

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Saša ROT

**UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI PROBIOTIČNIH
BAKTERIJ *Lactobacillus acidophilus* IN *Bifidobacterium
animalis* ssp. *lactis* V BLATU ODRASLIH**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Saša ROT

**UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI PROBIOTIČNIH BAKTERIJ
Lactobacillus acidophilus IN *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* V
BLATU ODRASLIH**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**DETECTION OF PROBIOTIC BACTERIA *Lactobacillus acidophilus*
AND *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* IN FECES OF ADULTS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2011

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 doc. dr. Andrejo Čanžek Majhenič, za somentorico dr. Bojano Bogovič Matijašič, za recenzentko pa doc. dr. Barbaro Jeršek.

Mentorica: doc. dr. Andreja Čanžek Majhenič

Somentorica: dr. Bojana Bogovič Matijašič

Recenzentka: doc. dr. Barbara Jeršek

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Saša Rot

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.24/.26+579.61:615.33 (043)=163.6
KG	probiotiki/probiotične bakterije/blato odraslih/komercialni probiotični preparat/antibiotiki/osamitev laktobacilov/osamitev bifidobakterij/ <i>Lactobacillus acidophilus</i> / <i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i> /morfološke lastnosti/analiza RAPD sevov/vrstno specifični PCR
AV	ROT, Saša
SA	ČANŽEK MAJHENIČ, Andreja (mentorica) / BOGOVIČ MATIJAŠIČ, Bojana (somentorica) / JERŠEK, Barbara (recenzentka)
KZ	SI- 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2011
IN	UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI PROBIOTIČNIH BAKTERIJ <i>Lactobacillus acidophilus</i> IN <i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i> V BLATU ODRASLIH
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XII, 61 str., 10 pregl., 21 sl., 38 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	V okviru širše zastavljene klinične študije, katere namen je bil ugotoviti učinkovitost komercialnega probiotičnega izdelka za preprečevanje z antibiotiki povezanih drisk pri odraslih, smo v blatu ugotavljali prisotnost dveh bakterijskih sevov vrst <i>Lactobacillus acidophilus</i> in <i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i> , ki ju ta probiotični preparat vsebuje. Vzorci blata za analize so bili odvzeti pred prvo aplikacijo probiotičnega preparata in antibiotika (20 začetnih vzorcev) ter po zadnjem odmerku probiotičnega preparata (20 končnih vzorcev). Tipizacijo obeh sevov smo izvedli z metodo RAPD, v kateri smo kot tarčno DNA uporabili DNA, osamljeno iz posameznih kolonij, izraslih iz nacepljenih vzorcev blata. V mikrobnih združbah, pripravljenih iz vzorcev blata, smo z vrstno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi s PCR ugotavljali prisotnost obeh bakterijskih vrst. V predposkusu smo najprej optimizirali postopek osamitve DNA iz kolonij in izbrali najprimernejši začetni oligonukleotid za RAPD. Izkazalo se je, da je najprimernejši način osamitve tarčne DNA za RAPD neposredno iz kolonij, z uporabo vročega začetka pred samo metodo. Od uporabljenih začetnih oligonukleotidov za RAPD je bil za tipizacijo kolonij seva vrste <i>L. acidophilus</i> najprimernejši M13, ter za tipizacijo seva vrste <i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> KGT-80GC. DNA iz mikrobnih združb smo osamili s komercialnim kompletom. Z metodo RAPD smo prisotnosti seva vrste <i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> potrdili pri dveh začetnih in dveh končnih vzorcih blata, pri čemer ni šlo za iste osebe. Prisotnosti seva vrste <i>L. acidophilus</i> nismo uspeli potrditi v nobenem od preiskovanih vzorcev blata. Pogostnost prisotnosti bakterij vrst <i>L. acidophilus</i> in <i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> v vzorcih blata pred in po terapiji pa je bila približno enaka. Uspešna preživelosti probiotičnih bakterij iz komercialnega preparata ob sočasni terapiji z antibiotikom kaže na obetaven potencial analiziranega probiotičnega preparata.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 579.24/.26+579.61:615.33 (043)=163.6
CX probiotics/lactic acid bacteria/human feces/commercial probiotic product/antibiotics/isolation of *Lactobacilli*/isolation of *Bifidobacteria*/*Lactobacillus acidophilus*/*Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*/morphological properties/RAPD method for strains/species specific PCR
AU ROT, Saša
AA ČANŽEK MAJHENIČ, Andreja (supervisor) / BOGOVIČ MATIJAŠIĆ Bojana (co-advisor) / JERŠEK, Barbara (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY 2011
TI DETECTION OF PROBIOTIC BACTERIA *Lactobacillus acidophilus* AND *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* IN FECES OF ADULTS
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XII, 61 p., 10 tab., 21 fig., 38 ref.
LA sl
AL sl/en
AB In our study, performed as a part of larger clinical study which aim was to establish the efficacy of a commercial probiotic product in preventing diarrhoea in adults, caused by antibiotic therapy, the presence of bacterial strains *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* comprised in the probiotic product was determined in feces of adults. The fecal samples were collected before the first application of probiotic preparation and antibiotics (initial sample) and after the last administration of probiotic preparation (final sample). We accomplished the typization of both strains with the RAPD method; the DNA isolated from single colonies grown from plated fecal samples was used as the target DNA. By using the species specific primers in PCR we determined the presence of two bacterial species in microbial consortia prepared from fecal samples. In preliminary test we optimized the protocol for DNA isolation from colonies and selected the most appropriate RAPD oligonucleotide. It turned out that the most appropriate method for target DNA isolation for the RAPD was directly from the colonies using hot start before method. Among the RAPD primers M13 proved to be the most suitable for the typization of *L. acidophilus* strain while KGT-80GC was the most suitable for the typization of *B. animalis* ssp. *lactis* strain. DNA isolation from microbial consortia was performed by the use of commercial kit. Through the RAPD analysis we ascertained the presence of the *B. animalis* ssp. *lactis* strain in two initial and two final fecal samples, but we were not able to verify the presence of *L. acidophilus* in none of the analysed fecal samples. The frequency at which *L. acidophilus* and *B. animalis* ssp. *lactis* were present in fecal samples was approximately the same, before and after the therapy. The successful survival of probiotic bacteria from the commercial product along with simultaneous antibiotic therapy show promising potential of the analyzed probiotic product.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
1 UVOD.....	1
1.1 ČREVESNA MIKROFLORA IN Z ANTIBIOTIKI POVEZANE DRISKE TER PROBIOTIKI	1
1.2 DELOVNA HIPOTEZA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 PROBIOTIKI	3
2.1.1 Razvoj definicije probiotikov skozi zgodovino	3
2.1.2 Zahteve za probiotike in selekcijski kriteriji	4
2.1.3 Zdravju koristni učinki probiotikov in prehranska vrednost.....	6
2.1.3.1 Učinek probiotičnih bakterij pri preprečevanju z antibiotiki povezanih drisk.....	7
2.2 BAKTERIJE VRSTE <i>Lactobacillus acidophilus</i>	8
2.3 BAKTERIJE VRSTE <i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i>	9
2.4 BAKTERIJE VRST <i>Lactobacillus acidophilus</i> IN <i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i> V KOMERCIALNIH PREPARATIH IN FERMENTIRANIH IZDELKIH	10
2.5 METODE SELEKCIJE IN IDENTIFIKACIJE BAKTERIJ RODOV <i>Lactobacillus</i> IN <i>Bifidobacterium</i>	11
2.5.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	12
2.5.1.1 RAPD	13
3 MATERIALI IN METODE	14
3.1 POTEK POSKUSA	14
3.2 MATERIAL	16
3.2.1 Bakterijski sevi.....	16
3.2.1.1 Čiste kulture iz komercialnega probiotičnega preparata	16
3.2.1.2 Bakterije iz vzorcev blata.....	16
3.2.1.3 Vzorci blata	17
3.2.2 Gojišča	17

3.2.2.1	Trdno gojišče MRS	17
3.2.2.2	Trdno gojišče Rogosa.....	17
3.2.2.3	Tekoče gojišče MRS	17
3.2.3	Dodatki gojiščem	18
3.2.4	Razredčevalne raztopine.....	18
3.2.4.1	Anaerobni diluent.....	18
3.2.5	Reagenti za barvanje po Gramu	19
3.2.6	Reagenti za pripravo bakterijske DNA	19
3.2.6.1	Priprava DNA mikrobnih združb in DNA kontrolnih sevov iz preparata	19
3.2.6.2	Priprava DNA posameznih kolonij	19
3.2.7	Reagenti za RAPD in PCR.....	20
3.2.7.1	Začetni oligonukleotidi	20
3.2.8	Reagenti za analizo pomnožkov v agaroznem gelu	21
3.3	LABORATORIJSKA OPREMA	22
3.4	METODE	22
3.4.1	Priprava vzorcev.....	22
3.4.1.1	Osamitev posameznih sevov iz komercialnega probiotičnega preparata.....	22
3.4.1.2	Priprava vzorcev blata.....	23
3.4.1.3	Osamitev posameznih bakterijskih vrst iz vzorcev blata	23
3.4.1.4	Priprava mikrobnih združb iz vzorcev blata	24
3.4.2	Morfološka analiza z barvanjem po Gramu	24
3.4.3	Priprava DNA	25
3.4.3.1	Optimizacija osamitve DNA iz posameznih kolonij za metodo RAPD	25
3.4.3.2	Osamitev DNA iz mikrobnih združb in kontrolnih sevov za PCR.....	26
3.4.4	Priprava reakcijske mešanice za PCR in RAPD	27
3.4.4.1	Priprava reakcijske mešanice za PCR za potrditev rodu <i>Bifidobacterium</i>	27
3.4.4.2	Priprava reakcijske mešanice za PCR za potrditev rodu <i>Lactobacillus</i>	28
3.4.4.3	Priprava reakcijske mešanice za RAPD s kontrolnim sevom za bakterije vrst <i>L. acidophilus</i> in <i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i>	29
3.4.4.4	Priprava reakcijske mešanice za PCR za preverjanje prisotnosti bakterij vrst <i>L. acidophilus</i> in <i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> v mikrobnih združbah	30
3.4.5	Razmere PCR in RAPD	30
3.4.6	Gelska elektroforeza.....	31
4	REZULTATI.....	33
4.1	MORFOLOŠKA ANALIZA LAKTOBACILOV IN BIFIDOBAKTERIJ	33
4.2	REZULTATI RAPD	34
4.2.1	Rezultati optimizacije osamitve DNA iz kolonij izraslih iz analiziranih vzorcev blata.....	34
4.2.2	Rezultati optimizacije izbire ustreznega začetnega oligonukleotida za RAPD	36

4.2.3	Rezultati optimizirane metode RAPD za pozitivne kontrole, pripravljene iz komercialnega probiotičnega preparata	37
4.2.4	Ugotavljanje istovetnosti kolonij iz vzorcev blata s sevom vrste <i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> iz probiotičnega preparata	38
4.2.5	Ugotavljanje istovetnosti kolonij iz vzorcev blata s sevom vrste <i>L. acidophilus</i> iz probiotičnega preparata	42
4.3	REZULTATI PCR.....	42
4.3.1	Rezultati PCR za potrditev rodu bakterij.....	42
4.3.2	Rezultati PCR za ugotavljanje prisotnosti bakterij vrste <i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> v mikrobnih združbah	44
4.3.3	Rezultati PCR za ugotavljanje prisotnosti bakterij vrste <i>L. acidophilus</i> v mikrobnih združbah	47
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	49
5.1	RAZPRAVA.....	49
5.1.1	Optimizacija osamitve DNA iz kolonij ter izbire začetnih oligonukleotidov za metodo RAPD	49
5.1.2	Tipizacija sevov vrst <i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> in <i>L. acidophilus</i>	50
5.1.3	Identifikacija bakterij vrst <i>L. acidophilus</i> in <i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> v mikrobnih združbah	51
5.2	SKLEPI.....	53
6	POVZETEK	54
7	VIRI.....	58
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Mikroorganizmi, ki se uporabljajo kot probiotiki (Rogelj in Perko, 2003)...	5
Preglednica 2: Razmere gojenja za osamitev posameznega seva iz komercialnega preparata	16
Preglednica 3: Razmere gojenja posameznih skupin bakterij iz vzorcev blata.	16
Preglednica 4: Dodatki gojiščem za zagotovitev selektivnosti pogojev rasti preiskovanih bakterij	18
Preglednica 5: Začetni oligonukleotidi za vrstno specifično PCR	20
Preglednica 6: Začetni oligonukleotidi za RAPD	21
Preglednica 7: Za rod specifični začetni oligonukleotidi za PCR	21
Preglednica 8: Rezultati RAPD za ugotavljanje seva vrste <i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i>	39
Preglednica 9: Rezultati PCR za ugotavljanje bakterij vrste <i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> v mikrobni združbi začetnih in končnih vzorcev blata.	44
Preglednica 10: Rezultati PCR za ugotavljanje bakterij vrste <i>L. acidophilus</i> v mikrobni združbi.	47

KAZALO SLIK

Slika 1: Ciklična termostata za PCR: Mastercycler gradient Eppendorf in Gene Cycler BIO-RAD.	13
Slika 2: Potek poskusa	1
Slika 3: Komplet za PCR in mešanica dNTP-jev v hladilni škatli.	20
Slika 4: Petrijeve plošče, nacepljene z vzorci blata med inkubacijo v anaerobnih razmerah.	23
Slika 5: Prikaz načinov osamitve bakterijske DNA iz kolonij laktobacilov in bifidobakterij z namenom optimizacije postopka.	25
Slika 6: Komercialni komplet za izolacijo genomske DNA.....	26
Slika 7: Sterilni prostor za pripravo reakcijske mešanice za PCR in RAPD.....	27
Slika 8: Priprava reakcijske mešanice PCR in razdelitev v mikro epruvete.	28
Slika 9: Prenos posameznih kolonij s sterilnim zobotrebcem z gojišča v mikro epruvete z reakcijsko mešanico za RAPD na osnovi kolonije.	29
Slika 10: Banjica za potek elektroforeze in model z glavnikom za izdelavo agaroznega gela.	31
Slika 11: Nanos vzorcev v žepke na agaroznem gelu in potek elektroforeze.	32
Slika 12: Mikroskopski preparat bakterij iz rodu <i>Lactobacillus</i> (Foto: Todar K., 2006)....	33
Slika 13: Mikroskopski preparat bakterij iz rodu <i>Bifidobacterium</i>	34
Slika 14: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov RAPD z začetnim oligonukleotidom M13 po različnih načinih priprave DNA.....	35
Slika 15: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov RAPD s preizkušanjem najprimernejšega začetnega oligonukleotida in različnimi načini priprave DNA.....	36
Slika 16: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov RAPD pozitivnih kontrol sevov bakterij vrst <i>L. acidophilus</i> in <i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i>	38
Slika 17: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov RAPD z začetnim oligonukleotidom KGT-80GC za preiskovani sev vrste <i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i>	39
Slika 18: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov PCR z začetnimi oligonukleotidi, specifičnimi za rod <i>Bifidobacterium</i>	43

Slika 19: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov PCR z začetnimi oligonukleotidi, specifičnimi za rod <i>Lactobacillus</i>	43
Slika 20: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov PCR z začetnima oligonukleotidoma Bflact2 in Bflact5 za bakterije vrste <i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i>	45
Slika 21: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov PCR z začetnima oligonukleotidoma Aci 16SI in 16SII za bakterije vrste <i>L. acidophilus</i>	48

KAZALO PRILOG

Priloga A: Negativni rezultati RAPD »neposredno na petih izbranih kolonijah« za testni sev vrste *B. animalis* ssp. *lactis*.

Priloga B: Negativni rezultati RAPD »neposredno na petih izbranih kolonijah« za testni sev vrste *L. acidophilus*.

Priloga C: Razmere PCR in RAPD.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Okrajšava ali simbol:	Pomen:
16 S in 23 S	mala in velika ribosomska podenota
A	adenin
ATCC	ameriška zbirka tipskih kultur (American Type Culture Collection)
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i>	<i>Bifidobacterium animalis</i> subspecies <i>lactis</i>
bp	bazni par
C	citozin
CGE	klasična gelska elektroforeza (ang. conventional electrophoresis)
DGGE	gelska elektroforeza v kombinaciji z denaturacijskim gradientom (ang. denaturing gradient gel electrophoresis)
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	mešanica nukleotidov
DSM	nemška zbirka mikroorganizmov in celičnih kultur (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen)
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina (ang. ethylenediaminetetraacetic acid)
FAO	Food and Agriculture Organisation of the United Nations
G	gvanin
GRAS	splošno priznано kot varno (ang. generally recognised as safe)
kb	kilobazni par
KE / ml	kolonijske enote v mililitru vzorca
<i>L. acidophilus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
M	molarnost (mol/L)
μL	mikroliter
mM	milimolarno
MRS	gojišče za laktobacile po De Man, Rogosa, Sharpe
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. polymerase chain reaction)
PFGE	gelska elektroforeza v utripajočem polju (ang. pulsed-field gel electrophoresis)
RAPD	naključno pomnožena polimorfna DNA (ang. randomly amplified polymorphic DNA)
REA	analiza z restriktcijskimi encimi (ang. restriction enzyme analysis)
RNA	ribonukleinska kislina
rRNA	ribosomska ribonukleinska kislina
S	Svedberg (sedimentacijski koeficient)
ssp.	subspecies (podvrsta)
T	timin
TAE	tris acetatni pufer
UV	ultravijoličen (-a svetloba)

1 UVOD

1.1 ČREVESNA MIKROFLORA IN Z ANTIBIOTIKI POVEZANE DRISKE TER PROBIOTIKI

Normalna črevesna mikrobiota je kompleksna združba mikroorganizmov, ki naseljujejo prebavni trakt in so v ravnovesju. Črevesna mikrobiota aktivno sodeluje pri prehrani gostitelja z absorpcijo hranil, nadzira gostiteljev imunski sistem, ščiti prebavni trakt pred kolonizacijo s patogenimi mikroorganizmi ter preprečuje raka debelega črevesa in gastroenteritis (Guarner in Malagelada, 2003).

Velik pomen pri vzdrževanju ravnovesja črevesne mikrobiote imajo probiotične bakterije. Probiotike opisujemo kot žive mikroorganizme, ki imajo ugodne učinke na zdravje gostitelja, če jih zaužije v zadostni količini, pri čemer je pomembno, da je učinke možno znanstveno dokazati (FAO/WHO, 2002). Poleg tega morajo zadostiti nekaterim zahtevam, med katere prištevamo varnost (nepatogeni mikroorganizmi), uspešno preživelost pri prehodu skozi celoten gastrointestinalni trakt, znan izvor in genetsko stabilnost (Holzapfel in sod., 1998). Probiotičen sev mora ostati metabolno aktiven vse do prebavnega trakta, torej do ciljnega mesta. Med pomembne selekcijske kriterije spada tudi sposobnost vezave probiotične bakterije na črevesno površino, s čimer vsaj začasno naseli črevo. Vezava pa vsekakor zagotavlja tekmovalnost in selektivno izločanje patogenih bakterij s črevesne površine (Saarela in sod., 2000).

Probiotiki učinkovito blažijo, preprečujejo ali celo zdravijo driske, povezane z jemanjem antibiotikov. Zdravljenje z antibiotiki ne uničuje le bakterij, ki so povzročile bolezen, ampak tudi povsem neškodljive ali celo koristne črevesne bakterije. Vendar pa nekatere bakterije preživijo terapijo z antibiotiki, in to predvsem tiste, ki nosijo genski zapis za odpornost proti antibiotiku, ki ga bolnik prejema. Tako preživijo nekatere koristne kot tudi nekoristne ali celo škodljive vrste bakterij, ki začasno postanejo prevladujoča mikrobiota črevesja. Če se škodljive bakterije dovolj namnožijo, včasih lahko povzročijo vnetje črevesa. Terapije z antibiotiki porušijo naravno ravnovesje črevesne mikrobiote, ki uravnava presnovo ogljikovih hidratov v kratko verižne maščobne kisline. Spremenjene razmere v prebavnem traktu omogočijo naselitev in rast potencialno patogenih mikroorganizmov, med katerimi so najpogostejše bakterije vrste *Clostridium difficile*. Bakterije izločajo različne toksine, ki povzročajo huda vnetja ali celo trajne poškodbe sluznice. Preparati, ki so namenjeni preprečevanju z antibiotiki povezanih drisk, navadno vsebujejo probiotične bakterijske seve, ki s svojim protimikrobnim delovanjem uspešno zavirajo rast in razmnoževanje bakterij, ki jih najdemo med najpogostejšimi povzročitelji drisk (McFarland, 2000).

Najbolj znani probiotični mikroorganizmi so predstavniki rodov *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 (splošno priznane kot varne) (Rogelj in Perko, 2003).

Probiotiki so sestavni del funkcionalne hrane, zlasti fermentiranih mlečnih izdelkov, v zadnjih letih pa so se močno uveljavili tudi kot sestavni del prehranskih dopolnil. Na policah trgovin in lekarn se vsakodnevno pojavljajo novi probiotični izdelki v različnih oblikah, kot na primer tablet, kapsul in napitkov. Namenjeni so predvsem preventivi, to je vzdrževanju ravnovesja črevesne mikroflore in vzpodbujanju imunskega sistema z namenom utrjevanja odpornosti organizma (Saarela in sod., 2000).

1.2 DELOVNA HIPOTEZA

Diplomsko delo je del širše zastavljene klinične študije, katere namen je bil ugotoviti učinkovitost komercialnega probiotičnega preparata za preprečevanje z antibiotiki povezanih drisk pri odraslih.

Osebe, ki jim je bila predpisana terapija z antibiotikom, so hkrati z antibiotikom ter teden dni po zadnjem odmerku antibiotika, prejemale še predpisani odmerek probiotičnega preparata. V okviru tega dela smo v blatu preverjali prisotnost dveh bakterijskih sevov iz vrst *Lactobacillus acidophilus* in *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*, ki ju ta probiotični preparat vsebuje.

Z uporabo primernih selektivnih gojišč z dodatki smo iz komercialnega preparata uspešno osamili bakterije seva *L. acidophilus* in bakterije seva *B. animalis* ssp. *lactis*.

Vzorci blata za analize so bili odvzeti pred prvo aplikacijo probiotičnega preparata in antibiotika, ter po zadnjem odmerku probiotičnega preparata. Predvsem v vzorcih blata, odvzetih po zadnji aplikaciji probiotičnega preparata, smo pričakovali prisotnost testnih sevov. Preverili smo jih z metodo RAPD (naključno pomnožena polimorfna deoksiribonukleinska kislina) na kolonijah, osamljenih iz blata in izraslih na ustreznih gojiščih. Pričakovali smo, da bo prisotnost bakterij vrst *L. acidophilus* in/ali *B. animalis* ssp. *lactis* v vzorcih blata po terapiji pogostejša kot v vzorcih blata, odvzetih pred prvo aplikacijo probiotičnega preparata in antibiotika.

Z raziskavo smo želeli preveriti prisotnost in preživelost probiotičnih bakterij komercialnega preparata ob sočasni terapiji z antibiotikom, kar bi bil pomemben podatek o dejanskem potencialu preparata.

2 PREGLED OBJAV

2.1 PROBIOTIKI

2.1.1 Razvoj definicije probiotikov skozi zgodovino

Koncept probiotikov je, poleg raziskovalcev Mora in Tissiera, na prelomu iz 19. v 20. stoletje vpeljal ruski znanstvenik in nobelovec Ilya Metchnikoff, ki je menil, da je življenjska doba bolgarskih kmetov daljša zaradi uživanja fermentiranih mlečnih izdelkov ter temeljito opisal in poudaril pomen črevesne mikroflore za človekovo zdravje (Vasiljevic in Shah, 2008).

Izraz probiotik je leta 1974 prvič uporabil Parker za opis dodatkov živalski krmi kot »organizmov in substanc, ki pripomorejo k ohranjanju intestinalne mikrobne združbe« (Vasiljevic in Shah, 2008).

Petnajst let kasneje pa je Fuller preoblikoval definicijo probiotikov v »živ mikrobni dodatek krmi, ki ugodno vpliva na žival gostiteljico z izboljšanjem njenega mikrobnega ravnotežja« (Fuller, 1989).

Ker je bila definicija dolgo omejena zgolj na živalsko prehrano, sta Havenaar in Huis in't Veld leta 1992 predlagala razširitev definicije tudi na humano prehrano. Probiotike sta opisala kot »mono- ali mešane kulture živih mikroorganizmov, ki koristno učinkujejo na človeka ali žival z uravnavanjem črevesne mikroflore« (Vasiljevic in Shah, 2008).

Od leta 2002 veljavna definicija, ki sta jo povzeli tudi organizaciji FAO in WHO, pa opisuje probiotike kot žive mikroorganizme, ki imajo ugodne učinke na zdravje gostitelja, če jih zaužije v zadostni količini, pri čemer je pomembno, da je učinke možno znanstveno dokazati (FAO/WHO, 2002).

2.1.2 Zahteve za probiotike in selekcijski kriteriji

Ne glede na to, ali bomo probiotik uporabili kot prehranski dodatek ali zdravilo, mora njegova izbira temeljiti na natančno določenih selekcijskih kriterijih, ki vključujejo ugotavljanje varnosti probiotičnega seva ter njegovih funkcionalnih in tehnoloških kriterijev (Saarela in sod., 2000; Vasiljevic in Shah, 2008).

Ugotavljanje varnosti seva vključuje:

- proučevanje značilnosti seva, ki mora biti nepatogen, imeti znan izvor in mora biti taksonomsko razvrščen,
- poznavanje možnih negativnih učinkov in ugotavljanje odpornosti probiotičnih bakterij proti antibiotikom,
- oceno tveganja prenosljivosti determinant za odpornost proti klinično pomembnim antibiotikom, če jih probiotiki imajo, na patogene bakterije (Rogelj in Perko, 2003; Vasiljevic in Shah, 2008).

Funkcionalni selekcijski kriteriji za probiotični sev vključujejo:

- poznavanje sposobnosti preživetja seva v prebavnem traktu ter vpliva nizkih vrednosti pH želodca in žolčnih soli,
- metabolno aktivnost (probiotični sev mora ostati metabolno aktiven v prebavnem traktu, na ciljnim mestu) in sposobnost vezave probiotične bakterije na črevesno površino s pogojem, da bakterija vsaj začasno naseli črevo,
- znanstveno proučevanje v smislu njihovega vpliva na zdravje (Rogelj in Perko, 2003).

Kadar želimo probiotične bakterije uporabiti v fermentiranih mlečnih izdelkih, je zaželeno, če poleg osnovnih izpolnitev zahtev varne uporabe posedujejo tudi primerne tehnološke lastnosti.

Med slednje sodijo:

- primernost seva za gojenje in obstojnost med tehnološkimi postopki,
- obstojnost seva med skladiščenjem in distribucijo živila,
- dobre senzorične lastnosti probiotičnega seva,
- genetska stabilnost seva (Rogelj in Perko, 2003; Vasiljevic in Shah, 2008).

Naravna ekološka niša probiotičnih bakterij je prebavni trakt, zato navadno slabo rastejo v mleku in imajo na sploh slabe tehnološke lastnosti, saj počasi in v majhnih količinah proizvajajo mlečno kislino, ne proizvajajo aromatičnih snovi in niso sposobne oblikovati dobrih reoloških lastnosti izdelka (Rogelj in Perko, 2003; Vasiljevic in Shah, 2008).

Izdelek, ki ga imenujemo probiotični, bi moral vsebovati do 10^8 KE probiotičnega seva / mL izdelka (Vasiljevic in Shah, 2008), nikakor pa ne manj od 10^6 KE / mL ob koncu roka obstojnosti (Rogelj in Perko, 2003).

Med najbolj poznanimi probiotičnimi mikroorganizmi najdemo predvsem predstavnike mlečnokislinskih bakterij (največ iz rodu *Lactobacillus*) in bifidobakterije.

Mikroorganizmi, ki se najpogosteje uporabljajo kot probiotiki, so prikazani v Preglednici 1.

Preglednica 1: Mikroorganizmi, ki se uporabljajo kot probiotiki (Rogelj in Perko, 2003)

Rod <i>Lactobacillus</i>	Rod <i>Bifidobacterium</i>	Ostale mlečnokislinske bakterije	Ostali mikroorganizmi
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>B. breve</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	
<i>L. rhamnosus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	
<i>L. plantarum</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	
<i>L. reuteri</i>	<i>B. animalis (lactis)</i>		
<i>L. johnsonii</i>			
<i>L. fermentum</i>			
<i>L. salivarius</i>			

2.1.3 Zdravju koristni učinki probiotikov in prehranska vrednost

Številne klinične študije, izvedene v zadnjih letih, opisujejo ugodne vplive probiotikov na zdravje ljudi. Nekatere študije so pozitivne učinke potrdile, pri nekaterih študijah pa se je pokazal obetaven potencial probiotikov za nadaljnje raziskave (Vasiljevic in Shah, 2008).

Eden prvih, znanstveno dokazanih zdravju pozitivnih učinkov probiotikov je lajšanje težav pri ljudeh, ki trpijo za laktozno intoleranco. Pri ljudeh z laktozno intoleranco je aktivnost encima β -galaktozidaze močno zmanjšana, zato jim uživanje mleka povzroča težave, saj laktoza (mlečni sladkor) ostane v prebavnem traktu nerazgrajena. Nasproten učinek pa ima pri teh ljudeh uživanje fermentiranih mlečnih izdelkov, ki vsebujejo tudi probiotične bakterije. Te namreč proizvajajo encim β - galaktozidazo, ki izboljša presnovo laktoze (Vasiljevic in Shah, 2008; Gomes in Malcata, 1999). Pozitivne učinke bakterij vrst *L. acidophilus* in *B. animalis* (obe vrsti vsebuje tudi probiotični preparat iz te raziskave) so proučevali zlasti v fermentiranih mlečnih izdelkih, kjer so odkrili nižji delež laktoze in višji delež prostih aminokislin kot v mleku ter številne vitamine, ki lahko izboljšajo rast in razmnoževanje predstavnikov črevesne mikrobiote. Obe vrsti lahko sintetizirata folno kislino, niacin, tiamin, riboflavin, piridoksin in vitamin K, ki se nato absorbirajo v človeški organizem. Poleg tega bakterije vrste *L. acidophilus* skupaj z nekaterimi vrstami bifidobakterij sintetizirajo levosučno mlečno kislino, ki se v črevesu dokazano bolje absorbira kot desnosučna mlečna kislina in predstavlja tudi vir energije (15 kJ / g) (O'Connell, 2009; Saarela, 2009; Gomes in Malcata, 1999).

V zadnjem času je veliko pozornosti namenjene proučevanju antitumorgenega in antikancerogenega potenciala probiotikov, saj mehanizmi zaenkrat še niso pojasnjeni. Domnevni antitumogeni učinek pripisujejo predvsem sposobnosti probiotičnih bakterij, da vežejo mutagene snovi na celično površino in s tem zmanjšajo njihov učinek. Po drugih razlagah pa naj bi bila učinkovitost delovanja teh mehanizmov povezana s spremembo sestave črevesne mikrobiote in s tem posledično povezanih metabolnih aktivnosti, normalizacijo permeabilnosti črevesja in povečane odpornosti črevesja. Veliko proučujejo tudi hiperholesterolemičen učinek probiotikov, čeprav tudi mehanizmi zniževanja ravni holesterola v krvi zaenkrat ostajajo nepojasnjeni. Pozitiven potencial probiotikov se kaže tudi v preprečevanju zaprek, črevesnih vnetij, alergij in vzpodbujanju imunskega sistema v smislu povečevanja odpornosti organizma. Sem spada preprečevanje črevesnih infekcij, potovalnih drisk in drisk pri zdravljenju z antibiotiki (Vasiljevic in Shah, 2008; Gomes in Malcata, 1999).

2.1.3.1 Učinek probiotičnih bakterij pri preprečevanju z antibiotiki povezanih drisk

Terapije z antibiotiki največkrat spremenijo pogoje v prebavnem traktu do te mere, da je omogočena naselitev in rast potencialno patogenih mikroorganizmov, med katerimi je najpogostejša bakterija vrste *Clostridium difficile*. V 25 – 30 % primerov pacientov, ki uživajo antibiotike, pride do porušanja ravnovesja črevesne mikroflore in do pojava z antibiotiki povezanih drisk, od katerih jih pri četrtini obolelih (driske) povzroča bakterija vrste *Clostridium difficile* z izločanjem enterotoksina A in citotoksina B (O' Connell, 2009; Bergogne Berezin, 2000). Oba toksina negativno delujeta na pravilno delovanje epitelnih celic črevesja (Bergogne Berezin, 2000).

Terapije z antibiotiki prav tako povzročajo spremembe fizioloških funkcij normalne črevesne mikroflore. Pogosto se poruši presnova ogljikovih hidratov, ki jih črevesne bakterije uporabljajo kot vir energije, in s tem zmanjša proizvodnja mlečne kisline in kratko verižnih maščobnih kislin. Zaradi funkcijskih motenj črevesne sluznice pride do zmanjšane absorpcije vode in elektrolitov v črevesje in s tem povezanih drisk (Bergogne Berezin, 2000).

V številnih kliničnih študijah so ugotovili pozitivne učinke sočasne terapije s probiotiki na preprečevanje drisk ob zdravljenju z antibiotiki. Predstavniki rodov bifidobakterij in laktobacilov so del avtohtone mikroflore prebavnega trakta ljudi in živali in proizvajajo mlečno kislino, zato so to tudi najpogostejše uporabljeni mikroorganizmi v terapevtske namene. S svojo metabolno aktivnostjo, ki vključuje tudi tvorbo protimikrobnih snovi ter zaščito črevesne sluznice, uspešno zavirajo rast in razmnoževanje patogenih bakterij (O' Connell, 2009; Bergogne Berezin, 2000).

V eni izmed raziskav so Plummer in sod. (2004) izvedli poskus, pri katerem so hospitalizirani pacienti sočasno prejeli antibiotik in probiotični preparat. V testni skupini, ki je sočasno z antibiotikom uživala tudi probiotik, so potrdili izločanje toksina bakterije vrste *C. difficile* pri 46 % pacientov, medtem ko so pri kontrolni skupini, ki je uživala samo antibiotik, toksin potrdili pri 78 % pacientov.

Za preprečevanje drisk, povezanih z uživanjem antibiotikov, so se v različnih kliničnih študijah kot najučinkovitejše izkazale bakterije seva *Lactobacillus rhamnosus* GG in kvasovke vrste *Saccharomyces boulardii* (McFarland, 2000).

2.2 BAKTERIJE VRSTE *Lactobacillus acidophilus*

Bakterije rodu *Lactobacillus* so po Gramu pozitivne dolge ali kokoidne, negiblive in nesporogene paličice, z vsebnostjo G+C v DNA med 32 in 51 %. Glede odnosa do kisika so aerotolerantni anaerobi. Prehransko so zahtevni mikroorganizmi, saj poleg fermentabilnih sladkorjev potrebujejo mnoge rastne dejavnike, kot so aminokisline, vitamini in organske baze. Predstavniki rodu so lahko homofermentativni (fermentirajo glukozo do mlečne kisline) ali heterofermentativni (fermentirajo glukozo do mlečne kisline, CO₂, etanola, očetne kisline) (Adamič in sod., 2003).

Laktobacile imenujemo tudi ubikvitarni mikroorganizmi, saj jih najdemo praktično povsod, predvsem pa v okoljih, bogatih z ogljikovimi hidrati. Tako naseljujejo najrazličnejše okoljske niše, kot so fermentirana živila rastlinskega in živalskega izvora, dihalni, prebavni in urogenitalni trakt ljudi in živali ter odplake (Felis in Dellaglio, 2007; Adamič in sod., 2003).

Rod *Lactobacillus* predstavlja eno najštevilčnejših skupin mlečnokislinskih bakterij, ki so hkrati tudi najpomembnejša skupina industrijskih bakterij v živilski industriji. Prvi opisi laktobacilov segajo na prelom iz 19. v 20. stoletje, ko je leta 1900 Moro kot prvi raziskovalec iz blata dojenih dojenčkov uspešno osamil fakultativno anaerobne, ravne paličice in jih poimenoval *Bacillus acidophilus*, takrat generično ime za laktobacile prebavnega trakta (Gomes in Malcata, 1999). Razvoj znanja je omogočil odkrivanje vedno novih vrst laktobacilov, tako da je do danes opisanih že preko 100 različnih vrst, število potrjenih vrst pa še iz dneva v dan narašča. Eden zadnjih zapisov navaja 106 potrjenih in opisanih vrst znotraj rodu *Lactobacillus* (Felis in Dellaglio, 2007).

Med najpogostejše omenjane in v terapevtske namene uporabne mikroorganizme vsekakor sodijo predstavniki homofermentativne in mikroaerofilne bakterije skupine *Lactobacillus acidophilus*. Poleg potrjenih, zdravju koristnih učinkov, so obetavni izsledki raziskav, ki obravnavajo učinkovanje nekaterih sevov te skupine pri lajšanju in celo zdravljenju drugih obolenj kot so alergije na hrano, kronična vnetja črevesa in rak debelega črevesja. Vendar pa bo potrebno za dokončno potrditev učinkovitosti sevov pri omenjenih težavah, opraviti še obsežne klinične raziskave ter raziskati mehanizme delovanja (Bogovič Matijašič, 2001; Saarela, 2009).

2.3 BAKTERIJE VRSTE *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*

Bakterije rodu *Bifidobacterium* so obvezno anaerobni, negibljivi, nesporogeni, po Gramu pozitivni paličasti mikroorganizmi, katerih glavna produkta fermentacije ogljikovih hidratov sta mlečna in očetna kislina. Vsebnost G+C v DNA znaša med 54 in 67%. V debelem črevesu dosežejo koncentracijo 10^8 do 10^9 celic na gram vsebine, kar jih uvršča med najpomembnejše organizme črevesne biote. Naseljujejo tudi črevesje živali in druge ekološke niše, vendar se sevi razlikujejo, kar omogoča uporabo bifidobakterij pri odkrivanju vira fekalne kontaminacije. Bifidobakterije humanega izvora pa se uporabljajo tudi v proizvodnji probiotičnih mlečnih izdelkov in prehranskih dopolnil (Adamič in sod., 2003).

Predstavnik rodu *Bifidobacterium* je iz blata dojenčkov prvi izoliral Tissier v letih 1899-1900 in jih poimenoval *Bacillus bifidus* (O' Connell, 2009).

Znotraj rodu je do sedaj poznanih 30 vrst, od tega je 10 vrst pretežno humanega izvora (človeško blato, zobni karies, vagina), 17 vrst živalskega izvora (črevesje in vamp živali), dve vrsti pa sta bili prvotno osamljeni iz odpadnih voda in ena iz fermentiranega mleka (Gomes in Malcata, 1999).

Bifidobakterije so ena najpomembnejših skupin mikroorganizmov v enem najkompleksnejših ekosistemov, kot je prebavni trakt ljudi in toplokrvnih živali ter čebel. Na velikost in sestavo populacije bifidobakterij vplivata predvsem starost in prehrana posameznika. Tako v črevesni mikrobioti dojenčkov prevladujejo predvsem bifidobakterije, katerih uspešno razmnoževanje stimulirajo bifidogeni faktorji, ko je glikoproteinska komponenta κ -kazeina humanega kolostruma. Velikost populacije bifidobakterij z leti počasi upada in pri odraslem človeku predstavlja v povprečju le še 25 % celotne črevesne mikrobiote oz. tretji najmočnejše zastopani rod. Dramatičen padec števila bifidobakterij pa se zgodi v obdobju starosti, ko se zmanjša izločanje želodčnega soka, nastale razmere pa omogočajo razrast vulgarnih mikroorganizmov, predvsem klostridijev in koliformnih bakterij (O' Connell, 2009; Gomes in Malcata, 1999).

Bakterije sevov *B. animalis* ssp. *lactis*, se v svetu že več kot 25 let uporabljajo v komercialne namene in sicer kot sestavni del funkcionalnih živil ali prehranskih dopolnil. Za zdravje pozitivni probiotični učinki predstavnikov te vrste so bili potrjeni v številnih neodvisnih kliničnih študijah. Pred kratkim je bilo objavljeno tudi celotno zaporedje genoma bakterij seva *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB - 12 (Garrigues in sod., 2010).

Bakterije sevov vrste *B. animalis* ssp. *lactis* imajo pomembno vlogo pri ohranjanju ravnotežja črevesne mikrobiote in spodbujanju aktivnosti prebavnega trakta, kar je predvsem dobrodošlo pri lažšanju zapeke. Potrjeni so bili tudi pozitivni učinki pri zdravljenju potovalnih, virusnih in rotavirusnih drisk (Saarela in sod., 2000).

2.4 BAKTERIJE VRST *Lactobacillus acidophilus* IN *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* V KOMERCIALNIH PREPARATIH IN FERMENTIRANIH IZDELKIH

Odkar je znano, da antibiotiki ne uničujejo samo zdravju škodljivih bakterij, ampak tudi bakterije normalne črevesne mikrobiote in da porušenje ravnotežja črevesne mikrobiote pogosto povzroči prebavne težave, se za lažšanje le-teh, ob terapiji z antibiotiki priporoča dopolnilna terapija s probiotiki. Najpreprostejši vnos probiotičnih bakterij je z uživanjem fermentiranih mlečnih izdelkov, ki probiotične bakterije vsebujejo, in kot taki predstavljajo eno najpogostejših oblik funkcionalne hrane.

V razvitih evropskih državah (Nemčija, Švedska, Francija), predstavljajo probiotični fermentirani mlečni izdelki več kot 25 % vseh fermentiranih mlečnih proizvodov (Vasiljevic in Shah, 2008; Gomes in Malcata, 1999).

Na tržišču se pojavlja vedno več fermentiranih ali nefermentiranih probiotičnih proizvodov in prehranskih dopolnil, ki večinoma vsebujejo bakterijske vrste rodov *Lactobacillus* in *Bifidobacterium*. Predstavniki obeh rodov so zaradi slabe rasti v mleku, največkrat dodani fermentiranim izdelkom kot starterske kulture v kombinaciji z drugimi podpornimi kulturami iz skupine mlečnokislinskih bakterij (Vasiljevic in Shah, 2008).

Probiotični preparati kot prehranska dopolnila v obliki kapsul, tablet ali praškov morajo imeti izpolnjene nekatere zahteve, prav tako kot običajno probiotično živilo (Rogelj in Bogovič Matijašić, 2004):

- Preparati morajo biti varni.
- Če so navedeni učinki na zdravje, morajo ti biti ustrezno dokazani tudi v kliničnih raziskavah na ljudeh.
- Preparati morajo biti jasno in natančno označeni, tako da je porabnik ob nakupu nedvoumno seznanjen z vsebino izdelka.
- Deklaracija bi morala vsebovati naslednje informacije:
 - a) zaznamek, ali so prisotne žive bakterije,
 - b) natančen opis bakterij,

- c) število posameznega bakterijskega seva, zapisano v enotah, razumljivih porabniku in strokovno pravih (ke/enoto izdelka),
- d) minimalno količino bakterij, ki ima še zdravju koristne učinke.

2.5 METODE SELEKCIJE IN IDENTIFIKACIJE BAKTERIJ RODOV *Lactobacillus* IN *Bifidobacterium*

Z namenom učinkovitega in selektivnega ločevanja, identifikacije in ugotavljanja števila bakterij, so bile v preteklosti razvite različne kultivacijske, molekularne in kemijske metode. Izbira metode je odvisna od vrste izdelka in mikroorganizmov, ki jih v izdelku pričakujemo. Največkrat se uporablja kombinacija različnih metod.

Osnova vsem analizam so navadno kultivacijske metode, kjer je z uporabo različnih selektivnih gojišč in dodatkov omogočena rast določene vrste bakterij, zavirane pa ostale vrste. Analiza temelji na opazovanju lastnosti zraslih kolonij, njihovi barvi, obliki in morfologiji. Razlikovanje posameznih vrst bakterij je mogoče tudi na podlagi opazovanja drugih značilnosti, kot so občutljivost za kisik in antibiotike, poraba hranil ter produkcija metabolitov (Charteris in sod., 1996).

Vendar ocenjujejo, da klasične kultivacijske tehnike omogočajo zelo omejen vpogled v mikrobno združbo, saj je kultivabilnih bakterij v humanem blatu le okrog 20 % (Smole Možina in Jeršek, 2001).

S stališča identifikacije probiotičnih sevov je potrebno poudariti, da številnih sevov in celo vrst zaradi filogenetske sorodnosti ni mogoče razlikovati na osnovi fenotipskih lastnosti. To velja tudi za probiotične bakterije iz skupine bakterij vrste *L. acidophilus* in vrste rodu *Bifidobacterium*. Vse to narekuje potrebo po uporabi molekularnih metod identifikacije in tipizacije probiotičnih sevov v selekcijskih postopkih in pri sledenju, bodisi v funkcionalnih živilih ali pa v prebavnem traktu po zaužitju izdelka (Smole Možina in Jeršek, 2001).

Tradicionalne metode ugotavljanja mikroorganizmov so velikokrat dolgotrajne in zahtevajo veliko dela, zato se vedno bolj poslužujemo hitrih, specifičnih in občutljivih metod. Sodobne metode, ki temeljijo na analizi DNA (deoksiribonukleinska kislina), počasi nadomeščajo oziroma dopolnjujejo tradicionalne, konvencionalne mikrobiološke metode (Coeuret in sod., 2004).

Uporaba molekularnih tehnik se vse bolj uveljavlja tudi v živilski mikrobiologiji. Eden od razlogov je, da kemijska narava nukleinskih kislin in molekularno-biološke metode omogočajo največjo specifičnost in občutljivost med vsemi znanimi hitrimi metodami mikrobiološke analitike. Drugi razlog pa je, da analiza nukleinskih kislin na temeljnem nivoju, t.j. ugotavljanju nukleotidnega zaporedja DNA/RNA molekul, daje možnost razvoja testov, ki omogočajo direktno in hitro odkrivanje ter identifikacijo mikroorganizmov v vzorcih hrane brez predhodne izolacije in namnoževanja mikrobne biomase (Smole Možina, 2003).

Obstaja cela vrsta različnih izvedb verižne reakcije s polimerazo (PCR) in kombinacij z drugimi molekularnimi metodami, ki jih lahko izvedemo pred ali po pomnoževanju DNA s PCR. Takšni primeri so vrstno/rodovno specifična PCR v kombinaciji z gelsko elektroforezo, metoda RAPD (naključno pomnožena polimorfna DNA), analiza DGGE (gelska elektroforeza v kombinaciji z denuracijskim gradientom), analiza REA (analiza z restrikcijskimi encimi) in druge (Smole Možina in Jeršek, 2001).

Analiza REA vključuje rezanje kromosomske DNA z restrikcijskimi endonukleazami na odseke, ki se ločujejo med seboj s klasično gelsko elektroforezo ali PFGE (gelska elektroforeza v utripajočem polju) (Charteris in sod., 1996).

Analiza DGGE omogoča ločevanje enako dolgih odsekov DNA, pomnoženih z univerzalnimi začetnimi oligonukleotidi, ki zaradi različnega zaporedja nukleotidov pri gelski elektroforezi z gradientom dajo različne elektroforetske vzorce, ki so odraz kompleksnosti sestave in stabilnosti proučevane črevesne mikrobiote (Smole Možina in Jeršek, 2001).

Poleg pomnoževanja mikrobne DNA s PCR je med najbolj razširjenimi temeljnimi molekularno-genetskimi pristopi za analize mikrobnih združb tudi hibridizacija, ki prav tako omogoča komplementarno vezanje nukleotidov (Smole Možina in Jeršek, 2001).

2.5.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

PCR je ena od molekularnih metod, ki se uporablja tudi za ugotavljanje mikroorganizmov v najrazličnejših ekosistemih, tudi živilih (Jeršek, 2003).

Princip metode je *in vitro* pomnožitev dela tarčne DNA z encimom DNA-polimerazo Taq v cikličnem termostatu (Slika 1). Optimalna temperatura delovanja encima je navadno 72 °C (nekateri encimi zahtevajo temperaturo 68 °C), encim pa ohranja svojo aktivnost tudi, če je krajši čas izpostavljen višjim temperaturam, na primer temperaturam, ki so potrebne za denaturacijo dvoverižne DNA.

Termostat zagotavlja zvezno spreminjanje temperature v ciklu, ki zajema tri faze. V prvi fazi poteče denaturacija oziroma razdvajanje dvoverižne DNA, v drugi fazi poteče prileganje začetnih oligonukleotidov, v tretji fazi pa podaljševanje verige. V vsakem ciklu se število tarčnih kopij podvoji. Izbira začetnih oligonukleotidov je odvisna od vrste PCR in vrste preiskovanih mikroorganizmov. Zaporedja baz adenin, timin, gvanin in citozin v začetnih oligonukleotidih so komplementarna delu tarčne DNA. Pomnožimo del tarčne DNA med izbranimi začetnima oligonukleotidoma.

Pomnožke PCR najenostavneje preverimo z gelsko elektroforezo, tako da njihovo velikost primerjamo z molekularnim označevalcem z znanimi velikostmi odsekov (Jeršek, 2003).

Glavni odliki metod, ki vključujejo PCR, sta specifičnost in občutljivost, ki izhajata iz strukturne narave molekul DNA in načina njihovega podvojevanja. Zato predvidevajo, da bodo te metode tudi v prihodnje predstavljale ključ za natančno analizo mikrobnih interakcij v prebavnem traktu, vključno s proučevanjem vloge probiotičnih bakterij v tem procesu. Poleg tega je danes PCR številnim raziskovalcem relativno dostopna tehnika, ki ne zahteva velikega tehnološkega vložka, daje pa dobre rezultate (Smole Možina in Jeršek, 2001).



Slika 1: Ciklična termostata za PCR: Mastercycler gradient Eppendorf in Gene Cyclyer BIO-RAD.

2.5.1.1 RAPD

RAPD je ena izmed metod odkrivanja in identifikacije mikroorganizmov na osnovi PCR, ki razlikuje seve iste vrste. Z nespecifičnimi (naključno izbranimi) začetnimi oligonukleotidi s PCR pomnožujemo dele DNA. Vzorci nastalih pomnožkov so značilni za posamezni sev in tako omogočajo razlikovanje testnih sevov od ostale bakterijske mikrobiote. Primerna je za analize velikega števila bakterijskih sevov v dokaj kratkem času (Torriani in sod., 1999).

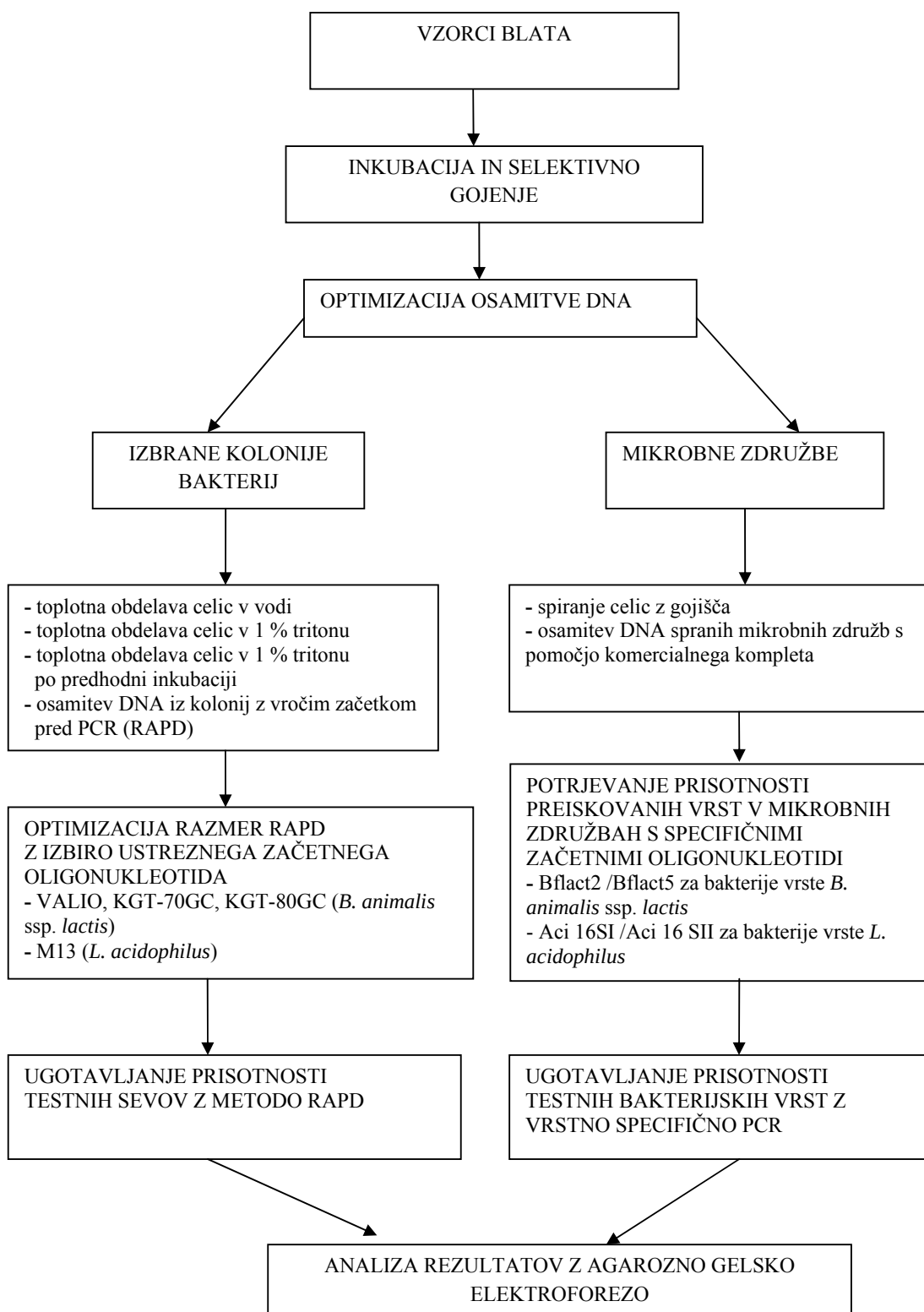
Edini pogoj pri izbiri začetnega oligonukleotida je, da se veže na komplementarna mesta tarčne verige DNA, ki niso oddaljena več kot 2000 bp. Literatura navaja uporabo naključno izbranih začetnih oligonukleotidov dolžine od 5 pa do 24 nukleotidov, najpogostejša pa je uporaba desetmernih enot. Uporablja se lahko en sam ali več naključno izbranih začetnih oligonukleotidov hkrati (Caetano Anolles, 1993).

Po analizi dobljenih pomnožkov z gelsko elektroforezo običajno dobimo kompleksen vzorec, ki ga imenujemo »fingerprint« ali prstni odtis. Tehnika sicer omogoča razlikovanje sevov iste vrste brez predhodnega poznavanja nukleotidnega zaporedja matrične DNA, slabost pa je slaba ponovljivost rezultatov. Avtorji omenjajo, da so profili RAPD ponovljivi, če so razmere PCR pomnoževanja natančno kontrolirane, reagenti, potrebni za pomnoževanje, pa vedno od istega proizvajalca. Standardizacija in optimizacija razmer reakcije pa poveča zahtevnost izvedbe, kar lahko nekoliko zasenči izhodiščne prednosti te tehnike (Gerritsen in sod., 1995).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 POTEK POSKUSA

Potek našega poskusa je bil razdeljen na dva dela. V prvem delu smo optimizirali postopek osamitve DNA in pogojev PCR ter RAPD. V drugem delu poskusa pa smo s pomočjo optimiziranih metod analizirali vzorce blata. Potek celotnega poskusa je prikazan na Sliki 2.



Slika 2: Potek poskusa

3.2 MATERIAL

3.2.1 Bakterijski sevi

3.2.1.1 Čiste kulture iz komercialnega probiotičnega preparata

V Preglednici 2 so prikazane razmere gojenja čistih kultur (pozitivne kontrole), osamljenih iz komercialnega probiotičnega preparata.

Dodatek antibiotikov v gojišče (klindamicin in ciprofloksacin pri bakterijah vrste *L. acidophilus* ter mupirocin pri bakterijah vrste *B. animalis* ssp. *lactis*), omogoča selektivnost gojišč za seve omenjenih vrst. Z dodatkom reducenta cistein hidroklorida v gojišče MRS, smo izboljšali pogoje za rast bifidobakterij.

Preglednica 2: Razmere gojenja za osamitev posameznega seva iz komercialnega preparata

Bakterija (pozitivna kontrola)	Selektivno gojišče	Gojenje
<u>Laktobacili</u> : <i>L. acidophilus</i>	MRS (pH 6,7) + klindamicin + ciprofloksacin	Anaerobno, 37 °C, 2 dni
<u>Bifidobakterije</u> : <i>B. animalis</i> ssp. <i>Lactis</i>	MRS (pH 6,7) + cistein hidroklorid + mupirocin	Anaerobno, 37 °C, 3 dni

3.2.1.2 Bakterije iz vzorcev blata

V Preglednici 3 so prikazane razmere gojenja bakterij iz vzorcev blata za analizo mikrobnih združb in posameznih kolonij.

Preglednica 3: Razmere gojenja posameznih skupin bakterij iz vzorcev blata.

Bakterije	Gojišče	Gojenje
Laktobacili	Rogosa + očetna kislina	Anaerobno, 37 °C, 2 dni
Bifidobakterije	MRS (pH 6,7) + cistein hidroklorid + mupirocin	Anaerobno, 37 °C, 3 dni

3.2.1.3 Vzorci blata

Osebe, ki jim je bila predpisana terapija z antibiotikom, so hkrati z antibiotikom ter teden dni po zadnjem odmerku antibiotika prejeli še predpisani odmerek probiotičnega preparata. Vzorci blata za analize so bili odvzeti pred prvo aplikacijo probiotičnega preparata in antibiotika (začetni vzorec blata), ter po zadnjem odmerku probiotičnega preparata (končni vzorec blata). Vzorci blata od 20-ih oseb so bili zbrani v posebne sterilne posodice za blato in v hladilni torbi prineseni v laboratorij. Nato so bili do analize shranjeni v zamrzovalniku na -20°C .

3.2.2 Gojišča

3.2.2.1 Trdno gojišče MRS

Trdno gojišče MRS smo pripravili iz tekočega gojišča MRS po navodilu proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija) in dodatka ustrezne količine agar-agarja (Merck). Zatehtani količini prašnega gojišča za pripravo tekočega gojišča MRS smo dodali ustrezno količino deionizirane in mikrofiltrirane vode, premešali ter gojišču umerili vrednost pH na 6,8. V tako pripravljeno tekoče gojišče smo dodali ustrezno količino agar-agarja (15 g/l) in ga avtoklavirali 15 min pri 118°C . Po avtoklaviranju je bila vrednost pH gojišča $6,2 \pm 0,2$. Potrebne dodatke oz. antibiotike smo v gojišča dodali neposredno pred njihovo uporabo.

- Trdno gojišče MRS (pH $6,2 \pm 0,2$) + cistein hidroklorid + mupirocin: selektivna izrast bifidobakterij iz komercialnega preparata in iz vzorcev blata
- Trdno gojišče MRS (pH $6,2 \pm 0,2$) + klindamicin + ciprofloksacin: selektivna izrast laktobacilov iz komercialnega preparata

3.2.2.2 Trdno gojišče Rogosa

Trdno gojišče Rogosa smo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck). Zatehtano količino gojišča smo zmešali z deionizirano in mikrofiltrirano vodo in mešanico segrevali do popolne raztopitve.

- Trdno gojišče Rogosa + očetna kislina: izrast laktobacilov iz vzorcev blata

3.2.2.3 Tekoče gojišče MRS

Tekoče gojišče MRS smo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck), ga razlili v stekleničke (po 200 mL) in avtoklavirali 15 min pri 118°C . Tekoče gojišče smo uporabljali za namnoževanje preiskovanih kultur.

3.2.3 Dodatki gojiščem

Dodatki gojiščem, s katerimi smo zagotovili selektivnost pogojev rasti preiskovanih bakterij, koncentracije njihovih založnih raztopin ter delovne koncentracije, so podani v Preglednici 4.

Preglednica 4: Dodatki gojiščem za zagotovitev selektivnosti pogojev rasti preiskovanih bakterij

Dodatek	Uporaba	Koncentracija založne raztopine	Delovna koncentracija
Antibiotik ciprofloksacin (Sigma, Nemčija)	Selektivna rast laktobacilov bakterij skupine <i>L. acidophilus</i>	2 mg / mL	1 mL / 200 mL trdnega gojišča MRS
Antibiotik mupirocin (Sigma, Nemčija)	Selektivna rast bifidobakterij	10 µg / mL	0,1 mL / 200 mL trdnega gojišča MRS
Antibiotik klindamicin (Sigma, Nemčija)	Selektivna rast laktobacilov bakterij skupine <i>L. acidophilus</i>	0,2 mg / mL	0,1 mL / 200 mL trdnega gojišča MRS
Reducent cistein hidroklorid (Merck, Nemčija)	Anaerobne razmere za rast bifidobakterij	0,05 g / mL	2 mL / 200 mL trdnega oz. tekočega gojišča MRS
Ocetna kislina (Fluka, Buchs, Švica)	Znižana vrednost pH - zaviranje večine bakterij, ne pa laktobacilov	/	260 µL / 200 mL trdnega gojišča Rogosa

Založne raztopine antibiotikov smo sterilizirali preko filtra z velikostjo por 0,22 µm (Sartorius®, Goettingen, Nemčija) ter jih do uporabe hranili pri -20 °C.

Vse dodatke smo v raztopljeni in primerno ohlajeni (45 – 50 °C) trdna gojišča dodajali neposredno pred uporabo.

3.2.4 Razredčevalne raztopine

3.2.4.1 Anaerobni diluent

Za zagotovitev anaerobnih razmer med razredčevanjem vzorcev smo pripravili anaerobni diluent.

Ob gretju in mešanju na mešalniku smo raztopili cistein (Merck) (0,557 g / L raztopine), NaCl (Merck) (8,5 g / L), pepton (Bioloife, Milano, Italija) (1 g / L) in želatino (Fluka, Buchs) (2 g / L). Raztopino smo razdelili v epruvete (po 9 ml za razredčevanje vzorcev) in stekleničke (po 200 mL za pripravo primarne razredčitve vzorcev) ter avtoklavirali.

3.2.5 Reagenti za barvanje po Gramu

Za barvanje po Gramu smo uporabili komplet Color Gram 2 (bioMerieux sa, Lyon, Francija), ki vsebuje naslednje reagente:

- Barvilo kristal vijolično,
- Lugol,
- Mešanica etanola in acetona (1:1),
- Barvilo safranin.

3.2.6 Reagenti za pripravo bakterijske DNA

3.2.6.1 Priprava DNA mikrobnih združb in DNA kontrolnih sevov iz preparata

- Komercialni komplet za izolacijo genomske DNA: Wizard® Genomic Purification Kit (Promega, Madison, ZDA),
- Izopropanol,
- 70 % etanol,
- 50 mM EDTA, pH = 8,0 (Sigma, Nemčija),
- Lizocim (10 mg/mL) in mutanolizin (2500 U/mL); (Sigma, Nemčija).

3.2.6.2 Priprava DNA posameznih kolonij

- 1 % triton X-100 (Sigma, St. Louis, ZDA),
- deionizirana in mikrofiltrirana voda,
- cistein hidroklorid,
- tekoče gojišče MRS .

3.2.7 Reagenti za RAPD in PCR

- Mešanica dNTP-jev, vsak v koncentraciji 10 mM (Fermentas, Nemčija),
- Komplet za PCR (Promega, Madison, Nemčija): GoTaq®DNA Polymerase, v koncentraciji reagenta 5U/μL; 5x Green GoTaq Reaction Buffer za polimerazo z MgCl₂ (koncentracija v reakcijski mešanici 1,5 mM); 5x Green GoTaq Flexi Buffer za polimerazo brez MgCl₂; 25mM MgCl₂,
- deionizirana in mikrofiltrirana voda.

Na Sliki 3 je prikazan komplet reagentov za PCR.



Slika 3: Komplet za PCR in mešanica dNTP-jev v hladilni škatli.

3.2.7.1 Začetni oligonukleotidi

Začetni oligonukleotidi, ki smo jih uporabili za izvedbo PCR oz. optimizacijo in izvedbo RAPD, njihova nukleotidna zaporedja ter velikosti nastalih pomnožkov, so zbrani v Preglednicah 5, 6 in 7.

Preglednica 5: Začetni oligonukleotidi za vrstno specifično PCR

Tarčna vrsta bakterij	Oznaka začetnega oligonukleotida	Nukleotidno zaporedje (5'- 3') začetnega oligonukleotida	Velikost pomnožka (bp)	Vir
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Aci 16SI	AGCTGAACCAACAGATTCAC	758	Walter in sod., 2000.
	Aci 16SII	ACTACCAGGGTATCTAATCC		
<i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i>	Bflact2	GTGGAGACACGGTTTCCC	680	Ventura in sod., 2001.
	Bflact5	CACACCACACAATCCAATAC		

Preglednica 6: Začetni oligonukleotidi za RAPD

Tarčna vrsta bakterij	Oznaka začetnega oligonukleotida	Nukleotidno zaporedje (5'- 3') začetnega oligonukleotida	Vir
Kontrolni sev vrste <i>Lactobacillus acidophilus</i>	M13	GAGGGTGGCGTTCT	Torriani in sod., 1999.
Kontrolni sev vrste <i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i>	KGT-80GC	CGCGTGCCCA	Katedra za mlekarstvo, Domžale
Kontrolni sev vrste <i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i>	KGT-70GC	AGCGGGCGTA	Katedra za mlekarstvo, Domžale
Kontrolni sev vrste <i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i>	VALIO	AGTCAGCCAC	Tynkkynen in sod., 1999.

Preglednica 7: Za rod specifični začetni oligonukleotidi za PCR

Tarčna vrsta bakterij	Oznaka začetnega oligonukleotida	Nukleotidno zaporedje (5'- 3') začetnega oligonukleotida	Velikost pomnožka (bp)	Vir
Rod <i>Lactobacillus</i>	LbLMA1-rev	CTCAAACTAAACAAAGTTTC	250	Dubernet in sod., 2002.
	R16-1	CTTGACACCGCCCGTCA		
Rod <i>Bifidobacterium</i>	Bif 164-f	GGGTGGTAATGCCGGATG	520	Satokari in sod., 2001.
	Bif 662-r	CCACCGTTACACCGGGAA		

3.2.8 Reagenti za analizo pomnožkov v agaroznem gelu

- 0,5x pufer TAE, pH= 8,0,
- Agaroz: SeaKem ® LE agarose (Lonza, Rockland, ZDA),
- Velikostna lestvica DNA: GeneRuler 100 bp DNA ladder in 1kb DNA ladder (0,1 µg/µL) (Fermentas),
- Barvilo SYBR Safe™ DNA gel stain (Invitrogen).

3.3 LABORATORIJSKA OPREMA

- Mastercycler gradient (Eppendorf) in Gene Cyclor (BIO-RAD),
- Komora za pripravo mešanic PCR (UV Sterilizing cabinets and workstation UVP),
- Centrifuga (mikro 22R, Hettich Zentrifugen, Nemčija; Sigma 3K18, Nemčija),
- Avtoklav (A- 21 CA Kambič, Slovenija),
- Digestorij (Modelle 80, Waldner, Nemčija),
- Inkubator (BT150, Marijan Krokter, Slovenija),
- SUB-CELL GT (BIO-RAD),
- Laboratorijska oprema: petrijeve plošče, steklovina, pipete, pincete, sterilni zobotrebeci, stojala, gorilnik, nastavki, mikro centrifugirke, kuhalnik, tehtnice,
- Mikrovalovna pečica (32 L Bosch, Nemčija),
- pH meter (Mettler Toledo MP 120, Mettler, Nemčija).

3.4 METODE

3.4.1 Priprava vzorcev

3.4.1.1 Osamitev posameznih sevov iz komercialnega probiotičnega preparata

- Zatehtano vsebino kapsule (0,5-1,0 g) komercialnega probiotičnega preparata smo resuspendirali v 10-kratni količini anaerobnega diluenta in dobili razredčitev 10^{-1} . Tako pripravljen vzorec smo z metodo po Kochu zaporedno redčili do razredčitve 10^{-8} in za nadaljnje analize uporabili razredčitve 10^{-6} , 10^{-7} in 10^{-8} .
- Za osamitev seva vrste *L. acidophilus* smo uporabili selektivno gojišče MRS + klindamicin + ciprofloksacin, medtem ko smo za osamitev seva vrste *B. animalis* ssp. *lactis* uporabili selektivno gojišče MRS + cistein hidroklorid + mupirocin. Vzorce ustreznih razredčitev smo na gojišča nanegli s tehniko razmaza, kjer smo na predhodno pripravljena in osušena gojišča razmazali po 0,1 mL ustreznih razredčitev, oziroma s tehniko prelivanja, kjer smo po 1 mL ustreznih razredčitev nanegli na petrijeve plošče in prelili s predhodno pripravljenim in raztopljenim gojiščem.
- Nacepljene plošče smo inkubirali v anaerobnih razmerah pri 37 °C, 2-3 dni.

3.4.1.2 Priprava vzorcev blata

- Manjšo količino odmrznjenega vzorca blata smo s plastično cepilno zanko prenesli v 3-4 mL anaerobnega diluenta ter premešali.

3.4.1.3 Osamitev posameznih bakterijskih vrst iz vzorcev blata

- Po 100 μ L resuspendiranega vzorca blata smo s tehniko razmaza nanesli na ustrezno selektivno gojišče. Za osamitev laktobacilov smo uporabili trdno gojišče Rogosa + očetna kislina, medtem ko smo za osamitev bifidobakterij uporabili trdno gojišče MRS + mupirocin + cistein hidroklorid.
- Nacepljene plošče smo v anaerobnih razmerah inkubirali pri 37 °C 2-3 dni.
- Posamezne kolonije izrasle po inkubaciji na tako pripravljenih gojiščih, smo naključno izbrali za nadaljnje analize RAPD.

Slika 4 prikazuje petrijeve plošče, nacepljene z vzorci blata, v škatlah z anaerobnimi razmerami med inkubacijo.



Slika 4: Petrijeve plošče, nacepljene z vzorci blata med inkubacijo v anaerobnih razmerah.

3.4.1.4 Priprava mikrobnih združb iz vzorcev blata

- Po inkubaciji smo na gojiščih izrasle kolonije sprali s približno 2 mL anaerobnega diluenta.
- Približno 1,0-1,5 mL tako pridobljenih vzorcev mikrobnih združb smo zbrali v mikro epruvetah, centrifugirali pri 18 000 obratih 2 minuti, zavrgli supernatant in zamrznili usedlino celic.

3.4.2 Morfološka analiza z barvanjem po Gramu

Z metodo barvanja po Gramu smo pod mikroskopom preverjali morfološke lastnosti laktobacilov in bifidobakterij, osamljenih tako iz komercialnega preparata, kot iz vzorcev blata.

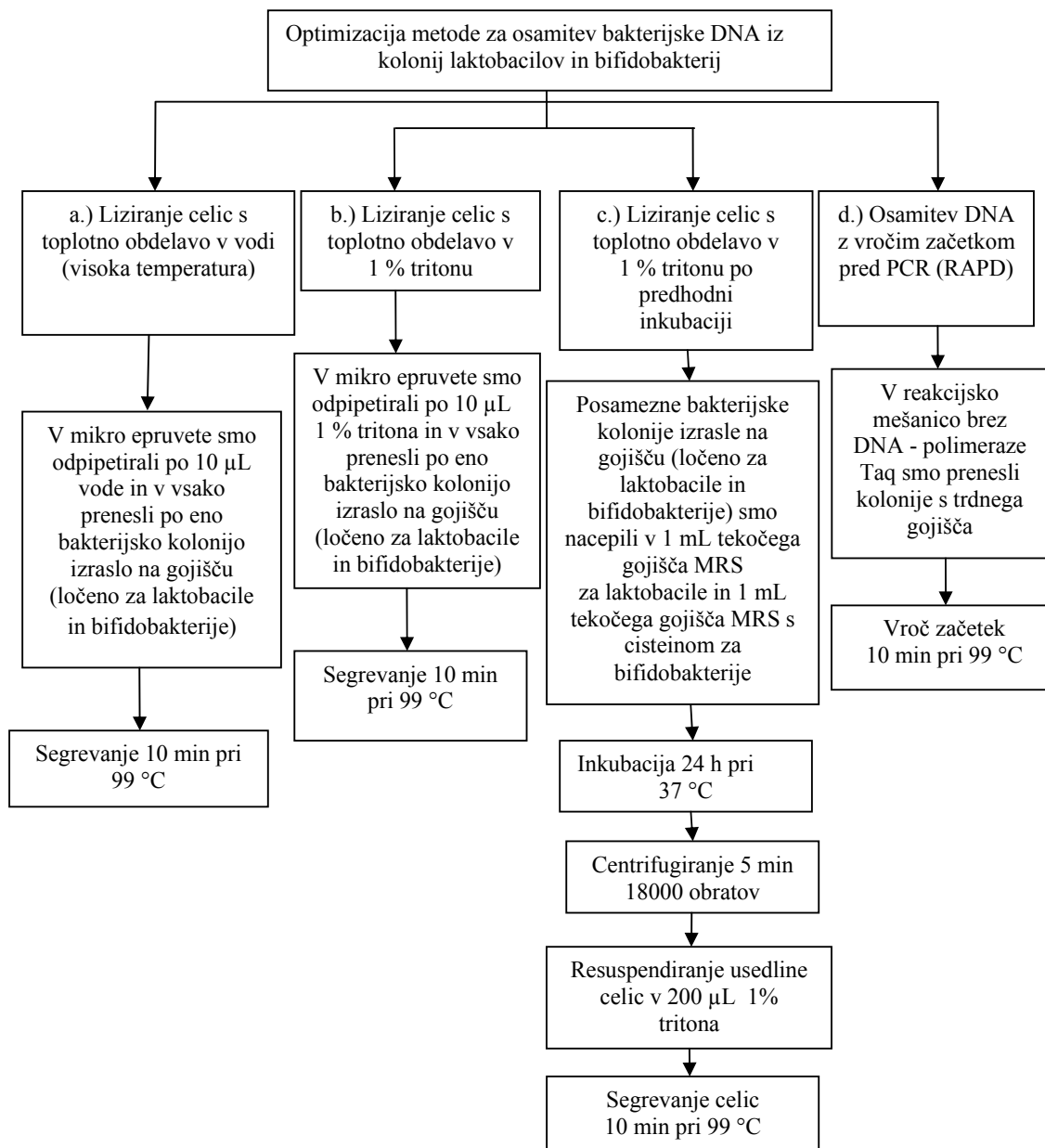
Potek fiksacije in barvanje po Gramu:

- Na objektno stekelce smo nanесли kapljico fiziološke raztopine za pripravo mokrega razmaza.
- Ob gorilniku smo na objektno stekelce s cepilno zanko v fiziološko raztopino vmešali bakterijsko kolonijo izraslo na gojišču s tehniko razmaza.
- Razmaz smo posušili na zraku ob gorilniku.
- Preparat smo fiksirali tako, da smo objektno stekelce trikrat hitro potegnili skozi plamen na gorilniku.
- Barvanje po Gramu smo izvedli po navodilih proizvajalca Bio-Merieux (Lyon, Francija):
 - Na fiksiran preparat smo nanесли barvilo kristal vijolično, ki smo ga po 1 minuti pazljivo sprali pod tekočo vodo.
 - Na preparat smo nato nanесли lugol, ki smo ga prav tako sprali po 1 minuti.
 - Preparat smo razbarvali z mešanico alkohola in acetona (1:1).
 - Preparat smo sprali pod tekočo vodo.
 - Na preparat smo nanесли še safranin, ki smo ga po 1 minuti sprali pod tekočo vodo.
 - Preparat smo pazljivo osušili s papirnato brisačko.
 - Na preparat smo pred mikroskopiranjem nanесли kapljico imerzijskega olja.

3.4.3 Priprava DNA

3.4.3.1 Optimizacija osamitve DNA iz posameznih kolonij za metodo RAPD

Ker smo želeli optimizirati metodo, smo DNA iz posameznih kolonij za RAPD osamili na 4 različne načine (Slika 5). DNA, osamljeno iz kolonij sevov iz preparata, smo za nadaljnje analize hranili pri -20 °C.



Slika 5: Prikaz načinov osamitve bakterijske DNA iz kolonij laktobacilov in bifidobakterij z namenom optimizacije postopka.

3.4.3.2 Osamitev DNA iz mikrobnih združb in kontrolnih sevov za PCR

- DNA iz predhodno pripravljene usedline celic mikrobnih združb smo osamili s pomočjo komercialnega kompleta za izolacijo genomske DNA Wizard® Genomic Purification Kit (Promega), ki je prikazan na Sliki 6.
- Tako osamljeno DNA smo uporabili kot tarčno DNA v PCR z začetnimi oligonukleotidi, specifičnimi za bakterije vrst *L. acidophilus* in *B. animalis* ssp. *lactis*.
- Tudi za osamitev DNA kontrolnih sevov iz preparata smo uporabili komplet za izolacijo genomske DNA Wizard® Genomic Purification Kit (Promega). Komercialni preparat smo nacepili na selektivna trdna gojišča MRS + cistein hidroklorid + mupirocin (selektivna izrast bifidobakterij) in MRS + klindamicin + ciprofloksacin (selektivna izrast laktobacilov) ter po inkubaciji precepili deset naključno izbranih kolonij z vsakega gojišča v tekoče gojišče MRS + cistein hidroklorid. Tako nacepljeno tekoče gojišče smo inkubirali ter po 18 urah uporabili po 2 mL izraslih celičnih suspenzij, kot izhodišče za osamitev DNA s pomočjo omenjenega kompleta.
- Osamljeno DNA kontrolnih sevov iz preparata smo prav tako uporabili kot tarčno DNA v PCR in RAPD.
- Do uporabe smo osamljeno DNA hranili pri -20 °C.



Slika 6: Komercialni komplet za izolacijo genomske DNA.

3.4.4 Priprava reakcijske mešanice za PCR in RAPD

Reakcijsko mešanico za PCR in RAPD smo pripravili v posebni komori za PCR, prikazani na Sliki 7. Pri delu smo uporabljali zaščitne rokavice za enkratno uporabo. Po končanem delu smo prostor razkužili in osvetlili z UV svetlobo za 30 min. Vse kemikalije, ki smo jih uporabili za pripravo mešanice PCR in RAPD, smo imeli ves čas na ledu. Glede na število vzorcev smo si izračunali volumne posameznih sestavin, potrebnih za mešanico.



Slika 7: Sterilni prostor za pripravo reakcijske mešanice za PCR in RAPD.

3.4.4.1 Priprava reakcijske mešanice za PCR za potrditev rodu *Bifidobacterium*

Ker smo želeli preveriti selektivnost gojišča za bifidobakterije (MRS + cistein hidroklorid + mupirocin), smo pri nekaterih vzorcih blata, poleg morfološke analize kolonij, nekaj naključno izraslih kolonij analizirali še s PCR z za rod *Bifidobacterium* specifičnimi začetnimi oligonukleotidi.

Reakcijsko mešanico PCR za en vzorec, v skupnem volumnu 20 μ L, smo pripravili:

- 4 μ L 5x zeleni GoTaq® Flexi Buffer (pufer),
- 2,4 μ L $MgCl_2$ (25mM),
- 0,3 μ L začetni oligonukleotid Bif 164-f (založna koncentracija 5 μ M),
- 0,3 μ L začetni oligonukleotid Bif 662-r (založna koncentracija 5 μ M),
- 0,2 μ L dNTP,
- 0,1 μ L GoTaq®DNA polimeraza,
- 10,7 μ L deionizirana in mikrofiltrirana voda.

Tej mešanici, razdeljeni v mikro epruvete, smo dodali po 2 μ L predhodno pripravljene DNA, ki smo jo osamili z liziranjem celic s toplotno obdelavo v 1 % tritonu po predhodni inkubaciji (Slika 5). Priprava reakcijske mešanice je prikazana na Sliki 8.



Slika 8: Priprava reakcijske mešanice PCR in razdelitev v mikro epruvete.

3.4.4.2 Priprava reakcijske mešanice za PCR za potrditev rodu *Lactobacillus*

Podobno kot za bifidobakterije, smo želeli preveriti tudi primernost in selektivnost gojišča Rogosa za laktobacile. Tudi tu smo nekaj naključno izbranih kolonij, izraslih iz nacepljenih vzorcev blata, analizirali s PCR, v kateri smo uporabili začetne oligonukleotide, specifične za rod *Lactobacillus*.

Reakcijsko mešanico za PCR za en vzorec, v skupnem volumnu 20 μL , smo pripravili:

- 4 μL 5x zeleni GoTaq® Reaction Buffer (pufer) z dodanim MgCl_2 (1,5 mM v reakcijski mešanici),
- 0,2 μL začetni oligonukleotid LbLMA1-rev (založna koncentracija 5 μM),
- 0,2 μL začetni oligonukleotid R16-1 (založna koncentracija 5 μM),
- 0,2 μL dNTP,
- 0,1 μL GoTaq®DNA polimeraza,
- 13,3 μL deionizirana in mikrofiltrirana voda..

Tej mešanici, razdeljeni v mikro epruvete, smo dodali po 2 μL predhodno pripravljene DNA, ki smo jo osamili z liziranjem celic s toplotno obdelavo v 1 % tritonu po predhodni inkubaciji (Slika 5).

3.4.4.3 Priprava reakcijske mešanice za RAPD s kontrolnim sevom za bakterije vrst *L. acidophilus* in *B. animalis* ssp. *lactis*

RAPD smo izvajali neposredno na koloniji. Optimizacija pogojev metode je obsegala optimizacijo osamitve DNA in ustrezno izbiro začetnega oligonukleotida. Ugotavljali smo primernost oligonukleotidov VALIO, KGT-70GC, KGT-80GC in M13. Na podlagi rezultatov smo izbrali začetni oligonukleotid KGT-80GC za identifikacijo preiskovanega seva vrste *B. animalis* ssp. *lactis* in začetni oligonukleotid M13 za identifikacijo seva vrste *L. acidophilus*.

Ugotavljali smo istovetnost petih kolonij iz posameznega vzorca blata s kontrolnima sevoma vrst *L. acidophilus* in *B. animalis* ssp. *lactis* iz komercialnega preparata.

Reakcijsko mešanico za RAPD, za en vzorec v skupnem volumnu 25 µL sestavlja:

- 6 µL 5x zeleni GoTaq® Flexi Buffer (pufer),
- 3 µL MgCl₂ (25mM),
- 0,2 µL dNTP,
- 0,3 µL začetni oligonukleotid M13 (založna koncentracija 5µM) (za identifikacijo seva vrste *L. acidophilus*) oziroma
0,3 µL začetni oligonukleotid KGT- 80GC (založna koncentracija 5µM) (za identifikacijo seva vrste *B. animalis* ssp. *lactis*),
- 15,5 µL deionizirana in mikrofiltrirana voda.

V reakcijsko mešanico brez DNA-polimeraze Taq, smo s sterilnim zobotrebcem aseptično prenesli del kolonije s trdnega gojišča (Slika 9). Vzorce smo prenesli v ciklični termostatat ter z vročim začetkom pri 99 °C 10 min in enkratni ponovitvi cikla izvedli lizo kolonij ter začetno denaturacijo DNA.



Slika 9: Prenos posameznih kolonij s sterilnim zobotrebcem z gojišča v mikro epruvete z reakcijsko mešanico za RAPD na osnovi kolonije.

Po začetni denaturaciji DNA smo prekinili reakcijo in vsakemu vzorcu dodali mešanico 0,1 μ L DNA-polimeraze Taq in 4,9 μ L deionizirane in mikrofiltrirane vode. Končna količina mešanice z vsemi reagenti ter dodano mešanico DNA-polimeraze Taq in vode, je znašala 30 μ L. Nato smo izvedli RAPD po protokolu, navedenem v Prilogi C3 in C4 (lastna konstrukcija, povzeta po Torriani in sod., 1999 in modificirana po raziskavi Lerner in Carter, 1995).

3.4.4.4 Priprava reakcijske mešanice za PCR za preverjanje prisotnosti bakterij vrst *L. acidophilus* in *B. animalis* ssp. *lactis* v mikrobnih združbah

Z uporabo oligonukleotidnih parov Bflact2/Bflact5 za bakterije vrste *B. animalis* ssp. *lactis* in Aci 16SI/16SII za bakterije vrste *L. acidophilus* smo preverjali prisotnost omenjenih vrst v mikrobnih združbah, pripravljenih iz nacepljenih vzorcev blata.

Reakcijsko mešanico PCR za en vzorec, v skupnem volumnu 30 μ L, sestavlja:

- 6 μ L 5x GoTaq®Reaction Buffer (pufer) z dodanim $MgCl_2$ (1,5 mM v reakcijski mešanici),
- 0,3 μ L dNTP,
- 0,1 μ L GoTaq®DNA polimeraza,
- 0,3 μ L začetni oligonukleotid Aci 16SI + 0,3 μ L začetni oligonukleotid Aci 16SII (založna koncentracija 5 μ M) (za bakterije vrste *L. acidophilus*)
oziroma
0,3 μ L začetni oligonukleotid Bflact2 + 0,3 μ L začetni oligonuklotid Bflact5 (založna koncentracija 5 μ M) (za bakterije vrste *B. animalis* ssp. *lactis*),
- 22,5 μ L deionizirana in mikrofiltrirana voda. .

Tej mešanici, razdeljeni v mikro epruvete, smo dodali po 0,5 μ L DNA, predhodno pripravljene iz mikrobnih združb (Poglavje 3.4.3.2).

3.4.5 Razmere PCR in RAPD

Mikro epruvete z ustreznim volumnom pripravljene reakcijske mešanice smo prenesli v ciklični termostat (Eppendorf Mastercycler gradient ali BIO-RAD Gene Cycler) ter za posamezno PCR ali RAPD vnesli razmere, ki so prikazane v preglednicah Priloge C (od C1 do C6).

3.4.6 Gelska elektroforeza

Vse pomnožke, ki smo jih dobili s PCR ali RAPD z različnimi oligonukleotidi in pri različnih razmerah, smo analizirali s pomočjo gelske elektroforeze. V analizi smo uporabili po 10 µL pomnožkov PCR oziroma RAPD.

Pripravili smo 1,8 % agarozni gel iz agaroze in 0,5x pufra TAE (pH 8). S segrevanjem smo raztopili agarozo v pufu do bistre raztopine, jo vlili v model za izdelavo agaroznega gela, počakali, da se strdi ter ga prenesli v elektroforezno banjico z 0,5x pufrom TAE (pH 8) (Slika 10).



Slika 10: Banjica za potek elektroforeze in model z glavnikom za izdelavo agaroznega gela.

V žepke pripravljenega agaroznega gela smo nanесли po 10 µL pomnožkov, pridobljenih s PCR (RAPD) z DNA testnih vzorcev ter pomnožke pozitivnih kontrol, pripravljenih z DNA kontrolnih sevov, osamljenih iz komercialnega probiotičnega preparata (Poglavje 3.4.3.2). Nanos vzorcev v žepke na agaroznem gelu je prikazan na Sliki 11.



Slika 11: Nanos vzorcev v žepke na agaroznem gelu in potek elektroforeze.

Za ovrednotenje velikosti pomnožkov PCR (RAPD), smo na gel vedno nanesli še po 2,5 μ L velikostnih lestvic DNA 100 bp in 1 kb.

Elektroforeza je potekala pri 100 V približno 1,5 h, odvisno od velikosti gela in produktov. Po končani elektroforezi smo gel za 30 minut izpostavili delovanju barvila SYBR Safe™, pri čemer se je barvilo vezalo na nukleotide pomnoženih odsekov DNA. Velikost in specifičnost pomnožkov PCR (RAPD) smo preverili pod UV-svetlobo, pod katero je barvilo SYBR Safe™ fluoresciralo. Gel smo računalniško dokumentirali in analizirali pomnožke .

4 REZULTATI

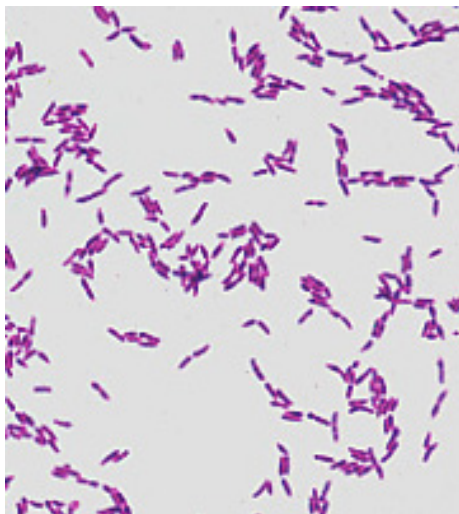
4.1 MORFOLOŠKA ANALIZA LAKTOBACILOV IN BIFIDOBAKTERIJ

S primerjavo morfologije kolonij, osamljenih iz komercialnega preparata in iz vzorcev blata, smo ugotovili, da imajo tako kolonije iz rodu *Lactobacillus* kot iz rodu *Bifidobacterium* značilen izgled.

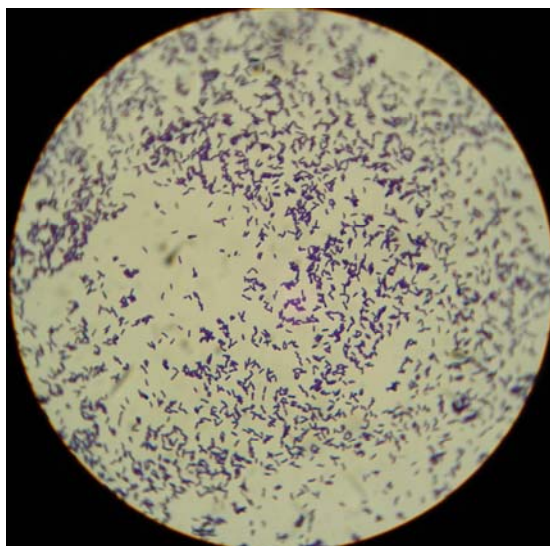
Po Gramu pobarvane preparate smo si ogledali pri 1000- kratni povečavi. Oba preiskovana mikroorganizma sta po Gramu pozitivna.

Bakterije rodu *Lactobacillus* so bile v obliki dolgih, modro-vijoličnih paličic (Slika 12), medtem ko so bile bakterije rodu *Bifidobacterium* značilnih razvejanih oblik, prav tako modro-vijolične barve (Slika 13).

Kolonije bifidobakterij, ki so izrasle na ploščah, so bile gladke in svetleče, medtem ko so bili pri laktobacilih robovi kolonij hrapavi in površina nesvetleča.



Slika 12: Mikroskopski preparat bakterij iz rodu *Lactobacillus* (Foto: Todar K., 2006).



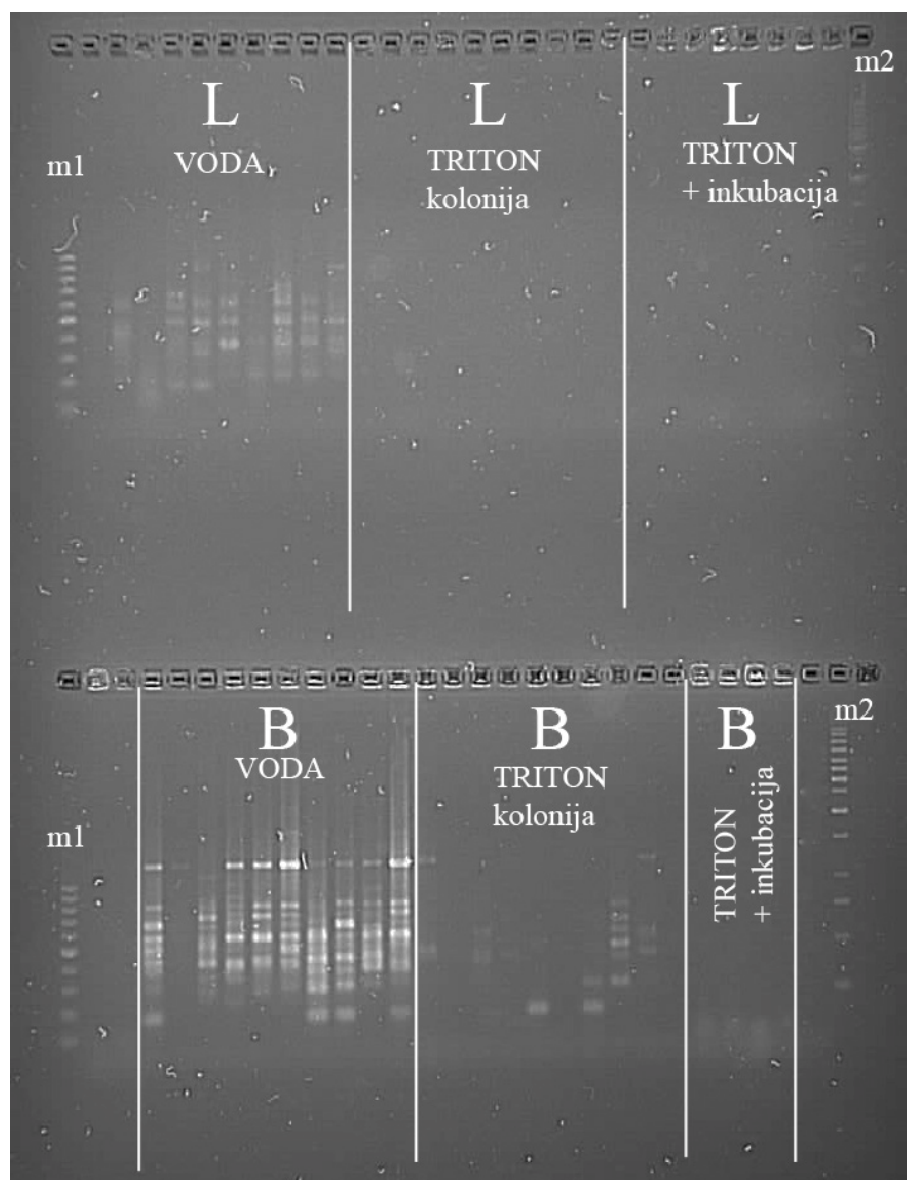
Slika 13: Mikroskopski preparat bakterij iz rodu *Bifidobacterium*.

4.2 REZULTATI RAPD

4.2.1 Rezultati optimizacije osamitve DNA iz kolonij izraslih iz analiziranih vzorcev blata

Iz kolonij, izraslih iz analiziranih vzorcev blata, smo za nadaljnje analize osamili DNA. Korak osamitve DNA iz posameznih kolonij smo najprej optimizirali.

Analizirali smo štiri načine osamitve DNA in sicer smo celice lizirali s toplotno obdelavo (visoka temperatura) v vodi, s toplotno obdelavo v tritonu, s toplotno obdelavo v tritonu po predhodni inkubaciji ter neposredno z vročim začetkom pred RAPD. Za vsako metodo smo uporabili 10 kolonij čistih kultur bakterij vrst *L. acidophilus* in *B. animalis* ssp. *lactis*, osamljenih iz komercialnega preparata, v kombinaciji z različnimi začetnimi oligonukleotidi. Prvotno smo najbolj jasen vzorec pomnožkov dobili z uporabo DNA, osamljene z lizo celic s toplotno obdelavo v vodi. Kasneje se je kot boljša metoda izkazala neposredna osamitev DNA z vročim začetkom pred PCR (RAPD), ki smo jo uporabili za osamitev DNA iz posameznih kolonij pri vseh nadaljnjih analizah. Slika 14 prikazuje rezultate pomnoževanja DNA, osamljene s tremi različnimi, prvotno analiziranimi postopki ob uporabi začetnega oligonukleotida M13.



Slika 14: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov RAPD z začetnim oligonukleotidom M13 po različnih načinih priprave DNA.

Legenda:

L – *Lactobacillus acidophilus*

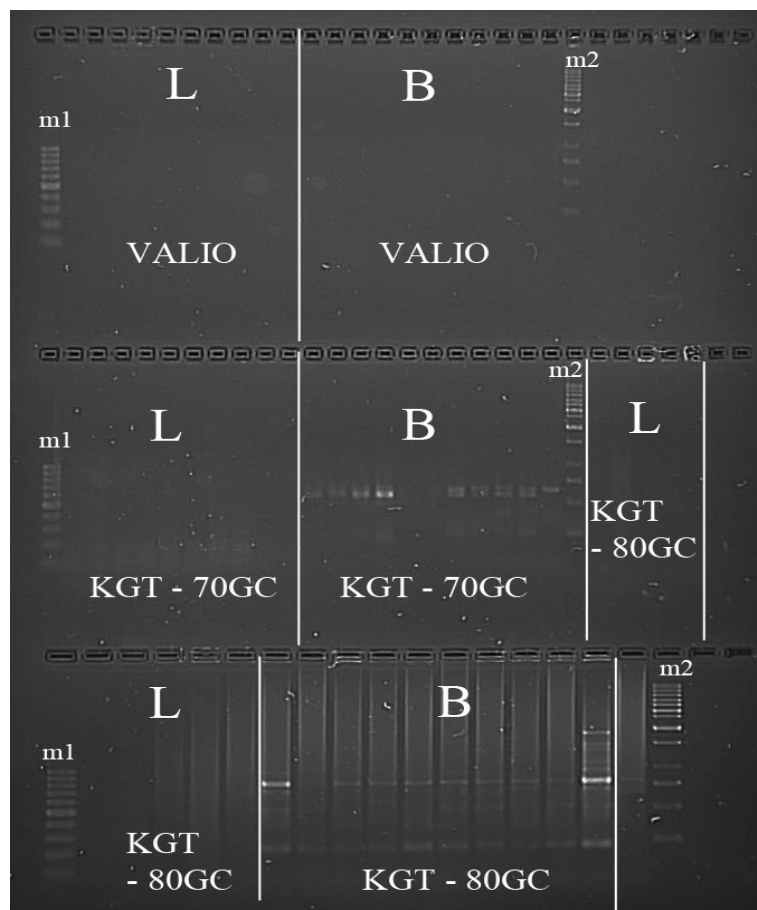
B – *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*

m1 – velikostna lestvica DNA 100 bp

m2 – velikostna lestvica DNA 1kb

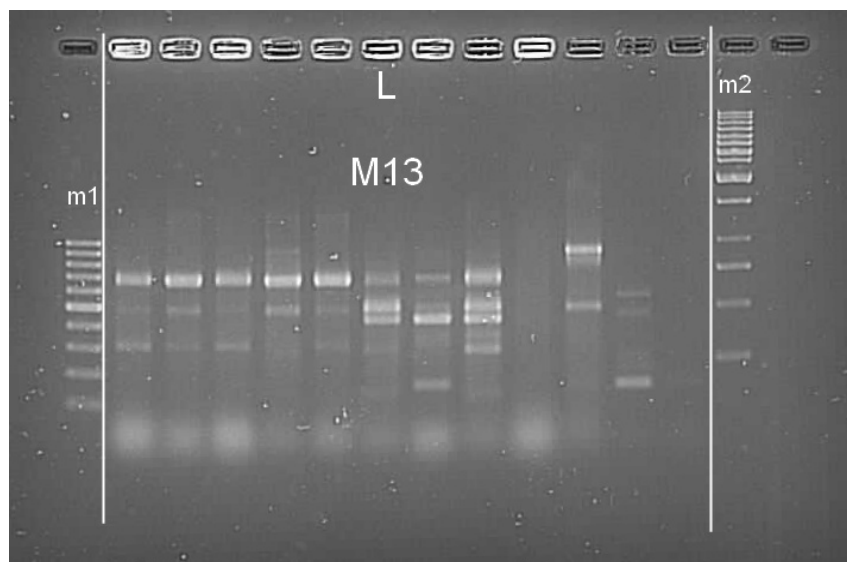
4.2.2 Rezultati optimizacije izbire ustreznega začetnega oligonukleotida za RAPD

Za razlikovanje testnih sevov bakterij vrst *L. acidophilus* in *B. animalis* ssp. *lactis* smo uporabili RAPD, ki pa smo jo najprej optimizirali. Z metodo RAPD smo z DNA kontrolnih sevov preizkušali začetne oligonukleotide VALIO, KGT-70GC, KGT-80GC in M13. Pri uporabi začetnih oligonukleotidov VALIO, KGT-70GC in KGT-80GC, smo DNA osamili z liziranjem celic s toplotno obdelavo v vodi (Slika 5, postopek a), pri uporabi začetnega oligonukleotida M13 pa smo DNA osamili z vročim začetkom pred PCR (RAPD) (Slika 5, postopek d). Izkazalo se je, da je za identifikacijo seva bakterijske vrste *B. animalis* ssp. *lactis* najprimernejši oligonukleotid KGT-80GC, medtem ko se je za identifikacijo seva bakterijske vrste *L. acidophilus* najbolje izkazal začetni oligonukleotid M13. Z obema začetnima oligonukleotidoma za posamezni sev, smo dobili najbolj jasni prstni odtis (fingerprint) (Slika 15) in najboljšo ponovljivost metode RAPD. Rezultati pomnožkov RAPD s preizkušenimi posameznimi začetnimi oligonukleotidi so prikazani na Sliki 15.



Se nadaljuje.

Slika 15: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov RAPD s preizkušanjem najprimernejšega začetnega oligonukleotida in različnimi načini priprave DNA.



Nadaljevanje Slike 15: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov RAPD s preizkušanjem najprimernejšega začetnega oligonukleotida in različnimi načini priprave DNA.

Legenda:

L – *Lactobacillus acidophilus*

B – *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*

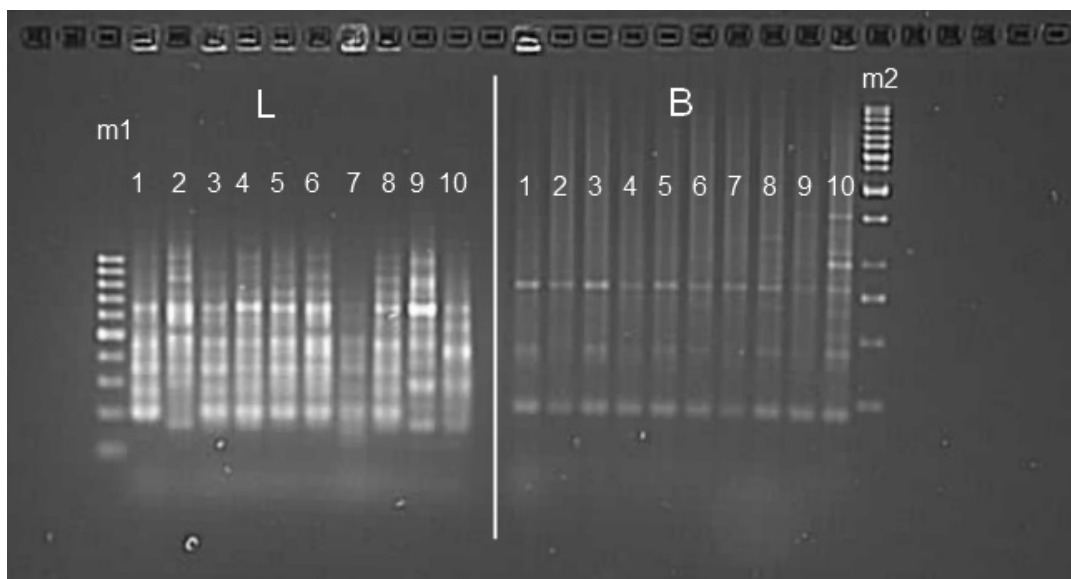
m1 – velikostna lestvica DNA 100 bp

m2 – velikostna lestvica DNA 1 kb

VALIO, KGT-80GC, KGT-70GC, M13 – oznake začetnih oligonukleotidov

4.2.3 Rezultati optimizirane metode RAPD za pozitivne kontrole, pripravljene iz komercialnega probiotičnega preparata

Za primerjavo pomnožkov RAPD vzorcev blata in preverjanje istovetnosti preiskovanih sevov bakterij, smo pripravili pozitivne kontrole iz analiziranega probiotičnega preparata. DNA je bila osamljena s kompletom za izolacijo genomske DNA (Poglavje 3.4.3.2). Slika 16 prikazuje rezultate pomnožkov RAPD pozitivnih kontrol za preiskovane seve bakterij vrste *L. acidophilus* z začetnim oligonukleotidom M13 in pozitivne kontrole za seve bakterij vrste *B. animalis* ssp. *lactis* z začetnim oligonukleotidom KGT-80GC. Pozitivne kontrole za preiskovane seve obeh vrst, smo uporabljali pri vseh nadaljnjih analizah.



Slika 16: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov RAPD pozitivnih kontrol sevov bakterij vrst *L. acidophilus* in *B. animalis* ssp. *lactis*.

Legenda:

L (1-10) – *L. acidophilus*

B (1-10) – *B. animalis* ssp. *lactis*

m1 – velikostna lestvica DNA 100 bp

m2 – velikostna lestvica DNA 1kb

4.2.4 Ugotavljanje istovetnosti kolonij iz vzorcev blata s sevom vrste *B. animalis* ssp. *lactis* iz probiotičnega preparata

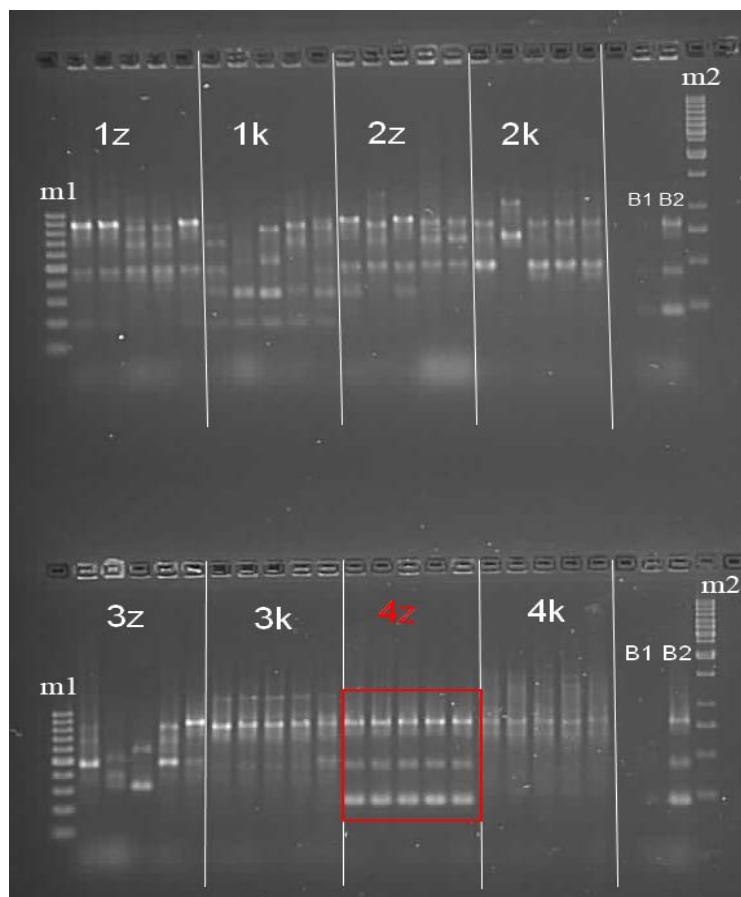
Z RAPD smo ugotavljali istovetnost petih naključno izbranih kolonij, izraslih iz vzorcev blata, s kontrolnim sevom vrste *B. animalis* ssp. *lactis*, ki ga vsebuje komercialni probiotični preparat. Z uporabljenim začetnim oligonukleotidom KGT-80GC smo dobili pozitivne rezultate (vsaj eno kolonijo identično preiskovanemu sevu) pri dveh začetnih vzorcih in dveh končnih vzorcih od skupno 20 začetnih (100 kolonij) in 20 končnih (100 kolonij) analiziranih vzorcev. Pri nobenem primeru začetnega in končnega vzorca ni šlo za isto osebo. Tako smo potrdili identičnost seva pri teh vzorcih. V Preglednici 8 so prikazani vzorci, pri katerih smo zabeležili pozitiven rezultat. Pozitivni rezultati (pomnožki RAPD) in vzorci pri katerih smo identificirali prisotnost iskanega seva bifidobaterij, so zbrani in označeni z rdečo obrobo na Sliki 17. Vsi negativni rezultati pomnožkov RAPD za sev vrste *B. animalis* ssp. *lactis* so prikazani v Prilogi A.

Preglednica 8: Rezultati RAPD za ugotavljanje seva vrste *B. animalis* ssp. *lactis*.

Številka osebe	Bifidobakterije	
	RAPD na kolonijah	
	začetni vzorec	končni vzorec
4	5+/5	0/5
5	2+/5	0/5
11	0/5	4+/5
16	0/5	1+/5

Legenda:

1+/5, 2+/5, 4+/5, 5+/5 : v vzorcu smo našli 1, 2, 4 oziroma 5 kolonij, identičnih preiskovanemu komercialnemu sevu



Se nadaljuje.

Slika 17: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov RAPD z začetnim oligonukleotidom KGT-80GC za preiskovani sev vrste *B. animalis* ssp. *lactis*.

Legenda:

z – začetni vzorec

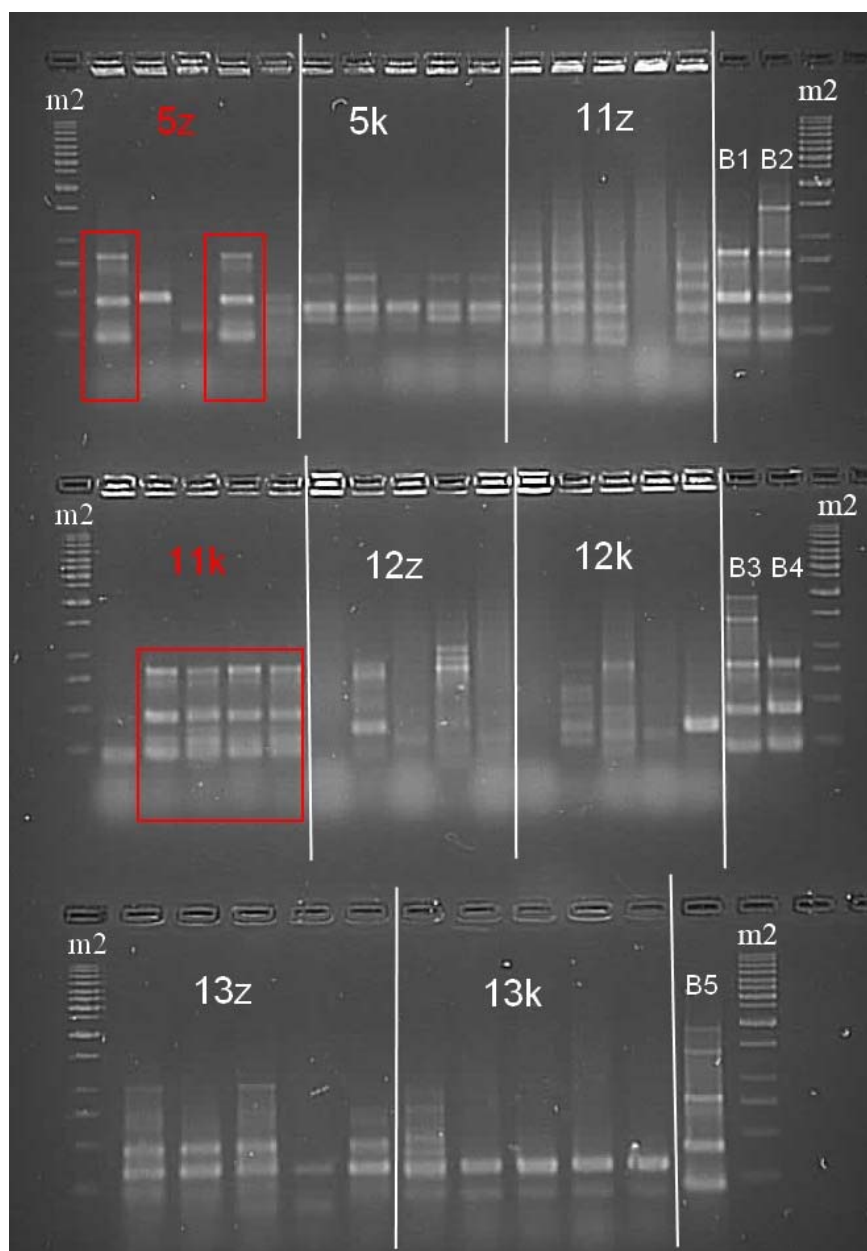
k – končni vzorec

rdeče označene številke – zaporedne številke oseb in pozitivni rezultati

B1, B2 – pozitivni kontroli iz komercialnega preparata

m1 – velikostna lestvica DNA 100 bp

m2 – velikostna lestvica DNA 1 kb



Se nadaljuje.

Nadaljevanje Slike 17: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov RAPD z začetnim oligonukleotidom KGT-80GC za preiskovani sev vrste *B. animalis* ssp. *lactis*.

Legenda:

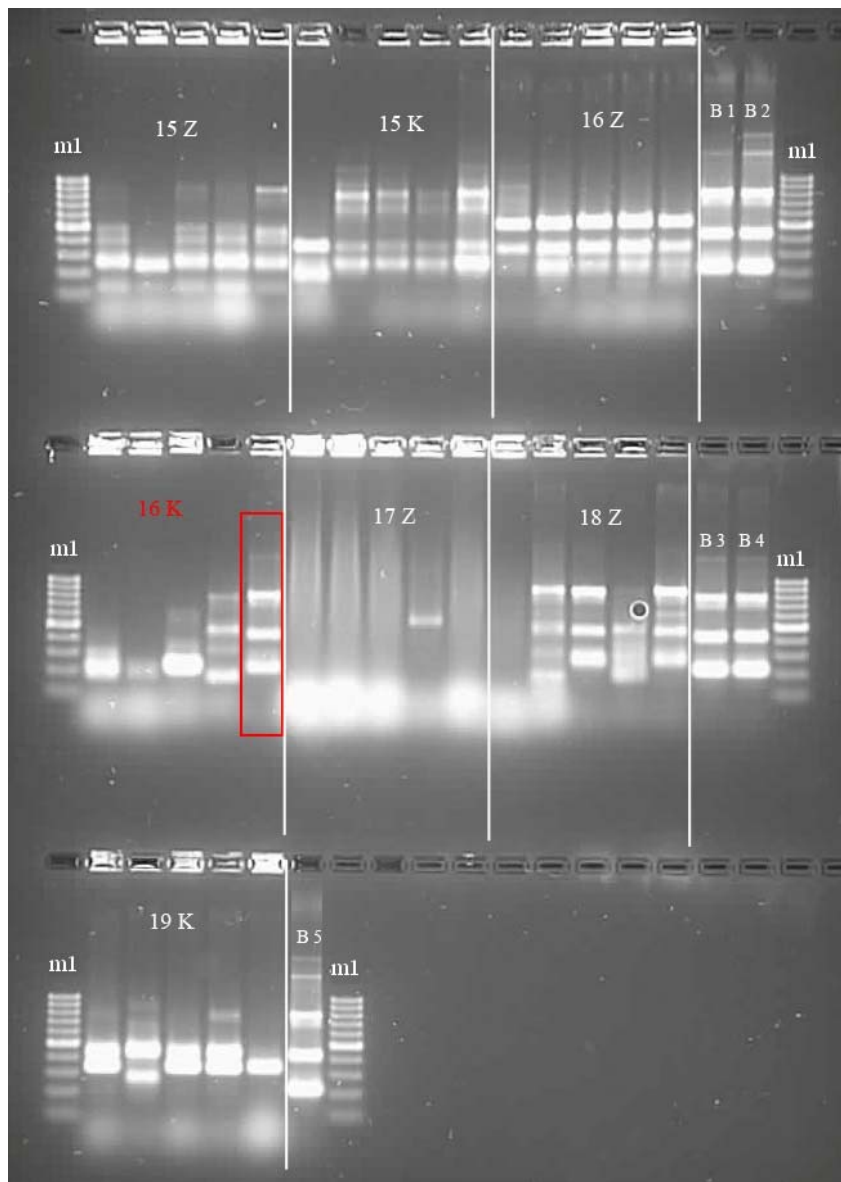
z – začetni vzorec

k – končni vzorec

rdeče označene številke - zaporedne številke oseb in pozitivni rezultati

B1 – B5 – pozitivne kontrole iz komercialnega preparata

m2 – velikostna lestvica DNA 1 kb



Nadaljevanje Slike 17: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov RAPD z začetnim oligonukleotidom KGT-80GC za preiskovani sev vrste *B. animalis* ssp. *lactis*.

Legenda:

z – začetni vzorec

k – končni vzorec

rdeče označene številke – zaporedne številke oseb in pozitivni rezultati

B1 – B5 – pozitivne kontrole iz komercialnega preparata

m1 - velikostna lestvica DNA 100 bp

4.2.5 Ugotavljanje istovetnosti kolonij iz vzorcev blata s sevom vrste *L. acidophilus* iz probiotičnega preparata

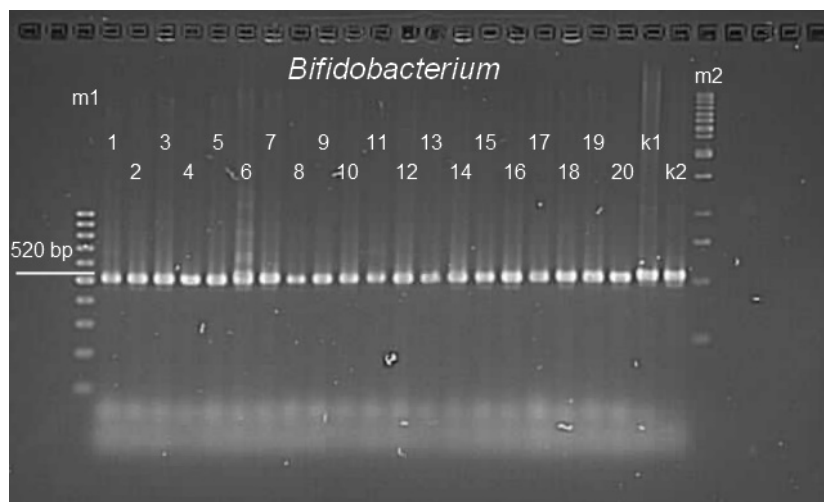
Z RAPD smo ugotavljali istovetnost petih naključno izbranih kolonij, izraslih iz vzorcev blata, s sevom vrste *L. acidophilus*, ki ga vsebuje preiskovani komercialni probiotični preparat. Uporabili smo začetni oligonukleotid M13, vendar nismo uspeli pri nobenem od skupno 20 začetnih in 19 končnih analiziranih vzorcev (pri enem končnem vzorcu, zaradi premajhne količine vzorca, analiza ni bila mogoča) na podlagi RAPD pomnožkov, potrditi identičnosti seva s komercialnim sevom v probiotičnem preparatu. Vsi negativni rezultati pomnožkov RAPD za sev vrste *L. acidophilus* so prikazani v Prilogi B.

4.3 REZULTATI PCR

4.3.1 Rezultati PCR za potrditev rodu bakterij

Ker smo želeli preveriti selektivnost gojišč za bifidobakterije in laktobacile, smo s PCR in uporabo specifičnih začetnih oligonukleotidov za rod *Bifidobacterium* in *Lactobacillus* preverili nekaj naključno izbranih kolonij, ki so izrasle iz nacepljenih vzorcev blata. Za potrjevanje rodu *Bifidobacterium* smo uporabili začetna oligonukleotida Bif 164-f in Bif 662-r, za potrjevanje rodu *Lactobacillus* pa začetna oligonukleotida LbLMA1-rev in R16-1. Pri vseh analiziranih vzorcih smo dobili pozitivne rezultate, identične kontrolnemu vzorcu iz probiotičnega preparata. Velikost produktov je znašala 520 bp za rod *Bifidobacterium* in 250 bp za rod *Lactobacillus*.

S potrditvijo pripadnosti analiziranih kolonij rodu *Bifidobacterium* oz. *Lactobacillus*, smo potrdili primernost in selektivnost izbranih gojišč, Rogosa za laktobacile ter MRS + mupirocin + cistein hidroklorid za bifidobakterije. Sliki 18 in 19 prikazujeta rezultate pomnoževanja DNA kolonij iz blata z oligonukleotidi, specifičnimi za posamezen rod.



Slika 18: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov PCR z začetnimi oligonukleotidi, specifičnimi za rod *Bifidobacterium*.

Legenda:

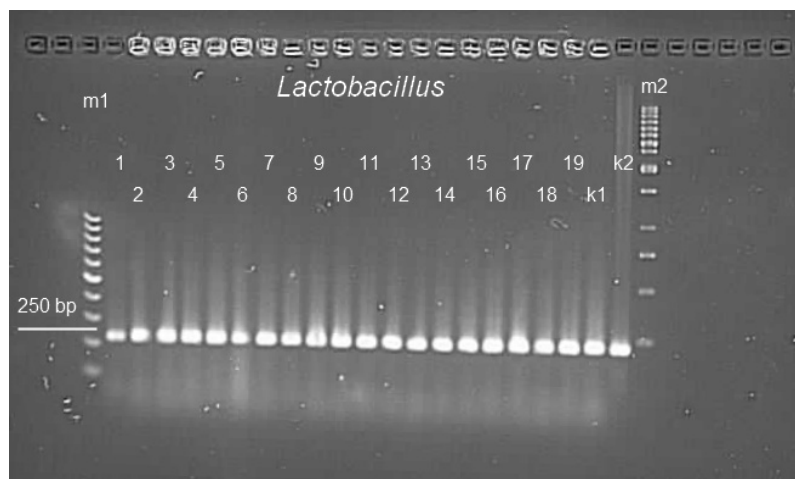
m1- velikostna lestvica DNA 100 bp

m2 – velikostna lestvica DNA 1 kb

od 1 do 20 - vzorci DNA, PCR pomnožki velikosti 520 bp

k1 - pozitivna kontrola za rod *Bifidobacterium* (iz probiotičnega preparata)

k2 – pozitivna kontrola za rod *Bifidobacterium* (iz mikrobne zbirke Katedre za mlekarstvo)



Slika 19: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov PCR z začetnimi oligonukleotidi, specifičnimi za rod *Lactobacillus*

Legenda:

m1- velikostna lestvica DNA 100 bp

m2 – velikostna lestvica DNA 1 kb

od 1 do 19 - vzorci DNA, PCR pomnožki velikosti 250 bp

k1 - pozitivna kontrola za rod *Lactobacillus* (iz probiotičnega preparata)

k2 – pozitivna kontrola za rod *Lactobacillus* (iz mikrobne zbirke Katedre za mlekarstvo)

4.3.2 Rezultati PCR za ugotavljanje prisotnosti bakterij vrste *B. animalis* ssp. *lactis* v mikrobnih združbah

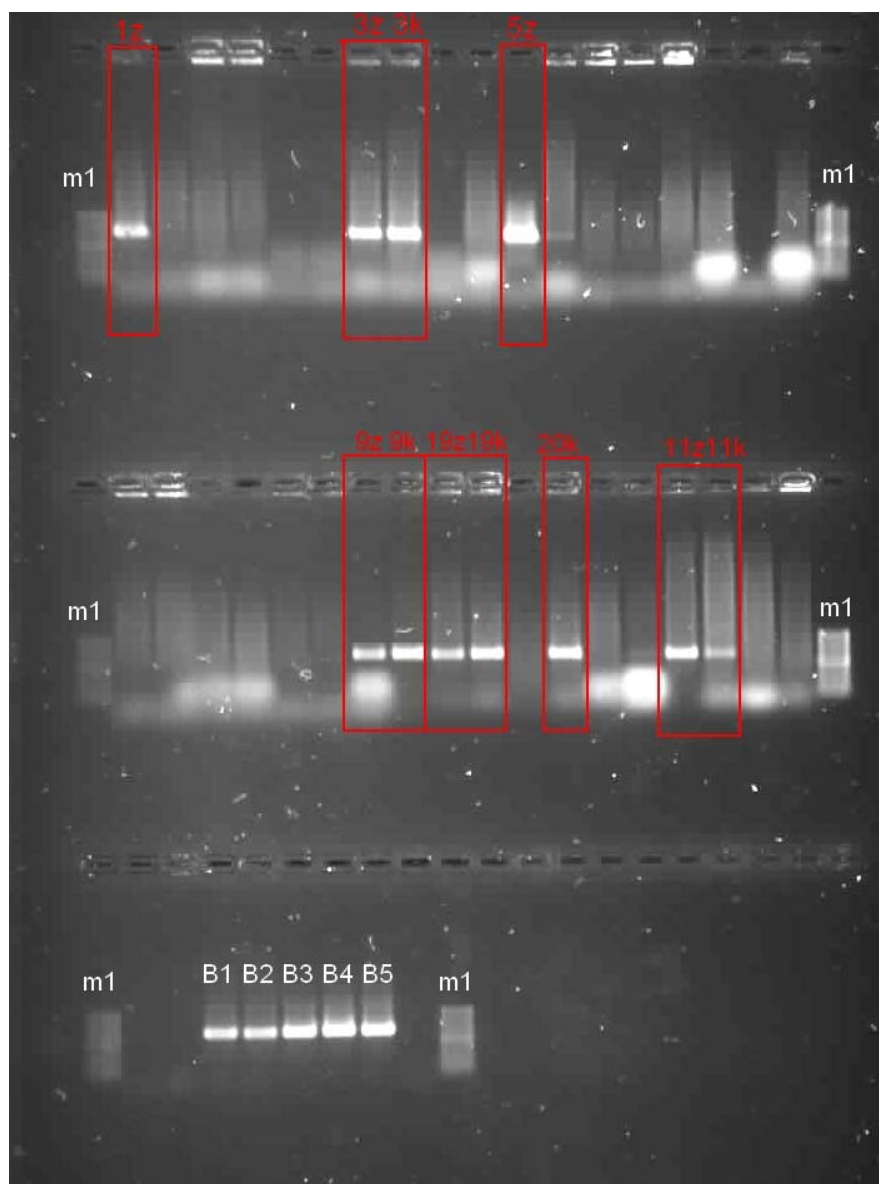
S PCR smo ugotavljali prisotnost bakterij vrste *B. animalis* ssp. *lactis* v mikrobnih združbah, ki smo jih pripravili s spiranjem kolonij, izraslih na ploščah iz nacepljenih vzorcev blata. Z uporabljenima začetnima oligonukleotidoma Bflact2 in Bflact5 smo dobili pozitivne rezultate, to je pomnožke velikosti 680 bp, pri 6 začetnih vzorcih in 7 končnih od skupno 19 začetnih in 19 končnih analiziranih vzorcev. V 5-ih primerih začetnega in končnega vzorca je šlo za isto osebo. S tem smo potrdili prisotnost pripadnikov bakterij vrste *B. animalis* v 13-ih vzorcih blata. Za analizo je bilo predvideno 20 začetnih in 20 končnih vzorcev, vendar pri 1 začetnem in 1 končnem vzorcu analiza in priprava mikrobne združbe zaradi premajhne količine vzorca ni bila mogoča.

V Preglednici 9 so prikazani vzorci, pri katerih smo zabeležili pozitiven rezultat. Pozitivni rezultati (pričakovano veliki in specifični pomnožki PCR) in vzorci pri katerih smo potrdili testno vrsto, so zbrani in označeni z rdečo obrobo na Sliki 20.

Preglednica 9: Rezultati PCR za ugotavljanje bakterij vrste *B. animalis* ssp. *lactis* v mikrobni združbi začetnih in končnih vzorcev blata.

Številka osebe	Bifidobakterije	
	PCR za ugotavljanje vrste	
	začetni vzorec blata	končni vzorec blata
1	+	-
3	+	+
5	+	+
9	+	+
10	-	+
11	+	+
19	+	+
20	-	+

Legenda:
 oznaka + pomeni pozitiven rezultat, PCR
 pomnožek velikosti 680 bp
 oznaka – pomeni negativen rezultat, ni pomnožka



Se nadaljuje.

Slika 20: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov PCR z začetnima oligonukleotidoma Bflact2 in Bflact5 za bakterije vrste *B. animalis* ssp. *lactis*.

Legenda:

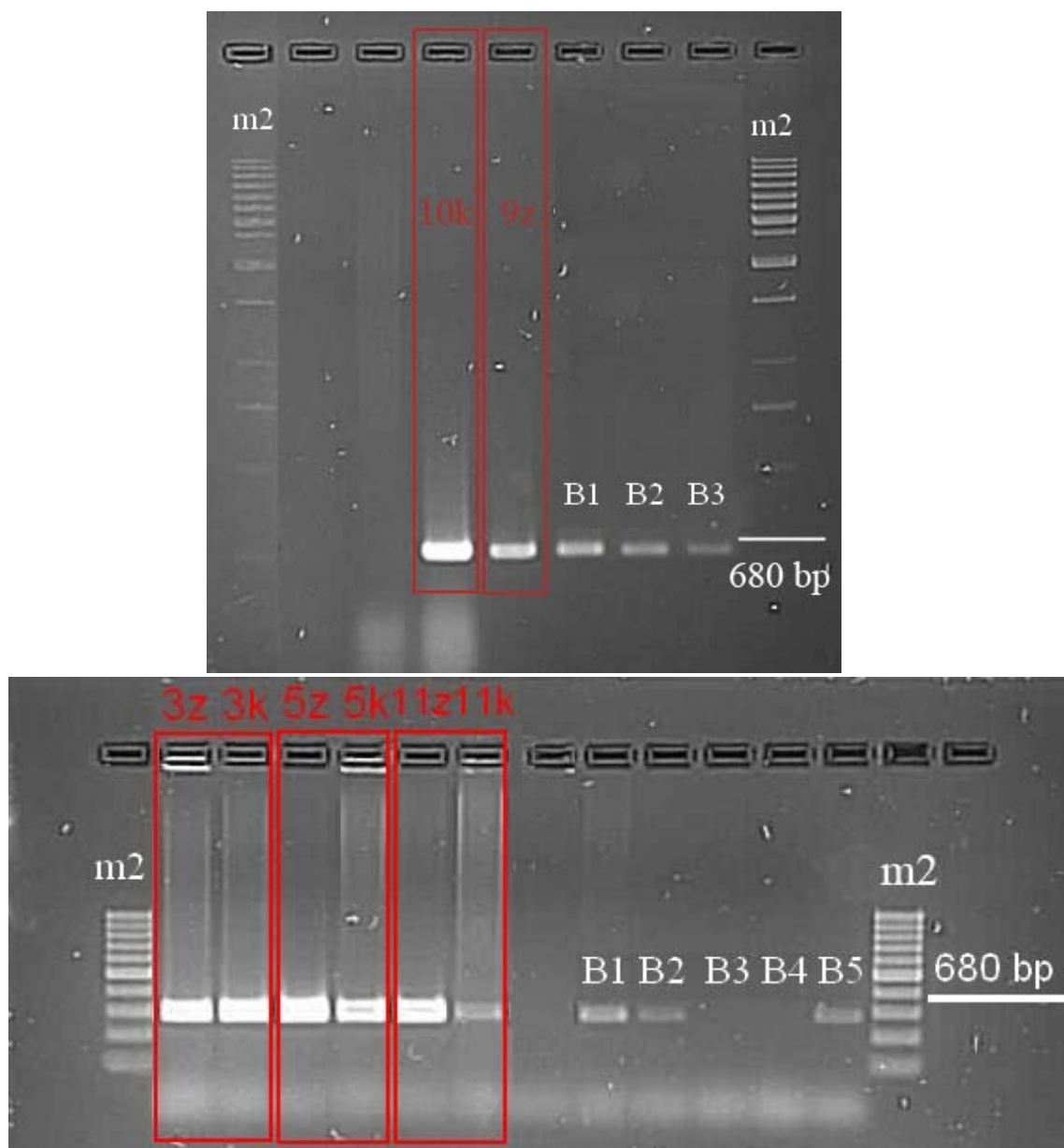
z – začetni vzorec blata

k – končni vzorec blata

označene številke – zaporedne številke oseb in pozitivni rezultati (PCR pomnožki velikosti 680 bp)

B1-B5 – pozitivne kontrole iz komercialnega preparata

m1 – velikostna lestvica DNA 100 bp



Nadaljevanje Slike 20: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov PCR z začetnima oligonukleotidoma Bflact2 in Bflact5 za bakterije vrste *B. animalis* ssp. *lactis*.

Legenda:

z – začetni vzorec blata

k – končni vzorec blata

označene številke – zaporedne številke oseb in pozitivni rezultati (PCR pomnožki velikosti 680 bp)

B1-B5 – pozitivne kontrole iz komercialnega preparata

m2 – velikostna lestvica DNA 1 kb

4.3.3 Rezultati PCR za ugotavljanje prisotnosti bakterij vrste *L. acidophilus* v mikrobnih združbah

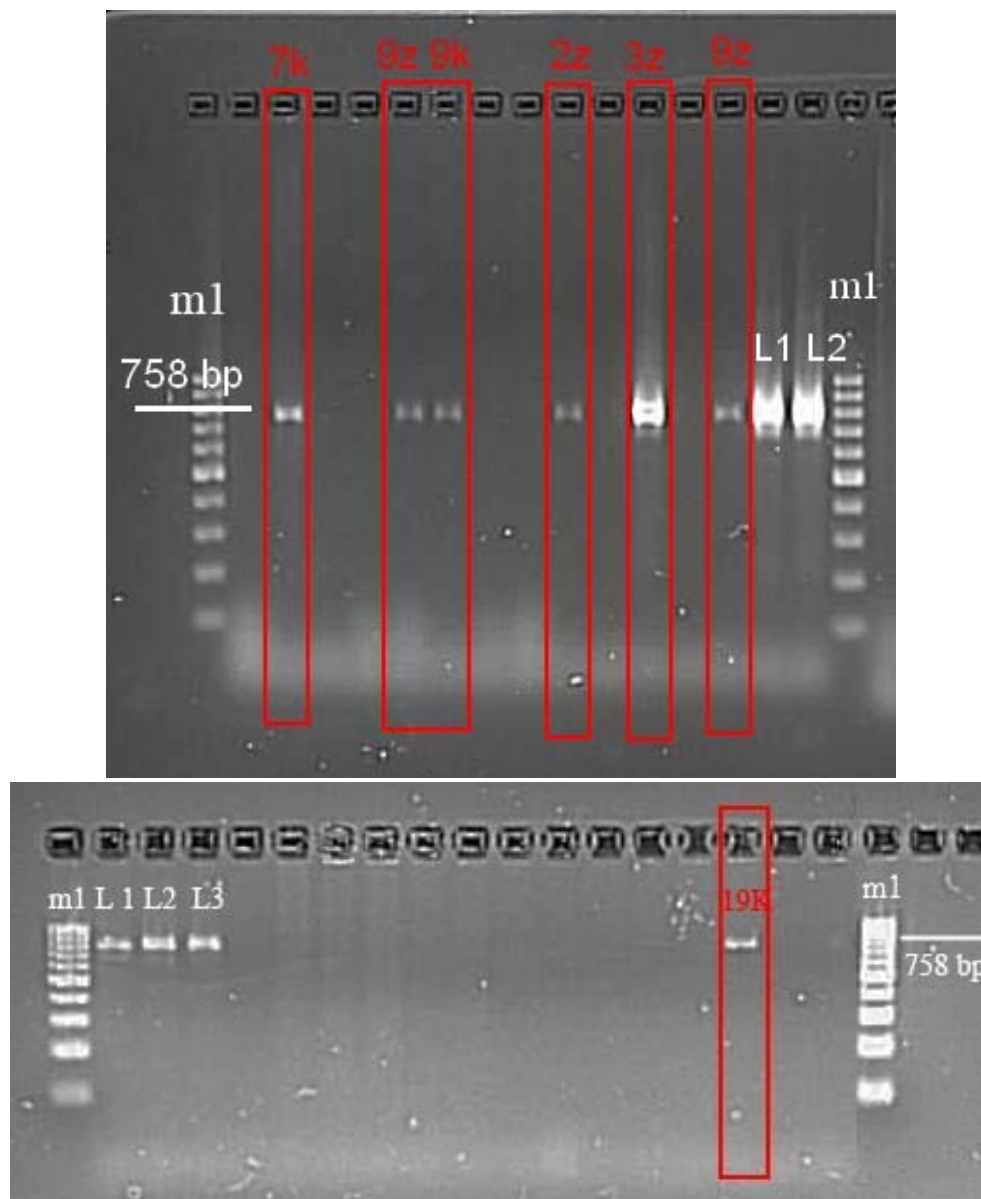
S PCR smo ugotavljali prisotnost bakterij vrste *L. acidophilus* v mikrobnih združbah, ki smo jih pripravili s spiranjem kolonij, izraslih na ploščah iz nacepljenih vzorcev blata. Z uporabljenima začetnima oligonukleotidoma Aci 16SI in Aci 16SII smo dobili pozitivne rezultate, to je pomnožke velikosti 758 bp, pri 3 začetnih vzorcih in 3 končnih od skupno 18 začetnih in 17 končnih analiziranih vzorcev. V enem primeru začetnega in končnega vzorca je šlo za isto osebo. S tem smo potrdili pripadnike bakterij vrste *L. acidophilus* v 6-ih vzorcih blata. Za analizo je bilo sicer predvideno 20 začetnih in 20 končnih vzorcev, vendar pri 2 začetnih in 3 končnih vzorcih analiza in priprava mikrobne združbe zaradi premajhne količine vzorca ni bila mogoča.

V Preglednici 10 so prikazani vzorci, pri katerih smo zabeležili pozitiven rezultat. Pozitivni rezultati (pomožki PCR) in vzorci pri katerih smo potrdili testno vrsto, so zbrani in označeni z rdečo obrobo na Sliki 21.

Preglednica 10: Rezultati PCR za ugotavljanje bakterij vrste *L. acidophilus* v mikrobni združbi.

Številka osebe	Laktobacili	
	PCR za ugotavljanje vrste	
	začetni vzorec blata	končni vzorec blata
2	+	-
3	+	-
7	-	+
9	+	+
19	-	+

Legenda:
oznaka + pomeni pozitiven rezultat, PCR
pomnožek velikosti 758 bp
oznaka – pomeni negativen rezultat, ni pomnožka



Slika 21: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov PCR z začetnima oligonukleotidoma Aci 16SI in 16SII za bakterije vrste *L. acidophilus*.

Legenda:

z – začetni vzorec

k – končni vzorec

označene številke – zaporedne številke oseb in pozitivni rezultati (PCR pomnožki velikosti 758 bp)

L1-L3 – pozitivne kontrole iz komercialnega preparata

m1 – velikostna lestvica DNA 100 bp

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Vzorci blata 20-ih oseb, odvzetih pred začetkom jemanja probiotičnega preparata in na koncu, smo cepili na primerna selektivna gojišča. Po inkubaciji smo z metodo RAPD analizirali DNA posameznih, naključno izbranih kolonij ter ugotavljali njihovo istovetnost z DNA kontrolnih sevov, osamljenih iz komercialnega preparata. V mikrobnih združbah pa smo z uporabo vrstno specifičnih začetnih oligonukleotidov ugotavljali prisotnost bakterij vrst *L. acidophilus* in *B. animalis* ssp. *lactis*.

5.1.1 Optimizacija osamitve DNA iz kolonij ter izbire začetnih oligonukleotidov za metodo RAPD

Kljub temu da je PCR številnim raziskovalcem vse bolj dostopna molekularna tehnika, saj ob zagotavljanju dobrih rezultatov ne zahteva velikega tehnološkega vložka, pa je potrebna velika doslednost pri izvajanju, ker le tako lahko zagotovimo dobro ponovljivost. Enega izmed ključnih korakov predstavlja osamitev mikrobne DNA iz vzorca, pri čemer je občutljivost mikrobnih celic na postopke liziranja zelo različna. Poleg tega je različna tudi učinkovitost pomnoževanja ribosomskih genov mešane populacije. Vse to povečuje razlike med dobljeno in dejansko sestavo mikrobne združbe (Smole Možina in Jeršek, 2001).

Liziranje celične stene in s tem osamitev DNA iz celice je pri po Gramu pozitivnih bakterijah, kamor spadajo tudi laktobacili in bifidobakterije, zaradi zgradbe celične stene težavnejše kot pri po Gramu negativnih bakterijah. Zato smo preskusili več postopkov za sprostitve DNA: s toplotno obdelavo celic v tritonu, s toplotno obdelavo celic v demineralizirani vodi ter s toplotno obdelavo celic v tritonu po predhodni inkubaciji posameznih bakterijskih kolonij v tekočem gojišču MRS. Ker z nobeno od naštetih tehnik osamitve nismo dobili jasnih in ponovljivih rezultatov, smo metodo osamitve DNA priredili po avtorjih Lerner in Carter (1995), ki sta PCR izvedla na osnovi kolonije. Del zrasle kolonije smo s trdnega gojišča prenesli v predhodno pripravljeno mešanico PCR (RAPD) brez DNA - polimeraze Taq ter mešanico obdelali z 10 minut trajajočim vročim začetkom pri 99 °C. V tem času je prišlo do lize bakterijskih celic iz kolonije in sprostitve DNA, hkrati pa je potekla tudi začetna denaturacija DNA. Po vročem začetku smo reakcijo prekinili, dodali v vsak vzorec DNA - polimerazo Taq in nadaljevali s pomnoževanjem po opisanih protokolih za RAPD. Izkazalo se je, da smo pri pomnoževanju DNA, osamljeni s pomočjo vročega začetka pred PCR (RAPD), dobili ostrejša in jasnejša lise na elektroforetski sliki. Poleg tega PCR na osnovi kolonije ne zahteva predhodne dodatne inkubacije posameznih bakterijskih kolonij, ki so izrasle na gojišču ter zamudne izolacije DNA, s čimer se skrajša čas analize (Lerner in Carter, 1995).

Razmere RAPD smo optimizirali tudi z izbiro ustreznega oligonukleotida. Preizkusili smo začetne oligonukleotide VALIO, KGT-70GC, KGT-80GC in M13 na izbranih kolonijah čistih kultur bakterij.

5.1.2 Tipizacija sevov vrst *B. animalis* ssp. *lactis* in *L. acidophilus*

Za tipizacijo sevov vrst *L. acidophilus* in *B. animalis* ssp. *lactis* v vzorcih blata odraslih smo uporabili metodo RAPD, ki smo jo izvedli neposredno na petih, naključno izbranih kolonijah, izraslih iz posameznega vzorca blata. Vzorce prog RAPD analize preiskovanih sevov smo primerjali z vzorci prog RAPD kontrolnih sevov, osamljenih iz komercialnega probiotičnega preparata. V preliminarinih testih optimizacije pogojev metode RAPD smo najprej preskusili štiri različne začetne oligonukleotide, saj smo želeli ugotoviti, s katerim začetnim oligonukleotidom dobimo najbolj jasni prstni odtis (fingerprint) in najboljšo ponovljivost metode RAPD za posamezni sev. Tako se je za tipizacijo seva vrste *L. acidophilus* najbolje izkazal oligonukleotid M13, medtem ko je bil za tipizacijo seva vrste *B. animalis* ssp. *lactis* najprimernejši oligonukleotid KGT-80GC. Oba oligonukleotida smo uporabili v nadaljevanju poskusa.

Tudi Torriani in sod. (1999) navajajo uspešno uporabo oligonukleotida M13 za razlikovanje med sevi znotraj bakterijskih podvrst *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in *L. delbrueckii* subsp. *lactis*. Podobno velja tudi za začetni oligonukleotid KGT-80GC (lastni konstrukt Katedre za mlekarstvo), za katerega so raziskovalci že na več primerih ugotovili primernost za tipizacijo mlečnokislinskih bakterij (neobjavljeni rezultati).

Metoda RAPD je torej zelo primerna za preiskovanje velikega števila sevov v kratkem času. Poleg optimizacije uporabe najprimernejšega oligonukleotida RAPD, smo optimizirali še postopek osamitve DNA, ki smo ga na posamezni koloniji izvajali neposredno pred RAPD z vročim začetkom. Tako smo močno skrajšali postopek osamitve DNA, kar nam je omogočilo, da smo v kratkem času z metodo RAPD pregledali veliko število kolonij, skupaj 393.

Od 193 kolonij laktobacilov z gojišča za bakterije vrste *L. acidophilus* nobena ni izkazala enakega vzorca RAPD kot kontrolni sev vrste *L. acidophilus*, medtem ko je od 200 kolonij z gojišča za bifidobakterije, 12 kolonij izkazalo enak vzorec RAPD kot kontrolni sev vrste *B. animalis* ssp. *lactis*. Naši rezultati RAPD so zelo spodbudni vsaj za bifidobakterije, saj kažejo na uspešno kombinacijo osamitve DNA in uporabljene metode, da smo potrdili prisotnost iskanega seva v tako kompleksnem vzorcu kot je blato.

5.1.3 Identifikacija bakterij vrst *L. acidophilus* in *B. animalis* ssp. *lactis* v mikrobnih združbah

V moderni taksonomiji je za ugotavljanje sorodstvenega odnosa med bakterijami zelo pomembna primerjava in analiza zaporedij genov za 16S rRNA in 23S rRNA. Poznavanje teh zaporedij omogoča konstrukcijo začetnih oligonukleotidov ali oligonukleotidnih sond, specifičnih bodisi za rod ali vrsto, ki med drugim omogočajo tudi hitro identifikacijo bifidobakterij in mlečnokislinskih bakterij (Ventura in sod., 2001).

Tako so na primer Walter in sod. (2000) z uporabo in primerjavo različnih metod preiskovali tiste vrste znotraj rodu *Lactobacillus*, ki naseljujejo prebavni trakt. Za zanesljivo identifikacijo bakterij vrste *L. acidophilus* so uporabili kombinacijo dveh metod in sicer DGGE ter PCR z vrstno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi. Najprej so iz čistih kultur laktobacilov in iz črevesne mikrobiote osamili DNA ter z univerzalnima začetnima oligonukleotidoma HDA1-GC ter HDA2 pomnožili V2-V3 regijo 16S rDNA. Dobljene pomnožke so ločili z gelsko elektroforezo v kombinaciji z denaturacijskim gradientom, vzorec pomnoženih odsekov DNA črevesne mikrobiote pa primerjali z vzorcem pomnoženih odsekov DNA čistih kultur laktobacilov, ki je služil kot referenčna lestvica za DGGE za laktobacile.

Rezultate metode DGGE so, na predhodno pripravljeni DNA čistih kultur laktobacilov in črevesne mikrobiote, podprli še s PCR, kjer so uporabili 11 parov začetnih oligonukleotidov, specifičnih za 11 različnih vrst iz rodu *Lactobacillus*. Za identifikacijo predstavnikov bakterij vrste *L. acidophilus* so uporabili začetna oligonukleotida Aci 16SI/16SII, ki sta se izkazala za specifična, saj nista pomnoževala drugih vrst (Walter in sod., 2000).

Zato smo tudi v naši študiji za identifikacijo bakterij vrste *L. acidophilus* v mikrobnih združbah iz blata uporabili začetna oligonukleotida Aci 16SI in 16SII. Z uporabo omenjenega para oligonukleotidov, smo pri 6 vzorcih od skupno 35 analiziranih vzorcev blata dobili pozitiven rezultat. Za analizo je bilo predvideno 40 vzorcev, vendar pri 5-ih vzorcih (2 začetnih in 3 končnih) analiza in priprava mikrobne združbe zaradi premajhne količine vzorca ni bila mogoča.

Tako kot pri laktobacilih je tudi pri bifidobakterijah identifikacija na nivoju rodu in vrste možna z uporabo sond, ki v tehnikah hibridizacije prepoznajo specifična mesta na podenotah 16S in/ali 23S rRNA, ali pa z uporabo specifičnih začetnih oligonukleotidov v tehnikah PCR (Walter in sod., 2000).

Številne študije, opravljene na zaporednjih rDNA rodu *Bifidobacterium*, so omogočile pripravo vrstno specifičnih začetnih oligonukleotidov. Analiza zaporedij 16S rRNA je pokazala 98,6 % sorodnost med nekdanjima vrstama *B. lactis* (DSM 10140) in *B. animalis* (ATCC 25527). Po sedanji klasifikaciji je *B. lactis* podvrsta (ssp.) bakterij vrste *B. animalis* (Ventura in sod., 2001).

Za specifično identifikacijo bakterij vrste *B. animalis* ssp. *lactis* so Ventura in sod. (2001) pripravili začetni oligonukleotidni par, Bflact2 in Bflact5. Oligonukleotid Bflact2 se specifično veže na območje, ki nosi zapis gena na 16S rRNA ribosomski podenoti, oligonukleotid Bflact5 pa se veže na območje zapisa gena na vmesni regiji 16S-23S rDNA. Avtorji navajajo, da je omenjeni par oligonukleotidov striktno specifičen za bakterije podvrste *B. lactis*, saj ne pomnožuje nobene druge vrste iz rodu *Bifidobacterium* ali *Lactobacillus*. Ko s PCR z oligonukleotidoma Bflact2 in Bflact5 analizirali 38 različnih vrst bifidobakterij in laktobacilov, so le pri treh sevih vrste *B. animalis* ssp. *lactis* dobili iskani pomnožek, velikosti 680 bp (Ventura in sod., 2001).

Na podlagi objavljenih rezultatov, smo tudi v naši študiji za identifikacijo bakterij vrste *B. animalis* ssp. *lactis* v vzorcih blata uporabili začetna oligonukleotida Bflact2/Bflact5 in kar pri 13 od skupno 38 analiziranih vzorcev potrdili prisotnost bakterij vrste *B. animalis* ssp. *lactis*. Za analizo je bilo predvideno 40 vzorcev, vendar pri 2 vzorcih (1 začetnem in 1 končnem) analiza in priprava mikrobne združbe zaradi premajhne količine vzorca ni bila mogoča. Pri pozitivnih vzorcih se je velikost produkta ujemala z velikostjo, navedeno v literaturi, to je 680 bp.

5.2 SKLEPI

- Z uporabo selektivnih gojišč MRS s klindamicinom in ciprofloksacinom za bakterije vrste *L. acidophilus* in MRS z mupirocinom za bakterije seva *B. animalis* ssp. *lactis* smo uspešno ločili in osamili bakterijska seva iz komercialnega preparata in ju uporabili za pozitivni kontroli.
- Prisotnosti testnega seva vrste *L. acidophilus* v vzorcih blata, odvzetih pred ali po aplikaciji probiotičnega preparata, z metodo RAPD na kolonijah nismo uspeli potrditi.
- Prisotnost testnega seva vrste *B. animalis* ssp. *lactis* smo z metodo RAPD na kolonijah potrdili pri dveh vzorcih blata, odvzetih pred aplikacijo probiotičnega preparata, ter pri dveh vzorcih blata, odvzetih po aplikaciji probiotičnega preparata.
- Prisotnost bakterij vrst *L. acidophilus* ali *B. animalis* ssp. *lactis* v vzorcih blata po terapiji s probiotičnim preparatom ni bila znatno pogostejša kot pred njo.

6 POVZETEK

Proučevali smo prisotnost in preživelost probiotičnih bakterij komercialnega probiotičnega preparata ob sočasni terapiji z antibiotikom, kar bi bil pomemben podatek o dejanskem potencialu preparata.

Iz komercialnega probiotičnega preparata smo s pomočjo selektivnih gojišč najprej osamili oba deklarirana probiotična seva. Za osamitev seva vrste *L. acidophilus* smo uporabili selektivno gojišče MRS z dodanima antibiotikoma klindamicinom in ciprofloksacinom, za osamitev seva vrste *B. animalis* ssp. *lactis* pa gojišče MRS z dodanim antibiotikom mupirocinom. Tako pripravljene plošče smo pri anaerobnih razmerah in temperaturi 37 °C inkubirali 3 dni. Izrasle kolonije posameznega seva so nam služile kot pozitivne kontrole za nadaljnje analize. Morfologijo kolonij izraslih sevov smo preverili z barvanjem po Gramu ter opazovanjem pod mikroskopom. Obe vrsti kolonij sta se obarvali modro do modro vijolično, kar je značilno obarvanje za po Gramu pozitivne bakterije. Bifidobakterije smo prepoznali po značilni razvejani obliki, medtem ko so imeli laktobacili obliko značilnih paličic.

Za potrjevanje pripadnosti osamljenih sevov iz probiotičnega preparata rodu *Lactobacillus* oziroma *Bifidobacterium* smo v PCR uporabili za rod specifične začetne oligonukleotide, in sicer za rod *Bifidobacterium* oligonukleotida Bif164-f in Bif662-r ter za rod *Lactobacillus* oligonukleotida LbLMA1-rev in R16-1. Poleg tega smo z omenjenimi oligonukleotidi preverili tudi rodovno pripadnost nekaterih naključno izbranih kolonij, izraslih iz vzorcev blata. Pri vseh analiziranih kolonijah smo dobili specifične pomnožke, katerih velikost je pri rodu *Lactobacillus* znašala 250 bp in pri rodu *Bifidobacterium* 520 bp. Z omenjeno analizo smo potrdili selektivnost gojišč, ki smo jih uporabljali za selektivno rast laktobacilov oziroma bifidobakterij iz vzorcev blata.

V nadaljevanju smo se lotili optimizacije razmer osamitve DNA iz posameznih kolonij in iz mikrobnih združb. Glede na veliko število preiskovanih vzorcev, smo morali pripraviti optimalen postopek osamitve DNA ne samo z vidika čistosti in izplena DNA, ampak tudi z vidika trajanja postopka osamitve.

DNA kontrolnih sevov iz preparata, smo osamili s pomočjo komercialnega kompleta za osamitev genomske DNA Wizard® Genomic Purification Kit.

Za liziranje bakterijskih celic iz kolonij in osamitev DNA iz vzorcev pa smo uporabili postopek toplotne obdelave (prevrevanje) kolonij v vodi, v 1 % tritonu ter v 1 % tritonu po predhodni inkubaciji bakterijskih kolonij v tekočem gojišču MRS.

Po analizi rezultatov PCR s pomočjo gelske elektroforeze se je izkazalo, da smo najbolj čist pomnožek PCR dobili pri reakciji, kjer smo kot tarčno DNA uporabili DNA, osamljeno iz kolonije s postopkom toplotne obdelave v vodi.

V nadaljevanju smo razmere še nekoliko spremenili in osamitev DNA iz posameznih kolonij sevov iz vzorca izvedli z vročim začetkom pred PCR (RAPD). V reakcijsko mešanico brez DNA- polimeraze Taq smo s sterilnim zobotrebcem prenesli kolonije s trdnega gojišča in jih v cikličnem termostatu PCR segrevali 10 min pri 99 °C.

Ker pa rezultati metode RAPD niso odvisni le od načina osamitve DNA, ampak tudi od optimalno izbranega začetnega oligonukleotida, ki da jasne, ponovljive in zanesljive rezultate tipizacije določenega seva, smo analizirali vzorce DNA, osamljene z različnimi postopki in z različnimi začetnimi oligonukleotidi (VALIO, KGT-70GC, KGT-80GC in M13).

Za identifikacijo seva vrste *L. acidophilus* se je kot najboljša izbira izkazal začetni oligonukleotid M13, za določanje testnega seva vrste *B. animalis* ssp. *lactis* pa KGT-80GC.

Kot že omenjeno, smo RAPD izvajali neposredno na koloniji, z uporabo vročega začetka za sprostitve DNA iz bakterijskih celic. Za ugotavljanje prisotnosti in istovetnosti sevov vrst *L. acidophilus* in *B. animalis* ssp. *lactis* v vzorcih blata, smo z RAPD analizirali po pet naključno izbranih kolonij za vsak sev in njihove vzorce RAPD primerjali z vzorci kontrolnih sevov. Izkazalo se je, da smo pri štirih vzorcih blata uspešno tipizirali sev vrste *B. animalis* ssp. *lactis*. Zelo zanimiv je rezultat, da smo iskani sev bifidobakterij tipizirali pri dveh vzorcih blata, odvzetih pred samo aplikacijo probiotičnega preparata, medtem ko pri istih pacientih iskanih sevov nismo uspeli tipizirati tudi v blatu, odvzetem po aplikaciji probiotičnega preparata.

Iz rezultatov predvidevamo, da so nekateri odrasli že pred terapijo z antibiotiki in aplikacijo probiotičnega preparata uživali probiotična živila (na primer jogurte) ali prehranska dopolnila, ki vsebujejo probiotike z istim sevom, kot ga vsebuje naš testni preparat. Terapija z antibiotiki je pri omenjenih pacientih najverjetneje porušila črevesno mikrofloro do te mere, da se kljub vzporedni aplikaciji komercialnega preparata v tako kratkem obdobju ni uspela dovolj obnoviti, da bi z uporabljenim analitskim pristopom iskani sev bifidobakterij zasledili tudi po koncu terapije. Po drugi strani pa smo iskani sev bifidobakterij uspešno zasledili v dveh vzorcih blata, odvzetih po končani terapiji, medtem ko ga v vzorcih blata istih pacientov, odvzetih pred terapijo, nismo zasledili.

Za tipizacijo seva vrste *L. acidophilus* smo uporabili začetni oligonukleotid M13, a žal pri nobenem od preiskovanih vzorcev blata, odvzetem bodisi pred ali po terapiji, nismo uspeli zaslediti iskanega seva laktobacila. Na podlagi dobljenega rezultata pa vseeno ne moremo zaključiti, da testni sev v blatu odraslih ni bil prisoten, saj je bila analiza posameznega vzorca blata, zaradi velikega števila odvzetih vzorcev blata, izvedena le na petih, naključno izbranih kolonijah, izraslih na selektivnem gojišču. Zaradi pestrosti sevov bakterijskih vrst v prebavnem traktu, je bila verjetnost, da bi z gojišča za analizo izbrali ravno pravo kolonijo, ki bi vsebovala bakterije testnega seva, majhna.

DNA iz mikrobnih združb smo osamili s pomočjo komercialnega kompleta za osamitev genomske DNA Wizard® Genomic Purification Kit. Za to smo se odločili tudi zato, ker se ob spiranju kolonij s trdnega gojišča v vzorcih pogosto znajdejo tudi nečistoče, ki bi lahko vplivale na PCR.

S PCR in vrstno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi smo preverjali prisotnost bakterij vrst *L. acidophilus* in *B. animalis* ssp. *lactis* v mikrobnih združbah iz vzorcev blata, ki smo jih pripravili s spiranjem kolonij s selektivnega gojišča z anaerobnim diluentom. S parom začetnih oligonukleotidov Aci 16SI in 16 SII smo potrdili prisotnost bakterij vrste *L. acidophilus* v treh vzorcih blata, odvzetih pred terapijo, in v treh vzorcih blata, odvzetih po terapiji (v enem primeru začetnega in končnega vzorca gre za istega pacienta), saj so se pomnožki PCR po velikosti (758 bp) ujemali s kontrolnim vzorcem iz komercialnega preparata. Za preverjanje prisotnosti bakterij vrste *L. acidophilus* v mikrobnih združbah smo skupno analizirali 35 vzorcev blata (začetnih in končnih).

S parom začetnih oligonukleotidov Bflact2 in Bflact5 pa smo potrdili prisotnost bakterij vrste *B. animalis* ssp. *lactis* v šestih začetnih vzorcih in sedmih končnih vzorcih blata (v petih primerih začetnega in končnega vzorca gre za istega pacienta), katerih velikost (680 bp) se je ujemala s kontrolnim vzorcem. Za preverjanje prisotnosti bakterij vrste *B. animalis* ssp. *lactis* v mikrobnih združbah, smo skupno analizirali 38 vzorcev (začetnih in končnih).

Naše predvidevanje, da bo prisotnost bakterij vrst *L. acidophilus* ali *B. animalis* ssp. *lactis* v vzorcih blata po terapiji pogostejša, se ni izkazalo za popolnoma upravičeno, saj smo le pri 4 vzorcih od skupno 73 analiziranih vzorcev, uspeli potrditi eno od obeh vrst, ki sta bili prisotni v končnih vzorcih, ne pa tudi v začetnih vzorcih, odvzetih pred terapijo.

Naše analize so bile del širše zastavljene klinične študije, katere namen je bil ugotoviti učinkovitost komercialnega probiotičnega preparata pri preprečevanju z antibiotiki povezanih drisk pri odraslih. V odvzetih vzorcih blata pred in po terapiji z antibiotiki in aplikaciji probiotičnega preparata smo preverjali prisotnost dveh bakterijskih sevov vrst *L. acidophilus* in *B. animalis* ssp. *lactis*, ki ju ta probiotični preparat vsebuje.

Pri nekaterih vzorcih blata smo potrdili prisotnost in preživelost probiotičnih bakterij komercialnega preparata ob sočasni terapiji z antibiotikom. Pri odraslih, pri katerih smo že v začetnem vzorcu blata, odvzetem pred aplikacijo probiotičnega preparata, uspešno zasledili preiskovani probiotični bakteriji, se je tudi po terapiji z antibiotiki in uživanjem preparata pokazala prisotnost iskanih bakterij.

Prisotnost testnih sevov smo ugotavljali na majhnem številu kolonij, vendar smo kljub temu pri nekaterih vzorcih dobili pozitivne rezultate, kar kaže na ometaven potencial analiziranega probiotičnega preparata.

Za dokončno sklepanje o dejanski prisotnosti zaužitih probiotičnih sevov v blatu pa bi bile potrebne obsežnejše analize, zlasti na večjem številu kolonij.

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, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 1 – 45.

Bergogne Berezin E. 2000. Treatment and prevention of antibiotic associated diarrhea. International Journal of Antimicrobial Agents, 16: 521 - 526

Bogovič Matijašić B. 2001. Ugotavljanje varnosti in učinkovitosti funkcionalne hrane. V: Funkcionalna hrana. 21. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož 8. in 9. november 2001. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 157 - 162

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

Charteris W. P., Kelly P. M., Morelli L., Collins J. K. 1996. Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations. International Journal of Food Microbiology, 35: 1 – 27

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

Dubernet S., Desmasures N., Gueguen M. 2002. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. FEMS Microbiology Letters, 214: 271-275

FAO/WHO. 2002. Report of a joint working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food, April 30 and May 1 2002, London, Ontario, Canada. London, Ontario, FAO/WHO: 11 str.
http://who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf (september 2010)

Felis G. E., Dellaglio F. 2007. Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. Current Issues in Intestinal Microbiology, 8: 44-61

Fuller R. 1989. Probiotics in man and animals. Journal of Applied Bacteriology, 66: 365 - 378

Garrigues C., Johansen E., Pedersen M. B. 2010. Complete genome sequence of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12, a widely consumed probiotic strain. *Journal of Bacteriology*, 192: 2467 – 2468

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

Gomes A. M. P., Malcata X. F. 1999. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science & Technology*, 10: 139 - 157

Guarner F., Malagelada J. R. 2003. Gut flora in health and disease. *Lancet*, 361: 512 – 519

Havenaar R., Huis in't Veld J. H. J. 1992. Probiotics: a general view. Cit po: Vasiljevic T., Shah N. P. 2008. Probiotics – From Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*, 18: 714 - 728

Holzappel W. H., Haberer P., Snel J., Schillinger U., Huis in't Veld J. H. J. 1998. Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 41: 85 – 101

Jeršek B. 2003. Higiena živil: laboratorijske vaje za predmet higiena živil. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 21 – 38

Lerner C. G., Carter C. D. 1995. PCR colony screening using the scintillation proximity assay to detect inserts in cloning vectors. *BioTechniques*, 19: 914-917

Metchnikoff I. I. 1907. The prolongation of life: Optimistic studies (reprinted edition 2004). New York, Springer. Cit po: Vasiljevic T., Shah N. P. 2008. Probiotics – From Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*, 18: 714 - 728

McFarland L. V. 2000. A review of the evidence of health claims for biotherapeutic agents. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 12: 65 – 76

Moro E. 1900. Über den *Bacillus acidophilus*. *Jahrbuch für Kinderheilkunde und Physische Erziehung*, 52: 38 – 55. Cit po: Vasiljevic T., Shah N. P. 2008. Probiotics – From Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*, 18: 714 – 728

O' Connell M. 2009. Bifidobacteria. V: Prebiotics and probiotics. Jardine S. (ed.). Leatherhead, Leatherhead Publishing and Blackwell Publishing: 79 – 91

Plummer S., Weaver M. A., Harris J.C., Dee P., Hunter J. 2004. *Clostridium difficile* pilot study: effect of probiotic supplementation on the incidence of *C. difficile* diarrhea. International Microbiology, 7, 1: 59 – 62.

Parker R. B. 1974. Probiotics, the other half of the story. Animal Nutrition and Health, 29: 4–8. Cit po: Vasiljevic T., Shah N. P. 2008. Probiotics – From Metchnikoff to bioactives. International Dairy Journal, 18: 714 – 728

Rogelj I., Bogovič Matijašić B. 2004. Probiotiki in varnost. V: Varnost živil. 22. Bitenčevi živilski dnevi, 18. in 19. marec 2004. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 181 – 189

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 – 578

Saarela M. 2009. Lactobacilli. V: Prebiotics and probiotics. Jardine S. (ed.). Leatherhead, Leatherhead Publishing and Blackwell Publishing: 101 - 108

Saarela M., Mogensen G., Fonden R., Mätt J., Mattila Sandholm T. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. Journal of Biotechnology, 84: 197 – 215

Satokari R. M., Vaughan E. E., Akkermans A. D. L., Saarela M., De Vos W. M. 2001. Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. Applied and Environmental Microbiology, 67: 504-513

Smole Možina S. 2003. Metode mikrobiološke preiskave živil. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 87-113.

Smole Možina S., Jeršek B. 2001. Mikrobiološke in molekularne metode karakterizacije probiotičnih dodatkov funkcionalnim živilom. V: Funkcionalna hrana. 21. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož 8. in 9. november 2001. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 207 – 218

Tissier H. 1900. Recherches sur la flore intestinale normale et pathologique du nourrisson. These. Paris: 1 – 253. Cit po: Vasiljevic T., Shah N. P. 2008. Probiotics – From Metchnikoff to bioactives. International Dairy Journal, 18: 714 - 728

Tynkkynen S., Satokari R., Saarela M., Sandholm T. M., Saxelin M. 1999. Comparison of ribotyping, randomly amplified polymorphic DNA analysis, and pulsed-field gel electrophoresis in typing of *Lactobacillus rhamnosus* and *L. casei* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 3908 - 3914

Todar K. 2008. The normal bacterial flora of humans. Madison, University of Wisconsin: 3 str.
http://www.textbookofbacteriology.net/normalflora_2.html (september 2010)

Torriani S., Zapparoli G., Dellaglio F. 1999. Use of PCR-based methods for rapid differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* subsp. *lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 4351 – 4356

Vasiljevic T., Shah N. P. 2008. Probiotics – From Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*, 18: 714 - 728

Ventura M., Reniero R., Zink R. 2001. Specific identification and targeted characterization of *Bifidobacterium lactis* from different environmental isolates by a combined multiplex-PCR approach. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2760 – 2765

Walter J., Tannock G. W., Tilsala Timisjarvi A., Rodtong S., Loach D. M., Munro K., Alatossava T. 2000. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 297 – 303

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. Andreji Čanžek Majhenič za pomoč pri nastajanju in pregledu te diplomske naloge in pri izvajanju laboratorijskega dela ter za trud in čas, ki si ga je vzela za moja vprašanja.

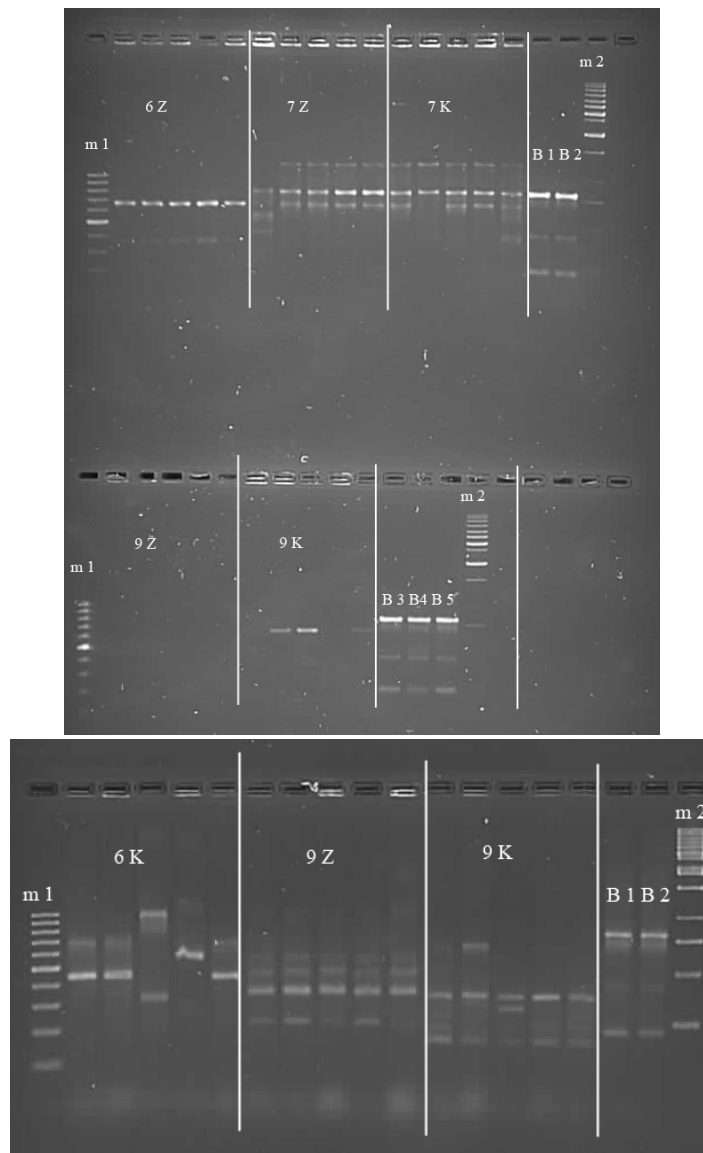
Za pomoč pri analizi rezultatov, praktičnem delu in pregledu diplomske naloge se zahvaljujem somentorici dr. Bojani Bogovič Matijašić.

Za strokovno recenzijo se zahvaljujem recenzentki doc. dr. Barbari Jeršek.

Za vso prijaznost in pomoč pri laboratorijskem delu se zahvaljujem tudi ostalim zaposlenim na Katedri za mlekarstvo v Domžalah.

PRILOGE

Priloga A: Negativni rezultati RAPD »neposredno na petih izbranih kolonijah« za testni sev vrste *B. animalis* ssp. *lactis*



Se nadaljuje.

Slika A: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov RAPD z začetnim oligonukleotidom KGT-80GC za preiskovani sev vrste *B. animalis* ssp. *lactis*.

Legenda:

z – začetni vzorec

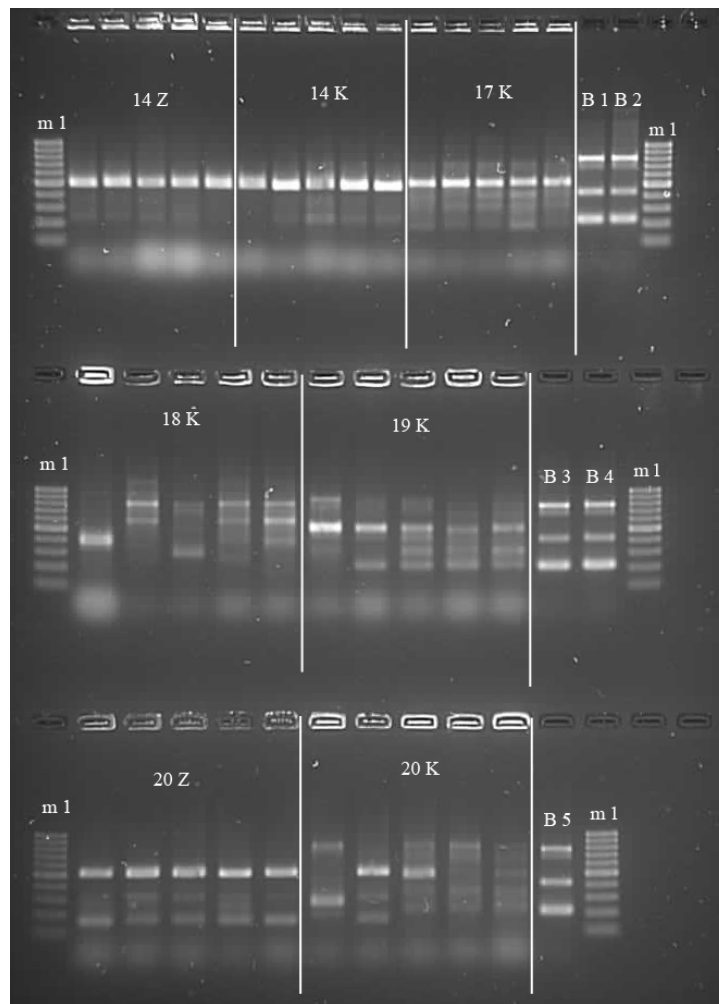
k – končni vzorec

m1 – velikostna lestvica DNA 100 bp

m2 – velikostna lestvica DNA 1 kb

B1 – B5 – pozitivne kontrole iz komercialnega preparata

označene številke – zaporedne številke oseb



Se nadaljuje.

Nadaljevanje Slike A: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov RAPD z začetnim oligonukleotidom KGT-80GC za preiskovani sev vrste *B. animalis ssp. lactis*.

Legenda:

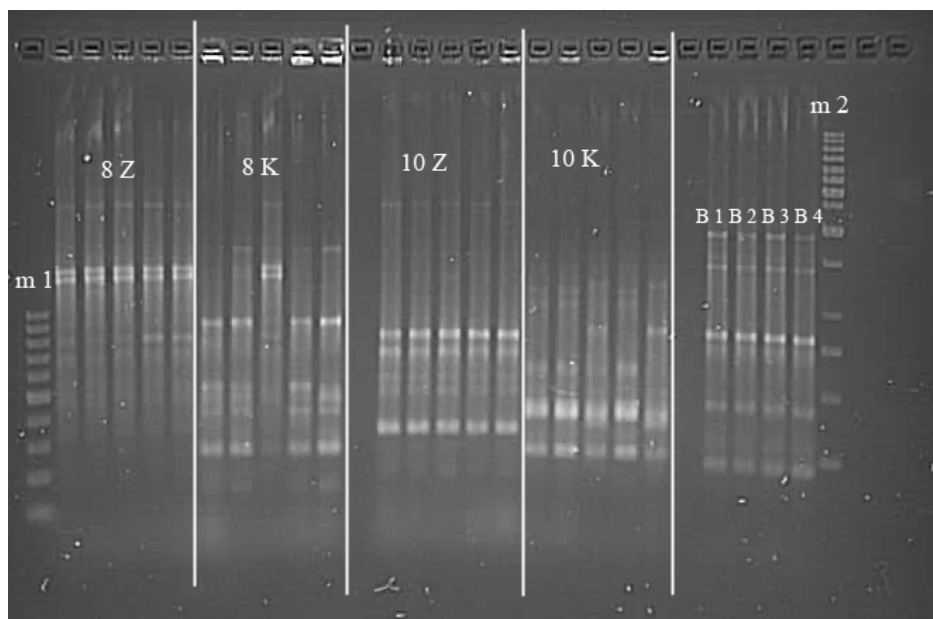
z – začetni vzorec

k – končni vzorec

m1 – velikostna lestvica DNA 100 bp

B1 – B5 – pozitivne kontrole iz komercialnega preparata

označene številke – zaporedne številke oseb



Nadaljevanje Slike A: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov RAPD z začetnim oligonukleotidom KGT-80GC za preiskovani sev vrste *B. animalis ssp. lactis*.

Legenda:

z – začetni vzorec

k – končni vzorec

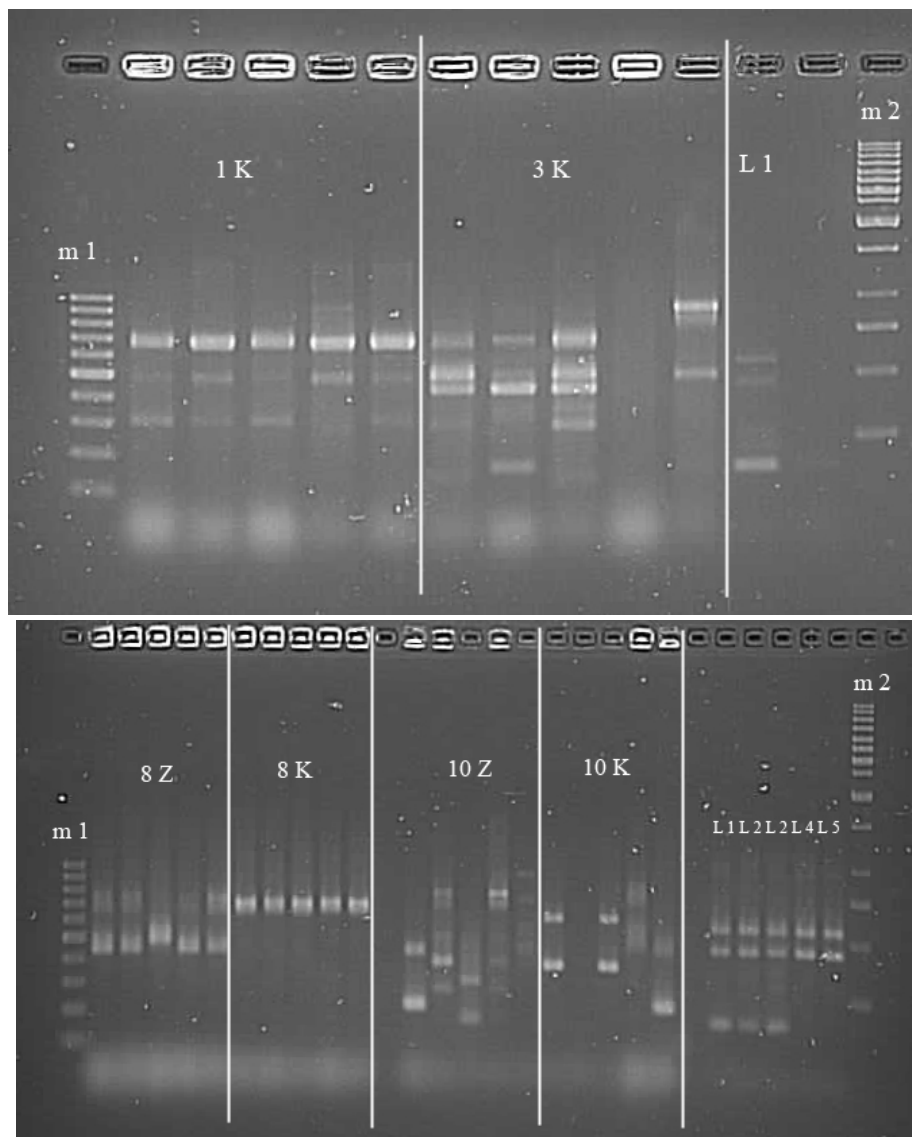
m1 – velikostna lestvica DNA 100 bp

m2 – velikostna lestvica DNA 1 kb

B1 – B4 – pozitivne kontrole iz komercialnega preparata

označene številke – zaporedne številke oseb

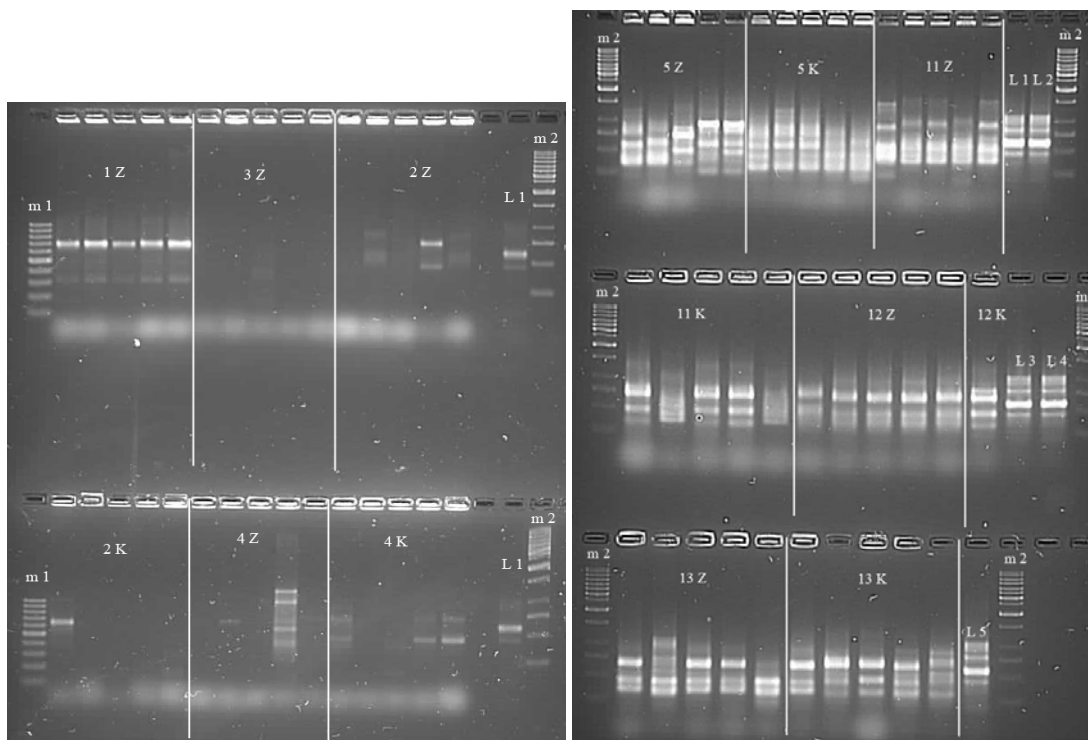
Priloga B: Negativni rezultati RAPD »neposredno na petih izbranih kolonijah« za testni sev vrste *L. acidophilus*.



Se nadaljuje.

Slika B: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov RAPD z začetnim oligonukleotidom M13 za preiskovani sev vrste *L. acidophilus*.

Legenda:
z – začetni vzorec
k – končni vzorec
m1 – velikostna lestvica DNA 100 bp
m2 – velikostna lestvica DNA 1 kb
L1 – L5 – pozitivne kontrole iz komercialnega preparata
označene številke – zaporedne številke oseb



Se nadaljuje.

Nadaljevanje Slike B: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov RAPD z začetnim oligonukleotidom M13 za preiskovani sev vrste *L. acidophilus*.

Legenda:

z – začetni vzorec

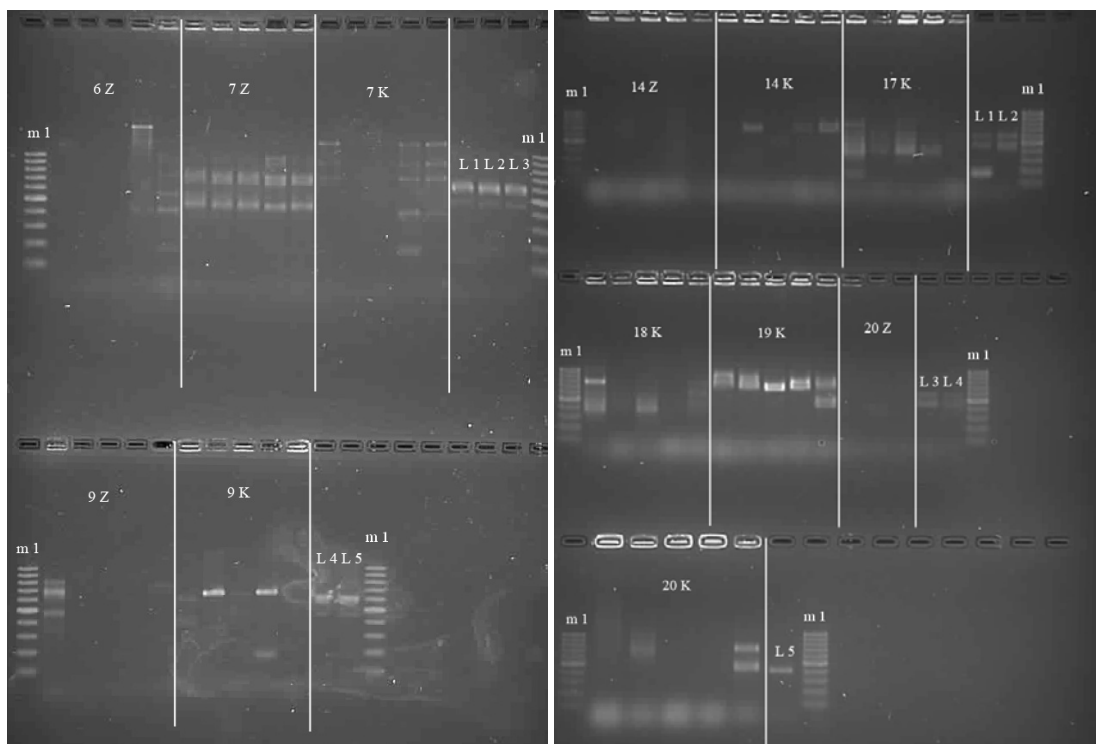
k – končni vzorec

m1 – velikostna lestvica DNA 100 bp

m2 – velikostna lestvica DNA 1 kb

L1 – L5 – pozitivne kontrole iz komercialnega preparata

označene številke – zaporedne številke oseb



Se nadaljuje.

Nadaljevanje Slike B: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov RAPD z začetnim oligonukleotidom M13 za preiskovani sev vrste *L. acidophilus*.

Legenda:

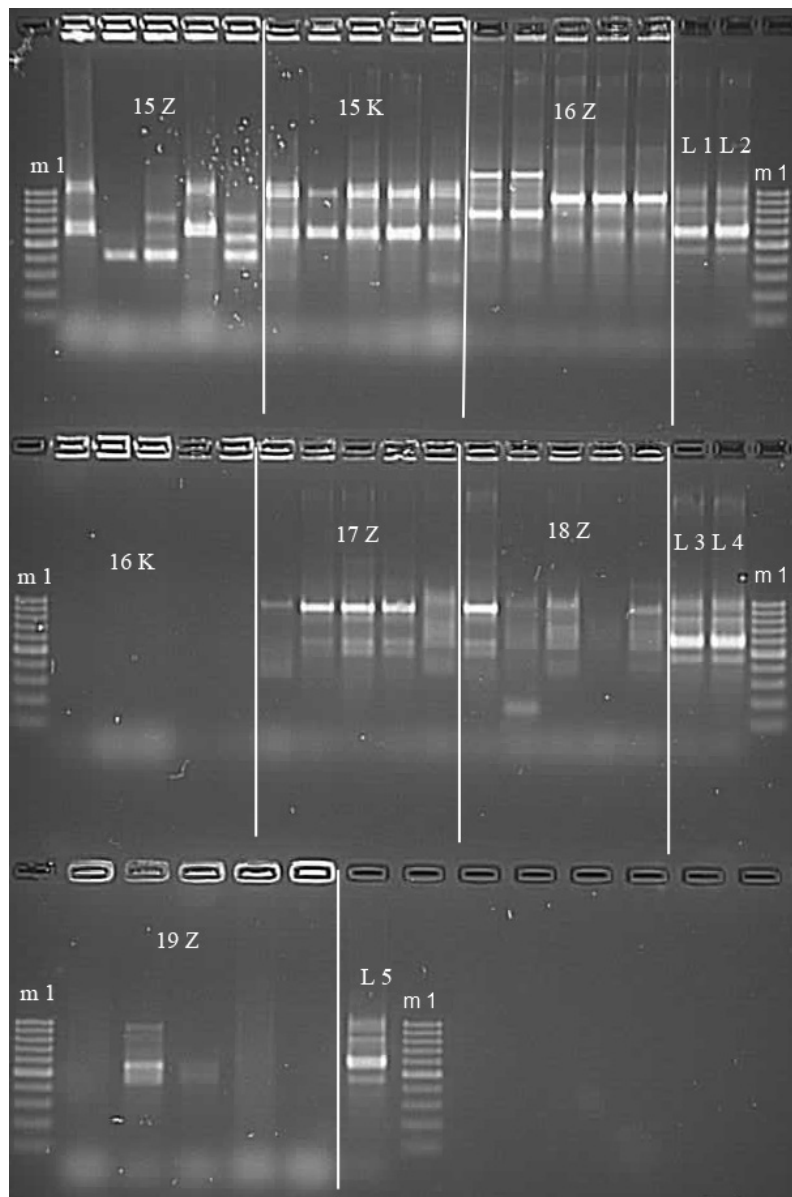
z – začetni vzorec

k – končni vzorec

m1 – velikostna lestvica DNA 100 bp

L1 – L5 – pozitivne kontrole iz komercialnega preparata

označene številke – zaporedne številke oseb



Nadaljevanje Slike B: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov RAPD z začetnim oligonukleotidom M13 za preiskovani sev vrste *L. acidophilus*.

Legenda:

z – začetni vzorec

k – končni vzorec

m1 – velikostna lestvica DNA 100 bp

L1 – L5 – pozitivne kontrole iz komercialnega preparata

označene številke – zaporedne številke oseb

Priloga C: Razmere PCR in RAPD.

Priloga C1: Razmere PCR za določanje rodu *Lactobacillus*.

Št. ciklov	Faza	Temperatura	Čas
1	Začetna denaturacija DNA	95 °C	5 min
30	Denaturacija DNA	95 °C	30 s
	Prileganje začetnih oligonukleotidov	55 °C	30 s
	Podaljševanje verige DNA	72 °C	30 s
1	Zaključno podaljševanje verige DNA	72 °C	7 min
	Ohladitev	4 °C	∞

Priloga C2: Razmere PCR za določanje rodu *Bifidobacterium*.

Št. ciklov	Faza	Temperatura	Čas
1	Začetna denaturacija DNA	94 °C	5 min
35	Denaturacija DNA	94 °C	30 s
	Prileganje začetnih oligonukleotidov	62 °C	20 s
	Podaljševanje verige DNA	68 °C	40 s
1	Zaključno podaljševanje verige DNA	68 °C	7 min
	Ohladitev	4 °C	∞

Priloga C3: Razmere RAPD za določanje kontrolnega seva vrste *L. acidophilus*.

Št. ciklov	Faza	Temperatura	Čas
1	Začetna denaturacija DNA	95 °C	5 min
40	Denaturacija DNA	95 °C	1 min
	Prileganje začetnih oligonukleotidov	45 °C	20 s
	Podaljševanje verige DNA	72 °C	2 min
1	Zaključno podaljševanje verige DNA	72 °C	5 min
	Ohladitev	4 °C	∞

Priloga C4: Razmere RAPD za določanje kontrolnega seva vrste *B. animalis* ssp. *lactis*.

Št. ciklov	Faza	Temperatura	Čas
1	Začetna denaturacija DNA	95 °C	2min
35	Denaturacija DNA	95 °C	1 min
	Prileganje začetnih oligonukleotidov	37 °C	2 min
	Podaljševanje verige DNA	72 °C	2 min
1	Zaključno podaljševanje verige DNA	72 °C	5 min
	Ohladitev	4 °C	∞

Priloga C5: Razmere PCR za določanje bakterij vrste *L. acidophilus* v mikrobnih združbah.

Št. ciklov	Faza	Temperatura	Čas
1	Začetna denaturacija DNA	92 °C	2 min
30	Denaturacija DNA	95 °C	30 s
	Prileganje začetnih oligonukleotidov	62 °C	30 s
	Podaljševanje verige DNA	72 °C	30 s
1	zaključno podaljševanje verige DNA	72 °C	5 min
	ohladitev	4 °C	∞

Priloga C6: Razmere PCR za določanje bakterij vrste *B. animalis* ssp. *lactis* v mikrobnih združbah.

Št. ciklov	Faza	Temperatura	Čas
1	Začetna denaturacija DNA	95 °C	5 min
30	Denaturacija DNA	95 °C	30 s
	Prileganje začetnih oligonukleotidov	58 °C	1 min
	Podaljševanje verige DNA	72 °C	4 min
1	zaključno podaljševanje verige DNA	72 °C	7 min
	ohladitev	4 °C	∞