

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Katarina KRAJNIK

**PROUČEVANJE POPULACIJ BIFIDOBAKTERIJ IN
LAKTOBACILOV V MATERINEM MLEKU IN BLATU DOJENČKA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**POPULATION STUDIES OF BIFIDOBACTERIA AND
LACTOBACILLI IN HUMAN MILK AND BABY FECES**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo na Katedri za mlekarstvo, Oddelka za zootehniko, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Ireno, za somentorico dr. Bojano Bogovič Matijašič in za recenzentko prof. dr. Sonjo Smole Možina.

Mentorica: prof. dr. Irena Rogelj
Somentorica: dr. Bojano Bogovič Matijašič
Recenzentka: prof. dr. Sonjo Smole Možina

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Katarina Krajnik

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 579.24:613.287.1(043)=163.6
KG humano mleko/dojenčkovo blato/ *Bifidobacterium*/*Lactobacillus*/črevesna mikrobiota
AV KRAJNIK, Katarina
SA ROGELJ, Irena (mentorica)/BOGOVIČ MATIJAŠIĆ, Bojana (somentorica) /SMOLE MOŽINA, Sonja (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI 2009
IN PROUČEVANJE POPULACIJ BIFIDOBAKTERIJ IN LAKTOBACILOV V MATERINEM MLEKU IN BLATU DOJENČKA
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP X, 44 str., 12 pregl., 10 slik, 3 pril., 42 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Raziskovali smo številčnost bifidobakterij in laktobacilov v humanem mleku in blatu dojenčka v prvih 8 mesecih po rojstvu. Na selektivnih gojiščih za bifidobakterije (NPNL), za skupino *L. acidophilus* (MRS s klindamicinom) in za laktobacile (LAMVAB) smo uspeli osamiti bifidobakterije in laktobacile iz mleka in blata. Ugotovili smo, da na selektivnih gojiščih poleg tarčnih skupin bakterij zraste tudi veliko kokov. Pripadnost izolatov rodovoma *Lactobacillus* in *Bifidobacterium* smo potrdili z analizo PCR, raznolikost bifidobakterij pa ugotavljali z metodo RAPD. Ugotovili smo, da smo iz mleka in blata največkrat osamili en sev bifidobakterij, za katerega smo z ugotavljanjem zaporedja nukleotidov v 16 S rDNA ugotovili, da sodi v vrsto *Bifidobacterium breve*. V vzorcih so bili prisotni tudi drugi sevi bifidobakterij, vendar jih zaradi občutljivosti za kisik nismo uspeli kultivirati ali ohranjati z zamrzovanjem. Redna prisotnost istega seva *Bifidobacterium breve* tako v materinem mleku kot v blatu njenega dojenčka dokazuje, da je tudi mleko vir dojenčkove črevesne oziroma fekalne mikrobiote.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 579.24:613.287.1(043)=163.6
CX Human milk/baby feces/*Bifidobacterium*/*Lactobacillus*/ gut microbiota
AU KRAJNIK, Katarina
AA ROGELJ, Irena (supervisor)/BOGOVIČ MATIJAŠIĆ, Bojana (co-advisor)/
SMOLE MOŽINA, Sonja (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Dep. of Food Sci. and Techn.
PY 2009
TI POPULATION STUDIES OF BIFIDOBACTERIA AND LACTOBACILLI IN
HUMAN MILK AND BABY FECES
DT Graduation Thesis (University studies)
NO X, 44 p., 12 tab., 10 fig., 3 ann., 42 ref.
LA sl
AL sl/en
AB We were studying the diversity of bifidobacteria and lactobacilli in human milk and infant feces in the first 8 month after birth. We isolated bifidobacteria and lactobacilli from human milk and baby feces on selective media NPNL (for bifidobacteria), MRS with clyndamicin (for *L. acidophilus* group) and LAMVAB (for lactobacilli). We found out that besides the target microorganisms, rod shaped bacteria could also grow on selective media. We determined the genus (*Lactobacillus* and *Bifidobacterium*) with PCR and diversity of bifidobacteria with RAPD. We isolated from milk and faeces most frequently one bifidobacteria strain which was found by sequencing 16 S rDNA to belong to *B. breve* species. There were also other bifidobacteria strains present in tested samples but due to their sensitivity to oxygen we were not able to cultivate and store them. The presence of *B. breve* in human milk and in baby feces during all 8 months after birth indicates that also human milk is a source of bifidobacteria for infant gut.

KAZALO VSEBINE

| | |
|---|-------------|
| KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI) | III |
| KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD) | IV |
| KAZALO VSEBINE | V |
| KAZALO PREGLEDNIC | VII |
| KAZALO SLIK | VIII |
| KAZALO PRILOG | IX |
| OKRAJŠAVE IN SIMBOLI | X |
| | |
| 1 UVOD | 1 |
| 1.1 NAMEN NALOGE IN DELOVNA HIPOTEZA..... | 2 |
| 2 PREGLED OBJAV | 3 |
| 2.1 ROD <i>Bifidobacterium</i> | 3 |
| 2.2 ROD <i>Lactobacillus</i> | 4 |
| 2.3 PROBIOTIKI | 5 |
| 2.4 HUMANO MLEKO..... | 7 |
| 2.5 MIKROORGANIZMI V HUMANEM MLEKU | 9 |
| 2.6 BIFIDOGENI DEJAVNIKI HUMANEGA MLEKA | 11 |
| 2.7 BLATO DOJENČKA | 12 |
| 3 MATERIALI IN METODE | 13 |
| 3.1 NAČRT POSKUSA | 13 |
| 3.2 MATERIALI..... | 13 |
| 3.2.1 Vzorci | 13 |
| 3.2.2 Gojišča | 13 |
| 3.2.2.1 Bujon MRS..... | 13 |
| 3.2.2.2 Gojišče za zamrzovanje..... | 14 |
| 3.2.2.3 Gojišče za bifidobakterije (NPNL) | 14 |
| 3.2.2.4 Gojišče za skupino <i>Lb. acidophilus</i> (MRS + cly) | 14 |
| 3.2.2.5 Gojišče za laktobacile (LAMVAB) | 14 |
| 3.2.2.6 Peptonska voda..... | 14 |
| 3.2.3 Kemikalije | 15 |
| 3.2.3.1 NP NL | 15 |
| 3.2.3.2 PCR | 15 |
| 3.2.3.3 Elektroforeza in barvanje | 16 |
| 3.2.3.4 Liza celic | 16 |
| 3.2.3.5 Izolacija DNA | 16 |
| 3.2.3.6 Čiščenje PCR pomnožkov..... | 16 |

| | | |
|---------|--|----|
| 3.3 | METODE | 16 |
| 3.3.1 | Vzorci | 16 |
| 3.3.2 | Kultivacija bakterij | 17 |
| 3.3.2.1 | Zamrznjeni izolati/kolonije | 17 |
| 3.3.2.2 | Zamrznjeno mleko in blato | 17 |
| 3.3.2.3 | Zamrzovanje čistih bakterijskih kultur | 17 |
| 3.3.3 | Identifikacija bakterij | 17 |
| 3.3.3.1 | Mikroskopiranje | 17 |
| 3.3.3.2 | PCR na kolonijah | 18 |
| 3.3.3.3 | Liza celic s tritonom | 19 |
| 3.3.3.4 | PCR | 19 |
| 3.3.3.5 | Izolacija DNA | 20 |
| 3.3.3.6 | RAPD | 21 |
| 3.3.3.7 | Gelska elektroforeza | 22 |
| 3.3.3.8 | Izolacija pomnožkov PCR za ugotavljanje zaporedja nukleotidov | 22 |
| 4 | REZULTATI | 24 |
| 4.1 | ŠTEVILO PREISKOVANIH BAKTERIJ V HUMANEM MLEKU IN BLATU DOJENČKA | 24 |
| 4.2 | IZGLED KOLONIJ IN MORFOLOGIJA BAKTERIJ | 25 |
| 4.2.1 | Izgled kolonij | 25 |
| 4.2.2 | Morfologija bakterij | 26 |
| 4.3 | PRIPRAVA DNA ZA PCR IN ANALIZO RAPD | 27 |
| 4.4 | POTRDITEV RODU S PCR | 27 |
| 4.5 | RAZLIKOVANJE SEVOV BIFIDOBAKTERIJ Z ANALIZO RAPD | 29 |
| 4.6 | UGOTAVLJANJE ZAPOREDJA NUKLEOTIDOV | 31 |
| 5 | RAZPRAVA IN SKLEPI | 32 |
| 5.1 | KONCENTRACIJA PREISKOVANIH BAKTERIJ V HUMANEM MLEKU IN DOJENČKOVEM BLATU | 32 |
| 5.2 | PROBLEMI S KULTIVACIJO BIFIDOBAKTERIJ | 34 |
| 5.3 | PCR NA KOLONIJAH | 35 |
| 5.4 | POTRJEVANJE RODU | 35 |
| 5.5 | DOLOČITEV VRST BIFIDOBAKTERIJ | 36 |
| 5.7 | SKLEPI | 37 |
| 6 | POVZETEK | 38 |
| 7 | VIRI | 40 |

ZAHVALA
PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

| | |
|--|----|
| Preglednica 1: Vrste bifidobakterij izoliranih iz človeka (Biavati in sod., 2000)..... | 3 |
| Preglednica 2: Mikroorganizmi, ki jih uporabljamo kot probiotike (Gardiner in sod., 2002)... | 6 |
| Preglednica 3: Bifidobakterije izolirane iz humanega mleka in njihovo pojavljanje (Gueimonde, 2007) | 11 |
| Preglednica 4: Postopek barvanja po Gramu | 17 |
| Preglednica 5: Protokol PCR na kolonijah..... | 18 |
| Preglednica 6: Sestava 30 µl reakcijske mešanice za PCR na kolonijah | 19 |
| Preglednica 7: Sestava 30 µl reakcijske mešanice za PCR z očiščeno DNA..... | 20 |
| Preglednica 8: Protokol PCR | 20 |
| Preglednica 9: Sestava 25 µl reakcijske mešanice za analizo RAPD | 21 |
| Preglednica 10: Protokol analize RAPD | 22 |
| Preglednica 11: Protokol PCR za ugotavljanje zaporedja nukleotidov | 22 |
| Preglednica 12: Število preiskovanih bakterij v mleku in blatu pri vseh vzorčenjih..... | 24 |

KAZALO SLIK

| | |
|--|----|
| Slika 1: Bifidobakterije, posnete z elektronskim mikroskopom (Biavati in sod., 2000) | 4 |
| Slika 2: Preprečevanje adhezije patogenih bakterij (Newburg, 2005) | 8 |
| Slika 3: Kolonije bifidobakterij na gojišču NPNL | 25 |
| Slika 4: Kolonije mešane kulture kokov in laktobacilov na gojišču MRS + cly | 25 |
| Slika 5: Kolonije laktobacilov na gojišču LAMVAB | 25 |
| Slika 6: Mikroskopski preparat po Gramu barvanih bifidobakterij | 26 |
| Slika 7: Pomnožki PCR s katerimi smo dokazali rod <i>Bifidobacterium</i> | 28 |
| Slika 8: Pomnožki PCR, s katerimi smo dokazali rod <i>Lactobacillus</i> | 29 |
| Slika 9: Pomnožki analize RAPD z z. o. KGT-70-GC | 30 |
| Slika 10: Pomnožki analize RAPD z z. o. M-13 | 30 |

KAZALO PRILOG

Priloga A: Nukleotidno zaporedje *Bifidobacterium breve*

Priloga B: Nukleotidno zaporedje *Staphylococcus epidermidis*

Pirloga C: Nukleotidno zaporedje *Enterococcus faecalis*

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

| | |
|--------|---|
| bp | Bazni par |
| cly | Klindamicin |
| DNA | Deoksiribonukleinska kislina |
| dNTP | Mešanica nukleotidov |
| NO | Dušikov oksid |
| EDTA | Etilendiaminotetraoetna kislina |
| GIT | Gastrointestinalni trakt |
| ke | Kolonijske enote |
| LAMVAB | Gojišče za laktobacile z vankomicinom |
| MKB | Mlečnokislinske bakterije |
| MRS | Gojišče (de Man-Rogosa-Sharpe) |
| NPNL | Gojišče za bifidobakterije (Nalidixic acid, LiCl, Neomycin-Sulphate, Paromomycin Sulphate Agar) |
| z. o. | začetni oligonukleotid |
| PCR | Polymerase Chain Reaction (verižna reakcija s polimerazo) |
| RAPD | Randomly Amplified Polymorphic DNA (pomnoževanje DNA z naključnimi začetnimi oligonukleotidi) |
| rpm | Revolutions per minute (obrti na minuto) |
| TAE | Tris acetatni pufer |
| VBNC | Viable but not culturable (žive, a ne kultivabilne celice) |

1 UVOD

Humano mleko je prva in edina naravna hrana novorojenca. Vsebuje vse snovi, ki so potrebne za njegov razvoj: beljakovine, maščobe, ogljikove hidrate, vitamine in minerale. Mleko vsebuje tudi mnogo zaščitnih snovi, ki predstavljajo pomembno obrambo novorojenca, saj se otrok rodi z nezrelim imunskim sistemom, poleg tega pa je zaradi oralnega raziskovanja okolice neprestano izpostavljen dejavnikom okolja, tudi umazaniji.

Najbolj poznane zaščitne, bioaktivne snovi v humanem mleku so imunoglobulini. Imunoglobulini nastajajo v organizmu doječe matere za lastno obrambo pred patogenimi mikroorganizmi. Iz krvi nato preidejo v njeno mleko. Na ta način jih dobi tudi dojenec, ki jih sam še ni sposoben proizvesti. V mleku so prisotni še glikani, ki preprečujejo adhezijo patogenih bakterij na epitelne celice črevesa. Zaščitno deljujejo tudi nekatere delno prebavljene komponente mleka: monogliceridi, proste maščobne kisline in protimikrobni peptidi (Newburg, 2005).

V humanem mleku so odkrili tudi veliko število bakterij. Najprej so raziskovali le potencialno patogene bakterije, ki so povezane s kliničnimi primeri mastitisa. Nato pa so ugotovili, da mleko naravno vsebuje tudi mnogo potencialno probiotičnih bakterij (mlečnokislinske bakterije in bifidobakterije). Te pozitivno vplivajo na črevesno mikrobioto novorojenca. Človek se rodi s »sterilnim« črevesom. Kolonizacija se prične že med porodom. Dolgo je veljalo, da ima način poroda (vaginalen ali s carskim rezom) pomemben vpliv na dojenčkovo črevesno mikrobioto. V zadnjih letih pa dokazujejo, da prehrana v prvih mesecih življenja bolj vpliva na razvoj črevesne mikrobiote kot sam način poroda. Ugotovili so, da imajo novorojenci, hranjeni z mlečnimi nadomestki (zalivančki), drugačno črevesno mikrobioto kot dojenčki. Zalivančki razvijejo mikrobioto, podobno odraslim, v mikrobioti dojenčkov pa prevladujejo bifidobakterije, prisotne so še mlečnokislinske bakterije in vrste *Bacteroides*. Razvoj črevesne mikrobiote novorojenca pa pomembno vpliva na razvoj imunskega sistema in homeostaze prebavil (Harmsen in sod, 2000, Martin in sod. 2003).

Sestava bakterijske populacije mleka se odraža tudi v mikrobioti blata dojenčka. Iz blata lahko osamimo le bakterije, ki so preživele pot skozi gastrointestinalni trakt.

Probiotične bakterije, osamljene iz humanega mleka, so zelo primerni kandidati za probiotike, saj so humanega izvora, varni, lahko jih uživajo dojenčki. Poleg tega so tudi prilagojeni mleku, oziroma sestavinam mleka.

1.1 NAMEN NALOGE IN DELOVNA HIPOTEZA

V diplomski nalogi smo želeli raziskati številčnost laktobacilov in bifidobakterij v mleku matere in blatu njenega dojenčka ter ugotoviti ali je mogoče iste predstavnike (seve) zaslediti v obeh okoljih.

Različne izolate iz mleka in blata smo nameravali shraniti za nadaljnje raziskave in morebitno uporabo kot probiotike.

Delovna hipoteza:

- mikrobiota mleka zdrave matere bo vsebovala laktobacile in bifidobakterije,
- posamezni sevi bifidobakterij in laktobacilov se bodo pojavili tudi v mikrobioti blata njenega dojenčka.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ROD *Bifidobacterium*

Bifidobakterije je prvi opisal Tissier leta 1900. Iz dojenčkovega blata je namreč osamil bakterije z obliko Y. Poimenoval jih je *Bacillus bifidus*. Opisal jih je kot anaerobne, po Gramu pozitivne palčke, ki ne proizvajajo plina. Nato so jih dolgo uvrščali v rod *Lactobacillus*. Kot samostojen rod so prvič opisane leta 1974 v osmi izdaji priročnika Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Biavati in sod, 2000).

Bifidobakterije običajno naseljujejo gastrointestinalni trakt (GIT) človeka in živali. Nahajajo se predvsem v debelem črevesu (Awaishah in sod., 2005). Osamili so jih iz blata dojenčka in odraslega človeka, vagine in dentalnega kariesa. So zelo pomembne črevesne bakterije, saj predstavljajo do 90 % črevesne mikrobiote pri novorojenčkih in 3 % - 7 % mikrobiote odraslih (Collado in sod., 2006). Vrste, tipične za človeka, so prikazane v preglednici 1.

Preglednica 1: Vrste bifidobakterij izoliranih iz človeka (Biavati in sod., 2000)

| Bifidobakterije | Življenjski prostor |
|-----------------------------|-------------------------------------|
| <i>B. breve</i> | Dojenček, vagina |
| <i>B. infantis</i> | Dojenček |
| <i>B. bifidum</i> | Blato dojenčka in odraslega, vagina |
| <i>B. catenulatum</i> | Blato dojenčka in odraslega |
| <i>B. longum</i> | Blato dojenčka in odraslega, vagina |
| <i>B. pseudocatenulatum</i> | Blato dojenčka in odraslega |
| <i>B. adolescentis</i> | Blato odraslega, vagina |
| <i>B. dentioclens</i> | karies |
| <i>B. dentium</i> | karies |
| <i>B. inopinatum</i> | karies |

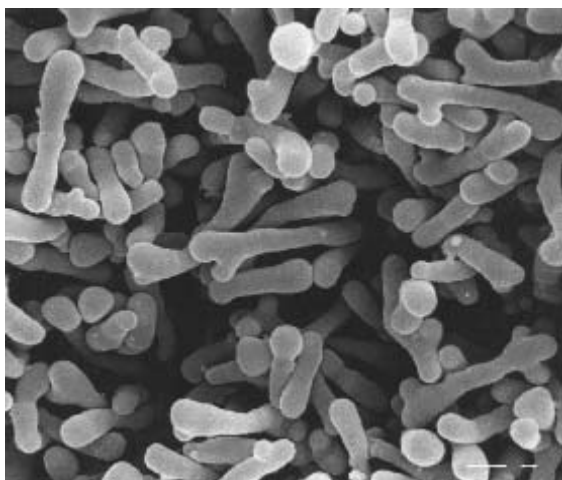
Optimalna temperatura rasti bifidobakterij se giblje med 37 °C in 41 °C, pod 20 °C in nad 46 °C večina bifidobakterij ne raste. Izjema je *B. thermacidophilum*, ki raste tudi pri 49,5 °C. Optimalna vrednost pH za bifidobakterije se giblje med 6,5 in 7,0. Pod pH 4,5 (izjema je zopet *B. thermacidophilum*) in nad pH 8,5 ni rasti. Bifidobakterije so anaerobni mikroorganizmi. Občutljivost za kisik je vrstno specifična, razlike so ugotovili celo med različnimi sevi iste vrste (Biavati in sod, 2000).

Bistvena razlika med bifidobakterijami in mlečnokislinskimi bakterijami je v metabolizmu heksoz. Bifidobakterije s pomočjo encima fruktoza-6-fosfat fosfoketolaze razgradijo heksoza-fosfate na eritroza-4-fosfat in acetil fosfat. Končna produkta sta mlečna in očetna kislina (Biavati in sod, 2000).

Bifidobakterije izločajo biološko aktivne snovi, ki vplivajo na gostiteljevo zdravje. Z zaviralnim delovanjem na koliformne in patogene mikroorganizme ter rotaviruse preprečujejo diarejo in rotavirusne okužbe pri otrocih (Biavati in sod, 2000). Z »*in vitro*« študijami so dokazali antagonistično delovanje proti bakterijam *E. coli* (Gibson in Wang,

1994), *Shigella dysenteriae* (Misra in Kuila, 1995) in *Yersinia enterocolitica* (Ozbas in Aytac, 1995).

Inhibicijsko delovanje bifidobakterij pripisujejo sintezi očetne in mlečne kisline. Nekatere vrste izločajo bakteriocine s širokim spektrom delovanja na po Gramu pozitivne in po Gramu negativne bakterije. Gibson in Wang (1994) sta opisala bakteriocidno delovanje proti salmoneli, listeriji, kampilobakterju, šigeli in vibriju. Meghroun in sod. (1990) so dokazali toplotno stabilno molekulo, ki deluje zaviralno na sorodne vrste *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Clostridium* in *Lactobacillus*. Našli so bakteriocin Bifidicin B, ki ga proizvaja *Bifidobacterium bifidum* NCBFB 1454 (Yildirim in Johnson, 1998).



Slika 1: Bifidobakterije, posnete z elektronskim mikroskopom (Biavati in sod., 2000)

2.2 ROD *Lactobacillus*

Bakterije tega rodu spadajo med najpomembnejše mlečnokislinske bakterije, ki so istočasno najpomembnejša skupina industrijsko uporabnih bakterij v živilstvu. To so po Gramu pozitivne dolge ali kokoidne, negibljive in nesporogene paličice. V okolju z nizko vrednostjo pH se barvajo po Gramu negativno. Ne vsebujejo porfirinov in citokromov, nimajo transportne verige elektronov, energijo pa pridobivajo izključno s fermentacijo sladkorjev. Glede odnosa do kisika so aerotolerantni anaerobi. Prehransko so zahtevni, poleg fermentabilnih sladkorjev potrebujejo mnoge rastne dejavnike, kot so aminokisliline, vitamini in organske baze. Naseljujejo okoljske niše, ki vsebujejo potrebna hranila, med drugim številne živilske surovine rastlinskega in živalskega izvora (Adamič in sod., 2003).

Laktobacili se razmnožujejo pri temperaturah od 2 °C do 35 °C (odvisno od vrste), optimum je med 30 °C in 40 °C. Rastejo pri vrednostih pH od 3,0 do 7,0, minimalna vrednost a_w za rast je okoli 0,90 (Adamič in sod., 2003).

Glede na končne produkte presnove jih delimo v dve skupini:

- Homofermentativne, pri katerih je končni produkt razgradnje glukoze mlečna kislina,
- Heterofermentativne, ki iz glukoze tvorijo mlečno in očetno kislino ter ostale produkte, med njimi pline (ogljikov dioksid) (Adamič in sod., 2003).

Laktobacili se pri človeku nahajajo v spodnjem delu tankega črevesa. Tu s proizvodnjem mlečne kisline zavirajo razvoj patogenih bakterij kot je *Salmonella* spp. in tekmujejo za prostor in hranila z drugimi nezaželenimi bakterijami. Laktobacili tudi izkoriščajo laktozo in s tem pomagajo pri prebavi ljudem, ki nimajo zadosti endogenih laktaz (primarna laktozna intoleranca) (Awaisheh in sod., 2005). Sposobni so tudi sinteze protimikrobnih substanc: že omenjene mlečne kisline, bakteriocinov, vodikovega peroksida, reuterina in drugih. Laktobacili spadajo med po Gramu pozitivne bakterije, ki lahko tvorijo biogene amine (histamin, tiramin, putrescin, kadaverin), ki negativno vplivajo na naše zdravje in so lahko tudi prekurzorji kancerogenih nitrozaminov (Martin in sod., 2005).

Olivares in sod. (2006) so raziskovali protimikrobni potencial štirih sevov laktobacilov: *Lactobacillus salivarius* CECT5713, *Lactobacillus gasseri* CECT5714, *L. gasseri* CECT5715 in *Lactobacillus fermentum* CECT5716, izoliranih iz humanega mleka. Z metodo difuzije na agarju so ugotavljali sintezo protimikrobnih snovi proti različnim patogenim mikroorganizmom. Vsi testirani laktobacili so delovali protimikrobno. Ko so vrednost pH uravnali na 7, tega učinka ni bilo več. Iz tega so sklepali, da so za protimikrobno delovanje teh sevov potrebne tudi organske kisline.

Da patogene bakterije lahko povzročijo infekcijo in se dalj časa zadržijo v črevesu, je potrebna njihova adhezija na epitelne celice. Laktobacili zmanjšujejo adhezijo tako, da se agregirajo na patogene bakterije, lahko pa se tudi sami povežejo z epitelnimi celicami in s tem preprečijo dostop patogenim bakterijam. Na prašičjih epitelnih celicah so testirali vpliv laktobacilov na adhezijo salmonele. Največji učinek na adhezijo salmonele je imel sev *Lactobacillus salivarius* CECT5713, ostali so adhezijo slabše preprečevali. Ko pa so najprej inokulirali laktobacile in nato salmonelo, se je adhezija salmonel močno zmanjšala. Iz tega so sklepali, da laktobacili proizvajajo metabolite, ki preprečujejo adhezijo. Dokazali so tudi, da laktobacili povečajo ekspresijo intestinalnih mucinov in s tem preprečujejo infekcijo. Delali so tudi preskuse na miših. Miške so okužili s *S. choleraesuis* CECT4155. Dodatek laktobacilov v njihovo hrano je močno izboljšal preživelost mišk (Olivares in sod., 2006).

2.3 PROBIOTIKI

Probiotiki so živi mikroorganizmi, ki, dodani hrani ali krmi, vplivajo na fiziologijo gostitelja tako, da okrepijo črevesni in sistemski imunski odgovor ter izboljšajo prehransko in mikrobnostavno ravnovesje v prebavilih (Rogelj in Perko, 2003).

Največ danes poznanih probiotičnih mikroorganizmov pripada rodovoma *Lactobacillus* in *Bifidobacterium*, kar je delno posledica njihove tradicionalne povezave z zdravjem, naravne prisotnosti v prebavnem traktu in fermentirani hrani, pa tudi tako imenovanega

statusa GRAS (Generally Recognized as Safe), ki jim daje sloves »varnih« mikroorganizmov, saj jih ljudje v fermentirani hrani uživajo že tisočletja (Rogelj in Perko, 2003).

Probiotične bakterije morajo preživeti prehod do črevesa (nizko vrednost pH želodca in žolčne soli) v zadostnem številu in biti sposobne vezave na črevesno površino. Imeti morajo pozitivne učinke na gostitelja in antagonistično delovati proti patogenim mikroorganizmom. Probiotične bakterije morajo biti varne. Če že vsebujejo gene za odpornost proti antibiotikom, moramo izključiti možnost, da se ti lahko prenesejo na druge bakterije. Da lahko nek probiotični bakterijski sev uporabimo v prehranskih dodatkih, zdravih ali v živilih, mora preživeti tudi tehnološke postopke, kot je liofilizacija (Biavati in sod, 2000).

Preglednica 2: Mikroorganizmi, ki jih uporabljamo kot probiotike (Gardiner in sod., 2002)

| laktobacili | bifidobakterije | enterokoki | ostali |
|--|------------------------|--------------------|--|
| <i>L. acidophilus</i> | <i>B. bifidum</i> | <i>E. faecium</i> | <i>Saccharomyces boulardii</i> |
| <i>L. plantarum</i> | <i>B. infantis</i> | <i>E. faecalis</i> | <i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i> |
| <i>L. casei</i> | <i>B. adolescentis</i> | | <i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>cremoris</i> |
| <i>L. rhamnosus</i> | <i>B. longum</i> | | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> |
| <i>L. delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i> | <i>B. breve</i> | | <i>Propionibacterium freudenreichii</i> |
| <i>L. fermentum</i> | <i>B. lactis</i> | | <i>Pediococcus acidilactici</i> |
| <i>L. johnsonii</i> | | | <i>Streptococcus thermophilus</i> |
| <i>L. gasseri</i> | | | <i>Escherichia coli</i> |
| <i>L. salivarius</i> | | | |
| <i>L. reuteri</i> | | | |

Stopnja preživelosti probiotika med prehodom skozi gastrointestinalni trakt je odvisna od kislosti v želodcu (poln želodec ima višjo vrednost pH kot prazen), zadrževalnega časa v želodcu, koncentracije in časa izpostavljenosti žolčnim solem, stopnje aktivnosti žolčnih hidrolaz in lastnosti same probiotične bakterije. Med najbolj odporne spadajo sevi vrst *L. acidophilus* in *B. longum* (Bezkorovainy, 2001).

Možni učinki probiotikov (Biavati in sod, 2000; Saxelin in sod., 2005):

- Ublažijo laktozno intoleranco z zagotavljanjem β galaktozidaze,
- izločajo bakteriocidne in bakteriostatične snovi,
- znižujejo vrednost pH okolja, v katerem živijo (črevesna vsebina),
- delujejo antimutageno in antikancerogeno,
- ublažijo rotavirusno diarejo in diarejo pri odraslih,
- vzpostavijo mikrobno ravnotežje v črevesju pri zdravljenju z antibiotiki,
- zavirajo rast *H. pylori* (povzročja želodčne težave),
- zmanjšajo kolonizacijo pogojno patogenih bakterij (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, β -hemolitični streptokoki), ki povzročajo infekcije ob zmanjšani imunski odpornosti,
- zmanjšajo nevarnost pojava alergij (z vplivom na imunski sistem).

Vemo, da snovi, ki jih metabolno aktivni probiotiki izločajo (bakteriocini, kratkoverižne maščobne kisline in peptidi) in komponente neaktivnih ali mrtvih celic (DNA, proteini), lahko vplivajo na obrambne poti. Pri večini nam podroben mehanizem delovanja še vedno ni poznan. Sobko in sod. (2006) so raziskovali eksogeno tvorbo dušikovega oksida (NO). To je plin, ki v organizmu prenaša signale. Prenos plina, ki ga proizvede ena sama celica in nato izstopi skozi celično membrano ter regulira delovanje drugih celic, predstavlja popolnoma nov princip signalizacije v bioloških sistemih. Vpliva na mnoge presnovne in fiziološke procese. Endogeni NO, ki nastaja iz aminokisline L-arginina s pomočjo NO sintaze, povzroča relaksacijo miškulature sten krvnih žil, regulira transport vode in elektrolitov, vpliva na imunski sistem in ščiti organizem pred infekcijami. Ugotovili so, da probiotične bakterije ob prisotnosti nitrata v gastrointestinalnem traktu (GIT) tvorijo NO. Najprej reducirajo nitrat v nitrit, iz njega pa se v kislem okolju (tvorba organskih kislin) tvori NO. Dokazali so, da patogene bakterije (*E. coli* in *S. aureus*) »*in vitro*« absorbirajo NO. Humano mleko vsebuje nitrat zato lahko probiotične bakterije v črevesu dojenega otroka tvorijo NO. Le-ta vpliva na njegov razvijajoči se imunski sistem in preprečuje rast patogenih bakterij.

Mätto in sod. (2006) so raziskovali preživelost treh probiotičnih mikroorganizmov *Lactobacillus* F19, *L. acidophilus* NCFB 1748 in *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 v GIT odraslih. Ti mikroorganizmi niso bili del mikrobiote testiranih oseb pred eksperimentom. Probiotike so zaužili v obliki jogurta. *Lactobacillus* F19 in *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 sta dobro preživela pot skozi GIT, *L. acidophilus* NCFB 1748 pa slabše. Odkrili so tudi povečano število bifidobakterij, ki ga niso mogli pripisati sevu *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 zato sklepajo, da je imel probiotični jogurt pozitiven vpliv na razmnoževanje endogenih bifidobakterij. Nekaj tednov po prenehanju uživanja tega jogurta probiotični mikroorganizmi iz jogurta niso bili več prisotni v blatu testiranih oseb. Izjema je bila ena oseba, pri kateri so s kolonoskopijo dokazali adhezijo *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 na epitelne celice. Pri tej osebi so v blatu našli *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 celotno obdobje eksperimenta.

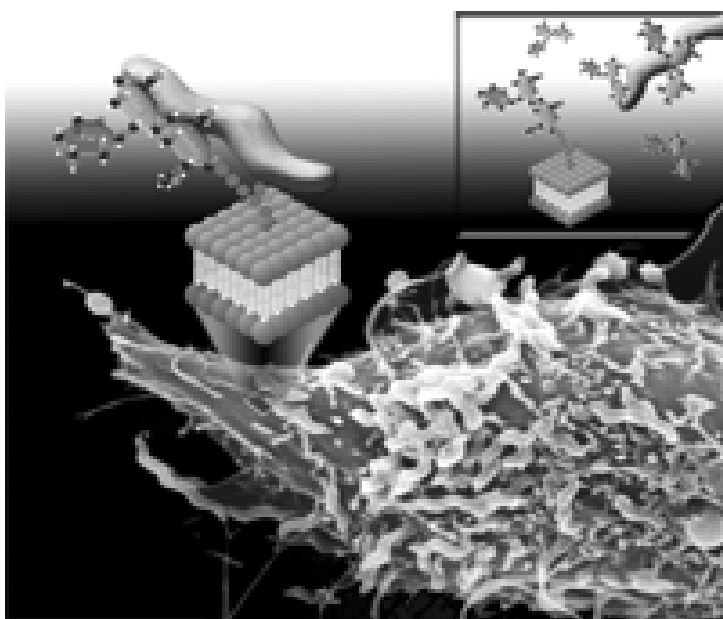
Zelo podobni raziskavi so opravili tudi Su in sod. (2005) ter Collado in sod. (2006). Prvi so dokazovali preživelost *B. lactis*, drugi pa *B. animalis*. Ugotovitve so bile podobne: bifidobakterije so preživele pot skozi GIT, vendar jih nekaj tednov (odvisno od posameznika) po končanem uživanju v blatu testiranih oseb niso več zasledili. Ugotovili so, da se eksogene bifidobakterije niso sposobne trajno naseliti v človeškem GIT. Če hočemo izkoristiti njihove pozitivne lastnosti, jih moramo redno vnašati v telo.

2.4 HUMANO MLEKO

Otrok se rodi z nezrelim imunskim sistemom, s skromno črevesno mikrobioto, ki jo pridobi med porodom, zato je njegova sposobnost, da se bori s patogenimi bakterijami, šibka. Poleg tega svojo okolico raziskuje oralno in je zato izpostavljen umazaniji. Že zaradi vseh teh dejstev je mogoče predvideti, da novorojenček potrebuje zaščito eksogenega izvora in da ta najverjetneje izvira iz materinega mleka (Newburg, 2005).

Tako sklepanje je vzpodbudilo raziskave humanega mleka. Našli so mnogo bioaktivnih dejavnikov, ki delujejo zaščitno ali pa imajo vpliv na imunski sistem. Bioaktivne komponente humanega mleka so imunoglobulini, bakterije s probiotičnim delovanjem, glikani in delno prebavljene sestavine mleka (Newburg, 2005).

Prve raziskane bioaktivne komponente v mleku so bili imunoglobulini, med katerimi prevladuje imunoglobulin A. Imunoglobuline proizvaja doječa mati, ko je tudi sama okužena. Iz materine krvi pridejo v mleko in tako v dojenčkovem črevesu delujejo proti patogenim bakterijam. Vendar ta odziv ni hiter, okužena mama za sintezo imunoglobulinov potrebuje več dni. To bi bilo za dojenčka usodno, če ne bi imel še drugih zaščitnih mehanizmov. Odkrili so, da humano mleko vsebuje bakterije s probiotičnim delovanjem, ki ščitijo dojenčka, in prebiotike (predstavljajo hrano probiotikom in so neprebavljivi del mleka). Glikani (kompleksni ogljikovi hidrati; glikoproteini, glikolipidi, mucini) preprečujejo adhezijo patogenih bakterij na epitelne celice črevesa. Slika 2 prikazuje princip preprečevanja adhezije. Patogena bakterija ima receptorska mesta, s pomočjo katerih se poveže z fosfolipidnim dvoslojem epitelnih celic (glavna slika 2) in tako povzroči bolezensko stanje okuženega. Glikani v mleku pa so sposobni vezave na receptorska mesta patogene bakterije, jih s tem zapolniti in tako preprečiti adhezijo patogene bakterije na črevesni epitelij (del slike 2 desno zgoraj) (Newburg, 2005).



Slika 2: Preprečevanje adhezije patogenih bakterij (Newburg, 2005)

Odkrili so, da imajo tudi nekatere delno prebavljene sestavine mleka bioaktivno delovanje. Sem spadajo proste maščobne kisline in monogliceridi ter protimikrobni peptidi. Ugotovili so, da imajo oleinska in linolna kislina ter monogliceridi, ki se sproščajo med prebavljanjem mleka v dojenčkovem tankem črevesu, sposobnost uničevanja inkapsuliranih virusov. Za protimikrobno delovanje prostih maščobnih kislin je zelo značilen sinergizem. Ena komponenta sama zase nima tako močnega delovanja, kot ga ima v kombinaciji z drugimi prisotnimi maščobnimi kislinami in peptidi. Protimikrobni peptidi se sproščajo tekom prebave mlečnih beljakovin. Intenzivnost protimikrobnega delovanja je

odvisna od okolja, v katerem se nahajajo, koncentracije in sinergističnih komponent (Newburg, 2005).

Primer beljakovine, ki pod specifičnimi pogoji v dojenčkovem prebavnem sistemu postane biološko aktivna, je α -laktoalbumin. V mlečnih žlezah je le-ta del encimskega kompleksa, ki sintetizira laktozo. Je prevladujoči protein v humanem mleku. V kislem okolju se protein delno razvije, oleinska kislina, ki se sprosti med prebavo mleka, pa to strukturo zadrži. Kompleks so poimenovali HAMLET (human α -lactoalbumin made lethal to tumor cells) in dokazali, da zavira razvoj tumorjev. HAMLET se veže tako z malignimi kot tudi z zdravimi celicami in se transportira v citoplazmo obeh. Vendar se samo v malignih celicah transportira v celično jedro. Tu se poveže s histoni in s tem prepreči povezovanje histonov z DNA. Posledično pride do kondenzacije kromatina in končno apoptoze (Newburg, 2005).

Ena glavnih razlik med dojenčki in zalivančki je v razvoju njihove črevesne mikrobiote. Začetna kolonizacija »sterilnega« črevesa novorojenčka se prične ob porodu, ko pride do kontakta med novorojenčkom in vaginalno mikrobioto. Tako se v novorojenčkovo črevesje naseli raznolika mikrobiota: bifidobakterije, enterobakterije, *Bacteroides*, klostridiji in po Gramu pozitivni koki. Po začetni inokulaciji se mikrobiota hitro spremeni, odvisno od prehrane novorojenčka. Če dobiva le humano mleko, se v enem tednu vzpostavi mikrobiota, kjer prevladujejo bifidobakterije (>60 %). Vzrok temu so verjetno bifidogeni faktorji, prisotni v humanem mleku. V mikrobioti so prisotne še mlečnokislinske bakterije (streptokoki in laktobacili) in vrste *Bacteroides*. Šele po odstavitvi dojenčka se razvije bolj raznolika mikrobiota, podobna odraslim. Pri zalivančkih pa se takoj razvije bolj raznolika mikrobiota: bifidobakterije, *Bacteroides*, enterobakterije, enterokoki, in klostridiji (Harmsen in sod, 2000).

Rochat in sod. (2007) so sestavili mlečni nadomestek (formulo), za katerega so dokazali, da je omogočil razvoj črevesne mikrobiote novorojenca, ki se ni bistveno razlikovala od mikrobiote dojenih otrok. Formula se je od običajnih formul razlikovala v vsebnosti albuminov (70% albuminov in 30% kazeinov), imela je manj proteinov (1,8 g/100kcal), manj fosfatov in laktozo kot vir ogljika. Vsebnost proteinov in razmerje albumini:kazeini so približali humanem mleku. Z zmanjšanjem fosfatov so pridobili puferno kapaciteto, ki je podobna puferni kapaciteti humanega mleka. V črevesni vsebini so produkti fermentacije laktoze ustvarili kislost, ki je ustrezala bifidobakterijam in zavirala rast potencialno patogenih bakterij kot so *Clostridium perfringens* in *Cl. difficile*.

Če dodajamo bifidobakterije v formulo za dojenčka, se te prav tako naselijo v njegov GIT in tam pozitivno vplivajo nanj. Kok in sod. (1996) so našli bifidobakterije v dojenčkovem blatu tretji dan hranjenja s tako formulo.

2.5 MIKROORGANIZMI V HUMANEM MLEKU

Največ mikrobioloških raziskav mleka doječih mater je bilo usmerjenih v ugotavljanje prisotnosti potencialno patogenih bakterij, povezanih s kliničnimi primeri mastitisa. Presenetljivo pa je bilo narejenih manj raziskav mikrobiote mleka zdravih mater, ki vključuje tudi potencialno probiotične bakterije. Če raziskovalcem uspe iz humanega

mleka izolirati mikroorganizem, ki lahko ugodno vpliva na svojega gostitelja, je tak sev dober kandidat za probiotik, saj je humanega izvora, varen, lahko ga uživajo dojenčki, poleg tega pa je prilagojen pogojem in sestavinam mleka.

Martin in sod. (2003) so v svoji študiji raziskovali prisotnost mlečnokislinskih bakterij v humanem mleku zdravih mater. Zanimalo jih je, ali bi lahko vplivale na kvalitativno in kvantitativno sestavo novorojenčkove črevesne mikrobiote. Da bi ugotovili izvor teh bakterij, so vzorce vzeli tudi iz bradavic, kože dojke in vagine. Mlečnokislinske bakterije so izolirali tudi iz blata dojenčkov in z njihovih ustnic, da bi ugotovili, ali ima dojenje vpliv na mikrobo kolonizacijo dojenčkovega prebavnega trakta. Potrdili so, da mlečnokislinske bakterije, ki sestavljajo črevesno mikrobioto dojenčka, izvirajo iz materinega mleka in ne iz vagine in materine kože. MKB, izolirane iz vagine in kože, so namreč imele drugačne profile RAPD (pripadale so drugim sevom), kot MKB izolirane iz mleka, blata in ustnic dojenčka. S tem so dokazali, da način poroda ne vpliva v tolikšni meri na mikrobioto novorojenčka, kot so predvidevali prej. Največkrat izolirani vrsti sta bili *L. gasseri* in *E. faecium*. Ti dve vrsti sta pogosto prisotni v probiotičnih izdelkih.

Ob ugotovitvi, da so bakterije naravno prisotne v humanem mleku, se nam poraja vprašanje, od kod izvirajo. Dokazali so (Martin in sod., 2004):

- da so MKB sposobne adhezije na epitelne črevesne celice,
- da se v mleku finskih mamici pojavljajo iste MKB kot prevladujejo v probiotičnih izdelkih na Finskem,
- da oralno zaužiti probiotiki naselijo tudi vagino, kar pomeni, da imajo mehanizme, s katerimi se širijo v druge dele organizma (sluznice) gostitelja,
- da se *S. typhimurium* pri oboleli mamici pojavi tudi v njenem mleku.

Ob upoštevanju vseh teh dejstev so prišli do teorije, da lahko MKB, prisotne v materinem črevesu, po neki endogeni poti pridejo do mlečnih žlez. MKB, pritrjene na epitelij, lahko preko dendritičnih celic pridejo v limfni sistem in potujejo po telesu. Tako pridejo tudi do mlečnih žlez. Mlečne žleze že pred porodom izločajo manjše količine kolostruma, povečata se limfni in krvni obtok, kar ima za posledico tvorbo biofilma. Če ta teorija drži, to pomeni, da lahko mama z dodajanjem probiotikov svoji prehrani direktno vpliva na razvoj črevesne mikrobiote svojega otroka. Razvoj črevesne mikrobiote je proces, ki vpliva na razvoj črevesja in imunskega sistema novorojenčka (Martin in sod., 2004).

Teorijo so potrdili Jimenez in sod. (2008). Matere, obolele za mastitisom, so dnevno zaužile 10^{10} CFU *Lactobacillus salivarius* CECT5713 in enako količino *Lactobacillus gasseri* CECT5714. Ti dve vrsti s produkcijo vodikovega peroksida zavirata rast stafilokokov, ki povzročajo mastitis. Že po 14 dneh so mastitis ozdravili, medtem ko se materam v kontrolni skupini stanje ni izboljšalo. Prav tako pa so tudi v mleku mater, ki so uživale probiotika, našli oba seva laktobacilov. Tako so dokazali, da z dodajanjem laktobacilov v prehrano doječih mater, ti pridejo tudi v njene mlečne žleze in mleko.

Tudi raziskava Rinne in sod. (2006) posredno potrjuje to teorijo. Doječe mamice so že pred porodom in med dojenjem razvrstili v dve skupini. Prva je dobivala probiotik *Lactobacillus rhamnosus* GG, druga pa placebo. Ugotovili so, da imajo dojenčki mamice, ki so uživale probiotik in samo dojile svoje dojenčke vsaj 3 mesece, več imunoglobulinov

(IgM, IaA in IgG) kot dojenčki mamic, ki so dobivale placebo. S tem so dokazali, da probiotiki v materinem gastrointestinalnem traktu pozitivno vplivajo na njeno mleko in s tem tudi na njenega otroka.

Ocenjujejo, da dojenček, ki popije približno 800 ml materinega mleka, dobi od 1×10^5 do 1×10^7 bakterij. Najbolj pogosto osamljeni mikroorganizmi so stafilokoki, streptokoki, mikrokoki, laktobacili, bifidobakterije in enterokoki. Ker so jih našli v mleku doječih mater v različnih raziskavah, jih lahko smatramo kot naravno mikrobioto humanega mleka. Sestava bakterijske populacije mleka se odraža tudi v mikrobioti blata dojenčka (Martin in sod., 2005).

Vrste bifidobakterij, ki so jih osamili iz humanega mleka, in pogostost pojavljanja, so prikazane v preglednici 3.

Preglednica 3: Bifidobakterije izolirane iz humanega mleka in njihovo pojavljanje (Gueimonde, 2007)

| bifidobakterije | % |
|------------------------|-----|
| <i>B. longum</i> | 100 |
| <i>B. animalis</i> | 74 |
| <i>B. bifidum</i> | 46 |
| <i>B. catenulatum</i> | 33 |
| <i>B. breve</i> | 6 |
| <i>B. adolescentis</i> | 6 |

2.6 BIFIDOGENI DEJAVNIKI HUMANEGA MLEKA

Pri iskanju razlogov za različno mikrobno sestavo blata dojenčkov in zalivančkov so se raziskovalci osredotočili na razlike v sestavi humanega in kravjega mleka.

Ugotovili so, da humano mleko vsebuje več laktoze, ima manjšo puferno kapaciteto ter manj proteinov in fosfatov kot kravje mleko. Zaradi manjše puferne kapacitete mlečna in očetna kislina, ki jo sintetizirajo bifidobakterije, znižata vrednost pH črevesne vsebine do vrednosti 5. S tem je onemogočena rast patogenih mikroorganizmov in mnogih mikroorganizmov, ki se nahajajo v fecesu zalivančkov in odraslih. Odkrili so tudi tako imenovane bifidogene dejavnike humanega mleka, ki stimulirajo rast bifidobakterij. To so N-acetilglukozamini, ki so potrebni za sintezo celične stene bifidobakterij, κ -kazein in peptidi, ki vsebujejo cistein. Vendar v zadnjem času ugotavljajo, da te komponente ne pridejo do debelega črevesa, kjer se nahajajo bifidobakterije, saj se že v tankem črevesu prebavijo. Tudi laktoferin uvrščajo med bifidogene faktorje, saj predstavlja vir železa, ki ga bifidobakterije potrebujejo za rast. Humano mleko vsebuje tudi prebiotike. To so sladkorji, ki jih človek ni sposoben prebaviti, probiotične bakterije pa jih lahko izkoriščajo kot vir ogljika. Sem spadajo laktuloza, različni fruktooligosaharidi in polisaharidi (Bezkorovainy, 2001).

2.7 BLATO DOJENČKA

Epitelne črevesne celice so največje področje prehajanja tujih snovi in mikroorganizmov v organizem. Zato so se razvili različni zaščitni mehanizmi, ki vključujejo fizikalne, kemične in biološke prepreke. Le-te predstavljajo epitelij, imunski sistem in gastrointestinalna mikrobiota. Mikrobiota gastrointestinalnega trakta je sestavljena iz kompleksnega in raznolikega ekosistema. Vsebuje do 1×10^{14} bakterij. Delovanje črevesnih bakterij je odvisno od različnih dejavnikov: prisotnosti hranil, redoks potenciala, vrednosti pH in njihove naseljenosti v gastrointestinalnem traktu. Normalna mikrobiota predstavlja prvo obrambo pred patogenimi mikroorganizmi. Zaščitno delujejo z ustvarjanjem fiziološko neugodnega okolja, produkcijo protimikrobnih snovi, tekmovanjem za iste substrate in adhezijo na črevesno sluznico. Tudi interakcije med mikrobioto, epitelnimi celicami in imunskim sistemom izboljšajo obrambo pred patogenimi bakterijami. Razvoj GIT in imunskega sistema je dinamičen proces, ki se prične v novorojenčku, zato so le-ti rizična skupina za infekcije. Zaščitne snovi dobijo iz materinega mleka, saj so že večkrat dokazali, da se infekcije pri nedojenih otrocih pojavljajo pogosteje. Zaščitne snovi humanega mleka so imunoglobulini, laktoferin in oligosaharidi. Mleko vsebuje tudi različne vrste laktobacilov, laktokokov in druge MKB s probiotičnim potencialom (Olivares in sod. 2006).

Izvor laktobacilov in bifidobakterij, ki kolonizirajo novorojenčkovo črevesje, predstavlja veliko uganko. V preteklosti je veljalo, da se je novorojenček okužil z njimi med porodom (vaginalnim). Zadnje molekularne študije pa kažejo, da kolonizacija ni odvisna od načina poroda (vaginalo ali s carskim rezom) in da materino mleko prispeva bakterije novorojenčkovi črevesni mikrobioti. Razvoj črevesne mikrobiote je odvisen od novorojenčkove prehrane v prvih dneh njegovega življenja. Zato novorojenčki, ki dobivajo le materino mleko, razvijejo mikrobioto, v kateri prevladujejo bifidobakterije, in imajo posledično manj enterobakterij. Sestava črevesne mikrobiote je specifična za par mati – dojenček. Materino mleko vsebuje majhno število različnih sevov laktobacilov, zato imajo dojenčki majhno število različnih sevov: v prvih šestih mesecih 26 % testiranih dojenčkov v svojem fecesu ni imelo laktobacilov, 37 % en sev, 26 % dva seva in 11 % tri ali več različnih sevov (Martin in sod., 2006).

Naše sedanje znanje o mikrobioti GIT temelji predvsem na kultivacijskih tehnikah. Vendar ocenjujejo, da do 85 % mikrobne populacije GIT nismo zmožni kultivirati. Posledično naša predstava o črevesni mikrobioti temelji na mikroorganizmih, ki jih lahko kultiviramo. Zato se za raziskovanje črevesne mikrobiote vedno bolj uporabljajo molekularne metode, pri katerih pomnožujemo različne dele genoma, največkrat 16S rDNA (Satokari in sod. 2000).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 NAČRT POSKUSA

Z vzorčenjem materinega mleka in dojenčkovega blata smo pričeli 25 dni po porodu. Vzorčili smo vsakih 14 dni, v obdobju 7 mesecev. Vzorce mleka in razredčenega blata smo nacepili na 3 različna gojišča:

- Gojišče za bifidobakterije (NPNL)
- Gojišče za laktobacile (LAMVAB)
- Gojišče za *L. acidophilus* (MRS + cly)

Gojišča smo anaerobno inkubirali pri 37 °C 48 ur. Prešteli smo kolonije, jih nato nekaj iz vsake plošče resuspendirali v bujonu MRS z glicerolom in zamrznili.

Zamrznjene vzorce smo revitalizirali na ustreznih gojiščih. S fazno-kontrastnim mikroskopom smo določili obliko celic. Osamljene kolonije iz vsakega gojišča smo precepili na novo gojišče in ponovno anaerobno inkubirali (37 °C, 48 ur). S tem smo pridobili čisto kulturo.

Rod posameznih izolatov smo potrdili z metodo PCR. S PCR smo pregledovali neposredno posamezne kolonije, ali pa celice iz čiste kulture, obdelane s toploto in detergentom tritonom, oziroma s komercialnim kitom za osamitev DNA.

Z metodo RAPD smo ugotavljali, ali osamljene bifidobakterije pripadajo različnim sevom. Rezultati ugotovljenih zaporedij oligonukleotidov s PCR pomnoženih delov 16 S rDNA, ki so jih določili v laboratoriju Microsynth v Balgachu, (Švica) pa so omogočili identifikacijo sevov na nivoju vrste.

3.2 MATERIALI

3.2.1 Vzorci

V obdobju 7-ih mesecev smo pridobili 17 vzorcev mleka in 14 vzorcev blata. Takoj po odvzemu smo vzorce zaprli v neprodušne vrečke z anaerobno atmosfero (GenBag, Bio-Merieux, Francija).

3.2.2 Gojišča

3.2.2.1 Bujon MRS

Pripravili smo ga po navodilih proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija), ter ga avtoklavirali 15 min pri 115 °C.

3.2.2.2 Gojišče za zamrzovanje

Bujon MRS (Merck, Darmstadt, Nemčija) smo avtoklavirali 15 min, pri 115 °C, ohlajenemu smo dodali 0,05 % cistein HCl (Merck, Darmstadt, Nemčija) in 25 % steriliziranega glicerola (Merck), ki deluje kot krioprotektant.

3.2.2.3 Gojišče za bifidobaterije (NPNL)

Bujonu MRS, ki smo ga pripravili po navodilih proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija), smo s koncentrirano NaOH uravnali pH na vrednost 7,2. Dodali smo 15 g/l agar-agarja (Merck, Darmstadt, Nemčija) in avtoklavirali 15 min pri 115 °C. Med avtoklaviranjem se je vrednost pH znižala na 6,9. Ohlajenemu (45 °C) gojišču smo pred razlivanjem na plošče dodali reducent cistein hidroklorid (Merck, Darmstadt, Nemčija) v koncentraciji 0,05 % (10 ml 5 % založne raztopine/l gojišča) in mešanico antibiotikov NPNL (50 ml založne raztopine /l gojišča).

3.2.2.4 Gojišče za skupino *Lb. acidophilus* (MRS + cly)

Bujonu MRS, ki smo ga pripravili po navodilih proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija), smo s koncentrirano NaOH uravnali pH na vrednost 6,8. Dodali smo 15 g/l agar-agarja (Merck, Darmstadt, Nemčija) in avtoklavirali 15 min pri 115 °C. Med avtoklaviranjem se je vrednost pH znižala na 6,2. Ohlajenemu (45 °C) gojišču smo pred razlivanjem na plošče dodali antibiotik klindamicin (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Nemčija) v koncentraciji 0,1 µg/ml.

3.2.2.5 Gojišče za laktobacile (LAMVAB)

Bujonu MRS (Merck) smo dodali 0,5 g/l cistein hidroklorida (Merck, Darmstadt, Nemčija) in 0,05 g/l barvila bromkrezol zeleno. Bujonu smo nato uravnali pH na vrednost 5,0 s 4 M HCl. Pred avtoklaviranjem (15 min, 115 °C) smo dodali še agar-agar (15 g/l) (Merck, Darmstadt, Nemčija). Ohlajenemu gojišču (45 °C) smo pred razlivanjem plošč dodali še 10 ml/l založne raztopine vankomicina (2 mg/ml v vodi) (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Nemčija). Vankomicin je antibiotik, ki zavira rast večine po Gramu pozitivnih bakterij, ne pa večine laktobacilov (Hartemink in sod., 1997).

3.2.2.6 Peptonska voda

Po navodilih proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija) smo pripravili ¼ Ringerjevo raztopino ter dodali 1 g/l peptona (Trypton, Merck, Darmstadt, Nemčija). Raztopino smo razdelili po 9 ml v epruvete in avtoklavirali. Raztopino smo uporabljali za razredčevanje po Kochu.

3.2.3 Kemikalije

3.2.3.1 NPNL

Za pripravo 100 ml NPNL smo potrebovali:

- 6,000 g LiCl
- 0,030 g naldiksične kisline
- 0,200 g neomicin sulfata
- 0,250 g paromomicin sulfata

Reagente smo suspendirali v 100 mL destilirane vode. Vrednost pH smo uravnali na 7,2-7,5 z NaOH. Rastopino smo sterilizirali s filtracijo skozi 0,45 µm pore. Antibiotik smo zamrzili na -18 °C in ga pri tej temperaturi tudi hranili.

3.2.3.2 PCR

- 10 mM dNTP (Promega, Madison, WI, ZDA)
- 5x zeleni GoTaq Flexi pufer za polimerazo brez MgCl₂ (Promega, Madison, WI, ZDA)
- 25 mM MgCl₂ (Promega, Madison, WI, ZDA)
- GoTaq DNA Polimeraza (Promega, Madison, WI, ZDA)
- Začetni oligonukleotidi: (Invitrogen life technologies, Paisley, Velika Britanija)
 - za bifidobakterije:
 - Bif 164f (5'-GGGTGGTAATGCCGGATG-3')
 - Bif 662r (5'-CCACCGTTACACCGGAA-3') (Kok in sod., 1996)
 - za laktobacile:
 - LbLMA 1 rev (5'-CTCAAACTAAACAAAGTTTC-3')
 - R16-1 (5'-CTTGACACACCGCCCGTCA-3') (Coeuret in sod., 2004)
 - za RAPD:
 - KGT-70-GC (lastni: 5'-CGC GTG CCC A -3')
 - M13 (Coeuret in sod., 2003)
 - za pripravo DNA za sekvenciranje:
 - P1(5'-TGCTCTGCCC-3')
 - P4(5'-CTGCTGGGAC-3') (Coeuret in sod., 2004)
- Pozitivna kontrola za bifidobakterije: *B. infantis* FAM 14392, iz zbirke Agroscope Liebefeld-Posieux, Bern, Švica
- Pozitivna kontrola za laktobacile *L. gasseri* DSMZ 20243, tipski sev iz zbirke Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Nemčija.

3.2.3.3 Elektroforeza in barvanje

- Puffer TAE, sestavljen iz 0,04 M Tris-acetata in 0,001 M EDTA (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Nemčija)
- Barvilo Sybr Safe DNA gel Stain (Invitrogen, ZDA)
- Agaroz (Sigma Chemical, St. Louis, ZDA)
- Molekularni označevalec velikosti 100 bp (100 bp DNA Ladder, Fermentas, Litva)
- Molekularni označevalec velikosti 1000 bp (1000 bp DNA Ladder, Fermentas, Litva)

3.2.3.4 Liza celic

- 1 % triton X-100 (Sigma Chemical, St. Louis, ZDA)
- ¼ Ringerjeva raztopina (Merck, Darmstadt, Nemčija)

3.2.3.5 Izolacija DNA

- komercialni set za izolacijo genomske DNA – Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, ZDA)
- izopropanol (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- 70 % etanol (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- 50 mM EDTA (Sigma Chemical, St. Louis, ZDA)
- 10 mg/ml lizocim (Sigma Chemical, St. Louis, ZDA)

3.2.3.6 Čiščenje PCR pomnožkov

Uporabili smo komercialni set za izolacijo pomnožkov PCR Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, ZDA).

3.3 METODE

3.3.1 Vzorci

Vzorcev mleka zaradi pričakovane nizke koncentracije bakterij nismo razredčevali, ampak smo po 0,1 ml mleka razmazali na gojišča NPNL, LAMVAB in MRS + cly. Vzorce blata smo razredčili po Kochu in nacepili na ustrezna gojišča (NPNL, LAMVAB in MRS + cly). Nacepljene plošče smo inkubirali 48 ur pri 37 °C. S štetjem kolonij smo ugotovili število kolonijskih enot posameznih bakterijskih skupin v mleku in blatu.

Posamezne kolonije smo prenesli v gojišče za zamrzovanje. Tako pripravljene vzorce smo hranili pri -80 °C. Zamrznili smo tudi vzorce mleka in blata.

3.3.2 Kultivacija bakterij

3.3.2.1 Zamrznjeni izolati/kolonije

Zamrznjene vzorce smo z ezo nacepili na ustrezno gojišče. Gojišča smo anaerobno (GENbox, BioMerieux sa, Marcy-l'Etoile, Francija) kultivirali na 37 °C 48 ur.

3.3.2.2 Zamrznjeno mleko in blato

Po odmrzovanju smo 1 ml vzorca mleka cepili v petrijeve plošče in prelili z gojiščem NP NL. Inkubirali smo anaerobno 37 °C, 48 ur.

Zamrznjene vzorce blata smo razredčili po Kochu do 10⁻⁶ in 10⁻⁷ v peptonski vodi. Na plošče NP NL smo naredili razmaz 100 µl. Inkubirali smo anaerobno pri 37 °C, 48 ur.

Mleko in blato smo cepili le pri tistih vzorčenjih, kjer iz zamrznjenih izolatov nismo uspeli izolirati bifidobakterij.

3.3.2.3 Zamrzovanje čistih bakterijskih kultur

V mikroepruvete smo aseptično odpipetirali 1,5 ml MRS bujona s cisteinom. V gojišča smo nato prenesli po eno kolonijo. Inkubirali smo na 37 °C 24 ur. Nato smo mikroepruvete centrifugirali (3500 g, 3 min). Gojišče smo aseptično odlili, usedlini bakterijskih celic v mikroepruvetah pa smo dodali 300 µl gojišča za zamrzovanje. Mikroepruvete smo zaprli, premešali, da so se celice resuspendirale, in zamrznili na -20 °C.

3.3.3 Identifikacija bakterij

3.3.3.1 Mikroskopiranje

Kolonije, ki so zrastle na gojiščih NP NL, MRS + cly in LAMVAB, smo barvali po Gramu s kompletom Bio-Merieux (Marcy-l'Etoile, Francija). Postopek je opisan v preglednici 4.

Preglednica 4: Postopek barvanja po Gramu

| | t (min) |
|-------------------------------|---------|
| Nanos barvila kristal violet | 1 |
| Spiranje z vodo | |
| Nanos barvila lugol | 1 |
| Spiranje z vodo | |
| Nanos raztopine aceton-etanol | 1 |
| Spiranje z vodo | |
| Nanos barvila safranin | 1 |
| Spiranje z vodo | |
| Sušenje, utrjevanje | |

Pobarvane preparate smo mikroskopirali s svetlobnim mikroskopom.

Za hitrejše ugotavljanje morfologije bakterij smo uporabljali tudi fazno-kontrastni mikroskop. Tako smo lahko prepoznali kokoidne bakterijske celice in take vzorce izločili iz nadaljnjih analiz.

3.3.3.2 PCR na kolonijah

Princip reakcije PCR je *in vitro* pomnoževanje dela tarčne DNA z DNA-polimerazo v cikličnem termostatu. Termostabilna DNA-polimeraza je encim, ki so ga osamili iz termofilnih bakterij *Thermus aquaticus*. Encim ima optimalno temperaturo 72 °C in ohranja svojo aktivnost tudi, če je krajši čas izpostavljen višjim temperaturam, ki so potrebne za denaturacijo dvoverižne DNA. Poseben termostat zagotavlja zvezno spreminjanje temperature v ciklu, ki zajema tri faze:

- Denaturacija/razdvajanje dvoverižne DNA
- Prileganje začetnih oligonukleotidov
- Podaljševanje verig

V vsakem ciklu se število tarčnih kopij podvoji. S 25 do 35 ponovitvami cikla se koncentracija pomnoženega dela DNA eksponentno pomnoži tudi do 10⁹ kopij (Jeršek, 2003).

PCR na kolonijah se od običajne PCR razlikuje pri pripravi DNA. Pri tej metodi smo namreč v reakcijsko mešanico prenesli kolonijo iz gojišča. Delali smo aseptično. V prvem ciklu v termostatu je potekla liza celic, da se je sprostila DNA. Naslednji cikli se niso razlikovali od običajne PCR. Protokol PCR je prikazan v preglednici 5.

Preglednica 5: Protokol PCR na kolonijah

| Tarčna bakterija | Reakcija | Parametri | št. ciklov |
|------------------|---------------|---------------|------------|
| Laktobacili | Liza celic | 10 min, 99 °C | 1 |
| | Denaturacija | 45 s, 95 °C | 30 |
| | Prileganje | 30 s, 55 °C | |
| | Podaljševanje | 30 s, 72 °C | |
| | Zaključek | 10 min, 72 °C | 1 |
| Bifidobakterije | Liza celic | 10 min, 99 °C | 1 |
| | Denaturacija | 45 s, 95 °C | 35 |
| | Prileganje | 30 s, 62 °C | |
| | Podaljševanje | 45 s, 68 °C | |
| | Zaključek | 20 s, 62 °C | 1 |
| 7 min, 68 °C | | | |

Sestava reakcijske mešanice je prikazana v preglednici 6.

Preglednica 6: Sestava 30 µl reakcijske mešanice za PCR na kolonijah

| Reagent | V (µl) |
|------------------------------|--------|
| dNTP (10 mM) | 2,5 |
| 5x koncentriran Go-Taq pufer | 6 |
| MgCl ₂ (25 mM) | 3 |
| z. o. 1 (100 µM) | 1 |
| z. o. 2 (100 µM) | 1 |
| GoTaq polimeraza (5 U/µl) | 0,15 |
| H ₂ O | 16,35 |

Pomnožke PCR smo dokazali z gelsko elektroforezo (poglavje 3.3.3.7) v 2 % agaroznem gelu.

3.3.3.3 Liza celic s tritonom

- Celično kulturo smo centrifugirali (10 min, 3500 g) in previdno odlili supernatant
- Dodali smo 1 ml fiziološke raztopine in razbili pelet
- Ponovno smo centrifugirali (10 min, 3500 g) in odpipetirali supernatant
- Dodali smo 1 ml 1 % tritona, razbili smo usedlino
- 5 min smo segrevali v vodni kopeli (100 °C), nato smo vsebino premešali
- Ohladili smo na ledu, premešali in shranili v zamrzovalnik pri -20 °C

3.3.3.4 PCR

Verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction, PCR) je poleg različnih hibridizacijskih tehnik in novejših tehnologij DNA-čipov ena od molekularnih metod, ki se uporablja tudi za ugotavljanje mikroorganizmov v živilih in drugih vzorcih.

Stopnje, ki so vključene v preiskavo vzorca s PCR:

- Priprava DNA
- Priprava in izvedba PCR
- Ugotavljanje pomnožkov (Jeršek, 2003)

Najprej smo preskusili DNA, pripravljeno z lizo celic s tritonom (poglavje 3.3.3.3). Po daljšem hranjenju tako pripravljene DNA nismo več dobili pomnožkov pri verižnem pomnoževanju s polimerazo. Ker smo s kontrolno DNA iz tipskih bakterijskih sevov pomnožke dobili, smo sklepali, da se je DNA razgradila, verjetno zaradi prisotnosti encimov v lizatu bakterij. Zato smo se odločili, da DNA, ki smo jo uporabili za analize PCR, iz celic osamimo z drugim postopkom (poglavje 3.3.3.5).

Sestava reakcijske mešanice je prikazana v preglednici 7.

Preglednica 7: Sestava 30 μ l reakcijske mešanice za PCR z očiščeno DNA

| Reagent | V (μ l) |
|---------------------------------|--------------|
| dNTP (10 mM) | 2,5 |
| 5x koncentriran Go-Taq pufer | 6 |
| MgCl ₂ (25 mM) | 3 |
| z. o. 1 (100 μ M) | 1 |
| z. o. 2 (100 μ M) | 1 |
| GoTaq polimeraza (5 U/ μ l) | 0,3 |
| H ₂ O | 14,2 |
| DNA | 2 |

Izvedba PCR je prikazana v preglednici 8.

Preglednica 8: Protokol PCR

| Tarčna bakterija | Reakcija | Parametri | št. ciklov |
|------------------|---------------|---------------|------------|
| Laktobacili | Začetek | 5 min, 95 °C | 1 |
| | Denaturacija | 45 s, 95 °C | 35 |
| | Prileganje | 30 s, 55 °C | |
| | Podaljševanje | 45 s, 72 °C | |
| | Zaključek | 10 min, 72 °C | 1 |
| Bifidobakterije | Začetek | 5 min, 94 °C | 1 |
| | Denaturacija | 30 s, 95 °C | 35 |
| | Prileganje | 20 s, 62 °C | |
| | Podaljševanje | 40 s, 68 °C | |
| | Zaključek | 20 s, 62 °C | 1 |
| 7 min, 68 °C | | | |

Pomnožke PCR smo dokazali z elektroforezo (poglavje 3.3.3.7) v 2 % agaroznem gelu.

3.3.3.5 Izolacija DNA

- Za izolacijo DNA smo uporabili 24 urno kulturo, ki smo jo namnožili v 1,3 ml MRS bujona s cisteinom pri 37 °C v mikroprugetah.
- Kulturo smo centrifugirali (13000 g, 2 min), odlili supernatant, usedlini smo dodali 1 ml fiziološke raztopine in vsebino premešali.
- Ponovno smo centrifugirali (13000 g, 2 min) in odlili supernatant
- Lizocim smo raztopili v 50 mM EDTA (10 mg lizocima/ml EDTA). V mikroprugete smo odpipetirali 600 μ l te raztopine in 6 μ l mutanolizina (2500 U/ml). Z mešanjem smo razbili usedlino.
- Mikroprugete smo prenesli v kopel (1 h, 37 °C).
- Zopet smo centrifugirali (14000 g, 2 min) in odstranili supernatant.
- Usedlini smo dodali 600 μ l Nuclei Lysis Solution in jo s pipeto pri tem razbili.
- Mikroprugete smo prenesli v kopel (80 °C, 5 min), nato smo jih ohladili na ledu na sobno temperaturo.
- Dodali smo 3 μ l RNA-se Solution, premešali smo le z obračanjem mikropruget.
- Mikroprugete smo dali na 37 °C za 1 uro, nato pa na led za 30 min.
- Dodali smo 200 μ l Protein Precipitation Solution, 20 s močno mešali, nato smo 5 min hladili na ledu.

- Centrifugirali smo 3 min pri 14000 g.
- V nove mikroeprovete smo odpipetirali 600 μ l isopropanola, mu dodali supernatant in premešali z obračanjem mikroeprevet.
- Ponovno smo centrifugirali (14000 g, 2 min) in poskusili čim bolj odstraniti supernatant.
- Usedlini smo dodali 600 μ l 70 % etanola, mešali smo z obračanjem mikroeprevet.
- Še zadnjič smo centrifugirali (14000 g, 2 min), odstranili etanol in posušili mikroeprovete v inkubatorju.
- Dodali smo 50 μ l destilirane in sterilizirane vode ter pustili čez noč v hladilniku.
- Izolirano DNA smo hranili pri -20 °C.

3.3.3.6 RAPD

Metoda RAPD temelji na pomnoževanju večjega števila različnih zaporedij nukleotidov na tarčni DNA z nespecifičnimi (naključno izbranimi) začetnimi oligonukleotidi. Edini pogoj je, da se začetni oligonukleotid veže na tarčni verigi DNA na nasproti si orientirani mesti prileganja, ki sta si dovolj blizu (ca 2000 bp). V literaturi so našteje uporabe naključno izbranih začetnih oligonukleotidov dolžine od 5 pa do 24 nukleotidov, najpogostejša pa je uporaba desetmernih enot. Uporablja se lahko en sam ali več naključno izbranih začetnih oligonukleotidov hkrati (Caetano-Anolles in sod., 1993). Avtorji omenjajo, da so profili RAPD ponovljivi, če so pogoji PCR pomnoževanja natančno kontrolirani, kemikalije, potrebne za PCR pomnoževanje, pa vedno dobavljene od istega proizvajalca (Gerritsen in sod., 1995).

V literaturi se za opisano metodo pojavljajo različni izrazi: tako analiza RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA ali Randomly Amplified Polymorphic DNA), AP-PCR (Arbitrarily Primed) ali DAF (DNA Amplified Fingerprinting) (Vandamme in sod., 1996). Čeprav nekateri razlikujejo omenjene postopke glede na dolžino uporabljenega začetnega oligonukleotida, načina ločitve in vizualizacije pomnoženih segmentov, ostaja princip analize pri vseh metodah enak.

Za analizo RAPD pri bifidobakterijah smo uporabili reakcijsko mešanico, prikazano v preglednici 9. Reakcija je potekala pri pogojih, opisanih v preglednici 10.

Preglednica 9: Sestava 25 μ l reakcijske mešanice za analizo RAPD

| Reagent | V (μ l) |
|---------------------------------|--------------|
| dNTP (10 mM) | 0,5 |
| 5x koncentriran Go-Taq pufer | 5 |
| MgCl ₂ (25 mM) | 4 |
| z. o. 1 (100 μ M) | 0,1 |
| z. o. 2 (100 μ M) | 0,125 |
| GoTaq polimeraza (5 U/ μ l) | 13,275 |
| H ₂ O | 2 |

Preglednica 10: Protokol analize RAPD

| Reakcija | Parametri | št. ciklov |
|---------------|--------------|------------|
| Začetek | 2 min, 95 °C | 1 |
| Denaturacija | 1 min, 95 °C | 35 |
| Prileganje | 2 min, 37 °C | |
| Podaljševanje | 2 min, 72 °C | |
| Zaključek | 5 min, 72 °C | 1 |

Pomnožke RAPD smo dokazali z elektroforezo (poglavje 3.3.3.7) v 1,8 % agaroznem gelu.

3.3.3.7 Gelska elektroforeza

Agarozni gel smo pripravili iz agaroze in pufru TAE. Raztopino smo segrevali v mikrovalovni pečici tako dolgo, da je postala bistra. Nato smo jo ohladili in vlili v modelček z glavnikom. Ko se je gel strdil, smo ga prenesli v posodo za elektroforezo s pufrom TAE. Pri tem smo pazili, da je pufer popolnoma prekril gel. Odstranili smo glavnik in v nastale luknjice nanесли po 10 µl pomnožkov PCR. V prvo luknjico smo nanесли 2,5 µl molekularnega označevalca (100 bp za pomnožke PCR in 1000 bp za pomnožke RAPD), v zadnjo pa pozitivno kontrolo. Elektroforeza je potekala pri 90 V 1 uro.

Po končani elektroforezi smo gel 30 min barvali v raztopini Sybr Safe (10 µl barvila/100 ml pufru) in ga pregledali v UV transiluminatorju pri 254 nm.

3.3.3.8 Izolacija pomnožkov PCR za ugotavljanje zaporedja nukleotidov

Vzorci DNA smo pomnoževali s PCR z začetnimi oligonukleotidi (z.o.) P1 in P4 po protokolu, opisanem v preglednici 11.

Preglednica 11: Protokol PCR za ugotavljanje zaporedja nukleotidov

| Reakcija | Parametri | št. ciklov |
|---------------|---------------|------------|
| Začetek | 5 min, 95 °C | 1 |
| Denaturacija | 1 min, 93 °C | 30 |
| Prileganje | 30 s, 52 °C | |
| Podaljševanje | 30 s, 72 °C | |
| Zaključek | 10 min, 72 °C | 1 |

Za elektroforezo smo pripravili 0,9 % agarozni gel. V luknjice smo nanесли 100 µl pomnožka PCR. Po končani elektroforezi smo gel barvali 45 minut.

- Pod UV svetlobo smo s skalpelom iz gela izrezali pomnožke PCR, jih prenesli v mikroepuvete in jim dodali Membrane binding solution (1 µl/ mg izrezane agaroze).
- Mikroepuvete smo prenesli v kopel (64 °C), da se je agarozna raztopila, raztopino smo premešali in nato centrifugirali, da ni bilo več kapljic na stenah mikroepuvet.
- Vsebinsko smo prenesli na mikrokolone, pustili na sobni temperaturi 1 min, nato smo centrifugirali (14000 rpm, 1 min).
- Tekočino v zbiralni epici smo odlili, dodali 700 µl Membrane Wash Solution in centrifugirali (14000 rpm, 5 min).
- Zopet smo odlili tekočino, dodali 500 µl Membrane Wash Solution in centrifugirali (14000 rpm, 5 min).

- Odlili smo tekočino in ponovno centrifugirali, da smo odstranili ves etanol.
- Mikrokolono smo prenesli v novo 1,5 ml mikroepruveto. Dodali smo 40 μ l Nuclease Free Water na sredino mikrokolone in pri tem pazili, da se nismo dotaknili membrane. Mikroepruveto smo pustili na sobni temperaturi 1 min.
- Zadnjič smo centrifugirali (2 min, 14000 rpm), odstranili smo mikrokolono in shranili tekočino z eluiranimi pomnožki PCR v mikroepruveti pri -20 °C.

Zaporedje nukleotidov so določili v laboratoriju Microsynth v Balgachu (Švica).

Zaporedja nukleotidov smo primerjali z zaporedji, shranjenimi v genski banki NCBI (National Center for Biotechnology Informations, Rockville Pike, Bethesda, ZDA) s pomočjo programa BLAST (Basic Local Aligment Search Tool), ki je dostopen na medmrežju (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

4 REZULTATI

4.1 ŠTEVILO PREISKOVANIH BAKTERIJ V HUMANEM MLEKU IN BLATU DOJENČKA

V preglednici 12 so prikazane koncentracije bifidobakterij (NPNL), laktobacilov brez vrst iz skupine *L. acidophilus*, ki ne zrastejo v prisotnosti vankomicina (LAMVAB) in koncentracije vrst iz skupine *L. acidophilus* (MRS + cly) v materinem mleku in dojenčkovem blatu ob različnih časih vzorčenja. V mleku smo na gojišču NPNL ugotovili od 0 do $1,4 \times 10^3$ ke/ml in v blatu od $3,2 \times 10^9$ do $5,4 \times 10^{10}$ ke/g. Na gojišču MRS + cly smo v mleku določili od 0 do $1,5 \times 10^3$ ke/ml in v blatu od 0 do $4,1 \times 10^{10}$ ke/g. Na gojišču LAMVAB smo v mleku določili od 0 do $1,5 \times 10^3$ ke/ml in v blatu od 0 do $1,03 \times 10^8$ ke/g.

Preglednica 12: Število preiskovanih bakterij v mleku in blatu pri vseh vzorčenjih

| Datum vzorčenja | Starost novorojenčka (dni) | Mleko | | | Blato | | |
|-----------------|----------------------------|------------------|-------------------|------------------|-----------------------|--------------------------------------|--------------------|
| | | NPNL (ke/ml) | MRS + cly (ke/ml) | LAMVAB (ke/ml) | NPNL (ke/g) | MRS cly (ke/g) | LAMVAB (ke/g) |
| 12.06.2006 | 25 dni | 100 | 70 | <100 | 8×10^9 | $1,2 \times 10^{10}$ | 0 |
| 19.06.2006 | 32 dni | 1210 | 10 | 1520 | $3,8 \times 10^{10}$ | 1×10^7 | n.p.(razmazano) |
| 26.06.2006 | 39 dni | 20 | 10 | 0 | $8,4 \times 10^9$ | 6×10^7 | 0 |
| 03.07.2006 | 46 dni | neštevno drobnih | neštevno drobnih | neštevno drobnih | $1,56 \times 10^{10}$ | $1,04 \times 10^8$ | 500 |
| 10.07.2006 | 53 dni | 70 | 0 | 0 | $5,4 \times 10^{10}$ | $2,2 \times 10^8$ | 0 |
| 17.07.2006 | 60 dni | 130 | 270 | 0 | $3,2 \times 10^9$ | $5,36 \times 10^8$ | 0 |
| 31.07.2006 | 74 dni | 1430 | prosojne 1500 | 0 | $2,9 \times 10^{10}$ | prosojne+debele $4,1 \times 10^{10}$ | 0 |
| 16.08.2006 | 90 dni | 0 | 0 | 0 | $8,1 \times 10^{10}$ | 5×10^8 | $6,2 \times 10^3$ |
| 28.08.2006 | 102 dni | 0 | 0 | 0 | $2,06 \times 10^{10}$ | $2,2 \times 10^{10}$ | neštevno (-7) |
| 12.09.2006 | 117 dni | 20 | 50 | 0 | $8,3 \times 10^9$ | n.p. | $1, \times 10^3$ |
| 25.09.2006 | 130 dni | 10 | 10 | 0 | $4,9 \times 10^9$ | 2×10^8 | neštevno (-2) |
| 12.10.2006 | 147 dni | 620 | 140 | 0 | $3,4 \times 10^{10}$ | $1,5 \times 10^8$ | neštevno (-4) |
| 23.10.2006 | 158 dni | 20 | 0 | 0 | $1,8 \times 10^{10}$ | $2,6 \times 10^8$ | $2,2 \times 10^7$ |
| 06.11.2006 | 172 dni | 850 | 0 | 0 | $4,6 \times 10^{10}$ | $6,5 \times 10^7$ | $1,03 \times 10^8$ |
| 06.12.2007 | 202 dni | 0 | 0 | 0 | n.p. | n.p. | n.p. |
| 18.12.2007 | 214 dni | 230 | 190 | 0 | n.p. | n.p. | n.p. |
| 03.01.2007 | 230 dni | 50 | 130 | 0 | n.p. | n.p. | n.p. |

Legenda: n.p. – ni podatka

Iz plošč, pridobljenih ob različnih časih vzorčenja, smo pobrali in zamrznili 240 kolonij (84 izoliranih iz mleka in 156 iz blata).

4.2 IZGLED KOLONIJ IN MORFOLOGIJA BAKTERIJ

4.2.1 Izgled kolonij

Kolonije na gojišču NPNL so bile bele barve, velike do 2 mm. Primer gojišča s kolonijami čiste kulture izolata bifidobakterij je na sliki 3.



Slika 3: Kolonije bifidobakterij na gojišču NPNL

Kolonije na gojišču MRS + cly so bile bele barve, velike do 2 mm. Na sliki 4 je mešana kultura kokov (manjše kolonije) in laktobacilov.



Slika 4: Kolonije mešane kulture kokov in laktobacilov na gojišču MRS + cly

Kolonije na gojišču LAMVAB so bile svetlo zelene barve, velike do 3 mm. Primer gojišča s kolonijami čiste kulture izolata laktobacilov je na sliki 5.

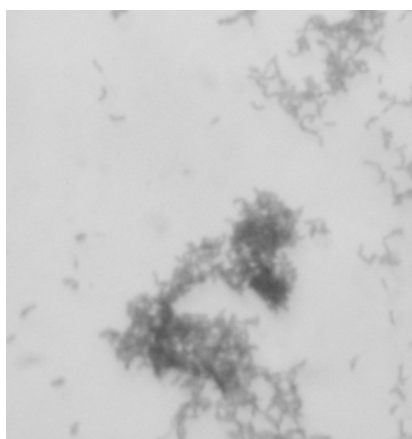


Slika 5: Kolonije laktobacilov na gojišču LAMVAB

4.2.2 Morfologija bakterij

- Bifidobakterije

Bifidobakterije spadajo v skupino po Gramu pozitivnih bakterij. Po obliki so palčke, na koncih odebeljene, nekatere imajo obliko črke V ali Y. Primer bifidobakterij, barvanih po Gramu in fotografiranih pod svetlobnim mikroskopom, je na sliki 6.



Slika 6: Mikroskopski preparat po Gramu barvanih bifidobakterij

- Laktobacili

Laktobacili spadajo v skupino po Gramu pozitivnih bakterij. Po obliki so palčke.

S fazno-kontrastnim mikroskopom smo pregledali celice vseh 240 izbranih in osamljenih kolonij, ki so zrastle na različnih gojiščih. Vse vzorce kolonij, kjer smo namesto paličastih bakterij opazili koke, smo izločili iz nadaljnje raziskave (60), prav tako pa smo izločili tudi vse vzorce, pri katerih po ponovnem nacepljanju na gojišča nismo dobili rasti (kolonij) (132).

Iz blata smo tako pridobili in zamrznili 37 izolatov:

- 8 od 54 bakterijskih kultur iz NP NL gojišča
- 26 od 37 bakterijskih kultur iz gojišča LAMVAB
- 3 od 65 bakterijskih kultur iz gojišča MRS + cly

Iz mleka pa smo pridobili in zamrznili 11 izolatov:

- 10 od 46 bakterijskih kultur iz NP NL gojišča
- 0 od 8 bakterijskih kultur iz gojišča LAMVAB
- 1 od 30 bakterijskih kultur iz gojišča MRS + cly

Zamrznjene vzorce mleka in blata, pri katerih v prvem poskusu nismo uspeli osamiti bakterijskih kultur iz gojišča NP NL, smo ponovno nacepili na gojišča. Pridobili smo še 17 bakterijskih izolatov iz mleka in 15 iz blata.

4.3 PRIPRAVA DNA ZA PCR IN ANALIZO RAPD

Za izvedbo PCR na kolonijah smo fazo priprave DNA izpustili, saj pri tej izvedbi PCR v reakcijsko mešanico vnesemo kolonijo. Čeprav nam je PCR na kolonijah večinoma uspela, smo se odločili, da bomo DNA izolirali s postopkom, s katerim dobimo večje količine očiščene DNA, ker smo slednjo potrebovali za analize RAPD.

DNA smo pripravili na dva načina. Najprej smo celice obdelali s toploto in tritonom, saj je ta postopek bolj enostaven. Ugotovili pa smo, da smo uspeli s PCR pomnožiti željene dele DNA samo, dokler so bili vzorci sveži. Po večkratnem odmrzovanju vzorcev pa pomnožkov več nismo uspeli dobiti.

Izolacija DNA s komercialnim kompletom kemikalij Wizard Genomic DNA Purification Kit je bila uspešna, pa tudi DNA je bila med daljšim skladiščenjem ali odmrzovanjem ter ponovnim zamrzovanjem obstojna.

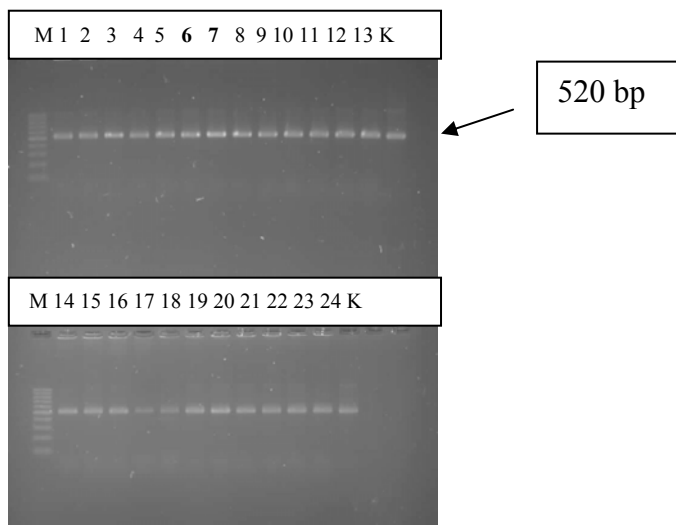
4.4 POTRDITEV RODU S PCR

Z začetnimi oligonukleotidi Bif 164f in Bif 662r smo potrdili rod *Bifidobacterium* pri 26 prečiščenih izolatih iz mleka in 21 iz blata. Kriteriji za potrditev rodu so bili:

- rast na gojišču NPNL
- morfološka oblika celic (palčke z odebeljenimi konci)
- 520 bp velik pomnožek v reakciji PCR ob uporabi oligonukleotidnih začetnikov Bif 164f in Bif 662r

Pri enem bakterijskem izolatu, osamljenem iz mleka in pri dveh iz blata, ki so imeli paličasto morfološko obliko, nismo potrdili rodu *Bifidobacterium*. Z reakcijo PCR namreč nismo dobili 520 bp velikih pomnožkov.

Na sliki 7 so pomnožki PCR, s katero smo dokazovali rod *Bifidobacterium*. Pri tem primeru so bili vsi preiskovani vzorci bifidobakterije, saj so bili pomnožki vseh vzorcev veliki 520 bp. Dolžina pomnožka se tudi ujema s pozitivno kontrolo *Bif. infantis* FAM 14392.



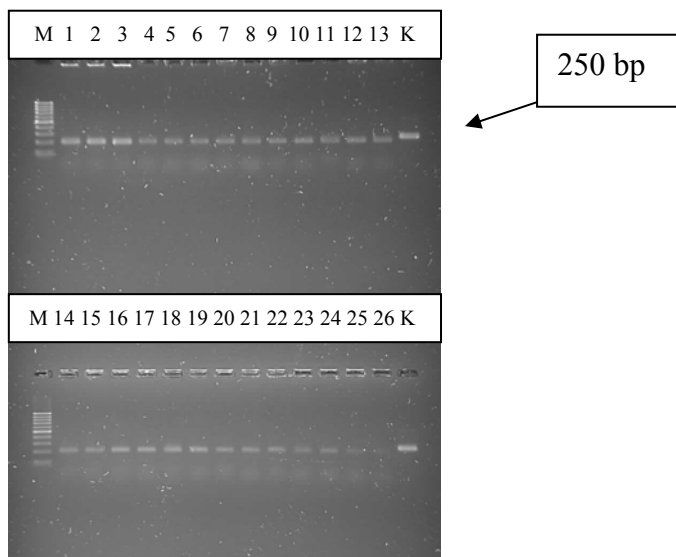
Slika 7: Pomnožki PCR s katerimi smo dokazali rod *Bifidobacterium* (M-molekularni označevalec 100 bp, K-pozitivna kontrola). Na kolonah 6 in 7 sta vzorca bakterijskih kultur, osamjenih iz blata, na ostalih so vzorci bakterijskih kultur, osamljenih iz mleka.

Rod *Lactobacillus* smo potrdili z začetnimi oligonukleotidi LbLMA 1 rev in R16-1 pri 29 prečiščenih izolatih iz blata. Pri izolatu iz mleka rodu nismo potrdili. Kriteriji za potrditev rodu so bili:

- rast na LAMVAB ali MRS + cly gojišču
- morfološka oblika bakterij (tanke palčke)
- 250 bp velik pomnožek PCR ob uporabi oligonukleotidnih začetnikov LbLMA 1 rev in R16-1.

Pri izolatu iz mleka rodu nismo potrdili. Kljub razmnoževanju na gojišču MRS z dodanim klindamicinom in paličasti morfologiji celic, pri uporabi z. o. LbLMA 1 rev in R16-1 nismo dobili pomnožka PCR.

Na sliki 8 so pomnožki PCR reakcije, s katerimi smo dokazovali rod *Lactobacillus*. Pri tem primeru so bili vsi preiskovani vzorci laktobacili, saj so vsi pomnožki veliki 250 bp. Dolžina pomnožka se tudi ujema s pozitivno kontrolo *Lb. gasseri* DSMZ 20243.



Slika 8: Pomnožki PCR, s katerimi smo dokazali rod *Lactobacillus* (M-molekularni označevalec 100 bp, K-pozitivna kontrola). Vsi vzorci so iz blata.

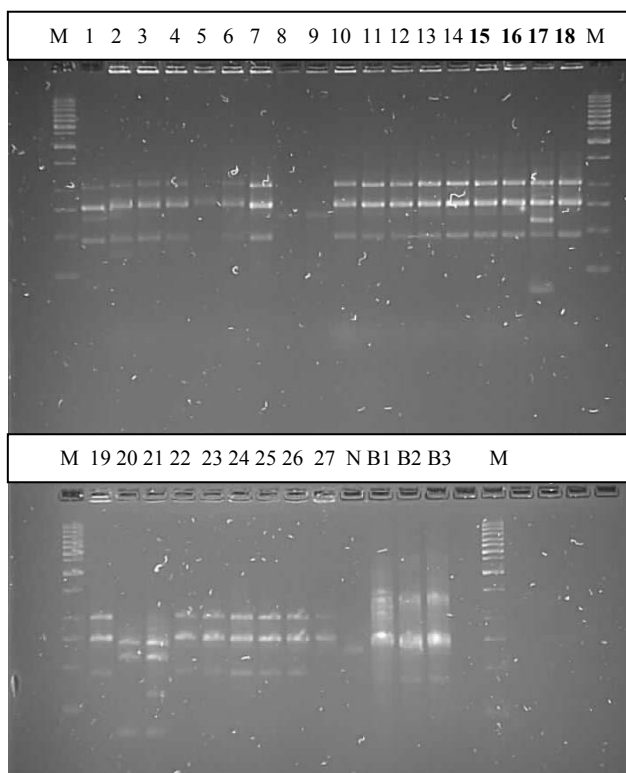
4.5 RAZLIKOVANJE SEVOV BIFIDOBAKTERIJ Z ANALIZO RAPD

Za uspešno izvedbo analize RAPD smo DNA izolirali s komercialnim setom. Za izolacijo smo potrebovali svežo kulturo. Pri tem koraku nismo uspeli namnožiti treh izolatov iz mleka in sedmih iz blata. Zato smo analizo RAPD naredili le na 23 vzorcih iz mleka in 14 iz blata.

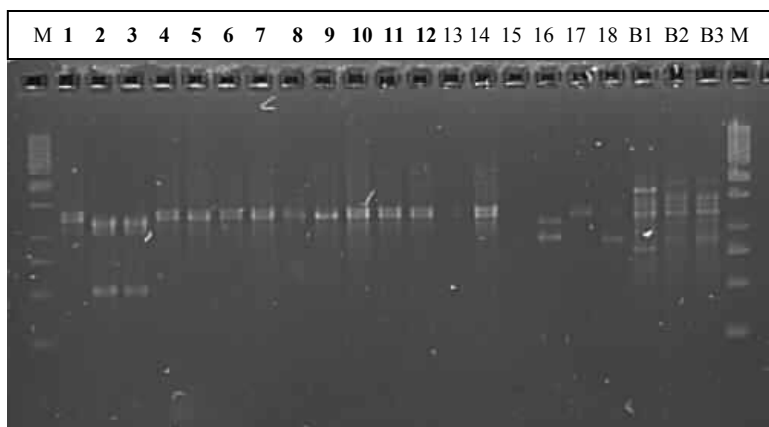
Najprej smo naredili analizo RAPD z oligonukleotidnim začetnikom KGT-70-GC (rezultati so razvidni na sliki 9). Pri izolatih, kjer nismo dobili jasnega vzorca, smo z istim z. o. analizo RAPD ponovili. Nato smo naredili RAPD še z z. o. M-13 (slika 10).

Pregledali smo rezultate in ugotovili, da:

- je en vzorec močno prevladoval, saj je 32 od skupno 37 izoliranih bifidobakterij pripadalo temu genotipu (imajo isti vzorec RAPD),
- smo uspeli izolirati še dva druga genotipa; en sev se je ponovil pri dveh izolatih (slika 9, kolona 17 ter slika 10, koloni 2 in 3), drug sev pa se je ponovil pri treh izolatih (slika 9, kolona 20 in 21 ter slika 10, koloni 16 in 18). Kolona 17 na sliki 9 in kolona 2 na sliki 10 predstavljata isti izolat. Kolona 21 na sliki 9 in kolona 18 na sliki 10 predstavljata isti izolat.



Slika 9: Pomnožki analize RAPD z z. o. KGT-70-GC. Kolonije št. 15, 16, 17 in 18 predstavljajo izolate iz blata, ostale št. pa izolate iz mleka. Na sliki je razvidno, da en izolat močno prevladuje (isti vzorec pomnožkov). Izolat v koloni 17 in izolata v koloni 20 in 21 pa se od ostalih razlikujeta.



Slika 10: Pomnožki analize RAPD z z. o. M-13. Kolone št. 1-12 predstavljajo izolate iz blata, ostale št. izolate iz mleka. Na sliki lahko vidimo, da en izolat močno prevladuje (isti vzorec pomnožkov). Izolata v koloni 2 in 3 ter izolata v koloni 16 in 18 pa se od ostalih razlikujeta.

Legenda k slikama:

- M – molekularni označevalec velikosti 1000 bp
- N – negativna kontrola (destilirana in avtoklavirana voda)
- B1 – referenčni sev *Bifidobacterium* iz izdelka Linex
- B2 – referenčni sev *Bif. infantis* FAM 14390
- B3 – referenčni sev *Bif. infantis* FAM 14392

4.6 UGOTAVLJANJE ZAPOREDJA NUKLEOTIDOV

Po enega predstavnika treh skupin sevov z enakimi vzorci RAPD smo identificirali s pomočjo ugotavljanja zaporedja nukleotidov v delu gena za 16 S RNA.

S pomočjo programa BLAST smo dobljena zaporedja nukleotidov (glej prilogo) primerjali z zaporedji, shranjenimi v genski banki NCBI. Ugotovili smo, da so izolati, pri katerih smo dobili prevladujoči vzorec RAPD, pripadali vrsti *Bifidobacterium breve* (20 izolatov iz mleka in 12 izolatov iz blata). Izolat z vzorcem RAPD, ki se je ponovil trikrat (vse tri smo izolirali iz zamrznjenih vzorcev mleka), smo prepoznali za *Staphylococcus epidermidis*. Za dva izolata s tretjim vzorcem RAPD pa se je izkazalo, da pripadata vrsti *Enterococcus faecalis* (oba izolata smo pridobili iz dojenčkovega fecesa).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 KONCENTRACIJA PREISKOVANIH BAKTERIJ V HUMANEM MLEKU IN DOJENČKOVEM BLATU

Koncentracijo bifidobakterij v humanem mleku smo ugotavljali s štetjem kolonij, ki so zrasle pri anaerobni kultivaciji na MRS agarju z dodanim cisteinom in mešanico antibiotikov NPNL. To gojišče je za selektivno izolacijo bifidobakterij opisano in priporočeno v standardu IDF 149 (1991).

Število zraslih kolonij iz 1 ml mleka se je gibalo od <100 (trije primeri) do $1,4 \times 10^3$. Iz rezultatov (Preglednica 12) je razvidno, da število kolonijskih enot (ke), zraslih na selektivnem gojišču za bifidobakterije (NPNL), ni bilo odvisno od obdobja laktacije doječe matere.

V blatu dojenčka smo od 25 do 230 dneva starosti na gojišču za bifidobakterije ugotovili 1×10^9 do 1×10^{10} ke. Iz tabele 12 je razvidno, da so bile bifidobakterije v enakih koncentracijah prisotne v blatu dojenčka skozi celotno obdobje testiranja. Pri tem moramo upoštevati tudi, da gojišče NPNL ni dovolj selektivno za bifidobakterije, saj se je za nekaj izolatov pokazalo, da so pripadniki drugih rodov, ki zajemajo kokoidne bakterije.

Gronlund in sod. (2007) navajajo podobne rezultate, saj so ugotovili v materinem mleku $5,6 \times 10^3$ ke bifidobakterij/ml in $2,5 \times 10^9$ ke bifidobakterij/g dojenčkovega blata. Novorojenčkova mikrobiota se po podatkih iz literature (Harmsen in sod, 2000) najbolj spreminja v prvih dneh življenja, ki jih v naši raziskavi nismo zajeli. Druga velika sprememba pa se zgodi šele po odstavitvi dojenčka, zato je stabilnost koncentracije bifidobakterij v dojenčkovem blatu v naši raziskavi pričakovana.

Prisotnost vrst iz skupine *Lactobacillus acidophilus* smo ugotavljali na agarju MRS, ki smo mu dodali antibiotik klindamicin. Inkubacija je potekala anaerobno 48 ur pri 37 °C. Gojišče MRS je gojišče za laktobacile, za katerega pa vemo, da omogoča tudi rast nekaterim drugim mlečnokislinskim bakterijam. Klindamicin pa zavira rast mnogih sorodnih laktobacilov, bifidobakterij in vrste *Streptococcus thermophilus* (IDF standard 192, 2006).

V 1 ml humanega mleka smo na gojišču MRS+cly ugotovili od 0 (6 primerov) do $1,5 \times 10^3$ ke bakterij. Pri večini vzorcev so se koncentracije gibale med 10 in 200 ke/ml (Preglednica 12). Med obdobjem laktacije in številom kolonijskih na gojišču MRS+cly ni bilo neposredne odvisnosti.

V blatu dojenčka smo od 25 do 230 dneva starosti na gojišču MRS+cly ugotovili od 7×10^7 do 4×10^{10} ke/g bakterij. Povezave med starostjo dojenčka in številom *L. acidophilus* v njegovem blatu nismo ugotovili.

Skupina *L. acidophilus*, ki je sposobna zrasti na gojišču MRS s klindamicinom, zajema vrste *L. acidophilus*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. gallinarum*, *L. crispatus* in *L. amylovorus*,

ki jih je mogoče razlikovati le na molekularnem nivoju. Predvsem vrste *L. acidophilus*, *L. gasseri* in *L. johnsonii* so v literaturi omenjene kot pogosto prisotne v humanem mleku. Humano mleko in posledično tudi blato dojenega otroka namreč ne vseujeta veliko različnih vrst laktobacilov (Martin in sod., 2006). V naši raziskavi nismo podrobneje pregledali predstavnikov laktobacilov, saj jih iz mleka nismo uspeli osamiti oziroma vzdrževati v kultivabilni obliki.

Rast bakterij na gojišču s klindamicinom je bila zelo šibka. Pri mikroskopiranju zraslih kolonij smo opazili, da so prevladovale kokoidne oblike celic. Le v štirih primerih smo opazili palčke. Pri treh izolatih iz blata smo s PCR pomnoževanjem 16S rDNA potrdili rod *Lactobacillus*, nismo pa ugotavljali tudi vrste. Pri izolatu iz mleka rodu *Lactobacillus* nismo potrdili.

Število laktobacilov smo ugotavljali tudi s štetjem kolonij, ki so zrasle na gojišču LAMVAB po 48 urni anaerobni kultivaciji pri 37 °C. Gojišče je bilo sestavljeno iz agarja MRS, reducenta cisteina, barvila bromkrezol zeleno in antibiotika vankomicina. Primerno je za selektivno gojenje laktobacilov ob prisotnosti bifidobakterij, streptokokov in enterokokov, saj so vsi ti rodovi občutljivi za vankomicin. Pomanjkljivost tega gojišča je ta, da na njem ne rastejo predstavniki skupine *Lb. acidophilus*. Kolonije, ki zrastejo na tem gojišču, so zelene barve zaradi prehoda barvila bromkrezol zeleno v celice. Hartemink in sod. (1997) navajo, da so kolonije lahko tudi bele, vendar takih pri našem eksperimentu nismo opazili. S testiranjem selektivnosti gojišča so Hartemink in sod. (1997) ugotovili, da se na njem lahko razmnožuje tudi vrsta *Streptococcus gordonii*, ki je značilna za ustno votlino.

V 15 vzorcih mleka ni bilo laktobacilov, ki bi zrasli na gojišču LAMVAB. V vzorcu, odvzetem 32. dan po porodu, smo ugotovili 1520 ke/ml, v vzorcu na 46. dan pa je zraslo veliko število netipičnih drobnih kolonij, za katere nismo dokazovali, ali so laktobacili (Preglednica 12). Razen v omenjenih dveh vzorcih pa laktobacilov, razen skupine *Lb. acidophilus*, v mleku nismo ugotovili. Možno je tudi, da so bili v mleku prisotni sevi laktobacilov, ki so občutljivi za vankomicin.

Pri vzorcih blata v začetnem obdobju (do 90 dni starosti), razen v enem primeru, na gojišču LAMVAB nismo opazili izraslih kolonij. Pri naslednjih vzorčenjih pa so zrasle kolonije laktobacilov. Največ med 10^7 in 10^8 ke/g, jih je bilo ugotovljenih pri zadnjih dveh vzorčenjih, to je pri 158 in 172 dneh po rojstvu. Pri ostalih vzorčenjih je bil velik razpon v koncentraciji; od 1×10^3 do več kot 10^8 ke/g (Preglednica 12).

Martin in sod. (2003) so ugotovili 2×10^4 do 1×10^5 cfu mlečnokislinskih bakterij/ml humanega mleka in 6×10^7 do 4×10^8 cfu MKB/g dojenčkovega blata. Uporabili so gojišče MRS in KAA V naši raziskavi smo ugotovili manjše koncentracije, saj smo ugotavljali le število laktobacilov. Ahrne in sod. (2005) so preučevali prisotnost laktobacilov v blatu 112 dojenčkov do šestega meseca starosti. Ugotovili so, da se koncentracije laktobacilov med dojenčki razlikujejo, pri 26 % laktobacilov sploh niso našli. Rezultati so tudi pokazali, da je v dojenčkoven črevesju prisotno majhno število različnih sevov laktobacilov.

Posamezne osamljene kolonije, ki so zrasle na gojiščih za laktobacile in bifidobakterije, smo zamrznili v bujonu MRS z glicerolom in jih hranili pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ko smo zbrali vse vzorce, smo jih zopet nacepili na ista gojišča. V 60 vzorcih (25 %) smo pod fazno-contrastnim mikroskopom ugotovili, da vsebujejo koke in ne palčke, kar pomeni, da gojišča niso bila dovolj selektivna. Predvsem na gojišču MRS + cly so rasli večinoma koki (pri 47 od skupno 95 zamrznjenih kolonij). Iz povedanega sledi, da je število laktobacilov in bifidobakterij, prikazano v tabeli 12, dejansko nekoliko precenjeno. Ker pa bolj selektivnih gojišč ni na voljo, so omenjena gojišča še vedno primerna izbira za osamitev laktobacilov in bifidobakterij, pri čemer je potrebno upoštevati tudi morfologijo bakterij in opraviti dodatne preskuse.

Kar 132 (55 %) zamrznjenih izolatov nismo uspeli po odmrzovanju ponovno nagojiti v tekočem gojišču. Bakterije so med shranjevanjem očitno odmrle ali pa prešle v VBNC stanje (viable but not culturable - žive celice, ki so izgubile sposobnost formiranja kolonij). Poskusili smo tudi s podaljševanjem inkubacije in dodajanjem reducenta (cistein hidroklorid) v MRS bujon, a neuspešno.

Izolati iz črevesja so pogosto zelo občutljivi za kisik. V času med odvzemom vzorca in nacepljanjem smo vzorce shranili v vrečkah z anaerobnimi pogoji (Genbag sistem), ter jih takoj po odpiranju vrečk nacepili v gojišče in prenesli v škatle z anaerobnimi pogoji (Genbox sistem). Postopki precepljanja kolonij, centrifugiranja, zamrzovanja, odmrzovanja pa so potekali v običajnem ozračju, zato je bila verjetno preživelost tako slaba. Za delo z anaerobnimi bakterijami so sicer potrebne anaerobne komore.

5.2 PROBLEMI S KULTIVACIJO BIFIDOBAKTERIJ

Bifidobakterije po večkratnem precepljanju (pri čiščenju kulture, revitalizaciji zamrznjenih čistih kultur) niso več zrasle v tekočem gojišču. Zagotovili smo jim anaerobno kultivacijo, optimalno temperaturo ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$), optimalna vrednost pH (6,9), cistein, ki je reducirala gojišče, ustrezno gojišče z antibiotiki, na katere bifidobakterije niso občutljive, a smo vseeno imeli veliko težav.

Vzrok omenjenih težav je najverjetneje delo z vzorci v aerobnih razmerah. Med kultivacijo bakterij smo sicer zagotavljali ustrezne anaerobne pogoje, shranjevanje in precepljanje bakterij pa ni potekalo v anaerobnih komorah. Za uspešno delo z bifidobakterijami bi morali očitno ves čas vzdrževati anaerobne pogoje.

Glede na to, da je bil eden od namenov osamitve posameznih bifidobakterij iz humanega mleka tudi iskanje primernega kandidata za probiotik, pri delu nismo uporabljali postopkov, ki se uporabljajo za striktno anaerobe (striktno delo v anaerobnih komorah), saj izolati, ki so tako občutljivi za kisik, tehnološko niso zanimivi niti za živilsko, niti za farmacevtsko industrijo. Kultivacija in aplikacija takšnih sevov je zaenkrat še prezahtevna in predraga, da bi bila zanimiva. Z našimi postopki smo zato izolirali le bifidobakterije, ki niso tako občutljive za kisik in lahko preživijo različne manipulacije.

Pri laktobacilih teh problemov nismo imeli. Če smo celice uspešno revitalizirali, so se tudi kasneje razmnoževale brez težav.

5.3 PCR NA KOLONIJAH

PCR na kolonijah je metoda PCR, ki je zanimiva, ker je faza priprave DNA zelo enostavna. Pri tem načinu namreč kar direktno vnesemo v reakcijsko mešanico za PCR kolonijo, ki jo želimo analizirati. Prvi cikel reakcije PCR je daljši in poteka pri višji temperaturi. V tem ciklu pride do lize celic v koloniji, sprosti se DNA, ki jo v naslednjih ciklih s pomočjo DNA polimeraze in izbranih začetnih oligonukleotidov lahko pomnožujemo. Kljub enostavnosti se je PCR na kolonijah izkazala za zelo učinkovito različico PCR. Z elektroforezo in barvanjem s Cybr Safe barvilom smo dokazali pomnožene fragmente DNA pričakovanih velikosti.

Ker pa smo želeli na posameznih kolonijah opraviti več reakcij PCR (za rod specifično ter najmanj dve analizi RAPD), smo vseeno morali pripraviti več DNA iz posameznih izolatov, za kar smo izolate nagojili v tekočem gojišču in DNA osamili iz usedline bakterijskih celic. Ko je DNA enkrat izolirana, pa jo lahko brez večjih izgub zamrznemo in hranimo do uporabe. Razen tega so analize RAPD pogosto bolj uspešne in ponovljive, če DNA predhodno očistimo.

DNA smo najprej izolirali s pomočjo Tritona. Triton je detergent, ki lizira celice. S tako pripravljeno suspenzijo DNA smo uspešno izpeljali reakcijo PCR še približno štiri tedne po pripravi. Kasneje pa nismo več uspeli dobiti pomnožkov v reakcijah PCR. Pomnožila se je le pozitivna kontrola, s čimer smo dokazali, da s samo reakcijo PCR ni bilo nič narobe. Sklepamo, da se je DNA v tem času razgradila. V suspenziji namreč ni bila le DNA, ampak tudi ostanki celic.

5.4 POTRJEVANJE RODU

Rod *Bifidobacterium*

Pripadnost rodu *Bifidobacterium* smo ugotavljali z molekularno metodo pomnoževanja 16S rDNA. Za PCR smo uporabili začetna oligonukleotida Bif 164f in Bif 662r. Pomnožek PCR, specifičen za bifidobakterije, je bil velik 520 bp.

Rod *Bifidobacterium* smo potrdili pri 26 bakterijskih kulturah osamljenih iz mleka in 21 iz blata. Pri treh bakterijskih kulturah, ki so rasle na gojišču NPNL, celice pa so bile paličastih oblik, nismo potrdili rodu bifidobakterij. Selektivnost gojišča NPNL torej ni najboljša, saj so na njem zrasle tudi druge bakterije.

Rod *Lactobacillus*

Za potrditev rodu *Lactobacillus* smo uporabili začetna oligonukleotida LbLMA 1 rev in R16-1. Pričakovali smo 250 bp velik pomnožek PCR reakcije. Pri eni od 30 bakterijskih kultur rodu nismo potrdili, kljub rasti bakterij na gojišču LAMVAB oz. MRS + cly in paličasti obliki celic.

5.5 DOLOČITEV VRST BIFIDOBakterIJ

Preden smo se lotili identifikacije bifidobakterij, smo seve genotipizirali z metodo RAPD, da bi videli, koliko različnih sevov smo osamili. Uporabili smo začetne oligonukleotide. KGT-70-GC in M-13. Bifidobakterije, ki so dale enake vzorce pomnožkov PCR, smo smatrali za pripadnice istega seva. Rezultati so se ujeli pri obeh z. o.; bifidobakterije, ki so imele enake vzorce pomnožkov PCR z z. o. KGT-70-GC, so imele enake vzorce tudi z z. o. M-13.

Ugotovili smo, da smo osamili le tri različne seve: vzorec RAPD, ki je prevladoval, se je ponovil pri 32-ih izolatih. Z z. o. KGT-70-GC smo pomnožili tri fragmente različnih dolžin, z z. o. M-13 pa en fragment. Z analizo zaporedja nukleotidov in s pomočjo programa BLAST smo določili, da sev sodi v vrsto *Bifidobacterium breve*. Sev se je pojavljal ob vseh vzorčenjih v materinem mleku in v blatu njenega dojenčka, od četrtega vzorčenja (pri starosti 46 dni) dalje. *B. breve* je novorojenček po vsej verjetnosti dobil iz materinega mleka. Bakterijski sev je preživel pot skozi njegov GIT in se naselil v njegovi črevesni mikrobioti. Vrsto *B. breve* so že izolirali iz humanega mleka in dojenčkovega blata, vendar je ne navajajo med najpogostejšimi vrstami. Gronlund in sod. (2007) so predstavnike te vrste našli v blatu 23 % testiranih dojenčkov in v 7 % vzorcev mleka doječih mater. Med predstavnike te vrste spadajo tudi nekateri probiotični sevi (Gardiner in sod., 2002).

Sev z vzorcem RAPD, ki se je ponovil trikrat, smo s pomočjo analize zaporedja nukleotidov identificirali za *Staphylococcus epidermidis*. Ta sev smo izolirali samo iz vzorcev mleka. Bakterija je značilen prebivalec kože in se vedno nahaja tudi v humanem mleku, saj le-ta pri dojenju pride v stik s kožo.

Sev, ki smo ga izolirali dvakrat, obakrat iz fecesa, pa se je pokazal za predstavnika *Enterococcus faecalis*. Bakterija je značilna za fekalno mikrobioto. V vzorcih mleka ga nismo našli.

Ugotovitev, da sta dva od sevov, ki smo jih osamili iz gojišča za bifidobakterije, pripadala vrstama *Staphylococcus epidermidis* in *Enterococcus faecalis*, je presenetljiva predvsem zato, ker smo pri obeh vzorcih dobili s PCR z z. o. Bif 164f in Bif 662r, 520 bp velik pomnožek, značilen za bifidobakterije. Mogoča razlaga za to je, da izolatov nismo dovolj prečistili, in je bila DNA izolirana iz celic bifidobakterij in kokov. Tako smo uspeli pomnožiti dele DNA, ki so značilni za bifidobakterije. V pomnožkih za analizo zaporedja nukleotidov, ki smo jih pridobili s PCR z univerzalnimi bakterijskimi z. o., pa so prevladovali pomnožki regije, ki je izvirala iz *Staphylococcus epidermidis* oziroma iz *Enterococcus faecalis*.

5.7 SKLEPI

- V blatu dojenčka so bili laktobacili prisotni od prvega vzorčenja, ko je bil otrok star 25 dni, do zadnjega pri osmih mesecih starosti, v koncentracijah 10^7 do 10^{10} ke/g, prevladovali pa so predstavniki skupine *Lb. acidophilus*. V mleku laktobacilov bodisi nismo ugotovili, bodisi so v manjšem številu zrasli na gojišču za skupino *Lb. acidophilus*, pa jih nismo uspeli potrditi kot laktobacile oziroma jih nismo uspeli gojiti.
- Bifidobakterije smo redno našli v blatu v koncentracijah 5×10^9 do 5×10^{10} ke/g, v mleku pa do 1430 ke/ml.
- Izoliranih bifidobakterij pogosto ni bilo mogoče namnožiti iz zamrznjene kulture. Predvidevamo, da tako hitro odmrejo zaradi občutljivosti za kisik v zraku.
- 32 izolatov bifidobakterij iz mleka doječe matere in iz blata dojenčka je imelo enak profil RAPD, kar kaže na to, da gre za isti sev, ki ga je dojenček pridobil od matere preko dojenja.
- V mleku in v blatu prevladujoči sev bifidobakterij pripada vrsti *B. breve*.

6 POVZETEK

Oblikovanje črevesne mikrobiote novorojenca je pomemben dejavnik v razvoju imunskega sistema in homeostaze prebavil. Vse več je tudi dokazov, da razvoj črevesne mikrobiote vpliva na zdravstveno stanje organizma v celotnem življenjskem obdobju. V naši nalogi smo zato raziskovali številčnost bifidobakterij in laktobacilov v humanem mleku in dojenčkovem blatu. Hoteli smo tudi ugotoviti, ali se isti sevi bifidobakterij pojavljajo v materinem mleku in v blatu njenega otroka.

Vzorci smo pridobili od doječe matere in njenega otroka v prvih osmih mesecih po rojstvu. Cepili smo jih na gojišča NPML (za bifidobakterije), MRS + cly (za skupino *L. acidophilus*) in LAMVAB (za laktobacile). Posamezne izolate laktobacilov in bifidobakterij smo potrdili na nivoju rodu z analizo PCR. Pri bifidobakterijah smo ugotavljali tudi vrsto, s pomočjo ugotavljanja zaporedja nukleotidov dela 16 S rDNA.

Pri kultivaciji bakterij smo naleteli na veliko težav. Gojišča, ki so vsebovala različne antibiotike, niso bila dovolj selektivna, saj smo povsod ugotovili tudi rast kokov. Po nekajmesečnem hranjenju izolatov bifidobakterij in laktobacilov pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (do enega leta), pa kar 59 % izolatov nismo več uspeli namnožiti.

Izkazalo se je, da je večina bifidobakterij iz humanega mleka in blata izjemno občutljivih za kisik tako, da bi bilo potrebno vse postopke od izolacije, precepljanja, kultivacije in hranjenja opravljati v strogo anaerobnih pogojih. To je verjetno tudi glavni vzrok, da smo ugotovili zelo majhno raznolikost izoliranih sevov iz mleka matere in blata dojenčka.. Izolirati in vzdrževati smo uspeli namreč samo 1 sev, ki je bil prisoten v 20 vzorcih mleka in 12 vzorcih blata. Sev, ki smo ga uspeli izolirati in shraniti, je zanimiv za nadaljne raziskave, saj so sevi z izjemno občutljivostjo za kisik, zaradi težke manipulacije, manj zanimivi za aplikacijo.

Dobili smo sledeče rezultate: na gojišču za bifidobakterije (NPML) je zraslo od 0 do $1,4 \times 10^3$ ke/ml mleka in od 1×10^9 do 1×10^{10} ke/g blata. Na gojišču MRS s klindamicinom, na katerem običajno zrastejo predstavniki skupine *Lb. acidophilus*, smo ugotovili od 0 do $1,5 \times 10^3$ ke/ml mleka in od $7 \times 10^7 - 4 \times 10^{10}$ ke/g blata. Na gojišču z vankomicinom za laktobacile (LAMVAB), kjer sicer zraste večina laktobacilov, ne pa predstavniki skupine *Lb. acidophilus*, so zrasle kolonije le iz dveh vzorcev mleka, v blatu pa smo ugotovili od 1×10^3 do 1×10^8 ke/g. Mleko in blato sta vsebovala bifidobakterije skozi celotno obdobje laktacije matere.

Pri mikroskopskem pregledovanju kolonij, zraslih na gojiščih za laktobacile in analizo PCR smo ugotovili, da iz vzorcev mleka nismo uspeli izolirati laktobacilov. Na gojiščih so rasli le koki. Pri izolatih blata, ki so rasli na gojiščih za laktobacile, pa smo z analizo PCR dokazali rod *Lactobacillus* v 29 primerih.

Z analizo RAPD smo analizirali DNA, pridobljeno iz izolatov bifidobakterij. Z dvema začetnimi oligonukleotidi smo v ločenih reakcijah PCR ugotovili tri različne vzorce oz. genotipe izolatov. S pomočjo analize zaporedja oligonukleotidov smo ugotovili, da je sev bifidobakterij, ki je prevladoval tako v vzorcih mleka kot tudi blata, pripadal vrsti *B. breve*.

To vrsto so iz humanega mleka in blata že izolirali drugi raziskovalci, vendar ne spada med najpogostejše vrste bifidobakterije v tovrstnih vzorcih. Videli smo, da je bil sev *B. breve* prisoten v vzorcih mleka in blata celotno obdobje jemanja vzorcev, to je od 25. do 230. dneva po rojstvu. S tem smo potrdili našo hipotezo, da je mleko doječe matere lahko izvor mikrobiote njenega otroka. Res pa je, da nimamo slike o raznolikosti bifidobakterij v preiskovanem mleku in blatu, saj smo občutljivejše seve izgubili med kultiviranjem in zamrzovanjem. Sev *B. breve*, ki smo ga ugotovili v različnih vzorcih mleka in blata, je očitno manj občutljiv za kisik in s tega stališča zanimiv za nadaljnje raziskave probiotičnih lastnosti.

7 VIRI

Adamič J., Smole-Možina S., Jeršek B. 2003. Vloga in pomen mikroorganizmov v živilih in taksonomija. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole-Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 1-45.

Ahrne S., Lonnermark E., Wold A.E., Aberg N., Hesselmar B., Saalman R., Strannegard I.L., Molin G., Adlerberth I. 2005. Lactobacilli in the intestinal microbiota of Swedish infants. *Microbes and Infection*, 7: 1256-1262.

Awaisheh S.S., Haddadin M.S.Y., Robinson R.K. 2005. Incorporation of selected nutraceuticals and probiotic bacteria into fermented milk. *International Dairy Journal*, 15: 1184-1190.

Bezkorovainy A. 2001. Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 2, Suppl. S: 399S-405S.

Biavati B., Vescovo M., Torriani S., Bottazzi V. 2000. Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Annals of Microbiology*, 50: 117-131.

Caetano-Anolles G. 1993. Amplifying DNA with arbitrary oligonucleotide primers. *PCR Methods and Applications*, 3, 2: 85-94.

Collado M.C., Moreno Y., Cobo J.M., Mateos J.A., Hernandez M. 2006. Molecular detection of *Bifidobacterium animalis* DN-173010 in human feces during fermented milk administration. *Food Research International*, 39: 530-535.

Coeuret, V., Dubernet, S., Bernardeau, M., Gueguen, M., Vernoux, J. P. 2003. Isolation, characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. *Lait*, 83: 269-306.

Coeuret V., Gueguen M., Vernoux J.P. 2004. Numbers and strains of lactobacilli in some probiotic products. *International Journal of Food Microbiology*, 97: 147-156.

Gardiner G.E., Ross R.P., Kelly P.M., Stanton C., Collins J.K., Fitzgerald G. 2002. Microbiology of therapeutic milks. V: Dairy microbiology handbook: The microbiology of milk and milk products. 3rd ed. Robinson R.K. (ed.). New York, John Wiley & Sons: 431-478.

Gerritsen M.A., Smits M.A., Olahoek T. 1995. Random amplified polymorphic DNA fingerprinting for rapid identification of leptospiras of serogroup Sejroe. *Journal of Medical Microbiology*, 42: 336-339.

Gibson G.R., Wang X. 1994. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*, 77: 412-420.

Gronlund M.M., Gueimonde M., Laitinen K., Kociubinski G., Gronroos T., Salminen S., Isolauri E. 2007. Maternal breast-milk and intestinal bifidobacteria guide the compositional development of the *Bifidobacterium* microbiota in infants at risk of allergic disease. *Clinical and Experimental Allergy*, 37: 1764-1772.

Gueimonde M., Laitinen K., Salminen S., Isolauri E. 2007. Breast milk: A Source of Bifidobacteria for infant gut development and maturation? *Neonatology*, 92: 64-66.

Hartemink R., Domenech V.R., Rombouts F.M. 1997. LAMVAB - A new selective medium for the isolation of lactobacilli from faeces. *Journal of Microbiological Methods*, 29: 77-84.

Harmsen H. J.M., Wildwboer-Veloo A.C.M., Raangs G.C., Wagendorp A.A., Klijn N., Bindels G., Welling G.W. 2000. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 30: 61-67.

IDF Standard 149. Annex A. Lactic acid starters. Section A.2.5. Enumeration of *Bifidobacterium*. 1991: 2 str.

IDF standard 192. ISO 20128. Milk products – Enumeration of presumptive *Lactobacillus acidophilus* on a selective medium – Colony-count technique at 37°C. 2006: 8 str.

Jeršek B. 2003. Higiena živil. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 21-25.

Jimenez J., Fernandez L., Maldonado A., Martin R., Olivares M., Xaus J., Rodriguez J.M. 2008. Oral administration of *Lactobacillus* strains isolated from breast milk as an alternative for the treatment of infectious mastitis during lactation. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 15: 4650-4655.

Kok R.G., De Waal A., Schut F., Welling G.W., Weenk G., Hellingwerf K.J. 1996. Specific detection and analysis of a probiotic *Bifidobacterium* strain in infant feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 10: 3668 – 3672.

Martin R., Jimenez E., Olivares M., Marin M.L., Fernandez L., Xaus J., Rodriguez J.M. 2006. *Lactobacillus salivarius* CECT 5713, a potential probiotic strain isolated from infant feces and breast milk of a mother-child pair. *International Journal of Food Microbiology*, 112: 35-43.

Martin R., Langa S., Reviriego C., Jimenez E., Marin M.L., Olivares M., Boza J., Jimenez J., Fernandez L., Xaus J., Rodriguez J.M. 2004. The commensal microflora of human milk: new perspectives for food bacteriotherapy and probiotics. *Trends in Food Science & Technology*, 15: 121-127.

- Martin R., Langa S., Reviriego C., Jimenez E., Marin M.L., Xaus J., Fernandez L., Rodriguez J.M. 2003. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *Journal of Pediatrician*, 143: 754-758 .
- Martin R., Olivares M., Marin M.L., Fernandez L., Xaus J., Rodriguez J.M. 2005. Probiotic potential of 3 lactobacilli strains isolated from breast milk. *Journal of Human Lactation*, 21, 8: 8-18.
- Mätto J., Fonden R., Tolvanen T., von Wright A., Vilpponen-Salmela T., Satokari R., Saarela M. 2006. Intestinal survival and persistence of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains administered in triple-strain yoghurt. *International Dairy Journal*, 16: 1174-1180.
- Meghrou J., Euloge P., Junelles A.M., Ballongue J., Petitdemange H. 1990. Screening of *Bifidobacterium* strains for bacteriocin production. *Biotechnology Letters* 12, 8: 575-580.
- Misra A.K., Kuila R.K. 1995. Antimicrobial substances from *Bifidobacterium bifidum*. *Indian Journal of Dairy Science*, 48: 612-614.
- Newburg D.S. 2005. Symposium: Innate immunity and human milk. *Journal of Nutrition*, 135: 1308-1312.
- Olivares M., Diaz-Ropero M.P., Martin R., Rodriguez J.M., Xaus J. 2006. Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk. *Journal of Applied Microbiology*, 101: 72-79.
- Ozbas Z.Y., Aytac S.A. 1995. Behavior of *Yersinia enterocolitica* and *Aeromonas hydrophila* in yogurt made with probiotic bacteria: *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus acidophilus*. *Milchwissenschaft*, 50: 626-629.
- Rinne M., Kalliomaki M., Arvilommi H., Salminen S., Isolauri E. 2006. Changes in gut microbiota and immune markers during the complementary feeding period in healthy breast-fed infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 52, 5: 488-495.
- Rochat F., Cherbut C., Barclay D., Puccio G., Fazzolari-Nesci A., Grathwohl D., Haschke F. 2007. A whey-predominant formula induces fecal microbiota similar to that found in breast-fed infants. *Nutrition Research*, 27: 735-740.
- Rogelj I., Perko B. 2003. Mlečni izdelki. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole-Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 541-577.
- Satokari R.M., Vaughan E.E., Akkermans A.D.L., Saarela M., deVos W.M. 2000. Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 2: 504-513.

Saxelin M., Tynkkynen S., Mattila-Sandholm T., de Vos W.M. 2005. Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. *Current Opinion in Biotechnology*, 16: 204-211.

Smole-Možina S. 1996. Izbor, priprava in shranjevanje industrijskih biokultur. V: *Biotehnologija-osnovna znanja*. Raspor P. (ur). Ljubljana, BIA, d.o.o.: 349-365.

Sobko T., Huang L., Midtvedt T., Norin E., Gustafsson L.E., Norman M., Jansson A., Lundberg J.O. 2006. Generation of NO by probiotic bacteria in the gastrointestinal tract. *Free Radical Biology & Medicine*, 41: 985-991.

Su P., Henriksson A., Tandianus J.E., Park J.H., Foong F., Dunn N.W. 2005. Detection and quantification of *Bifidobacterium lactis* LAFTI B94 in human faecal samples from a consumption trial. *FEMS Microbiology Letters*, 244: 99-103.

Tissier M.H. 1900. Recherches sur la flore intestinale normale et pathologique du nourisson. Thesis. Paris. University of Paris. Cit. po: Biavati B., Vescovo M., Torriani S., Bottazzi V. 2000. Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Annals of Microbiology*, 50: 117-131.

Vandamme P., Pot B., Gillis M., De Vos P., Kersters K., Swings J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews*, 60, 2: 407-438.

Yildirim Z., Johnson M.G. 1998. Characterization and antimicrobial spectrum of bifidocin B, a bacteriocin produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. *Journal of Applied Microbiology*, 46: 231-241.

ZAHVALA

Zahvaljujem se somentorici dr. Bojani Bogovič Matijašič za napotke in pomoč pri delu v laboratoriju katedre za mlekarstvo, za skrben in strokoven pregled dela ter za prijaznost in dobro voljo.

Prav tako gre zahvala za strokoven in skrben pregled diplomskega dela mentorici prof. dr. Ireni Rogelj. Hvala za ves čas in strokovna pojasnila.

Za natančen pregled se zahvaljujem recenzentki prof. dr. Sonji Smole Možina.

Za vzorce se zahvaljujem dr. Andreji Čanžek Majhenič in njeni hčerki Titi.

Hvala zaposlenim v laboratoriju za mlekarstvo za pomoč v laboratoriju, predvsem dr. Metodi Zorič Peternel.

Za pomoč pri iskanju in urejanju literature se zahvaljujem ge. Ivici Hočevar in ge. Barbari Slemnik.

Hvala tudi očetu in mami, bratom Juretu, Petru in Simonu ter sestri Ivanki in prijateljem za podporo in pomoč v času študija.

PRILOGE

Priloga A: Nukleotidno zaporedje s PCR pomnoženega dela 16 s RNA (začetna oligonukleotida P1 in P4) -*Bifidobacterium breve*:

GGNNCNTCGGGCTTTGCCTGGTGGTGGAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATGCGT
GACCGACCTGCCCCATGCACCGGAATAGCTCCTGGAAACGGGTGGTAATGCCG
GATGCTCCATCACANCGCATGGTGTGTTGGGAAAGCCTTTGCGGCNTGGGATGG
GGTCGCGTCCTATCAGCTTGATGGCGGGGTAACGGCCCACCATGGNTTCGACGG
GTAGCCGGCCTGAGAGGGCNACCGGCCACNTTGGGACTGANATACGGNCCANA
CTCCTACNGGAGGCANCAAGTGGGGAATATTGCACANTGGNCGCNAGCCTGATG
CANCGACNCCGCNTGAGGGATGGAGGCCTTNGGGTTGTAAACCTCTTTTGTAN
GGAGCAAGGCACTTTGNGTTGNNTGTACCTTTCGAATAAGCACCGNNTAACTNC
NTGCCAGCAGCCGCGGTAATACNTANGGTGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGN
CGTAANGGGCTCGTNNCGGNTCNNCCNCCGGTGTNAAAGTCC

Priloga B: Nukleotidno zaporedje s PCR pomnoženega dela 16 s RNA (začetna oligonukleotida P1 in P4) -*Staphylococcus epidermidis*:

CTTGCTCCTCTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGATAACCTACC
TATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATATATTG
AACCGCATGGTTCAATAGTGAAAGACGGTTTTTGCTGTCACTTATAGATGGATCC
GCGCCGATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATGCGTA
GCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTC
CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAG
CAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTATTAGGGA
AGAACAATGTGTAAGTAAGTACTATGCACGTCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCC
ACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCC
GGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAG
CCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGAAAACCTTGAGTGCAGAA
GAGGAAAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATNCC

Priloga C: Nukleotidno zaporedje s PCR pomnoženega dela 16 s RNA (začetna oligonukleotida P1 in P4) - *Enterococcus faecalis*:

TGCTTGCACCTCAATTGGAAAGAGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGT
AACCTACCCATCAGAGGGGGATAAACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGCATA
ACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATG
GATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGGAGTAACGGCTCACCAAGGCCA
CGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG
CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGT
CTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGT
TGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAAC
CAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCA
AGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCT
GATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTT
GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCNTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATN
CCNN

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Katarina Krajnik

**PROUČEVANJE POPULACIJ BIFIDOBAKTERIJ IN
LAKTOBACILOV V MATERINEM MLEKU IN
BLATU DOJENČKA**

DIPLOMSKO DELO

LJUBLJANA, 2009