermentiranimi proizvodi (Soomro in sod., 2002). V siru se pojavljajo od laktobacilov predvsem predstavniki vrst *L. helveticus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in *L. casei*. Tipična fermentacija jogurta poteka s startersko kulturo *Streptococcus thermophilus* in *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* v razmerju 1:1. Med pomembnejšimi fermentiranimi mlečnimi izdelki sta še kefir, v katerem najdemo veliko različnih vrst, med drugim *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. casei*, *L. brevis* in *L. kefiri*, ter acidofilno mleko, ki vsebuje *L. acidophilus* (Caplice in Fitzgerald, 1999).
- b) Mesni izdelki, med katerimi so najbolj poznane fermentirane klobase, so rezultat mlečnokislinske fermentacije mešanice mesa, mašcobe, soli, sladkorja in začimb. Spadajo med tradicionalne prehrambne izdelke srednje in južne Evrope. Industrijske starterske kulture so sestavljene iz mešanice mlečnokislinskih bakterij (laktobacili in pediokoki) ter nekaterih drugih bakterijskih vrst in plesni (Caplice in Fitzgerald, 1999).
- c) Rastlinski izdelki v surovi obliki vsebujejo veliko število mikroorganizmov. Ker pasterizacija negativno vpliva na senzorične lastnosti, predstavlja fermentacija dobro alternativo. Med ekonomsko najzanimivejšimi rastlinskimi produkti, ki jih fermentirajo v industrijskem merilu, so v Evropi predvsem oljke, kumare in zelje. Na površini rastlinskih izdelkov že najdemo naravno prisotne mlečnokislinske bakterije, ki sicer predstavljajo le od 0,15 do 1,5 % celotne

populacije, vendar pomanjkanje kisika, dodana sol ter nizek pH favorizirajo njihovo rast. V komercialnih starterskih kulturah pa poleg bakterij nekaterih vrst rodov *Leuconostoc* in *Lactococcus* najdemo zlasti *L. plantarum*, *L. casei* in *L. acidophilus* (Buckenhüskes, 1997; Caplice in Fitzgerald, 1999).

#### 2.1.4 Laktobacili kot probiotiki

Gastrointestinalni trakt poseljujejo tako aerobni kot anaerobni organizmi, ki živijo v simbiozi. Sesalsko črevo je najgosteje poseljeni ekosistem na Zemlji, z okrog  $10^{12}$  organizmov/g vsebine debelega črevesja (Marchesi in Shanahan, 2007). Število mikroorganizmov se povečuje od zgornjih prebavil proti debelemu črevesju (slika 3). Bakterije gostitelju koristijo s proizvodnjo vitaminov, preprečujejo pa tudi naselitev patogenih bakterij, tako da z njimi tekmujejo za hranila, ali pa jih zavirajo s svojimi metaboliti. Bakterije v črevesju stimulirajo razvoj določenih vrst tkiva, na primer Peyerjeve plošče, in produkcijo protiteles ter proizvajajo za gostitelja koristne snovi, kakor so maščobne kislina, peroksid in bakteriocini. Že pred rojstvom, predvsem pa takoj po njem, se začne naseljevanje otrokovih prebavil z mikrobioto, ki je odvisna od številnih dejavnikov, kot so način poroda, okolje, prehrana in drugi. V začetku je nestabilna in se spreminja, kasneje pa se ustali (Iannitti in Palmieri, 2010).



Slika 3: Sestava, naloge in poselitev črevesja odraslega (Iannitti in Palmieri, 2010: 702).

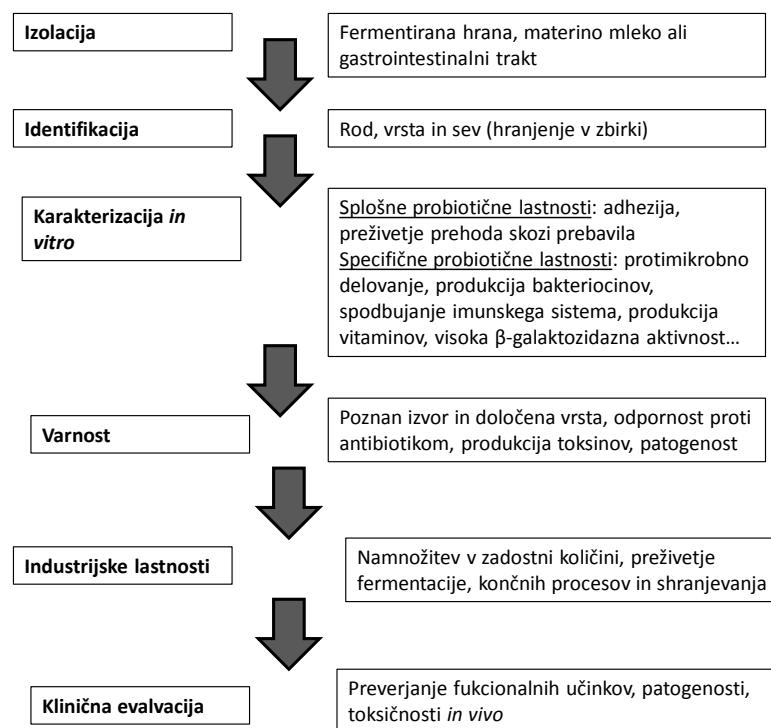
Figure 3: Composition, tasks and colonisation of human adult colon (Iannitti and Palmieri, 2010: 702).

Gastrointestinalni trakt je poseljen z mikrobioto, ki jo v ravnotežju sestavljajo simbionti s pozitivnimi učinki na zdravje gostitelja, komenzalne bakterije, ki so stalni prebivalci črevesja, vendar nimajo pozitivnega niti škodljivega učinka na gostitelja ter patobionti, stalno naseljeni potencialno patogeni mikroorganizmi. Mikrobiota je potrebna za normalno delovanje organizma gostitelja. Če pride do sprememb v zmanjšanju simbiontov ali povečanju patobiontov, se pojavi težave, kot so napenjanje, vnetja, bolečine, krči, driska ali zaprtje (Iannitti in Palmieri, 2010).

Probiotiki so živi organizmi, ki, zaužiti v zadostni količini, pozitivno vplivajo na zdravje gostitelja (Guarner in Schaafsma, 1998). Najpogosteje se kot probiotiki uporabljajo bakterije, ki izvirajo iz naravne črevesne mikrobiote. Med probiotiki so najbolj razširjene bakterije iz rodov *Lactobacillus* in *Bifidobacterium*, vendar se uporabljajo tudi druge vrste, kot so *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces boulardii*, *Streptococcus thermophilus* in druge (Senok in sod., 2005).

#### 2.1.4.1 Pomembne lastnosti kandidatnih sevov za probiotike

Da o sevu lahko razmišljamo kot o probiotiku, mora najprej zadostiti zahtevam glede varnosti za gostitelja. Mora biti nepatogen, občutljiv za antibiotike, ki so pomembni v medicini in veterini, ne sme povzročati stranskih učinkov in ne sme proizvajati toksinov. Pozitivni učinki na gostitelja morajo biti dokazani *in vitro* in *in vivo*. Poleg tega mora preživeti prehod skozi gastrointestinalni trakt v zadostnem številu ter biti odporen proti stresom med proizvodnjo in shranjevanjem (Fontana in sod., 2013; Margolles in sod., 2009).



Slika 4: Shema postopka pridobitve probiotika ter kriterijev, ki jim mora sev zadoščati.

Figure 4: Schematic of probiotic isolation and evaluation of strain characteristics.

Pri iskanju probiotičnega seva je potrebno zadostiti številnim kriterijem (slika 4).

### I. Osamitev in identifikacija seva

Najobičajnejši viri potencialno probiotičnih sevov so fermentirana hrana, humano mleko ali črevesna mikrobiota. V fermentirani hrani najdemo veliko število mlečnokislinskih bakterij, ugodni učinki uživanja fermentiranih izdelkov pa so že dolgo poznani (Heller, 2001). Materino mleko je postalo vir probiotičnih bakterij šele v zadnjem času, saj je dolgo veljalo, da je sterilno. Bakterije v mleku služijo začetni vzpostavitevi mikrobiote dojenčkov in imajo ugodne učinke na imunski sistem (Perez-Canو in sod., 2010). Gastrointestinalni trakt ljudi oziroma blato je neomejeni vir kandidatnih sevov, saj vsebuje ogromno bakterij, od katerih večine ne znamo gojiti. Za vsak nov izolat moramo ugotoviti, v katero vrsto sodi, saj je zaželeno, da ima status GRAS oziroma QPS (ang. »Qualified Presumption of Safety«) (EFSA, 2007; EFSA, 2013; Fontana in sod., 2013).

### II. Karakterizacija probiotičnih sevov

Karakterizacija sevov lahko vključuje različne teste, ki so odvisni od iskanih lastnosti. Poglavitni lastnosti, ki se testirata pri vseh kandidatnih sevih, saj sta nujni za učinkovanje probiotika.

#### - Preživetje prehoda skozi prebavila

Če želimo doseči ugodne učinke probiotika v črevesju, mora ta preživeti prehod skozi želodec, kjer najdemo zelo nizek pH ter pepsin s proteolitičnim delovanjem, ter tanko črevesje. V želodcu je običajen pH med 1,5 in 4,5, odvisno od zaužite hrane (Verdenelli in sod., 2009), vendar ob postenju pada tudi do 1 (Corcoran in sod., 2008), kar lahko močno zmanjša število preživelih bakterij. Sledijo neugodne razmere v tankem črevesju, kjer so bakterije izpostavljene žolčnim solem ter pankreatinu (Fontana in sod., 2013; Muller in sod., 2009).

#### - Adhezija

Sposobnost probiotičnega seva, da se pritrdi na črevesne epitelne celice ali mukus, je pomembna zaradi njegove obstojnosti v črevesju, tekmovanja s potencialno patogenimi organizmi ter interakcij z gostiteljevim imunskim sistemom. Za teste *in vitro* se običajno uporablja celična linija Caco-2 (Fontana in sod., 2013).

Probiotik pa mora imeti tudi ugodne učinke na zdravje gostitelja. Običajni se preskuša *in vitro* ter *in vivo* naslednje lastnosti.

#### - Protimikrobeno delovanje

Nekateri probiotiki imajo protimikrobeno delovanje proti patogenim mikroorganizmom, kot so *Clostridium difficile*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Listeria monocytogenes*, *Helicobacter pylori* in drugimi. Med najpomembnejšimi mehanizmi delovanja probiotičnih bakterij so zaviranje drugih mikroorganizmov z bakterocini, organskimi kislinami, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ali etanolom, tekmovanje za vezavna mesta na črevesnih epitelnih celicah in tekmovanje za hranila (Fontana in sod., 2013).

#### - Producija bakteriocinov

Sposobnost produkcije protimikrobnih snovi s strani mlečnokislinskih bakterij je že dolgo znana in se uporablja za konzerviranje hrane. Poleg nastajanja mlečne kisline, ki ustvarja neugodno okolje z nizkimi vrednostmi pH, imajo številni laktobacili tudi

sposobnost produkcije bakteriocinov, ki inhibirajo rast drugih bakterij (Ouwehand in Vesterlund, 2004).

- Spodbujanje imunskega sistema

Probiotični sevi lahko vplivajo na gostiteljev imunski sistem. Črevesni epitelij igra pomembno vlogo pri interakcijah z imunskim sistemom, poleg tega pa je v stiku z črevesno mikrobioto. Lahko bodisi stimulirajo imunski sistem, da varuje pred nalezljivimi boleznimi in rakom, ali zavirajo pretiran imunski odgovor, ki vodi do alergij ali kroničnih črevesnih bolezni (Crohn-ova bolezen, ulcerozni kolitis, sindrom razdražljivega črevesja) (Gill in sod., 2009). Smiselno je proučiti sposobnost kandidatnih sevov, da spodbudijo ali zavirajo produkcijo citokinov, kemokinov in interleukinov v celicah gostitelja, kot so črevesne epitelne celice, makrofagi, dendritične celice (Vasiljevic in Shah, 2008).

- Sposobnost produkcije vitaminov in drugih koristnih spojin

Nekateri probiotični sevi imajo sposobnost produkcije gostitelju koristnih molekul. To so lahko makro- in mikronutrienti, kot na primer vitamini. Znano je, da so nekatere probiotične bakterije sposobne produkcije, zlasti tistih iz skupine B, kot so na primer B<sub>12</sub>, folati, riboflavin ter biotin (LeBlanc in sod., 2011).

- Blaženje laktozne intolerance

Zmanjšanje aktivnosti črevesne β-galaktozidaze je presnovna motnja, pri kateri občutijo bolniki ob zaužitju laktoze bolečine v trebuhu, napihnjenost, napenjanje, slabost, bruhanje, diarejo ali zaprtje. Večina pacientov z laktozno intoleranco ima manjše težave ob zaužitju fermentiranih mlečnih izdelkov kot pa nefermentiranih. Razlogov je več, med njimi manjša vsebnost lakteze ter encim β-galaktozidaza, ki ga vsebujejo kulture, uporabljene v procesu fermentacije mlečnih izdelkov. Tudi večina probiotičnih sevov ima encim β-galaktozidazo, vendar je aktivnost β-galaktozidaze zelo sevno specifična, zato je smiselno testirati njeno aktivnost, če želimo probiotik uporabljati za blaženje laktozne intolerance (Vasiljevic in Shah, 2008).

- Drugi pozitivni učinki na zdravje

Probiotiki imajo lahko vpliv na metabolizem maščobnih kislin, znižujejo nivo holesterola ali imajo kakšno drugo lastnost, ki pogojuje ugodne vplive na gostiteljevo zdravje.

### III. Varnost

Med teste, potrebne za določitev varnosti probiotičnega seva, spadajo:

- Poznan izvor in vrsta seva

Pravilna taksonomska uvrstitev seva je pomembna, saj posamezne vrste lahko pomenijo določeno tveganje, ki ga je potrebno ustrezno raziskati (Sanders in sod., 2010).

- Odpornost proti antibiotikom

Nekateri probiotični sevi so že naravno odporni proti številnim antibiotikom. Takšno odpornost poimenujemo »intrinzična« ali naravna odpornost, saj je značilna za določeno bakterijsko vrsto in običajno ni prenosljiva. Če pa je odpornost pridobljena, obstaja nevarnost horizontalnega prenosa na druge bakterijske vrste, zato je pri probiotičnih sevih nezaželena (Donohue, 2009). Po priporočilih EFSA (2012) je potrebno vse žive mikroorganizme, ki so namenjeni za prehrano ljudi ali živali, preveriti glede njihove odpornosti proti antibiotikom, ki so pomembni v medicini in veterini. Priporočila vsebujejo mejne vrednosti minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) za 9 antibiotikov (ampicilin, vankomicin, gentamicin, kanamicin, streptomicin, eritromicin, klindamicin,

tetraciklin ter kloramfenikol), na podlagi katerih lahko interpretiramo rezultate testiranja in posamezne seve spoznamo kot občutljive oziroma rezistentne.

#### IV. Industrijske lastnosti

Razen tega, da sev dobro opišemo, ugotovimo učinke na gostitelja in potrdimo varnost, moramo raziskati tudi njegovo industrijsko uporabnost. Sev moramo namnožiti v zadostnih količinah ter zagotoviti, da ohrani živost tako med postopki proizvodnje kakor med hranjenjem. Med proizvodnjo so bakterije izpostavljene organskim kislinam, kisiku, pomanjkanju hranil, nizkemu pH ter protimikrobnim substancam. Preživeti morajo tudi liofilizacijo ali sušenje z razprševanjem, kjer so izpostavljen visokim ali nizkim temperaturam, kisiku, visokemu osmotskemu pritisku. Med neugodnimi dejavniki med shranjevanjem pa so lahko neugodna temperatura ali prisotnost kisika. Prav robustnost sevov na industrijskem nivoju je pogosto ozko grlo (Fontana in sod., 2013; Vasiljevic in Shah, 2008).

#### V. Klinični poskusi

Probiotični sev pa je potrebno preveriti tudi s poskusi *in vivo*, na populaciji, kateri je izdelek z določenim(i) sevom (sevi) namenjen. Preveriti je potrebno funkcionalnost ter varnost (morebitna patogenost, toksičnost).

##### 2.1.4.2 Bakterije vrste *Lactobacillus* kot probiotiki

Danes laktobacile najdemo na trgu v številnih probiotičnih izdelkih za različne namene. Znanstveno je dokazano, da posamezni sevi blažijo probleme laktozne intolerance ter rotavirusne in antibiotične diareje. Nekateri probiotični sevi laktobacilov imajo tudi potencial v zdravljenju in preprečevanju alergij, inhibiciji *Helicobacter pylori* in drugih črevesnih patogenov ali pri zdravljenju kroničnih črevesnih bolezni (IBD, IBS) (Vasiljevic in Shah, 2008). Potrebne pa so še obsežnejše klinične študije, ki bodo nedvomno potrdile učinkovitost posameznih probiotičnih sevov pri različnih boleznih.

##### 2.1.4.3 Vrsta *Lactobacillus plantarum* kot probiotik

Sevi *L. plantarum* se na trgu že pojavljajo kot probiotiki. Najbolj znan je sev *L. plantarum* 299v te vrste, osamljen iz črevesne sluznice zdravega osebka. S sevom je bilo narejeno že okrog 40 raziskav na ljudeh. Dokazano je, da uživanje tega seva poveča število laktobacilov v blatu (Goossens in sod., 2006), da sev kaže protibakterijsko aktivnost proti številnim potencialno patogenim vrstam (Johansson in sod., 1998) ter da ima ugodno imunomodulatorno aktivnost (Sen in sod., 2002). Narejena je bila tudi klinična študija, ki kaže izboljšanje simptomov pacientov s sindromom razdražljivega črevesja ob uživanju probiotika 299v (Ducrotté in sod., 2012).

Veliko drugih sevov *L. plantarum* je izkazalo pozitivne lastnosti, ki nakazujejo možnost uporabe za boljši metabolizem lipidov in nižanje holesterola (Bosch in sod., 2014; Huang in sod., 2013; Salaj in sod., 2013), spodbujanje imunskega sistema (Mañé in sod., 2011; Noguchi in sod., 2012), zmanjšanje imunskega odgovora na alergije (Snel in sod., 2011), protivirusno delovanje pri gripi (Park in sod., 2013), zmanjšanje virulence *Streptococcus pyogenes* (Rizzo in sod., 2013), preprečevanje infekcij z bakterijo *Salmonella enterica* (Das in sod., 2013), zmanjšanje težav, povezanih z diabetesom

(Bejar in sod., 2013), lajšanje otroškega atopičnega dermatitisa (Han in sod., 2012), blaženje ulceroznega kolitisa (Liu in sod., 2011) in številne druge pozitivne učinke.

## 2.2 ODZIV BAKTERIJ NA STRESNE RAZMERE

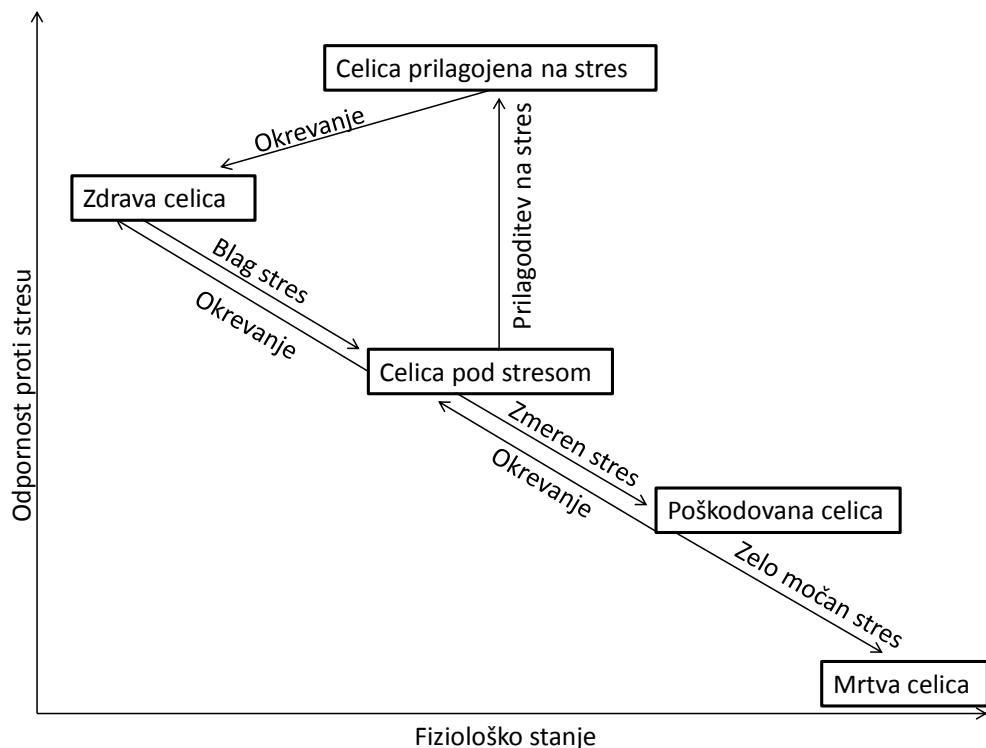
### 2.2.1 Stres, fiziološki in biotehnološki pomen

Stres lahko definiramo kot spremembo, ki negativno vpliva na rast ali preživetje mikroorganizmov. Ker se habitati mikroorganizmov stalno spreminjajo, je pomemben hiter odgovor na stres. Dejavniki stresa so po svojem izvoru lahko kemični, fizikalni ali biološki, vir stresa pa je lahko tudi organizem sam. Sprememba je lahko v genomu, proteomu ali okolju bakterije, saj stresorji povzročajo denaturacijo proteinov, sprožajo zlome v verigah nukleinskih kislin, oksidacijo makromolekul, dehidracijo ter inhibirajo transkripcijo in translacijo (Vorob'eva, 2004).

Na sliki 5 vidimo povezave med fiziološkimi stanji celice in odzivom celic mikroorganizma na stres. Vsi mikroorganizmi imajo podedovano toleranco proti stresnim dejavnikom (npr. nizek pH), vendar se med seboj razlikujejo. Toleranca je odvisna tako od vrste kot od posameznega seva, pomeni pa sposobnost mikroorganizma, da preživi stres. Toleranca proti stresu se lahko izboljša na različne načine:

- a) specifično, s pomočjo prilaganja celic na stres, če so izpostavljeni subletalni dozi stresa; to običajno poteka v logaritemski fazi rasti,
- b) z generalnim odzivom na stres; pri tem lahko ena vrsta stresa povzroči odpornost tudi na druge vrste stresa,
- c) v stacionarni fazi rasti, brez predhodne izpostavitve stresu; v tem primeru gre za povečanje odpornosti proti več stresnim faktorjem (Lorca in de Valdez, 2009).

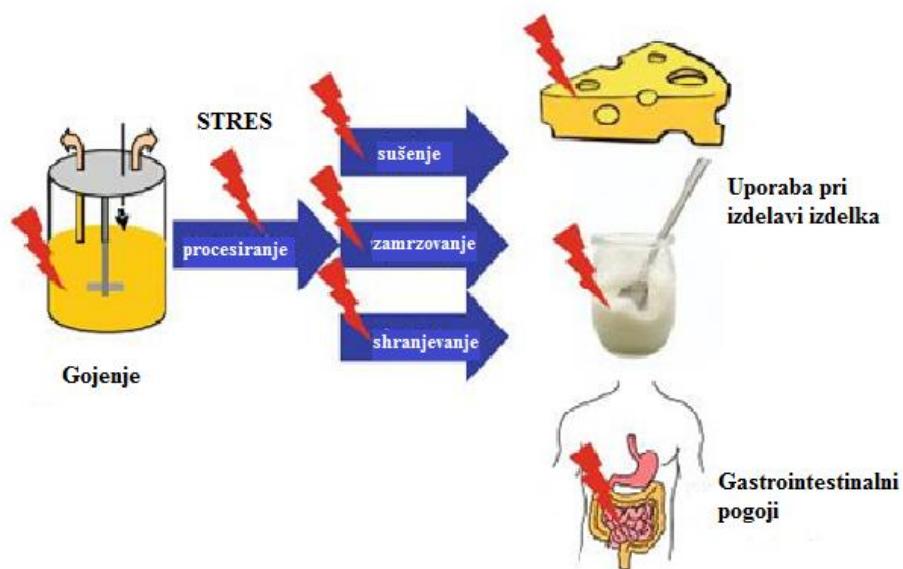
Zaradi stresa pride do poškodb na celičnih komponentah, kar onemogoči razmnoževanje mikroorganizma ali pa večjo občutljivost za druge stresne dejavnike. Take poškodovane celice (slika 5) lahko bodisi okrevajo ali pa odmrejo (Yousef in Courtney, 2003).



Slika 5: Povezave med fiziološkimi stanji celice ob izpostavitvi stresu (Yousef in Courtney, 2003: 3).

Figure 5: Connections between physiological states of the cell exposed to stress (Yousef and Courtney, 2003: 3).

Večina mikroorganizmov je sposobna premagati stres z zaznavanjem le-tega in prilagajanjem nanj. Določene skupine mikroorganizmov pa so se na neugodne razmere tako dobro prilagodile, da so ekstremna okolja njihov habitat. Primer takšnih so različni acidofilni, psihrofilni ali halofilni mikroorganizmi (Beales, 2004). Poleg stresa v naravnem okolju pa je pri industrijsko zanimivih sevih pomembna tudi odpornost proti stresom tekom proizvodnje. Ti so lahko temperatura, ki odstopa od optimalne, osmotski in oksidativni stres med fermentacijo ali pa stresi, povezani s tehnološkimi procesi, kot sta liofilizacija ali sušenje (slika 6). Zlasti je to pomembno pri probiotikih ali starterskih kulturah, kjer morajo biti ob koncu proizvodnje mikroorganizmi živi in metabolno aktivni (Bron in sod., 2011).



Slika 6: Shematski prikaz različnih vrst stresa, ki so jim izpostavljenе starterske in probiotične kulture med industrijskim procesom (Bron in sod., 2011: 370).

Figure 6: Schematic presentation of the various stresses encountered by starter and probiotic cultures in the industrial process (Bron *et al.*, 2011: 370).

Za zaznavanje stresa uporabljajo bakterije različne transmembranske regulatorne sisteme, ki omogočajo, da so v stiku tako z okoljem kakor tudi s citosolom. Običajno imajo dve komponenti. Zunanji del proteina veže različne signalne molekule, ki povzročijo avtofosforilacijo, ki ji sledi prenos fosfata na naslednji protein, ki je aktivator ali represor transkripcije (Vorob'eva, 2004). Uravnavanje odgovora na stres je nujno, saj se morajo ob specifičnem stresu sintetizirati pravi proteini za obrambo celice. To poteka na več nivojih, odvisno od vrste stresa in od bakterij samih. Tako se lahko uravnava transkripcija ali translacija ter tudi stabilnost mRNK in proteina (Yousef in Courtney, 2003). Ravno sprožitev prepisovanja je najpomembnejši korak v regulaciji bakterijskih genov. Vezava RNK-polimeraze s faktorjem sigma ( $\sigma$ ) je predpogoj za začetek prepisovanja. Faktor  $\sigma$  je namreč majhna proteinska molekula, ki prepozna promotorsko zaporedje v DNK in sproži prepisovanje genov. Vsak sigma faktor sodeluje pri transkripciji določene skupine genov (Vorob'eva, 2004). Pri splošnem odzivu na stres sodeluje faktor  $\sigma^S$ . Njegova koncentracija je zelo nizka pri hitro rastočih celicah, ki niso izpostavljene stresu, inducira pa ga različni stresni dejavniki. Njegovi indukciji sledi aktivacija številnih genov, ki sprožijo izražanje genov za splošno odpornost proti stresu in v nekaterih primerih tudi morfološke spremembe (Fischer in sod., 1998). Seveda pa imajo celice tudi negativno kontrolno prepisovanja s stresom povezanih genov. To vključuje faktorje anti-sigma, ki se vežejo s specifičnim faktorjem sigma, pri čemer nastajajo kompleksi, ki preprečuje vezavo na RNK-polimerazo. Odgovor na stres vključuje produkциjo proteinov, ki popravljajo poškodbe, odstranjujejo stresni faktor ali prehodno izboljšujejo odpornost. Celica lahko tudi mutira ali preide v speče stanje (Yousef in Courtney, 2003).

## 2.2.2 Odziv laktobacilov na različne stresne dejavnike

### 2.2.2.1 Vpliv nizkih temperatur

Glede na optimalno temperaturo rasti laktobacile uvrščamo med mezofilne ali termofilne bakterije. Med industrijskimi procesi, to je med shranjevanjem starterskih kultur ter fermentiranih produktov v hladilniku, med zorenjem sira, med zamrzovanjem ali liofilizacijo, pridejo v stik s temperaturami, nižjimi od optimalnih. Preživetje vse do konca industrijskega procesa pa je ključnega pomena za industrijsko uporabo, zato je pomembno poznavanje mehanizmov in odgovorov na stres zaradi izpostavljenosti nizkim temperaturam, ki pripomore k optimizaciji fermentacije, shranjevanja ali izbiri ustreznega konzerviranja končnega produkta (van de Guchte in sod., 2002).

Fluidnost bakterijske membrane se zmanjša, če so celice izpostavljene nizkim temperaturam, kar vpliva na njeno prehodnost in delovanje. Razen tega nizke temperature vplivajo na sekundarne strukture molekul DNK in RNK, ki se stabilizirajo, kar privede do zmanjšane učinkovitosti podvojevanja, prepisovanja in prevajanja DNK. Mikroorganizmi so razvili odgovor na hladni stres, ki se kaže v sintezi velikega števila beljakovin, imenovanih CIP (ang. »cold induced proteins«). Njihove naloge so:

- vzdrževanje membranske fluidnosti s povečanjem deleža kratkih in nenasičenih maščobnih kislin v lipidih,
- sprožanje dodatnega zvitja DNK, ki prepreči nezaželene sekundarne strukture ter
- prepisovanje genov za beljakovine, ki omogočajo prilagoditev celice na nizke temperature (van de Guchte in sod., 2002).

Med CIP najdemo veliko število beljakovin hladnega šoka (CSP, ang. »cold shock protein«). To so medsebojno zelo sorodne beljakovine z več kot 45 % identičnimi aminokislinskimi zaporedji pri po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih bakterijah ter nizko molekulsko maso (7 kDa). Njihove ortologe najdemo v tudi do devet kopijah (Vorob'eva, 2004; Wouters in sod., 2000). Med njimi je najbolj znana beljakovina CspA, ki ima vlogo kot transkripcjski aktivator ali šaperon mRNK in jo najdemo tudi pri laktobacilih (Sauvageot in sod., 2006). Proteini hladnega šoka so izraženi tudi v določenih stadijih rasti pri optimalni temperaturi, kar kaže na njihovo vpletenost v druge procese v celici (De Angelis in Gobbetti, 2004). Pri vrsti *L. plantarum* so opazili izražanje treh različnih CSP ob hladnem stresu, in sicer *CspL*, *CspP* in *CspC* (Derzelle in sod., 2000). Ob povečanem izražanju vseh treh genov je opažena povečana odpornost proti nizkim temperaturam in tudi stradanju (Derzelle in sod., 2003).

### 2.2.2.2 Vpliv liofilizacije

Stabilizacija probiotičnih kultur je velikega pomena za njihovo komercialno uporabo, saj veliko sevov ne doseže trga ravno zaradi slabega preživetja med industrijskimi procesi in shranjevanjem. Liofilizacija je ena izmed najbolj razširjenih stabilizacijskih metod za pripravo in dolgotrajno shranjevanje in izdelkov z mlečnokislinskimi bakterijami. Pri liofilizaciji gre za sušenje kultur s pomočjo sublimacije ledu (Montel Mendoza in sod., 2013; Siaterlis in sod., 2009).

Liofilizacija je sestavljena iz treh glavnih korakov: zamrzovanje, primarno sušenje in sekundarno sušenje (slika 7).

a) Zamrzovanje

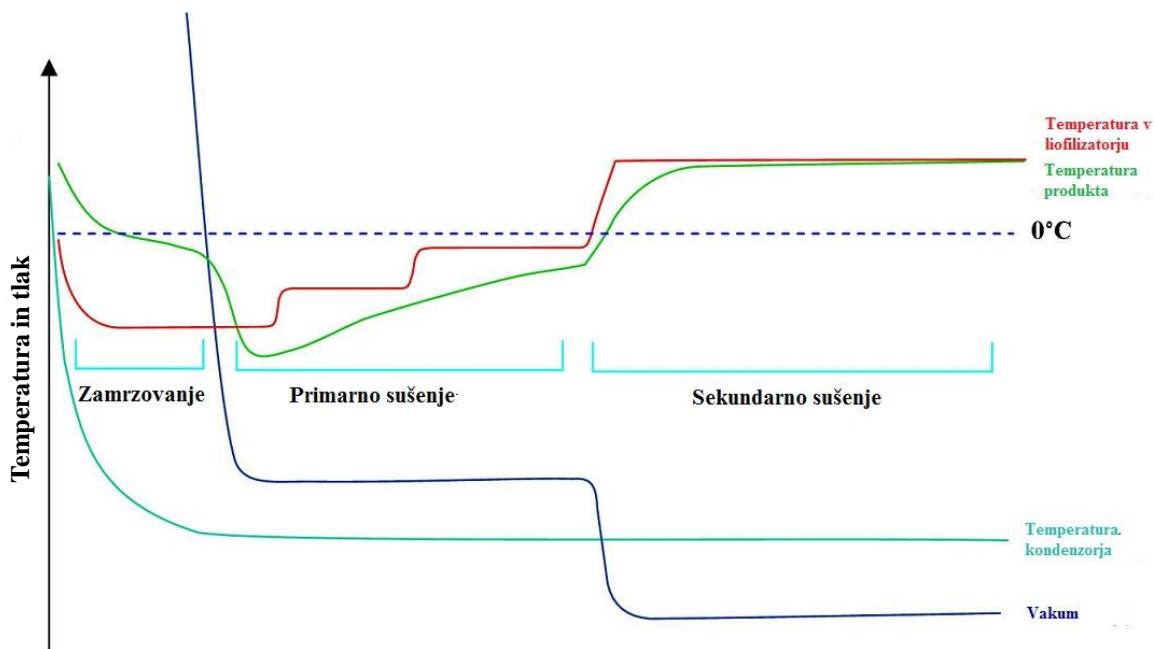
Na začetku bakterijske vzorce zamrznemo, da ločimo vodo od ostalih snovi s pomočjo nastajanja ledenih kristalov. Hitro zamrzovanje, na primer v tekočem dušiku, pripomore k boljšemu preživetju postopka, vendar pa se s tem podaljšajo naslednji koraki liofilizacije. Pri počasnem zamrzovanju nastajajo večji ledeni kristali, ki olajšajo izhajanje vode iz vzorca.

b) Primarno sušenje

Ko zamrznjeno kulturo izpostavimo vakuumu, začne voda sublimirati iz vzorca. Postopek sublimacije se začne na robu, za izhajanje vode iz notranjosti vzorca pa morajo nastati manjše pore. Med sublimacijo se zviša temperatura vzorca, tako da preseže temperature kondenzorja. Pri primarnem sušenju se temperatura toliko dvigne, da voda v vzorcu sublimira, vendar še ne pride do utekočinjenja vzorca. Voda se premika iz toplejšega območja proti hladnejšemu. Tako ima lahko vzorec  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  in kondenzor  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

c) Sekundarno sušenje

Pri sekundarnem sušenju temperaturo vzorca zvišamo na do okrog  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  oziroma do sobne temperature, tako da odstranimo še vso preostalo vodo (Morgan in sod., 2006; Perry, 1995; Strasser in sod., 2009).



Slika 7: Spremembe temperature in tlaka med tremi fazami liofilizacije (Common misconceptions in freeze drying, 2012).

Figure 7: Changes in temperature and pressure during three phases of lyophilisation (Common misconceptions in freeze drying, 2012)

Za boljše preživetje med liofilizacijo se uporabljajo zaščitne snovi, kot so posneto mleko, sladkorji, polialkoholi, antioksidanti, aminokisline ali prebiotiki. Njihovo zaščitno delovanje je različno. Tisti, ki lahko vstopajo v celico, naredijo celično membrano bolj prožno, vežejo intracelularno vodo in preprečujejo nastajanje prevelikih

ledenih kristalov v celici. Primer takšnih zaščitnih molekul so monoivalentni alkoholi, amidi, sulfoksiidi in tudi glicerol, ki je eno izmed pogosteje uporabljenih zaščitnih sredstev. Medtem ko glicerol počasi vstopa v celice, v odvisnosti od temperature in tipa celic, nekatera zaščitna sredstva ne morejo v celice, pač pa na površini celic ustvarijo viskozno plast, ki omogoči delno izhajanje vode iz celice, inhibirana pa je rast ledenih kristalov. Primer zaščitnih molekul, ki ne vstopajo v celico, so mono-, oligo- in polisaharidi, poliakoholi, proteini in polietilen glikol (Saarela in sod., 2005).

Stres med liofilizacijo torej povzročita tako zamrzovanje kot sublimacija. Med zamrzovanjem nastajajo znotraj celic ledeni kristali, ki povzročijo fizične poškodbe. Med sublimacijo pa nastaja visok osmotski pritisk zaradi visoke koncentracije citoplazmatskih topljencev. Prav membranska integriteta in denaturacija makromolekul sta glavna dejavnika, ki vplivata na preživetje med liofilizacijo (De Angelis in Gobbetti, 2004). Povezano med odpornostjo proti zamrzovanju in odgovorom na hladni stres so prvič dokazali pri vrsti *Bacillus subtilis* (Willimsky in sod., 1992). Pri mlečnokislinskih bakterijah se je tudi že pokazalo, da je preživetje med zamrzovanjem boljše po predhodni prilagoditvi na nizke temperature (Lorca in sod., 1999; Panoff in sod., 2000), vendar le v eksponentni fazi rasti (Wouters in sod., 1999). Pri *Lactococcus lactis* so pokazali, da je večina sevov, izpostavljenih hladnemu šoku pred liofilizacijo (2 h na 10 °C), bolje preživelata tudi liofilizacijo. Podoben učinek so dosegli tudi s topotnim šokom (Broadbent in Lin, 1999), kar kaže na to, da na preživetje med liofilizacijo vpliva veliko dejavnikov, od izbire zaščitnih snovi, gojišča, razmer pred liofilizacijo in faze rasti (Montel Mendoza in sod., 2013).

#### 2.2.2.3 Vpliv oksidativnega stresa

Laktobacili so aerotolerantni mikroorganizmi, ki ne uporabljajo proton-translocirajoče elektronske transportne verige. Običajno je korelacija med rastjo laktobacilov in prisotnostjo kisika negativna, vendar pa imajo vsaj nekateri med njimi oksidaze, ki izkoriščajo O<sub>2</sub> za oksidacijo substratov, kot je na primer piruvat ali NADH. Pri tem lahko nastajajo reaktivne kisikove zvrsti, ki povzročajo oksidativni stres. Tudi sevi iste vrste, ne samo različnih vrst, se razlikujejo v odpornosti proti oksidativnemu stresu, saj je ta odvisna od njihovih antioksidativnih obrambnih mehanizmov (De Angelis in Gobbetti, 2004; Vorob'eva, 2004).

Toksičnost kisika v glavnem pripisujemo kisikovim radikalom, kot je O<sub>2</sub><sup>-</sup> (superoksid) ali HO<sup>•</sup> (hidroksidni radikal), ter molekulam vodikovega peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ali singletnega kisika. Vsi med njimi lahko poškodujejo beljakovine, lipide in nukleinske kisline ter s tem povzročajo staranje celic in celično smrt. Oksidativni stres bakterije zaznavajo s specifičnimi transkripcijskimi regulatorji, ki sprožijo obrambne mehanizme, ko je kritična meja reaktivnih kisikovih zvrsti presežena. Bakterije so razvile različne metode spopadanja z njihovo toksičnostjo, med katerimi je preprečevanje nastajanja ali odstranjevanje reaktivnih kisikovih zvrsti, zaščita tarčnih molekul ali popravljanje nastalih poškodb (van de Guchte in sod., 2002). Pri mlečnokislinskih bakterijah za odstranjevanje reaktivnih kisikovih zvrsti služijo NADH-oksidaza, NADH-peroksidaza, glutation in tioredoksin. Medtem ko je večina kisikovih reaktivnih zvrsti nestabilnih, sta H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in O<sub>2</sub><sup>-</sup> izjemi, zato imajo nekatere bakterijske vrste encime, ki ju razgrajujejo. Poleg tega se celice poslužujejo tudi molekul z antioksidativnimi učinki, ki ščitijo DNK

pred oksidacijo. Omenjene učinke imajo vitamini, karotenoidi in poliamini. Nekatere vrste laktobacilov, med katerimi so *L. plantarum*, *L. casei* in *L. fermentum*, vsebujejo visoko koncentracijo Mn, ki deluje kot učinkovit lovilec  $O_2^-$  (van de Guchte in sod., 2002; Vorob'eva, 2004). Nekatere vrste laktobacilov, zlasti vaginalne, so zmožne proizvajati vodikov peroksid kot obrambno molekulo, medtem ko so druge vrste laktobacilov zelo občutljive, kar povezujejo z različno količino peroksidaz.  $H_2O_2$  je nevtralna molekula, ki lahko prečka membrano. Ima močan oksidacijski potencial, vendar z biološkimi materiali reagira počasi, če ni prisotnih katalizatorjev. Če pride do reakcije, nastane reaktivnejši  $HO^\cdot$  (Asad in sod., 2004; Talwalkar in Kailasapathy, 2003).

#### 2.2.2.4 Vpliv kisle vrednosti pH

Laktobacili prihajajo v stik s kislinami že v svojem naravnem okolju, saj proizvajajo mlečno kislino, ki naredi okolje neugodno za rast ostalih bakterij. To izkoriščamo pri konzerviranju hrane s pomočjo fermentacije. Probiotične bakterije pa prihajajo v stik s kislim pH tudi v gastrointestinalnem traktu gostitelja. Signal za stres lahko prihaja iz zunanjega okolja ali pa nastane v celici. Zaradi kopičenja protonov v celici pride do znižanja citosolnega pH, kar vpliva na transmembranski gradient pH ( $\Delta pH$ ), ki ga celice uporabljajo kot vir energije za transport različnih molekul, do poškodb beljakovin in DNK ter do zmanjšanja aktivnosti občutljivih encimov. Pri laktobacilih se toleranca proti kislinam lahko poveča v stacionarni fazi rasti, ko se poveča tudi odpornost proti različnim vrstam stresa, ali pa v logaritemski fazi rasti, zaradi prilagoditve na nižji pH, če celice predhodno izpostavimo subletalnemu stresu (van de Guchte in sod., 2002). Nekateri laktobacili vzdržujejo nevtralni znotrajcelični pH, dokler ni zunaj celice presežena mejna vrednost, ko to ni več mogoče. Drugi pa vzdržujejo konstanten  $\Delta pH$ , tako da v skladu z nižanjem zunanjega pH nižajo tudi znotrajceličnega (Shabala in sod., 2006). Za obrambo proti stresu, povzročenemu zaradi kislega pH, se celice borijo na več načinov.

##### I. Črpanje protonov

$F_1F_0$ -ATPaza je encim, ki s pomočjo privzemanja protonov tvori ATP, seveda pa gre proces tudi v obratno smer, ko celica s pomočjo ATP izčrpava protone in zvišuje intracelularni pH, pri čemer gre za precejšno energetsko obremenitev celice (van de Guchte in sod., 2002). Encim je sestavljen iz več podenot. Tudi pri vrsti *L. plantarum* so dokazali prisotnost tega encima (Kleerebezem in sod., 2003), kakor tudi povečano izražanje ene od podenot, produkta gena *atpD*, v kislem okolju (Duary in sod., 2010).

##### II. Producija bazičnih snovi

Bakterije uravnavajo pH tudi s pomočjo arginin deaminazne poti, pri čemer se arginin pretvarja v ornitin, amonijak in  $CO_2$ . Amonijak nevtralizira protone, nastali ATP pa se lahko porabi tudi za aktivno izčrpavanje protonov. Poleg arginina je pri nekaterih bakterijah za nevtraliziranje pH pomembna tudi ureaza, ki katalizira hidrolizo uree v  $CO_2$  in amonijak. Podobno je tudi s sintezo histidina, ki ima bazične lastnosti (Broadbent in sod., 2010; van de Guchte in sod., 2002).

##### III. Sprememba membrane

Celična membrana je pogosto prva tarča stresa. En izmed prvih odgovorov, ki se jih poslužujejo bakterije pri obrambi pred stresom, je tako sprememba maščobnih kislin celične membrane, pri čemer pride do sprememb v organizaciji membrane, integriteti, sestavi lipidov in fluidnosti. Med običajnimi mehanizmi so povečanje deleža

dolgoverižnih, ciklopropanskih in nasičenih maščobnih kislin. Celična membrana je poleg fizične ovire pomembna tudi v metabolizmu, saj uravnava vstopanje molekul v celico in izstopanje iz nje (Wu in sod., 2012). Eden izmed vpletenih genov je *cfaI*, ki kodira ciklopropan maščobno-acil-fosfolipidno sintazo (ang. »cyclopropane fatty-acyl-phospholipid synthase«), ki katalizira spremembe iz nenasičenih maščobnih kislin v njihove ciklopropanske derivate, kar naredi bakterijsko membrano manj propustno. Povečano izražanje gena so že opazili pri vrsti *L. casei* (Broadbent in sod., 2010).

#### IV. Spremembe v metabolizmu

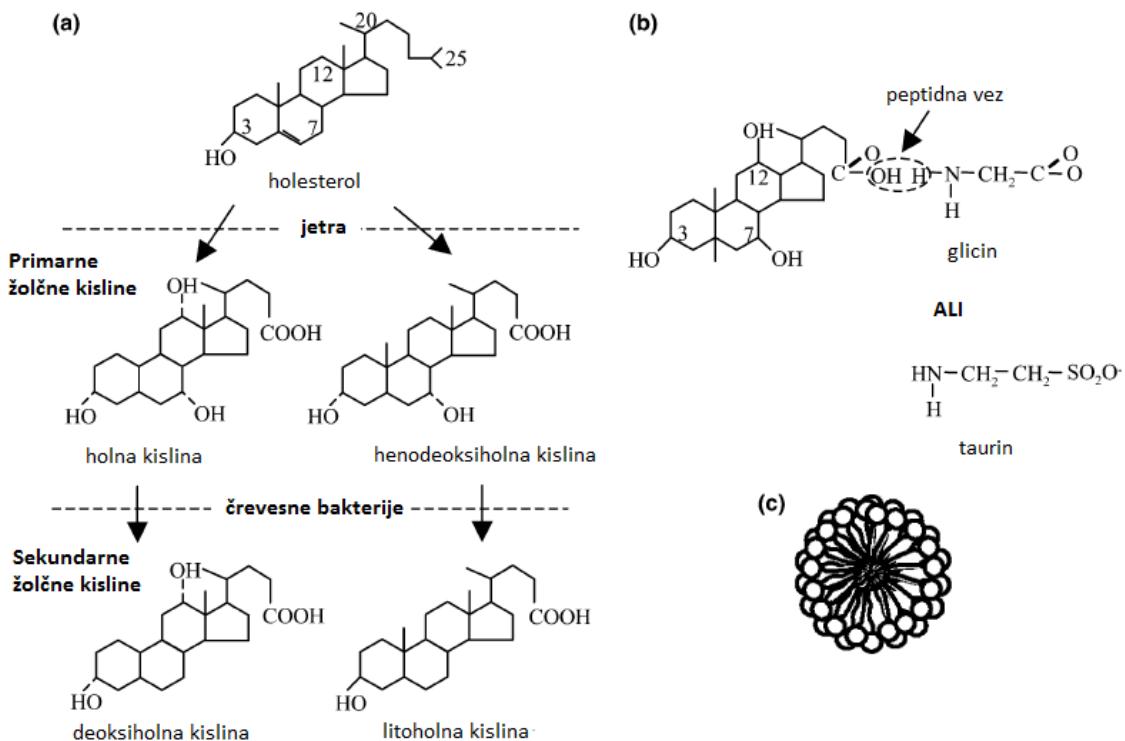
Izpostavitev bakterij stresu lahko spremeni njihov metabolizem. Znano je povečanje proizvodnje alkoholov, ketonov, ketonskih kislin in aminokislin zaradi izpostavitve različnim stresom. Preusmeritev metabolizma je lahko tudi zaželena in se izkorišča pri fermentaciji hrane (Serrazanetti in sod., 2011). Pri *L. casei* pa je že znana preusmeritev v malolaktično fermentacijo, če ga izpostavimo kislemu pH. Pri tem s pomočjo encima malat dehidrogenaza (gen *mleS*) iz malata nastajata laktat in CO<sub>2</sub>, sprošča pa se ATP (Broadbent in sod., 2010). Podobno so že dokazali tudi pri vrsti *L. plantarum*, kjer malolaktična fermentacija pomaga celicam pri ohranjanju ΔpH (García in sod., 1992).

#### V. Popravljanje poškodovanih proteinov in DNK

V nekaterih primerih se tudi ob kislem stresu aktivirajo šaperoni, ki imajo pomembno vlogo pri zagotavljanju prave konformacije proteinov ter preprečevanju nastajanja nezaželenih proteinskih agregatov. Nizek intracelularni pH povzroči tudi depurinacijo in depirimidacijo DNK, zato je pomembno, da se ob tovrstnem stresu vključijo sistemi za popravljanje DNK (van de Guchte in sod., 2002).

##### 2.2.2.5 Vpliv žolčnih soli

Žolč je kompleksen prebavni izloček jeter, ki služi razbijanju maščob ter njihovi absorpciji. Njegove najpomembnejše sestavine so holesterol, mukus, fosfolipidi, različne anorganske snovi ter žolčne soli (ali žolčne kisline), ki so derivati holne kisline, ki nastaja iz holesterola v jetrih (slika 8a). Pred izločanjem se žolčne kisline konjugirajo z glicinom ali taurinom. Glikoholne in tauroholne soli predstavljajo kar 80 % vseh soli pri človeku (slika 8b). Funkcija žolčnih kislin je, da delujejo kot detergenti, pomagajo pri raztopljanju lipidov, izločanju snovi ter imajo protimikrobno delovanje. Njihovo toksično delovanje na bakterijske celice je povezano s celično membrano. Žolč je bolj škodljiv za po Gramu pozitivne vrste, ki nimajo dodatne zunanje membrane, vendar pa škoduje tudi po Gramu negativnim vrstam, pri katerih žolčne soli lahko vstopajo v celice skozi porine. Žolčne soli povzročajo tudi porušenje stabilnosti makromolekul, saj sprožajo nastanek sekundarnih struktur v molekulah RNK, poškodbe molekul DNK ter aktivirajo encime, povezane s popravljanjem DNK. Bakterijske celice se ob izpostavitvi žolču skrčijo, poškoduje se celična membrana ter pride do uhajanja celičnega materiala (Begley in sod., 2005; van de Guchte in sod., 2002). Seveda pa so bakterije razvile različne mehanizme obrambe pred stresom zaradi žolčnih soli. Črevesna mikrobiota pretvori konjugirane žolčne kisline med njihovim prehodom skozi črevesje. Glavne spremembe so dekonjugacija, 7α-dehidroksilacija in 7α-dehidrogenacija. Na ta način nastajajo sekundarne žolčne kisline (slika 8a) (Begley in sod., 2005; Pavlović in sod., 2012).



Slika 8: (a) Kemijska struktura glavnih žolčnih kislin v človeškem črevesju. Primarne žolčne kisline se sintetizirajo v jetrih, v črevesu pa jih bakterijski encimi pretvorijo v sekundarne žolčne kisline. (b) Vse žolčne kisline pa so pred izločanjem konjugirane z glicinom ali taurinom s peptidno vezjo. (c) Žolčne kisline so amfipatske molekule, ki se združujejo v agregate, imenovane micerle, ki lahko razaplajo druge lipide (Begley in sod., 2005: 628).

Figure 8: (a) Chemical structure of major bile acids in human gut. Primary bile acids are synthesized in liver, but are modified in gut by bacterial enzymes into secondary bile acids. (b) All bile acids are conjugated with glycine or taurine before secretion. (c) Bile acids are amphipathic molecules, which are merged into aggregates called micelles, which can solubilise other lipid molecules (Begley et al., 2005: 628).

Škodljiv učinek žolčja na bakterijske celice je odvisen od njegove koncentracije ter vrst žolčnih kislin, ki ga sestavljajo. Vpliv pa ima tudi sestava bakterijske celice, predvsem njene membrane. Sprememba naboja, hidrofobnosti ali fluidnosti imajo pomemben vpliv na odpornost proti žolčnim solem (Chou in Cheng, 2000). Raziskave kažejo, da je odpornost proti žolču za sev specifična lastnost, saj opažajo veliko variabilnost v odpornosti med sevi iste vrste (Chateau in sod., 1994; Jacobsen in sod., 1999; Succi in sod., 2005). Mehanizmi zaznavanja stresa zaradi žolčja so neznani, vendar verjetno podobni dogajanju med izpostavitvijo ostalim stresom (Begley in sod., 2005).

Hidrolaza žolčnih soli (BSH) je encim, ki sodeluje pri dekonjugaciji žolčnih soli in ga pogosto najdemo v po Gramu pozitivnih vrstah, prisotnih v gastrointestinalnem traktu. Veliko probiotičnih sevov, s katerimi je bilo narejenih največ študij, ima več kot eno vrsto genov za BSH. Njihova funkcija ni popolnoma poznana, njihovo izražanje pa je najverjetneje odvisno od časa izpostavitve, vrste žolčnih soli ali fiziološkega stanja celice. Zakaj se bakterije poslužujejo dekonjugacije žolčnih soli, prav tako ni popolnoma znano. Najbolj razširjena je teorija, da je dekonjugacija detoksifikacijski mehanizem, ki igra vlogo pri preživetju v gastrointestinalnem traktu, vendar rezultati

vseh raziskav tega ne podpirajo. Razlog je lahko tudi v tem, da pri nizkih koncentracijah žolča, ki so jih uporabili v preteklih raziskavah, izražanje BSH ni nujno potrebno in obstaja možnost, da encimi BSH sodelujejo samo pri gliko-konjugiranih žolčnih soleh. Takšne dekonjugirane žolčne soli pri nizkem pH percipitirajo (Begley in sod., 2005; Begley in sod., 2006; Pavlović in sod., 2012). Posedovanje genov BSH je lahko na eni strani zaželena lastnost probiotikov, ker jim pomaga pri preživetju v neugodnih razmerah v črevesju in ker lahko zniža nivo holesterola, na drugi strani pa nezaželena, saj je velika količina dekonjugiranih žolčnih soli lahko škodljiva za gostitelja. Dekonjugirane žolčne soli so manj učinkovite pri emulgiranju lipidov in nastajanju micel, lahko povzročijo poškodbe DNK in so verjetno povezane s črevesnim rakom ali slabšim delovanjem črevesne sluznice, ki vodi do vnetja in driske. Dekonjugirane žolčne soli pa se lahko povežejo s holesterolom, ki precipitira s kalcijevimi solmi ter žolčnimi pigmenti, kar vodi v nastanek žolčnih kamnov. Vendar pa večina probiotičnih sevov ni sposobna dehidroksilacije dekonjugiranih žolčnih soli, zato se večina produktov encima BSH izloči (Begley in sod., 2006).

#### 2.2.2.6 Vpliv stresa prehoda skozi prebavila

Da probiotik lahko izkaže pričakovane učinke, mora prispeti živ na mesto delovanja. Med prehodom skozi prebavila so mikroorganizmi izpostavljeni stresnim dejavnikom. Začne se s stresom v želodcu, zaradi vzpostavitve nizkemu pH, ki je običajno med 1,5 in 4,5, odvisno od želodčne vsebine (Verdenelli in sod., 2009). Med postenjem pa lahko pH pade tudi do 1 (Corcoran in sod., 2008). Ta odgovor na stres je opisan v poglavju 2.2.2.4. V želodcu je prisoten tudi pepsin, proteolitični encim, ki lahko hidrolizira proteine na zunanjih bakterijskih membranah, kjer se nahajajo tudi proteini, pomembni za agregacijo in adhezijo. Sledi prehod v tanko črevo, kjer se sproščajo tudi ostali proteolitični in lipolitični encimi, prisotne pa so še žolčne soli, ki lahko uničijo bakterijsko membrano. Njihova koncentracija ni statična, ampak niha od 15 mM takoj po obroku v duodenumu, v jejunumu okrog 10 mM in v ileumu pade koncentracija žolčnih soli pod 4 mM zaradi absorpcije (Marteau in sod., 1997). Odgovor na stres, povezan z žolčnimi solmi, je opisan v točki 2.2.2.5.

Pomembno je tudi dejstvo, da si stres nizkega pH in žolčnih soli pri prehodu skozi prebavila sledita. Bakterijske celice so po izpostavitvi nizkemu pH poškodovane, zato lahko na stres ob izpostavitvi žolčnim solem odgovarjajo drugače kot nepoškodovane celice (Marteau in sod., 1997).

Na sevu *L. plantarum* WCFS1 so van Bokhorst-van de Veen in sod. (2012) pokazali, da sestava gojišča, faza rasti in potek fermentacije močno vplivajo na preživetje seva v simuliranih gastrointestinalnih razmerah. Našli so tudi 13 genov, potencialno povezanih s preživetjem. Veliko jih je povezanih s celično membrano, kar ni presenetljivo, saj je to prva obramba pred vplivi okolja.

#### 2.2.3 Navzkrižna odpornost proti stresnim dejavnikom

V bakterijah odgovor na stres sproži tako izražanje proteinov, specifičnih za prilagoditev na določeno vrsto stresa, kot tudi splošni odgovor na stres, zato ni presenetljivo, da se lahko hrati pojavi odpornost proti več vrstam stresa. Navzkrižna

odpornost namreč pomeni, da se ob predhodni prilagoditvi na eno vrsto stresa pojavi tudi odpornost proti eni ali več drugačnih oblik stresa (Vorob'eva, 2004). Navzkrižna odpornost je v veliki meri vrstno in tudi za sev specifična, kar nam pove, da je na molekularni ravni prilagoditev na stres lahko različna (van de Guchte in sod., 2002).

Pri laktobacilih so že dokazali obstoj navzkrižne odpornosti. Kim in sod. (2001) so pri *Lactobacillus acidophilus* pokazali, da se ob prilagoditvi na določen stres lahko poveča odpornost ali navzkrižna odpornost proti drugim vrstam stresa, vendar je ne sprožijo vse vrste stresa. Tako so ugotovili, da so bile celice laktobacilov, izpostavljene subletalnim koncentracijam žolča, odpornejše proti visokim temperaturam, vendar ne tudi proti NaCl, medtem ko je izpostavitev NaCl, oziroma s tem povezanim osmotskim stresom, izboljšala odpornost proti žolču ter visokim temperaturam. Predhodna izpostavitev visokim temperaturam pa ni sprožila navzkrižne odpornosti. Tudi Loca in de Valdez (1999) sta pri *L. acidophilus* pokazala boljšo odpornost proti različnim vrstam stresa, ki so jim bile bakterije izpostavljene med zamrzovanjem, izpostavljivo visokim temperaturam, osmotskemu stresu, etanolu, kislemu okolju ali vodikovemu peroksidu, če so bile celice v eksponentni fazi in gojene na nižji temperaturi ( $25^{\circ}\text{C}$ ) ali če so bile v stacionarni fazi rasti. Pri *Lactobacillus rhamnosus* GG pa so pokazali, da inkubacija pri povišanem tlaku sproži odpornost proti letalno visokim temperaturam (Ananta in Knorr, 2003). Pri *L. plantarum* so ob prilagoditvi na etanol opazili tudi odpornost proti visokim temperaturam, ne pa tudi proti drugim vrstam stresa (van Bokhorst-van de Veen in sod., 2011). V številnih raziskavah so skušali odgovoriti na vprašanje, ali izpostavitev kislemu pH ščiti pred zamrzovanjem. Rezultati nakazujejo izboljšanje preživetja zamrzovanja, če jih predhodno inkubiramo na znižanem pH pri sevu *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* vendar je učinkovitost odvisna od uporabljene kisline za zniževanje pH ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  je boljša od  $\text{HCl}$ ) (Streit in sod., 2007). Pri tem pride do sprememb v proteomu, nekatere izmed sprememb so povezane tudi z maščobnimi kislinami (Streit in sod., 2008). Podobno so tudi pri vrsti *L. acidophilus* dokazali, da ob znižanju pH na 5 sev boljše preživi zamrzovanje, pri tem pa pride do sprememb v maščobnih kislinah. Enaki rezultati so bili doseženi tudi ob znižanju temperature gojenja na  $30^{\circ}\text{C}$  (Wang in sod., 2005). Pri testiranju navzkrižne odpornosti med nizkim pH in liofilizacijo so ugotovili, da sevu *L. coryniformis* Si3 škoduje prilagoditev na nizek pH (pH 4,5) ali znižane temperature ( $26^{\circ}\text{C}$ ) pred liofilizacijo, saj se preživetje zmanjša. Povišane temperature pa niso imele vpliva ( $42^{\circ}\text{C}$ ) (Schoug in sod., 2008), medtem ko so pri sevu *L. reuteri* opazili pozitiven vpliv znižanega pH na preživetje liofilizacije (Palmfeldt in Hahn-Härdal, 2000). Na sevu *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* so preverjali korelacijo med pH in sušenjem z razprševanjem. Če pH tekom fermentacije ni bil nadzorovan (dovolili so padec na pH pod 4), je bilo preživetje sušenja z razprševanjem boljše (Silva in sod., 2005).

## 2.3 PREDNOST RASTI V STACIONARNI FAZI–GASP

### 2.3.1 Razmere v stacionarni fazi rasti

Bakterije v naravnem okolju preživijo večino časa v stacionarni fazi rasti. Do zaustavitve v rasti lahko pride zaradi kateregakoli stresa, ki poleg neposrednega stresnega vpliva na celico sproži tudi pomanjkanje enega ali več hranil. Primer je kisel pH, ki zmanjša aktivnost transporterjev in s tem povzroči pomanjkanje hranil, ker ti ne

prehajajo v celico. Prehod v stacionarno fazo rasti se zgodi tudi zaradi nakopičenja končnih produktov fermentacije (na primer mlečne kislina) ali stradanja, ko bakteriji zmanjka vsaj enega izmed esencialnih hranil. Večina bakterij je na dolgotrajno stacionarno fazo dobro prilagojena (van de Guchte in sod., 2002). Stradanie sproži različne spremembe v celici. Pri nekaterih po Gramu pozitivnih organizmih vodi v nastajanje spor, druge bakterije pa razvijejo povečano odpornost brez prehoda v speče stanje. Te celice vzdržujejo nizek metabolizem, ki jim omogoča viabilnost tudi več let (Zambrano in Kolter, 1996).

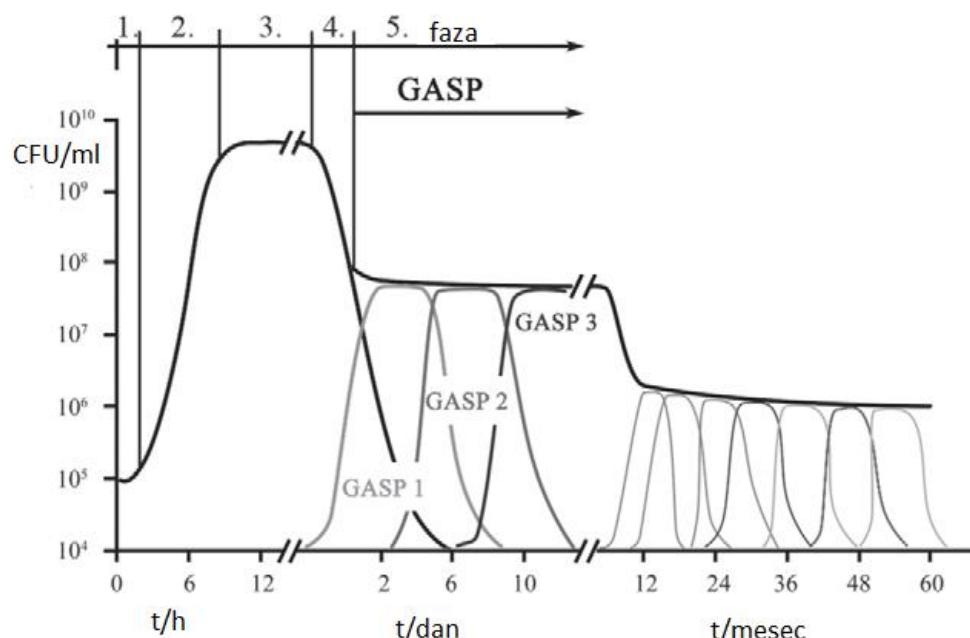
Odgovor na stradanje je lahko sprožen z nedostopnostjo različnih esencialnih hranil. Pomanjkanje ogljikovih hidratov je pogosto in najbolj preučeno, saj povzroči takojšnje pomanjkanje energije. Drugo limitirajoče hranilo je fosfat, ki je esencialen za sintezo DNK in RNK ter za oskrbovanje z energijo. Pomanjkanje dušika in aminokislin pa povzroči zmanjšanje sinteze proteinov (De Angelis in Gobbetti, 2004). Prehod v stacionarno fazo rasti sproži preusmeritev metabolizma v alternativne vire hranil in splošni odgovor na stres, s katerim bakterije postanejo odpornejše proti več različnim vrstam stresa (van de Guchte in sod., 2002). Stradane celice so običajno manjše kot normalno rastoče, njihova celična stena je trdneje povezana, citoplazma skoncentrirana in periplazmatski volumen povečan, kar poveča odpornost proti različnim vrstam stresa. Spremembe sproži prepisovanje genov za splošni odgovor na stres. Gen *rpoS* je zelo pomemben za prehod v stacionarno fazo pri *E. coli*, saj kodira transkripcijski faktor  $\sigma^S$ , ki nadzoruje prepisovanje velikega števila genov. Prepis *rpoS* pa nadzorujejo drugi dejavniki (Bačun-Družina in sod., 2011).

### 2.3.2 Prednost rasti v stacionarni fazi rasti in njen evolucijski pomen

Bakterijski življenjski cikel ima pet življenjskih faz. Prve tri faze so faza lag ali faza prilagajanja, ki nastopi takoj, ko celice prenesemo v sveže gojišče. Te so metabolno zelo aktivne in se večajo, vendar se še prilagajajo na nove razmere, zato se ne delijo. Druga faza je eksponentna ali logaritemská faza, ko se celice neprestano delijo in rastejo. Stopnja eksponentne faze je zelo odvisna od okoljskih dejavnikov, kot so temperatura, pH in dostopnost hranil ter od same bakterijske vrste. Tretja faza je stacionarna, nastopi pa, ko začne v gojišču primanjkovati hranil ali pa se kopijo toksični produkti. Vse tri faze so že zelo dobro poznane, sledijo jim manj poznani faza odmiranja in dolgotrajna stacionarna faza (slika 9). Kdaj nastopi katera izmed faz, je odvisno od gojišča in bakterijske vrste. V fazi odmiranja propade 99 % vseh celic. Preživele celice porabljajo material iz razpadlih celic, kot so aminokisline iz proteinov, ogljikovi hidrati iz celične stene, lipidi iz membran in tudi DNK. Po fazi smrti nastopi dolgotrajna stacionarna faza, v kateri lahko vzdržujemo bakterije zelo dolgo brez dodajanja hranil. Glede na znane raziskave naj bi kulture s koncentracijo  $10^6$  KE/ml lahko vzdrževali tudi 5 let. Ker je število celic je omejeno, ob nastajanju novih stare odmrejo (Finkel, 2006).

Poleg sprememb v izražanju genov, morfoloških in fizioloških sprememb se v dolgotrajni stacionarni fazi rasti dogajajo tudi genomske modifikacije. S tem je povezan pojav fenotipa prednosti rasti v stacionarni fazi ali GASP (ang. »growth advantage in stationary phase«). GASP je povezan s sposobnostjo dolgotrajno staranih celic, da prerastejo mlajše kulture, kar se dokazuje s poskusi z mešanimi kulturami, ki vsebujejo

različno stare celice. Pri *E. coli* se fenotip GASP pojavi že po 10 dneh. Prednost staranih celic pa ni v bolji prilagojenosti na stacionarno fazo, ampak je prednost genetska. To so dokazali s serijskim precepljanjem mutantov GASP, ki so kljub temu ohranili svojo prednost (Finkel, 2006). Ob dolgotrajnem gojenju v stacionarni fazi se nenehno pojavljajo novi mutanti z boljšo prilagoditvijo in sposobnostjo preživetja v neugodnih razmerah, zato je populacija dinamična (slika 9). Mutanti GASP imajo prednost, ki je lahko sposobnost učinkovitejše porabe hranil, pridobljenih iz mrtvih celic, zato hitro prerastejo izhodno kulturo. Po določenem času se pojavi uspešnejši mutant, ki prevlada (Bačun-Družina, 2011).



Slika 9: Rastna krivulja za nesporulirajoče bakterije s petimi fazami rasti (1. lag faza, 2. eksponentna faza, 3. stacionarna faza, 4. faza odmiranja, 5. dolgotrajna stacionarna faza) s pojavom različnih mutantov GASP (Bačun-Družina in sod., 2011: 14).

Figure 9: Growth curve of non-sporulating bacteria with five growth phases (1. lag phase, 2. exponential phase, 3. stationary phase, 4. death phase, 5. prolonged stationary phase) with appearance of GASP mutants (Bačun-Družina *et al.*, 2011: 14).

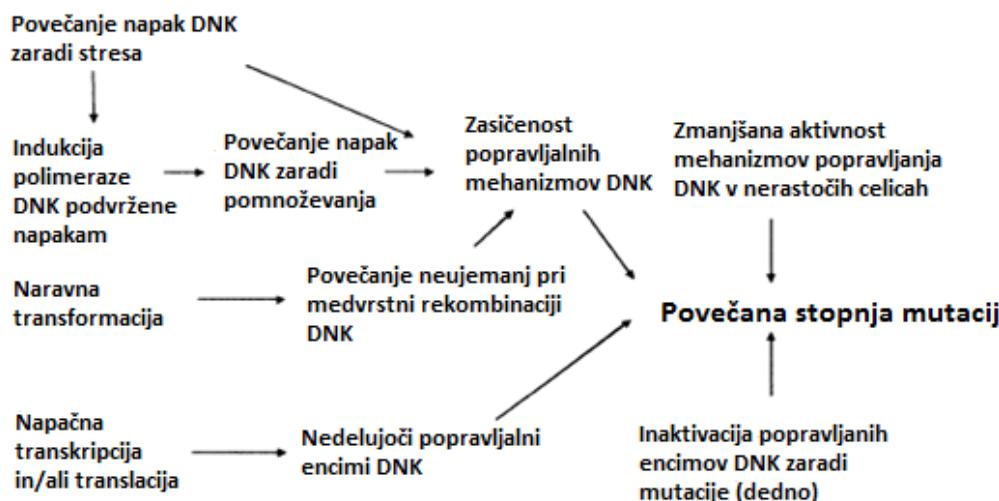
Evolucijski proces poteka tako, da se v populaciji pojavljajo novi aleli z naključnimi, spontanimi mutacijami. Če novi aleli omogočajo konkurenčno prednost v določenem okolju, lahko novi mutanti prerastejo ostale. Enak proces poteka v podaljšani stacionarni fazi rasti, zato se lahko uporablja tudi za študij evolucijskih procesov. Celice, ki preživijo podaljšano stacionarno fazo rasti, so med seboj zelo različne. Celice se fiziološko in morfološko prilagodijo, v tej fazi pa prihaja tudi do mutacij. Tiste, ki preživijo, imajo določeno prednost pred ostalimi in jih prerastejo (Vulić in Kolter, 2001; Zambrano in Kolter, 1996).

### 2.3.3 Mutacije, ki omogočajo GASP

Znano je, da se mutacije dogajajo naključno in da naravna selekcija daje prednost koristnim, vendar je večina mutacij nevtralnih ali celo neugodnih za celico, zato sevi ohranljajo nizek nivo mutacij. Sevom s povečanim številom mutacij pravimo mutatorji in jih najdemo tudi v naravnih populacijah, med drugim pri *E. coli* (Matic in sod., 1997). Hipermutacijsko stanje je dedno, pri čemer je povečanje mutacij lahko majhno (10–20 krat), visoko (100–1000 krat) ali zelo visoko ( $>1000$  krat) (Jayaraman, 2009, 2011). Pojavljanje mutatorjev je v naravi večje od pričakovanega, kar nakazuje, da je v določenih razmerah selekcijska prednost v povečanem številu mutacij. Veliko takšnih sevov najdemo pri patogenih bakterijah (Denamur in Matic, 2006). Giraud in sod. (2001) so dokazali, da se je 25 % mutatorjev prilagodilo na rast v mišjem gastrointestinalnem traktu in postal avksotrofov, medtem ko je bil delež pri nemutatorjih samo 5-odstotni.

Celice pa so sposobne tudi aktivne mutageneze, če so izpostavljene stresu, četudi ta ni mutagen. Tako povečano mutagenost, ki ni dedna, ampak samo prehodna, imenujejo adaptivna mutagenost, usmerjena ali s stresom povzročena mutageneza. V razmerah stacionarne faze rasti je število mutacij večje od teoretično pričakovane (Fonville in sod., 2011; Foster, 2007). Ob pomanjkanju hrani se celice v stacionarni fazi, ko se ne delijo, prilagodijo na okolje s pomnoževanjem števila genov, ki jih potrebujejo za rast, ali pa na ta način, da zamaknejo bralni okvir tako, da gen postane ponovno aktivен. Takšen primer je gen *lac* v *E. coli* (Clarins in Foster, 1991; Hersh in sod., 2004). S stresom povzročena mutageneza lahko povzroči razvoj odpornosti proti antibiotikom, omogoči bakterijam kolonizacijo novih gostiteljev, bakterije lahko pridobijo patogenost ali sposobnosti metabolizma novih produktov. Vsaj trije različni odgovori na stres morajo biti aktivirani, da se število mutacij poveča. Med njimi so odgovor na stres, povezan s celično ovojnico (Gibson in sod., 2010), splošni odziv na stres (Layton in Foster, 2003) ter odziv SOS na poškodbe DNK (McKenzie in sod., 2000).

Obstaja več načinov, kako celice pridejo do povečane stopnje mutacij (slika 10). Mehanizmi vključujejo k napakam podvrženo polimerazo DNK, zmanjšanje popravljalnih mehanizmov v celicah v stacionarni fazi rasti, povečano število neujemanj zaradi medvrstne rekombinacije, ki je posledica naravne transformacije, napačno transkripcijo in/ali translacijo ali pa so zaradi mutacije inaktivirani popravljalni encimi DNK. Slednji mehanizem je deden.

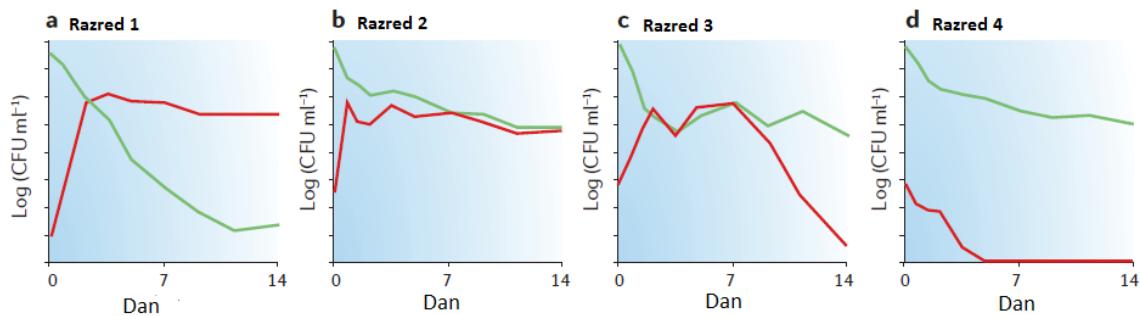


Slika 10: Mechanizmi, ki zmanjšujejo učinkovitost popravljanja DNK in omogočajo povečanje števila mutacij v stresnih razmerah (Kivisaar, 2003: 817).

Figure 10: Mechanisms, which are decreasing DNA repair mechanisms efficiency and are responsible for increasing of mutation rate in stress (Kivisaar, 2003: 817).

### 2.3.4 Dosedanja spoznanja o pojavu GASP

Pri testiranju pojava GASP se poslužujemo mešanih kultur, kjer je stara kultura v manjšini (na primer 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000 volumskega razmerja), kultura, ki je komaj dosegla stacionarni fazo (mlada kultura) pa je v presežku. Pri tem imamo več možnih izidov (slika 11). Če stara kultura popolnoma preraste mlajšo, temu pravimo močni GASP (razred 1, slika 11a). Razred 2 (slika 11b) fenotipa GASP pomeni, da obe kulturi sobivata v približno enakem številu. Pravimo mu tudi šibki GASP. V razredu 3 (slika 11c) manjšina celic sicer poveča svoje število, medtem ko ga mlada kultura zmanjša in kulturi nekaj časa sobivata, vendar stara kultura sčasoma izumre, zato mu pravimo spodleteli GASP. Razred 4 (slika 11d), ko stara kultura nima prednosti pred mlajšo, pa pomeni, da ni prišlo do pojava GASP (Bačun-Družina in sod., 2011; Finkel, 2006).



Slika 11: Štirje možni izidi poskusa GASP. V mešani kulturi starih celic (rdeča črta) in mladih (zeleni) lahko dobimo močni fenotip GASP (a, razred 1), šibki GASP (b, razred 2), spodleteli GASP (c, razred 3) ali pa ne dobimo fenotipa GASP (d, razred 4) (Finkel, 2006: 116).

Figure 11: Four possible outcomes of GASP experiment. In mixed culture of aged culture (red line) and young culture (green line) we can get strong GASP phenotype (a, Class 1), weak GASP (b, Class 2), abortive GASP (c, Class 3) or no GASP phenotype (d, Class 4) (Finkel, 2006: 116).

V tipičnem poskusu GASP skupaj kultiviramo celice, pridobljene iz kulture v pozni stacionarni fazi, in celice iz zgodnje stacionarne faze. Pri tem inokuliramo bistveno manj (1:100, 1:1000 ali 1:10000) celic stare bakterijske kulture kot celic mlajše kulture (v začetku stacionarne faze). Kadar stara kultura preraste mlajšo ali kulturi sobivata, kljub številčno slabšemu položaju stare kulture, lahko govorimo o pojavu GASP. Ta je posledica mutantov, ki nastanejo v stacionarni fazi in imajo prednosti rasti v razmerah stradanja. Tovrstni pojav je že precej raziskan pri po Gramu negativnih vrstah. Največ raziskav je bilo narejenih pri vrsti *E. coli* (Farrell in Finkel, 2003; Finkel in Kolter, 1999; Madan in sod., 2005; Rozen et al., 2009; Zambrano in sod., 1993; Zinser in sod., 2000). Sicer je pojav opisan tudi pri *Enterobacter cloacae*, *Salmonella enterica*, *Shigella dysenteriae*, *Providencia stuartii* (Martinez-Garcia in sod., 2003), *Pseudomonas aureofaciens* (Silby in sod., 2005), *Pseudomonas putida* (Tark in sod., 2005), *Geobacter sulfurreducens* (Helmus in sod., 2012), *Vibrio cholerae* (Paul in sod., 2004), *Vibrio fischeri* (Petrun in Lostroh, 2013) in *Xanthomonas oryzae* (Rajeshwari in sod., 1997). Dokazan pa je pojav GASP tudi v mešanih kulturah *E. coli* in *Salmonella enterica* (Bacun-Družina in sod., 2007). Veliko slabše je pojav o GASP raziskan na po Gramu pozitivnih vrstah. Prednost rasti v stacionarni fazi so preverjali pri vrstah *Mycobacterium smegmatis* (Smeulders in sod., 1999), *Listeria monocytogenes* (Bruno in Freitag, 2011), *Staphylococcus aureus*, *Bacillus globigii* in *Enterococcus faecalis* (Finkel et al., 2000). Pri laktobacilih pa tega pojava do sedaj še niso proučevali.

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 Gojišča in raztopine

###### 3.1.1.1 Raztopine

Pri pripravi gojišč in raztopin smo uporabljali izdelke proizvajalcev Sigma (Nemčija), Merck (Nemčija), Biolife (Italija) in Fluka (Švica).

Seznam uporabljenih raztopin:

- 0,5 M EDTA

V 1 litru dH<sub>2</sub>O smo raztopili 186,1 g Na<sub>2</sub>EDTA×2H<sub>2</sub>O. S peleti NaOH smo uravnali pH na 8,0 ali 9,5.

- 0,5 M Tris, pH 7,6

V 1 litru dH<sub>2</sub>O smo raztopili 60,55 g Tris base. S HCl smo uravnali pH na 7,6.

- TE pufer, pH 8

Sestavljen je iz 20 mM Tris-HCl in 50 mM EDTA.

- Pufer za protoplaste (PB)

V 1 litru dH<sub>2</sub>O smo zatehtali 171,2 g saharoze, 1,6 g TRIS-HCl ter 4,1 g MgCl<sub>2</sub>×6H<sub>2</sub>O ter mu pH uravnali na 6,5. Za pripravo protoplast pufra brez saharoze smo zatehtali vse sestavine razen saharoze (Singhvi in sod., 2010).

- 10x TBE

V 800 ml dH<sub>2</sub>O smo zatehtali 108 g Tris base, 55 g borove kisline in 7,5 g Na<sub>2</sub>EDTA×2H<sub>2</sub>O. Nato smo volumen uravnali na 1 liter. Če ostanejo neraztopljeni koščki, smo postavili raztopino v vročo kopel.

- TAE

Pripravili smo 50-kratno založno raztopino pufra. Za 1 liter smo zatehtali 242 g Tris base, kateremu smo dodali 57,1 ml ledocetne kisline ter 100 ml 0,5 M EDTA.

- Agarozni gel

Agarozo (Sigma, electrophoresis grade) smo zatehtali v 1x TAE pufer in raztopimo v mikrovalovni pečici. Preden gel vlijemo, mu dodamo 1µl barvila SybrSafe (Invitrogen) na 100 ml gela.

###### 3.1.1.2 Uporabljeni gojišča

Seznam uporabljenih gojišč:

- Agar MRS

V 1 litru dH<sub>2</sub>O smo raztopili 70,2 g mešanice agarja MRS, ki smo jo segrevali do vretja ter avtoklavirali pri 121 °C, 15 min.

- Gojišče MRS

V 1 litru dH<sub>2</sub>O smo raztopili 55,2 g mešanice MRS, ki smo jo segrevali do vretja ter za poskuse z nižjim pH uravnali na izbrano vrednost. Gojišče smo avtoklavirali pri 121 °C, 15 min.

- Gojišče MML

V 1 litru dH<sub>2</sub>O smo zatehtali 10 g kazein peptona, 5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 g amonijevega citrata, 2 g natrijevega acetata, 0,1 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,05 g MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O ter 1 g Tween 80. Gojišče smo avtoklavirali na 121 °C, 15 min ter v ohlajeno gojišče dodali 4 g sterilne glukoze.

- Agar Mueller Hinton + MRS

V 1 litru dH<sub>2</sub>O smo zatehtali 34,2 g Mueller-Hinton agarja II ter 7,02 g agarja MRS. Mešanico smo segrevali do vretja ter ji umerili pH na 6,7. Agar smo avtoklavirali na 121 °C, 15 minut.

- Gojišče MRS-MOPS

V 1 litru dH<sub>2</sub>O smo raztopili 55,2 g mešanice MRS, ki smo jo segrevali do vretja ter ji dodali še 0,2 M MOPS ter pH uravnali na 7. Gojišče smo avtoklavirali pri 121 °C, 15 min.

- Gojišče MRS z variacijami

Za poskuse z različnimi viri sladkorjev smo pripravili MRS osnovno, ki je sestavljena iz 10 g/l kazein peptona, 5 g/l kvasnega ekstrakta, 2 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 g/l Tween 80, 5 g/l natrijevega acetata, 2 g/l amonijevega citrata, 0,2 g/l MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O ter 0,05 g/l MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O. Mešanico smo avtoklavirali na 121 °C, 15 min ter v ohlajeno dodali ustrezne sterilne raztopine sladkorjev rafinoza, lakteza, fruktoza ali glukoza (10 g/l).

- Gojišče 2TY

V 1 litru dH<sub>2</sub>O smo zmešali 16 g kazein peptona, 10 g kvasnega ekstrakta, 5 g NaCl in z NaOH uravnali pH na 7,0 (Sambrook in Russell, 2001).

- Agar 2TY

V 1 litru dH<sub>2</sub>O smo zmešali 16 g kazein peptona, 10 g kvasnega ekstrakta, 5 g NaCl in z NaOH uravnali pH na 7,0. Pred avtoklaviranjem smo mešanici dodali še 15 g/l agarja in avtoklavirali na 121 °C 20 min.

### 3.1.2 Antibiotiki in indikatorji

Preglednica 1: Seznam uporabljenih antibiotikov in indikatorjev.

Table 1: List of antibiotics and indicators used in our experiments.

Antibiotik /indikator	Proizvajalec	Topilo	Uporabljena koncentracija (µg/l)
<b>ampicilin</b>	Gentham Life Sciences	dH <sub>2</sub> O	100
<b>kanamicin</b>	Fisher	dH <sub>2</sub> O	25
<b>monosulfat</b>	BioReagents		
<b>kloramfenikol</b>	Sigma	dH <sub>2</sub> O	180
<b>IPTG</b>	Acros Organics	dH <sub>2</sub> O	10
<b>X-gal</b>	Sigma	DMSO	30

### 3.1.3 Bakterijski sevi

Preglednica 2: Bakterijski sevi in njihove lastnosti.

Table 2: Bacterial strains and their characteristics.

vrsta	sev	izvor
<i>Lactobacillus plantarum</i>	KR6	Lastni izolat iz kisle repe (ta študija)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	KR3	Lastni izolat iz kisle repe (ta študija)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	M5	Mikrobske zbirke Laboratorijske za tehnologijo antibiotikov, encimov, pribiotikov in starterskih kultur (Zagreb) – izolat iz sira
<i>Lactobacillus plantarum</i>	299v	Komercialni probiotik
<i>Lactobacillus plantarum</i>	B-4496	Mikrobska zbirka ARS (NRRL) – tipski sev (=ATCC 14917 <sup>T</sup> )
<i>Lactobacillus plantarum</i>	SF9	Mikrobska zbirka Laboratorijske za tehnologijo antibiotikov, encimov, pribiotikov in starterskih kultur (Zagreb)
<i>Enterococcus faecalis</i>	S1-17	Mikrobska zbirka Laboratorijske za tehnologijo antibiotikov, encimov, pribiotikov in starterskih kultur (Zagreb)
<i>Escherichia coli</i>	K17	Mikrobska podjetja Acies bio

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Osamitev in ugotavljanje lastnosti novih sevov laktobacilov

#### 3.2.1.1 Osamitev novih sevov, gojenje in shranjevanje

Nove seve smo pridobili iz tekočine kisle repe, kislega mleka ali kislega zelja. Serijske razredčitve v fiziološki raztopini smo nanesli na agar MRS in inkubirali za 48 ur pri 37 °C v anaerobnih škatlah (Genbox, Biomerieux, Francija). Vse bele okrogle kolonije smo prečistili na gojišču MRS, posamezne kolonije pa precepili v tekoče gojišče MRS. Celice za shranjevanje smo pridobili s centrifugiranjem in resuspendiranjem usedline v bujonu MRS s 30 % glicerola.

Za namnoževanje biomase smo kulture gojili pri 37 °C v tekočem gojišču MRS, v mikroaerofilnih razmerah, petrijeve plošče pa smo inkubirali v anaerobnih razmerah. Kulture smo shranjevali v bujoni MRS s 30 % glicerola pri -80 °C, za daljše obdobje, oziroma pri -20 °C, za krajše obdobje.

#### 3.2.1.2 Izolacija genomske DNK in določanje vrste s sekvenciranjem dela gena za 16S rRNK

- Priprava elektrokompetentnih celic sevov *E. coli* DH10β

Za pripravo elektrokompetentnih celic smo sev *E. coli* DH10β, shranjen pri temperaturi -80 °C, nacepili na agarne plošče 2TY in inkubirali preko noči pri temperaturi 37 °C. S posameznimi kolonijami smo inokulirali 7 ml gojišča 2TY in inkubirali s stresanjem preko noči pri temperaturi 37 °C (200 rpm). S tem inokulumom smo inokulirali 2 litrske Erlenmayerjeve steklenice s 400 ml gojišča 2TY (1 % inokulum). Celice smo gojili 2–3

ure s stresanjem (37 °C, 220 rpm). Celice so bile pripravljene, ko je OD<sub>600</sub> dosegel 0,9. Takrat smo celice v kivetah postavili na led za 20 min in centrifugirali (4 °C, 4000 rpm, 10 min). Po centrifugiranju smo celice dvakrat spirali z dH<sub>2</sub>O z 1 mM HEPES pH 7,0 in enkrat z 97,5 ml 10 % glicerolom z 1 mM HEPES pH 7,0 z vmesnim centrifugiranjem po vsakem koraku (4 °C, 4000 rpm, 10 min). Po zadnjem centrifugiranju so bile celice resuspendirane v 2,5 ml 10 % glicerola/1 mM HEPES pH 7,0. Tako pridobljeno raztopino celic smo razdelili v paralelke po 40 µl in jih shranili pri temperaturi -80 °C za nadaljnje poskuse.

- izolacijo genomske DNK *L. plantarum* sevov

Za izolacijo genomske DNK smo shranjene seve namnožili preko noči (16 ur) in inkubirali pri 37 °C v mikroaerofilnih razmerah. Nato smo sveže gojišče MRS inokulirali z 10 % prekonočne kulture ter jih gojili 5 ur pri 37 °C v mikroaerofilnih razmerah, da smo dobili celice v logaritemski fazi rasti. Celice smo izločili iz gojišča s centrifugiranjem. Genomsko DNA smo pridobili s pomočjo kompleta reagentov PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, ZDA). Izolacija je potekala v skladu z navodili izdelovalca kompleta, le da smo podaljšali inkubacijo z lizocimom na 45 min. Vsa spiranja smo opravili dvakrat.

Del gena za 16S rRNK smo namnožili z verižno reakcijo s polimerazo (PCR), v kateri smo uporabili začetna oligonukleotida P1 (5'-GCGGCCTGCCTAATACATGC ) in P4 (5'-ATCTACGCATTCAACCGCTAC) (Klijn in sod., 1991). Pomnožek PCR smo očistili s komercialnim kompletom reagentov Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, ZDA). A-repi so bili dodani s polimerazo DreamTaq (30 µl očiščenega PCR-produkta, 5 µl PCR-pufra, 4 µl dNTP, 1 µl polimeraze DreamTaq (Thermo Scientific, ZDA), 72 °C, 30 min). Pomnožek PCR smo ponovno očistili. Očiščen produkt smo ligirali s kompletom TA Colonizing (Invitrogen, ZDA) (2 µl PCR 2.1 vektorja, 1 µl ligaze, 1 µl pufra za ligacijo, 6 µl očiščenega PCR-produkta, čez noč na 4 °C) ter izvedli elektroporacijo s predpripravljenimi kompetentnimi celicami *E. coli* DH10β. 2 µl ligacijske reakcije smo dodali kompetentnim celicam, jih obdelali z elektroporacijo, zmešali z 1 ml gojišča 2TY ter inkubirali 45 min pri 37 °C. Celice smo izločili s centrifugiranjem (5000 rpm, 3 min), pri čemer smo 800 µl supernatanta zavrgli. Preostanek je bil resuspendiran in nacepljen na agar 2TY z X-gal, IPTG in kanamicinom (preglednica 1). Plošče z agarjem smo inkubirali čez noč pri 37 °C. Zrasle posamezne bele kolonije smo preko noči gojili pri 37 °C v tekočem gojišču 2TY z ampicilinom (preglednica 1). Plazmide smo izolirali iz kulture s pomočjo kompleta reagentov GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma, ZDA). Restrikcija je bila narejena z encimom EcoRI (Fast Digest, Thermo Scientific, ZDA) in fragmenti, pregledani na agaroznem gelu (dolžina približno 700 bp). Po 6 fragmentov vsakega seva, ki so imeli pravo dolžino, smo poslali na sekvenciranje (Macrogen, Seoul, Korea). Pridobljena zaporedja smo s pomočjo orodja NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) primerjali z zaporedji v genski banki NCBI ter na podlagi tega ugotovili vrsto.

### 3.2.1.3 Primerjava sevov z gelsko elektroforezo v pulzirajočem polju (PFGE)

Šest sevov *L. plantarum* smo gojili preko noči v gojišču MRS z 10 g/l glicina (0,1 % inkulum, 37 °C) in jim naslednji dan dodali kloramfenikol (preglednica 1) in inkubirali še dodatno uro pri 37 °C. Bakterijske celice smo izločili s pomočjo centrifugiranja in jih sprali s pufrom za protoplaste brez saharoze, v skladu s protokolom za pripravo protoplastov (Singhvi in sod., 2010). Naslednje spiranje je potekalo s pufrom za protoplaste s saharozo (PB). Usedlino s celicami smo resuspendirali v 500 µl PB ter prenesli 100 µl v 400 µl PB z dodanim lizocimom (10 mg/ml) in mutanolizinom (40 U/ml). Celice smo inkubirali 2 uri pri 37 °C ter jim nato dodali 500 µl 2 % agaroze z nizkim tališčem (Biorad, ZDA). Z mešanico smo napolnili model za pripravo agaroznih blokov. Ko so se strdili, smo jih odstranili iz modela in prenesli v pufer za lizo (6 mM Tris-HCl, pH 7,6, 1 M NaCl, 0,5 M EDTA, 1 % natrijev lauril sarkozin, lizocim 5 mg/ml) za 60 min pri 37 °C. Bloke smo nato dvakrat po 15 minut spirali s 50 mM EDTA (pH 9,5) in prenesli v pufer (25 mM EDTA, pH 9,5, 1 % natrijev lauril sarkozin) s proteinazo K (1 mg/ml). Po 24 urah inkubacije na 50 °C z rahlim mešanjem smo bloke sprali 4-krat po 30 min na ledu s TE-pufrom (pH 8). Bloke smo nato do uporabe hranili pri 4 °C v 0,5 M EDTA (pH 9,5). Pred restrikcijo smo jih 3-krat po 30 min na ledu spirali s sterilno ddH<sub>2</sub>O in nato še za 30 min na sobni temperaturi z restrikcijskim pufrom. Restrikcijo smo izvedli z restrikcijskim encimom *SfiI* (5 µl/blok, Thermo Scientific, ZDA). Fragmente DNK smo ločili v 1-odstotnem agaroznem gelu s Chef Mapper elektroforeznim sistemom (Biorad, ZDA). Elektroforeza je potekala 23 ur in 52 min v 0,5-kratnem TBE-pufru na 14 °C. Začetni pulzni čas je bil 1,19 s in končni 63,80 s. Po končani elektroforezi smo gel barvali 1 uro v TBE-pufru z dodanim barvilom za barvanje gelov (SaybrSafe, Invitrogen, ZDA).

### 3.2.1.4 Odpornost proti antibiotikom

Ugotavljni smo minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) antibiotikov ampicilin (AM), gentamicin (GM), kanamicin (KM), streptomicin (SM), eritromicin (EM), klindamicin (CM), kloramfenikol (CL), vankomicin (VA) in tetraciklin (TC), ki jih navajajo v smernicah EFSA za ugotavljanje občutljivosti bakterijskih sevov za antibiotike (2012). V vsako ploščo s polmerom 9 cm smo nalili 25 ml trdnega gojišča Mueller Hinton (90 %) + MRS (10 %). Plošče z agarjem smo dobro osušili ter nanesli prekonočne celice kultur, ki smo jih zbrali s centrifugiranjem in resuspendirali v fiziološki raztopini, da smo dosegli OD pri 600 nm okoli 0,3. Na vsako ploščo smo s sterilno vatirano palčko nacepili 100 µl suspenzije ter na površino položili po en trak za gradientom antibiotikov E-Test® (BioMerieux, Francija) (slika 12). Plošče smo inkubirali 48 ur pri 37 °C v anaerobnih razmerah in rezultate interpretirali v skladu z navodili proizvajalca ter priporočili EFSA (2012).



Slika 12: Ugotavljanje antibiotične odpornosti s pomočjo E-test®-a.

Figure 12: Antibiotic resistance determination with use of E-test®.

### 3.2.2 Stres, povezan s stacionarno fazo rasti

#### 3.2.2.1 Pridobitev kultur v stacionarni fazi rasti

Vse seve smo nacepili v gojišče MML. Uporabili smo 2,5 % inokulum in jih gojili v mikroaerofilnih razmerah (tesno zaprta centrifugirka) pri 37 °C brez stresanja. Po 16, 23 in 30 dneh od začetka inkubacije smo določili število preživelih bakterij s štetjem na ploščah ter shranili vzorec kulture za nadaljnje poskuse (slika 13).



Slika 13: Ugotavljanje števila preživelih bakterij *L. plantarum* (KE/ml) s štetjem KE na gojišču MRS.

Figure 13: Determination of number of survived *L. plantarum* (CFU/ml) by plate counting on MRS agar.

### 3.2.2.2 Rast na različnih gojiščih

Bakterijske kulture *L. plantarum* sevov KR3, KR6, M5, SF9, B-4496 in 299v smo gojili v gojišču z različnimi sladkorji ter rezultate rasti primerjali z rastjo v gojišču z glukozo (razmerje OD izbranega sladkorja z OD na glukozi po 8 urah rasti). Enako smo storili tudi za kulture istih sevov, ki so bile predhodno izpostavljene stresu zaradi dolgotrajne stacionarne faze, kjer smo testirali rast posameznih kolonij – pri čemer smo kulture dolgotrajne stacionarne faze nacepili do posameznih kolonij. V vsako od 96 vdolbin na sterilni mikrotitrski ploščici smo vnesli 190 µl gojišča (MRS z različni sladkorji) ter 10 µl prekonočne kulture v gojišču MRS, ki smo jo predhodno centrifugirali ter resuspendirali v sterilni fiziološki raztopini (0,9-odstotni NaCl), da smo odstranili morebitne ostanke glukoze, ki je bila prisotna v gojišču MRS. Mikrotitrskie ploščice smo inkubirali pri 37 °C ter merili absorbanco ( $A_{600}$ ) vsako uro do 8 ur od začetka inkubacije. Iz pridobljenih meritev smo izrisali rastne krivulje, ki smo jih primerjali z rastjo v gojišču z glukozo (kontrola).

### 3.2.2.3 Postavitev GASP poskusov

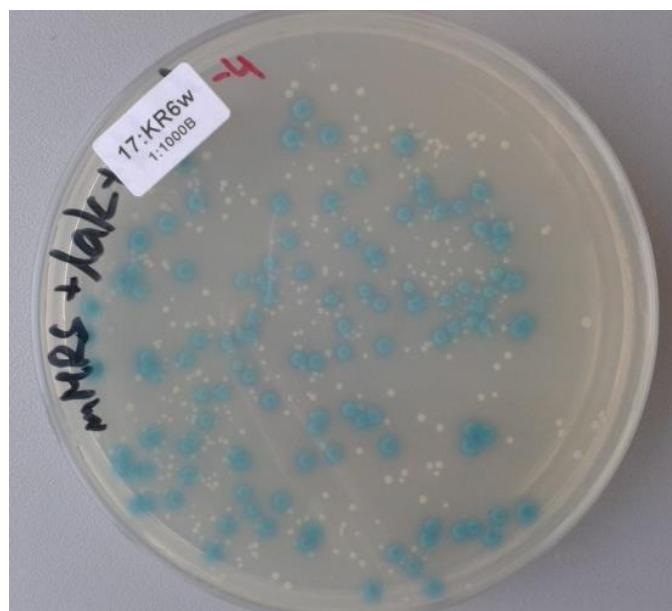
#### 3.2.2.3.1 Poskusi z mešanimi kulturami laktobacilov in *E. coli*

Za ovrednotenje prednosti rasti v stacionarni fazi smo uporabili gojišče MML, v katerega smo inokulirali 1 % zamrznjene kulture (pridobljene iz dolgotrajne stacionarne faze ali divji tip) in inkubirali 24 ur pri 37 °C. Kulture smo nato združili v različnih razmerjih (1:1, 1:100, 1:1000 in 1:10.000). Tako pridobljene mešane kulture smo gojili pri 37 °C v mikroaerofilnih razmerah do 30 dni. Kadar smo želeli preprečiti neposredni stik med celicami različnih kultur, smo uporabili mikrotitrskie ploščice s 6 vdolbinami, v

katere smo vstavili vstavke s polikarbonatno membrano. V notranjost vstavka smo vnesli po 3 ml prve kulture, v spodnji del vdolbine pa drugo kulturo, v razmerjih kot je opisano zgoraj. Kot kontrole so bile uporabljene centrifugirke. Vzorčili smo v ustreznih intervalih ter s pomočjo štetja na ploščah ugotavljali število preživelih. Za laktobacile smo uporabili agar MRS, za *E. coli* K17 pa agar 2TY.

### 3.2.2.3.2 Poskusi z mešanimi kulturami laktobacilov in *E. faecalis*

Podobno kot v poskusih z *E. coli* smo tudi v poskusih pojava GASP v mešanih kulturah laktobacilov in *E. faecalis* S1-17 uporabili gojišče MML, v katerega smo inokulirali 1 % zamrznjene kulture (pridobljene iz dolgotrajne stacionarne faze ali divji tip) in inkubirali 24 ur pri 37 °C. Seve smo nato združili v različnih razmerjih (1:1, 1:100, 1:1000, 1:10.000 in 1:100.000). Mešane kulture smo gojili pri 37 °C v mikroaerofilnih razmerah do 30 dni. V ustreznih intervalih smo vzorčili in nacepljali na agar MRS z laktozo in X-gal (preglednica 1). *E. faecalis* S1-17 na ploščah zraste kot majhna bela kolonija, *L. plantarum* pa kot večja modra kolonija (slika 14).



Slika 14: Primer izgleda kolonij *L. plantarum* (modre kolonije) in *E. faecalis* S1-17 (bele kolonije) na gojišču MRS z laktozo in X-gal.

Figure 14: Example of appearance of *L. plantarum* colonies (blue colonies) and *E. faecalis* S1-17 (white colonies) on MRS medium with lactose and X-gal.

### 3.2.2.4 Preživetje v simuliranih razmerah prebavil

Zamrznjene kulture (divjega tipa ali kulture iz bakterij, odvzetih v dolgotrajni stacionarni fazi rasti) smo nacepili v gojišče MRS (1 % inokulum) in jih gojili preko noči. Prekonočno kulturo smo centrifugirali in resuspendirali v 2 ml sterilne fiziološke raztopine. V 9,5 ml simuliranega želodčnega soka (125 mM NaCl, 7 mM KCl, 45 mM NaHCO<sub>3</sub>), pripravljenega kot opisano v Fernandez in sod. (2003), s pH 2,4, smo dodali 0,5 ml suspenzije bakterij. Gojili smo pri 37 °C in vzorčili vsakih 90 min ter serijske razredčitve nacepljali na agar MRS. Po 180 minutah smo simuliran želodčni sok

zamenjali s simuliranim črevesnim sokom, ki je imel pH 8, vseboval pa tudi 0,1 % pankreatina in različne koncentracije žolča (0,1 do 0,3 %). Kot kontrolo smo uporabili sterilno fiziološko raztopino.

### 3.2.3 Odpornost proti nizkim vrednostim pH

#### 3.2.3.1 Testiranje odpornosti proti nizkim vrednostim pH

Glede na rezultate odpornosti proti antibiotikom, rasti na različnih sladkorjih in sekvenciranja, smo poskuse, povezane s kislim pH, nadaljevali samo z dvema sevoma, ki sta pokazala najbolj obetavne probiotične lastnosti, in sicer *L. plantarum* KR6 in M5.

Za testiranje odpornosti proti kislemu pH smo prekonočne kulture centrifugirali, sprali s sterilno fiziološko raztopino in alikvote kultur inkubirali v pufru (125 mM NaCl, 45 mM NaHCO<sub>3</sub>, 7 mM KCl) s pH, uravnanim s 3 M HCl na vrednosti 2,1 do 2,6. Kot kontrolo smo uporabili sterilno fiziološko raztopino. Število (KE/ml) smo ugotavljali v vzorcih, odvzetih po 1,5 in 3 urah, s štetjem na ploščah. Plošče smo inkubirali pri 37 °C za 48 h, v anaerobnih razmerah.

#### 3.2.3.2 Prilagoditev na kisel pH

Za testiranje sposobnosti prilagoditve sevov na kisel pH smo uporabili 5-odstotni inokulum prekonočne kulture v gojišču MRS-MOPS. Seva smo gojili do pozne logaritemske faze (6 h, 37 °C) z vmesnim uravnavanjem pH z 12,5-odstotnim amonijevim hidroksidom. Gojišče smo nato odstranili s centrifugiranjem, sprali s sterilno fiziološko raztopino ter alikvote resuspendirali v gojišču MRS z različnim pH od 2 do 7 (uravnano s HCl), v katerem smo seve inkubirali 30 min. Sledilo je ponovno spiranje in inkubacija v gojišču MRS s pH 2. Vzorčili smo vsakih 30 min ter ugotavljali število kolonijskih enot (KE/ml).

#### 3.2.3.3 Izolacija RNK, obdelava z DNazo in prepis v cDNA

Za izolacijo RNK smo izvedli poskus prilagoditve na kisel pH. Kulture sevov M5 in KR6 smo gojili v gojišču MRS-MOPS (5 % inokulum prekonočne kulture) pri 37 °C 6 ur z uravnavanjem pH na 7, z 12,5 % amonijevim hidroksidom. Po 6 urah smo kulturo razdelili na 3 dele, sprali s sterilno fiziološko raztopino ter resuspendirali v gojišču MRS z različnimi pH (pH 7, 4,5 ter 2,5 za KR6 ter pH 7, 5 ter 2,5 za M5). Vzorci za izolacijo RNK so bili odvzeti ob času 0 ter po 30 min inkubacije pri različnih vrednostih pH.

1,5 ml celične kulture smo prenesli v mikrocentrifugirke s 800 mg cirkonijevih kroglic (premer 0,1 mm) ter centrifugirali (30.000 rpm, 1 min). Pelet s cirkonijevimi kroglicami smo nato takoj resuspendirali v 1 ml Trizola (Ambion, ZDA) in razbili celice s stresalnikom s kroglicami (ang. »bead beater«) (3-krat po 60 s z vmesnimi inkubacijami na ledu po 5 min). Homogenizirano mešanico smo centrifugirali ter supernatant prenesli v MaXtract mikrocentrifugirke (Qiagen, Nemčija) skupaj z 200 µl kloroform, rahlo premešali ter inkubirali 3 min na sobni temperaturi ter 3 min na ledu. Po centrifugiranju smo preneseli zgornjo vodno fazo v svežo mikrocentrifugirko ter ji dodali etanol (55 %

v/v) in mešanico prenesli v RNeasy kolono iz kompleta (Qiagen, Nemčija), navodilom katerega smo sledili v naslednjih korakih. Koncentracija in čistost izolirane RNK smo preverili z meritvijo absorbance 260/280 nm (NanoVue spektrofotometer, VB). Sledila je obdelava z DNazo s kompletom reagentov Turbo DNA-free (Ambion, ZDA) ter cDNK sinteza s kompletom RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific, ZDA).

### 3.2.3.4 PCR v realnem času (qPCR)

Vsaka analiza z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (qPCR) je bila izvedena v 20 µl reakcijski mešanici sestavljeni iz 10 µl SYBR Green Master Mix (Thermo Scientific, ZDA), 3 µl vode brez nukleaz, 1µl vsakega začetnega oligonukleotida (10 µM, preglednica 3) in 5 µl cDNK (1 ng/µl). Negativne kontrole brez cDNK so bile dodane v vsaki seriji za vse pare začetnih oligonukleotidov. Prav tako smo preverili uspešnost obdelave z DNAzo ter izvedli reakcije z referenčnim genom na vzorcih RNK po obdelavi z DNAzo. Vsak cikel qPCR je bil sestavljen, kot je opisano v preglednici 4. Relativno izražanje genov smo izračunali po metodi  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Livak in Schmittgen, 2001) z normalizacijo na pH 7 ter uporabo referenčnega gena *gapB*.

Preglednica 3: Seznam začetnih oligonukleotidov za vrsto *L. plantarum* (Duary in sod., 2010), uporabljenih v reakcijah qPCR.

Table 3: List of primers used in qPCR reaction for *L. plantarum* species (Duary *et al.*, 2010).

Tarčni gen		Ime začetnega oligonukleotida	Nukleotidno zaporedje	Velikost produkta PCR (bp)
gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza	<i>gapB</i>	gapB_147_F	actgaatttagttgttatcttagac	147
		gapB_147_R	gaaagtatgtaccgataacatcaga	
FoF1-ATP sintaza podenota alfa	<i>atpA</i>	atpA_110_F	ccaggtcgtaagcttatcc	110
		atpA_110_R	ggtaaggccgtcattgaacc	
ciklopropan maščobno-acil-fosfolipidna sintaza	<i>cfaI</i>	cfaI_150_F	acgacacctgttgtcgcacctg	150
		cfaI_150_R	agggggctatatccaaatg	
malat dehidrogenaza	<i>mleS</i>	mleS_140_F	acaagggtctcagcgttcagc	140
		mleS_140_R	gactgggattcccgactgatg	
histidinol dehidrogenaza	<i>hisD</i>	hisD_150_F	tgaaccactcggtgactacg	150
		hisD_150_R	ggagcttccttagccaaagc	

Preglednica 4: Reakcijski parametri za qPCR.

Table 4: qPCR thermal cycling conditions.

Protokol		Temperatura (°C)	Čas
Začetni koraki	Začetna denaturacija	50	2 min
		95	10 min
40 ciklov	Denaturacija	95	30 s
	Prileganje	54	30 s
	Podaljševanje	72	40 s
Program talilne krivulje		95	1 min
		55	30 s
		95	30 s

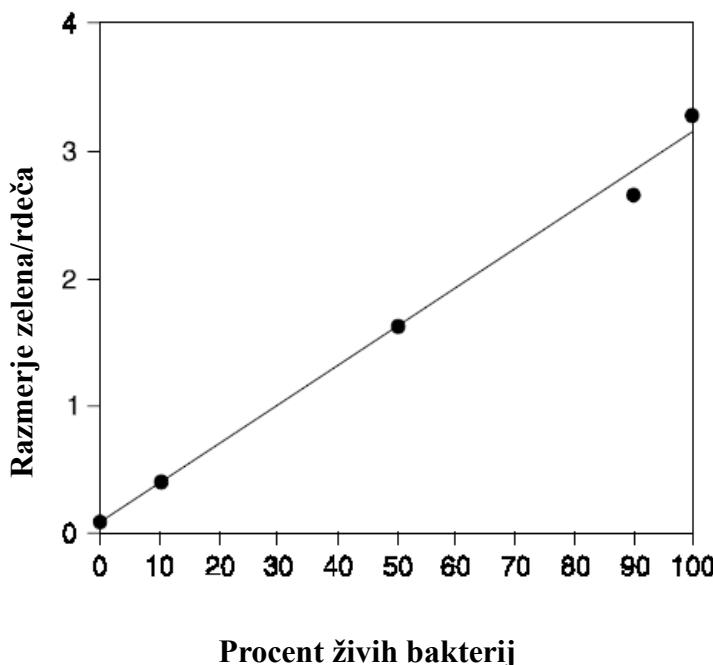
### 3.2.3.5 Ugotavljanje živosti in integritete celične membrane

Za preverjanje živosti in integritete bakterijske membrane smo izvedli poskus prilagoditve na kisel pH. Kulture sevov M5 in KR6 smo gojili v gojišču MRS-MOPS (5 % inokulum prekonočne kulture) pri 37 °C z uravnavanjem pH na 7 z 12,5 % amonijevim hidroksidom. Po šestih urah smo kulturo razdelili na 3 dele, sprali s sterilno fiziološko raztopino ter resuspendirali v gojišču MRS z različnimi pH (pH 7, 4,5 ter 2,5 za KR6 ter pH 7, 5 ter 2,5 za M5). Po 30 minutah izpostavitve smo vzeli po 500 µl vzorcev za barvanje, sprali s fiziološko ter pelet resuspendirali v 2 ml sterilne fiziološke raztopine. V vdolbine na mikrotitrski ploščici smo nanesli po 100 µl kulture ter 100 µl barvila Live/Dead® Baclight™ (Bacterial Viability Kit, Molecular Probes, ZDA).

Za umeritveno krivuljo smo uporabili po 1 ml vzorca kulture po 6 urah gojenja v gojišču MRS-MOPS. Vzorec smo centrifugirali in pelet resuspendirali v 200 µl sterilne fiziološke raztopine. 100 µl vzorca smo dodali k 900 µl sterilne fiziološke raztopine ter preostalih 100 µl k 900 µl 70-odstotnega izopropanola. Obe alikvoti smo 1 uro inkubirali na sobni temperaturi z občasnim mešanjem. Vzorce smo nato centrifugirali in 2-krat sprali s sterilno fiziološko raztopino. Po zadnjem centrifugiranju smo pelet resuspendirali v 2 ml sterilne fiziološke raztopine. Iz alikvot smo pripravili vzorce z različnim razmerjem (0, 10, 50, 90 in 100 %) živih (inkubiranih v fiziološki raztopini) in mrtvih celic (inaktiviranih v izopropanolu). V vdolbine na mikrotitrski ploščici smo nanesli po 100 µl vzorca in 100 µl barvila Live/Dead® Baclight™ (Bacterial Viability Kit, Molecular Probes, ZDA). Mešanico smo inkubirali 15 min v temi na sobni temperaturi. Eksitacija je potekala pri 485 nm, emisija pa pri 530 nm in 630 nm (Tecan Safire 2, Švica).

Komplet Live/Dead® Baclight™ (Bacterial Viability Kit, Molecular Probes, ZDA) vsebuje barvili SYTO®9 in propidijev jodid. SYTO®9 lahko vstopi v vse bakterijske celice in se veže na nukleinske kisline, pri čemer oddaja zeleno fluorescenco. Propidijev jodid pa lahko vstopi le v celice s poškodovano membrano, kjer se prav tako veže na nukleinske kisline, pri čemer oddaja rdečo fluorescenco. Pri uporabi mešanice obeh barvil nepoškodovane bakterije oddajajo zeleno fluorescenco, poškodovane pa rdečo (Molecular Probes, 2004).

Za izris umeritvene krivulje smo izračunali razmerje med zeleno in rdečo emisijo istega vzorca. Dobiti moramo linearno umeritveno krivuljo (slika 15). Živost bakterij v tretiranih vzorcih pa smo dobili z odčitavanjem z umeritvene krivulje.



Slika 15: Primer umeritvene krivulje, ki jo dobimo s fluorescenčno spektroskopijo (Molecular Probes, 2004: 4).

Figure 15: Example of standard curve drawn from fluorescence spectroscopy measurements (Molecular Probes, 2004: 4).

### 3.2.4 Poskusi za ugotavljanje navzkrižne odpornosti

#### 3.2.4.1 Odpornost proti žolčnim solem ob prilagoditvi na nizek pH

Prekonočno kulturo sevov M5 in KR6 smo precepili (5 % inokulum) v gojišče MRS-MOPS ter gojili na 37 °C 6 ur, z uravnavanjem pH na 7. Sledila je 30-minutna izpostavitev subtletalnim vrednostim pH, ki sta bili določeni v predhodnem poskusu. Za sev M5 smo uporabili pH 5 ter za sev KR6 pH 4,5, kot kontrolo pa pri obeh sevih pH 7. Celice smo sprali s sterilno fiziološko raztopino ter jih razdelili v alikvote, ki smo jih izpostavili žolčnim solem (koncentracije 0 do 0,3 %) za 2 uri z vmesnimi vzorčenji za določanje KE/ml.

#### 3.2.4.2 Preživetje v simuliranih razmerah prebavil ob prilagoditvi na nizek pH

Kulture sevov *L. plantarum* v gojišču MRS smo precepili v gojišče MRS-MOPS (0,2 % inokulum) in jih gojili preko noči na 37 °C. Kulturam smo uravnali pH na 7 z 12,5 % amonijevim hidroksidom in inkubirali še dodatno 1 uro. Kulture smo centrifugirali in celice resuspendirali v simuliranem želodčnem soku s pH 2,4, 3 ali 7 (kontrola). Pufer je bil pripravljen, kot je opisano v Fernandez in sod. (2003). Po 3-urni inkubaciji pri 37 °C smo gojišče zamenjali s simuliranim črevesnim sokom, ki je vseboval 0,3 % žolčnih soli ter 0,1 % pankreatina in imel pH 8. Inkubirali smo še dodatne 3 ure. Število preživelih bakterij (KE/ml) smo ugotavljal s štetjem na ploščah na gojišču MRS.

### 3.2.4.3 Ugotavljanje preživetja liofilizacije ob prilagoditvi na nizek pH

Prekonočno kulturo sevov M5 in KR6 smo precepili (5 % inokulum) v MRS-MOPS gojišče ter gojili na 37 °C 6 ur z uravnavanjem pH na 7. Sledila je 30-minutna izpostavitev subletalnim vrednostim pH, ki sta bili določeni v predhodnem poskusu. Za sev M5 smo uporabili pH 5 ter za sev KR6 pH 4,5, kot kontrolo pa pH 7 pri obeh sevih. Celice smo sprali s sterilno fiziološko raztopino ter razdelili v alikvote po 7 ml, centrifugirali in resuspendirali v 1 ml ustreznega lioprotектanta (fiziološka raztopina, 10-odstotni inulin, 10-odstotno posneto mleko, 10-odstotni glicerol). Kulture smo nato zamrznili pri -80 °C za kratek čas (45 min) in liofilizirali čez noč (Christ Alpha 1-2 LDplus, Germany). Število preživelih celic smo ugotavljali pred zamrzovanjem ter po liofilizaciji. Preživetje liofilizacije smo ugotavljali tako, da smo v 1 ml MRS resuspendirali liofilizirano kulturo, rehidrirali 15 min in nacepili na plošče za štetje.

### 3.2.4.4 Ugotavljanje preživetja nizkih temperatur ob prilagoditvi na nizek pH

Prekonočno kulturo sevov M5 in KR6 smo precepili (5 % inokulum) v gojišče MRS-MOPS ter gojili pri 37 °C 6 ur z uravnavanjem pH na 7. Sledila je 30-minutna izpostavitev subletalnim vrednostim pH, ki sta bili določeni v predhodnem poskusu. Za sev M5 smo uporabili pH 5 ter za sev KR6 pH 4,5, kot kontrolo pa pH 7 za obo seva. Celice smo sprali s sterilno fiziološko raztopino ter pelet resuspendirali v MRS s 30 % glicerola, kot kontrolo pa smo uporabili samo gojišče MRS (na 10 ml centrifugirane kulture dodamo 3 ml zaščitnega sredstva). Vzorčili smo pred izpostavitvijo nizkim temperaturam ter vsakih nekaj dni med inkubacijo na 4 °C.

### 3.2.4.5 Ugotavljanje odpornosti proti vodikovemu peroksidu ob prilagoditvi na nizek pH

Prekonočno kulturo sevov M5 in KR6 smo precepili (5 % inokulum) v gojišče MRS-MOPS ter gojili na 37 °C 6 ur z uravnavanjem pH na 7. Sledila je 30-minutna izpostavitev subletalnim vrednostim pH, ki sta bili določeni v predhodnem poskusu. Za sev M5 smo uporabili pH 5 ter za sev KR6 pH 4,5 kot kontrolo pa pH 7 za obo seva. Celice smo sprali s sterilno fiziološko raztopino ter pelet resuspendirali v enakem volumnu gojišča MRS z dodanim vodikovim peroksidom (0, 0,1 ali 0,2 %). Vzorčili smo ob času 0, 15 ter 30 minut, ter določili KE/ml.

## 3.2.5 Statistična obdelava rezultatov

Vsi rezultati so prikazani kot povprečje vsaj dveh neodvisnih poskusov v dveh paralelkah. Za ugotavljanje statistično značilnih razlik med povprečji dveh skupin vzorcev ( $n=6$ ) smo uporabili Studentov  $t$ -test. Za statistično značilno razliko smo vzeli p-vrednost  $<0,05$ .

## 4 REZULTATI

### 4.1 IZBOR, KARAKTERIZACIJA IN PRIMERJAVA SEVOV *LACTOBACILLUS PLANTARUM*

#### 4.1.1 Določanje vrste pri sevih *L. plantarum* KR3 in *L. plantarum* KR6

Seva *L. plantarum* KR3 in *L. plantarum* KR6 smo pridobili v okviru širšega projekta, v katerem smo osamili večje število sevov mlečnokislinskih bakterij iz kiske repe, zelja in kislega mleka. Sevoma KR3 in KR6 smo določili vrsto s pomnoževanjem in sekvenciranjem gena za 16S rRNK. Analiza pridobljenih zaporedij z algoritmom BLASTn je pokazala najboljše ujemanje (99 % identičnost) z zaporedjem gena za 16S rRNK iz seva *L. plantarum* WCFS1. Poravnava zaporedij 16S RNK iz sevov KR3, KR6 in *L. plantarum* WCFS1 je prikazana na sliki 16. Opazili smo, da se pojavljajo razlike zaporedij, kar je najverjetneje povezano z razlikami med posameznimi kopijami gena za 16S rRNK v genomu. Tudi referenčni sev *L. plantarum* WCFS1 z znanim genomom ima 5 kopij rRNK genov z dvema razlikama v nukleotidnem zaporedju (Coenye in Vandamme, 2003).

KR3a	TTGCGGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAACCTCGGTATTGGTATTGGTGCTTCATC
KR3b	TTGCGGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAACCTCGGTATTGGTATTGGTGCTTCATC
KR6a	TGGCGGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAACCTCGGTATTGGTATTGGTGCTTCATC
KR6b	TGGCGGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAACCTCGGTATTGGTATTGGTGCTTCATC
WCFS1a	TGGCGGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAACCTCGGTATTGGTATTGGTGCTTCATC
WCFS1b	TGGCGGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAACCTCGGTATTGGTATTGGTGCTTCATC
*	*****
KR3a	ATGATTTCACATTGAGTGAGTGGCGAACTGGTAGTAACACGTGGAAACCTGCCAGAA
KR3b	ATGATTTCACATTGAGTGAGTGGCGAACTGGTAGTAACACGTGGAAACCTGCCAGAA
KR6a	ATGATTTCACATTGAGTGAGTGGCGAACTGGTAGTAACACGTGGAAACCTGCCAGAA
KR6b	ATGATTTCACATTGAGTGAGTGGCGAACTGGTAGTAACACGTGGAAACCTGCCAGAA
WCFS1a	ATGATTTCACATTGAGTGAGTGGCGAACTGGTAGTAACACGTGGAAACCTGCCAGAA
WCFS1b	ATGATTTCACATTGAGTGAGTGGCGAACTGGTAGTAACACGTGGAAACCTGCCAGAA
*	*****
KR3a	GCGGGGGATAAACACCTGGAAACAGATGCTAACACCGCATACAAACTTGGACCGCATGGTC
KR3b	GCGGGGGATAAACACCTGGAAACAGATGCTAACACCGCATACAAACTTGGACCGCATGGTC
KR6a	GCGGGGGATAAACACCTGGAAACAGATGCTAACACCGCATACAAACTTGGACCGCATGGTC
KR6b	GCGGGGGATAAACACCTGGAAACAGATGCTAACACCGCATACAAACTTGGACCGCATGGTC
WCFS1a	GCGGGGGATAAACACCTGGAAACAGATGCTAACACCGCATACAAACTTGGACCGCATGGTC
WCFS1b	GCGGGGGATAAACACCTGGAAACAGATGCTAACACCGCATACAAACTTGGACCGCATGGTC
*	*****
KR3a	CGAGCTTGAAGAGATGGCTTCAGCTATCACCTTGGATGGTCCCGCGCGTATTAGCTAGA
KR3b	CGAGCTTGAAGAGATGGCTTCAGCTATCACCTTGGATGGTCCCGCGCGTATTAGCTAGA
KR6a	CGAGCTTGAAGAGATGGCTTCAGCTATCACCTTGGATGGTCCCGCGCGTATTAGCTAGA
KR6b	CGAGCTTGAAGAGATGGCTTCAGCTATCACCTTGGATGGTCCCGCGCGTATTAGCTAGA
WCFS1a	CGAGCTTGAAGAGATGGCTTCAGCTATCACCTTGGATGGTCCCGCGCGTATTAGCTAGA
WCFS1b	CGAGCTTGAAGAGATGGCTTCAGCTATCACCTTGGATGGTCCCGCGCGTATTAGCTAGA
*****	*****
KR3a	TGGTGAGGCAACGGCTCACCATGGCAATGATACTGAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCC
KR3b	TGGTGAGGCAACGGCTCACCATGGCAATGATACTGAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCC
KR6a	TGGTGAGGCAACGGCTCACCATGGCAATGATACTGAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCC
KR6b	TGGTGAGGCAACGGCTCACCATGGCAATGATACTGAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCC
WCFS1a	TGGTGAGGCAACGGCTCACCATGGCAATGATACTGAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCC
WCFS1b	TGGTGAGGCAACGGCTCACCATGGCAATGATACTGAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCC
*****	*****

Se nadaljuje

### Nadaljevanje slike 16

KR3a	ACATTGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGAGGCAGCAGTAGGAATCTTCCAC
KR3b	ACATTGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGAGGCAGCAGTAGGAATCTTCCAC
KR6a	ACATTGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGAGGCAGCAGTAGGAATCTTCCAC
KR6b	ACATTGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGAGGCAGCAGTAGGAATCTTCCAC
WCFS1a	ACATTGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGAGGCAGCAGTAGGAATCTTCCAC
WCFS1b	ACATTGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGAGGCAGCAGTAGGAATCTTCCAC
	*****
KR3a	AATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCCGTGAGTGAAGAAGGTTTGGCTCGTAAA
KR3b	AATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCCGTGAGTGAAGAAGGTTTGGCTCGTAAA
KR6a	AATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCCGTGAGTGAAGAAGGTTTGGCTCGTAAA
KR6b	AATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCCGTGAGTGAAGAAGGTTTGGCTCGTAAA
WCFS1a	AATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCCGTGAGTGAAGAAGGTTTGGCTCGTAAA
WCFS1b	AATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCCGTGAGTGAAGAAGGTTTGGCTCGTAAA
	*****
KR3a	ACTCTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACCTGTCAGGTATTGACGGTATTAA
KR3b	ACTCTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACCTGTCAGGTATTGACGGTATTAA
KR6a	ACTCTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACCTGTCAGGTATTGACGGTATTAA
KR6b	ACTCTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACCTGTCAGGTATTGACGGTATTAA
WCFS1a	ACTCTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACCTGTCAGGTATTGACGGTATTAA
WCFS1b	ACTCTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACCTGTCAGGTATTGACGGTATTAA
	*****
KR3a	CCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT
KR3b	CCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT
KR6a	CCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT
KR6b	CCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT
WCFS1a	CCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT
WCFS1b	CCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT
	*****
KR3a	GTCCGGATTATTGGCGTAAAGCGAGCGCAGGGGTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCC
KR3b	GTCCGGATTATTGGCGTAAAGCGAGCGCAGGGGTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCC
KR6a	GTCCGGATTATTGGCGTAAAGCGAGCGCAGGGGTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCC
KR6b	GTCCGGATTATTGGCGTAAAGCGAGCGCAGGGGTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCC
WCFS1a	GTCCGGATTATTGGCGTAAAGCGAGCGCAGGGGTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCC
WCFS1b	GTCCGGATTATTGGCGTAAAGCGAGCGCAGGGGTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCC
	*****
KR3a	TTCGGCTAACCGAAGAACGTGATCGGAAACTGGGA
KR3b	TTCGGCTAACCGAAGAACGTGATCGGAAACTGGGA
KR6a	TTCGGCTAACCGAAGAACGTGATCGGAAACTGGGA
KR6b	TTCGGCTAACCGAAGAACGTGATCGGAAACTGGGA
WCFS1a	TTCGGCTAACCGAAGAACGTGATCGGAAACTGGGA
WCFS1b	TTCGGCTAACCGAAGAACGTGATCGGAAACTGGGA
	*****

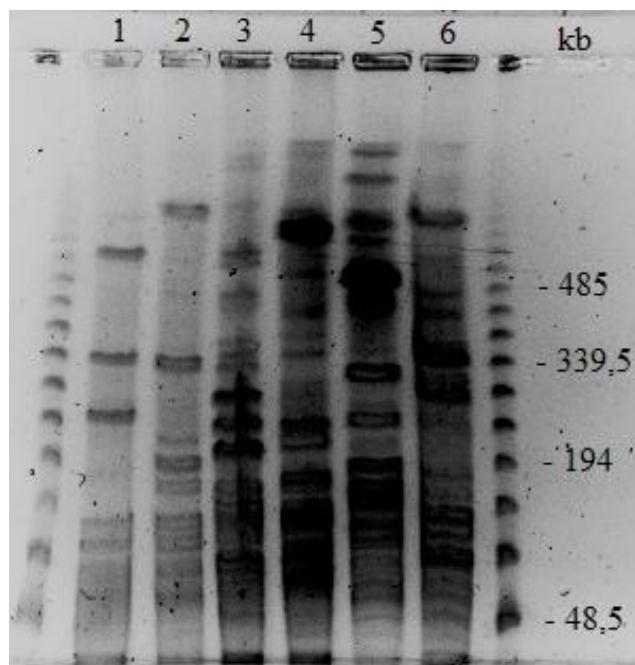
Slika 16: Poravnava delnih 16S rRNK-sekvenc sevov KR3 in KR6 s sekvenčnimi iz referenčnega genoma seva *L. plantarum* WCFS1 (Clustal Omega). Z barvami so prikazane razlike med zaporedji.

Figure 16: Alignment of partial 16S rRNK sequences of strains KR3 and KR6 with two 16S rRNK sequences from reference genome of *L. plantarum* WCFS1 (Clustal Omega). Differences between sequences are shown in colours.

#### 4.1.2 Primerjava makrorestrikcijskih profilov različnih sevov *L. plantarum* z metodo PFGE

Preden smo začeli z drugimi poskusi, smo različne seve primerjali med seboj, da bi videli, kako so si podobni na genetskem nivoju. Restrikcija genomske DNK z encimom *SfiI* je pokazala zelo različne makrorestrikcijske vzorce šestih izbranih sevov (slika 17). Seva KR3 in KR6 se zelo razlikujeta od preostalih sevov *L. plantarum*, saj imata najmanjše število lis velikih dolžin. Največ podobnosti smo opazili med sevoma M5 in

299v, vendar tudi slednja nista identična. Iz rezultatov lahko sklepamo, da je vseh 6 sevov zelo različnih tudi na genetskem nivoju.



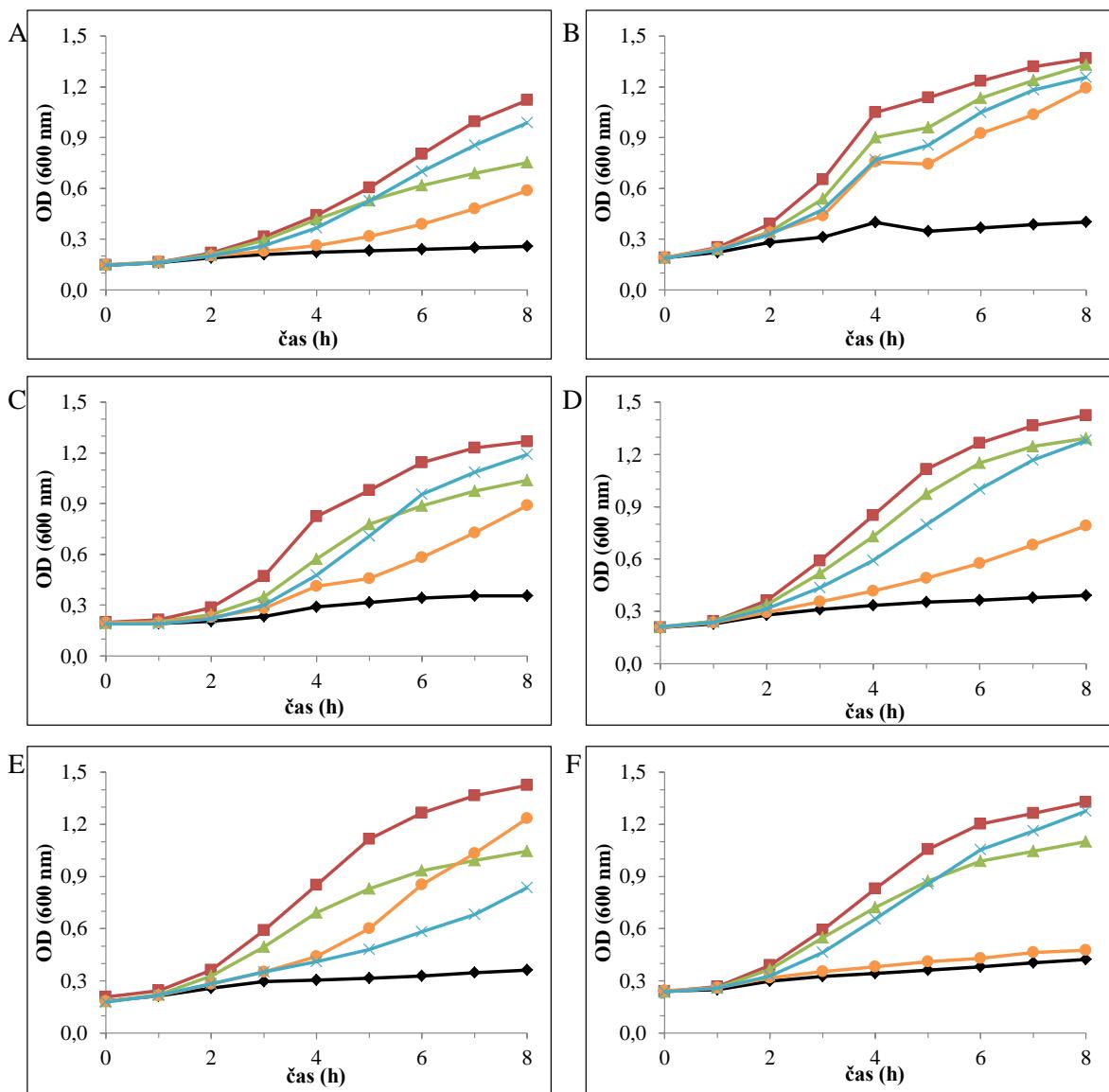
Slika 17: Makrorestrikcijski profil PFGE izbranih sevov *L. plantarum* po restikciji s *SfiI*. Sevi so označeni z imeni 1-KR3, 2-KR6, 3-M5, 4-SF9, 5-B-4496, 6-299v. Na skrajni levi in desni strani vidimo standardno velikostno lestvico DNK.

Figure 17: PFGE macrorestriction profile of selected *L. plantarum* strains after restriction with *SfiI*. Strains are labeled 1-KR3, 2-KR6, 3-M5, 4-SF9, 5-B-4496 and 6-299v. On the left and right side of the gel is standard DNA ladder.

#### 4.1.3 Sposobnost rasti izbranih sevov *L. plantarum* na različnih sladkorjih kot glavnih virih ogljika

Primerjavo šestih izbranih sevov smo v naslednjem koraku izvedli tudi na biokemijskem nivoju, tako da smo preverili profil rasti v prisotnosti štirih različnih sladkorjev (glukoza, fruktoza, rafinoza in lakoza) kot glavnih virov ogljika. Seve smo gojili v variantah tekočega gojišča MRS, pri čemer smo glukozo zamenjali z enim od naštetih sladkorjev. Med izbranimi sevi *L. plantarum* smo opazili veliko variabilnost, zlasti v hitrosti rasti na rafinozi kot glavnem viru ogljika v gojišču (slika 18).

Poleg tega je primerjava rastnih krivulj pokazala, da sev KR3 v vseh gojiščih raste najpočasneje. Tudi v gojišču z glukozo po osmih urah ni dosegel stacionarne faze rasti, za razliko od ostalih sevov (slika 18A). Sev KR6 lahko zelo učinkovito porablja vse testirane sladkorje (slika 18B), medtem ko seva M5 in SF9 rasteta relativno hitro na glukozi, fruktozi in lakozi, veliko manj učinkovito pa porabljata rafinozo (slika 18C, D). Rast seva B-4496 je hitra v prisotnosti glukoze, poraba ostalih sladkorjev pa je manj učinkovita (slika 18E). Zanimivo je, da komercialni sev *L. plantarum* 299v sploh ni sposoben izkoriščati rafinoze, saj je ostala krivulja rasti tekom 8 ur gojenja enaka kot v gojišču brez dodanega sladkorja (slika 18F).



Slika 18: Krivulje rasti *L. plantarum* KR3 (A), KR6 (B), M5 (C), SF9 (D), B-4496 (E) in 299v (F) v gojišču brez sladkorja (črna), z glukozo (rdeča), fruktozo (zelena), rafinozo (oranžna) ali laktozo (modra).

Figure 18: Growth curves of *L. plantarum* KR3 (A), KR6 (B), M5 (C), SF9 (D), B-4496 (E) and 299v (F) in media without sugar (black), with glucose (red), fructose (green), raffinose (orange) or lactose (blue).

#### 4.1.4 Odpornost izbranih sevov *L. plantarum* proti antibiotikom

Eden izmed najpomembnejših kriterijev varnosti probiotičnih sevov je njihova odpornost proti antibiotikom, pomembnih za humano uporabo. V priporočilih Evropske agencije za varno hrano (EFSA) je navedenih 9 antibiotikov (ampicilin, vankomicin, gentamicin, kanamicin, streptomycin, eritromicin, klindamicin, tetraciklin in kloramfenikol), proti katerim probiotični sevi ne smejo biti odporni. Minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) teh antibiotikov smo za izbrane seve *L. plantarum* ugotavljali na agarnih ploščah z uporabo t. i. E-testov (poglavje 3.2.1.4). Pri vseh 6 izbranih sevih smo opazili odpornost proti vankomicinu, ki pa z vidika varnosti ni

problematična, saj je »intrinzična« za vse heterofermentativne in fakultativno heterofermentativne laktobacile, med katere spada tudi vrsta *Lactobacillus plantarum* (Tynkkonen in sod., 1998). Pri komercialnem sevu 299v smo opazili tudi odpornost proti kanamicinu. Odpornosti proučevanih sevov proti vsem ostalim antibiotikom (MIK) pa ne presega mejnih vrednosti, določenih s strani EFSA (2012).

Preglednica 5: Odpornost šestih izbranih sevov *L. plantarum* proti devetim antibiotikom, ugotovljena z E-test®.

Table 5: Susceptibility of six chosen *L. plantarum* strains to nine antimicrobial agents determined by E-test®.

Antibiotik (testirana koncentracija)	MIK (mg/l)						
	KR3	KR6	M5	SF9	B-4496	299v	MIK mejna vrednost*
ampicilin (AM) (0.016-256)	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,25	2
vankomicin (VA) (0.016-256)	>256	>256	>256	>256	>256	>256	n.p.
gentamicin (GM) (0.064- 1024)	1,5	2	0,75	2	2	6	16
kanamicin (KM) (0.016-256)	32	64	32	35	64	>256	64
streptomycin (SM) (0.064- 1024)	48	64	24	24	64	64	n.p.
eritromicin (EM) (0.016-256)	1	0,25	0,5	1	0,5	0,5	1
klindamicin (CM) (0.016- 256)	2	0,38	0,016	0,25	0,25	1	2
tetraciklin (TC) (0.016-256)	10	24	8	12	12	6	32
kloramfenikol (CL) (0.016-256)	6	6	2	8	4	8	8

\* Mejne vrednosti MIK za odpornost vrste *Lactobacillus plantarum* proti antibiotikom (EFSA, 2012); n.p. testiranje ni potrebno. MIK, večje od mejne MIK, kažejo na odpornost seva proti določenemu antibiotiku.

## 4.2 STRES STACIONARNE FAZE RASTI

### 4.2.1 Sevi, pridobljeni v dolgotrajni stacionarni fazi

Vseh šest izbranih sevov *L. plantarum* smo dolgo gojili v stacionarni fazi v gojišču MML, da bi pridobili kulture za nadaljnje poskuse. Divji tip sevov smo inokulirali in vzorčili po 16, 23 in 30 dneh od začetne inokulacije. Preživetje v dolgotrajni stacionarni fazi se je izkazalo za sevno specifično lastnost. Seva KR3 in 299v sta zelo dobro preživelila do 30 dni v stacionarni fazi. Pri sevu SF9 se je število preživelih kolonij tekom inkubacije zmanjševalo, pri sevu KR6 po 30. dnevu nismo več zaznali preživelih bakterij, pri sevu M5 se je šele po 30 dneh gojenja v stacionarni fazi rasti pojavilo nekaj preživelih bakterij. Sev B-4496 pa inkubacije ni preživel (preglednica 6).

Preglednica 6: Koncentracija bakterij (KE/ml), pridobljenih po dolgotrajni inkubaciji v stacionarni fazi.

Table 6: Concentration of bacteria (CFU/ml) gained in prolonged incubation in stationary phase.

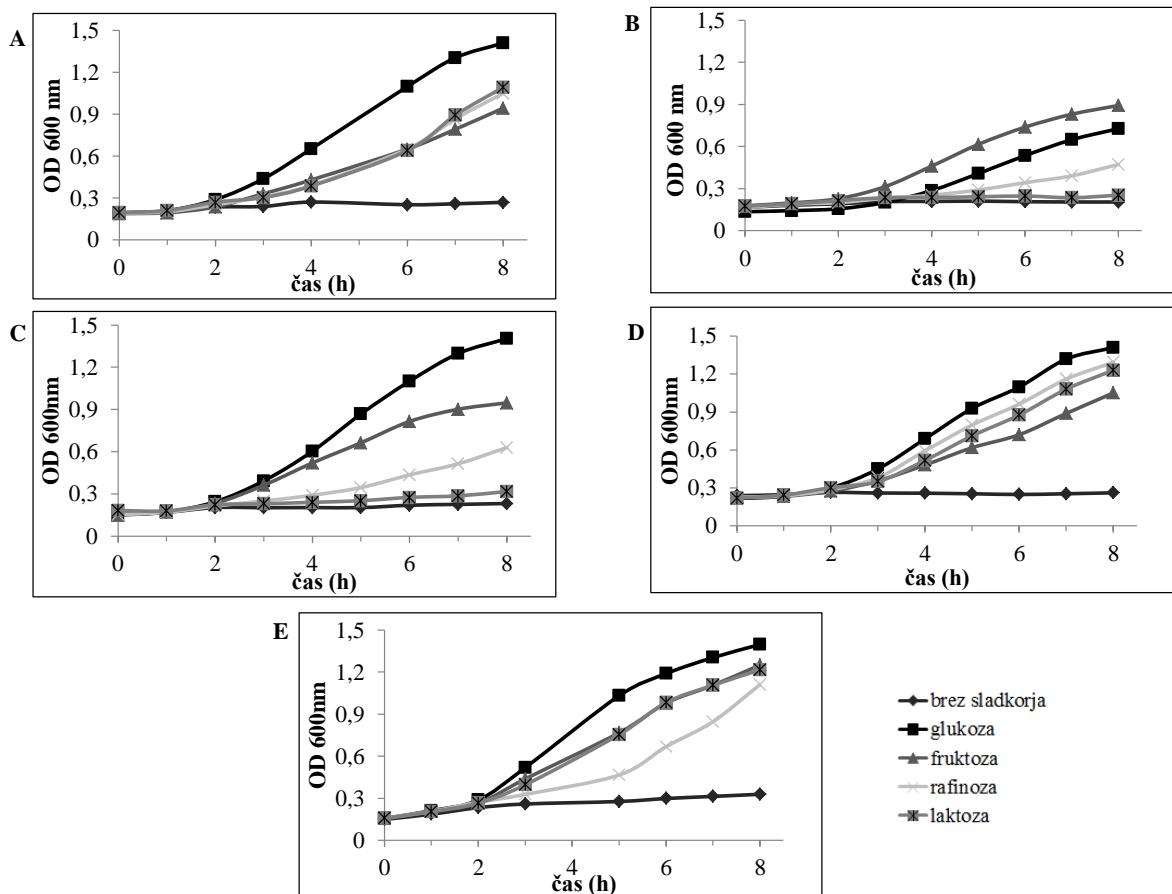
Sev	Dolžina inkubacije (dni)		
	16	23	30
<b>KR3</b>	++	+++	+++
<b>KR6</b>	++	+++	-
<b>M5</b>	-	-	+
<b>SF9</b>	+++	++	+
<b>B-4496</b>	-	-	-
<b>299v</b>	+++	+++	+++

- manj kot  $10^2$  KE/ml, +  $10^2\text{-}10^3$  KE/ml, ++  $10^3\text{-}10^4$  KE/ml, +++ nad  $10^4$  KE/ml

V nadalnjih poskusih smo uporabili alikvote shranjenih kultur pridobljenih v stacionarni fazi rasti (poglavlji 4.2.3 in 4.2.5), v drugih pa smo iz kultur dolgotrajne stacionarne faze osamili posamezne kolonije in jih primerjali med sabo (poglavlji 4.2.2. in 4.2.4).

### 4.2.2 Rast sevov iz dolgotrajne stacionarne faze na gojiščih z različnimi sladkorji kot glavnimi viri ogljika

Ker smo opazili, da se 6 izbranih sevov *L. plantarum* med sabo razlikuje v sposobnosti rasti v prisotnosti različnih sladkorjev (poglavlje 4.1.3), smo testirali tudi posamezne kolonije iz dolgotrajne stacionarne faze rasti in jih primerjali z divjim tipom sevov (poglavlje 3.2.2.2). Primer takšnih rastnih krivulj je podan na sliki 19, kjer smo primerjali kulture iz 4 različnih kolonij iz dolgotrajne stacionarne faze z divjim tipom seva KR6. Opazili smo predvsem, da kulture iz kolonij istega seva, ki so bile izpostavljene dolgotrajni stacionarni fazi, rastejo počasneje (slika 19B). Rast na laktوزi ali rafinozi je bila večinoma počasnejša (slika 19B, C). Različno rast kultur iz posameznih kolonij je mogoče razložiti s pojavljanjem različnih mutacij oziroma načinov prilagoditve na dolgotrajno stacionarno fazo. Tudi kulture iz bakterij, ki so bile enako dolgo izpostavljene dolgotrajni stacionarni fazi, so izkazale različne hitrosti rasti in sposobnost metabolizma sladkorjev (slika 19A, B).



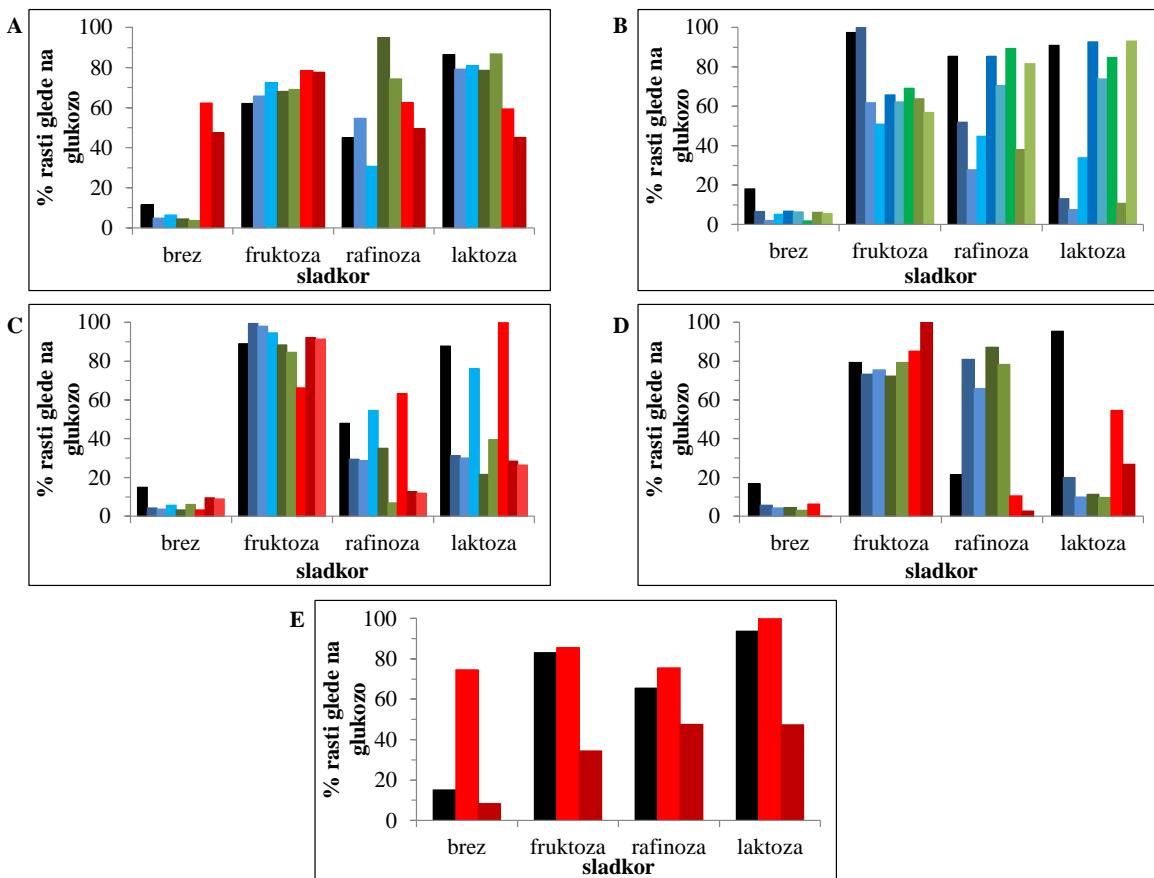
Slika 19: Rast seva KR6 in kultur iz bakterijskih celic, izpostavljenih dolgotrajni stacionarni fazi, v različnih gojiščih (A = kultura iz izolirane kolonije, pridobljene po 16 dneh inkubacije, B = kultura iz izolirane kolonije, pridobljene po 16 dneh inkubacije, C = kultura iz izolirane kolonije, pridobljene po 23-ih dneh inkubacije, D = kultura iz izolirane kolonije, pridobljene po 23 dneh inkubacije, E = wt, kultura, ki ni bila izpostavljena dolgotrajni stacionarni fazi rasti).

Figure 19: Growth of the strain KR6 and of cultures obtained from bacterial cells exposed to prolonged stationary phase on different medias (A = culture from single bacteria obtained after 16 days of incubation, B = culture from single bacteria obtained after 16 days of incubation, C = culture from single bacteria obtained after 23 days of incubation, D = culture from single bacteria obtained after 23 dneh incubacije, E = wt, culture unexposed to stationary growth phase).

Primerjava rasti kultur iz bakterij, izpostavljenih dolgotrajni stacionarni fazi, v prisotnosti različnih sladkorjev, je pri vseh izbranih sevih *L. plantarum* pokazala velike razlike (slika 20). Na sliki so prikazane relativne vrednosti, preračunane glede na rast v gojišču z glukozo (poglavlje 3.2.2.2). Tudi kulture iz bakterij, ki so bile izolirane iz kulture v stacionarni fazi rasti ob istem času (po 16, 23 ali 30 dneh), so izkazovale različno spodbavnost rasti v prisotnosti posameznih virov sladkorjev.

Pri sevu KR3 smo opazili, da so kulture iz bakterij, ki so bile odvzete po 30-dnevni inkubaciji v podaljšani stacionarni fazi, boljše rasle na gojišču brez sladkorjev v primerjavi z divjim tipom seva, slabše pa v gojišču z laktozo. Pri nekaterih kulturah pa se je izboljšala sposobnost rasti v gojišču z rafinozo (slika 20A). Pri sevu KR6 smo testirali največje število različnih kultur iz bakterij, odvzetih po dolgotrajni izpostavitvi stacionarni fazi, in prav tako opazili veliko raznolikost med njimi (slika 20B). Divji tip

seva je zelo dobro rasel v gojiščih z vsemi tremi različnimi sladkorji (fruktoza, rafinoza, laktoza) v primerjavi z originalnim gojiščem z glukozo, medtem ko so kulture iz bakterij iz stacionarne faze v nekaterih primerih izgubile to sposobnost. Pri skoraj vseh se je zmanjšala sposobnost rasti na fruktozi na 60 do 70 % v primerjavi z divjim tipom, ki raste enako hitro v prisotnosti fruktoze kot glukoze. Večjo raznolikost samo opazili v rasti v prisotnosti rafinoze in laktoze, kjer sposobnost rasti variira od 10 do 90 % glede na glukozo. Pri sevu SF9 smo opazili manjše raznolikosti v hitrosti rasti v prisotnosti fruktoze, ki je bila dobra (slika 20C), medtem ko je bila rast v prisotnosti rafinoze in laktoze večinoma še slabša. Pri komercialnem sevu 299v smo opazili, da je po izpostavitevi dolgotrajni stacionarni fazi v nekaterih primerih pridobil sposobnost rasti v prisotnosti rafinoze (slika 20D), vendar izgubil sposobnost izkoriščanja laktoze, rast na fruktozi pa je ostaja dobra. Sev M5 je dolgotrajno stacionarno fazo preživel zelo slabo (poglavlje 4.2.1), zato smo pridobili malo bakterij, ki so bile sposobne tvoriti kolonije, in to šele po 30 dneh. Ena izmed teh kultur je slabo rasla v prisotnosti vseh treh sladkorjev, medtem ko je druga enako dobro kot v prisotnosti sladkorjev rasla tudi v gojišču brez sladkorjev (slika 20E).



Slika 20: Sposobnost rasti *L. plantarum* KR3 (A), KR6 (B), SF9 (C), 299v (D) in M5 (E) v prisotnosti različnih sladkorjev. Prikazane so vrednosti deleža rasti (%), izračunanega iz primerjave OD v gojišču z različnimi sladkorji z rastjo v gojišču z glukozo, po 8 urah inkubacije. Črni stolpci predstavljajo divji tip (kontrolo). Rast kultur iz bakterij iz 16 dni stare stacionarne kulture je prikazana s stolpiči modrih odtenkov, tistih iz 23 dni stare kulture z zelenimi odtenki in tistih iz 30 dni stare kulture z rdečimi odtenki.

Figure 20: Growth of *L. plantarum* KR3 (A), KR6 (B), SF9 (C), 299v (D) and M5 (E) on medium with different sugars. Bars represent percent of growth (%), which is calculated by comparison of the OD in medium with different sugar composition with the growth on glucose, after 8 hours. Black bars represent wild type (control). Different shades of blue represent cultures of bacteria from 16 days old stationary phase culture, green shades from 23 days and red shades from 30 days old stationary phase culture.

#### 4.2.3 Prednost rasti izbranih sevov *L. plantarum* pred *E. coli* in *E. faecalis* v stacionarni fazi - GASP

V dolgotrajni stacionarni fazi rasti se dogajajo genomske modifikacije, s katerimi je povezan tudi pojav fenotipa prednosti rasti v stacionarni fazi ali GASP (ang. »growth advantage in stationary phase«). GASP je povezan s sposobnostjo dolgotrajno staranih kultur, da prerastejo mlajše kulture, kar se dokazuje s poskusi z mešanimi kulturami. Pri *E. coli* se tak fenotip GASP pojavi že po 10 dneh rasti v stacionarni fazi. Zanimalo nas je, ali so sevi *L. plantarum* sposobni prerasti druge vrste bakterij v mešanih kulturah. Za testiranja smo izbrali bakterijska seva *Escherichia coli* K17 in *Enterococcus faecalis* S1-17.

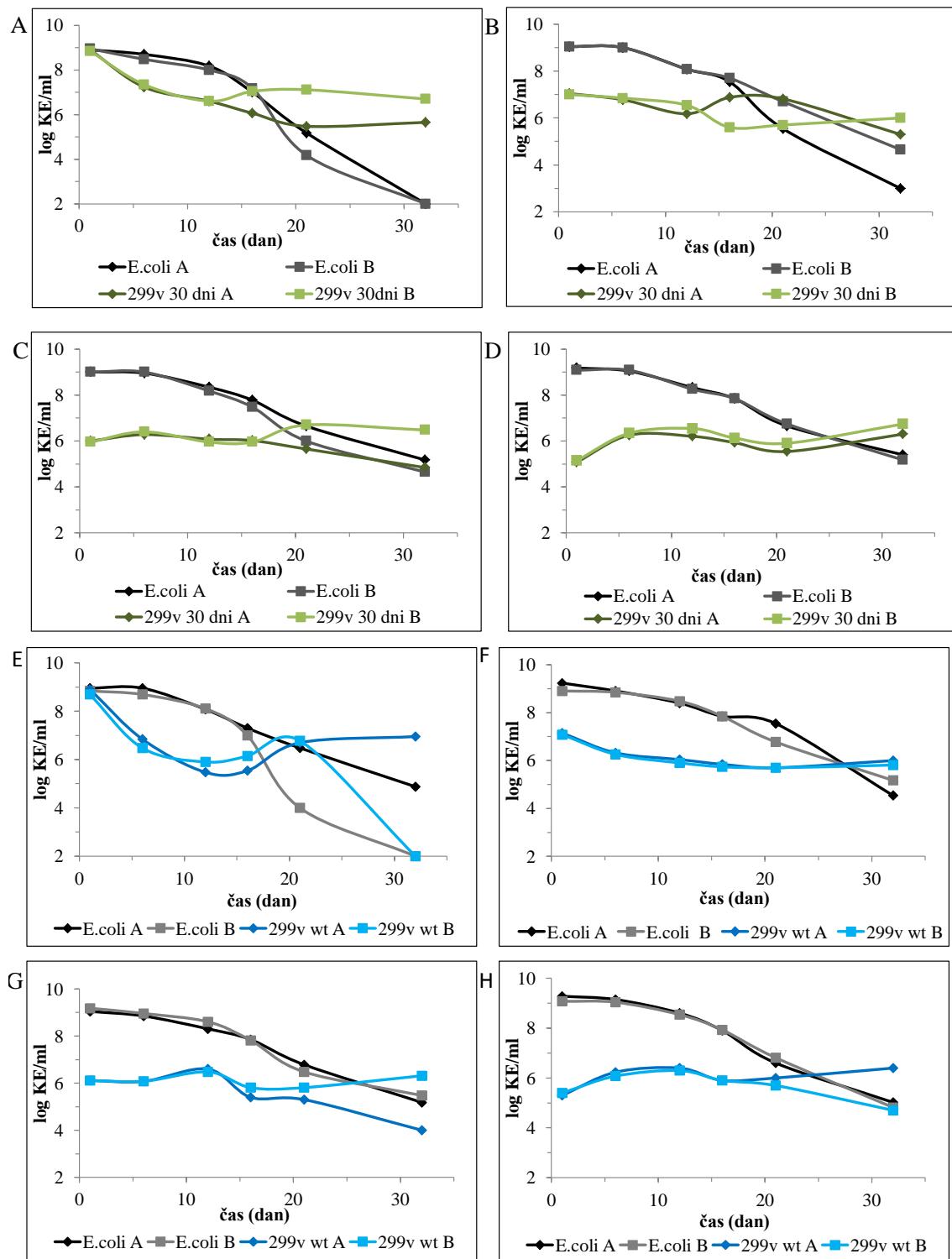
#### 4.2.3.1 Mešane kulture seva *Escherichia coli* K17 in izbranih sevov *L. plantarum*

Fenomen GASP je bil najbolj temeljito preučen na bakterijah vrste *E. coli*, tako v mešanih kulturah različnih sevov te bakterije kakor tudi z mešanimi kulturami *E. coli* in drugih vrst. Prednosti rasti v stacionarni fazi med sevi *E. coli* in laktobacili pa doslej še niso opisali. Zanimalo nas je, ali različni sevi *L. plantarum* kažejo fenotip GASP in kakšne so razlike med sevi.

V vseh eksperimentih GASP smo testirali različne mešane kulture *E. coli* K17, stare 1 dan, in izbranega seva *L. plantarum*, pri čemer je bila v mešanih kulturah ob inokulaciji koncentracija *E. coli* bistveno večja od koncentracije *L. plantarum*. Za eksperimente smo uporabili tako kulture *L. plantarum* iz celic, predhodno izpostavljenih dolgotrajni stacionarni fazi (poglavje 4.3.1), kot tudi divji tip testnih sevov. Zanimalo nas je, ali so kulture *L. plantarum* s predhodno izpostavljivo dolgotrajni stacionarni fazi pridobile prednost rasti v primerjavi z *E. coli* v mešani kulturi. V nadaljevanju so podrobno opisani eksperimenti za detektiranje fenomena GASP z različnimi pari sevov.

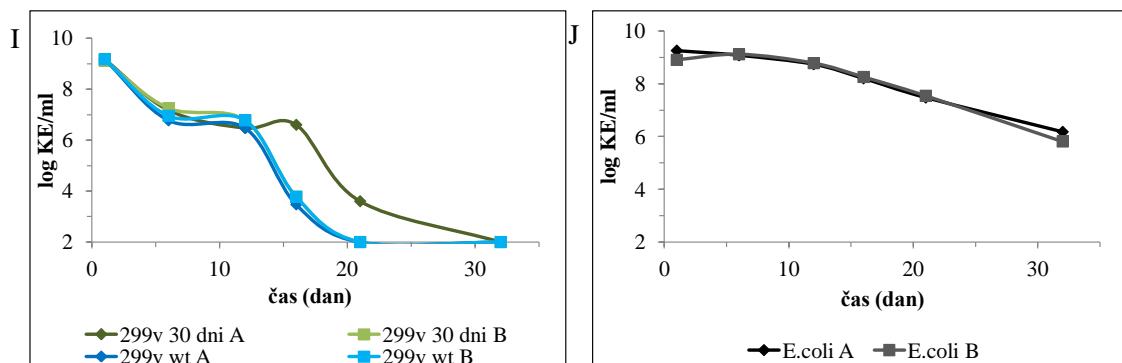
##### a) Mešane kulture *E. coli* K17: *L. plantarum* 299v

Pri opazovanju morebitnega pojava GASP med sevoma *L. plantarum* 299v in *E. coli* K17 smo zato mešano kulturo inokulirali v različnih razmerjih izhodnih kultur. Če smo sočasno kultivirali obe vrsti v razmerju 1:1, je *L. plantarum* prerasel *E. coli* (slika 21A). Število *E. coli* K17 je namreč padlo pod mejo detekcije v 30 dneh sočasne kultivacije, medtem ko je *L. plantarum* 299v preživel v številu  $10^6$ - $10^7$  KE/ml. Vendar se je s povečanjem razmerja v prid *E. coli*, trend prevlade *L. plantarum* 299v zmanjšal (slika 21B, C, D) in pri razmerjih 1:100, 1:1000 ali 1:10000 je prišlo do sobivanja med sevoma. Število *E. coli* K17 se je tekom 30 dni sočasne kultivacije počasi zmanjševalo, medtem ko je sev 299v vzdrževal število celic med  $10^6$  in  $10^7$ . Tudi v tem primeru se kot pri ostalih sevih pojavi sobivanje, čemur pravimo šibki GASP (slika 11, tip 2). Zelo podobne rezultate smo dobili, če smo namesto 30 dni stare kulture seva *L. plantarum* 299v uporabili 1 dan staro kulturo. V razmerju 1:1 opazimo prevlado laktobacila le v enem alikvotu, v drugem pa se je število *E. coli* K17 hitreje zmanjševalo, kar je očitno vplivalo tudi na sev 299v, ki tudi hitreje odmiral (slika 21E). S povečevanjem razmerja v prid *E. coli* se prevlada laktobacila zmanjšuje, podobno kot pri mešani kulturi s 30 dni staro kulturo seva 299v (slika 21F, G, H). Če smo 1 dan in 30 dni stari kulturi *L. plantarum* 299v gojili kot čisti kulturi brez sočasne kultivacije, je število KE/ml padlo pod mejo detekcije med 20 in 30 dnevi gojenja (slika 21I). V čisti kulturi *E. coli* K17 je trend rasti ostal enak kot pri sočasnih kultivacijah z *L. plantarum* 299v, pri katerih je bilo razmerje ob inokulaciji vsaj 1:100 v prid *E. coli* K17 (slika 21J).



Se nadaljuje

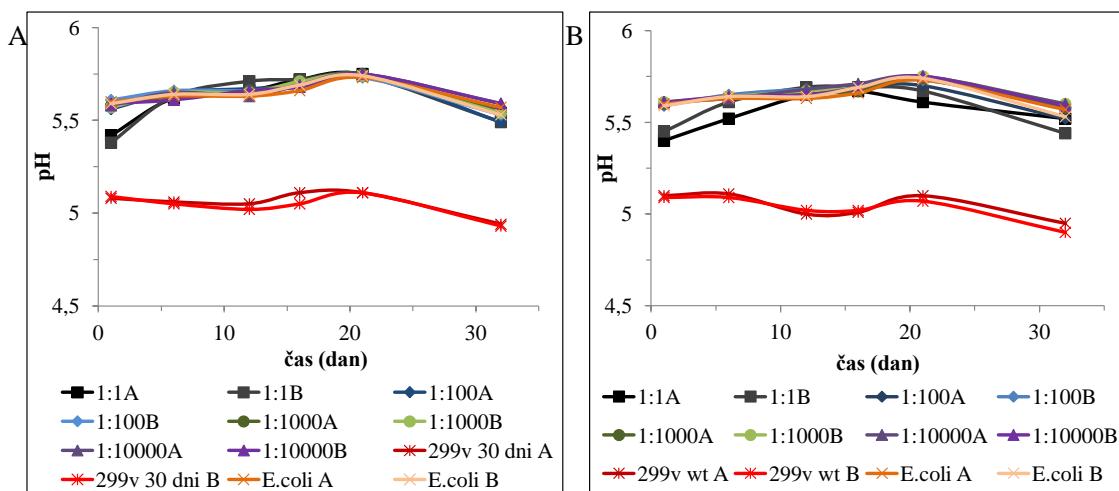
Nadaljevanje slike 21



Slika 21: Rastne krivulje v mešanih kulturah sevov *L. plantarum* 299v in *E. coli* K17. Sočasne kultivacije 30 dni stare kulture *L. plantarum* 299v in 1 dan stare kulture *E. coli* K17 so prikazane v različnih razmerjih na slikah z zelenimi in črnimi črtami od A do D (A = razmerje 1:1, B = razmerje 1:100, C = razmerje 1:1000, D = razmerje 1:10.000). Sočasne kultivacije 1 dan stare kulture *L. plantarum* 299v in 1 dan stare kulture *E. coli* K17 so prikazane v različnih razmerjih na slikah z modrimi in črnimi črtami od E do H (E = razmerje 1:1, F = razmerje 1:100, G = razmerje 1:1000, H = razmerje 1:10.000). Rast čistih kultur *L. plantarum* 299v, brez sočasne kultivacije, je prikazana na sliki I (zelena = 30 dni stare kultura, modra = 1 dan stara kultura) ter *E. coli* K17 na sliki J. Meja detekcije je bila 100 KE/ml.

Figure 21: Growth curves of mixed cultures of strain *L. plantarum* 299v and *E. coli* K17. Mixed cultivation of 30 days old culture of *L. plantarum* 299v and 1 day old culture of *E. coli* K17 in different ratios is shown on figures A-D with green and black lines (A = ratio 1:1, B = ratio 1:100, C = ratio 1:1000, D = ratio 1:10.000). Mixed cultivation of 1 day old culture of *L. plantarum* 299v and 1 day old culture of *E. coli* K17 in different ratios is shown on figures E-H with blue and black lines (E = ratio 1:1, F = ratio 1:100, G = ratio 1:1000, H = ratio 1:10.000). Growth of the pure cultures, without cocultivation, is shown on figure I for *L. plantarum* 299v (green =30 days old culture, blue =1 day old culture) and *E. coli* K17 on figure J. Limit of detection was 100 CFU/ml.

Tekom gojenja mešanih kultur sevov *E. coli* K17 in *L. plantarum* 299v smo spremljali tudi pH vrednost. Izkazalo se je, da so pH vrednosti mešanih kultur z 1 dan starim sevom 299v zelo podobne tistim s 30 dni starim sevom 299v (22A, B). Izkazalo se je, da ima čista kultura 299v precej nižji pH kot čista kultura *E. coli* K17 ozziroma mešane kulture obeh sevov. Če je sev 299v gojen brez sočasne kultivacije, je že začetni pH blizu vrednosti 5,0, v nadalnjem poteku kultivacije pa še dodatno pada. Začetni pH kultur v razmerju 1:1 je bil med 0,1–0,2 nižji od mešanih kultur z večjim deležem kulture *E. coli* K17, vendar se je tekom sočasne kultivacije dvignil na enako vrednost, kot so jo imele ostale mešane kulture in čista kultura *E. coli* K17.

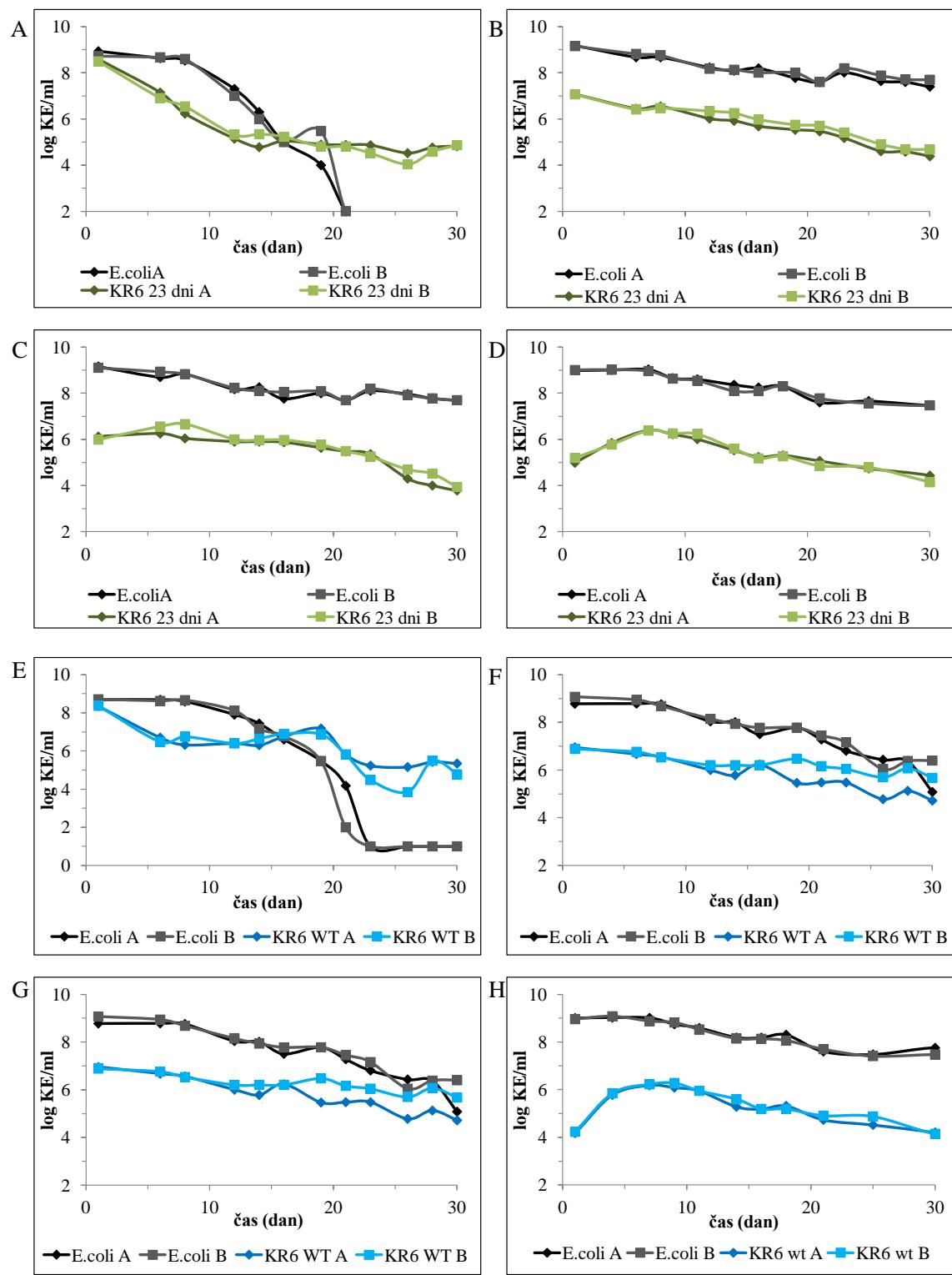


Slika 22: Vrednost pH med kultivacijo mešanih kultur *L. plantarum* 299v in *E. coli* K17. Slika A prikazuje vrednost pH med sočasno kultivacijo 30 dni stare kulture *L. plantarum* 299v in 1 dan stare kulture *E. coli* K17 v različnih razmerjih v dveh alikvotih (črna = 1:1, modra = 1:100, zelena = 1:1000, vijolična = 1:10.000) ter vrednost pH med kultivacijo čistih kultur (rdeča = 299v, oranžna = K17). Slika B prikazuje vrednost pH med sočasno kultivacijo 1 dan stare kulture *L. plantarum* 299v (wt) in 1 dan stare kulture *E. coli* K17 v različnih razmerjih v dveh alikvotih (črna = 1:1, modra = 1:100, zelena = 1:1000, vijolična = 1:10.000) ter vrednost pH med kultivacijo čistih kultur (rdeča = 299v, oranžna = K17). Vrednosti na sliki so povprečja dveh paralelk.

Figure 22: pH values during cultivation of mixed cultures *L. plantarum* 299v and *E. coli* K17. Figure A shows pH values during mixed cultivation of 30 days old culture of *L. plantarum* 299v and 1 day old *E. coli* K17 in different ratios in two aliquots (black = 1:1, blue = 1:100, green = 1:1000, violet = 1:10.000) or pH values during cultivation of pure cultures (red = 299v, orange = K17). Figure B shows pH values during mixed cultivation of 1 day old culture of *L. plantarum* 299v and 1 day old *E. coli* K17 in different ratios in two aliquots (black = 1:1, blue = 1:100, green = 1:1000, violet = 1:10.000) or pH values during cultivation of pure cultures (red = 299v, orange = K17). Values on the picture represent mean value of two parallels.

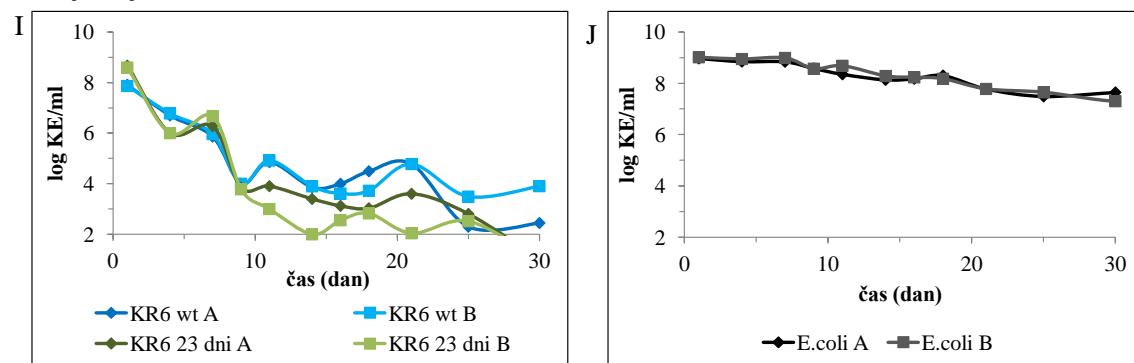
### b) Mešana kultura *E. coli* K17: *L. plantarum* KR6

Ko smo inokulirali mešano kulturo z 1 dan staro kulturo *E. coli* K17 in 23 dni staro kulturo *L. plantarum* KR6 v razmerju 1:1 (slika 23A), smo podobno kot pri sevu 299v opazili, da laktobacil preraste *E. coli*. Rezultat je neodvisen od starosti seva, saj enako prerast opazimo, tudi če je KR6 star 1 dan (23E). Če pa v mešanih kulturah razmerje KR6 in *E. coli* povečujemo v prid *E. coli*, opazimo sobivanje med sevoma (slika 23B, C, D, F, G, H). Če pa smo sev KR6 (wt in 23 dni staro kulturo) gojili v čistih kulturah, smo opazili velik upad števila in nihanja v KE/ml (slika 23I), česar pa pri *E. coli* ne opazimo (slika 23J), saj zelo dobro preživi tudi brez sočasne kultivacije.



Se nadaljuje

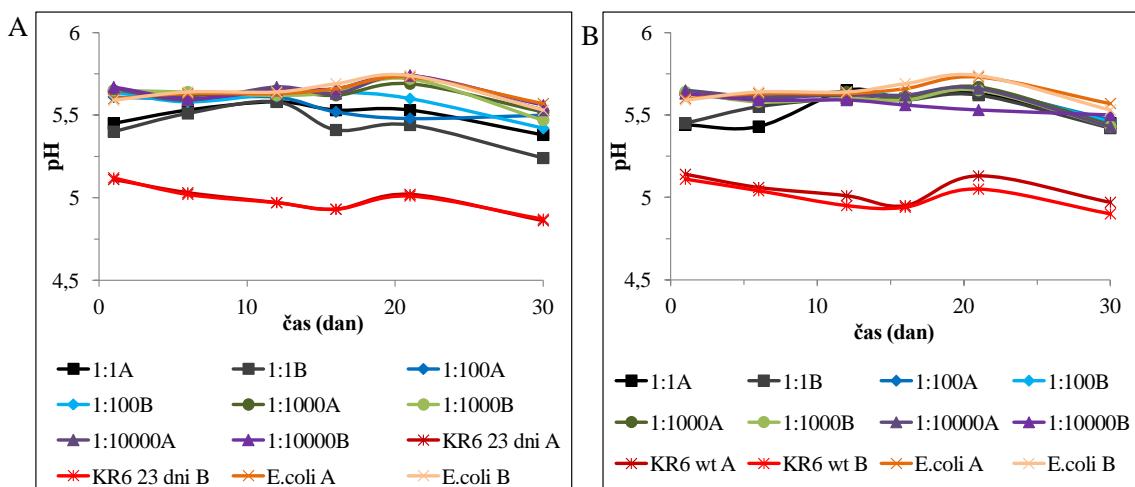
Nadaljevanje slike 23



Slika 23: Rastne krivulje mešanih kultur sevov *L. plantarum* KR6 in *E. coli* K17. Sočasna kultivacija 23 dni stare kulture *L. plantarum* KR6 in 1 dan stare kulture *E. coli* K17 so prikazane v različnih razmerjih na slikah z zelenimi in črnimi črtami od A do D (A = razmerje 1:1, B = razmerje 1:100, C = razmerje 1:1000, D = razmerje 1:10.000). Sočasna kultivacija 1 dan stare kulture *L. plantarum* KR6 in 1 dan stare kulture *E. coli* K17 so prikazane v različnih razmerjih na slikah z modrimi in črnimi črtami od E do H (E = razmerje 1:1, F = razmerje 1:100, G = razmerje 1:1000, H = razmerje 1:10.000). Rast čistih kultur *L. plantarum* KR6, brez sočasne kultivacije, je prikazana na sliki I (zelena = 30 dni stare kultura, modra = 1 dan starata kultura) ter *E. coli* K17 na sliki J. Meja detekcije je bila 100 KE/ml.

Figure 23: Growth curves of mixed cultures of strain *L. plantarum* KR6 and *E. coli* K17. Mixed cultivation of 23 days old culture of *L. plantarum* KR6 and 1 day old culture of *E. coli* K17 in different ratios is shown on figures A-D with green and black lines (A = ratio 1:1, B = ratio 1:100, C = ratio 1:1000, D = ratio 1:10.000). Mixed cultivation of 1 day old culture of *L. plantarum* KR6 and 1 day old culture of *E. coli* K17 in different ratios is shown on figures E-H with blue and black lines (E = ratio 1:1, F = ratio 1:100, G = ratio 1:1000, H = ratio 1:10.000). Growth of the pure cultures, without cocultivation, is shown on figure I for *L. plantarum* KR6 (green = 30 days old culture, blue = 1 day old culture) and *E. coli* K17 on figure J. Limit of detection was 100 CFU/ml.

Tekom gojenja mešanih kultur sevov *E. coli* K17 in *L. plantarum* KR6 smo spremljali tudi vrednost pH. Izkazalo se je, da so vrednosti pH mešanih kultur z 1 dan starim sevom KR6 zelo podobne tistim s 23 dni starim sevom KR6 (24A, B), podobno kot pri sevu 299v. Izkazalo se je, da ima tudi čista kultura KR6 precej nižji pH kot čista kultura *E. coli* K17 oziroma mešane kulture obeh sevov, saj je že začetni pH čiste kulture nižji in ostane okrog vrednosti pH 5. Začetni pH kultur v razmerju 1:1 je bil za okrog 0,2 nižji od ostalih mešanih kultur, vendar se je tekom sočasne kultivacije dvignil na enako vrednost, kot so jo imele ostale mešane kulture in čista kultura *E. coli* K17, okrog vrednosti pH 5,5.



Slika 24: Vrednost pH med kultivacijo mešanih kultur *L. plantarum* KR6 in *E. coli* K17. Slika A prikazuje vrednost pH med sočasno kultivacijo 23 dni stare kulture *L. plantarum* KR6 in 1 dan stare kulture *E. coli* K17 v različnih razmerjih v dveh alikvotih (črna = 1:1, modra = 1:100, zelena = 1:1000, vijolična = 1:10.000) ter vrednost pH med kultivacijo čistih kultur (rdeča = KR6, oranžna = K17). Slika B prikazuje vrednost pH med sočasno kultivacijo 1 dan stare kulture *L. plantarum* KR6 (wt) in 1 dan stare kulture *E. coli* K17 v različnih razmerjih v dveh alikvotih (črna = 1:1, modra = 1:100, zelena = 1:1000, vijolična = 1:10.000) ter vrednost pH med kultivacijo čistih kultur (rdeča = KR6, oranžna = K17). Vrednosti na sliki so povprečje dveh paralelk.

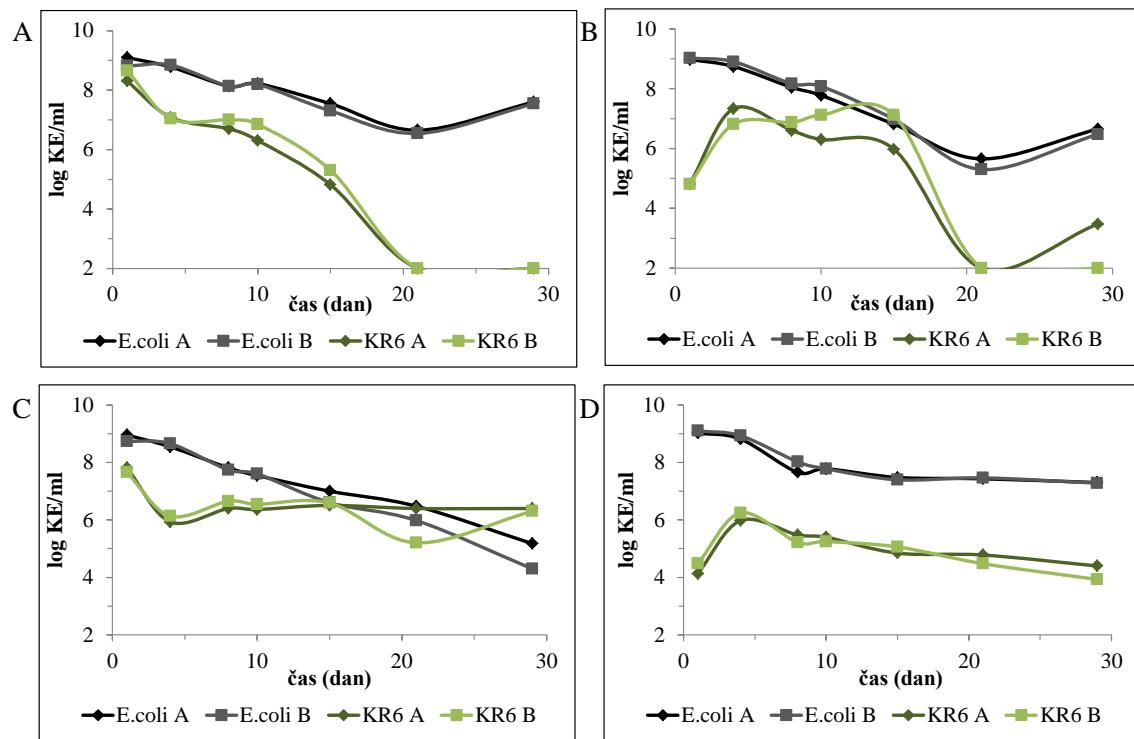
Figure 24: pH values during cultivation of mixed cultures *L. plantarum* KR6 and *E. coli* K17. Figure A shows pH values during mixed cultivation of 23 days old culture of *L. plantarum* KR6 and 1 day old *E. coli* K17 in different ratios in two aliquots (black = 1:1, blue= 1:100, green = 1:1000, violet = 1:10.000) or pH values during cultivation of pure cultures (red = KR6, orange = K17). Figure B shows pH values during mixed cultivation of 1 day old culture of *L. plantarum* KR6 (wt) and 1 day old *E. coli* K17 in different ratios in two aliquots (black = 1:1, blue = 1:100, green = 1:1000, violet = 1:10.000) or pH values during cultivation of pure cultures (red = KR6, orange = K17). Values on the picture represent mean value of two parallels.

Na primeru opaženega sobivanja *L. plantarum* KR6 z *E. coli* smo želeli ugotoviti, ali je za ta pojav potreben neposredni medsebojni kontakt celic obeh kultur ali pa lahko *E. coli* K17 pozitivno vpliva na rast *L. plantarum* že s svojim metabolizmom, ki predvidoma manj zakisa gojišče, hkrati pa bi lahko *E. coli* v gojišče izločala metabolite, ki bi lahko pozitivno vplivali na rast laktobacilov. V tem primeru neposreden kontakt ne bi bil potreben. Standardne poskuse smo izvajali v običajnih 50 ml centrifugirkah, za poskuse mešanih kultur, v katerih ne pride do stika obeh vrst celic, pa smo uporabili mikrotitrirske ploščice z inserti, ki eno kulturo fizično ločijo od druge, vendar imajo membrano, skozi katero lahko prehajajo snovi (poglavlje 3.2.2.3).

Med sočasno kultivacijo sevov 1 dan stare kulture *E. coli* K17 in 23 dni stare kulture *L. plantarum* KR6, fizično ločenih z membrano, smo opazili hitrejše umiranje seva KR6 (slika 25A, B), kot v primeru, ko med njima ni bilo fizične pregrade. Število KE seva KR6 je v tem primeru padlo pod mejo detekcije že po 20 dneh. Na število celic *E. coli* (KE/ml) fizično ločevanje sevov ni vplivalo. To kaže na spodleteli fenotip GASP (slika 11, tip 3). V centrifugirkah, kjer seva nista fizično ločena, sobivata (slika 25C, D), čemur pravimo šibki GASP. Če smo *E. coli* inkubirali 30 dni brez KR6, je bilo

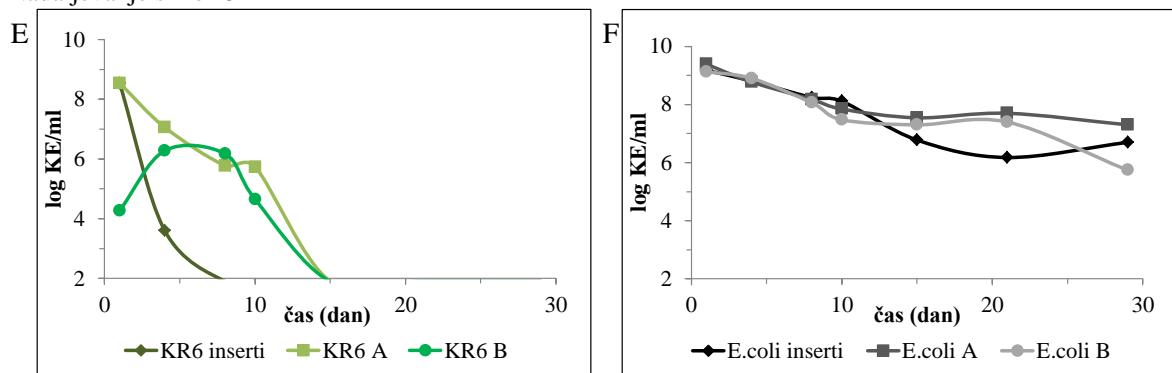
preživetje podobno v centrifugirkah in v mikrotitrskih ploščicah z membrano (slika 25F), medtem ko je bilo odmiranje seva KR6 v centrifugirkah počasnejše (slika 25E).

V enem od poskusov smo kulturo KR6 1. dan gojenja prenesli v izrabljeno gojišče, v katerem je predhodno 1 dan rasla *E. coli*, da bi ugotovili, ali *E. coli* v gojišče izloča snovi, ki pozitivno vplivajo na rast *L. plantarum*. V tem primeru se je število KE/ml *L. plantarum* sicer povečevalo prvih 7 dni, nato pa drastično upadlo (slika 25E – alikvot KR6 B), drugi alikvot pa je bil kultiviran brez sprememb (slika 25E – alikvot KR6A). V obeh alikvotih je KE/ml padlo pod mejo detekcije istočasno (slika 25E).



Se nadaljuje

Nadaljevanje slike 25

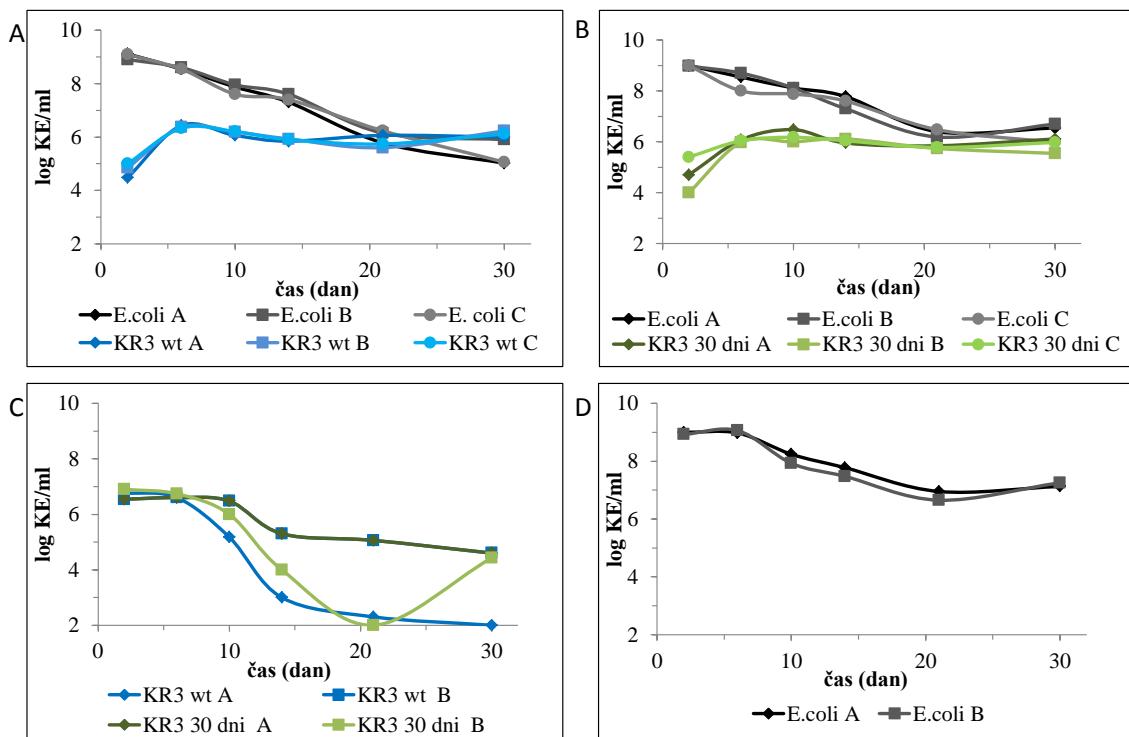


Slika 25: Rastne krivulje mešanih kultur *L. plantarum* KR6 in *E. coli* K17, ločenih z membrano ali ne. Sliki A in B prikazujeta rastne krivulje mešanih kultur 23 dni stare kulture *L. plantarum* KR6 in 1 dan stare kulture *E. coli* K17, ločeni z membrano (inkubacija v mikrotitrski ploščici z inserti) (A = razmerje 1:10, B = razmerje 1:10.000). Sliki C in D prikazujeta rastne krivulje mešanih kultur 23 dni stare kulture *L. plantarum* KR6 in 1 dan stare kulture *E. coli* K17, ki nista bili ločeni (inkubacija v 50 ml centrifugirkah) (C = razmerje 1:10, D = razmerje 1:10.000). Na sliki E so prikazane rastne krivulje čistih kultur seva KR6 (romb = čista kultura seva KR6, inkubirana v mikrotitrski ploščici, kvadrat = čista kultura, gojena v 50 ml centrifugirki, krog = čista kultura KR6, kjer smo v 1. dnevu zamenjali gojišče z izrabljenim gojiščem, na katerem je 1 dan rasla *E. coli*). Na sliki F so prikazane rastne krivulje treh alikvotov čiste kulture *E. coli* K17 (romb = mikrotitrtska ploščica z inserti, kvadrat in krog = paralelki v centrifugirkah). Meja detekcije je bila 100 KE/ml.

Figure 25: Growth curves of mixed cultures of *L. plantarum* KR6 and *E. coli* K17, separated with membrane or not. Figures A and B show growth curves of mixed cultures of 23 days old *L. plantarum* KR6 and 1 day old *E. coli* K17, separated with membrane (microtiter plate with inserts) (A = ratio 1:10, B = 1:10.000). Figures C and D show growth curves of mixed cultures of 23 days old *L. plantarum* KR6 and 1 day old *E. coli* K17, unseparated with membrane (incubation in 50 ml falcon tubes) (C = ratio 1:10, D = 1:10.000). On figure E are shown growth curves of KR6 pure cultures (rhombus = pure culture of strain KR6, incubated in microtiter plate with inserts, square = pure culture of KR6, incubated in falcon tube, circle = pure culture of KR6, where was the medium on the first day replaced with spent medium, where was *E. coli* incubated for 24 hours). Figure F show growth curves of three aliquots of pure culture of strain *E. coli* K17 (rhombus = microtiter plates with inserts, square and circle = parallels in falcon tubes). Limit of detection was 100 CFU/ml.

### c) Mešana kultura *E. coli* K17: *L. plantarum* KR3

V nadaljnjih poskusih smo želeli potrditi, če je sobivanje značilno tudi za druge seve *L. plantarum*. Za reprezentativno smo izbrali razmerje 1:10.000. Če smo inkubirali 30 dni staro kulturo KR3 in mlado kulturo *E. coli* v razmerju 1:10.000, se je število KE *E. coli* zmanjšalo, medtem ko je število KE KR3 naraslo, na koncu pa sta oba seva sobivala skupaj v približno enakem številu (slika 26B). Podobne rezultate smo dobili tudi, če smo namesto 30 dni stare kulture uporabili 1 dan staro kulturo seva KR3 (slika 26A). Če smo sev KR3 gojili samega (brez *E. coli*), smo opazili veliko razliko med paralelkama (slika 26C). V vsaki centrifugirki namreč lahko nastanejo drugačne mutacije, ki lahko različno vplivajo na nadaljnjo rast kulture. Če pridobljene krivulje rasti klasificiramo glede na fenotipe GASP (slika 11), lahko sklepamo, da *L. plantarum* KR3 v sočasni kultivaciji z *E. coli* K17 kaže šibki fenotip GASP. Vendar pa lastnost ni nujno povezana z dolgotrajno stacionarno fazo, saj smo enake rezultate dobili tudi, če sta bili obe kulturi, *E. coli* K17 kot tudi *L. plantarum* KR3, stari 1 dan.

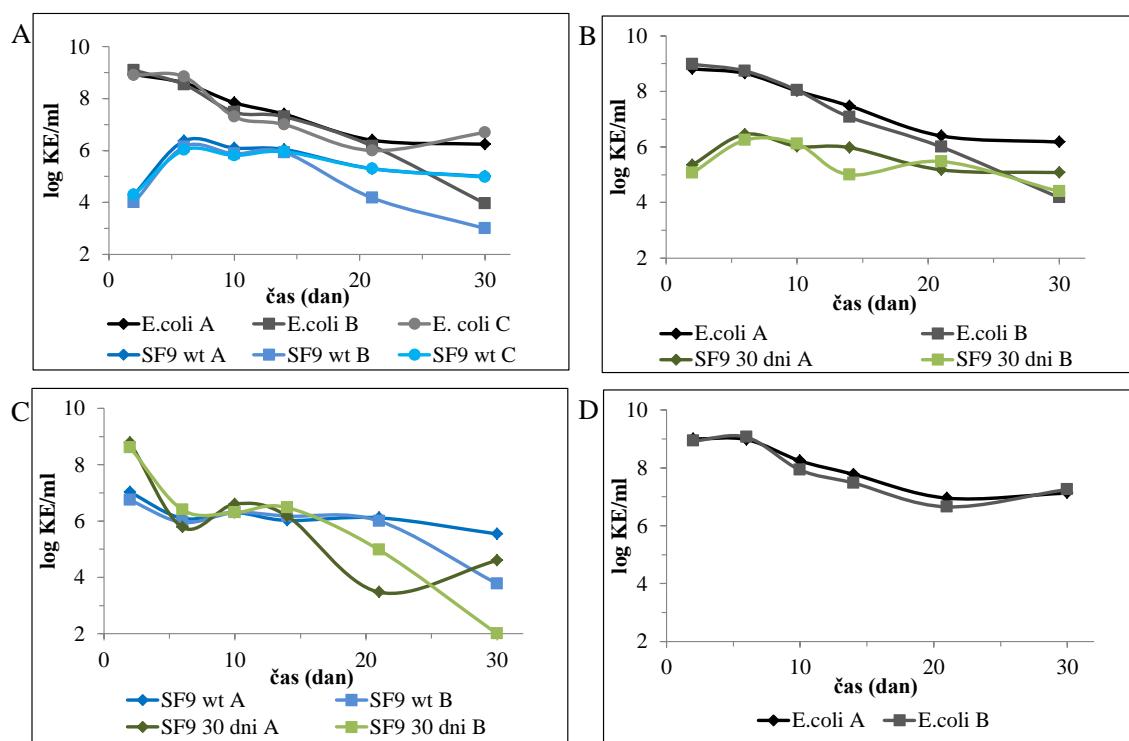


Slika 26: Rastne krivulje mešanih kultur *L. plantarum* KR3 in *E. coli* K17. Na sliki A so prikazane rastne krivulje pri sočasni kultivaciji 1 dan stare kulture *L. plantarum* KR3 in 1 dan stare kulture *E. coli* K17 v razmerju 1: 10000, na sliki B pa pri sočasni kultivaciji 30 dni stare kulture *L. plantarum* KR3 in 1 dan stare kulture *E. coli* K17 v enakem razmerju. Istočasno smo preverili tudi rast čistih kultur *L. plantarum* KR3, ki je prikazana na sliki C (modra = 1 dan stará čista kultura KR3 (wt), zelena = 30 dni stará kultura KR3) in *E. coli* K17, ki je prikazana na sliki D. Meja detekcije je bila 100 KE/ml.

Figure 26: Growth curves of mixed cultures *L. plantarum* KR3 and *E. coli* K17. On figure A are shown growth curves when 1 day old *L. plantarum* KR3 and 1 day old *E. coli* K17 were cocultivated in ratio 1: 10.000, on figure B is shown mixed cultivation of 30 days old culture of *L. plantarum* KR3 and 1 day old *E. coli* K17 in the same ratio. Growth of the pure cultures was monitored at the same time for *L. plantarum* KR3, which is shown on figure C (blue = 1 day old pure culture of KR3 (wt), green = 30 days old culture of KR3) and *E. coli* K17, which is shown on figure D. Limit of detection was 100 CFU/ml.

#### d) Mešana kultura *E. coli* K17: *L. plantarum* SF9

Tudi pri sevu *L. plantarum* SF9 smo med gojenjem v mešani kulturi z *E. coli* dobili podobne rezultate kot z ostalimi sevi *L. plantarum*. Če smo inokulirali staro kulturo *L. plantarum* SF9 in mlado kulturo *E. coli* K17 v razmerju 1:10.000, se je število KE seva SF9 v 30 dneh inkubacije malo povečalo, število KE *E. coli* pa se je zmanjšalo, tako da sta se števili KE izenačili in sta seva sobivala (slika 27B). Tudi v primeru, ko sta bila seva *E. coli* K17 in *L. plantarum* SF9 enako stara (1 dan), sta sobivala vseh 30 dni skupnega gojenja. Opazili smo, da je paralelka, ki je imela ob koncu manjše število KE *E. coli*, imela tudi manjše število KE *L. plantarum* SF9 (slika 27A). Če smo sev SF9 gojili samega, se je njegovo število (KE/ml) tekom inkubacije malo zmanjšalo, pri čemer so se paralelke med seboj razlikovale (slika 27C). *E. coli* K17 pa je sama zelo dobro preživel 30 dni kultivacije v gojišču MML (slika 27D). Če pridobljene krivulje rasti klasificiramo glede na fenotipe GASP (slika 11), lahko enako kot pri sevu KR3 sklepamo, da krivulje rasti kažejo šibki fenotip GASP.

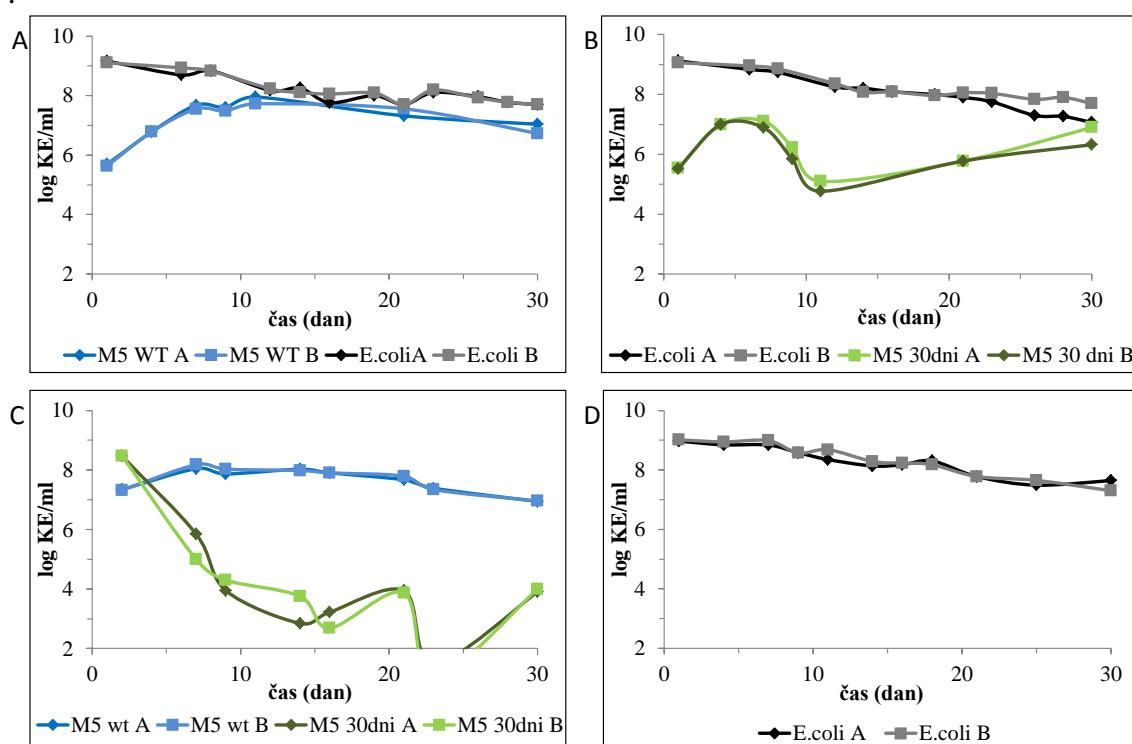


Slika 27: Rastne krivulje mešanih kultur *L. plantarum* SF9 in *E. coli* K17. Na sliki A so prikazane rastne krivulje pri sočasni kultivaciji 1 dan stare kulture *L. plantarum* SF9 in 1 dan stare kulture *E. coli* K17 v razmerju 1: 10000, na sliki B pa pri sočasni kultivaciji 30 dni stare kulture *L. plantarum* SF9 in 1 dan stare kulture *E. coli* K17 v enakem razmerju. Istočasno smo preverili tudi rast čistih kultur *L. plantarum* SF9, ki je prikazana na sliki C (modra = 1 dan stará čista kultura SF9 (wt), zelena = 30 dni stará kultura SF9) in *E. coli* K17, ki je prikazana na sliki D. Meja detekcije je bila 100 KE/ml.

Figure 27: Growth curves of mixed cultures *L. plantarum* SF9 and *E. coli* K17. On figure A are shown growth curves when 1 day old *L. plantarum* SF9 and 1 day old *E. coli* K17 were cocultivated in ratio 1: 10.000, on figure B is shown mixed cultivation of 30 days old culture of *L. plantarum* SF9 and 1 day old *E. coli* K17 in the same ratio. Growth of the pure cultures was monitored at the same time for *L. plantarum* SF9, which is shown on figure C (blue = 1 day old pure culture of SF9 (wt), green = 30 days old culture of SF9) and *E. coli* K17, which is shown on figure D. Limit of detection was 100 CFU/ml.

#### e) Mešana kultura *E. coli* K17: *L. plantarum* M5

Ko smo inokulirali mešano kulturo z 1 dan staro kulturo *L. plantarum* M5 in kulturo *E. coli* K17 staro 1 dan v razmerju 1:10.000 v korist *E. coli*, smo, podobno kot pri ostalih sevih *L. plantarum*, opazili sobivanje sevov (slika 28A). Prav tako sta seva *E. coli* in M5 sobivala tudi, če je bila kultura M5 stara 30 dni (slika 28B). Zanimivo je, da je mlajša kultura M5 vzdrževala enakomerno število (KE/ml), medtem ko je pri 30 dni starí kulturi prišlo do nihanja v številu živih celic. Večje nihanje smo opazili tudi, če smo sev M5 gojili v čisti kulturi brez sočasne kultivacije (slika 28C). Za razliko od ostalih sevov *L. plantarum* je bilo v mešani kulturi *L. plantarum* M5 in *E. coli* K17 tekom 30 dnevne kultivacije število KE/ml za oba seva relativno visoko, za *E. coli* K17 po 30 dneh še vedno okoli  $10^8$  KE/ml, za sev M5 pa približno  $10^7$  KE/ml, ne glede na to, ali je kultura seva M5 ob začetku sočasne kultivacije izvirala iz dolgotrajne stacionarne faze. Kot pri prejšnjih dveh sevih lahko rastne krivulje sočasnih kultivacij klasificiramo kot šibki GASP.



Slika 28: Rastne krivulje mešanih kultur *L. plantarum* M5 in *E. coli* K17. Na sliki A so prikazane rastne krivulje pri sočasni kultivaciji 1 dan stare kulture *L. plantarum* M5 in 1 dan stare kulture *E. coli* K17 v razmerju 1: 10.000, na sliki B pa pri sočasni kultivaciji 30 dni stare kulture *L. plantarum* M5 in 1 dan stare kulture *E. coli* K17 v enakem razmerju. Istočasno smo preverili tudi rast čistih kultur *L. plantarum* M5, ki je prikazana na sliki C (modra = 1 dan old pure culture of M5 (wt), zelena = 30 dni old culture of M5) in *E. coli* K17, ki je prikazana na sliki D. Meja detekcije je bila 100 KE/ml.

Figure 28: Growth curves of mixed cultures *L. plantarum* M5 and *E. coli* K17. On figure A are shown growth curves when 1 day old *L. plantarum* M5 and 1 day old *E. coli* K17 were cocultivated in ratio 1: 10.000, on figure B is shown mixed cultivation of 30 days old culture of *L. plantarum* M5 and 1 day old *E. coli* K17 in the same ratio. Growth of the pure cultures was monitored at the same time for *L. plantarum* M5, which is shown on figure C (blue = 1 day old pure culture of M5 (wt), green = 30 days old culture of M5) and *E. coli* K17, which is shown on figure D. Limit of detection was 100 CFU/ml.

Pri poskusih mešanih kultur *E. coli* in različnih sevov *L. plantarum* smo zaznali trend, da kulti sobivata, čemur pravimo tudi šibki GASP. Za seve *L. plantarum*, ki smo jih vključili v proučevanje pojava GASP, ni bil nujen pogoj za rast populacije laktobacilov in sobivanje z *E. coli* to, da je kultura stara. Sočasna kultivacija je bila za seve *L. plantarum* sicer koristna, saj so čisti sevi sicer prej odmrli, ne pa tudi za kulturo *E. coli*, ki je zelo dobro preživila tudi v odsotnosti laktobacilov. Z merjenjem pH smo ugotovili, da *L. plantarum* močneje zakisa gojišče in proizvede več mlečne kisline, kadar raste v odsotnosti *E. coli*. Pri mešanih kulturah *L. plantarum* z *E. coli* pa so bile vrednosti pH podobne kot pri gojenju *E. coli* same. Če smo seva fizično ločili z membrano, pri čemer so metaboliti še vedno lahko prehajali, seva nista sobivala, saj je *L. plantarum* začel odmirati, vendar kasneje kot v čisti kulturi. Iz tega lahko sklepamo, da je za uspešno sobivanje sevov potreben tudi fizični stik.

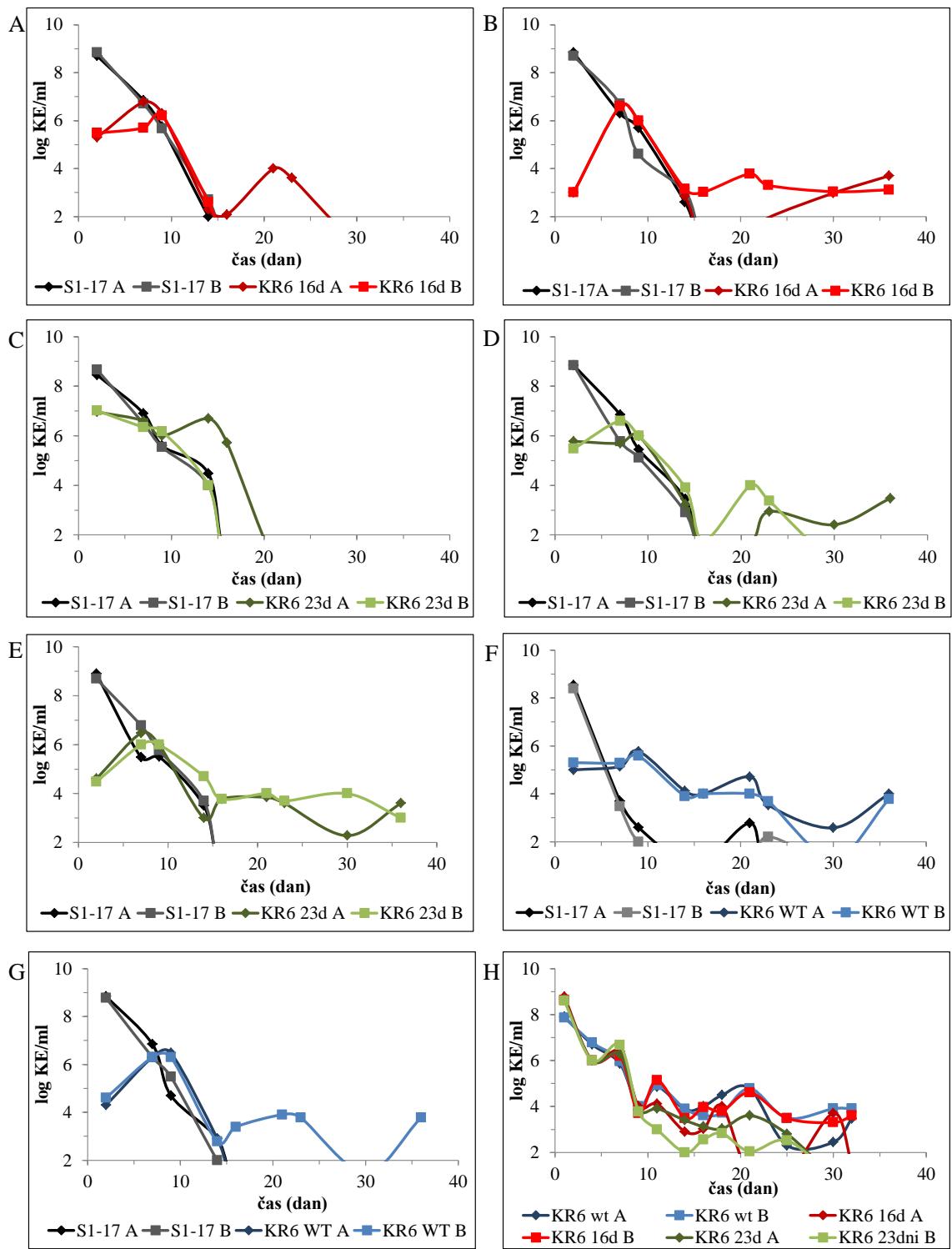
#### 4.2.3.2 Mešane kulture seva *Enterococcus faecalis* S1-17 in izbranih sevov *Lactobacillus plantarum*

V naslednjem segmentu poskusov GASP smo sočasno kultivirali bakterije vrst *Enterococcus faecalis* in *Lactobacillus plantarum*. Bakterije vrste *E. faecalis* so stalni prebivalci črevesja, kjer veljajo za komenzalne bakterije, saj večina sevov na gostitelja nima niti škodljivega niti blagodejnega učinka. Nekateri predstavniki *E. faecalis* pa povzročajo hude okužbe pri ljudeh, zlasti pri osebah z oslabljenim imunskim sistemom. V črevesju bakterije omenjenih dveh vrst pridejo v stik, zato bi bilo z vidika delovanja probiotikov sposobnost vrste *L. plantarum*, da preraste vrsto *E. faecalis*, zaželjena.

V vseh poskusih GASP smo testirali različne kombinacije 1 dan stare kulture *E. faecalis* S1-17 z različnimi sevi *L. plantarum*, pri čemer so bili enterokoki v številčni prednosti. Uporabili smo tako kulture laktobacilov, izpostavljene dolgotrajni stacionarni fazi (poglavje 4.3.1), kot tudi divji tip testnih sevov.

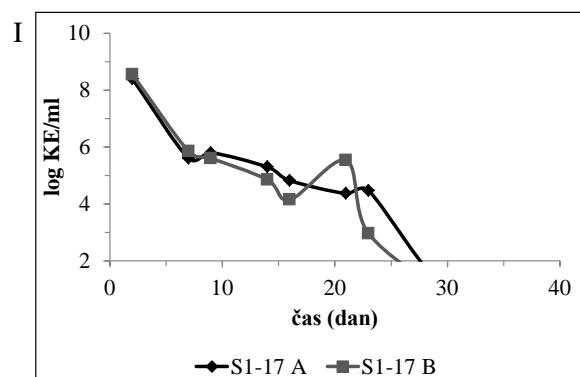
##### a) Mešana kultura *E. faecalis* S1-17: *L. plantarum* KR6

Poskuse sobivanja sevov *L. plantarum* in *E. faecalis* in morebitnega pojava GASP smo zastavili podobno kot poskuse mešanih kultur laktobacilov z *E. coli*, opisane zgoraj (poglavje 3.2.2.3.2). Pri sočasni kultivaciji *L. plantarum* KR6 in 1 dan starih kultur *E. faecalis* S1-17 smo opazili razlike v preživetju med dogotrajnim inkubiranjem v odvisnosti od razmerja med sevoma ob inokulaciji. Če celice *E. faecalis* niso bile v zelo velikem presežku (1:100 ali 1:1000), sta oba seva odmirala s podobno dinamiko (slika 29A, C, D), če je bila kultura KR6 starana (16 ali 23 dni). Če pa je bilo seva *L. plantarum* KR6 ob inokulaciji zelo malo glede na koncentracijo enterokokov (razmerje 1:10.000 ali manj), se je pokazalo, da je sev KR6 prerasel večinsko kulturo *E. faecalis* S1-17 (slika 29B, E). Kljub temu je število celic KR6 (KE/ml) ostalo zelo majhno, okrog  $10^3$  KE/ml. Izjema so mešane kulture 1 dan stare KR6 in 1 dan stare kulture *E. faecalis* S1-17, ki je uspela prerasti tudi v manjšem razmerju 1:1000, kot tudi pri eni alikvoti v primeri 1:10.000 (slika 29F, G). Če smo gojili različno stare kulture KR6 same, smo opazili velika nihanja v številu KE/ml, kar je verjetno posledica naključnega pojavljanja in nato namnožitve/prevlade novih, uspešnejših mutant (slika 29H). Sev S1-17 je odmiral počasneje, če smo ga inkubirali samega (brez laktobacilov) (slika 29I), kar kaže na škodljivi vpliv seva KR6 na enterokoke seva S1-17. Rezultati kažejo na močni fenotip GASP (slika 11, tip 1), ki pa se ne pojavi vedno.



Se nadaljuje

Nadaljevanje slike 29

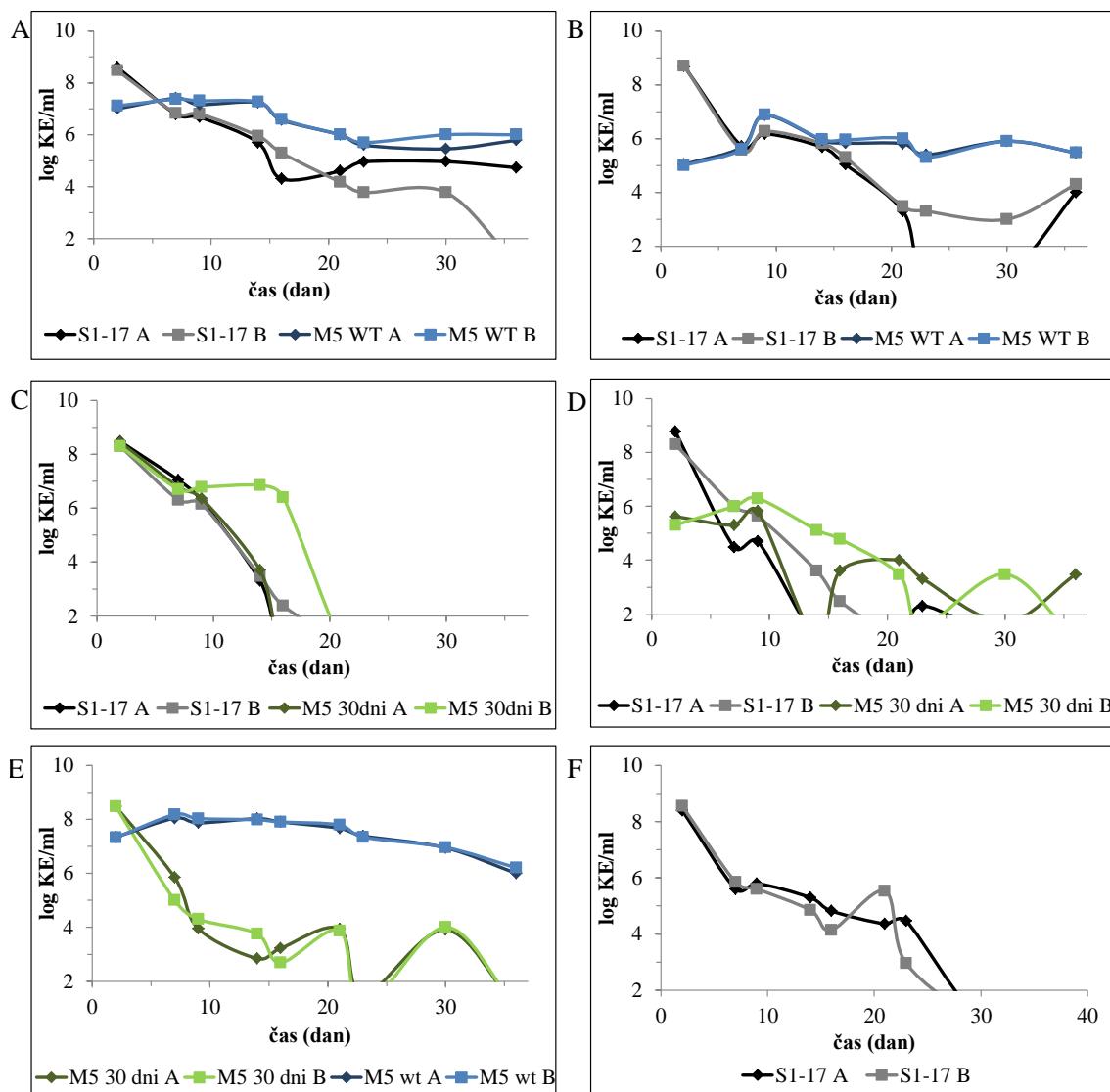


Slika 29: Rastne krivulje mešanih kultur *L. plantarum* KR6 in *E. faecalis* S1-17. Sliki A in B prikazujeta rastne krivulje mešanih kultur 16 dni stare kulture *L. plantarum* KR6 in 1 dan stare kulture *E. faecalis* S1-17 v različnih razmerjih z rdečimi in črnimi črtami (A = razmerje 1:1000, B = razmerje 1:1.000.000). Slike C, D in E prikazujejo rastne krivulje mešanih kultur 23 dni stare kulture *L. plantarum* KR6 in 1 dan stare kulture *E. faecalis* S1-17 v različnih razmerjih z zelenimi in črnimi črtami (C = razmerje 1:100, D = razmerje 1:1000, E = razmerje 1:10.000). Na slikah F in H smo spremljali rastne krivulje mešanih kultur 16 dan stare kulture *L. plantarum* KR6 in 1 dan stare kulture *E. faecalis* S1-17 v različnih razmerjih z modrimi in črnimi črtami (F = razmerje 1:1000, G = razmerje 1:10.000). Slika H prikazuje preživetje čiste kulture *L. plantarum* KR6 (modra = 1 dan stará kultura (wt), rdeča = 16 dni stará kultura, zelena = 23 dni stará kultura), preživetje čiste kulture *E. faecalis* S1-17, pa je prikazano na sliki I. Meja detekcije je bila 100 KE/ml.

Figure 29: Growth curves of mixed cultures *L. plantarum* KR6 and *E. faecalis* S1-17. Figures A and B show growth curves of mixed cultures of 16 days old *L. plantarum* KR6 and 1 day old *E. faecalis* S1-17 in different ratios in red and black lines (A = ratio 1:1000, B = 1:1.000.000). Figures C, D and E show growth curves of mixed cultures of 23 days old *L. plantarum* KR6 and 1 day old *E. faecalis* S1-17 in different ratios in green and black lines (C = ratio 1:100, D = ratio 1:1000, E = ratio 1:10.000). Figures F and G show growth curves of mixed cultures of 1 day old *L. plantarum* KR6 and 1 day old *E. faecalis* S1-17 in different ratios in blue and black lines (F = ratio 1:1000, G = ratio 1:10.000). Figure H shows growth of the pure cultures of *L. plantarum* KR6 (blue = 1 day old culture (wt), red = 16 days old culture, green = 23 days old culture), growth of pure culture of *E. faecalis* S1-17 is shown on figure I. Limit of detection was 100 CFU/ml.

#### b) Mešane kulture *E. faecalis* S1-17: *L. plantarum* M5

Pri sočasni kultivaciji 1 dan stare kulture *L. plantarum* M5 in 1 dan stare kulture *E. faecalis* S1-17 v razmerju 1:100 ali 1:10.000 (slika 30A, B), smo ugotovili, da je sev M5 v 36 dneh preživel bolje kot enterokoki, ki so bili ob inokulaciji v številčni prednosti. Tudi enterokok je v teh primerih uspel preživeti. Ko smo v poskusu uporabili 30 dni staro kulturo M5, pa se je takoj začelo odmiranje in je število KE po 20 dneh padlo pod mejo detekcije (slika 30C, D), neodvisno od razmerja med sevoma. Če smo sev M5 gojili brez prisotnosti enterokokov, smo opazili veliko razliko v preživetju med sevi divjega tipa (star 1 dan) in 30 dni staro kulturo istega seva. Divji tip tekom 36 dnevne inkubacije skoraj ni odmiral, medtem ko se je število KE pri dolgotrajno starani kulturi prvih 15 dni zelo zmanjšalo, med nadaljnjo inkubacijo pa nihalo (slika 30E). Sev S1-17, tudi kadar je rasel sam, ni preživel 36 dni gojenja v gojišču MML.

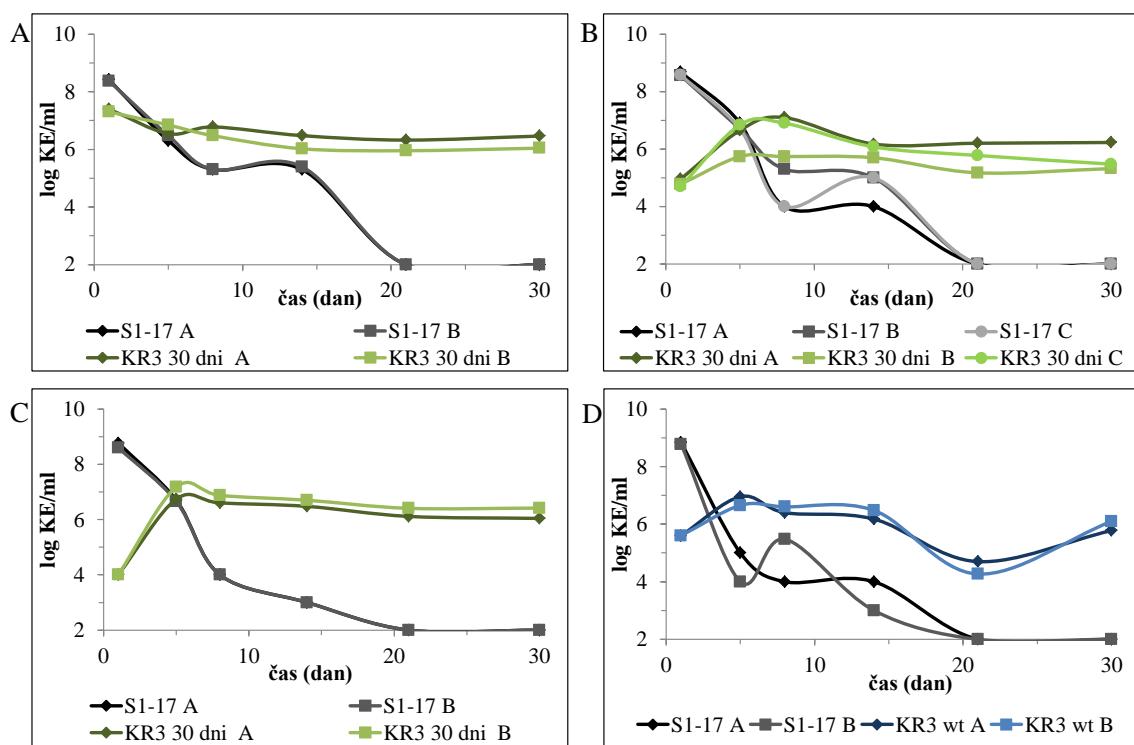


Slika 30: Rastne krivulje mešanih kultur *L. plantarum* M5 in *E. faecalis* S1-17. Slike A in B prikazujeta rastne krivulje mešanih kultur 1 dan stare kulture *L. plantarum* M5 in 1 dan stare kulture *E. faecalis* S1-17 v različnih razmerjih z modrimi in črnimi črtami (A = razmerje 1:100, B = razmerje 1:10.000). Slike C in D prikazujejo rastne krivulje mešanih kultur 30 dni stare kulture *L. plantarum* M5 in 1 dan stare kulture *E. faecalis* S1-17 v različnih razmerjih z zelenimi in črnimi črtami (C = razmerje 1:1, D = razmerje 1:10.000). Slika E prikazuje preživetje čiste kulture *L. plantarum* M5 (modra = 1 dan star kultura (wt), zelena = 30 dni star kultura), preživetje čiste kulture *E. faecalis* S1-17 pa je prikazano na sliki F. Meja detekcije je bila 100 KE/ml.

Figure 30: Growth curves of mixed cultures *L. plantarum* M5 and *E. faecalis* S1-17. Figures A and B show growth curves of mixed cultures of 1 day old *L. plantarum* M5 and 1 day old *E. faecalis* S1-17 in different ratios in blue and black lines (A = ratio 1:100, B = 1:10.000). Figures C and D show growth curves of mixed cultures of 30 days old *L. plantarum* M5 and 1 day old *E. faecalis* S1-17 in different ratios in green and black lines (C = ratio 1:1, D = ratio 1:10.000). Figure E shows growth of the pure cultures of *L. plantarum* M5 (blue = 1 day old culture (wt), green = 30 days old culture), growth of pure culture of *E. faecalis* S1-17 is shown on figure F. Limit of detection was 100 CFU/ml.

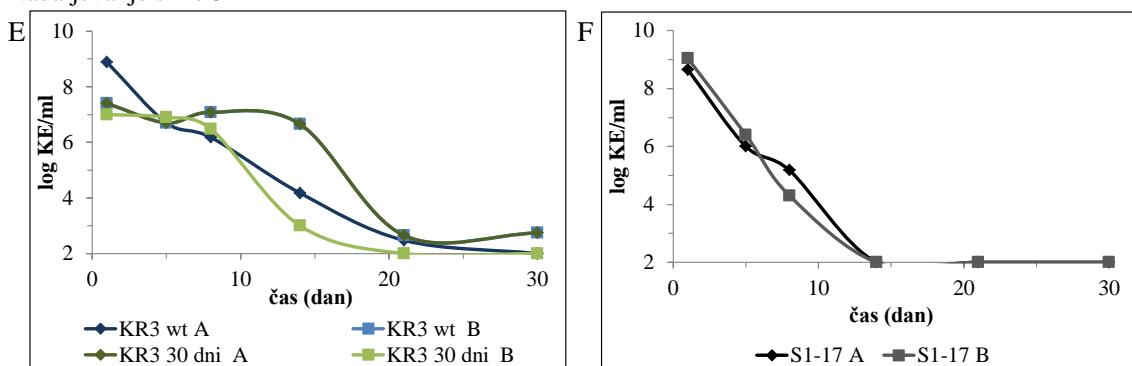
c) Mešane kulture *E. faecalis* S1-17: *L. plantarum* KR3

Podobno kakor je opisano zgoraj, smo poskusili tudi sočasno kultivacijo *E. faecalis* S1-17 in seva *L. plantarum* KR3. Ugotovili smo, da sev KR3 kaže močni GASP (slika 11, tip 1), saj je uspela stara kultura *L. plantarum* KR3 vedno prerasti mlajšo in večinsko kulturo *E. faecalis* S1-17, neodvisno od začetnega razmerja (slika 31A, B, C). Sev KR3 v primerih večjih razmerij v začetku še povečuje KE/ml, vendar se število ustali po 10. dnevu in preživi do 30 dni v število okrog  $10^6$  KE/ml, enako kot v primeru razmerja 1:10. Enako prevlado seva KR3 nad enterokoki smo opazili tudi, če smo uporabili mlado kulturo seva KR3 (slika 31D), pri čemer pa ne moremo govoriti o GASP, ampak o kakšnih drugih mehanizmih delovanja seva tega seva *L. plantarum*. Če smo seva gojili ločeno, se je število KE pri obeh hitreje zmanjšalo (slika 31E, F).



Se nadaljuje

Nadaljevanje slike 31

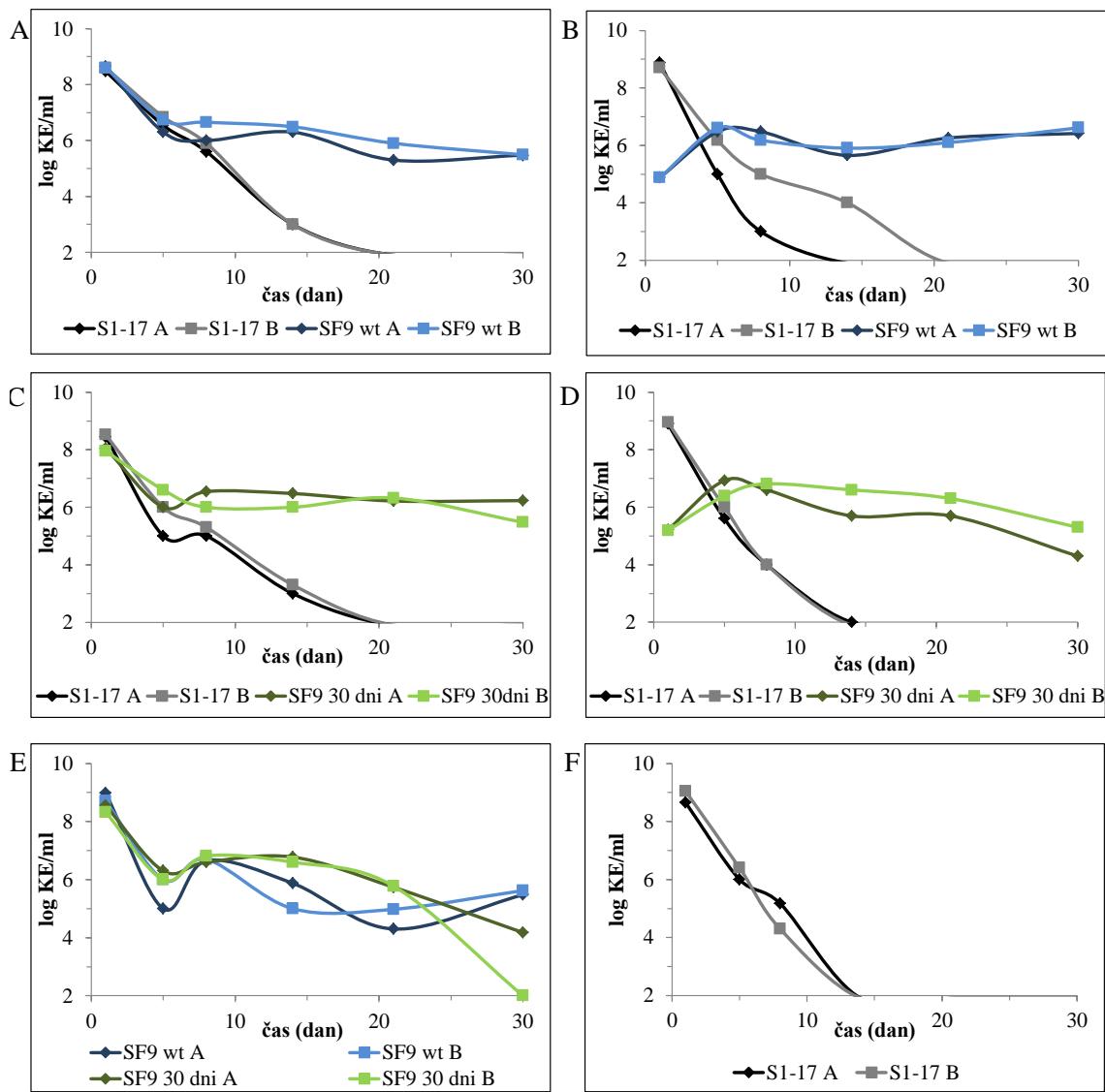


Slika 31: Rastne krivulje mešanih kultur *L. plantarum* KR3 in *E. faecalis* S1-17. Slike A, B in C prikazujejo rastne krivulje mešanih kultur 30 dni stare kulture *L. plantarum* KR3 in 1 dan stare kulture *E. faecalis* S1-17 v različnih razmerjih z zelenimi in črnimi črtami (A = razmerje 1:10, B = razmerje 1:1000, C = razmerje 1:10.000). Slika D prikazuje preživetje v sočasni kultivaciji 1 dan stare kultura seva KR3 in 1 dan stare kultura *E. faecalis* S1-17 v razmerju 1:1000 z modrimi in črnimi črtami. Na sliki E je prikazana rast čistih kultur seva *L. plantarum* KR3 (modra = 1 dan stare kultura (wt), zelena = 30 dni stare kultura), na sliki F pa so prikazane rastne krivulje čiste kulture seva *E. faecalis* S1-17. Meja detekcije je bila 100 KE/ml.

Figure 31: Growth curves of mixed cultures *L. plantarum* KR3 and *E. faecalis* S1-17. Figures A, B and C show growth curves of mixed cultures of 30 days old *L. plantarum* KR3 and 1 day old *E. faecalis* S1-17 in different ratios in green and black lines (A = ratio 1:10, B = ratio 1:1000, C = ratio 1:10.000). Figure D shows growth curves of mixed cultures of 1 day old *L. plantarum* KR3 and 1 day old *E. faecalis* S1-17 in different ratios in blue and black lines in ratio 1:1000. Figure E shows growth of the pure cultures of *L. plantarum* KR3 (blue = 1 day old culture (wt), green = 30 days old culture), growth of pure culture of *E. faecalis* S1-17 is shown on figure F. Limit of detection was 100 CFU/ml.

#### d) Mešana kultura *E. faecalis* S1-17: *L. plantarum* SF9

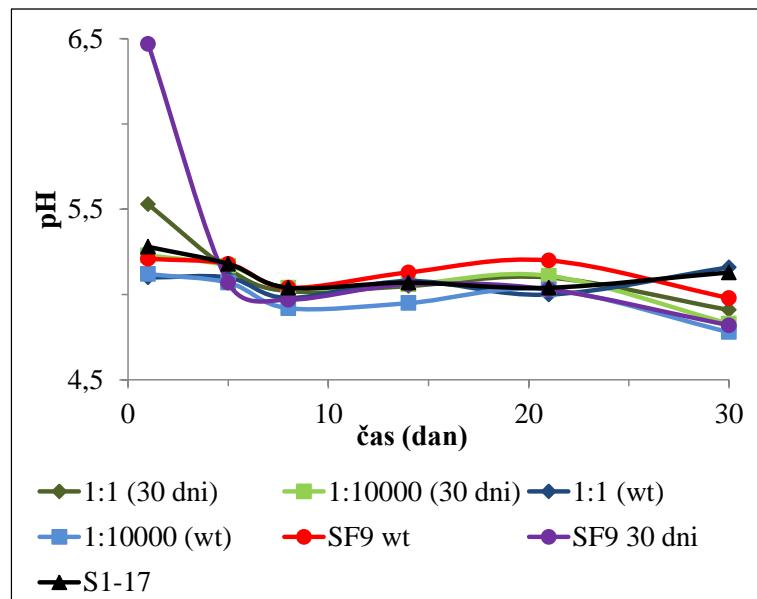
Pri sočasni kultivaciji enako starih (1 dan) kultur *E. faecalis* S1-17 in *L. plantarum* SF9 v istem razmerju je uspel sev SF9 prerasli enterokoke (slika 32A). Podobno smo opazili tudi v primeru, ko je bilo laktobacilov seva SF9 10.000-krat manj (slika 32B) kot enterokokov. Če smo namesto 1 dan stare kulture SF9 uporabili kulturo, pridobljeno po 30 dneh (iz stacionarne faze), v razmerju 1:1, so bili rezultati skoraj identični tistim, dobljenim z 1-dnevnnimi kulturami (slika 32C). Rastne krivulje v poskusu s 30 dni staro kulturo SF9, inokulirano v 10.000-krat manjšem številu kot enterokokov, ko so kljub temu laktobacili prerasli sev *E. faecalis* S1-17, prikazujejo močni fenotip GASP (slika 11, tip 1). Če smo sev SF9 gojili samega, je prav tako v večini primerov uspel preživeti 30 dni (slika 32E). Opazna so tudi nihanja v številu tekom gojenja, kar zopet kaže na naključno pojavljanje mutacij in nato prevlado mutantov v kulturi (slika 9). Število KE seva *E. faecalis* S1-17 pa je med gojenjem čiste kulture padlo pod mejo detekcije med 10 in 15 dnevi (slika 32F), podobno kot v primeru sočasne kultivacije z *L. plantarum*.



Slika 32: Rastne krivulje mešanih kultur *L. plantarum* SF9 in *E. faecalis* S1-17. Slike A in B prikazujeta rastne krivulje mešanih kultur 1 dan stare kulture *L. plantarum* SF9 in 1 dan stare kulture *E. faecalis* S1-17 v različnih razmerjih z modrimi in črnimi črtami (A = razmerje 1:1, B = razmerje 1:10.000). Slike C in D prikazujejo rastne krivulje mešanih kultur 30 dni stare kulture *L. plantarum* SF9 in 1 dan stare kulture *E. faecalis* S1-17 v različnih razmerjih z zelenimi in črnimi črtami (C = razmerje 1:1, D = razmerje 1:10.000). Slika E prikazuje preživetje čiste kulture *L. plantarum* SF9 (modra = 1 dan staro, zelena = 30 dni staro), preživetje čiste kulture *E. faecalis* S1-17, pa je prikazano na sliki F. Meja detekcije je bila 100 KE/ml.

Figure 32: Growth curves of mixed cultures *L. plantarum* SF9 and *E. faecalis* S1-17. Figures A and B show growth curves of mixed cultures of 1 day old *L. plantarum* SF9 and 1 day old *E. faecalis* S1-17 in different ratios in blue and black lines (A = ratio 1:1, B = 1:10.000). Figures C and D show growth curves of mixed cultures of 30 days old *L. plantarum* SF9 and 1 day old *E. faecalis* S1-17 in different ratios in green and black lines (C = ratio 1:1, D = ratio 1:10.000). Figure E shows growth of the pure cultures of *L. plantarum* SF9 (blue = 1 day old culture (wt), green = 30 days old culture), growth of pure culture of *E. faecalis* S1-17 is shown on figure F. Limit of detection was 100 CFU/ml.

Tekom poskusov s sočasno kultivacijo sevov *E. faecalis* S1-17 in *L. plantarum* SF9 smo spremljali tudi spremembe v vrednosti pH (slika 33). Na začetku kultivacije je imela najvišji pH 30 dni stara čista kultura seva SF9 (pH 6,5). Sočasna kultura istega seva, ki je rasel v razmerju 1:1, je imela v izhodišču prav tako nekoliko višji pH od ostalih (pH 5,5), vendar so se vrednosti pH že ob naslednjem vzorčenju (5. dan) izenačile z ostalimi in ostale okrog vrednosti pH 5 več čas med 30-dnevnim gojenjem.

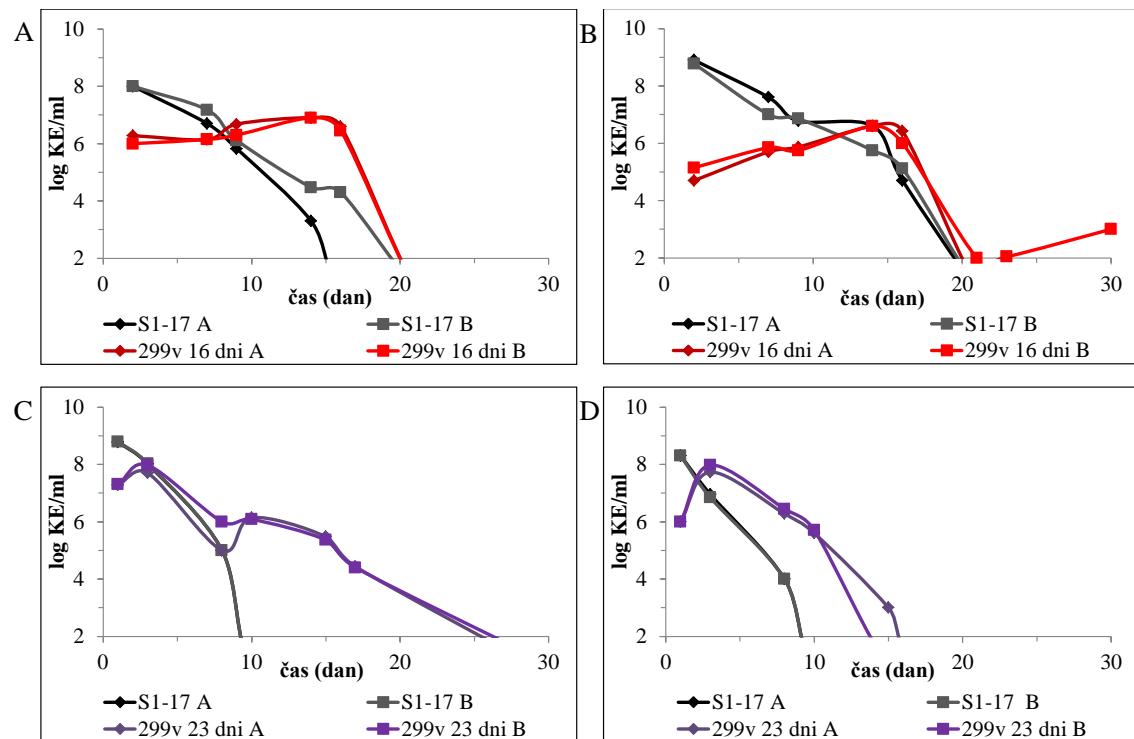


Slika 33: Vrednost pH med kultivacijo mešanih kultur *L. plantarum* SF9 in *E. faecalis* S1-17. Slika prikazuje vrednost pH med sočasno kultivacijo 30 dni stare kultura *L. plantarum* SF9 in 1 dan stare kulture *E. faecalis* S1-17 z zeleno (romb = 1:1, kvadrat = 1:10.000), med sočasno kultivacijo 1 dan stare kulture *L. plantarum* SF9 in 1 dan stare kulture *E. faecalis* S1-17 z modro (romb = 1:1, kvadrat = 1:10.000) ter vrednost pH med kultivacijo čistih kultur (rdeča = 1 dan stara čista kultura SF9 (wt), vijolična = 30 dni stara kultura SF9, črna = 1 dan stara čista kultura S1-17). Vrednosti na sliki so povprečje dveh paralelk.

Figure 33: pH values during cultivation of mixed cultures *L. plantarum* SF9 and *E. faecalis* S1-17. Figure shows pH values during mixed cultivation of 30 days old culture of *L. plantarum* SF9 and 1 day old *E. faecalis* S1-17 with green lines (rhombus = 1:1, square = 1:10.000), during mixed cultivation of 1 day old culture of *L. plantarum* SF9 and 1 day old *E. faecalis* S1-17 with blue lines (rhombus = 1:1, square = 1:10.000) or pH values during cultivation of pure cultures (red= 1 day old pure culture of SF9 (wt), violet = 30 days old culture of SF9, black = 1 day old pure culture of S1-17). Values on the figure represent mean value of two parallels.

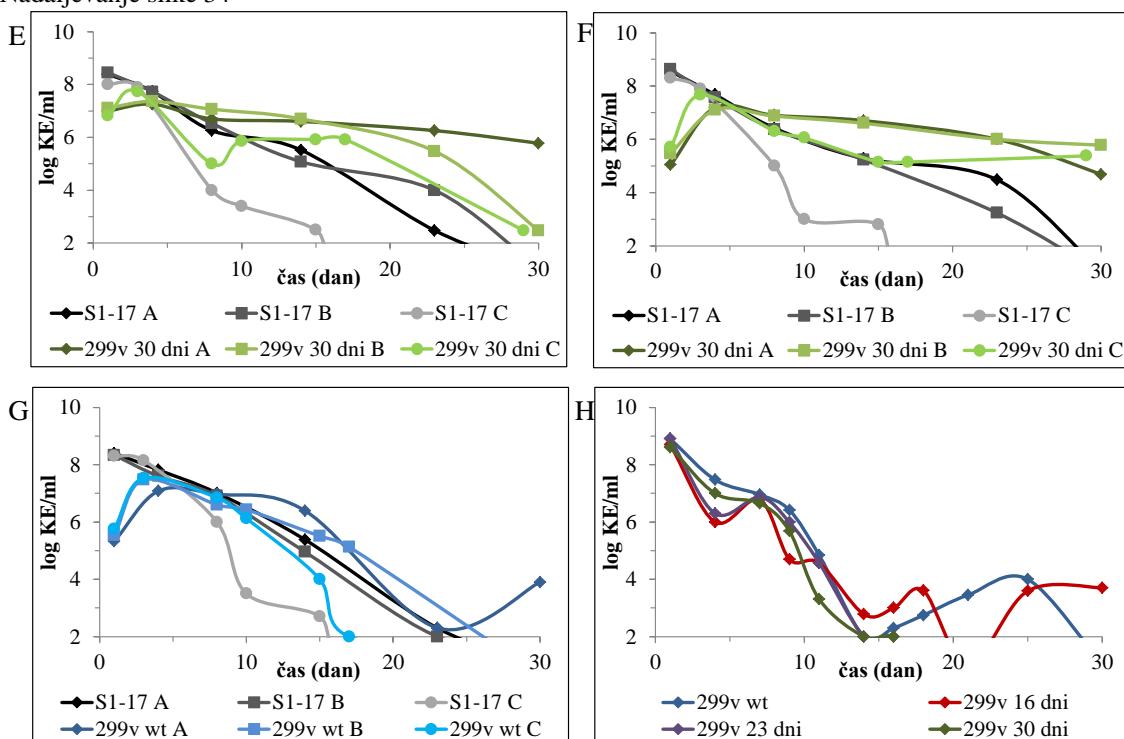
e) Mešana kultura *E. faecalis* S1-17: *L. plantarum* 299v

Prednosti rasti v stacionarni fazi smo raziskali tudi pri komercialnem sevu *L. plantarum* 299v. Ugotovili smo, da če je seva 299v 100-krat ali 1000-krat manj v primerjavi z *E. faecalis* S1-17, sev 299v ne uspe prerasti seva S1-17 (slika 34A, B, C, D). Pojava GASP nismo opazili, saj je število KE pri obeh sevih padlo pod mejo detekcije že pred iztekom 30-dnevne inkubacije. Izjema je 30 dnia stará kultura iz stacionarne faze, ki je izkazala močni fenotip GASP (slika 11, tip 1), če je bila dodana enterokokom v razmerju 1:1000, v nekaterih primerih pa tudi pri razmerju 1:100 (slika 34E, F).



Se nadaljuje

Nadaljevanje slike 34

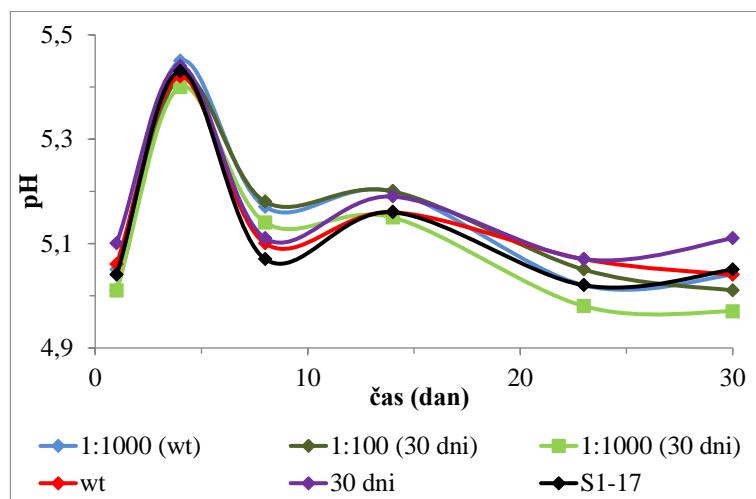


Slika 34: Rastne krivulje mešanih kultur *L. plantarum* 299v in *E. faecalis* S1-17. Sliki A in B prikazujeta rastne krivulje mešanih kultur 16 dni stare kulture *L. plantarum* 299v in 1 dan stare kulture *E. faecalis* S1-17 v različnih razmerjih z rdečimi in črnimi črtami (A = razmerje 1:100, B = razmerje 1:1000). Sliki C in D prikazujeta rastne krivulje mešanih kultur 23 dni stare kulture *L. plantarum* 299v in 1 dan stare kulture *E. faecalis* S1-17 v različnih razmerjih z vijoličnimi in črnimi črtami (C = razmerje 1:100, D = razmerje 1:1000). Sliki E in F prikazujeta rastne krivulje mešanih kultur 30 dni stare kulture *L. plantarum* 299v in 1 dan stare kulture *E. faecalis* S1-17 v različnih razmerjih z zelenimi in črnimi črtami (E = razmerje 1:100, F = razmerje 1:1000). Sliki G so prikazane rastne krivulje mešanih kultur 1 dan stare kulture *L. plantarum* 299v in 1 dan stare kulture *E. faecalis* S1-17 v razmerju 1:1000 z modrimi in črnimi črtami. Slika H prikazuje preživetje čiste kulture *L. plantarum* 299v (modra = 1 dan stará kultura (wt), rdeča = 16 dni stará kultura, vijolična = 23 dni stará kultura, zelena = 30 dni stará kultura). Meja detekcije je bila 100 KE/ml.

Figure 34: Growth curves of mixed cultures *L. plantarum* 299v and *E. faecalis* S1-17. Figures A and B show growth curves of mixed cultures of 16 days old *L. plantarum* 299v and 1 day old *E. faecalis* S1-17 in different ratios in red and black lines (A = ratio 1:100, B = 1:1000). Figures C and D show growth curves of mixed cultures of 23 days old *L. plantarum* 299v and 1 day old *E. faecalis* S1-17 in different ratios in violet and black lines (C = ratio 1:100, D = ratio 1:1000). Figures E and F show growth curves of mixed cultures of 30 days old *L. plantarum* 299v and 1 day old *E. faecalis* S1-17 in different ratios in green and black lines (E = ratio 1:100, G = ratio 1:1000). Figure G shows growth curves of mixed cultures of 1 day old *L. plantarum* 299v and 1 day old *E. faecalis* S1-17 in 1:1000 ratio in green and black lines. Figure H shows growth of the pure cultures of *L. plantarum* 299v (blue = 1 day old culture (wt), red = 16 days old culture, violet = 23 days old culture, green = 30 days old culture). Limit of detection was 100 CFU/ml.

Ko smo spremljali spremjanje vrednosti pH med sočasno kultivacijo 1 dan stare kulture *L. plantarum* 299v in *E. faecalis* S1-17 v razmerju 1:1000 ali če smo namesto 1 dan stare kulture laktobacilov uporabili 30 dni staro v razmerju 1:100 ali 1:1000, smo vedno dobili zelo podoben profil pH (slika 35). Ta profil je skoraj identičen tistemu v primeru inkubacije čistih kultur. Iz tega lahko sklepamo, da razlike, ki smo jih opazili

med sočasno kultivacijo 30 dni stare kulture 299v z S1-17, niso posledice razlik v profilu pH, ampak je sev 299v pridobil prednost rasti v stacionarni fazi.

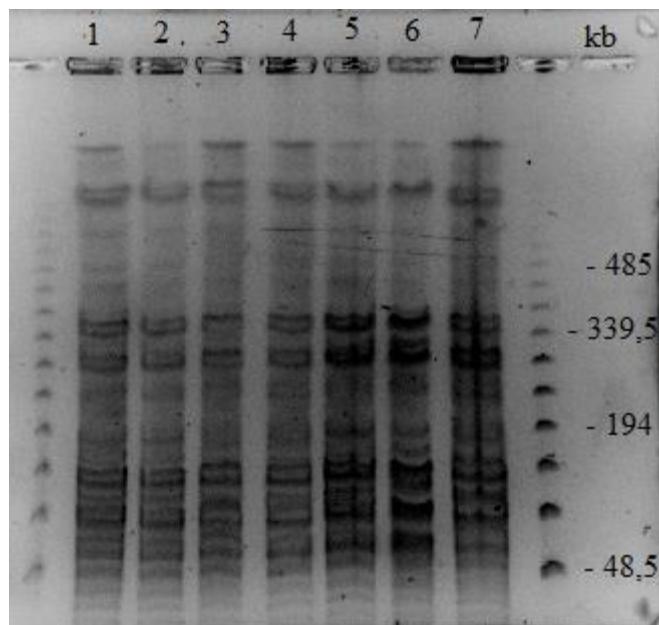


Slika 35: Vrednost pH med kultivacijo mešanih kultur *L. plantarum* 299v in *E. faecalis* S1-17. Slika prikazuje vrednost pH med sočasno kultivacijo 1 dan stare kulture *L. plantarum* 299v in 1 dan stare kulture *E. faecalis* S1-17 v razmerju 1:1000 z modro, med sočasno kultivacijo 30 dni stare kulture *L. plantarum* 299v in 1 dan stare kulture *E. faecalis* S1-17 z zeleno (romb = 1:100, kvadrat = 1:1000) ter vrednost pH med kultivacijo čistih kultur (rdeča = 1 dan staro čista kultura 299v (wt), vijolična = 30 dni staro kultura 299v, črna = 1 dan staro čista kultura S1-17). Vrednosti na sliki so povprečja dveh paralelki.

Figure 35: pH values during cultivation of mixed cultures *L. plantarum* 299v and *E. faecalis* S1-17. Figure shows pH values during mixed cultivation of 1 day old culture of *L. plantarum* 299v and 1 day old *E. faecalis* S1-17 in ratio 1:1000 with blue line, during mixed cultivation of 30 days old culture of *L. plantarum* 299v and 1 day old *E. faecalis* S1-17 with green lines (rhombus = 1:100, square = 1:1000) or pH values during cultivation of pure cultures (red = 1 day old pure culture of 299v (wt), violet = 30 days old culture of 299v, black = 1 day old pure culture of S1-17). Values on the figure represent mean value of two parallels.

#### 4.2.4 Restriktični profil kultur seva *L. plantarum* 299v iz bakterij, izpostavljenih dolgotrajni stacionarni fazi

Pri sevu 299v smo opazili razlike v fenotipu GASP med kulturami iz bakterijskih celic, ki so bile različno dolgo izpostavljene podaljšani stacionarni fazji. Kultura, stara 30 dni, je pri sočasni kultivaciji s sevom *E. faecalis* S1-17 izkazala močan GASP (slika 34F), medtem ko pri 16 ali 23 dni starih kulturah fenotipa GASP nismo opazili (slika 34A, B, C, D). Različno stare kulture seva 299v (16, 23 in 30 dni) smo zato nacepili na trdno gojišče in po inkubaciji izbrali po 2 posamezni koloniji za izolacijo genomske DNK ter primerjali njihov makrorestriktični profil s profilom kolonij, zraslih iz sveže kulture istega seva. Restriktični profili z encimom *SfiI* kolonij iz različno starih kultur se niso razlikovali (slika 36), kar nakazuje, da ni prišlo do večjih genomskeh sprememb. Analiza makrorestriktičnega profila pa ne more izključiti manjših sprememb, npr. točkastih mutacij, manjših delecij ali insercij, ki jih z metodo PFGE ni mogoče zaznati.



Slika 36: Makrorestriktijski profil PFGE seva *L. plantarum* 299v po restrikciji s *SfiI*. Na različne proge smo nanesli vzorce iz kolonij, pridobljenih iz različno starih kultur: 1 = sveža, 2 = 16 dni, 3 = 16 dni, 4 = 23 dni, 5 = 23 dni, 6 = 30 dni, 7 = 30 dni. Na skrajni levi in desni strani vidimo standardno velikostno lestvico DNK.

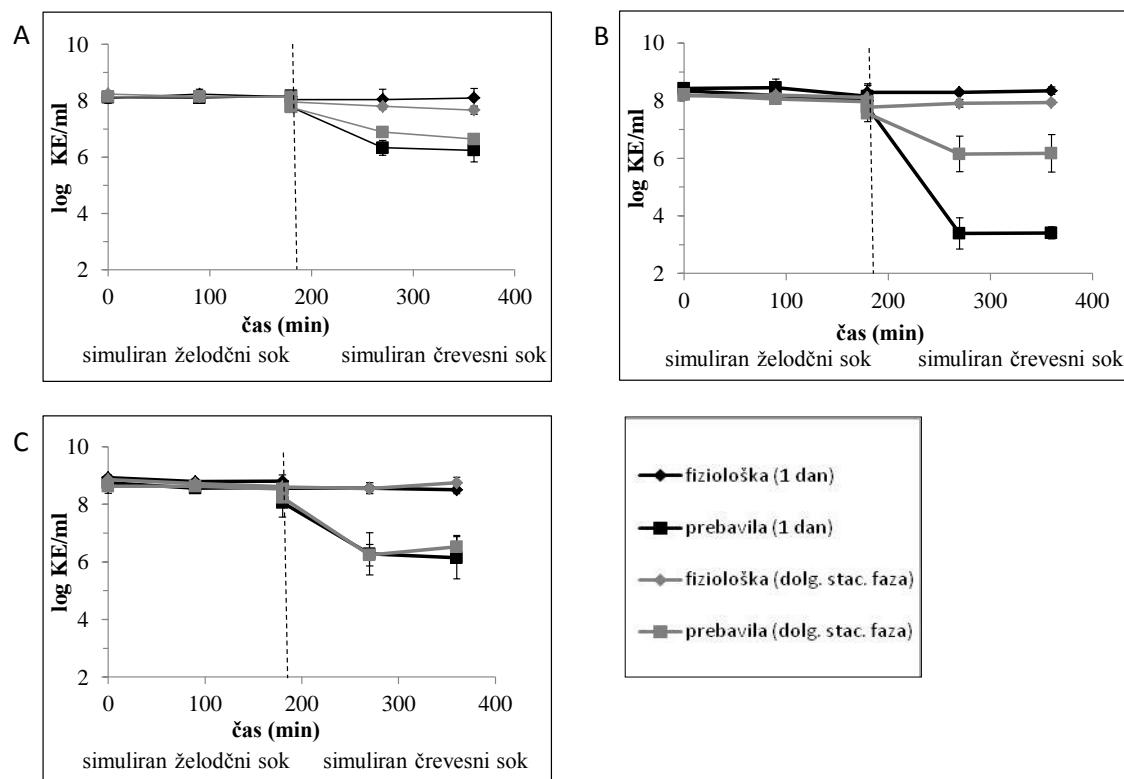
Figure 36: PFGE macrorestriction profile of *L. plantarum* 299v strain after restriction with *SfiI*. Samples of colonies, gained from cultures of different age, were loaded on lanes: 1 = fresh culture, 2 = 16 days, 3 = 16 days, 4 = 23 days, 5 = 23 days, 6 = 30 days, 7 = 30 days. On the left and right side of the gel is standard DNA ladder.

#### 4.2.5 Preživetje kultur stacionarne faze v simuliranih razmerah prebavil

V dolgotrajni stacionarni fazi rasti smo največje razlike med divjim tipom in starano kulturo opazili pri 3 sevih *L. plantarum*, in sicer KR6, M5 in 299v. Te seve smo zato v nadaljevanju izbrali za preverjanje sposobnosti preživetja v simuliranih razmerah prebavil (poglavlje 3.2.2.4). Preverjali smo preživetje tako 1 dan starih kultur teh sevov (običajna stacionarna faza rasti), kakor tudi sevov iz dolgotrajne stacionarne faze (23 dni za KR6 ali 30 dni za seva M5 in 299v). Uporabili smo gojišča, ki so simulirala sestavo želodčnega soka (pH 2,4, pepsin) ter črevesnega soka (pH 8, žolčne soli).

Rezultati so pokazali, da so vsi trije sevi zelo dobro preživeli izpostavitev simuliranemu želodčnemu soku (slika 37), saj se število KE po 180-minutni izpostaviti ni zmanjšalo. Seva KR6 in 299v sta deloma preživelata tudi v simuliranem črevesnem soku (slika 37A, C). V obeh primerih je število KE padlo z  $10^8$  KE/ml za približno 2 logaritemski enoti. Pri nobenem od obeh sevov nismo opazili razlike med kulturo iz celic v stacionarni fazi (1 dan) in kulturo iz celic v podaljšani stacionarni fazi rasti (23 dni ali 30 dni). Za razliko od KR6 in 299v pa je sev M5 je zelo slabo preživel inkubacijo v simuliranem črevesnem soku, če ni bil prej izpostavljen dolgotrajni stacionarni fazi (slika 37B). Število KE/ml v en dan starci kulturi se je zmanjšalo iz  $10^8$  KE/ml na okrog  $10^3$  KE/ml. Po drugi strani pa je kultura seva M5 iz bakterijskih celic, izpostavljenih 30 dnevni stacionarni fazi, inkubacijo v simuliranem črevesnem soku preživelata podobno kot seva KR6 in 299v, v številu okrog  $10^6$  KE/ml. Sev M5 je torej v dolgotrajni stacionarni fazi

postal odpornejši proti stresu, povezanem z žolčnimi solmi, medtem ko pri sevih KR6 in 299v nismo opazili razlik med izhodnim sevom in kulturami iz celic iz dolgotrajne stacionarne faze.



Slika 37: Preživetje sevov *L. plantarum* KR6 (A), M5 (B) in 299v (C), odvzetih v dolgotrajni stacionarni fazi, v simuliranih razmerah prebavil: 180 min inkubacije v simuliranem želodčnem soku (pH 2,4 in pepsin) ter 180 min v simuliranem črevesnem soku (pH 8, žolčne soli in pankreatin). Primerjali smo preživetje kultur, pridobljenih s preclpljanjem 1 dan inkubiranih sevov (črna), s kulturami iz celic, odvzetih v dolgotrajni stacionarni fazi (siva), v simuliranih razmerah prebavil (kvadrat) in v fiziološki raztopini (romb).

Figure 37: Survival in simulated GI conditions: 180 min in simulated gastric juice (pH 2,4 and pepsin) and 180 min in simulated intestinal juice (pH 8, bile salts and pancreatin) for strains *L. plantarum* KR6 (A), M5 (B) and 299v (C). The comparison between survival of cells gained from 1 day old culture (black) or from prolonged stationary phase culture (grey) in simulated GI conditions (square) or in sterile saline solution (rhombus).

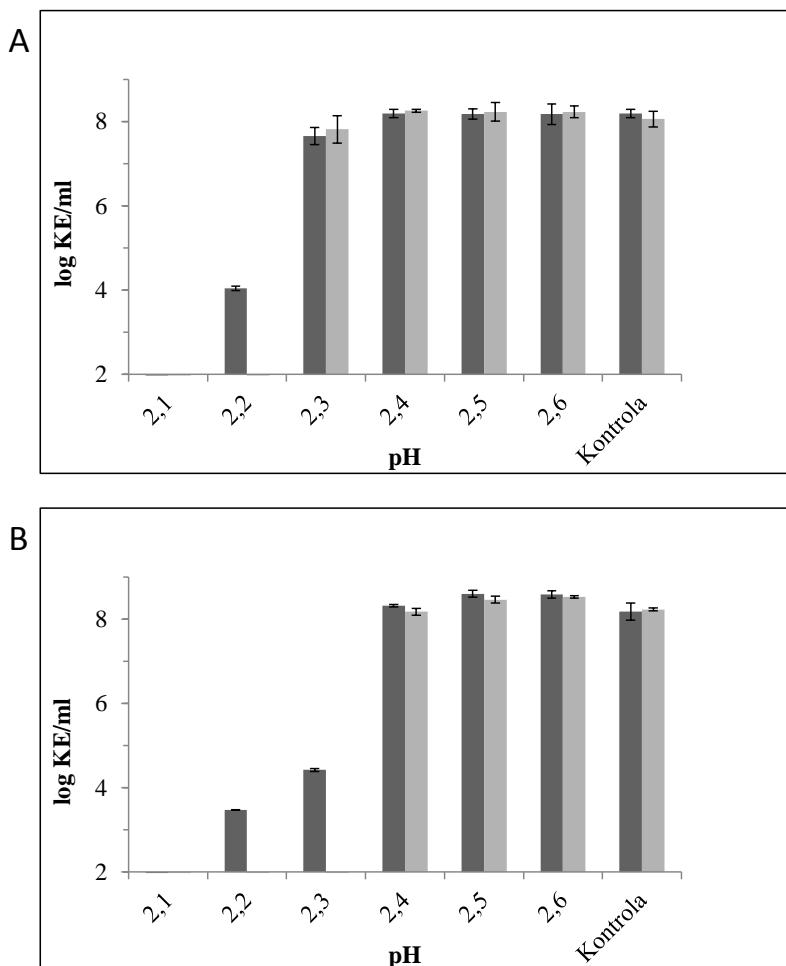
#### 4.3 STRES, POVEZAN Z NIZKIM PH

##### 4.3.1 Odpornost izbranih sevov *L. plantarum* proti nizkemu pH

Ena izmed pomembnejših lastnosti dobrih probiotičnih sevov je sposobnost preživetja pri nizkem pH, ki so mu bakterije izpostavljene v želodcu. Pri sevih *L. plantarum* je ta lastnost relativno slabo raziskana. Izmed preučevanih sevov *L. plantarum* smo glede na hitrost rasti na različnih sladkorjih, razlike v preživetju dolgotrajne stacionarne faze in fenotipov GASP za nadaljnje podrobnejše analize odpornosti proti nizkemu pH izbrali seva *L. plantarum* M5 in *L. plantarum* KR6. Oba seva tudi nista izkazala odpornosti

proti antibiotikom (poglavlje 4.1.4) in sta dobro preživela v simuliranih razmerah prebavil (poglavlje 4.2.5).

Prvi cilj je bil določiti spodnjo mejo vrednosti pH, pri kateri oba seva še lahko preživita, in vrednost pH, ki je seva nista sposobna preživeti (letalni pH). Seva smo gojili v gojišču MRS do stacionarne faze, ju izpostavili pH med 2,1 in 2,6, po inkubaciji pa določili število preživelih celic (KE/ml). Rezultati kažejo, da lahko oba seva preživita pH 2,4 ali višjega brez znatnega zmanjšanja viabilnosti (slika 38). Sev KR6 je odpornejši na nizek pH kot M5, saj se je število KE/ml pri pH 2,3 tudi po 3 urah izpostavitve zmanjšalo za manj kot 50 % (slika 38A), medtem ko v kulturi seva M5 ob istih pogojih KE nismo več detektirali (slika 38B). Glede na pridobljene rezultate smo v nadalnjih poskusih pH 2,0 uporabljali kot letalni pH in pH 2,4 oziroma 2,5 kot ekstremno neugodni, vendar še ne smrtni vrednosti pH.



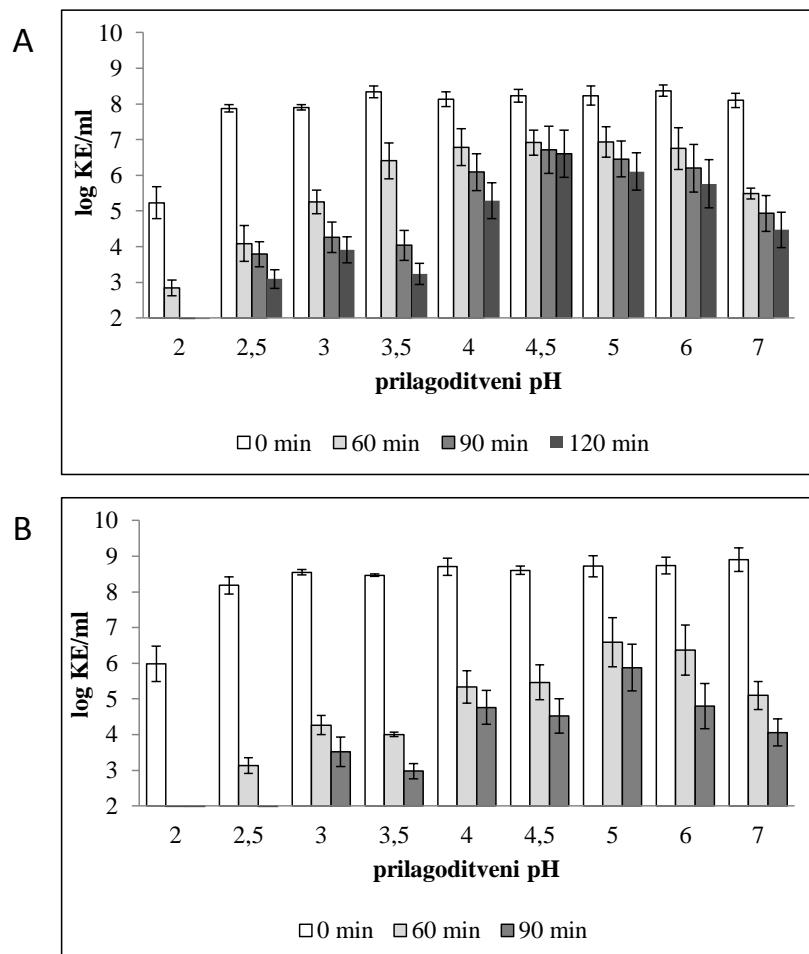
Slika 38: Vpliv izpostavitve zelo nizkemu pH (od 2,1 do 2,6) na viabilnost sevov KR6 (A) in M5 (B) po 1,5 (temno siva) oziroma 3 urah (svetlo siva) inkubacije na 37 °C. Meja detekcije je 100 KE/ml. Vrednosti na grafu predstavljajo povprečja poskusov in relativne napake (standardna deviacija deljena s povprečjem vzorcev), preračunane na naravno skalo.

Figure 38: Influence of low pH challenge at different pH points ranging from 2,1 to 2,6 on viability of *L. plantarum* KR6 (A) and *L. plantarum* M5 (B) determined after 1.5 h (dark grey) or after 3 h (light gray) incubation at 37 °C. Limit of detection was 100 CFU/ml. The values plotted represent the sample means and relative errors (standard deviation, divided by sample mean), as calculated on the natural scale.

#### 4.3.2 Prilagoditev na nizek pH

Bakterijske celice imajo številne mehanizme za prilagoditev na neugodne razmere, med katerimi je tudi nizek pH (poglavlje 2.2.2). V naslednjem koraku raziskav smo testirali sposobnost sevov *L. plantarum* M5 in KR6 za prilagoditev na nizek pH, kar lahko bistveno vpliva na preživetje v zelo neugodnih razmerah. Za poskus smo uporabili celice v pozni eksponentni fazi rasti, saj so celice stacionarne faze običajno že prilagojene in zato tudi že odpornejše na nizek pH. Kulture smo najprej izpostavili 30-minutni fazu prilagoditve na nizek pH, pri čemer smo uporabili variante gojišča MRS z različnimi vrednostmi pH od 2 do 7 (poglavlje 3.2.3.2). Sledila je izpostavitev pH 2, ki je sicer letalna, za 120 min. Rezultati kažejo, da je prilagoditvena faza pomagala obema

sevoma bistveno boljše preživeti nizek pH (slika 39). Pri sevu KR6 je 30-minutna prilagoditev na pH 4,5 povečala preživetje kar za 100-krat v primerjavi s kontrolo (prilagoditev pri pH 7). Sev KR6 se je tako izkazal ne samo kot manj občutljiv za nizek pH, ampak tudi bolj sposoben prilagoditve (slika 39A). Pri sevu M5 se je najboljše izkazala 30-minutna inkubacija na pH 5, ki je povečala preživetje po 60 in 90 min več kot 10-krat v primerjavi s kontrolo na pH 7 (slika 39B). Še vedno pa pri sevu M5 nismo opazili preživelih kolonij po 120 minutah na pH 2, ne glede na prilagoditveno fazo.



Slika 39: Vpliv prilagoditve na nizek pH pri različnih vrednosti (pH 2–7) na preživetje sevov *L.plantarum* KR6 (A) in *L. plantarum* M5 (B) med inkubacijo pri letalno nizkem pH (pH 2). Meja detekcije je bila 100 KE/ml. Vrednosti na grafu predstavljajo povprečja poskusov in relativne napake (standardna deviacija deljena s povprečjem vzorcev), preračunane na naravno skalo.

Figure 39: Influence of acid adaptation treatments at different pH values on the survival of *L. plantarum* KR6 (A) and *L. plantarum* M5 (B) during incubation in lethal acidic condition (pH 2). The limit of detection was 100 CFU/ml; The values plotted represent the sample means and relative errors (standard deviation, divided by sample mean), as calculated on the natural scale.

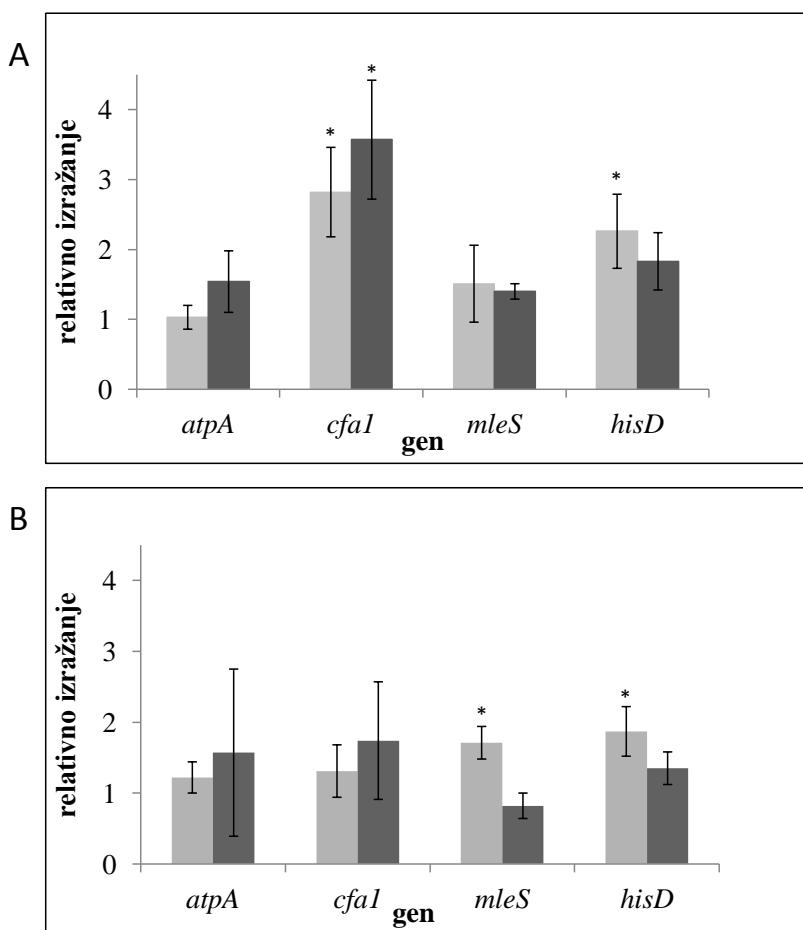
#### 4.3.3 Spremembe v izražanju genov *atpA*, *cfa1*, *hisD* in *mleS* ob izpostavitvi izbranih sevov *L. plantarum* nizkemu pH

Glede na opaženo dobro sposobnost prilagoditve izbranih sevov *L. plantarum* KR6 in M5 na nizek pH, smo v naslednji fazi preverili, kateri mehanizmi prilagoditve na nizek pH so pri tem aktivirani. Testirali smo spremembe v izražanju štirih genov, ki jih povezujejo z glavnimi mehanizmi odgovora na stres nizkega pH (Broadbent in sod., 2010; Koponen in sod., 2012; van de Guchte in sod., 2002). Preverjali smo spremembe v izražanju genov *atpA*, ki kodira alfa podenoto H<sup>+</sup>-ATPaze, in *cfa1*, ki je povezan s spremembami membranske sestave, saj kodira encim, ki spreminja nenasičene maščobne acilne verige v njihove ciklopropanske derivate in s tem vpliva na permeabilnost membrane. Preverljali smo tudi spremembe izražanja gena *mleS*, ki kodira dehidrogenazo malat. Povečanje njegovega izražanja pomeni prehod v malolaktično fermentacijo. Zadnji testirani gen pa je bil *hisD*, ki kodira histidinol dehidrogenazo, vpleteno v zadnja dva koraka biosinteze bazične amino kisline histidina.

Kulture sevov KR6 in M5 smo gojili do pozne eksponentne faze, kulturo razdelili v tri alikvote in vsak alikvot v prilagoditveni fazi inkubirali 30 minut na gojišču MRS z različnimi vrednosti pH. Kontrolni alikvot je bil inkubiran pri pH 7. Enega od alikvotov smo inkubirali pri pH vrednosti, ki smo jo predhodno določili kot optimalno za prilagoditveni tretma. Ta vrednost je bila 4,5 za sev KR6 in 5 za sev M5. Tretji alikvot pa smo istočasno izpostavili močno kisli pH vrednosti, ki pa še ni smrtna za nobenega od obeh sevov, in sicer pH 2,5. Ob času 0 in po 30 minutah smo iz alikvotov vzeli vzorce, v katerih smo nato preverili raven izražanja izbranih 4 genov z metodo qPCR (poglavlje 3.2.3.4).

Rezultati analize qPCR so pokazali, da se je v sevu KR6, ki se je v predhodnih poskusih izkazal kot odpornejši na pH, izražanje gena *cfa1* statistično značilno povečalo (*t*-test,  $P<0,05$ ) (slika 40A) kar za približno 3-krat, če je bil izpostavljen nizkemu pH (4,5 oziroma 2,5). Prav tako je bilo v sevu KR6 povečano izražanje gena *hisD*, ki pa je bilo statistično značilno samo pri prilagoditvenem pH 4,5. Medtem pa smo pri pH 2,5 opazili povečano ekspresijo gena *atpA*, ki sicer ni bila statistično značilna, česar pa nismo opazili pri pH 4,5, kjer je bilo relativno izražanje gena *atpA* okrog 1. Pri obeh pH smo opazili tudi majhno povečanje izražanja gena *mleS*, ki pa prav tako ni bilo statistično značilno.

Pri sevu M5 smo opazili nekoliko povečano izražanje vseh štirih genov ob inkubaciji pri pH 5 (slika 40B), čeprav je bilo povišanje statistično značilno samo za gena *hisD* in *mleS* (*t*-test,  $p<0,05$ ). Pri izpostavitvi pH 2,5 pa izražanje štirih genov ni bilo statistično značilno povečano. Rahlo povečano je bilo izražanje gena *hisD*, pri genih *atpA* in *cfa1* pa je bila standardna deviacijo prevelika, da bi lahko jasno interpretirali rezultate. Izražanje gena *mleS* pa se je pri pH 2,5 celo nekoliko zmanjšalo.



Slika 40: Spremembe izražanja štirih izbranih genov (*atpA*, *cfaI*, *mleS*, *hisD*) pri sevih *L. plantarum* KR6 (A) in M5 (B) po 30 min inkubacije pri prilagoditvenem pH (svetlo siva; 4,5 ali 5 za KR6 ali M5) ali pH 2,5 (temno siva), relativno glede na spremembe izražanja pri kontrolnem pH 7. \*Statistično značilno povečano izražanje (*t*-test,  $p<0,05$ ).

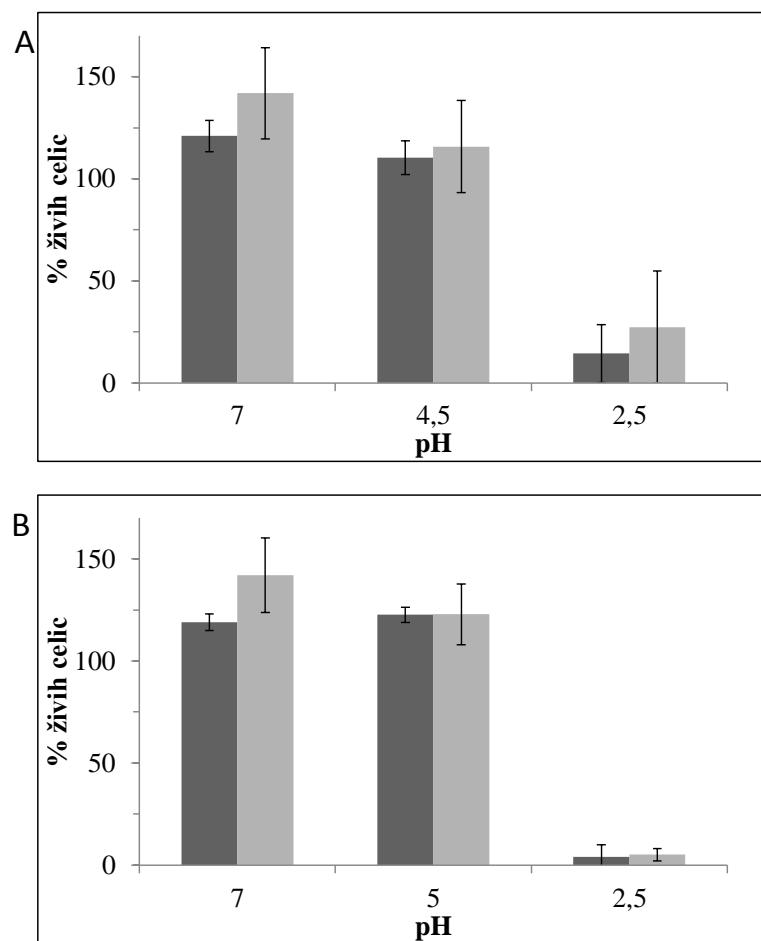
Figure 40: Changes in expression levels of the four tested genes (*atpA*, *cfaI*, *mleS*, *hisD*) in *L. plantarum* KR6 (A) and M5 (B) strains after 30 min incubation at adaptation pH (light grey; 4,5 or 5 for KR6 and M5, respectively) and pH 2,5 (dark grey), relative to the changes in expression when incubated at pH 7. \*Statistically significant upregulation (*t*-test,  $p<0.05$ ).

#### 4.3.4 Vpliv nizkega pH na preživetje in integriteto celične membrane

Pri inkubaciji bakterijskih celic pri nizkem pH je za sposobnost preživetja ključna integriteta celične membrane. Poskus preverjanja preživetja pri nizkem pH in ohranjanja integritete celične membrane smo zastavili enako kot za testiranje izražanja genov s qPCR, saj smo kulturi obeh sevov po 6 urah gojenja izpostavili trem različnim vrednostim pH za 30 minut, in sicer pH 2,5, subletalnemu pH (4,5 za sev KR6 in 5 za M5) in kontrolnemu pH 7. Po končani inkubaciji smo vzorce tretirali s komercialnim barvilo Live/Dead® Baclight™ in kot alternativo prešteli na ploščah MRS (poglavlje 3.2.3.5). Barvilo (Live/Dead® Baclight™) deluje na principu, da propidijev jodid, barvilo, ki oddaja rdečo fluorescenco, vstopa le v celice s poškodovano membrano, ki so mrtve, medtem ko zeleno barvilo SYTO® 9obarva vse celice. Na podlagi razmerja med zeleno in rdečo fluorescenco lahko določimo delež preživelih celic. S poskusom

smo želeli dokazati, ali nizek pH vpliva na integriteto celične membrane in v kolikšni meri je integriteta membrane okrnjena pri subletalnem pH in pri močno kisli vrednosti 2,5. Zanimala nas je tudi primerjava rezultatov ugotavljanja živosti s štetjem na ploščah in z diferencialnim barvanjem s fluorescenčnima barviloma.

Rezultati so potrdili, da sta oba seva zelo odporna na subletalne vrednosti pH, saj se delež živih celic ni zmanjšal, ampak celo povečal (slika 41). Zanimivo pa je odstopanje pri kontrolni pH vrednosti 7, kjer smo s štetjem na ploščah dobili večji delež živih celic kot z barvanjem, tudi standardna deviacija je pri metodi štetja na ploščah večja. Precej nižji delež preživetja pa je bil pri pH 2,5. Število KE je padlo iz  $10^8$  na okrog  $10^7$  pri sevu KR6 in na okrog  $10^6$  pri sevu M5. Sev KR6 je izkazal boljše preživetje, vendar je bilo tudi odstopanje med poskusi večje. Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da pri zelo nizkih vrednostih pH (pH 2,5), poškodbe celične membrane sovpadajo z manjšim deležem preživelih celic, pri subletalnih vrednostih pH pa ne prihaja do večjih membranskih poškodb.



Slika 41: Preživetje sevov, KR6 (A) in M5 (B) pri nizkem pH, ugotovljeno z metodo diferencialnega barvanja (Live/Dead® Baclight<sup>TM</sup>) (temno siva) in štetjem na ploščah (svetlo siva).

Figure 41: Survival of acid pH exposure of two strains, KR6 (A) and M5 (B), determined with differential staining method (Live/Dead® Baclight<sup>TM</sup>) (dark grey) and cell plate count (light grey).

### 4.3.5 Navzkrižna odpornost sevov *L. plantarum*, prilagojenih na nizek pH, na druge dejavnike stresa

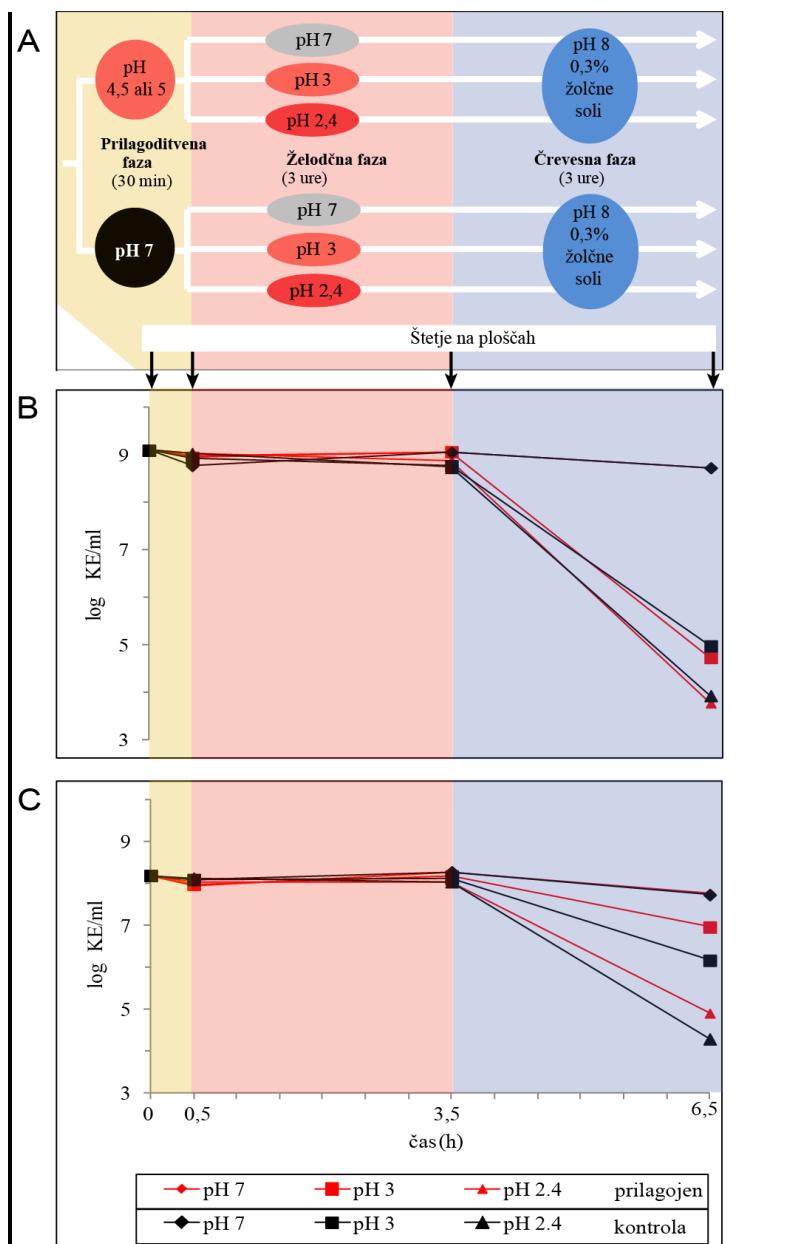
#### 4.3.5.1 Vpliv prilagoditve na nizek pH na odpornost proti simuliranim razmeram prebavil

V predhodnih poskusih (poglavlje 4.3.2) smo opazili dobro sposobnost sevov *L. plantarum* KR6 in M5 za prilagoditev na neugodne razmere kislega pH. Zanimalo nas je tudi, ali lahko izpostavitev prilagoditvenim vrednostim pH izboljša tudi preživetje v simuliranih razmerah prebavil. Oba seva (KR6 in M5) smo v 30-minutni prilagoditveni fazi inkubirali v gojišču MRS z znižanim pH (4,5 in 5) in ju nato izpostavili simuliranim razmeram prebavil (poglavlje 3.2.4.2), ki vključujejo fazo 3-urne izpostavitve simuliranemu želodčnemu soku, ki ima nizek pH in vsebuje pepsin, ki ji sledi faza izpostavitve črevesnemu soku, ki vsebuje žolčne soli ter pankreatin (slika 42A). Preživetje smo ugotavljali s štetjem na ploščah (KE/ml).

Sev M5 prav tako kot sev dobro preživi simulirane želodčne razmere, saj se število KE/ml med 3-urno inkubacijo ni zmanjšalo (slika 42B). Opazili pa smo veliko občutljivost za simulirane črevesne razmere, saj se je število KE/ml po inkubaciji v želodčnem soku s pH 3 in 3-urni inkubaciji v simuliranih črevesnih razmerah zmanjšalo za 4 logaritemske enote oziroma za 5 pri želodčnem soku s pH 2,4. Pri tem razlik v preživetju ni bilo, če je bil sev prilagojen na nizek pH ali ne. Opazili pa smo boljše preživetje v simuliranem črevesnem soku, če želodčni sok, ki so mu bili izpostavljeni pred tem, ni bil zakisan.

Pri sevu KR6 smo opazili, da je enako kot sev M5, zelo dobro preživel simulirane želodčne razmere, saj se število ni zmanjšalo tudi ob izpostavitvi pH 2,4 za 3 ure (slika 42C), kar je neodvisno od prilagoditvenega pH. V simuliranem črevesnem soku pa smo opazili škodljivi učinek žolčnih soli, saj je število KE/ml močno padlo. Če je bila inkubacija na želodčnem soku pri pH 3, se število iz  $10^8$  KE/ml po želodčni fazi zmanjša na  $10^7$  KE/ml po črevesni fazi, če je bil sev prilagojen na nizek pH, oziroma na  $10^6$  KE/ml, če je bil inkubiran na pH 7. Če je bila inkubacija v simuliranem želodčnem soku pri pH 2,4, pa smo opazili manjši pozitiven učinek prilagoditvenega pH, saj je log KE/ml v tem primeru 4,9, pri kontrolnem pH pa 4,3. Opazili pa smo tudi boljše preživetje v simuliranem črevesnem soku, če želodčni sok ni bil zakisan.

Če primerjamo seva, opazimo boljše preživetje seva KR6, zlasti ob predhodni inkubaciji pri pH 4,5 v simuliranem črevesnem soku, ki ima zelo škodljiv učinek na oba seva. Pri sevu M5 pa nismo opazili izboljšanja preživetja ob izpostavitvi pH 5. Pri obeh sevih pa smo opazili boljše preživetje v simuliranih črevesnih razmerah, če sta bila predhodno izpostavljena simuliranemu želodčnemu soku s pH 7. Iz rezultatov lahko sklepamo, da prilagoditev na nizek pH nima velikega vpliva na preživetje simuliranih razmer prebavil, saj ne zaščiti sevov pred škodljivim vplivom žolčnih soli.



Slika 42: Preživetje sevov *L. plantarum* M5 (B) in KR6 (C) v simuliranih gastrointestinalnih razmerah. Shematski prikaz poskusa je prikazan na sliki A. Alikvote obeh sevov smo izpostavili prilagoditveni vrednosti pH pred simuliranim gastorintestinalim prehodom in so prikazane z rdečimi črtami, medtem ko so kontrolni vzorci prikazani s črnimi. Faza prehoda skozi želodec je osenčena rdeče in črevesna faza modro. Preživetje obeh sevov smo določili ob času 0, ob koncu prilagoditvene faze (30 min), ob koncu 3-urne želodčne faze in ob koncu 3-urne izpostavitve simulirani črevesni fazi. Meja detekcije je bila 100 KE/ml.

Figure 42: Survival of *L. plantarum* M5 (B) and KR6 (C) in simulated gastrointestinal conditions. Schematic representation of the assay is presented in panel A. Aliquots of both cultures which were adapted to acid prior to exposure to simulated gastrointestinal tract passage are represented by red lines and non-acid-adapted aliquots are presented by black lines. The gastric phase is shaded red and the intestinal phase blue. Viability was determined at t=0, at the end of acid adaptation phase (0,5 h), at the end of 3 h exposure to simulated gastric conditions and at the end of 3 h exposure to simulated intestinal conditions. Limit of detection was 100 CFU/ml.

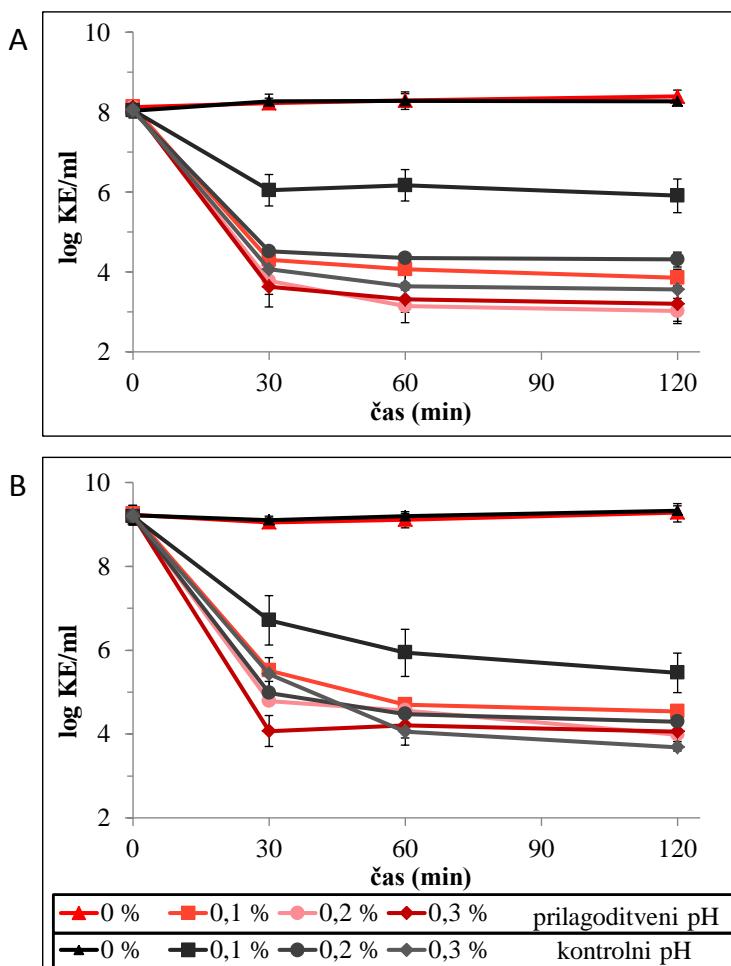
#### 4.3.5.2 Vpliv prilagoditve na nizek pH na odpornost proti žolčnim solem

Zaradi slabega preživetja v žolču pri testiranju simuliranih razmerah prebavil (slika 42), smo preverili vpliv žolča še brez predhodne izpostavitve simuliranim želodčnim razmeram (poglavlje 3.2.4.1). Oba seva (*L. plantarum* KR6 in M5) smo gojili do pozne eksponentne faze, kateri je sledila 30 min inkubacija na gojišču MRS z različnim pH. Kontrolni vzorec je bil inkubiran na pH 7, drugi pa na pH vrednosti, ki smo jo predhodno določili kot optimalni prilagoditveni tretma. Ta vrednost je bila 4,5 za sev KR6 in 5 za sev M5. Nato smo seva dve uri inkubirali na treh različnih koncentracijah žolčnih soli (0,1, 0,2 in 0,3 %) ter kontroli brez žolčnih soli z vzorčenjem za štetje na ploščah.

Sev *L. plantarum* KR6 je zelo občutljiv za žolčne sole (slika 43A), saj se je vrednost KE/ml bistveno zmanjšala že po 30 min izpostavitve, medtem ko je bilo zmanjšanje med 30 in 120 min zelo majhno. Po 30 min inkubacije z 0,1 % žolčnih soli je iz začetnega števila  $10^8$  KE/ml, pri alikvotu prilagojenem na nizek pH, število padlo za 4 log KE/ml, pri kontroli pa samo za 2. Pri koncentraciji žolčnih soli 0,2 % se je prav tako pokazalo boljše preživetje v primeru, ko bakterije niso bile prilagojene na nizek pH. Število se je v 30 min iz  $10^8$  KE/ml zmanjšalo na  $3 \cdot 10^4$  KE/ml pri netretirani in na  $6 \cdot 10^3$  KE/ml pri alikvotu, izpostavljenem pH 4,5. Koncentracija žolčnih soli 0,3 %, ki je bila uporabljena tudi v poskusih simulacije razmer v prebavilih, je dala podobne rezultate. V 30 min izpostavitve takšni koncentraciji je število padlo z  $10^8$  KE/ml na  $4 \cdot 10^3$  KE/ml pri prilagojenem in na  $10^4$  KE/ml pri kontrolnem vzorcu.

Sev *L. plantarum* M5 je prav tako zelo občutljiv za žolčne sole (slika 43B). Opazili smo velik padec števila KE/ml že po 30 min izpostavitve žolčnim solem, v nekaterih primerih pa dodatno še do 60 min, medtem ko se število celic med 60 in 120 min izpostavitve skoraj ni spremenjalo. 0,1 % koncentracija žolčnih soli je povzročila zmanjšanje z  $10^9$  na  $3 \cdot 10^5$  KE/ml v 30 min in na  $5 \cdot 10^4$  KE/ml v naslednjih 30 min, če je bil sev prilagojen na nizek pH. Pri kontroli pa je bilo zmanjšanje števila na  $5 \cdot 10^6$  KE/ml po 30 min in nato na  $9 \cdot 10^5$  KE/ml. Razlika med različno tretiranimi vzorcema je bila velika. Pri 0,2 % žolčnih soleh pa razlike v preživetju med prilagojenim in kontrolnim vzorcem skoraj ni, saj je v obeh primerih po 60 min izpostavitve log KE/ml enak 4,5. Pri 0,3 % žolčnih soli smo opazili razliko po 30 min inkubacije, ko je bilo v kontrolnem vzorcu za 1,5 log KE/ml več preživelih bakterij kot v vzorcu, prilagojenem na nizek pH, vendar se je število kasneje izenačilo in je bilo po 60 min v obeh primerih okrog 4.

Oba seva sta zelo občutljiva za žolčne sole. Največjo razliko smo opazili pri 0,1 % žolčnih soli, kjer se je pokazal največji neugodni vpliv kislega pH pri obeh sevih. Pri kontrolnem pH (7) je bilo preživetje boljše, prilagoditev na nizek pH pa je očitno škodovala sevom ob nadaljnji izpostavitvi žolčnim solem, kar kaže na škodljivo kombinacijo pH in žolčnih soli. Večja razlika med alikvoti je bila opažena pri sevu KR6, kjer je prilagoditev na nizek pH zmanjšala preživetje tudi na višjih koncentracijah žolčnih soli.



Slika 43: Preživetje sevov KR6 (A) in M5 (B) med 120-minutno inkubacijo v prisotnosti žolčnih soli v različnih koncentracijah od 0 do 0,3 %. Oba seva sta bila pred tretmajem z žolčnimi solmi za 30 min izpostavljena prilagoditvenemu pH (rdeče črte) ali kontrolnemu pH (zelene črte). Meja detekcije je bila 100 KE/ml. Vrednosti na grafu predstavljajo povprečja poskusov in relativne napake (standardna deviacija deljena s povprečjem vzorcev), preračunane na naravno skalo.

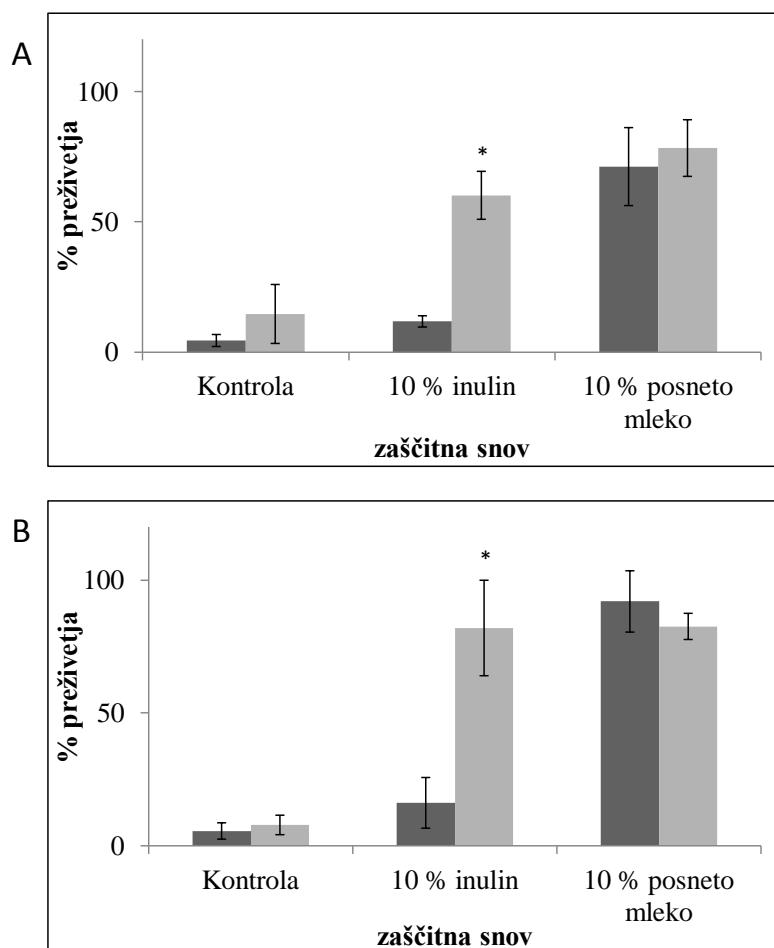
Figure 43: Survival of strains KR6 (A) and M5 (B) during 120 min incubation with bile salts in concentrations ranging from 0 to 0,3 %. Both strains were exposed to adaptive pH (red lines) or control pH (green lines) for 30 minutes prior to bile salt treatment. The limit of detection was 100 CFU/ml; The values plotted represent the sample means and relative errors (standard deviation, divided by sample mean), as calculated on the natural scale.

#### 4.3.5.3 Vpliv prilagoditve na nizek pH na preživetje med liofilizacijo

Industrijski sevi morajo biti prilagojeni tudi na postopke priprave sevov za dolgotrajno shranjevanje, kot je liofilizacija. Iz tega razloga smo ovrednotili preživetje sevov *L. plantarum* KR6 in M5 med liofilizacijo, pri čemer smo poskusili tri različne zaščitne snovi (glicerol, inulin, posneto mleko). Zanimalo nas je tudi, ali prilagoditveni mehanizmi, ki povečajo odpornost proti nizkemu pH, lahko pomagajo tudi pri boljšem preživetju postopka liofilizacije. Kulturo obeh sevov smo gojili do pozne eksponentne faze in jo razdelili v dva alikvota, ki smo ju za 30 minut izpostavili prilagoditvenemu pH (4,5 za sev KR6 in 5 za M5) oziroma kontrolnemu pH (7). Vsak alikvot smo nato še

nadalje razdelili na štiri dele ter pelet resuspenidrali v različnih zaščitnih sredstvih oziroma v fiziološki raztopini. Pred liofilizacijo je imel vsak alikvot približno  $10^9$  KE/ml (poglavlje 3.2.4.3).

Preživetje med liofilizacijo je bilo pri obeh testiranih sevih najboljše, če smo kot zaščitno snov uporabili 10-odstotno raztopino posnetega mleka (slika 44), pri čemer prilagoditev na nizek pH ni imela bistvenega vpliva. Predhodna prilagoditev na nizek pH pa je imela zelo velik vpliv, če smo kot zaščitno sredstvo uporabili inulin. Inulin se je pri kontrolnih razmerah pH brez prilagoditve na nizek pH izkazal kot neustrezno zaščitno sredstvo, saj je bilo preživetje liofilizacije med 10 in 20 %, podobno kot če ne uporabimo zaščitnega sredstva. Po prilagoditvi na nizek pH pa se stopnja preživetja pri sevu KR6 poveča na 60 % oziroma pri sevu M5 na 82 %. Če je bil kot zaščitno sredstvo uporabljen 10-odstotni glicerol, nismo dobili preživelih kolonij, ne glede na prilagoditev na nizek pH.



Slika 44: Preživetje sevov KR6 (A) in M5 (B) med liofilizacijo, izraženo v % preživetja, v odvisnosti od uporabljenega zaščitnega sredstva. Alikvote kulture obeh sevov smo izpostavili 30-minutni prilagoditvi na pH 4,5 oziroma 5 pred liofilizacijo (svetlo sivi stolpci) in primerjali s kontrolnim pH 7 (temno sivi stolci). Meja detekcije je bila 100 KE/ml. \*Statistično značilno boljše preživetje v primerjavi s kontrolnim vzorcem brez prilagoditve na nizek pH ( $t$ -test,  $p<0.05$ ).

Figure 44: Survival of the strains KR6 (A) and M5 (B) during lyophilisation, expressed in % of survival, depending on lyoprotectants. Aliquots of cultures of both strains were exposed to pre-adaptation at pH values (5 or 4,5) for 30 min before lyophilisation (light grey columns) and compared to unadapted controls (pH 7 – dark grey columns). Limit of detection was 100 CFU/ml. \*statistically significant higher survival in comparison with acid unadapted aliquot ( $t$ -test,  $p<0.05$ ).

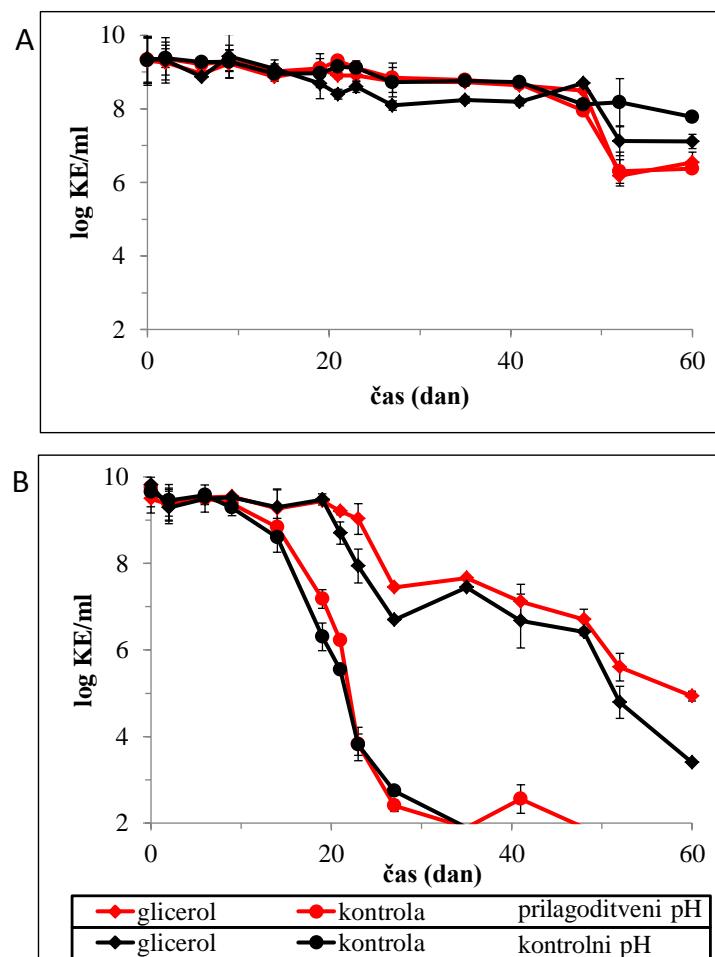
#### 4.3.5.4 Vpliv prilagoditve na nizek pH na preživetje pri nizkih temperaturah

Probiotiki so lahko nizkim temperaturam izpostavljeni tako tekom manipulacije sevov med proizvodnjo kot tudi med shranjevanjem končnega produkta. Raziskali smo, ali prilagoditev na nizek pH vpliva na preživetje pri nizkih temperaturah in na morebitno pojavljanje navzkrižne zaščite med prilagoditvijo na nizek pH in odpornostjo proti nizkim temperaturam. Seva *L. plantarum* KR6 in M5 smo za 60 dni izpostavili nizkim temperaturam (4 °C) in spremljali preživetje, če smo seva inkubirali v gojišču MRS z glicerolom ali brez njega (poglavje 3.2.4.4).

Sev KR6 zelo dobro preživi 60 dni pri nizkih temperaturah, saj je število ostalo nad  $10^6$  KE/ml ves čas inkubacije pri  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  (slika 45A). Bistvenih razlik med različno pripravljenimi alikvotami na začetku ni bilo, opazili pa smo jih po 50 dneh inkubacije na  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Najbolje so preživele bakterije, ki niso bile izpostavljene prilagoditvi na nizek pH, pri čemer je bilo v alikvoti z glicerolom končno število  $1,3 \cdot 10^7$ , v tistem brez glicerola pa  $6 \cdot 10^7$  KE/ml. Če pa je bil sev izpostavljen pH 4,5, so se po 50 dneh inkubacije pojavile razlike v preživetju, saj je število v tem alikvotu padlo na  $6,5 \log$  KE/ml.

Sev M5 pa je slabše preživel nizke temperature (slika 45B). Najboljše preživetje smo ugotovili v primeru prilagoditve na nizek pH in z inkubacijo v glicerolu, do razlike od netretiranega alikvota je prišlo šele na koncu inkubacije. Končna razlika med alikvotoma je kar za  $1,5 \log$  KE/ml. Sevu M5 je dodatek glicerol pri dolgotrajni inkubaciji na  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  koristol, saj se je ob njegovi odsotnosti ne glede na predhodno tretiranje število KE/ml drastično zmanjšalo ter padlo pod mejo detekcije že po 14 dneh inkubacije.

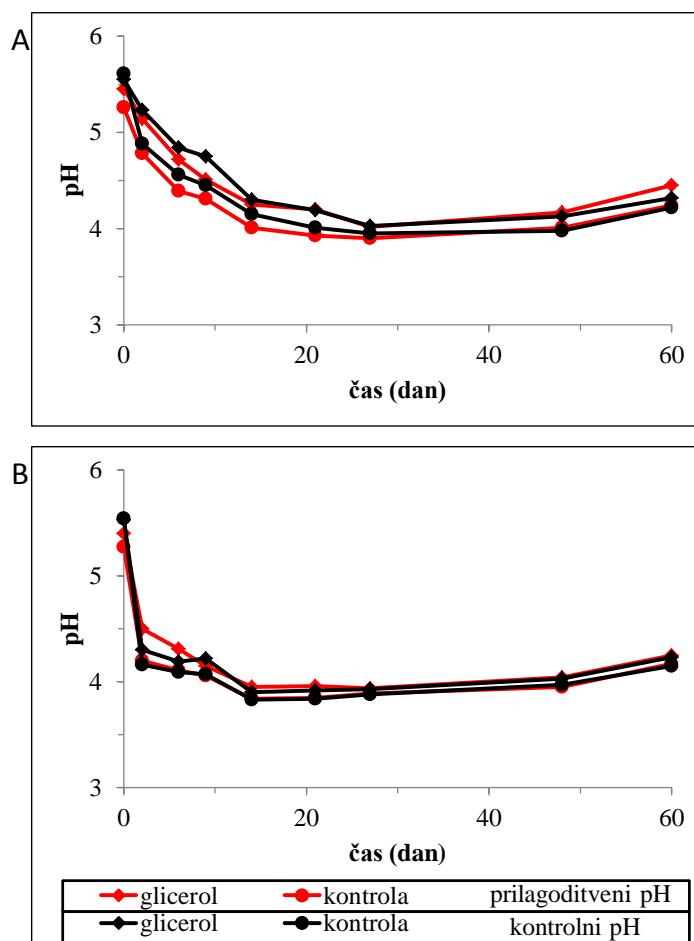
Primerjava sevov je pokazala veliko boljše preživetje seva KR6 med 60-dnevno inkubacijo pri  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Pri slednjem smo opazili negativen vpliv prilagoditve na pH, medtem ko je sevu M5 tako tretiranje koristilo. Sev M5 je pokazal večjo občutljivost za nizke temperature ob odsotnosti glicerola.



Slika 45: Preživetje sevov *L. plantarum* KR6 (A) in M5 (B) med izpostavitvijo nizkim temperaturam (4 °C). Alikvoti so bili resupenidrani v MRS s 30-odstotnim glicerolom (romb) ali samo v gojišču MRS (krog). Pred tem pa sta bila seva izpostavljena prilagoditvenemu pH (rdeče črte) ali nevtralnemu pH (kontrola) (črne črte) za 30 min. Meja detekcije je bila 100 KE/ml. Vrednosti na grafu predstavljajo povprečja poskusov in relativne napake (standardna deviacija, deljena s povprečjem vzorcev), preračunane na naravno skalo.

Figure 45: Survival of *L. plantarum* KR6 (A) and M5 (B) during exposure to low temperatures (4 °C). Aliquots of the strains were resuspended in MRS with 30 % glycerol (rhombus) or in MRS medium (circle). Strains were before treatment acid adapted (red lines) or not (black lines) for 30 minutes. Limit of detection was 100 CFU/ml. The values plotted represent the sample means and relative errors (standard deviation, divided by sample mean), as calculated on the natural scale.

Zanimalo nas je, ali do razlik v številu med vzorci, inkubiranimi z glicerolom in kontrolo, pride zaradi različnega pH, zato smo skupaj s spremeljanjem KE/ml spremljali tudi profil pH, ki pa se ni razlikoval niti med alikvoti niti med sevoma (slika 46). Očitno pa je padla vrednost pH tekom inkubacije, kar nakazuje, da je najverjetneje prišlo do rasti kulturi in nastajanja mlečne kisline.



Slika 46: Vrednost pH med 60-dnevno izpostavljivijo sevov *L. plantarum* KR6 (A) in M5 (B) nizkim temperaturam ( $4^{\circ}\text{C}$ ). Alikvoti so vsebovali celice laktobacilov, resuspendirane v gojišču MRS z 30-odstotnim glicerolom (romb) ali v samem gojišču MRS (krog). Pred tem pa sta bila seva izpostavljena prilagoditvenemu pH (rdeča) ali kontrolnemu pH (črna) za 30 min. Vrednosti na sliki so povprečje dveh paralelek.

Figure 46: pH values during 60 day exposure of *L. plantarum* KR6 (A) and M5 (B) to low temperatures ( $4^{\circ}\text{C}$ ). Aliquots contained bacterial cells resuspended in MRS with 30 % glycerol (rhombus) or in MRS medium (circle). Strains were before treatment for 30 minutes acid adapted (red) or not (black). Values on the figure represent mean of two paralels.

#### 4.3.5.5 Vpliv prilagoditve na nizek pH na odpornost proti oksidativnemu stresu

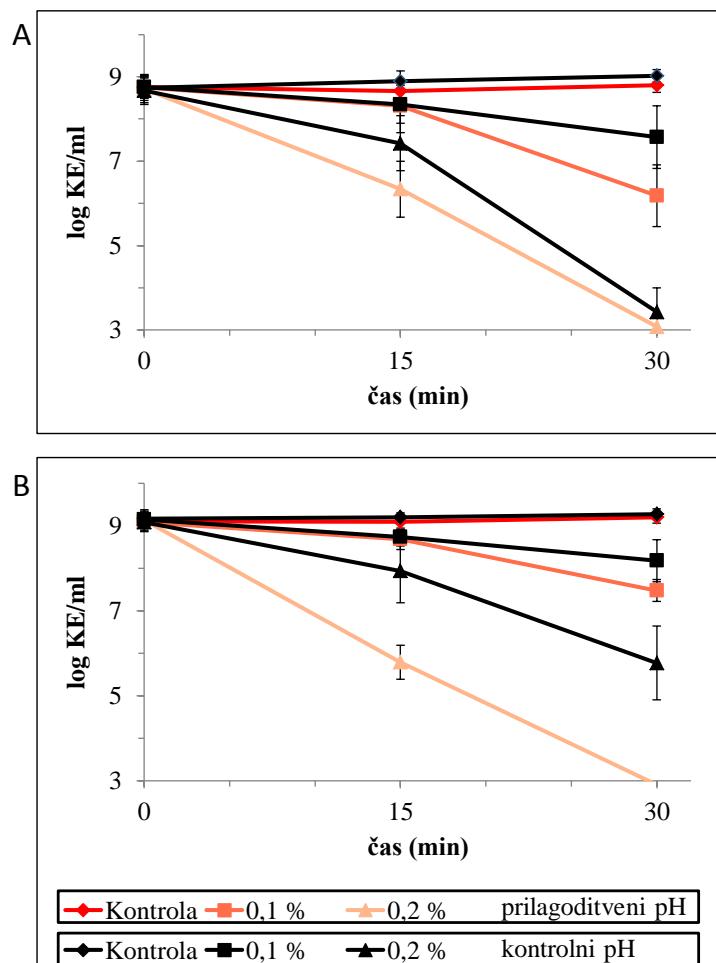
Zanimala nas je tudi morebitna navzkrižna odpornost proti nizkemu pH in oksidativnemu stresu, ki je bil povzročen z vodikovim peroksidom. Zanimalo nas je, ali prilagoditev na nizek pH pripravi seve tudi na to vrsto stresa. Oba seva (*L. plantarum* KR6 in M5) smo tretirali kot pri ostalih poskusih in izpostavili prilagoditvi na nizek pH. Sledila je 30-minutna izpostavitev vodikovemu peroksidu, in sicer 0,1 in 0,2 % koncentraciji (3.2.4.5).

Sev *L. plantarum* KR6 je pokazal veliko občutljivost za vodikov peroksid (slika 47A). Že po 15 min izpostavitve je prišlo do odmiranja, še večje pa je bilo zmanjšanje števila

KE/ml po 30 min. Če smo sev izpostavili 0,1 % peroksida, je po 15 min število upadlo samo za 0,5 log KE/ml, neodvisno od tega, ali so bile bakterije predhodno prilagojene na nizek pH ali ne. Razlika pa se je pojavila po 30 min izpostavitve, ko je bilo preživetje v kontrolnem alikvotu boljše za 1,5 log KE/ml kot v alikvotu s celicam, prilagojenimi na nizek pH. Pri 0,2 % koncentraciji vodikovega peroksida smo zasledili odmiranje že po 15 min izpostavitve, pri čemer se je kontrolni alikvot prav tako izkazal boljše, saj je bilo preživetje bakterij v njem za 1 log KE/ml boljše. Razlika pa se je zmanjšala po 30 min izpostavitve  $H_2O_2$ .

Tudi sev M5 je bil občutljiv za  $H_2O_2$  (slika 47B). Pri izpostavitvi 0,1 % koncentraciji vodikovega peroksida se je v 30 min število KE/ml zmanjšalo z  $10^9$  KE/ml na  $3 \cdot 10^7$  KE/ml v alikvotu z bakterijami, ki so bile izpostavljene prilagajanju, in na  $1,5 \cdot 10^8$  KE/ml v kontrolnem alikvotu. Tudi pri 0,2 %  $H_2O_2$  so bakterije, ki niso bile izpostavljene kislemu pH, preživele bolje. Medtem ko je število KE ob predhodni prilagoditvi po 30 min izpostavitve  $H_2O_2$  padlo pod mejo detekcije, je kontrolni alikvot vseboval  $6 \cdot 10^5$  KE/ml.

Izkazalo se je, da je  $H_2O_2$  zelo škodljiv za oba seva, prilagoditev na nizek pH pa ne izboljša preživetja oksidativnega stresa, ampak ga celo poslabša. Zaščita pred nizkim pH ne zaščiti celic pred  $H_2O_2$ . Razlike so bile zelo opazne pri sevu M5, kjer je bilo preživetje (0,2 % koncentraciji vodikovega peroksida) v kontrolnem alikvotu za 3 log KE/ml enote boljše kot v alikvotu s predhodno prilagojenimi bakterijami.



Slika 47: Preživetje sevov *L. plantarum* KR6 (A) in M5 (B) med izpostavljivijo vodikovemu peroksidu. Alikvoti sevov so bili pred tem izpostavljeni prilagoditvenemu pH (rdeča) ali kontrolnemu (črna) za 30 min. Meja detekcije je bila 1000 KE/ml. Vrednosti na grafu predstavljajo povprečja poskusov in relativne napake (standardna deviacija, deljena s povprečjem vzorcev), preračunane na naravno skalo

Figure 47: Survival of *L. plantarum* KR6 (A) and M5 (B) of exposure to hydrogen peroxide. Aliquots of the strains were before treatment acid adapted (red lines) or not (black lines) for 30 minutes. Limit of detection was 1000 CFU/ml. The values plotted represent the sample means and relative errors (standard deviation, divided by sample mean), as calculated on the natural scale.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 PRIMERJAVA RAZLIČNIH SEVOV *LACTOBACILLUS PLANTARUM*

Glavni namen doktorskega dela je bil raziskati vpliv stresnih razmer, pogojenih s kislim okoljem in z razmerami v stacionarni fazi rasti, na izbrane seve vrste *Lactobacillus plantarum*. Poleg tega smo analizirali tudi potencial nekaterih od preučevanih sevov za probiotično uporabo. Poleg tipskega seva *L. plantarum* B-4496 (ATCC 14917) in komercialnega seva *L. plantarum* 299v smo v okviru doktorskega dela uporabili tudi 2 seva *L. plantarum* iz mikrobine zbirke Laboratorija za tehnologijo antibiotikov, encimov, pribiotikov in starterskih kultur na Fakulteti za živilsko tehnologijo in biotehnologijo v Zagrebu (M5 in SF9). V sklopu te raziskave pa smo osamili več različnih sevov iz fermentiranih živil in med njimi izbrali dva izolata iz kisle repe, ki se uvrščata v vrsto *L. plantarum*, poimenovali pa smo ju KR3 in KR6. Ko smo primerjali njihov makrorestrikcijski profil z metodo PFGE, smo opazili zelo veliko raznolikost (slika 17), kar sovpada z ugotovitvami drugih podobnih raziskav (Pepe in sod., 2004; Scolari in sod., 2002), saj vrsta *L. plantarum* velja za eno izmed najbolj raznolikih (Siezen in van Hylckama Vlieg, 2011). Raznolikost izbranih sevov se je ponovno pokazala pri merjenju rasti na štirih različnih sladkorjih (glukoza, fruktoza, rafinoza in lakoza). Sevi so se med seboj razlikovali v hitrosti rasti in sposobnosti fermentacije lakoze in rafinoze (slika 18). Sev KR6 je pokazal najboljšo rast na vseh 4 sladkorjih. V tej študiji sicer nismo primerjali njihovih genomov, vendar je možno, da je ta raznolikost povezana z obstojem regij v genomu vrste *L. plantarum*, ki so povezane s preživetjem. V teh regijah se nahajajo tudi geni za metabolizem različnih ogljikovih hidratov (Molenaar in sod., 2005; Siezen in van Hylckama Vlieg, 2011). Prav tako ima 6 izbranih sevov različen izvor, kar je lahko vplivalo na njihove metabolne lastnosti, vendar pa v drugih raziskavah niso uspeli pokazati povezave med izvorom sevov in njihovimi lastnostmi (Molenaar in sod., 2005; Parente in sod., 2010). Pri preučevanih sevih *L. plantarum* smo našli razlike tudi med sevi iz istega vira. Oba seva, KR3 in KR6, izvirata iz kisle repe, vendar se razlikujeta tako v makrorestrikcijskem profilu kot tudi hitrosti rasti na različnih sladkorjih. Čeprav poznamo izvor določenega seva, ne moremo zagotovo sklepati, da je sev na okolje, iz katerega smo ga osamili, tudi dobro prilagojen, saj bakterije lahko prehajajo med ekološkimi nišami. Po sposobnosti rasti v prisotnosti različnih sladkorjev se je najboljše izkazal sev KR6, saj je skoraj enako hitro rasel na vseh štirih testiranih sladkorjih, kar mu v črevesju lahko omogoča prednost pred ostalimi bakterijami. Sev KR6 smo identificirali kot najboljši probiotični kandidat med šestimi izbranimi sevi tudi kar zadeva varnost, saj je občutljiv na vse antibiotike, ki so po priporočilih EFSA pomembni v medicini in jih je potrebno vključiti v preskušanje varnosti bakterijskih sevov, namenjenih za prehrano ljudi (2012).

### 5.2 VPLIV STRESNIH RAZMER STACIONARNE FAZE RASTI NA IZBRANE SEVE *LACTOBACILLUS PLANTARUM*

Vpliv dolgotrajne stacionarne faze na laktobacile je doslej ostal slabo raziskan. Opisane so že razlike v preživetju (do 96 ur) – *L. plantarum* WCFS1 (Marco in Kleerebezem, 2008) in *L. casei* (Hussein in sod., 2009a) – glede na uporabljeno gojišče. Če je bil sev *L. casei* izpostavljen dolgotrajni stacionarni fazi do 30 dni, je bolje preživel v gojišču brez dodanih sladkorjev (Hussain in sod., 2009b), kar je verjetno povezano z manjšim

znižanjem vrednosti pH in manjšimi koncentracijami proizvedene mlečne kisline ter etanola. V gojišču brez sladkorja sicer nastaja več mravljične kisline, pa tudi proteinski profil je drugačen, saj je povečano izražanje proteinov, povezanih z alternativnimi viri ogljikovih hidratov (Al-Naseri in sod., 2013). Ko smo 6 sevov gojili v dolgotrajni stacionarni fazi do 30 dni, smo prav tako opazili razlike v preživetju med sevi. Pri tipskem sevu B-4496 je bilo število KE/ml pod mejo detekcije že po 16 dnevih kultivacije. Možno je, da vse bakterijske celice niso odmrle, ampak prešle v nekultivabilno stanje celic, ki so ga opisali že pri *Lactococcus lactis* (Ganesan in sod., 2007) in *Bifidobacterium longum* (Lahtinen in sod., 2005). Lahtinen in sod. (2006) pa so nakazali, da lahko probiotični sevi, kot je na primer *Lactobacillus acidophilus* LA-5, med dolgotrajnim shranjevanjem preidejo v speče stanje. V naši študiji pa nas je bolj zanimala tista bakterijska populacija različnih sevov, ki je uspela preživeti pomanjkanje hranil, presežek metabolnih produktov in s tem povezan seleksijski pritisk, pri tem pa je ostala tudi kultivabilna. Pri *L. brevis* so s proteomsko analizo pokazali, da dolgotrajno starane kulture razgrajujejo odpadne produkte mrtvih celic (Butorac in sod., 2013) in da najverjetneje vsi sevi nimajo te sposobnosti ali pa so na odpadne produkte preobčutljivi. Ko smo primerjali posamezne kulture, zrasle iz kolonij istega seva, potem ko je bil izpostavljen stresu dolgotrajne stacionarne faze, smo opazili veliko razliko v rasti na 4 različnih sladkorjih (glukoza, fruktoza, rafinoza in lakoza). Spremembe so se pokazale kakor izguba ali poslabšanje sposobnosti rasti na določenem ogljikovem hidratu, kot tudi pridobljena oziroma izboljšana rast. Spremembe so najverjetneje povezane z mutacijami, ki so jih celice pridobile v neugodnih razmerah stacionarne faze in stradanja. Mutacije, povezane z neugodnimi razmerami, so pri laktobacilih slabše raziskane. Pri *L. plantarum* Machielson in sod. (2010) niso zaznali povečanja frekvenc mutacij v stacionarni fazi, vendar so celice gojili samo 72 ur. Mutacije, povezane z metabolizmom sladkorjev, so pri *L. plantarum* sicer že opisali. Tako so na primer uspeli pridobiti spontane mutante, ki so boljše rasle na rafinozi, pri čemer spontani mutant v nasprotju s starševskim sevom ni potreboval indukcije za produkcijo  $\alpha$ - in  $\beta$ -galaktozdaze (Ahrné in Molin, 1991). Celice v naši študiji so bile med 30-dnevnim gojenjem sicer stradane, saj se je vsa glukoza verjetno porabila že v začetku, drugih virov ogljikovih hidratov pa jim nismo dodajali. V tem primeru so bolj smiselne mutacije v izgubi in poslabšanju rasti na določenem sladkorju, saj se na ta način bakterijske celice prilagodijo na rast brez sladkorjev in na izkoriščanje odpadnih produktov mrtvih celic. Možen pa je tudi pojav naključnih mutacij, ki so izboljšale sposobnost rasti v prisotnosti določenega sladkorja.

### 5.2.1 Sočasna kultivacija sevov *L. plantarum* z *E. coli* ali *E. faecalis*

Prednost rasti v stacionarni fazi (GASP) je pojav, ki pri laktobacilih do sedaj še ni bil raziskan. Zanimali so nas predvsem medvrstni odnosi, relevantni tudi za razmere v debelem črevesju, kjer bakterije nenehno tekmujejo za razpoložljiva hranila. Na bakterijski vrsti *E. coli*, ki jo najdemo tudi v človeških prebavilih, je bilo doslej narejenih največ študij pojava GASP. Pri poskusih mešanih kultur *E. coli* in različnih sevov *L. plantarum* smo zaznali trend, da kulturi sobivata, čemur pravimo tudi šibki GASP (slika 11, tip 2). Pri sevih *L. plantarum*, ki smo jih vključili v proučevanje pojava GASP, smo opazili naraščanje populacije laktobacilov v mešani kulturi in sobivanje z *E. coli*, pri tem pa predhodna izpostavitev kulture dolgotrajni stacionarni fazi ni bila nujen pogoj (slika 21, 23, 26, 27, 28). Sočasna kultivacija z *E. coli* je bila za seve *L.*

*plantarum* tudi koristna, saj so sevi v čistih kulturah odmrli bistveno prej kot v mešanih kulturah. Po drugi strani pa je *E. coli* zelo dobro preživelu tudi v čisti kulti oziroma v odsotnosti laktobacilov (21I, J). Z merjenjem pH smo ugotovili, da čiste kulture *L. plantarum* močneje zakisajo gojišče in verjetno proizvedejo več mlečne kislina kot pa mešane kulture *L. plantarum* in *E. coli*. Pri mešanih kulturah *L. plantarum* z *E. coli* je bil profil pH podoben kot pri gojenju *E. coli* same (slika 22, 24). Če smo seva fizično ločili z membrano, pri čemer so metaboliti še vedno lahko prehajali, seva nista sobivala, saj je *L. plantarum* začel odmirati, vendar še vedno kasneje kot v čisti kulti in dobimo spodleteli fenotip GASP (slika 25). Iz tega lahko sklepamo, da je za optimalen pozitiven vpliv *E. coli* na celice *L. plantarum* oziroma optimalno sobivanje sevov potreben tudi fizični stik.

Simbolični odnosi med različnimi bakterijskimi vrstami in laktobacili so zaenkrat relativno slabo raziskani. Pri dveh probiotičnih kandidatih, predstavnikih vrst *Lactococcus lactis* in *Enterococcus mundtii*, so opazili simbiozo med sevoma med skupnim gojenjem, ki se je odražala v večji količini biomase pri sočasni kultivaciji, za kar pa ni bilo potrebnega fizičnega stika, ampak primerno gojišče (Kimoto-Nira in sod., 2012). Nekaj študij je bilo narejenih s sevi *L. kefirnofaciens* in s kvasovkami vrste *Saccharomyces cerevisiae*, ki imajo prav tako simboličen odnos. Glavni pozitivni vpliv so pripisali sposobnosti kvasovk, da porablja mlečno kislino in zmanjšujejo njen toksični vpliv. Kvasovke naj bi tudi stimulirale rast *L. kefirnofaciens* (Cheirsilp in sod., 2003a) in preko fizičnega stika z laktobacili stimulirale produkcijo polisaharida kefirana (Cheirsilp in sod., 2003b). Podoben vpliv ima verjetno tudi *Escherichia coli* na *Lactobacillus plantarum*, saj smo v primeru sočasne kultivacije izmerili višji pH, kar je verjetno posledica nižjih koncentracij nastale mlečne kislina. Vendar to najverjetneje ni edini pozitivni učinek, ki ga ima sočasna kultivacija. Študije mešanih kultur pa so pomembne tudi s stališča učinkovanja probiotikov. Mogoče je, da je probiotičen sev tudi v črevesju sposoben razviti simbiotski odnos z bakterijami drugih vrst. Koristen pa bi bil tudi razmislek o istočasnem uživanju probiotičnih sevov teh dveh bakterijskih vrst (*Escherichia coli* in *Lactobacillus plantarum*) skupaj. Tudi med sevi vrste *E. coli* namreč najdemo take s probiotičnim delovanjem, ki so tudi varni za uporabnika. Še prej pa bo potrebno bolje raziskati mehanizme delovanja *E. coli* na *L. plantarum*.

V črevesju sesalcev lahko najdemo tudi bakterije rodu *Enterococcus*. Večino sevov tega rodu smatramo za komenzalne bakterije, saj na gostitelja nimajo niti škodljivega niti blagodejnega učinka. Je pa res, da posamezni predstavniki vrste *E. faecalis* v določenih primerih povzročajo hude okužbe pri ljudeh, zlasti v povezavi z oslabljenim imunskim sistemom gostitelja. Odnosi med *E. faecalis* in *L. plantarum* so zanimivi tudi z vidika delovanja probiotikov, saj je lahko sposobnost vrste *L. plantarum*, da preraste *E. faecalis*, pozitivna lastnost. V poskusih GASP z mešanimi kulturami *E. faecalis* in *L. plantarum* smo opazili velike razlike med testiranimi sevi *L. plantarum*. Seva SF9 in KR3 sta vedno prerasla testirani sev enterokoka, zato smo sklepali, da izkazujeta močni fenotip GASP (slika 31, 32). Zanimivo je, da pri tem starost kultur *L. plantarum* ni imela izrazitega vpliva. Pri sevu M5 pa je enterokoke uspešno prerasel samo izvorni sev M5, medtem ko je 30 dni starata kultura odmrla (slika 30). Pri sevu KR6 pa smo opazili prerast enterokokov samo v nekaterih primerih (slika 29), kar potrjuje, da je vsaka sočasna kultivacija edinstven dogodek, pri katerem se vzpostavlja drugačni razmere in nastajajo specifične naključne mutacije ter spremembe v sevih. Podobno je bilo pri sevu

299v, kjer je samo 30 dni stara kultura, kadar je bila v manjšini, kazala močni fenotip GASP (slika 34). Profili pH se med kulturami, ki so odmrle ali ki so bile sposobne prerasti drugo kulturo, niso razlikovali (slika 35). V podobni raziskavi na mešanih kulturah, kjer sta bila uporabljena seva *E. coli* in *Salmonella enterica*, so prav tako opazili močni fenotip GASP, vendar le v primeru, ko je bila stara kultura odporna proti antibiotiku. Z analizo fragmentov DNK s PFGE pa so opazili dodatne fragmente pri odpornih sevih (Bačun-Družina in sod., 2007). Zato smo tudi v naši raziskavi primerjali restrikcijske fragmente različnih kolonij seva *L. plantarum* 299v, pridobljenih po nacepljanju stare kulture tega seva. Med makrorestrikcijskimi fragmenti kolonij ni bilo razlik, kar pa ne izključuje manjših točkovnih mutacij, insercij ali delecij, ki omogočajo 30 dnevni kulturi laktobacilov, da preraste *E. faecalis*.

### 5.3 ODPORNOST IN PRILAGODITEV IZBRANIH SEVOV NA NIZEK PH

Laktobacili prihajajo v stik s kislinami že v svojem naravnem okolju, saj proizvajajo mlečno kislino in druge kisline. Probiotične bakterije pa prihajajo v stik s kislim pH tudi v gastrointestinalnem traktu gostitelja. Pri laktobacilih se toleranca proti kislinam lahko poveča v stacionarni fazi rasti, ko se poveča tudi odpornost proti različnim vrstam stresa, ali pa v logaritemski fazi rasti, zaradi prilagoditve na nižji pH, če celice predhodno izpostavimo subletalnemu stresu (van de Guchte in sod., 2002). Testiranje odpornosti in prilagoditev na nizek pH je bilo opravljeno na sevih KR6 in M5, ki smo ju izbrali za najprimernejša probiotična kandidata zaradi dobrega izkoriščanja sladkorjev in varnosti, kar zadeva občutljivost proti antibiotikom, pomembnim v medicini. Pri testiranju odpornosti proti nizkim vrednostim pH smo uporabili celice v stacionarni fazi rasti, ko so celice praviloma bolj odporne. Izkazalo se je, da je med sevoma znatna razlika v odpornosti proti nizkemu pH, pri čemer se je sev KR6 izkazal za odpornejšega (slika 38). Mejni vrednosti pH, pri katerih seva dobro preživita tudi 3 ure, sta 2,3 za KR6 in 2,4 za M5. Zanimivo je, da je bila samo za 0,1 nižja vrednost pH že smrtna za oba seva. Boljšo odpornost seva KR6 morda lahko povežemo z izvorom sevov in prilagoditvijo na tisto okolje, saj je bil sev KR6 izoliran iz kiske repe, kjer je pH običajno pod 4, sev M5 pa iz sira, kjer je pH običajno med 4,2 in 4,6. Povezave med virom izolacije in odpornostjo proti stresu v predhodnih študijah sicer niso uspeli dokazati. Parente in sod. (2010) so na primer primerjali 63 različnih sevov *Lactobacillus plantarum* in niso našli povezave med virom izolacije in odpornostjo proti različnim stresnim dejavnikom. Razlog za to je lahko tudi, da vir izolacije ne pomeni nujno tudi njegovo domačo ekološko nišo, na katero je sev prilagojen, saj sevi prehajajo med njimi.

Seva KR6 in M5 sta se sicer izkazala za relativno odporna proti kislemu okolju, kar je pomembna lastnost potencialnih probiotikov, ki morajo nizek pH čim bolje preživeti. V želodcu ljudi pH variira med 1,5 in 4,5, odvisno od količine in vrste zaužite hrane (Verdenelli in sod., 2009), med postenjem pa lahko pada tudi do pH 1 (Corcoran in sod., 2008). Pri laktobacilih se toleranca proti kislinam lahko poveča v stacionarni fazi rasti, ko se poveča tudi odpornost proti različnim drugim vrstam stresa. V logaritemski fazi rasti pa se odpornost lahko izboljša v primeru prilagoditve na nižji pH, če celice predhodno izpostavimo subletalnemu stresu (van de Guchte in sod., 2002). Tudi v tej raziskavi smo uspeli izboljšati odpornost obeh sevov na nizek pH s pomočjo predhodne 30-minutne prilagoditve na nizek, a ne smrten pH. Za vsak sev posebej smo poiskali

optimalni prilagoditveni pH, ki je bil pri sevu KR6 za 0,5 pH vrednosti nižji kot pri sevu M5. Preživetje pH vrednosti 2 pa se je pri sevu KR6 s pomočjo predhodne prilagoditve povečalo kar za 100-krat, pri sevu M5 pa le za 10-krat. Medtem ko je bil pozitiven učinek prilagoditve pri sevu KR6 (pri pH 4,5) viden tudi po 120 minutah inkubacije pri nizkem pH (pH 2), pa je bilo pri sevu M5 po 120 min v vseh primerih število KE/ml pod mejo detekcije (slika 39). Sev KR6 se je torej izkazal za odpornejšega proti nizkim vrednostim pH, hkrati pa je imelo predhodno tretiranje pri nizkem pH z namenom prilagoditve na kislo okolje tudi večji vpliv na njegovo odpornost kot pri sevu M5.

Z analizo izražanja 4 izbranih genov, povezanih z odpornostjo proti nizkim vrednostim pH, smo s qPCR ugotovili, da se seva razlikujeta tudi v regulaciji izražanja teh genov (slika 40). Največja razlika je bila v izražanju gena *cfa1*, ki se je pri sevu KR6 tako v prilagoditvenem pH kot pri pH 2,5 povečalo za več kot 3-krat, pri sevu M5 pa povečanja izražanja nismo zabeležili. Gen *cfa1* kodira zapis za encim ciklopropan maščobno-acil-fosfolipidno sintazo, ki katalizira spremembe nenasičenih acilnih maščobnih verig v njihove ciklopropanske derivate. To naredi bakterijsko membrano manj prepustno zaradi povečanja deleža nasičenih in ciklopropanskih maščobnih kislin. Da je zmanjšanje prepustnosti bakterijske membrane pomembno za preživetje pri nizkem pH, so že pokazali na vrsti *L. casei* (Broadbent in sod., 2010, Wu in sod., 2012). Iz pridobljenih rezultatov sicer ne moremo sklepati, da je ravno tako velika razlika v izražanju gena *cfa1* tista, ki je odgovorna za razlike v odpornosti proti nizkemu pH med sevoma. Smo pa pri obeh sevih opazili manjše povečanje izražanje gena *hisD*, ki je povezan z nastajanjem bazične aminokisline histidina, pri sevu M5 pa tudi rahlo povečano izražanje gena *mleS*. Očitno se seva proti nizkemu pH branita na več načinov.

Ena izmed ugotovitev naše študije je tudi, da izražanje gena *atpA* ni bilo signifikantno povečano pri nobenem izmed sevov, ne glede na vrednost pH. Ti rezultati so presenetljivi, saj encim F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPaza, ki črpa protone iz celice in pri tem porablja ATP, pogosto povezujejo z odpornostjo proti nizkemu pH. Duary in sod. (2010) so dokazali povečanje ekspresije gena *atpD*, ki kodira eno izmed podenot tega encima pri *L. plantarum*. Pri *L. rhamnosus* GG so naprimer opazili povečano transkripcijo *atpA* pri pH 4,8 (Koponen in sod., 2012). Podobno se je pokazalo tudi pri predstavniku *L. acidophilus* (Kullen in Klaenhammer, 1999; Lorca in Valdez, 2001). Na drugi strani pa rezultati nekaterih raziskav govorijo nasprotno. Za izčrpavanje H<sup>+</sup> je namreč potreben ATP, kar pa je za celice energetsko potratno. Tako so Broadbent in sod. (2010) pri vrsti *L. casei* opazili celo zmanjšanje ATPazne aktivnosti ob prilagoditvi na nizek pH, pri *L. plantarum* WCFS1 pa niso opazili spremembe v izražanju genov, ki kodirajo zapis za encim F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPazo, če je bil sev predhodno prilagojen na mlečno kislino (Pieterse in sod., 2005). Študija na *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* je pokazala, da ni prišlo do izčrpavanja protonov, če so celice izpostavili kislemu pH, ampak so protoni celo vstopali v celice in na ta način zniževali citoplazemski pH. S tem je ostal ΔpH med notranjostjo iz zunanjostjo celic ves čas konstanten (Shabala in sod., 2006). Nasprotujoči rezultati prejšnjih študij tako nakazujejo, da je odgovor na nizke vrednosti pH s povečanjem izčrpavanja protonov različen od seva do seva.

Pri istih razmerah smo preverili tudi ohranjenost integritete bakterijske membrane z diferencialnim barvanjem z barvili Live/Dead® BacLight™, vzporedno pa smo ugotavljali preživetje tudi s štetjem na ploščah. Ugotovili smo, da prilagoditveni pH pri

nobenem sevu ni vplival na integriteto celične membrane (slika 41), se je pa integriteta membrane zmanjšala pri izpostavitvi pH 2,5 za 30 min. Pri sevu KR6 je število KE/ml padlo iz  $10^8$  na  $10^7$  KE/ml, pri sevu M5 pa celo na  $10^6$  KE/ml. Podobno raven preživetja smo ugotovili tudi z diferencialnim barvanjem. Glede na to, da so bili rezultati, pridobljeni z od kultivacije neodvisno metodo in s kultivacijsko metodo, podobni, lahko sklepamo, da so tiste celice s poškodovano membrano tudi izgubile sposobnost razmnoževanja, kar se je odražalo v manjšem številu kolonij po nacepljanju na ploše. Ne kaže pa, da bi del bakterijske populacije izgubil sposobnost razmnoževanja, pri tem pa ohranil integriteto celične membrane.

#### 5.4 NAVZKRIŽNA ODPORNOST

V bakterijah odgovor na stres sproži tako izražanje proteinov, specifičnih za prilagoditev na določeno vrsto stresa, kot tudi splošni odgovor na stres, zato ni presenetljivo, da se lahko hkrati pojavi odpornost proti več vrstam stresa. Navzkrižna odpornost namreč pomeni, da se ob predhodni prilagoditvi na eno vrsto stresa pojavi tudi odpornost proti eni ali več drugačnih oblik stresa (Vorob'eva, 2004). V okviru te raziskave nas je zanimalo, ali prilagoditev *L. plantarum* na nizke vrednosti pH pomaga pri premagovanju tudi drugih vrst stresa, ki so jim probiotične bakterije običajno izpostavljene tako med industrijsko proizvodnjo kot tudi v prebavilih gostitelja.

##### 5.4.1 Preživetje izbranih sevov v simuliranih razmerah prebavilih

Ena izmed najpomembnejših lastnosti probiotika je sposobnost preživetja neugodnih razmer v želodcu gostitelja, kjer je izpostavljen zelo nizkemu pH ter pepsinu, čemur sledijo prav tako neugodne razmere tankega črevesja z rahlo bazičnim pH in žolčnimi solmi.

Preživetje 3 izbranih sevov (KR6, M5 in 299v) smo testirali v sklopu proučevanja stresa, povezanega s stacionarno fazo rasti. Tam sta seva KR6 in 299v zelo dobro preživelā simulirane razmere prebavil, razlik v preživetju med kulturo v stacionarni fazi in tisto iz dolgotrajne stacionarne faze pa ni bilo (slika 37). Bakterijske kulture v stacionarni fazi so v primerjavi z rastočimi kulturami tudi zaradi fiziološkega stanja celic odpornejše proti različnim vrstam stresa, saj se takrat prepisujejo geni za splošni odgovor na stres, celice so manjše kot normalno rastoče, njihova celična stena je trdnejše povezana, citoplazma skoncentrirana in periplazmatski volumen povečan (Bačun-Družina in sod., 2011). Sev M5 je slabše preživel v simuliranih razmerah prebavil, kljub temu, da je bila kultura v stacionarni fazi rasti. Odpornost tega seva pa se je izboljšala po izpostavitvi dolgotrajni stacionarni fazi, tako da je bilo preživetje v simuliranih razmerah prebavil za kar 3 log KE/ml boljše. Pri celicah iz dolgotrajne stacionarne faze so se verjetno zgodile mutacije, ki so sevu omogočile boljšo odpornost proti žolčnim solem.

Preživetje sevov KR6 in M5 v simuliranih razmerah prebavil smo poskusili tudi po predhodni vzpostavitvi nizkemu a ne smrtnemu pH, z namenom prilagoditve proti stresu zaradi kislega okolja ter morebitni vzpostavljivosti pred nizkim pH, ki bi sevoma pomagala preživeti tudi neugodne razmere v črevesju. Rezultati so pokazali, da sta bila seva kljub prilagoditvi na kisel pH še vedno zelo občutljiva za žolč (slika 42).

Pri sevu KR6 smo sicer opazili rahlo izboljšanje preživetja v primeru predhodne prilagoditve pri nizkem pH, pri sevu M5, pa ne. Preživetje pri obeh sevih je bilo slabše kot v primeru, ko smo uporabili kulturi iz stacionarne faze rasti (slika 37). Zanimivo je, da sta seva zelo dobro preživelna v simuliranem črevesnem soku, če nista bila predtem izpostavljena simuliranemu želodčnemu soku z nizkim pH. V dodatnih poskusih smo zato preverili še, kako seva preživita v prisotnosti žolčnih soli samih, brez predhodne izpostavitve želodčnemu soku. Ugotovili smo, da prilagoditev na nizek pH škodi sevoma pri preživetju stresa zaradi žolčnih soli (slika 43), zlasti v primerih, ko so koncentracije žolčnih soli nižje (0,1 %). Neugoden vpliv prilagoditvenega pH je bil večji pri sevu KR6. Že v predhodnih raziskavah so ugotovili, da je preživetje v gastrointestinalih razmerah specifična lastnost vsakega seva. Omenjeno smo potrdili tudi v naši študiji, saj sta se seva razlikovala v sposobnosti preživetja v simuliranih razmerah v prebavilih. Zago in sod. (2007) so izmed 27 testiranih *L. plantarum* sevov, našli samo 5 takšnih z zadovoljivim preživetjem v simuliranih GI razmerah. Prav tako pa so tudi drugi raziskovalci že potrdili, da imajo na preživetje v simuliranih razmerah v prebavilih velik vpliv tako uporabljenogojšče kot faza rasti, saj imajo celice v stacionarni fazi rasti boljšo sposobnost preživetja neugodnih razmer v prebavilih (van Bokhorst-van de Veen in sod., 2012). Možna razloga za opaženo neugodno kombinacijo nizkega pH in žolčnih soli je, da so celice zaradi nizkega pH že poškodovane in jih zato žolčne soli hitreje ubijejo. Bron in sod. (2004) so pri *L. plantarum* WCFS1 opazili močno okrnjeno celično integriteto po dodatku žolčnih soli.

#### 5.4.2 Preživetje bakterijskih celic, prilagojenih na nizek pH, med liofilizacijo

Liofilizacija je ena izmed najbolj razširjenih metod dolgotrajnega shranjevanja starterskih kultur in probiotikov. Stres med liofilizacijo povzročata tako zamrzovanje kot sublimacija. Med zamrzovanjem nastajajo znotraj celic ledeni kristali, ki povzročijo fizične poškodbe, med sublimacijo pa nastaja visok osmotski pritisk zaradi visoke koncentracije citoplazmatskih topljencev. Prav membranska integriteta in denaturacija makromolekul sta glavna dejavnika, ki vplivata na preživetje med liofilizacijo (De Angelis in Gobbetti, 2004). Za boljše preživetje med liofilizacijo se uporabljajo zaščitne snovi, kot so posneto mleko, sladkorji, polialkoholi, antioksidanti, aminokisline ali prebiotiki. Njihovo delovanje je različno, saj nekateri naredijo celično membrano bolj prožno, drugi pa vežejo intracelularno vodo in preprečujejo nastajanje prevelikih ledenih kristalov v celici. Zaščitna sredstva, ki ne morejo v celice, pa na površini celic ustvarijo viskozno plast, ki omogoči delno izhajanje vode iz celice, zmanjšana pa je rast ledenih kristalov (Saarela in sod., 2005). Nekatere pretekle študije so pokazale slabše preživetje med liofilizacijo, če so bile celice izpostavljene kislemu pH (Schoug in sod., 2008), druge pa boljše (Palmfeldt in Hahn-Härdal, 2000). V naši raziskavi smo poskusili, ali prilagoditev na nizek pH zaščiti seva *L. plantarum* KR6 in M5 tudi pred stresom liofilizacije, pri čemer smo primerjali 3 različne zaščitne snovi. Medtem ko se je glicerol pri obeh sevih izkazal kot neustrezno zaščitno sredstvo, se je pa za oboje sev najboljše izkazalo posneto mleko, ki je izboljšalo preživetje pri obeh sevih, ne glede na predhodno prilagojenost na nizek pH (slika 44). Najverjetnejše ravno zaradi zelo dobrega preživetja nismo opazili razlik med prilagojenimi in kontrolnimi alikvoti. V predhodnih študijah so že poročali, da so celice, ki so bile pred liofilizacijo izpostavljene blagemu stresu, slednjo boljše preživele (Silva in sod., 2005; Wang in sod. 2005). Podobno smo opazili tudi v naši raziskavi, saj so celice, izpostavljene blagemu stresu (v našem

primeru pH 4,5 oziroma 5), boljše preživele postopek liofilizacije, predvsem kadar smo za zaščitno sredstvo uporabili inulin. Z uporabo inulina ob navzkrižni zaščiti z nizkim pH je bilo preživetje podobno kot pri liofilizaciji s posnetim mlekom. Inulin je rastlinski polisaharid s prebotoičnimi lastnostmi (Slavin, 2013). Zaradi vse pogostejših alergij na mleko in pojavljanja laktozne intolerance, raste interes po probiotičnih pripravkih, ki ne temeljijo na mleku. Inulin predstavlja primerno zamenjavo za mleko, razen tega lahko tudi spodbuja probiotični sev v samem črevesju (Beganovič in sod., 2014; Takemura in sod., 2010). Rezultati nakazujejo, da inulin ni zaščitil netretiranih celic (kontrol) in celic, prilagojenih na nizek pH, v enaki meri. Glede na to, da je zaščitno delovanje inulina povezano z njegovo interakcijo z lipidnimi membranami (Demel in sod., 1998), lahko sklepamo, da je membrana prilagojenih celic drugačna od netretiranih (kontrolnih) in mogoče zato inulin lažje reagira z njo. Spremembe v membrani pa nakazujejo tudi rezultati analize qPCR (slika 40).

#### 5.4.3 Temperaturni in oksidativni stres

Nizkim temperaturam so probiotični sevi pogosto izpostavljeni med shranjevanjem, zato je odpornost proti nizkim temperaturam pri industrijskih sevih zelo zaželena. V tej raziskavi nas je zanimal morebitni pojav navzkrižne odpornosti proti tej vrsti stresa, do katere bi prišlo zaradi izpostavitve celic nizkemu pH. Na vrsti *L. sakei* so že preučevali vpliv dolgotrajne stacionarne faze na preživetje pri 4 °C in ugotovili, da so kulture, ki so na 4 °C rasle zelo počasi, kazale boljše preživetje (Marceau in sod., 2003). Navzkrižne tolerance med nizkim pH in nizko temperaturo še niso raziskali. Do sedaj so pokazali povezavo med prilagoditvijo na nizek pH in zamrzovanjem (Lorca in deValdez, 2001; Palmfeldt in Hahn-Hägerdal, 2000). V naši raziskavi smo seva KR6 in M5 prilagodili na nizek pH in za 60 dni inkubirali pri 4 °C. Pri enem alikvotu smo uporabili tudi zaščitno sredstvo glicerol, ki se sicer pogosto uporablja pri zamrzovanju bakterijskih sevov. Opazili smo veliko razliko v preživetju obeh sevov (slika 45), saj je bilo v vzorcih s sevom KR6 tudi po 60 dneh število nad  $10^6$  KE/ml, za razliko od seva M5, ki je preživel veliko slabše. Zanimivo pa je, da je prilagoditev pri nizkem pH izboljšala preživetje seva M5 med inkubacijo na nizkih temperaturah, sevu KR6 pa je celo škodila. Te razlike smo opazili šele po 50 dneh shranjevanja, ne vemo pa, kako dolgo zaščitni efekt prilagoditve na nizek pH pravzaprav traja, ker smo z analizami zaključili po 60 dneh. Zanimiva pa je tudi ugotovitev, da sevu M5 pri preživetju dolgotrajnih nizkih temperatur pomaga glicerol. V našem primeru je šlo pravzaprav za kombinacijo velikega števila stresov. Namreč, seva sta bila izpostavljena nizkim temperaturam, stradanju in tudi nizkemu pH (slika 45). Pri sevu M5 je pH veliko hitreje padal in je sev morda prav zato slabše preživel, saj je občutljivejši za nizek pH. Ostaja tudi nepojasnjeno, ali glicerol zaščiti sev M5 pred nizkimi temperaturami ali morda pred nizkim pH. Odgovori na ta vprašanja terjajo dodatne študije.

Pomembna vrsta stresa je tudi oksidativni stres, ki ga povzročajo reaktivne kisikove vrste. Tudi bakterijski sevi iste vrste, ne samo različnih vrst, se razlikujejo v odpornosti proti oksidativnemu stresu, saj je ta odvisna od antioksidativnih mehanizmov, ki jih posedujejo (De Angelis in Gobbetti, 2004; Vorob'eva, 2004). V naši študiji smo preverjali občutljivost sevov M5 in KR6 za vodikov peroksid in morebitno navzkrižno odpornost med prilagoditvijo na nizek pH in oksidativnim stresom. Izkazalo se je, da je za to vrsto stresa sev KR6 malo bolj občutljiv od M5, je pa  $H_2O_2$  zelo škodljiv za oba

seva. Tudi Parente in sod. (2010) so opazili veliko raznolikost v odpornosti proti oksidativnemu stresu med sevi in korelacijo med odpornostjo proti 0,1 %  $H_2O_2$  in stresom topotnega šoka. Zaščita pred nizkim pH v naši študiji ni zaščitila celic tudi pred  $H_2O_2$ , ampak jih je naredila občutljivejše. Občutljivost za peroksid je verjetno povezana s sestavo membrane celic, prilagojenih na nizek pH, saj te v kislem pH zvišujejo delež ciklopropanskih in nasičenih maščobnih kislin, kar smo pokazali pri sevu KR6 tudi s qPCR. Po nekaterih podatkih pa naj bi se proti oksidativnemu stresu bakterijske celice borile ravno na obraten način, s povečevanjem deleža nenasičenih maščobnih kislin, podobno kot pri stresu topotnega šoka (Guerzoni in sod., 2001). Poročali so tudi že o navzkrižni odpornosti med blagim stresom pH in oksidativnim stresom (Cappa in sod., 2005), kar potrjuje, da je to vrstno in sevno specifična lastnost, odvisna od obrambnih mehanizmov, ki jih bakterija posedeje.

## 5.5 SKLEPI

Namen doktorskega dela je bil raziskati vpliv stresnih pogojev, pogojenih s kislim okoljem in z razmerami v stacionarni fazi rasti, na izbrane seve vrste *Lactobacillus plantarum*. Pri tem smo prišli do naslednjih zaključkov.

- Različni sevi *L. plantarum* so se različno odzvali na izpostavljenost kislemu okolju. Med sevoma *L. plantarum* M5 in KR6, ki sta med vsemi pokazala najboljši potencial za probiotično uporabo, so bile opazne razlike v preživetju, zmanjšanju integritete celične membrane in izražanju različnih genov, predvsem *cfa1*. Prva hipoteza je tako potrjena.
- Z izpostavljanjem sevov *L. plantarum* dolgotrajni kultivaciji v stacionarni fazi je prišlo do sprememb v sposobnosti rasti na različnih substratih, ki so se pokazale tako v sposobnosti izkoriščanja določenih sladkorjev, kot tudi v hitrosti rasti. Samo v nekaterih primerih smo ob izpostavitvi dolgotrajni stacionarni fazi opazili pojav fenomena GASP, ko so po dolgotrajni kultivaciji v stacionarni fazi nekatere kulture *L. plantarum* pridobile prednost rasti v stacionarni fazi in so prerasle večinske kulture mlajših celic seva *E. faecalis*. Drugo hipotezo smo torej uspeli delno potrditi.
- Tretjo hipotezo smo potrdili le delno, saj je dolgotrajna izpostavitev sevov *L. plantarum* stacionarni fazi rasti izboljšala preživetje v simuliranih razmerah prebavil le pri sevu *L. plantarum* M5, ki je te razmere sicer preživel najslabše. Prilagoditev na nizek pH pa ni pomembno izboljšala preživetja v simuliranih razmerah prebavil, ampak jo je v nekaterih primerih celo poslabšala.
- Četrte hipoteze, v kateri smo predvideli razvoj navzkrižne odpornosti med prilagoditvijo na nizek pH in preživetjem pri nizkih temperaturah, nismo uspeli potrditi.
- Pri sevih *L. plantarum* je pod vplivom izpostavljanja dolgotrajni rasti v stacionarni fazi prišlo do sprememb v sposobnosti rasti na različnih substratih. S tem smo potrdili še zadnjo postavljeno hipotezo.

## 6 POVZETEK (SUMMARY)

### 6.1 POVZETEK

*Lactobacillus plantarum* je ena izmed raznovrstnejših vrst laktobacilov, ki jo najdemo v številnih ekoloških nišah, od zelenjave, mesa, rib, fermentiranih mlečnih izdelkov do prebavnega trakta. Predstavniki te vrste imajo zelo veliko število genov za transport sladkorjev, nekateri sevi pa tudi več zelo variabilnih regij, ki so povezane s sintezo plantaricinov, ekopolisaharidov ter genov, povezanih s transportom in metabolizmom sladkorjev, kar jim omogoča zelo dobro prilagajanje na različna okolja. Poleg tega imajo enega izmed večjih genomov med mlečnokislinskimi bakterijami, saj presega 3 Mb.

Stres lahko definiramo kot spremembo, ki negativno vpliva na rast ali preživetje mikroorganizmov. Ker se habitati mikroorganizmov stalno spreminja, je pomemben hiter odgovor na stres. Dejavniki stresa so po svojem izvoru lahko kemični, fizikalni ali biološki, vir stresa pa je lahko tudi organizem sam. Do sprememb pod vplivom stresa lahko pride v genomu, proteomu ali okolju bakterije, saj stresorji povzročajo denaturacijo proteinov, sprožajo zlome v verigah nukleinskih kislin, oksidacijo makromolekul, dehidracijo ter inhibirajo transkripcijo in translacijo, kar onemogoči razmnoževanje mikroorganizmov ali pa večjo občutljivost za druge stresne dejavnike. Tako poškodovane celice lahko bodisi okrevojo ali pa odmrejo. Laktobacili prihajajo v stik s kislinami že v svojem naravnem okolju, saj proizvajajo mlečno kislino in druge kisline. Probiotične bakterije pa prihajajo v stik s kislim pH tudi v gastrointestinalnem traktu gostitelja. V bakterijah odgovor na stres sproži tako izražanje proteinov, specifičnih za prilagoditev na določeno vrsto stresa, kot tudi splošni odgovor na stres, zato ni presenetljivo, da se lahko hkrati pojavi odpornost proti več vrstam stresa, čemur pravimo navzkrižna odpornost in je v veliki meri vrstno in tudi za sev specifična, kar nam pove, da je na molekularni ravni prilagoditev na stres lahko različna.

Bakterije v naravnem okolju preživijo večino časa v stacionarni fazi rasti. Prehod v stacionarno fazo rasti se zgodi zaradi nakopičenja končnih produktov fermentacije, izpostavljenosti stresu ali stradanja, ko bakteriji zmanjka vsaj enega izmed esencialnih hranil. Prehod v stacionarno fazo rasti sproži preusmeritev metabolizma v alternativne vire hranil in splošni odgovor na stres, s katerim bakterije postanejo odpornejše proti več različnim vrstam stresa. Stradane celice so običajno manjše kot normalno rastoče, njihova celična stena je trdneje povezana, citoplazma skoncentrirana in periplazmatski volumen povečan, kar poveča odpornost proti različnim vrstam stresa. Če pa celice izpostavimo dolgotrajni stacionarni fazi, poleg sprememb v izražanju genov, morfoloških in fizioloških sprememb pride tudi do genomskeih modifikacij. S tem je povezan pojav fenotipa prednosti rasti v stacionarni fazi ali GASP (ang. »growth advantage in stationary phase«). GASP je povezan s sposobnostjo dolgotrajno staranih celic, da prrastejo mlajše kulture, kar se dokazuje s poskusi z mešanimi kulturami, ki vsebujejo različno stare celice. Prednost staranih celic pa ni v boljši prilagojenosti na stacionarno fazo, ampak je prednost genetska. Ob dolgotrajnem gojenju v stacionarni fazi se nenehno pojavljajo novi mutanti z boljšo prilagoditvijo in sposobnostjo preživetja v neugodnih razmerah, zato je populacija dinamična. Mutanti GASP imajo prednost, ki je lahko sposobnost učinkovitejše porabe hranil, pridobljenih iz mrtvih

celic, zato hitro prerastejo izhodno kulturo. Po določenem času se pojavi uspešnejši mutant, ki prevlada.

V študiji smo se osredotočili na dva stresna dejavnika, in sicer na dolgotrajno stacionarno fazo rasti, ki je pogosto prisotna v naravi, kjer mikroorganizmom primanjuje hranil, ter na stres, povezan z nizkim pH. Preverjali smo, ali različni sevi *L. plantarum* preživijo dolgotrajno gojenje ter kako to vpliva na njihovo rast na različnih substratih. Zanimal nas je pojav GASP, ki pri laktobacilih še ni bil dokazan. Na drugi strani pa smo se osredotočili tudi na stres, povezan z nizkim pH, ki je pomemben dejavnik za izbor probiotičnih sevov. Testirali smo toleranco in prilagoditev na nizek pH ter kako to vpliva na izražanje štirih različnih genov, povezanih z različnimi mehanizmi obrambe proti kislemu pH. Testirali smo tudi pojav navzkrižne odpornosti med nizkim pH in drugimi vrstami stresa.

V študiji smo primerjali šest različnih *L. plantarum* sevov v njihovi sposobnosti rasti na 4 različnih sladkorjih (glukoza, fruktoza, rafinoza in laktosa), kjer smo med različnimi sevi opazili velike razlike. Te pa so se povečale tudi med kulturami, vzgojenimi iz bakterijskih celic istega seva, če smo ga izpostavili dolgotrajni stacionarni fazi rasti. Posamezne bakterijske celice so zmanjšale ali izgubile sposobnost rasti na določenem sladkorju, najpogosteje na laktosi in rafinozi. V nekaj redkih primerih pa je prišlo celo do izboljšanja rasti. Sicer velikih genomskeh sprememb s PFGE analizo nismo opazili, vendar to ne izključuje manjših mutacij, insercij ali delecij, ki so se zgodile tekom dolgotrajnega stradanja.

V poskusih GASP z mešanimi kulturami *E. coli* K17 in različnih sevov *L. plantarum* smo opazili sobivanje med sevi. Pri tem ima korist predvsem *L. plantarum*, ki v sočasni kultivaciji preživi v večjem številu kot bi sam, tudi 30 dni. Lastnost ni odvisna od seva, niti od njegove starosti, zato gre najverjetneje za vrstno lastnost. Izboljšano preživetje pa gre najverjetneje na račun višjega pH in s tem povezane manjše vsebnosti mlečne kislina v gojišču ob sočasni kultivaciji, pomemben pa je tudi še neznan mehanizem, ki je povezan s fizičnim stikom, kar smo dokazali s poskusi, kjer so bile bakterije dveh sevov med seboj ločene z membrano. Pri poskusih z mešanimi kulturami *E. faecalis* S1-17 in različnih sevov *L. plantarum* pa smo pokazali večje razlike med sevi. Nekateri so uspeli popolnoma prerasti enterokoke, pri sevu 299v pa je imela to sposobnost samo 30 dni stara kultura. Slednja se je v dolgotrajni stacionarni fazi prilagodila na stradanje, vendar večjih genetskih premestitev nismo opazili. Sposobnost sobivanja in pa tudi prerast drugih sevov sta pri probiotičnih sevih zaželeni lastnosti, saj morajo v črevesju z drugimi bakterijami tekmovati za hranila, ravno predstavnike *E. coli* in *E. faecalis* pa najdemo tudi tam.

Na sevih M5 in KR6, ki sta bila izbrana kot najprimernejša probiotična kandidata, smo preverili odpornost proti nizkemu pH, ki se je izkazala za zelo visoko, saj sta preživelna tudi pH 2,4 (M5) oziroma 2,3 (KR6) – 3 ure brez večjega padca preživetja. Seva sta tudi sposobna prilagoditve na nizek pH, kjer smo ju najprej za 30 min izpostavili blagemu stresu pH, kateremu je sledil pH 2,0, ki sta ga preživelna v večjem številu, kot brez predhoden prilagoditve. Sev KR6 se je izkazal za odpornejšega proti nizkemu pH, prav tako je imela predhodna prilagoditev nanj večji učinek. V izražanju 4 izbranih genov (*atpA, cfa1, hisD* in *mleS*) pa je bila med sevoma največja razlika v izražanju gena *cfa1*,

katerega izražanje je bilo pri sevu KR6 kar 3-krat povečano. Njegova funkcija je povezana s prepustnostjo celične membrane, ne vemo pa, ali je to tisti mehanizem, ki daje sevu KR6 toliko boljšo odpornost proti nizkemu pH. Pri obeh sevih smo opazili tudi manjše povečanje v izražanju gena *hisD*, ki je povezan z akumulacijo bazične amino kisline histidin, pri sevu M5 pa tudi *mleS*.

Seva M5 in KR6 sta zelo občutljiva za žolčne soli, zato je preživetje v simuliranih razmerah prebavil slabše. Preživetje je tem slabše, čim nižji je pH simuliranega želodčnega soka, čeprav je samo preživetje te faze zelo dobro. Tudi prilagoditev na nizek pH pri tem ni pomagala. Očitno ob izpostavitvi nizkemu pH pride do poškodb celic, ki še niso smrtni, sosledje z izpostavitvijo žolčnim solem pa je zanje usodno. Seva sta prehod skozi simulirane razmere prebavil preživelja boljše, če so bile celice v stacionarni fazi rasti. Sevu M5 pa je še dodatno pomagalo, če so bile celice izpostavljene dolgotrajni stacionarni fazi rasti. Prilagoditev na nizek pH pa je ugodno zaščitila celice pred liofilizacijo, če je kot zaščitno sredstvo uporabljen prebiotik inulin, ki je možni nadomestek posnetega mleka, ki se sicer pogosto uporablja kot zaščitno sredstvo pri liofilizaciji. Uporaba inulina med liofilizacijo pa bi bila koristna tudi po zaužitju, saj bi prebiotik lahko ugodno deloval na sev tudi v prebavnem traktu. Prilagoditev na nizek pH prav tako ni zaščitila celic pred nizkimi temperaturami (4 °C) in oksidativnim stresom. Preživetje oksidativnega stresa se je po predhodni prilagoditvi na nizek pH celo poslabšalo.

## 6.2 SUMMARY

*Lactobacillus plantarum* is one of the most diverse *Lactobacillus* species which populates diverse niches from vegetables, meat, fish, fermented milk products and gastrointestinal tract. This species has a large number of genes involved in sugar transport and consumption. Strains in these species differ in variable regions where genes for synthesis of plantaricin, exopolysaccharides and genes for sugar transport and consumption are found. Their genome is one of the biggest among lactic acid bacteria and exceeds 3 Mb. All these characteristics give the species ability to adapt to different environments.

Stress can be defined as a change with negative impact on microorganism's growth and/or survival. Bacterial habitats are subject to constant change and quick response to stress is of vast importance. Stress factors can be chemical, physical or biological in their nature, and organism can be also source of the stress itself. Stress effects genomes, proteomes and environment, cause denaturation of proteins, DNA breaks, oxidizes macromolecules, cause dehydration or inhibit transcription and translation. That diminishes microorganisms' ability to reproduce or cause sensitivity to other stresses. Damaged cells can survive or die, dependent on the nature of the injury. One of the important types of stress for *Lactobacillus plantarum* species is acidic pH. Lactobacilli get in contact with acid due to their own production of lactic acid, which makes their environment unfavourable for other microorganisms. Probiotic bacteria get also in contact with acidic pH in hosts gastrointestinal tract. Stress response in bacteria triggers expression of proteins, specific for adaptation to certain stress and also sets in motion unspecific general stress response. It is not surprising that can cause resistance to more than one stress, which is called cross resistance. Cross resistance is species- and often

strain-dependent, which tells us that stress resistance and adaptation can be different on molecular level.

Microorganisms spent most of their time in stationary growth phase. Accumulation of fermentation end products, absence of essential nutrients, exposure to stress or/and starvation, triggers stationary growth phase. That causes redirection of bacterial metabolism into alternative nutrient consumption and into general stress response, which causes resistance to other stress factors. Starved cells are often smaller as growing cells, their cell membrane is less permeable, cytoplasm concentrated and periplasmatic volume bigger, which also causes resistance to other stresses. But when the cells are exposed to prolonged stationary phase, the changes are not only in gene expression, morphology and physiology, but are also genetic, which is associated with emergence of growth advantage in stationary phase (GASP). GASP is the ability of cells from prolonged stationary growth phase to overgrow younger culture, even when in minority. The existence of GASP is tested with experiments of mixed cultures of young and old cells. Emergence of GASP phenotype was shown after 10 days in *E. coli*. Advantage of the old cells is not in their adaptation to stationary growth phase but is genetic modification. There are constantly new mutants, with better ability to survive in harsh environment, so the culture in prolonged stationary phase is highly dynamic. Main reason for GASP mutants to overgrow young culture is in their ability for quicker or more effective consumption of nutrients from dead cells. But there is always the next overachiever mutant in the culture, which will eventually overgrow the one before.

We focused in this study on two stress factors. One of them was prolonged stationary growth phase, which is often found in natural bacterial environments, where starvation is involved and the second was acidic pH. We were interested how different strains of *Lactobacillus plantarum* survive prolonged stationary phase and if that causes changes in growth on different substrates. We were also interested in GASP phenotype in lactobacilli, because it has not been reported yet. The second stress factor was low pH, which is important stress in probiotic strains. The study of expression of four selected genes, representing different mechanisms to battle acidic pH, was also done in connection with tolerance and adaptation to low pH. Cross resistance between low pH and other stresses was also evaluated.

Six different *L. plantarum* strains were tested in the study for their ability to grow on four sugars. Great diversity was detected among strains. The diversity was also found among lactobacilli cultures subcultivated from single cells of the same strain, when pre-exposed to prolonged stationary phase. Loss or retardation in growth on one or even more sugars, most often on lactose and/or raffinose was seen. There was also improvement in ability to ferment sugars in some cases. Major rearrangements among colonies were not detected, but that does not exclude smaller mutations, insertions or deletions which happened during prolonged starvation.

In GASP experiments with mixed cultures of *E. coli* K17 and different strains of *L. plantarum* the coexistence of two strains was found. *L. plantarum* has more benefits from the relationship, as it allows better survival up to 30 days. The beneficial relationship, however, is not strain dependent, neither connected to prolonged stationary phase, but is species dependent. Better survival of *L. plantarum* strains is due to lesser

concentrations of lactic acid in medium when the two species are cocultured. , But there is also an unknown mechanism involved, where physical connection is important, which was shown in experiment where the two strains were separated with permeable membrane. GASP experiments with mixed cultures of *E. faecalis* S1-17 and different *L. plantarum* strains showed greater differences among strains. KR3 and SF9 are able to completely overgrow the enterococci, but strain 299v showed GASP phenotype only with 30 days old culture from prolonged stationary phase. The culture must be better equipped to survive in stationary phase, but major genetic modifications were not detected. Ability to coexist or to overgrow different species is beneficial characteristic for probiotic strains, because of their competition with other bacteria for nutrients in the hosts' gut where *E. coli* and *E. faecalis* are also habitants.

The acidic pH studies were done only with M5 and KR6 strains, which were the most promising probiotic candidates in our study. Resistance to low pH was good in both strains, because they were able to survive pH 2,4 (M5) or 2,3 (KR6) for up to 3 hours without loss of survival. Both strains are also able to adapt to acidic pH, which was determined with 30 min exposure to mild pH stress, followed with severe acidic stress (pH 2,0). Pre-adaptation to acidic pH caused better survival of severe pH stress and strain KR6 was more resistant to acidic pH and adaptation gave greater beneficial effect. Expression of four selected genes (*atpA*, *cfaI*, *mleS*, *hisD*) was also studied in adaptation pH and more severe pH (2,5). Both strains showed slight overexpression of gene *hisD*, connected with accumulation of basic amino acid histidine. Strain M5 also showed slight overexpression of gene *mleS*, but the main difference between strains was in expression of gene *cfaI*, which was up to 3-fold overexpressed in strain KR6, but not in M5. The function of the gene *cfaI* is connected with cell membrane permeability, but we cannot be sure if less permeable membrane is the main mechanism which gives strain KR6 advantage in survival in the acidic pH.

Both strains (M5 and KR6) showed sensitivity to bile salts, which caused less than optimal survival in the simulated gastrointestinal conditions. Survival was worse when gastric phase had lower pH, even though the survival of low pH was very good. Acid adaptation did not help with better survival. It is possible that low pH damaged the cells, but not lethally, but direct following of the bile salt stress was probably fatal. But the strains showed better survival of gastrointestinal conditions when the cells were taken from stationary growth phase, and with strain M5, prolonged stationary phase exposure also helped. Cross resistance tests also showed that adaptation to acidic pH protected cells from stress in lyophilisation process, when inulin was used as protection agent. Inulin is a prebiotic which is a possible substitute for skimmed milk, often used as protection agent in lyophilisation. The use of inulin can be beneficial for probiotic culture even later, after digestion. The cross protection studies showed no protection from adaptation to low pH towards low temperatures (4 °C) or oxidative stress. The survival of the exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was even worse when cells were acid adapted.

## 7 VIRI

- Ahrné S., Molin G. 1991. Spontaneous mutations changing the raffinose metabolism of *Lactobacillus plantarum*. Antonie van Leeuwenhoek, 60, 2: 87-93
- Al-Naseri A., Bowman J. P., Wilson R., Nilsson R. E., Britz M. L. 2013. Impact of lactose starvation on the physiology of *Lactobacillus casei* GCRL163 in the presence or absence of Tween 80. Journal of Proteome Research, 12, 11: 5313-5322
- Altermann E. , Russell W. M., Azcárate-Peril M. A., Barrangou R., Buck B. L., McAuliffe O., Souther N., Dobson A., Duong T., Callanan M., Lick S., Hamrick A., Cano R., Klaenhammer T. R. 2005. Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. Proceedings of National Academy of Sciences of USA, 102: 3906-3912
- Ananta E., Knorr D. 2003. Pressure-induced thermotolerance of *Lactobacillus rhamnosus* GG. Food Research International, 36: 991-997
- Asad N. R., Asad L. M. B. O., Almeida C. E. B. D., Felzenszwab I., Cabral-Neto J. B., Leitão A. C. 2004. Several pathways of hydrogen peroxide action that damage the *E. coli* genome. Genetics and Molecular Biology, 27, 2: 291-303
- Axelsson L. 2004. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. V: Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects. 3<sup>rd</sup> ed. Salminen S., von Wright A., Ouwehand A. (eds.). New York, Marcel Dekker, Inc.: 1-66
- Baćun-Družina V., Čagalj Ž., Gjuračić K. 2007. The growth advantage in stationary-phase (GASP) phenomenon in mixed cultures of enterobacteria. FEMS Microbiology Letters, 266: 119-127
- Baćun-Družina V., Butorac A., Mrvčić J., Dragičević T. L., Stehlík-Tomas V. 2011. Bacterial stationary-phase evolution. Food Technology and Biotechnology, 49, 1: 13-23
- Beales N. 2004. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 3, 1: 1-20
- Beganovic J., Kos B., Lebos Pavunc A., Uroic K., Jokic M., Suskovic J., 2014. Traditionally produced sauerkraut as source of autochthonous functional starter cultures. Microbiological Research, 169: 623-632
- Begley M., Gahan C. G. M., Hill C. 2005. The interaction between bacteria and bile. FEMS Microbiology Reviews, 29: 625-651
- Begley M., Hill C., Cormac G., Gahan M. 2006. Bile salt hydrolase activity in probiotics. Applied and Environmental Microbiology, 72, 3: 1729-1738

- Bejar W., Hamden K., Salah B. R., Chouayekh H. 2013. *Lactobacillus plantarum* TN627 significantly reduces complications of alloxan-induced diabetes in rats. *Anaerobe*, 24: 4-11
- Bosch M., Fuentes M. C., Audivert S., Bonachera M. A., Peiró S., Cuñé J. 2014. *Lactobacillus plantarum* CECT 7527, 7528 and 7529: probiotic candidates to reduce cholesterol levels. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94, 4: 803-809
- Broadbent J. R., Lin C. 1999. Effect of heat shock or cold shock treatment on the resistance of *Lactococcus lactis* to freezing and lyophilisation. *Cryobiology*, 39, 1: 88-102
- Broadbent J. R., Larsen R. L., Deibel V., Steele J. L. 2010. Physiological and transcriptional response of *Lactobacillus casei* ATCC 334 to acid stress. *Journal of Bacteriology*, 192: 2445-2458
- Bron P. A., Marco M., Hoffer S. M., van Mullekom E., de Vos W. M., Kleerebezem M. 2004. Genetic characterisation of the bile salt response in *Lactobacillus plantarum* and analysis of responsive promoters *in vitro* and *in situ* in the gastrointestinal tract. *Journal of Bacteriology*, 186, 23: 7829-7835
- Bron P. A., van Bokhorst-van de Veen H., Wels M., Kleerebezem M. 2011. Engineering robust lactic acid bacteria. V: Stress responses of lactic acid bacteria. Tsakalidou E., Papadimitriou K. (eds.). Berlin, Springer: 369-394
- Bruno J. C., Freitag N. E. 2011. *Listeria monocytogenes* adapts to long-term stationary phase survival without compromising bacterial virulence. *FEMS Microbiology Letters*, 323, 2: 171-179
- Buckenhüskes H. J. 1997. Fermented vegetables. V: Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. 2<sup>nd</sup> ed. Doyle P. D., Beuchat L. R., Montville T. J. (eds.). Washington, DC, ASM Press: 595–609
- Butorac A., Dodig I., Bačun-Družina V., Tishbee A., Mrvčić J., Hock K., Diminić J., Cindrić M. 2013. The effect of starvation stress on *Lactobacillus brevis* L62 protein profile determined by *de novo* sequencing in positive and negative mass spectrometry ion mode. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 27, 9: 1045-1105
- Canchaya C., Claesson M. J., Fitzgerald G. F., van Sinderen D., O'Toole P. W. 2006. Diversity of the genus *Lactobacillus* revealed by comparative genomics of five species. *Microbiology*, 152: 3185-3196
- Caplice E., Fitzgerald G. F. 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 50: 131-149

- Cappa F., Cattivelli D., Cocconcelli P. S. 2005. The *uvrA* gene is involved in oxidative and acid stress responses in *Lactobacillus helveticus* CNBL1156. Research in Microbiology, 156, 10: 1039-1047
- Chateau N., Deschamps A. M., Hadj Sassi A. 1994. Heterogeneity of bile salts resistance in the *Lactobacillus* isolates of a probiotic consortium. Letters in Applied Microbiology, 18: 42-44
- Cheirsilp B., Shimizu H., Shioya S. 2003a. Enhanced kefiran production by mixed culture of *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Biotechnology, 100, 1: 43-53
- Cheirsilp B., Shoji H., Shimizu H., Shioya S. 2003b. Interactions between *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Saccharomyces cerevisiae* in mixed culture for kefiran production. Journal of Bioscience and Bioengineering, 96, 3: 279-284
- Chen Y. S., Wang Y. C., Chow Y. S., Yanagida F., Liao C. C., Chiu C. M. 2014. Purification and characterization of plantaricin Y, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* 510. Archives of Microbiology, 196, 3: 193-199
- Chou C. C., Cheng S. J. 2000. Recovery of low-temperature stressed *E. coli* 0157:H7 and its susceptibility to crystal violet, bile salt, sodium chloride and ethanol. International Journal of Food Microbiology, 61: 127-136
- Clarins J., Foster P. L. 1991. Adaptive reversion of a frameshift mutation in *Escherichia coli*. Genetics, 128: 695-701
- Coenye T., Vandamme P. 2003. Intrageneric heterogeneity between multiple 16S ribosomal RNA operons in sequenced bacterial genomes. FEMS Microbiology Letters, 228: 45-49
- Common misconceptions in freeze drying: Part 1. 2012. Biopharma Process Systems. <http://www.biopharma.co.uk/2013/03/06/common-misconceptions-in-freeze-drying-part-1/> (23. jun. 2014)
- Corcoran B. M., Stanton C., Fitzgerald G., Ross R. P. 2008. Life under stress: The probiotic stress response and how it may be manipulated. Current Pharmaceutical Design, 14: 1382-1399
- Das J. K., Mishra D., Ray P., Tripathy P., Beuria T. K., Singh N., Suar M. 2013. *In vitro* evaluation of anti-infective activity of a *Lactobacillus plantarum* strain against *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis*. Gut Pathogens, 5, 1: 11, doi: 0.1186/1757-4749-5-11: 11 str.
- De Angelis M., Gobbetti M. 2004. Environmental stress responses in *Lactobacillus*: A review. Proteomics, 4: 106-122

- Dellaglio F., Felis G. E. 2005. Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. V: Probiotics and prebiotics: Scientific Aspects. 1<sup>st</sup> ed. Tannock G. W. (ed.). Norfolk, Caister Academic Press: 25-49
- Demel R. A., Dorrepaal E., Ebskamp M. J. M., Smeekens J. C. M., De Kruijff B. 1998. Fructans interact strongly with model membranes. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1375, 1: 36-42
- Denamur E., Matic I. 2006. Evolution of mutation rates in bacteria. Molecular Microbiology, 60, 4: 820-827
- Derzelle S., Hallet B., Francis K. P., Ferain T., Delcour J., Hols P. 2000. Changes in *cspL*, *cspP*, and *cspC* mRNA abundance as a function of cold shock and growth phase in *Lactobacillus plantarum*. Journal of Bacteriology, 182: 5105-5113
- Derzelle S., Hallet B., Ferain T., Delcour J., Hols P. 2003. Improved adaptation to cold-shock, stationary-phase, and freezing stresses in *Lactobacillus plantarum* overproducing cold-shock proteins. Applied and Environmental Microbiology, 69: 4285-4290
- Donohue D. 2009. Safety of probiotic organisms. V: Handbook of Probiotics and Prebiotics. 2<sup>nd</sup> ed. Lee Y. K., Salminen S. (eds.). New Jersey, A John Wiley & Sons, Inc: 75-95
- Duary R. K., Batish V. K. Grover S. 2010. Expression of the *atpD* gene in probiotic *Lactobacillus plantarum* strains under in vitro acidic conditions using RT-qPCR. Research in Microbiology, 161: 399-405
- Ducrotté P., Sawant P., Jayanthi V. 2012. Clinical trial: *Lactobacillus plantarum* 299v (DSM 9843) improves symptoms of irritable bowel syndrome. World Journal of Gastroenterology, 18, 30: 4012-4018
- EFSA 2007. Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. The EFSA Journal, 587, doi: 10.2903/j.efsa.2007.587: 16 str.
- EFSA 2012. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. EFSA Journal, 10, 6: 2740, doi: 10.2903/j.efsa.2012.2740: 10 str.
- EFSA 2013. Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2013 update). EFSA Journal, 11, 11: 3449, doi: 10.2903/j.efsa.2013.3449: 108 str.
- Farrel M. J., Finkel S. E. 2003. The growth advantage in stationary-phase phenotype conferred by *rpoS* mutations is dependent on the pH in nutrient environment. Journal of Bacteriology, 185, 24: 7044-7052

- Fernandez M. F., Boris S., Barbes C. 2003. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, 94: 449-455
- Finkel S. E., Kolter R. 1999. Evolution of microbial diversity during prolonged starvation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, 7: 4023-4027
- Finkel S. E., Zinser E. R., Kolter R. 2000. Long-term survival and evolution in the stationary phase. V: *Bacterial Stress Responses*. Storz G., Hengge-Aronis R. (eds.). Washington, DC, ASM Press: 231–238
- Finkel S. E. 2006. Long-term survival during stationary phase: evolution and the GASP phenotype. *Nature Reviews*, 4: 113-120
- Fischer D., Teich A., Neubauer P., Hengge-Aronis R. 1998. The general stress sigma factor  $\sigma^S$  of *Escherichia coli* is induced during diauxic shift from glucose to lactose. *Journal of Bacteriology*, 180, 23: 6203-6206
- Fontana L., Bermudez-Brito M., Plaza-Diaz J., Muñoz-Quezada S., Gil A. 2013. Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *British Journal of Nutrition*, 109, S2: 35-50
- Fonville N. C., Ward R. M., Mittelman D. 2011. Stress-induced modulators of repeat instability and genome evolution. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 21: 36-44
- Foster P. L. 2007. Stress-induced mutagenesis in bacteria. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 42: 373-397
- Ganesan B., Stuart M. R., Weimer B. C. 2007. Carbohydrate starvation causes a metabolically active but nonculturable state in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 8: 2498-2512
- García M. J., Zúñiga M., Kobayashi H., 1992. Energy production from L-malic acid degradation and protection against acidic external pH in *Lactobacillus plantarum* CECT 220. *Journal of General Microbiology*, 138: 2519-2524
- Gibson J. L., Lombardo M. J., Thornton P. C., Hu K. H., Galhardo R. S., Beadle B., Habib A., Magner D. B., Frost L. S., Herman C., Hastings P. J., Rosenberg S. M. 2010. The  $\sigma^E$  stress response is required for stress-induced mutation and amplification in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 77: 415–430
- Gill H. S., Grover S., Batish V. K., Gill P. 2009. Immunological effects of probiotics and their significance to human health. V: *Prebiotics and Probiotics Scence and Technology*. Charalampopoulos D., Rastall R. A. (eds.). Berlin, Springer: 901-948

Giraud A., Matic M., Tenaillon O., Clara A., Radman M., Fons M., Taddie F. 2001. Costs and benefits of high mutation rates: adaptive evolution of bacteria in the mouse gut. *Science*, 291: 2606–2608

Glaser P., Frangeul L., Buchrieser C., Rusniok C., Amend A., Baquero F., Berche P., Bloecker H., Brandt P., Chakraborty T., Charbit A., Chetouani F., Couvé E., de Daruvar A., Dehoux P., Domann E., Domínguez-Bernal G., Duchaud E., Durant L., Dussurget O., Entian K. D., Fsihi H., Garvía-del Portillo F., Garrido P., Gautier L., Goebel W., Gómez-López N., Hain T., Hauf J., Jackson D., Jones L. M., Kaerst U., Kreft J., Kuhn M., Kunst F., Kurapkat G., Madueno E., Maitournam A., Vicente J. M., Ng E., Nedjari H., Nordsiek G., Novella S., de Pablos B., Pérez-Díaz J. C., Purcell R., Remmel B., Rose M., Schlueter T., Simoes N., Tierrez A., Vázquez-Boland J. A., Vos H., Wehland J., Cossart P. 2001. Comparative genomics of *Listeria* species. *Science*, 294, 5543: 849-852

Goossens D., Jonkers D., Russel M., Stobberingh E., Stockbrügger R. 2006. The effect of a probiotic drink with *L. plantarum* 299v on the bacterial composition in faeces and mucosal biopsies of rectum and ascending colon. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 23: 255-263

Guarner F., Schaafsma G. J. 1998. Probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 39: 237-238

Guerzoni M. E., Lanciotti R., Cocconcelli P. S. 2001. Alteration in cellular fatty acid composition as a response to salt, acid, oxidative and thermal stresses in *Lactobacillus helveticus*. *Microbiology*, 147, 8: 2255-2264

Haakensen M., Pittet V., Ziola B. 2011. Reclassification of *Paralactobacillus selangorensis* Leisner *et al.* 2000 as *Lactobacillus selangorensis* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61, 12: 2979-2983

Han Y., Kim B., Ban J., Lee J., Kim B. J., Choi B. S., Hwang S., Ahn K., Kim J. 2012. A randomized trial of *Lactobacillus plantarum* CJLP133 for the treatment of atopic dermatitis. *Pediatric Allergy and Immunology*, 23, 7: 667-673

Heller K. J. 2001. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 2: 374-379

Helmus R. A., Liermann L. J., Brantley S. L., Tien M. 2012. Growth advantage in stationary-phase (GASP) phenotype in long-term survival strains of *Geobacter sulfurreducens*. *FEMS Microbiology Ecology*, 79, 1: 218-228

Hersh M. N., Ponder R. G., Hastings P. J., Rosenberg S. M. 2004. Adaptive mutation and amplification in *Escherichia coli*: two pathways of genome adaptation under stress. *Research in Microbiology*, 155, 5: 352-359

- Huang Y., Wang X., Wang J., Sui Y., Yang L., Wang Z. 2013. *Lactobacillus plantarum* strains as potential probiotic cultures with cholesterol-lowering activity. *Journal of Dairy Science*, 96, 5: 2746-2753
- Hussain M. A., Knight M. I., Britz M. L. 2009a. Proteomic analysis of lactose-starved *Lactobacillus casei* during stationary growth phase. *Journal of Applied Microbiology*, 106, 3: 764-773
- Hussain M. A., Rouch D. A., Britz M. L. 2009b. Biochemistry of non-starter lactic acid bacteria isolate *Lactobacillus casei* GCRL163: Production of metabolites by stationary-phase cultures. *International Dairy Journal*, 19, 1: 12-21
- Iannitti T., Palmieri B. 2010. Therapeutical use of probiotic formulations in clinical practice. *Clinical Nutrition*, 29: 701-725
- Jacobsen C. N., Rosenfeldt Nielsen V., Hayford A. E., Møller P. L., Michaelsen K. F., Paerregaard A., Sandström B., Tvede M. and Jakobsen M. 1999. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 4949–4956
- Jayaraman R. 2009. Mutators and hypermutability in bacteria: the *Escherichia coli* paradigm. *Journal of Genetics*, 88, 3: 379-391
- Jayaraman R. 2011. Hypermutation and stress adaptation in bacteria. *Journal of Genetics*, 90: 383-391
- Johansson M. L., Nobaek S., Berggren A., Nyman M., Björck I., Ahrné S., Jeppsson B., Molin G. 1998. Survival of *Lactobacillus plantarum* DSM 9843 (299v), and effect on the short-chain fatty acid content of faeces after ingestion of a rose-hip drink with fermented oats. *International Journal of Food Microbiology*, 42: 29-38
- Kim W. S., Perl L., Park J. H., Tandianus J. E., Dunn N. W. 2001. Assessment of stress response of the probiotic *Lactobacillus acidophilus*. *Current Microbiology*, 43: 346-350
- Kimoto-Nira H., Ohmori H., Suzuki C. 2012. Commensal symbiosis between a *Lactococcus lactis* strain and an *Enterococcus mundtii* strain increases cell yield in constituted broth. *Journal of Dairy Science*, 95, 11: 6372-6378
- Kivisaar M. 2003. Stationary phase mutagenesis: mechanisms that accelerate adaptation of microbial populations under environmental stress. *Environmental Microbiology*, 5, 10: 814-827

Kleerebezem M., Boekhorst J., van Kranenburg R., Molenaar D., Kuipers O. P., Leer R., Tarchini R., Peters S. A., Sandbrink H. M., Fiers M. W. E. J., Stiekema W., Lankhorst R. M. K., Bron P. A., Hoffer S. M., Groot M. N. N., Kerkhoven R., de Vries M., Ursing B., de Vos W. M., Siezen R. J. 2003. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Microbiology*, 100, 4: 1990-1995

Klijn N., Weerkamp A. H., de Vos W. M. 1991. Identification of mesophilic lactic acid bacteria by using polymerase chain reaction-amplified variable regions of 16S rRNA and specific DNA probes. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 11: 3390-3393

Koponen, J., Laakso, K., Koskenniemi, K., Kankainen, M., Savijoki, K., Nyman, T. A., de Vos, W. M., Tynkkynen, S., Kalkkinen, N., Varmanen, P., 2012. Effect of acid stress on protein expression and phosphorylation in *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Journal of Proteomics*, 75: 1357-1374

Kullen M. J., Klaenhammer T. R. 1999. Identification of the pH-inducible, proton-translocating F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase (atpBEFHAGDC) operon of *Lactobacillus acidophilus* by differential display: gene structure, cloning and characterisation. *Molecular Microbiology*, 33, 6: 1152-1161

Lahtinen S. J., Gueimonde M., Ouwehand A. C., Reinikainen J. P., Salminen S. J. 2005. Probiotic bacteria may become dormant during storage. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 3: 1662-1663

Lahtinen S. J., Ouwehand A. C., Reinikainen J. P., Korpela J. M., Sandholm J., Salminen S. J. 2006. Intrinsic properties of so-called dormant probiotic bacteria, determined by flow cytometric viability assays. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 7: 5132-5134

Layton J. C., Foster P. L. 2003. Error-prone DNA polymerase IV is controlled by the stress-response sigma factor, RpoS, in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 50: 549–561

LeBlanc J. G., Laiño J. E., del Valle M. J., Vannini V., van Sinderen D., Taranto M. P., del Valdez G. F., de Giori G. S., Sesma F. 2011. B-Group vitamin production by lactic acid bacteria-current knowledge and potential applications. *Journal of Applied Microbiology*, 111: 1297-1309

Lee Y. 2009. Probiotic microorganisms. V: Handbook of probiotics and prebiotics. 2<sup>nd</sup> ed. Lee Y. K., Salminen S. (eds.). New Jersey, John Wiley & Sons: 3-176

Liu Y. W., Su Y. W., Ong W. K., Cheng T. H., Tsai Y. C. 2011. Oral administration of *Lactobacillus plantarum* K68 ameliorates DSS-induced ulcerative colitis in BALB/c mice via the anti-inflammatory and immunomodulatory activities. *International Immunopharmacology*, 11, 12: 2159-2166

- Livak K. J., Schmittgen T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods*, 25: 402-408
- Lorca G. L., de Valdez G. F. 1999. The effect of suboptimal growth temperature and growth phase on resistance of *Lactobacillus acidophilus* to environmental stress. *Cryobiology*, 39: 144–149
- Lorca G. L., de Valdez G. F. 2001. A low-pH-inducible, stationary-phase acid tolerance response in *Lactobacillus acidophilus* CRL 639. *Current Microbiology*, 42: 21-25
- Lorca G. L., de Valdez G. F. 2009. *Lactobacillus* stress responses. V: *Lactobacillus* molecular biology: From genomics to probiotics. Ljungh Å., Wadström T. (eds.). Norfolk, Caister Academic Press: 116-136
- Machielsen R., van Alen-Boerrigter I. J., Koole L. A., Bongers R. S., Kleerebezem M., Vlieg J. E. V. H. 2010. Indigenous and environmental modulation of frequencies of mutation in *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 5: 1587-1595
- Madan R., Kolter R., Mahadevan S. 2005. Mutations that activate the silent bgI operon of *Escherichia coli* confer a growth advantage in stationary phase. *Journal of Bacteriology*, 187, 23: 7912-7917
- Mañé J., Pedrosa E., Lorén V., Gassull M. A., Espadaler J., Cuñé J., Bonachera M. A., Cabré E. 2011. A mixture of *Lactobacillus plantarum* CECT 7315 and CECT 7316 enhances systemic immunity in elderly subjects. A dose-response, double-blind, placebo-controlled, randomized plot trial. *Nutrición Hospitalaria*, 26, 1: 228-235
- Marceau A., Zagorec M., Champomier-Vergès M. C. 2003. Positive effects of growth at suboptimal temperature and high salt concentration on long-term survival of *Lactobacillus sakei*. *Research in Microbiology*, 154, 1: 37-42
- Marchesi J., Shanahan F. 2007. The normal intestinal microbiota. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 20: 508-513
- Marco M. L., Kleerebezem M. 2008. Assessment of real-time RT-PCR for quantification of *Lactobacillus plantarum* gene expression during stationary phase and nutrient starvation. *Journal of Applied Microbiology*, 104, 2: 587-594
- Margolles A., Mayo B., Ruas-Madiedo P. 2009. Screening, identification, and characterization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. V: *Handbook of Probiotics and Prebiotics*. 2<sup>nd</sup> ed. Lee Y. K., Salminen S. (eds.). New Jersey, A John Wiley & Sons, Inc: 4-24
- Marteau P., Minekus M., Havenaar R., Huis In't Veld J. H. J. 1997. Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. *Journal of Dairy Science*, 80, 6: 1031-1037

- Martinez-Garcia E., Tormo A., Navarro-Llorens J. M. 2003. GASP phenotype: presence in enterobacteria and independence of sigmaS in its acquisition. FEMS Microbiology Letters, 225: 201–206
- Matic I., Radman M., Taddei F., Picard B., Doit C., Bingen E., Danamur E., Elion J. 1997. Highly variable mutation rates in commensal and pathogenic *Escherichia coli*. Science, 277: 1833-1834
- McKenzie G. J., Harris R. S., Lee P. L., Rosenberg S. M. 2000. The SOS response regulates adaptive mutation. Proceedings of National Academy of Sciences of the USA, 97: 6646–6651
- Molecular Probes. 2004. LIVE/DEAD<sup>®</sup> BacLight<sup>™</sup> Bacterial Viability Kits. Molecular Probes: 8 str.
- Molenaar D., Bringel F., Schuren F. H., de Vos W. M., Siezen R. J., Kleerebezem M. 2005. Exploring *Lactobacillus plantarum* genome diversity by using microarrays. Journal of Bacteriology, 187, 17: 6119-6127
- Montel Mendoza G., Pasteris S. E., Otero M. C., Nader-Macías M. E. F. 2013. Survival and beneficial properties of lactic acid bacteria from raniculture subjected to freeze-drying and storage. Journal of Applied Microbiology, 116, 1: 157-166
- Morgan C. A., Herman N., White P. A., Vesey G. 2006. Preservation of microorganisms by drying. A review. Journal of Microbiological Methods, 66: 183-193
- Muller J. A., Ross R. P., Fitzgerald G. F., Stanton C. 2009. Manufacture of probiotic bacteria. V: Prebiotics and Probiotics Science and Technology. Charalampopoulos D., Rastall R. A. (eds.). Berlin, Springer: 725-759
- Müller D. M., Carrasco M. S., Tonarelli G. G., Simonetta A. C. 2009. Characterization and purification of a new bacteriocin with broad inhibitory spectrum produced by *Lactobacillus plantarum* lp 31 strain isolated from dry-fermented sausage. Journal of Applied Microbiology, 106, 6: 2031-2040
- Noguchi S., Hattori M., Sugiyama H., Hanaoka A., Okada S., Yoshida T. 2012. *Lactobacillus plantarum* NRIC1832 enhances IL-10 production from CD4<sup>+</sup> T cells *in vitro*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 76, 10: 1925-1931
- Ouwehand A. C., Vesterlund S. 2004. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. V: Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects. 3<sup>rd</sup> ed. Salminen S., von Wright A., Ouwehand A. (eds.). New York, Marcel Dekker, Inc.: 375-396
- Palmfeldt J., Hahn-Hägerdal B. 2000. Influence of culture pH on survival of *Lactobacillus reuteri* subjected to freeze-drying. International Journal of Food Microbiology, 55, 1-3: 235-238

- Panoff J. M., Thammavongs B., Gueguen M. 2000. Cryoprotectants lead to phenotypic adaptation to freeze-thaw stress in *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CIP 101027T. *Cryobiology*, 40: 264-269
- Parente E., Ciocia F., Ricciardi A., Zotta T., Felis G. E., Torriani S., 2010. Diversity of stress tolerance in *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus paraplantarum*: A multivariate screening study. *International Journal of Food Microbiology*, 144: 270-279
- Park M. K., NGO V., Kwon Y. M., Lee Y. T., Yoo S., Cho Y. H., Hong S. M., Hwang H. S., Ko E. J., Jung Y. J., Moon D. W., Jeong E. J., Kim M. C., Lee Y. N., Jang J. H., Oh J. S., Kim C. H., Kang S. M. 2013. *Lactobacillus plantarum* DK119 as a probiotic confers protection against influenza virus by modulating innate immunity. *PLoS One*, 8, 10: e 75368, doi: 10.1371/journal.pone.0075368: 10 str.
- Paul K., Ghosh A., Sengupta N., Chowdhury R. 2004. Competitive growth advantage of nontoxigenic mutants in the stationary phase in archival cultures of pathogenic *Vibrio cholerae* strains. *Infection and Immunity*, 72, 9: 5478-5482
- Pavlović N., Stankov K., Mikov M. 2012. Probiotics-Interactions with bile acids and impact on cholesterol metabolism. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 168: 1880-1895
- Pepe O., Blajotta G., Anastasio M., Moschetti G., Ercolini D., Villani F. 2004. Technological and molecular diversity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from naturally fermented sourdoughs. *Systematic and Applied Microbiology*, 27, 4: 443-453
- Perez-Cano F. J., Dong K., Yaqoob P. 2010. *In vitro* immunomodulatory activity of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 and *Lactobacillus salivarius* CECT5713: two probiotic strains isolated from human breast milk. *Immunobiology*, 215: 996–1004
- Perry S. F. 1995. Freeze-Drying and Cryopreservation of Bacteria. V: Cryopreservation and Freeze-Drying protocols. McLellan J. G., Day M. R. (eds.). Berlin, Springer: 21-30
- Petrun B., Lostroh C. P. 2013. *Vibrio fischeri* exhibit the growth advantage in stationary-phase phenotype. *Canadian Journal of Microbiology*, 59, 2: 130-135
- Pieterse B., Leer R. J., Schuren F. H. van der Werf M. J., 2005. Unravelling the multiple effects of lactic acid stress on *Lactobacillus plantarum* by transcription profiling. *Microbiology*, 151: 3881-3894
- Pridmore R. D., Berger B., Desiere F., Vilanova D., Barretto C., Pittet A. C., Zwahlen M. C., Rouvet M., Altermann E., Barrangou R., Mollet B., Mercenier A., Klaenhammer T. R., Arigoni F., Schell M. A. 2004. The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. *Proceedings of National Academy of Sciences of USA*, 101: 2512 -2517

- Rajeshwari R., Yashitola J., Sonti R. V., Reddy A. P. K. 1997. Characteristics of stationary-phase variation affecting virulence in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Canadian Journal of Microbiology, 43, 9: 862-867
- Ross R. P., Morgana S., Hill C. 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. International Journal of Food Microbiology, 79: 3-16
- Rozen D. E., Philippe N., Arjan de Visser J., Lenski R. E., Schneider D. 2009. Death and cannibalism in a seasonal environment facilitate bacterial coexistence. Ecology Letters, 12: 34-44
- Rizzo A., Losacco A., Carretelli C. R., Domenico M. D., Bevilacqua N. 2013. *Lactobacillus plantarum* reduces *Streptococcus pyogenes* virulence by modulating IL-17, IL-23 and Toll-like receptor 2/4 expression in human epithelial cells. International Immunopharmacology, 17, 2: 453-461
- Saarela M., Virkajarvi I., Alakomi H. L., Mattila-Sandholm T., Vaari A., Suomalainen T., Mättö, J. 2005. Influence of fermentation time, cryoprotectant and neutralization of cell concentrate on freeze-drying survival, storage stability, and acid and bile exposure of *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* cells produced without milk-based ingredients. Journal of Applied Microbiology, 99, 6: 1330-1339
- Salaj R., Štofilova J., Šoltesova A., Hertelyova Z., Hijova E., Bertkova I., Strojny L., Kružliak P., Bomba A. 2013. The effects of two *Lactobacillus plantarum* strains on rat lipid metabolism receiving a high fat diet. The Scientific World Journal, 2013: 135142, doi: 10.1155/2013/135142: 7 str.
- Sambrook J., Russell D. W. 2001. Preparation and analysis of eukaryotic genomic DNA. Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 1: 6-39. [http://www.google.si/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CC0QFjAA&url=http%3A%2F%2Fmededucation.bjmu.edu.cn%2Freportreference%2Fmc3%2Fall%2520chapter%25206.doc&ei=lwOxUqn3M4aftAb0o4GIBQ&usg=AFQjCNF115v4S53jqPUbh3Qfd6J\\_hLoyg&sig2=TYrJWwpbUP0MrrN5sIxfg&bvm=bv.58187178,d.Yms](http://www.google.si/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CC0QFjAA&url=http%3A%2F%2Fmededucation.bjmu.edu.cn%2Freportreference%2Fmc3%2Fall%2520chapter%25206.doc&ei=lwOxUqn3M4aftAb0o4GIBQ&usg=AFQjCNF115v4S53jqPUbh3Qfd6J_hLoyg&sig2=TYrJWwpbUP0MrrN5sIxfg&bvm=bv.58187178,d.Yms) (maj, 2014)
- Sanders M. E., Akkermans L. M. A., Haller D., Hammerman C., Heimbach J., Hörmannsperger G., Huys G., Levy D. D., Lutgendorff F., Mack D., Phothirath P., Solano-Aguilar G., Vaughan E. 2010. Safety assessment of probiotics for human use. Gut Microbes, 1, 3: 164-185
- Sauvageot N., Beaufils S., Mazé A., Deutscher J., Hartke A. 2006. Cloning and characterisation of a gene encoding cold-shock protein in *Lactobacillus casei*. FEMS Microbiology Letters, 254, 1: 55-62

- Schoug Å., Fischer J., Heipieper H. J., Schnürer J., Håkansson S. 2008. Impact of fermentation pH and temperature on freeze-drying survival and membrane lipid composition of *Lactobacillus coryniformis* Si3. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 35: 175-181
- Scolari G., Vescovo M., Zaconi C., Battistotti B. 2002. Phenotypic and genetic variability in *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus plantarum* strains from different origin. Annals of Microbiology, 52, 1: 71-80
- Sen S., Mullan M. M., Parker T. J., Woolner J. T., Tarry S. A., Hunter J. O. 2002. Effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on colonic fermentation and symptoms of irritable bowel syndrome. Digestive Diseases and Science, 47: 2615-2620
- Senok A. C., Ismaeel A. Y., Botta G. A. 2005. Probiotics: facts and myths. Clinical Microbiology Infection, 11: 958-966
- Serrazanetti D. I., Ndagijimana M., Sado-Kamdem S., Corsetti A., Vogel R. F., Ehrmann M., Guerzoni M. E. 2011. Acid stress-mediated metabolic shift in *Lactobacillus sanfranciscensis* LSCE1. Applied and Environmental Microbiology, 77, 8: 2656-2666
- Shabala L., McMeekin T., Budde B. B., Siegumfeldt H., 2006. *Listeria innocua* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* employ different strategies to cope with acidic pH. International Journal of Food Microbiology, 110, 1: 1-7
- Siaterlis A., Deepika G., Charalampopoulos D. 2009. Effect of culture medium and cryoprotectants on the growth and survival of probiotic lactobacilli during freeze drying. Letters in Applied Microbiology, 48, 3: 295-301
- Siezen R. J., Tzeneva V. A., Castioni A., Wels M., Phan H. T., Rademaker J. L., Starrenburg M. J., Kleerebezem M., Molenaar D., van Hylckama Vlieg J. E., 2010. Phenotypic and genomic diversity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from various environmental niches. Environmental Microbiology, 12, 3: 758-773
- Siezen R. J., van Hylckama Vlieg J. E. T. 2011. Genomic diversity ad versatility of *Lactobacillus plantarum*, a nautral metabolic engineer. Microbial Cell Factories, 10, Suppl. 1: S3, doi: 10.1186/1475-2859-10-S1-S3: 13 str.
- Silby M. W., Giddens S. R., Mahanty H. K. 2005. Mutation of a LysR-type regulator of antifungal activity results in a growth advantage in stationary phase phenotype in *Pseudomonas aureofaciens* PA147-2. Applied and Environmental Microbiology, 71, 1: 569-573
- Silva J., Carvalho A. S., Ferreira R., Vitorino R., Amado F., Domingues P., Teixeira P., Gibbs P. A. 2005. Effect of the pH of growth on the survival of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* to stress conditions during spray-drying. Journal of Applied Microbiology, 98: 775-782

- Slavin J. 2013. Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits. *Nutrients*, 5: 1417-1435
- Smeulders M. J., Keer J., Speight R. A., Williams H. D. 1999. Adaptation of *Mycobacterium smegmatis* to stationary phase. *Journal of Bacteriology*, 181, 1: 270-283
- Snel J., Vissers Y. M., Smit B. A., Jongen J. M., van der Meulen E. T., Zwijsen R., Ruinemans-Koerts J., Jansen A. P., Kleerebezem M., Savelkoul H. F. 2011. Strain-specific immunomodulatory effects of *Lactobacillus plantarum* strains on birch-pollen-allergic subjects out of season. *Clinical and Experimental Allergy*, 41, 2: 232-242
- Soomro A. H., Masud T., Anwaar K. 2002. Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and human health—a review. *Pakistan Journal of Nutrition*, 1, 1: 20-24
- Strasser S., Neureiter M., Geppl M., Braun R., Danner H. 2009. Influence of lyophilisation, fluidized bed drying, addition of protectants, and storage on the viability of lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 107, 1: 167-177
- Streit F., Corrieu G., Béal C. 2007. Acidification improves cryotolerance of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1. *Journal of Bacteriology*, 128: 659-667
- Streit F., Delettre J., Corrieu G., Béal C. 2008. Acid adaptation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* induces physiological responses at membrane and cytosolic levels that improves cryotolerance. *Journal of Applied Microbiology*, 105: 1071-1080
- Succi M., Tremonte P., Reale A., Sorrentino E., Grazia L., Pacifico S., Coppola R. 2005. Bile salt and acid tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. *FEMS Microbiology Letters*, 244, 1: 129-137
- Takemura N., Hagio M., Ishizuka S., Ito H., Morita T., Sanoyama K. 2010. Inulin prolongs survival of intragastrically administered *Lactobacillus plantarum* No. 14 in the gut of mice fed a high-fat diet. *Journal of Nutrition*, 140, 11: 1963-1969
- Talwalkar A., Kailasapathy K. 2003. Metabolic and biochemical responses of probiotic bacteria to oxygen. *Journal of Dairy Science*, 86: 2537–2546
- Tark M., Tover A., Tarassova K., Tegova R., Kivi G., Hõrak R., Kivisaar M. 2005. A DNA polymerase V homologue encoded by TOL plasmid pWW0 confers evolutionary fitness on *Pseudomonas putida* under conditions of environmental stress. *Journal of Bacteriology*, 187, 15: 5203-5213
- Tynkkynen S., Singh K. V., Varmanen P. 1998. Vancomycin resistance factor of *Lactobacillus rhamnosus* GG in relation to enterococcal vancomycin resistance (*van*) genes. *International Journal of Food Microbiology*, 41: 195-204

- van Bokhorst-van de Veen H., Abee T., Tempelaars M., Bron P. A., Kleerebezem M., Marco M. L. 2011. Short- and long-term adaptation to ethanol stress and its cross-protective consequences in *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 15: 5247-5256
- van Bokhorst-van de Veen H., Lee I. C., Marco M. L., Wels M., Bron, P. A., Kleerebezem M. 2012. Modulation of *Lactobacillus plantarum* gastrointestinal robustness by fermentation conditions enables identification of bacterial robustness markers. *PloS one*, 7, 7: e39053, doi:10.1371/journal.pone.0039053.t001: 13 str.
- van de Guchte M., Serradell P., Chervaux C., Smokvina T., Ehrlich S. D., Maguin E. 2002. Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82: 187-216
- Vasiljevic T., Shah N. P. 2008. Probiotics-From Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*, 18: 714-728
- Verdenelli M. C., Ghelfi F., Silvi S., Orpianesi C., Cecchini C., Cresci A. 2009. Probiotic properties of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* isolated from human faeces. *European Journal of Nutrition*, 48, 6: 355-363
- Vorob'eva L. I. 2004. Stressors, stress reactions, and survival of bacteria: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 40, 3: 217-224
- Vulić M., Kolter R. 2001. Evolutionary cheating in *Escherichia coli* stationary phase cultures. *Genetics*, 158, 2: 519-526
- Wang Y., Corrieu G., Béal C. 2005. Fermentation pH and temperature influence the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus* RD758. *Journal of Dairy Science*, 88, 1: 21-29
- Willimsky G., Bang H., Fischer G., Marahiel M. A. 1992. Characterization of *cspB*, a *Bacillus subtilis* inducible cold shock gene affecting cell viability at low temperatures. *Journal of Bacteriology*, 174: 6326–6335
- Wouters J. A., Jeunissen B., Rombouts F. M., de Vos W. M., Kuipers O. P., Abee T. 1999. Analysis of the role of 7 kDa cold-shock proteins of *Lactococcus lactis* MG1363 in cryoprotection. *Microbiology*, 145: 3185–3194
- Wouters J. A., Rombouts F. M., Kuipers O. P., de Vos W. M., Abee T. 2000. The role of cold-shock proteins in low-temperature adaptation of food-related bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 23: 165–173
- Wu C., Zhang J., Wang M., Du G., Chen J. 2012. *Lactobacillus casei* combats acid stress by maintaining cell membrane functionality. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39: 1031-1039

Yousef A. E., Courtney P. D. 2003. Basics of stress adaptation and implications in new-generations foods. V: Microbial stress adaptation and food safety. Yousef A. E., Juneja V. K. (eds.). Boca Ration, CRC Press: 1-30

Zago M., Fornasari M. E., Carminati D., Burns P., Suarez V., Vinderola G., Reinheimer J., Giraffa G., 2011. Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. Food Microbiology, 28: 1033-1040

Zambrano M. M., Kolter R. 1993. *Escherichia coli* mutants lacking NADH dehydrogenase I have a competitive disadvantage in stationary phase. Journal of Bacteriology, 175: 5642–5647

Zambrano M. M., Kolter R. 1996. GASPing for life in stationary phase. Cell, 86: 181-184

Zhang Z., Schwartz S., Wagner L., Miller W., 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. Journal of Computational Biology, 7, 1-2: 203-214

Zinser E. R., Kolter R. 2000. Prolonged stationary phase incubation selects for *lrp* mutants in *E. coli* K-12. Journal of Bacteriology, 182: 4361-4365

## ZAHVALA

Viš. znan. sod. Bojana Bogovič Matijašič se zahvaljujem za mentorstvo in vodenje.

Hvala Gregorju Koscu za usmerjanje in nasvete pri eksperimentih in pisanju.

Hvala Krešotu in Štefanu za ideje in nasvete.

Zahvaljujem se Medisu ter Spirit Slovenija za financiranje raziskav.

Hvala tudi vsej skupini v Aciesu za sproščene delovne dneve in spodbudo.

Hvala družini in prijateljem za podporo in razumevanje.

