

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Tjaša SERNEL

**UGOTAVLJANJE DEKLARIRANIH BAKTERIJ V PROBIOTIČNIH
PREHRANSKIH DOPOLNILIH NA SLOVENSKEM TRGU**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**ASSESSMENT OF LABELED BACTERIA IN PROBIOTIC FOOD
SUPPLEMENTS AVAILABLE ON SLOVENIAN MARKET**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Mikrobiološki del je bil opravljen v laboratoriju Katedre za mlekarstvo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela določila viš. znan. sod. dr. Bojano Bogovič Matijašić, za somentorico dr. Metodo Zorič Peteruel in za recenzentko prof. dr. Sonjo Smole Možina.

Mentorica: viš. znan. sod. dr. Bojana Bogovič Matijašić

Somentorica: dr. Metoda Zorič Peteruel

Recenzentka: prof. dr. Sonja Smole Možina

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Tjaša Sernel

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 579.67:615.372:577.2.083(043)=163.6
KG probiotiki/probiotična prehranska dopolnila/probiotični izdelki/označevanje probiotičnih izdelkov/prisotnost probiotičnih bakterij/konvencionalne gojitvene metode/molekularno-biološke metode/izolacija DNA/PCR/sekvenciranje/ustreznost deklaracij
AV SERNEL, Tjaša
SA BOGOVIČ MATIJAŠIĆ, Bojana (mentorica)/ZORIČ PETERNEL, Metoda (somentorica)/SMOLE MOŽINA, Sonja (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI 2011
IN UGOTAVLJANJE DEKLARIRANIH BAKTERIJ V PROBIOTIČNIH PREHRANSKIH DOPOLNILIH NA SLOVENSKEM TRGU
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XVI, 99 str., 30 pregl., 52 sl., 1 pril., 120 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Na slovenskem trgu se je v zadnjih letih število probiotičnih prehranskih dopolnil zelo povečalo. V času vzorčenja jih je bilo v slovenskih lekarnah mogoče kupiti najmanj 38. Mikrobiološke analize probiotičnih izdelkov velikokrat pokažejo neskladje med številom in vrstami dejansko prisotnih probiotičnih bakterij v izdelku ter podatki na deklaraciji. Namen diplomske naloge je bil ugotoviti, ali analizirani izdelki ustrezajo deklaracijam glede števila in vrste probiotičnih bakterij. Za analizo 14 probiotičnih izdelkov smo se poslužili konvencionalnih gojitvenih in molekularno-bioloških metod. Na deklaracijah štirih izdelkov smo naleteli na nepravilno poimenovanje bakterij, na dveh je proizvajalec vrsti dodal še tržno ime, kar ni zaželeno. Podatke o bakterijskih vrstah so vsebovali vsi izdelki, podatke o bakterijskih sevih pa le redki. Deklaracije so bile pomanjkljive glede podatkov o številu mikroorganizmov za vsako bakterijsko vrsto posebej. Na večini so bili samo podatki o številu vseh mikroorganizmov skupaj. Le trije od štirinajstih analiziranih izdelkov so vsebovali ustrezno skupno število probiotičnih bakterij glede na deklaracijo. Devet izdelkov je v celoti ustrezalo deklaraciji, kar zadeva prisotnost navedenih bakterijskih vrst. Pri ostalih petih izdelkih pa nekaterih bakterijskih vrst nismo potrdili. Pri dveh izdelkih smo zasledili tudi predstavnike vrst, ki niso bile deklarirane. Prisotnost posameznih bakterijskih vrst smo dokazali z metodo PCR. Konvencionalne metode pogosto ne omogočajo razlikovanja med sorodnimi vrstami bakterij zaradi neselektivnosti gojišč, lahko pa jih uporabimo za ugotavljanje števila probiotičnih bakterij v povezavi z metodo PCR. Tudi hipoteza, da na slovenskem tržišču obstajajo probiotični izdelki, katerih deklaracije niso popolne oziroma pravilne, se je izkazala za utemeljeno.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 579.67:615.372:577.2.083(043)=163.6
CX probiotics/probiotic nutritional supplements/probiotic products/labelling of probiotic products/presence of probiotic bacteria/conventional culture-dependent methods/molecular-biological methods/DNA isolation/PCR/sequencing/suitability of declarations
AU SERNEL, Tjaša
AA BOGOVIČ MATIJAŠIĆ, Bojana (supervisor)/ZORIČ PETERNEL, Metoda (co-advisor)/SMOLE MOŽINA, Sonja (reviewer)
PP SI-1000, Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY 2011
TI ASSESSMENT OF LABELED BACTERIA IN PROBIOTIC FOOD SUPPLEMENTS AVAILABLE ON SLOVENIAN MARKET
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XVI, 99 p., 30 tab., 52 fig., 1 ann., 120 ref.
LA sl
AL sl/en
AB In recent years, the number of probiotic food supplements on the Slovenian market has increased. At the time of sampling, there were at least 38 such products available in Slovenian pharmacies. Microbiological analysis of probiotic products often show a discrepancy between the number and identity of probiotic bacteria actually present in the product and data on the label. The aim of this study was to find out whether analyzed products correspond to the labels regarding number and species of probiotic bacteria. For the analysis of 14 probiotic products, we used conventional culture-dependent and molecular-biological methods. In the labels of four products we have encountered the bacterial names which were not appropriate, on two products the manufacturer has added trading names, which is not desirable. While information on the bacterial species was indicated for all products, the information on the bacterial strains was very rare. Labels were insufficient regarding the number of individual bacterial species. In general only the number of total microorganisms was given. Only three of fourteen analyzed products contained an adequate total number of probiotic bacteria with respect to the labeled ones. Nine out of fourteen products fully corresponded as regards the presence of labeled bacterial species. In five products some bacterial species were not confirmed. In two products we identified also some bacteria which were not labeled. The presence of individual bacterial species was demonstrated by PCR. Conventional methods often do not allow differentiation between related species of bacteria because of unsufficient selectivity of the media, however they may be used for the enumeration of probiotic bacteria in conjunction with PCR. In addition, our hypothesis that probiotic products with uncomplete or incorrect labelling can be found on Slovenian market, was confirmed.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PREGLEDNIC	X
KAZALO PRILOG	XII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIII
1 UVOD	16
1.1 CILJI NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 DEFINICIJE PROBIOTIKOV	3
2.2 RODOVI BAKTERIJ, KI JIH NAPOGOSTEJE UPORABLJAJO KOT PROBIOTIČNE BAKTERIJE	5
2.3 MIKROBIOTA PREBAVNEGA TRAKTA	6
2.4 OZNAČEVANJE PROBIOTIČNIH IZDELKOV	7
2.4.1 Organizacije v Evropi in po svetu, ki se ukvarjajo s kriteriji označevanja funkcionalne hrane	8
2.5 IZBIRA, VARNOST IN LASTNOSTI PROBIOTIČNIH SEVOV	9
2.6 POMEN PODKREPITVE ZDRAVSTVENEGA UČINKA PROBIOTIKOV	11
2.7 POZITIVNI UČINKI PROBIOTIKOV IN MOŽNA TVEGANJA ZA ZDRAVJE	11
2.7.1 Pozitivni učinki probiotikov	12
2.7.2 Možni negativni učinki probiotikov	16
2.8 SODOBNA METODA UGOTAVLJANJA IN IDENTIFIKACIJE PROBIOTIČNIH BAKTERIJ: POMNOŽEVANJE DNA Z METODO PCR	18
2.9 POMEN ODMERKA PROBIOTIKOV ZA POZITIVEN UČINEK NA ZDRAVJE UPORABNIKA	20
2.10 RAZISKAVE USTREZNOSTI PROBIOTIČNIH IZDELKOV V EVROPI IN DRUGOD PO SVETU	21
3 MATERIAL IN METODE	23
3.1 NAČRT POSKUSA	23
3.2 MATERIAL	26
3.2.1 Probiotični izdelki	26
3.2.2 Gojišča	27

3.2.3 Antibiotiki	28
3.2.3.1 Ciprofloksacin	28
3.2.3.2 Klindamicin	28
3.2.3.3 Mupirocin	28
3.2.4 Raztopini za razredčevanje	28
3.2.4.1 Fiziološka raztopina.....	28
3.2.4.2 Pufer TAE.....	28
3.2.5 Reagenti za pripravo mikroskopskega preparata	29
3.2.6 Kemikalije in encimi za izolacijo DNA in reakcijo PCR	29
3.2.6.1 Kemikalije za izolacijo DNA	29
3.2.6.2 Kemikalije za reakcijo PCR	29
3.3 METODE	31
3.3.1 Ugotavljanje števila MO v probiotičnih prehranskih dopolnilih.....	31
3.3.2 Ugotavljanje morfoloških lastnosti kolonij in bakterijskih celic	33
3.3.3 Izolacija genomske DNA za izvedbo reakcije PCR	34
3.3.3.1 Priprava DNA za izolacijo.....	34
3.3.3.2 Izolacija DNA	34
3.3.4 Ugotavljanje vrst bakterij z metodo PCR z vrstno-specifičnimi začetnimi oligonukleotidi.....	35
3.3.4.1 Reakcija PCR.....	35
3.3.4.2 Princip reakcije PCR	35
3.3.4.3 Reakcijska mešanica za PCR.....	36
3.3.4.4 Potek PCR	37
3.3.5 Pregledovanje pomnožkov PCR z agarozno gelsko elektroforezo.....	39
3.3.5.1 Priprava agarognega gela za agarozno gelsko elektroforezo	40
3.3.5.2 Potek elektroforeze	40
3.3.6 Pomnoževanje dela 16S rDNA z metodo PCR na osnovi kolonije in priprava pomnožkov DNA za sekvenciranje	41
3.3.6.1 Reakcijska mešanica za PCR.....	41
3.3.6.2 Čiščenje pomnožkov PCR	42
3.3.7 Sekvenciranje	42
4 REZULTATI.....	43
4.1 UGOTAVLJANJE USTREZNOSTI DEKLARACIJ PROBIOTIČNIH PREHRANSKIH DOPOLNIL	43
4.2 UGOTAVLJANJE ŠTEVILA PROBIOTIČNIH BAKTERIJ V POSAMEZNIH PREHRANSKIH DOPOLNILIH IN MORFOLOGIJA	46
4.2.1 Yogermina® 100 (suspenzija).....	46
4.2.2 Bion® 3 Seniors (tablete)	48
4.2.3 BioGaia® (tablete)	49
4.2.4. Probiolex® (kapsule)	51
4.2.5 Probiolex® (prašek)	53
4.2.6 Bion® Transit (kapsule)	56
4.2.7 Bion® 3 Juniors (tablete)	57
4.2.8 BioGaia® (kapljice)	58
4.2.9 WAYA® AD (prašek).....	59

4.2.10 WAYA® AB (prašek).....	62
4.2.11 WAYA® IT (prašek)	64
4.2.12 LYOLACT® (kapsule).....	66
4.2.13 ^{NEO®} Fermental _{MAX} (suspenzija).....	68
4.2.14 ^{NEO®} Fermental _{MAX} (kapsule)	69
4.2.15 Povzetek rezultatov o ugotavljanju ustreznosti koncentracije probiotičnih bakterij v prehranskih dopolnilih.....	71
4.3 POTRJEVANJE PRISOTNOSTI DEKLARIRANIH VRST BAKTERIJ V PROBIOTIČNIH PREHRANSKIH DOPOLNILIH Z METODO PCR OZ. S SEKVENCIRANJEM (SAMO ZA <i>B. coagulans</i>) IN GELSKO ELEKTROFOREZO.	72
4.3.1 <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> in <i>Bifidobacterium lactis</i>	72
4.3.2 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	73
4.3.3 <i>Enterococcus faecium</i>	73
4.3.4 <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i> in <i>Lactobacillus plantarum</i>	74
4.3.5 <i>Lactobacillus gasseri</i> , <i>Lactobacillus reuteri</i> in <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	75
4.3.6 <i>Lactobacillus bulgaricus</i> in <i>Streptococcus thermophilus</i>	76
4.3.7 <i>Lactococcus lactis</i> in <i>Bifidobacterium bifidum</i>	76
4.3.8 Potrjevanje prisotnosti bakterij vrste <i>Bacillus coagulans</i> s pomočjo ugotavljanja nukleotidnega zaporedja	77
4.3.9 Povzetek rezultatov prisotnosti živih bakterij deklariranih vrst v probiotičnih prehranskih dopolnilih z metodo PCR oz. s sekvenciranjem (samo za <i>B. coagulans</i>)	78
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	80
5.1 RAZPRAVA.....	80
5.1.1 Ustreznost deklaracij probiotičnih izdelkov	80
5.1.2 Rezultati ugotavljanja morfologije kolonij in celic ter števila deklariranih vrst bakterij v probiotičnih izdelkih	82
5.1.3 Potrjevanje deklariranih vrst bakterij v probiotičnih izdelkih z metodo PCR oz. s sekvenciranjem (samo za <i>B. coagulans</i>).....	84
5.2 SKLEPI.....	86
6 POVZETEK.....	87
7 VIRI	89
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO SLIK

Slika 1: Verižna reakcija s polimerazo (Boyer, 2005: 350)	19
Slika 2: Shema poteka dela od nakupa probiotičnih izdelkov do končne obdelave rezultatov	25
Slika 3: Molekulska označevalca (100 bp in 1 kb) dolžin pomnožkov DNA po gelski elektroforezi na agarazi	31
Slika 4: Petrijeve plošče v inkubatorju (A), Zunanost inkubatorja z notranjo temperaturo 37 °C (B).....	32
Slika 5: Anerobne razmere z uporabo GENbox-a.....	32
Slika 6: Svetlobni mikroskop	33
Slika 7: Priprava mikroskopskega preparata	34
Slika 8: Aparatura za izvedbo reakcije PCR	36
Slika 9: Notranjost aparature za reakcijo PCR	37
Slika 10: Nanašanje vzorcev v prazne prostorčke na gelu	40
Slika 11: <i>Lb. plantarum</i> in <i>Lb. paracasei</i> na gojišču MRS; izdelek Yogermina® 100 (suspenzija).....	47
Slika 12: <i>Bif. lactis</i> pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvane po Gramu; izdelek Yogermina® 100 (suspenzija).....	47
Slika 13: <i>Lb. acidophilus</i> pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvane po Gramu; izdelek Yogermina® 100 (suspenzija)	47
Slika 14: <i>Lb. plantarum</i> in <i>Lb. paracasei</i> pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvane po Gramu; izdelek Yogermina® 100 (suspenzija).....	47
Slika 15: Vse bakterije na gojišču MRS (A), <i>Lb. gasseri</i> na gojišču MRS+cly+cip (B), <i>Bif. bifidum</i> in <i>Bif. longum</i> na gojišču MRS+cys+mup (C); izdelek Bion® 3 Seniors (tablete).....	48
Slika 16: <i>Bif. bifidum</i> in <i>Bif. longum</i> pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvane po Gramu; izdelek Bion® 3 Seniors (tablete)	49
Slika 17: <i>Lb. gasseri</i> pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvane po Gramu; izdelek Bion® 3 Seniors (tablete)	49
Slika 18: <i>Lb. reuteri</i> na gojišču MRS; izdelek BioGaia® (tablete)	50
Slika 19: Kolonija iz gojišča MRS (<i>Lb. reuteri</i>) pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvana po Gramu; izdelek BioGaia® (tablete)	50
Slika 20: Kolonija iz gojišča MRS (laktobacili in koki ali kokobacili) pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvana po Gramu; izdelek BioGaia® (tablete)	50
Slika 21: <i>B. coagulans</i> na gojišču BHI; izdelek Probioplex® (kapsule)	52
Slika 22: Kolonija iz gojišča M17 (<i>Str. thermophilus</i>) pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvana po Gramu (A), Kolonija iz gojišča M17 (G+ palčke) pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvana po Gramu (B), <i>B. coagulans</i> pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvane po Gramu (C); izdelek Probioplex® (kapsule)	52
Slika 23: <i>Lb. bulgaricus</i> na gojišču MRS (pH=5,2) (A), <i>Bif. bifidum</i> pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvane po Gramu (B), <i>Lb. acidophilus</i> pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvane po Gramu (C); izdelek Probioplex® (prašek)	54

Slika 24: Kolonija iz gojišča M17 (<i>Str. thermophilus</i>) pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvana po Gramu (A), Kolonija iz gojišča M17 (G+ palčke) pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvana po Gramu (B); izdelek Probiolex® (prašek)	54
Slika 25: <i>B. coagulans</i> na gojišču PCA (vmešavanje) pri temperaturi ink. 42 °C (C); izdelek Probiolex® (prašek)	55
Slika 26: <i>Lb. plantarum</i> pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvane po Gramu; izdelek Bion® Transit (kapsule)	56
Slika 27: <i>Lb. gasseri</i> na gojišču MRS+cly+cip (A), <i>Lb. gasseri</i> pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvane po Gramu (B); izdelek Bion® 3 Juniors (tablete)	57
Slika 28: <i>Lb. reuteri</i> na gojišču MRS; izdelek BioGaia® (kapljice)	58
Slika 29: <i>Bif. bifidum</i> na gojišču MRS+cys+mup (A), <i>Lb. acidophilus</i> na gojišču MRS+cly+cip (B); izdelek WAYA® AD (prašek)	60
Slika 30: <i>Lb. casei</i> in <i>Lb. plantarum</i> na gojišču MRS pri temperaturi ink. 30 °C (A), <i>Lb. rhamnosus</i> in <i>Lb. salivarius</i> na gojišču MRS pri temperaturi ink. 37 °C (B), <i>Lc. lactis</i> na gojišču M17 (C); izdelek WAYA® AD (prašek)	60
Slika 31: Velika kolonija iz gojišča MRS pri temperaturi ink. 37 °C (laktobacili) pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvana po Gramu (A), Majhna kolonija iz gojišča MRS pri temperaturi ink. 37 °C (laktobacili) pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvana po Gramu (B); izdelek WAYA® AD (prašek)	61
Slika 32: <i>Bif. bifidum</i> pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvane po Gramu; izdelek WAYA® AD (prašek)	61
Slika 33: <i>Lc. lactis</i> pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvane po Gramu (A), <i>Lb. casei</i> in <i>Lb. plantarum</i> pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvane po Gramu (B); izdelek WAYA® AD (prašek)	61
Slika 34: <i>Ent. faecium</i> na gojišču CATC (A), <i>Lb. paracasei</i> in <i>Lb. plantarum</i> na gojišču MRS pri temperaturi ink. 30 °C (B), <i>Bif. bifidum</i> in <i>Bif. lactis</i> na gojišču MRS+cys+mup (C); izdelek WAYA® AB (prašek)	63
Slika 35: <i>Lb. rhamnosus</i> in <i>Lb. salivarius</i> na gojišču MRS pri temperaturi ink. 37 °C (A), <i>Lb. acidophilus</i> na gojišču MRS+cly+cip (B); izdelek WAYA® AB (prašek)	63
Slika 36: <i>Ent. faecium</i> pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvane po Gramu; izdelek WAYA® AB (prašek)	64
Slika 37: <i>Lb. casei</i> in <i>Lb. plantarum</i> na gojišču MRS pri temperaturi ink. 30 °C (A), <i>Lb. rhamnosus</i> na gojišču MRS pri temperaturi ink. 37 °C (B), <i>Bif. bifidum</i> , <i>Bif. longum</i> in <i>Bif. lactis</i> na gojišču MRS+cys+mup (C); izdelek WAYA® IT (prašek)	65
Slika 38: <i>Bif. bifidum</i> , <i>Bif. longum</i> in <i>Bif. lactis</i> pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvane po Gramu (A), <i>Lb. rhamnosus</i> pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvane po Gramu (B), <i>Lb. casei</i> in <i>Lb. plantarum</i> pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvane po Gramu (C); izdelek WAYA® IT (prašek)	65
Slika 39: <i>Lb. bulgaricus</i> na gojišču MRS (pH=5,2) (A), <i>Lb. gasseri</i> na gojišču MRS+cly+cip (B), <i>Str. thermophilus</i> na gojišču M17 (C); izdelek LYOLACT® (kapsule)	67

Slika 40: <i>Lb. gasseri</i> pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvane po Gramu (A), Manjša kolonija iz gojišča MRS (pH=5,2) (koki) pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvana po Gramu (B), Večja kolonija iz gojišča MRS (pH=5,2) (<i>Lb. bulgaricus</i>) pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvana po Gramu (C); izdelek LYOLACT® (kapsule).....	67
Slika 41: Večja kolonija iz gojišča M17 (<i>Str. thermophilus</i>) pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvana po Gramu (A), Manjša kolonija iz gojišča M17 (laktobacili) pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvana po Gramu (B); izdelek LYOLACT® (kapsule)	68
Slika 42: <i>B. coagulans</i> na gojišču BHI (A), <i>B. coagulans</i> pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvane po Gramu (B); izdelek ^{NEO®} Fermental _{MAX} (suspenzija)	69
Slika 43: <i>B. coagulans</i> na gojišču BHI; izdelek ^{NEO®} Fermental _{MAX} (kapsule)	70
Slika 44: Manjša kolonija iz gojišča BHI (bacili) pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvana po Gramu (A), Večja kolonija iz gojišča BHI (bacili in koki) pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvana po Gramu (B); izdelek ^{NEO®} Fermental _{MAX} (kapsule)	70
Slika 45: Pomnožki PCR z začetnimi oligonukleotidi za bakterijske vrste <i>Bif. bifidum</i> , <i>Bif. longum</i> in <i>Bif. lactis</i>	72
Slika 46: Pomnožki PCR z začetnimi oligonukleotidi za bakterijsko vrsto <i>Lb. acidophilus</i>	73
Slika 47: Pomnožki PCR z začetnimi oligonukleotidi za bakterijsko vrsto <i>Ent. faecium</i> ...	73
Slika 48: Pomnožki PCR z začetnimi oligonukleotidi za bakterijske vrste <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. paracasei</i> in <i>Lb. plantarum</i>	74
Slika 49: Pomnožki PCR z začetnimi oligonukleotidi za bakterijske vrste <i>Lb. gasseri</i> , <i>Lb. reuteri</i> in <i>Lb. rhamnosus</i>	75
Slika 50: Pomnožki PCR z začetnimi oligonukleotidi za bakterijski vrsti <i>Lb. bulgaricus</i> in <i>Str. thermophilus</i>	76
Slika 51: Pomnožki PCR z začetnimi oligonukleotidi za bakterijski vrsti <i>Lc. lactis</i> in <i>Bif. bifidum</i>	76
Slika 52: Očiščeni pomnožki PCR velikosti 660 bp (kar je bila pričakovana velikost produktov), pripravljeni za analize nukleotidnega zaporedja.....	77

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: MO, ki jih uporabljajo kot probiotike (Gardiner in sod., 2002)	5
Preglednica 2: Opis rodov bakterij, ki jih najpogosteje uporabljajo kot probiotike (Adamič in sod., 2003)	5
Preglednica 3: Klinični učinki nekaterih probiotičnih sevov (Rogelj, 2001: 226; Salminen in Gueimonde, 2004)	14
Preglednica 4: Probiotična prehranska dopolnila na slovenskem trgu (november 2009) ...	23
Preglednica 5: Probiotična prehranska dopolnila, ki smo jih analizirali	26
Preglednica 6: Gojišča, katera smo uporabili v raziskavi, vrste bakterij, katerim je bilo gojišče namenjeno, ter posebnosti posameznih gojišč	27
Preglednica 7: Začetni oligonukleotidi za posamezno vrsto bakterij	30
Preglednica 8: Pogoji inkubacije in ustrezna gojišča za izbrane vrste bakterij	32
Preglednica 9: Imena, pričakovana velikost pomnožkov in viri za začetne oligonukleotide, ki smo jih uporabili v reakcijah PCR.....	37
Preglednica 10: Parametri reakcij PCR za ugotavljanje prisotnosti DNA posameznih vrst bakterij	38
Preglednica 11: Parametri reakcije PCR za pomnoževanje dela 16S rDNA iz kolonij <i>B. coagulans</i> z začetnimi oligonukleotidi P1 in P4	41
Preglednica 12: Podatki na deklaracijah izbranih probiotičnih prehranskih dopolnil	43
Preglednica 13: Rezultati štetja KE probiotičnih bakterij v izdelku Yogermina® 100 (suspenzija), morfološkega opazovanja bakterijskih kolonij na gojiščih in bakterijskih celic pod mikroskopom (barvanje po Gramu)	46
Preglednica 14: Rezultati štetja KE probiotičnih bakterij v izdelku Bion® 3 Seniors (tablete), morfološkega opazovanja bakterijskih kolonij na gojiščih in bakterijskih celic pod mikroskopom (barvanje po Gramu)	48
Preglednica 15: Rezultati štetja KE probiotičnih bakterij v izdelku BioGaia® (tablete), morfološkega opazovanja bakterijskih kolonij na gojiščih in bakterijskih celic pod mikroskopom (barvanje po Gramu)	49
Preglednica 16: Rezultati štetja KE probiotičnih bakterij v izdelku Probiolex® (kapsule), morfološkega opazovanja bakterijskih kolonij na gojiščih in bakterijskih celic pod mikroskopom (barvanje po Gramu)	51
Preglednica 17: Rezultati štetja KE probiotičnih bakterij v izdelku Probiolex® (prašek), morfološkega opazovanja bakterijskih kolonij na gojiščih in bakterijskih celic pod mikroskopom (barvanje po Gramu)	53
Preglednica 18: Število KE <i>B. coagulans</i> v probiotičnem izdelku Probiolex® (prašek) po termični obdelavi na 80 °C/10 minut.....	55
Preglednica 19: Rezultati štetja KE probiotičnih bakterij v izdelku Bion® Transit (kapsule) morfološkega opazovanja bakterijskih kolonij na gojiščih in bakterijskih celic pod mikroskopom (barvanje po Gramu).....	56
Preglednica 20: Rezultati štetja KE probiotičnih bakterij v izdelku Bion® 3 Juniors (tablete), morfološkega opazovanja bakterijskih kolonij na gojiščih in bakterijskih celic pod mikroskopom (barvanje po Gramu)	57
Preglednica 21: Rezultati štetja KE probiotičnih bakterij v izdelku BioGaia® (kapljice), morfološkega opazovanja bakterijskih kolonij na gojiščih in bakterijskih celic pod mikroskopom (barvanje po Gramu).....	58

Preglednica 22: Rezultati štetja KE probiotičnih bakterij v izdelku WAYA® AD (prašek), morfološkega opazovanja bakterijskih kolonij na gojiščih in bakterijskih celic pod mikroskopom (barvanje po Gramu).....	59
Preglednica 23: Rezultati štetja KE probiotičnih bakterij v izdelku WAYA® AB (prašek), morfološkega opazovanja bakterijskih kolonij na gojiščih in bakterijskih celic pod mikroskopom (barvanje po Gramu).....	62
Preglednica 24: Rezultati štetja KE probiotičnih bakterij v izdelku WAYA® IT (prašek), morfološkega opazovanja bakterijskih kolonij na gojiščih in bakterijskih celic pod mikroskopom (barvanje po Gramu).....	64
Preglednica 25: Rezultati štetja KE probiotičnih bakterij v izdelku LYOLACT® (kapsule), morfološkega opazovanja bakterijskih kolonij na gojiščih in bakterijskih celic pod mikroskopom (barvanje po Gramu).....	66
Preglednica 26: Rezultati štetja KE probiotičnih bakterij v izdelku ^{NEO®} Fermental _{MAX} (suspenzija), morfološkega opazovanja bakterijskih kolonij na gojiščih in bakterijskih celic pod mikroskopom (barvanje po Gramu)	68
Preglednica 27: Rezultati štetja KE probiotičnih bakterij v izdelku ^{NEO®} Fermental _{MAX} (kapsule), morfološkega opazovanja bakterijskih kolonij na gojiščih in bakterijskih celic pod mikroskopom (barvanje po Gramu)	69
Preglednica 28: Zbrani rezultati štetja probiotičnih bakterij v različnih probiotičnih prehranskih dopolnilih.....	71
Preglednica 29: Analiza nukleotidnega zaporedja DNA iz različnih kolonij iz izdelkov ^{NEO®} Fermental _{MAX} (suspenzija), ^{NEO®} Fermental _{MAX} (kapsule) in Probiolex® (prašek)	78
Preglednica 30: Povzetek rezultatov prisotnosti/odsotnosti deklariranih vrst bakterij z metodo PCR oz. s sekvenciranjem (samo za <i>B. coagulans</i>) in agarozno gelsko elektroforezo v različnih probiotičnih prehranskih dopolnilih.....	78

KAZALO PRILOG

Priloga A: Rezultati sekvenciranja dela V1/V3 gena za 16S rRNA izolatov *B. coagulans*

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	adenin
AFC	Australian Food Council
AFLP	amplified fragment length polymorphism (polimorfizem dolžin pomnožkov DNA)
ANZFA	Australia New Zealand Food Authority
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>B. clausii</i>	<i>Bacillus clausii</i>
<i>B. coagulans</i>	<i>Bacillus coagulans</i>
<i>B. licheniformis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
BHI	gojišče Brain Heart Infusion
<i>Bif. adolescentis</i>	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>
<i>Bif. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Bifidobacterium animalis</i> subspecies <i>lactis</i>
<i>Bif. bifidum</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
<i>Bif. breve</i>	<i>Bifidobacterium breve</i>
<i>Bif. infantis</i>	<i>Bifidobacterium infantis</i>
<i>Bif. lactis</i>	<i>Bifidobacterium lactis</i>
<i>Bif. longum</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>
BLAST	Basic Local Aligment Search Tool
bp	bazni par
C	citozin
CATC	gojišče Citrate Azide Tween Carbonate
CFU	colony-forming unit (enota, ki tvori kolonijo)
cip	ciprofloxacin
<i>Cl. difficile</i>	<i>Clostridium difficile</i>
cly	klindamicin
cys	cistein
DGGE	denaturing gradient gel electrophoresis (elektroforetsko ločevanje DNA na poliakrilamidnem gelu z gradientom denaturacijskega sredstva)
DNA	deoxyribonucleic acid (deoksiribonukleinska kislina)
dNTP	deoksinukleotid trifosfat (mešanica nukleotidov)
EDTA	ethylenediaminetetraacetate (etylendiamin-tetraacetat)
EFSA	European Food Safety Authority
<i>Ent. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Ent. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
EU	Evropska unija
FAO	Food and Agriculture Organization
FDA	Food and Drug Administration
FOSHU	Foods for Specified Health Use
FUFOSE	Functional Food Science in Europe
G	gvanin
G+	po Gramu pozitivne
G-	po Gramu negativne
GRAS	generally recognized as safe (splošno priznano kot varno)

<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
IgG	imunoglobulin G
ILSI	International Life Science Institute
ink.	inkubacija
JHCI	Joint Health Claims Initiative
kb	kilobazni par
KE	kolonijske enote
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>Lb. bulgaricus</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> (skrajšano <i>Lactobacillus bulgaricus</i>)
<i>Lc. lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subspecies <i>cremoris</i>
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subspecies <i>lactis</i>
<i>Lb. casei</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
<i>Lb. fermentum</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>
<i>Lb. gasseri</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i>
<i>Lb. johnsonii</i>	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
<i>Lb. paracasei</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>
<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>Lb. reuteri</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>
<i>Lb. rhamnosus</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
<i>Lb. salivarius</i>	<i>Lactobacillus salivarius</i>
<i>Lb. sporogenes</i>	<i>Lactobacillus sporogenes</i>
M	molarnost (mol/l)
MKB	mlečnokislinske bakterije
MO	mikroorganizmi
MRS	gojišče de Man, Rogosa in Sharpe
mup	mupirocin
M17	gojišče za <i>Streptococcus thermophilus</i> in za laktokoke
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCA	Plate Count Agar
PCR	polymerase chain reaction (verižna reakcija s polimerazo)
PFGE	pulsed field gel electrophoresis (gelska elektroforeza v utripajočem polju)
RAPD	randomly amplified polymorphic DNA (verižna reakcija s polimerazo z naključno izbranimi začetnimi oligonukleotidi)
rDNA	ribosomal deoxyribonucleic acid (ribosomalna deoksiribonukleinska kislina)
real-time PCR	PCR v realnem času
RFLP	restriction fragment length polymorphism (študij polimorfizma dolžin restrikcijskih fragmentov oz. restrikcijska analiza pomnožkov PCR)
RNA	ribonucleic acid (ribonukleinska kislina)
rRNA	ribosomal ribonucleic acid (ribosomalna ribonukleinska kislina)

<i>Sac. boulardii</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata)
sp.	species (vrst)
stekl.	steklenička
<i>Str. thermophilus</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
subsp.	subspecies (podvrsta)
T	timin
TAE	tris acetatni pufer
Taq polimeraza	polimeraza, izolirana iz mikroorganizma <i>Thermus aquaticus</i>
U	unit (enota, encimska enota)
u.f.c.	celice, ki tvorijo kolonijo
UV	ultravijoličen (-a svetloba)
VBNC	viable but not culturable (žive, ampak nekultivabilne)
WHO	World Health Organization

1 UVOD

Na slovenskem trgu je mogoče dobiti vedno več probiotičnih prehranskih dopolnil, ki imajo znanstveno dokazan pozitiven vpliv na zdravje uporabnika. Kupimo jih lahko v lekarnah in specializiranih trgovinah. Označevanje le-teh je pogosto pomanjkljivo in neustrezno glede števila probiotičnih bakterij in deklariranih vrst.

Probiotične bakterije so živi mikroorganizmi (MO), ki imajo, če jih zaužijemo v zadostnem številu, pozitivne učinke na zdravje potrošnika (Guarner in Schaafsma, 1998). Najbolj tipični predstavniki probiotičnih bakterij so iz rodov *Lactobacillus* in *Bifidobacterium*. Probiotike pa najdemo tudi med predstavniki *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* in *Bacillus*. V prehranskih izdelkih so najbolj razširjeni probiotiki iz skupine mlečnokislinskih bakterij (MKB) in bifidobakterij, ki delijo z MKB isto ekološko nišo – fermentirano hrano in prebavni trakt, vendar so taksonomsko precej oddaljene od rodov MKB. Glavni produkt metabolizma bifidobakterij je ocetna kislina, medtem ko je pri MKB mlečna kislina. MKB so po Gramu pozitivne (G+), nesporogene, naseljujejo anaerobne niše, a so aerotolerantne, acidotolerantne, prehransko zahtevne, katalaza negativne bakterije, ki energijo pridobijo izključno s fermentacijo, ter v splošnem veljajo za varne bakterije. Najbolj razširjeni sevi, ki jih uporabljam kot probiotike, pripadajo vrstam MKB s statusom GRAS (angl. generally recognized as safe). Probiotične bakterije lahko učinkujejo na različne načine. Doslej so dokazali, da lahko:

- pomagajo pri težavah s kroničnim zaprtjem,
- koristijo pri lajšanju vnetnih črevesnih bolezni,
- lajšajo simptome pri sindromu vzdraženega črevesja,
- zmanjšajo pogostost pojava alergij pri otrocih,
- zmanjšajo pojav vseh vrst diarej,
- zmanjšajo nevarnost za nastanek črevesnih okužb,
- lajšajo pojav zaprtja in zmanjšajo nevarnost za nastanek raka debelega črevesa,
- kot kultura v jogurtu izboljšajo prebavo lakoze pri ljudeh, ki ne morejo učinkovito absorbirati lakoze,
- izboljšajo kolonizacijsko rezistenco črevesne mikrobiote,
- vzdržujejo ravnotežje črevesne mikrobiote,
- vzpostavljajo ravnotežje mikrobiote ob diareji in terapiji z antibiotiki,
- vzpodobujajo imunski sistem (Perdigon in sod., 1995).

Poglavitni mehanizmi učinkovanja probiotikov so naslednji:

- tekmovanje za hranila,
- zasedanje mest pripenjanja na črevesno sluznico,
- zniževanje vrednosti pH okolja,
- producija protimikrobnih snovi,
- redukcija pro-karcinogenih snovi,
- interakcije s celicami črevesne sluznice in imunskega sistema.

Kakovost probiotikov določajo splošne mikrobiološke (sposobnost preživetja v izdelku in človeškem prebavnem traktu), tehnološke in funkcionalne lastnosti probiotičnih MO, ki so med seboj povezane in soodvisne (Sanders in Huis in't Veld, 1999). Probiotik naj bi

zadostil zahtevam, kot so humani izvor ter fenotipska in genotipska stabilnost v pogojih proizvodnje, skladiščenja in po zaužitju le-tega (Holzapfel in sod., 1998; Saarela in sod., 2000).

Najpogostejsi način ugotavljanja števila MO v probiotičnih izdelkih je štetje kolonij na hranljivih gojiščih. Tradicionalni taksonomski sistem MKB je temeljil na fenotipskih lastnostih (morfologija, način fermentacije glukoze, temperaturno območje rasti, konfiguracija mlečne kisline in sposobnost fermentacije različnih ogljikovih hidratov). Hibridizacijski testi, kot so DNA-DNA ali DNA-RNA, in primerjalne sekvenčne analize genov za 16S rRNA in 23S rRNA so pokazali odstopanja klasično postavljenih taksonov od filogenetske sorodnosti, ki jo odraža nukleotidno zaporedje izbranih odsekov genoma (npr. ribosomskih genov). To je pripeljalo do velikih sprememb v taksonomiji številnih bakterijskih rodov. Težavna je bila tudi identifikacija probiotičnih sevov, saj številni sevi in celo vrste niso razločljivi na osnovi fenotipskih lastnosti. Vse to je vodilo k uporabi molekularnih metod identifikacije in tipizacije probiotičnih sevov v seleksijskih postopkih in pri sledenju njihove prisotnosti v funkcionalnem živilu med proizvodnjo ali skladiščenjem ali v prebavnem traktu po zaužitju izdelka (Smole Možina in Jeršek, 2001).

Glavna prednost molekularnih metod pred klasičnimi mikrobiološkimi tehnikami je ta, da vse bolj odpravljajo potrebo po kultivaciji MO in zato dajejo realnejšo sliko mikrobne raznolikosti mikrobnih združb. Med molekularnimi metodami imajo prednost tiste, ki temeljijo na analizi DNA, ker je ta manj odvisna od okoljskih dejavnikov kot ostale sestavine mikrobnih celic. Iz mikrobnih celic lahko osamimo celotno DNA ali pa le posamezne dele genoma (npr. plazmidno DNA ali kromosomalno DNA) (Smole Možina in Jeršek, 2001).

Veliko občutljivost pri odkrivanju prisotnosti MO v kompleksnih okoljih dosežemo z uporabo PCR (angl. polymerase chain reaction, tj. verižna reakcija s polimerazo), ki omogoča encimsko pomnožitev kratkega dela matrične (mikrobske) DNA *in vitro* (Smole Možina in Jeršek, 2001).

Sekvenciranje je ugotavljanje nukleotidnega zaporedja pomnožkov DNA in tako daje najpopolnejšo informacijo o pomnožkih PCR. Primerjalna sekvenčna analiza genov za 16S rRNA je ena od temeljev sodobne mikrobske taksonomije, saj takšna analiza omogoča identifikacijo prisotnih mikrobnih vrst in s tem odkrivanje kompleksnosti mikrobske združbe črevesa, vključno z morebitnimi učinki uživanja probiotičnih bakterij (Ricke in Pillai, 1999; Tannock, 2001).

1.1 CILJI NALOGE

Cilji diplomske naloge so bili:

- ugotavljanje števila in potrjevanje prisotnosti navedenih vrst probiotičnih bakterij v posameznem prehranskem dopolnilu ter
- ugotavljanje ustreznosti deklaracij analiziranih probiotičnih prehranskih dopolnil (skladnost rezultatov štetja probiotičnih bakterij z deklariranim številom; skladnost rezultatov reakcij PCR z navedenimi vrstami).

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Delovne hipoteze diplomske naloge so bile:

- Na slovenskem tržišču obstajajo izdelki (probiotična prehranska dopolnila), katerih deklaracije niso popolne oz. pravilne (rezultati štetja nižji od deklariranih števil, odsotnost navedenih bakterijskih vrst ali prisotnost nedeklariranih vrst).
- Na slovenskem tržišču obstajajo izdelki, pri katerih bo ugotovljeno število vsebovanih kultivabilnih probiotičnih bakterij nižje od navedenega.
- Prisotnost kultivabilnih bakterij navedenih vrst probiotičnih bakterij je mogoče ugotoviti z uporabo reakcije PCR z izbranimi vrstno-specifičnimi začetnimi oligonukleotidi, pri čemer v reakciji uporabimo DNA iz konzorcijev zraslih kolonij.

2 PREGLED OBJAV

2.1 DEFINICIJE PROBIOTIKOV

Začetki probiotikov segajo že daleč v zgodovino, v čas, ko so ljudje začeli uživati fermentirano mleko, saj so mu že takrat pripisovali zdravju koristne učinke. Nova spoznanja, da so z ugodnimi učinki na zdravje povezane bakterije, pa segajo v začetek dvajsetega stoletja. Take bakterije dandanes imenujejo probiotiki (Rogelj in Bogovič Matijašić, 2004).

Beseda probiotik izhaja iz grške besede »*pro bios*«, ki pomeni »za življenje« (Myers, 2007).

Začetnik sodobnega koncepta probiotikov je Ellie Metchnikoff, ki je MKB pripisal pomembno vlogo pri vzdrževanju zdravja, saj naj bi zavirale gnilobni tip fermentacij v črevesju (Shortt, 1999).

Tissier je leta 1906 govoril o ugodnih kliničnih učinkih moduliranja mikrobiote pri otrocih s črevesnimi infekcijami in trdil, da lahko bifidobakterije »izrinejo« patogene bakterije (Rogelj in Perko, 2003).

Izraz probiotik sta prva uporabila Lilly in Stillwell leta 1965 za opis substanc, ki jih proizvaja en MO in stimulirajo rast drugih MO (Rogelj in Perko, 2003).

Sperti (1971) ter Fujii in Cook (1973) so probiotike označili kot spojine, ki spodbujajo rast MO ali izboljšajo imunski odziv gostitelja.

Tudi Parker (1974) je uporabil izraz probiotiki za opis dodatkov živalski krmi, ki pospešujejo rast.

Kasneje je Fuller (1989) postavil osnovno definicijo probiotikov. Po njegovem mnenju so probiotiki živ mikrobeni dodatek krmi, ki ugodno vpliva na žival gostiteljico z izboljšanjem njenega mikrobnega ravnotežja.

Definicija probiotikov je bila dolgo vezana le na živalsko prehrano. Zato sta Havenaar in Huis in't Veld (1992) predlagala, da se ta definicija razširi tudi na humano prehrano. Njuna definicija je temeljila na tem, da je probiotik mono ali mešana kultura živih MO, ki koristno učinkujejo na človeka ali žival z uravnavanjem črevesne mikrobiote.

Danes uveljavljena definicija probiotikov, ki sta jo sprejeli tudi organizaciji FAO (angl. Food and Agriculture Organization) in WHO (angl. World Health Organization), pravi, da so to živi MO, ki ob zaužitju v zadostni količini pozitivno delujejo na zdravje neposredno ali posredno z okrepitevijo fizioloških oz. obrambnih mehanizmov (Guarner in Schaafsma, 1998).

Probiotiki vplivajo na fiziologijo gostitelja tako, da okrepijo imunski odgovor in izboljšajo prehransko in mikrobeno ravnovesje v prebavilih. Pozitivno delovanje na imunski sistem ni

omejeno le na žive celice, ampak tudi celični kompleksi (mrtve celice ali deli celic) MKB ali drugih probiotičnih MO lahko vplivajo na funkcijo črevesne sluznice in na imunski odgovor (Naidu in sod., 1999).

Probiotična prehranska dopolnila lahko s svojimi sestavinami pozitivno učinkujejo na eno ali več funkcij organizma (Roberfroid, 1996).

2.2 RODOVI BAKTERIJ, KI JIH NAJPOGOSTEJE UPORABLJAJO KOT PROBIOTIČNE BAKTERIJE

MKB so najpogostejši predstavniki probiotičnih bakterij in so naravno prisotne v človekovem in živalskem prebavnem traktu ter na drugih mukoznih površinah (Holzapfel in Schillinger, 2002). MKB so ena izmed industrijsko najbolj pomembnih skupin bakterij, saj jih uporablajo v različne namene, kot so proizvodnja hrane, za izboljšanje zdravja (probiotiki), proizvodnjo makromolekul, encimov in metabolitov (Pfeiler in Klaenhammer, 2007). Največ poznanih probiotičnih sevov pripada rodovoma *Lactobacillus* in *Bifidobacterium* (preglednica 1), ki sta že naravno prisotna v prebavnem traktu in fermentirani hrani. Bifidobakterije ne spadajo v družino MKB, z njimi delijo le isti življenjski prostor – prebavni trakt in fermentirano hrano. Ena pomembnejših razlik med njimi je, da je glavni proizvod MKB mlečna kislina, pri bifidobakterijah pa acetna kislina. Vsak sev MKB ali bifidobakterij nima probiotičnih lastnosti. Da lahko sploh opravijo svojo pozitivno vlogo v prebavnem traktu, morajo zaužite bakterije najprej preživeti prehod do črevesja in ga vsaj začasno naseliti, kar pomeni, da morajo uspešno tekmovati za življenjski prostor in hranila, odporne morajo biti na nizke vrednosti pH ter proizvajati protimikrobnne snovi. Izbera probiotika mora temeljiti na natančno določenih selekcijskih kriterijih, ki vključujejo ugotavljanje varnosti in kliničnih učinkov (Klaenhammer in Kullen, 1999; Saarela in sod., 2000).

Preglednica 1: MO, ki jih uporabljajo kot probiotike (Gardiner in sod., 2002)

Laktobacili	Bifidobakterije	Enterokoki	Ostali
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Bif. bifidum</i>		<i>Sac. boulardii</i>
<i>Lb. plantarum</i>	<i>Bif. infantis</i>		<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
<i>Lb. casei</i>	<i>Bif. adolescentis</i>		<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
<i>Lb. rhamnosus</i>	<i>Bif. longum</i>		<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>Lb. bulgaricus</i>	<i>Bif. breve</i>		<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>Lb. fermentum</i>	<i>Bif. lactis</i>		<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>Lb. johnsonii</i>			<i>Str. thermophilus</i>
<i>Lb. gasseri</i>			<i>Escherichia coli</i>
<i>Lb. salivarius</i>			<i>B. coagulans</i>
<i>Lb. reuteri</i>			

Legenda:

subsp....subspecies (podvrsta)

Sev, ki ga želimo uporabiti v probiotičnem živilu ali prehranskem dopolnilu, mora preživeti tehnološki postopek izdelave in v zadostnem številu prispeti do ciljnega mesta v prebavnem traktu (Gardiner in sod., 1998). Sev mora tudi obdržati obstojnost med skladiščenjem in distribucijo izdelka. Dodatek probiotičnega seva ne sme negativno vplivati na senzorične lastnosti živila. Predvsem je pomembno, da je genetsko stabilen

(Rogelj in Perko, 2003). Vsak probiotični bakterijski sev je zelo specifičen in vsakega od njih je treba proučiti posebej (Yeung in sod., 2004).

Preglednica 2: Opis rodov bakterij, ki jih najpogosteje uporabljajo kot probiotike (Adamič in sod., 2003)

Rodovi bakterij	Značilnosti posameznega rodu
rod <i>Lactobacillus</i>	najpomembnejše MKB in najpomembnejša skupina industrijsko uporabnih bakterij v živilstvu, G+ dolge ali koloidne, negibljive, nesporogene palčke, energijo pridobivajo s fermentacijo sladkorjev, aerotolerantni anaerobi, prehransko zahtevni
rod <i>Bifidobacterium</i>	anaerobne, negibljive, nesporogene, G+ odebujene palčke v obliki črk V in Y (razvejane palčke), njihov glavni produkt je ocetna kislina, najpomembnejši organizmi črevesne mikrobiote
rod <i>Enterococcus</i>	G+ koki, v parih ali kratkih verižicah, ubikvitarni bakterije, odporne bakterije, preživijo mnoge živilske procese; pozitivne lastnosti enterokokov: v proizvodnji probiotičnih izdelkov, lahko proizvajajo protimikrobne snovi, imajo vodilno vlogo pri fermentaciji nekaterih vrst sirov; negativne lastnosti enterokokov: nekateri oportunistični patogeni, povzročajo lahko črevesna obolenja in bolnišnične infekcije, nekateri prenašalci genov za odpornost proti antibiotikom
rod <i>Streptococcus</i>	pomembni pri proizvodnji fermentiranih živil, okrogli, G+, fakultativni do obvezno anaerobni koki, so v parih, krajsih ali daljših verižicah
rod <i>Lactococcus</i>	okrogle, negibljive, nesporogene MKB, v proizvodnji fermentiranih mlečnih izdelkov, fermentirajo laktozo v mlečno kislino, tvorijo produkte, pomembne za aromo fermentiranih izdelkov, nekateri sevi tvorijo bakteriocine (nizin)
rod <i>Bacillus</i>	G+, ubikvitarni bakterije, aerobne ali fakultativno anaerobne palčke, tvorijo endospore, nekatere acidofilne, druge halotolerante ali celo halofilne, glede na temperaturno območje rasti so mezofilne, psihrotrofne, termofilne, topotropne odpornost spor je različna, nekateri kvarljivci živil, nekateri povzročitelji alimentarnih toksikoinfekcij, nekatere vrste rodu pomembni industrijski MO (za pridobivanje encimov, antibiotikov, insekticidov)

Nekateri probiotični izdelki za ljudi vsebujejo tudi spore nekaterih vrst rodu *Bacillus*. Ti organizmi niso običajni naseljevalci črevesja, ampak jih najdemo v zemlji, zraku, vodi, rastlinah, človeških in živalskih iztrebkih. Ker nekateri predstavniki tega rodu lahko proizvajajo enterotoksine, je potrebno seve *Bacillus* še posebej skrbno proučiti, preden pridejo v uporabo. Velik del spor preživi prehod skozi želodec in pride v črevesje, kjer lahko učinkujejo. Posamezni sevi rodu *Bacillus* naj bi stimulirali imunski odziv, proizvajali vitamin K2, imeli protitumorno delovanje. Probiotike v obliki spor ponavadi uporabljajo za preprečevanje črevesnih obolenj, predvsem drisk, ki so posledica uživanja antibiotikov. Sporogeni predstavniki *Bacillus* proizvajajo tudi bakteriocin koagulin, ki pozitivno učinkuje na infekcije sečnih poti (Huynh in sod., 2005).

Bakterije rodu *Bacillus* so kot probiotiki v uporabi že 50 let. Leta 1958 je bil v Italiji registriran farmacevtski dodatek Enterogermina®, ki je prvi vseboval bakterije tega rodu, vendar pa večjo pozornost tem bakterijam namenjajo šele zadnjih petnajst let. Predvsem so proučevali bakterije vrste *B. subtilis*, *B. clausii*, *B. cereus*, *B. coagulans* in *B. licheniformis*. Spore bakterij rodu *Bacillus* imajo kar nekaj prednosti pred drugimi MO, ki ne tvorijo spor. Prva je ta, da spore v proizvodu v posušeni obliki tudi pri sobni temperaturi dobro preživijo. Druga prednost je, da so spore sposobne preživeti nizke vrednosti pH želodca (Cutting, 2011).

2.3 MIKROBIOTA PREBAVNEGA TRAKTA

Človeški prebavni trakt poseljuje ogromno število MO, predvsem anaerobnih. Mikrobiota prebavnega trakta je sprva (pri dojenčkih) relativno enostavna, vendar z odraščanjem postaja vse kompleksnejša. Število različnih bakterij je pri posameznikih lahko zelo različno, kakor tudi raznolikost in vrstna sestava. Prehrana ima velik pomen, ne samo za ljudi, temveč tudi za bakterije v našem črevesju. Energijo bakterijam predstavljajo predvsem neprebavljive komponente v hrani, kot so celuloza, hemiceluloza, pektin, inulin (Blaut in Clavel, 2007).

Kolonizacija črevesja se začne takoj po rojstvu. Način rojstva (naraven, carski rez) in prehranjevanje (dojenje ali hranjenje po steklenički z mlekom v prahu) ter okolje, v katerem se otrok roditi (razviti svet, države v razvoju), vplivajo na potek kolonizacije. Pri vsakem posamezniku se razvije posebna kombinacija prevladujočih vrst bakterij, ki je dokaj stabilna. Precej bakterij, ki jih z mikroskopom lahko najdemo, je nemogoče kultivirati (40–80 %). Zaradi tega se za proučevanje uporablajo molekularno-biološki pristopi (Guarner in Malagelada, 2003).

V želodcu je malo bakterij, več jih je v tankem črevesu, največ pa v debelem, ki vsebuje kompleksni mikrobiom. Nekatere bakterije so potencialni patogeni, vendar lahko interakcija med gostiteljem in mikrobi prinaša tudi koristi za zdravje (Guarner in Malagelada, 2003).

Črevesne bakterije imajo izredno velik katalitični potencial. Pripisujejo jim pomembno vlogo v našem organizmu, saj sodelujejo v številnih procesih zaviranja oz. spodbujanja določenih bolezni (tumorji, nastanek Ca-oksalatnih kamnov, kronična črevesna vnetja ...), vplivajo na naš imunski sistem, sodelujejo pri popravi poškodovanih celic, aktivaciji oz. inaktivaciji določenih bioaktivnih komponent v hrani (npr. lignin v rastlinah). Aktiviran lignin oz. spremenjen do oblike, ki se lahko uporabi v nadaljnjih procesih, ima pozitivne učinke na diabetes in srčno-žilne bolezni s svojim antiaterogenim efektom, prav tako pa pomaga pri zniževanju holesterola (Blaut in Clavel, 2007).

Bakterije lahko prehajajo iz črevesja skozi sluznico. Nepravilno delovanje sluznične ovire v črevesju ima lahko za posledico prehajanje množice živih MO, ki z limfo pridejo v notranje organe, npr. jetra ali vranico. Bakterije se lahko razširijo po vsem telesu in povzročijo sepsko, šok, odpoved organov ali smrt. Testi na živalih so pokazali, da so vzroki za prehajanje bakterij skozi črevesno sluznico prehitra rast bakterij v tankem črevesu, povečana prepustnost črevesne sluznice in nepravilnosti v imunski zaščiti gostitelja. Pri ljudeh prihaja do povečanega prehajanja bakterij med nekaterimi boleznimi, kot so ciroza jeter, pankreatitis, črevesna vnetja ali črevesno zaprtje (Guarner in Malagelada, 2003).

Nekateri molekularno-genetski mehanizmi za nastanek raka debelega črevesa so znani. Vse več je tudi dokazov, da lahko na razvoj sporadičnega raka debelega črevesa vplivajo dejavniki okolja, npr. prehrana (maščobe in rdeče meso). Vplive prehrane na kancerogene procese bi zelo verjetno lahko spremenili s spremembami metabolne aktivnosti in sestavo črevesne mikrobiote. Nekateri črevesni MO povečujejo škodo, ki jo DNA v celicah

debelega črevesa povzročajo heterociklični amini, druge črevesne bakterije (laktobacili in bifidobakterije) pa lahko take sestavine razgradijo (Guarner in Malagelada, 2003).

2.4 OZNAČEVANJE PROBIOTIČNIH IZDELKOV

Na slovenskem tržišču proizvajalci pri večini probiotičnih prehranskih dopolnil ne navajajo funkcionalnih učinkov in zdravilnih lastnosti, zato se lahko prodajajo v prosti prodaji. Za patentiranje posameznih aplikacij zdravljenja je potrebno opraviti obsežne študije, vložiti veliko denarja, medtem ko moramo za nov prehrambeni izdelek oz. prehransko dopolnilo, ki jih obravnavajo podobno kot živila, le zadostiti osnovnim zahtevam za hrano glede kvalitete, zdravstvene neoporečnosti in trajnosti (Bogovič Matijašić, 2001).

Probiotike lahko zaužijemo v obliki fermentiranega ali nefermentiranega živila, kot prehranska dopolnila ali zdravila. Pri tem morajo biti izpolnjene določene zahteve z vidika zdravja potrošnikov:

- izdelki morajo biti varni, v primeru, da gre za živilo, vsaj toliko kot konvencionalno živilo;
- v primeru, da so navedeni učinki na zdravje, morajo biti ti dokazani v kliničnih raziskavah na ljudeh;
- izdelki morajo biti jasno in ustrezno označeni, se pravi, da mora deklaracija vsebovati ustrezne informacije, kot so: zaznamek, ali so prisotne žive bakterije, natančen opis bakterij, velikost populacije posamezne bakterije, minimalno količino bakterij, ki še ima zdravju koristne učinke, natančno vsebnost bakterij za obdobje, ko je izdelek na tržišču, torej do konca roka obstojnosti (Hamilton-Miller in sod., 1999).

2.4.1 Organizacije v Evropi in po svetu, ki se ukvarjajo s kriteriji označevanja funkcionalne hrane

Na deklaracijah funkcionalnih živil najdemo tako prehranske kot zdravstvene trditve. Slednje je potrebno znanstveno utemeljiti in so prepovedane, če se nanašajo na preprečevanje, zdravljenje ali ozdravljenje bolezni. Decembra 2006 je EU (Evropska unija) objavila Uredbo 1924/2006 o prehranskih in zdravstvenih trditvah na deklaracijah funkcionalnih živil. Splošen cilj te uredbe je bil uskladiti nacionalna pravila o prehranskih in zdravstvenih trditvah, pri tem pa zagotoviti prost pretok živil in visoko raven varstva potrošnikov. PASSCLAIM EU-projekt je znanstveno utemeljil zdravstvene trditve na živilih. Evropska agencija za varnost hrane (EFSA – angl. European Food Safety Authority) svetuje Evropski komisiji glede zdravstvenih trditev predloženih v skladu z Uredbo 1924/2006. Objavila je že veliko pozitivnih in negativnih mnenj o zdravstvenih trditvah na funkcionalnih živilih. Nekatera med njimi so znanstveno dokazana. V EU je splošna politika o varnosti hrane določena v Beli listini o varnosti hrane (Uredba ..., 2006; Verhagen in sod., 2010).

V Evropi je organizacija ILSI (angl. International Life Science Institute) izdala dokument FUFOSE (angl. Functional Food Science in Europe), v katerem je funkcionalna hrana opisana kot hrana, ki vsebuje dodatke s pozitivnimi učinki na različne funkcije v telesu. Ta

organizacija poudarja tudi, da tablet in kapsul ne prištevamo k funkcionalni hrani (Verhagen in sod., 2010).

V ZDA je agencija FDA (angl. Food and Drug Administration) izdala določene izsledke iz znanstvene literature za zdravstvene trditve, ki jih pripisujejo prehranskim dodatkom (Feord, 2002). FDA je bila ustanovljena na pobudo ljudi, ki so bili zaskrbljeni glede varnosti hrane in dopolnil prehrani. Prizadeva si, da je zdravilo varno za namenjeno uporabo. Kasneje so morale odgovorne osebe za zdravila dokazati, da je zdravilo učinkovito, z ustreznimi in dobro kontroliranimi študijami (Murphy in Roberts, 2006).

Na Japonskem imajo že od leta 1991 sistem FOSHU (angl. Foods for Specified Health Use), ki zajema uradno priznane kriterije za funkcionalno hrano, kot so informacije o cilju delovanja, prehranski vrednosti, priporočljivi dnevni dozi, opozorilo pred prekomernim uživanjem (Sanders in Huis in't Veld, 1999). Japonska je ustvarila pojem funkcionalnih živil in je edina država, ki je zakonsko opredelila funkcionalna živila. Pozitiven napredek programa sistema FOSHU je bil ustvariti koncept funkcionalne hrane, ki bi ga sčasoma uporabili tudi v drugih industrializiranih državah (Warfel in sod., 2007).

V Veliki Britaniji je organizacija JHCI (angl. Joint Health Claims Initiative) izdala dokument, ki zadeva tudi probiotične izdelke. Ta dokument poudarja, da morajo biti zdravstvene trditve, deklarirane na izdelku, potrjene z znanstvenimi raziskavami na živalih in ljudeh v kliničnih in epidemioloških študijah (Feord, 2002).

V Avstraliji in Novi Zelandiji je prepovedano deklariranje zdravstvenih trditev na prehranskih dopolnilih. Vladni organizaciji ANZFA (angl. Australia New Zealand Food Authority) in AFC (angl. Australian Food Council) sta pomagali oblikovati študijo o zdravstvenih trditvah. Ta študija navaja, da noben izdelek ne sme vsebovati zdravstvenih trditev, dokler ne izpolni določenih zahtev. Dovoljenje o deklariraju zdravstvenih učinkov izdelka lahko izda samo organizacija ANZFA (Sanders in Huis in't Veld, 1999).

2.5 IZBIRA, VARNOST IN LASTNOSTI PROBIOTIČNIH SEVOV

Največ študij s probiotiki je bilo narejenih na rodovih *Lactobacillus* in *Bifidobacterium*. Probiotiki so se najprej pojavili v fermentirani hrani, veliko kasneje pa še v drugih probiotičnih izdelkih (Tuohy in sod., 2003). Probiotike je mogoče tržiti kot prehranska dopolnila ali zdravila. Praviloma je pri slednjih potrebno veliko časa, zapletenih in dragih raziskav, da potrdimo učinkovitost probiotičnih MO. Tak izdelek mora imeti jasno opredeljene terapevtske učinke (Piano in sod., 2006).

Ker so pogosto deklaracije nepravilne oz. pomanjkljive, se vprašamo, če je uživanje probiotičnih dodatkov sploh smiselno in če ne predstavljajo karšnegakoli tveganja za zdravje uporabnikov, ki so prepuščeni lastni presoji, kaj je dobro za njih in ali bodo kupili določen probiotični izdelek. Ponavadi ljudje bolj zaupajo izdelkom, ki se jih da kupiti v lekarni kot pa tistim, ki se jih dobi v specializiranih trgovinah.

Kriteriji za izbiro probiotičnih sevov vključujejo varnostni, funkcionalni in tehnološki vidik. Ne glede na to, kako se uporablajo (kot prehranska dopolnila ali zdravila), morajo izpolnjevati selekcijske kriterije (Klaenhammer in Kullen, 1999; Saarela in sod., 2000).

Sev, ki ga uporabljam kot probiotik za ljudi, mora ustrezati naslednjim zahtevam:

- biti mora natančno taksonomsko identificiran,
- želeno je, da je vrstno-specifičen, torej humani izolat,
- mora biti nepatogen in netoksičen (Rogelj in Bogovič Matijašić, 2004),
- ne sme povzročati sistemskih infekcij in prebavnih težav,
- ne sme izločati encimov s škodljivim delovanjem,
- ne sme vsebovati prenosljivih genov za odpornost proti antibiotikom (Ruseler-van Embden in sod., 1995; Salminen in sod., 1998; Adams, 1999).

Najbolj priljubljeni so sevi, ki pripadajo vrstam MKB s statusom GRAS (Rogelj in Bogovič Matijašić, 2004).

Probiotični sev mora zadostiti vsaj nekaterim kriterijem funkcionalnosti, kot so:

- odpornost proti kislini, želodčnemu soku in žolču,
- sposobnost vezave na črevesne epitelne celice in ohranjanje aktivnosti v humanem prebavnem traktu,
- spodbujanje imunskega odziva,
- učinkovitost proti patogenim bakterijam (*H. pylori*, *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes*...),
- antimutageno in antikarcinogeno delovanje (Saarela in sod., 2000).

V primeru, da probiotične seve vključimo v živila, morajo zadostiti tudi tehnološkim parametrom industrijske proizvodnje, kot so:

- da ne vplivajo negativno na senzorične lastnosti,
- odpornost proti fagom,
- sposobnost preživetja med postopki predelave,
- stabilnost v izdelku do konca roka obstojnosti (Mattila-Sandholm in sod., 2002).

Probiotične bakterije, ki jih vključujejo v probiotične izdelke, morajo biti sposobne tekmovati za hranila in za mesta pripenjanja v prebavilih, morajo pa biti sposobne rasti tudi v anaerobnih razmerah.

Število probiotičnih bakterij v izdelku mora biti dovolj visoko, da lahko po zaužitju izdelka premagajo ovire na poti do črevesja (kislino v želodcu, žolčne soli, bazičnost dvanajstnika) in se tam zadržati tako dolgo, da lahko izkažejo pričakovano pozitivno delovanje (Fasoli in sod., 2003).

Raziskave sposobnosti preživetja probiotičnih bakterij se odvijajo *in vitro* ter *in vivo*. Lick in sod. (2001) so npr. ugotovili, da so bifidobakterije praviloma bolj občutljive na želodčni sok kot laktobacili. Kar zadeva občutljivost na žolčne soli pa obstajajo razlike med sevi posameznih vrst.

Zhou in sod. (2005) so v svoji raziskavi dokazali, da so bakterije vrste *Lb. rhamnosus*, *Lb. acidophilus* in *Bif. lactis* varne za uporabo, saj nobena izmed njih nima plazmida za prenos rezistence proti antibiotikom.

Informacije o učinkovitosti in varnosti številnih probiotikov so še nepopolne. Za posamezne probiotične seve so uspeli dokazati učinkovitost pri driski, povezani z jemanjem antibiotikov. Kar veliko raziskav je potrdilo pozitivne učinke probiotikov na imunski odziv, ko gre za reakcije pri cepljenju ali kroničnih črevesnih vnetnih boleznih, kot je npr. ulcerativni kolitis. Vendar bo potrebnih še več raziskav, da se potrdi učinke za vsak sev posebej. Objavljeni so tudi podatki o preprečevanju vnetja nosne sluznice in astme, a še niso dovolj dokazani (Ezendam in van Loveren, 2008).

2.6 POMEN PODKREPITVE ZDRAVSTVENEGA UČINKA PROBIOTIKOV

Uspešna in odgovorna uporaba probiotikov zahteva ustrezno označevanje koristi za zdravje. To mora zadovoljiti potrebe potrošnikov, usklajeno mora biti z zakonskimi predpisi in ne sme navajati učinkov, ki niso znanstveno podprtji. Zakonski predpisi se med državami razlikujejo. Za področje EU so bile objavljene smernice o pravilnem označevanju funkcionalnih živil, ki vključujejo tudi probiotična (MKGP, 2010).

Na splošno je znano, da samo *in vitro* študije ne morejo dovolj uspešno napovedati učinkovitosti in varnosti probiotika za uporabnika, saj so razmere v prebavilih kompleksnejše. So pa te študije pomembne in potrebne kot osnova za nadaljnje študije. Pred študijami *in vivo* je potrebno opraviti nekatere študije *in vitro*, kot so:

- uvesti metode za kvantificiranje preiskovanih bakterij v bioloških vzorcih,
- identificirati in opisati testne seve,
- ugotoviti razlike med testnimi sevi in drugimi sevi istih vrst,
- testirati preživetje v simuliranih razmerah gastrointestinalnega trakta,
- izvesti študije funkcionalnosti na različnih celičnih modelih (Sanders in sod., 2004).

Znanstveniki so razvili številne živalske modele in sisteme za proučevanje fizioloških učinkov različnih bioaktivnih komponent in diet. Zaradi anatomskeh, presnovnih in fizioloških razlik med živalmi in ljudmi pa rezultati teh študij ne morejo biti zadosten dokaz o učinkovitosti pri ljudeh, še posebej če uporabljeni odmerki pri živalih ne morejo odražati realnih odmerkov za ljudi. Vsekakor pa so te študije pomembne, saj omogočajo uspešnejše načrtovanje kliničnih preskusov na ljudeh. Vzamemo lahko tudi vzorec tkiva, kjer se nahajajo gostitelji, kar je pri ljudeh težje izvesti, saj je zdrave prostovoljce težko dobiti. Izvedene študije so lahko tudi osnova za uporabo probiotikov pri živalih (Sanders in sod., 2004).

Za dokaz učinkovitosti je potrebno, da so študije na ljudeh dobro načrtovane, opravljene na dovolj veliki populaciji (vzorec mora biti reprezentativen), morajo biti dvojno slepe, kontrolirane ter ponovljive. Vendar tudi pri teh študijah obstajajo določene omejitve. Upoštevati je potrebno, da se aktivne sestavine lahko spreminjajo, odvisno od časa in pogojev shranjevanja. Včasih je težko zagotoviti ustrezni placebo, ki je po senzoričnih lastnostih zelo podoben probiotičnemu izdelku. Tudi objektivnega mnenja potrošnikov ni

enostavno pridobiti. Ostaja pa nekaj pomembnih nedorečenih vprašanj v zvezi s probiotiki, in sicer: opredelitev testnih produktov – identifikacija in kvantifikacija aktivne biološke funkcije za uporabljen produkt, ustrejni biomarkerji, ki bi nudili jasne indikatorje tveganja, meritve prijazne človeku, ni pa tudi še dovolj informacij o prednostih dolgoročnega uživanja probiotikov (Sanders in sod., 2004).

2.7 POZITIVNI UČINKI PROBIOTIKOV IN MOŽNA TVEGANJA ZA ZDRAVJE

Posamezni probiotični sevi imajo pozitivne učinke, nekateri pa predstavljajo možna tveganja za zdravje uporabnikov.

2.7.1 Pozitivni učinki probiotikov

Najprej moramo razlikovati uporabo probiotikov kot sestavin funkcionalne hrane oz. prehranskih dopolnil, od uporabe v terapevtske namene. Na temo probiotikov je bilo narejenih že veliko raziskav. Na podlagi kliničnih študij lahko rečemo, da so funkcionalni učinki vsaj nekaterih probiotičnih bakterij že znanstveno dokazani.

V prihodnosti se kaže težnja po uporabi probiotikov tudi v klinične namene (za zdravljenje), vendar bo moralo biti pred klinično prakso opravljenih še več raziskav, kakor tudi izdelani standardni protokoli terapije. Trenutna uporaba probiotikov v zdravstvene namene je omejena predvsem na ponovno vzpostavljanje ravnotežja črevesne mikrobiote ob driski in terapiji z antibiotiki ter normalizacijo črevesne mikrobiote in s tem na preprečevanje različnih vrst drisk (Silvi in sod., 2003; Saarela in sod., 2002).

Kadar ima hrana poleg zagotavljanja energije in esencialnih hranil še dodatne pozitivne učinke na zdravje potrošnika, lahko govorimo o funkcionalni hrani. Najbolj tipični predstavniki funkcionalnih izdelkov v današnjem času so gotovo izdelki s probiotiki in prebiotiki, ki učinkujejo na sestavo in aktivnost mikrobiote prebavnega trakta.

Že Ilja Metchnikoff je pripisoval koristen vpliv bakterij rodu *Lactobacillus* na zdravje in staranje ljudi. Zapisal je, da so predstavniki tega rodu sposobni nevtralizirati amine, amoniak in druge strupene snovi ter vzpostaviti pravilno ravnotežje v mikrobioti. S tem naj bi preprečili degenerativne bolezni in izboljšali kakovost življenja potrošnikov. Metchnikoff je tudi domneval, da bakterije tega rodu zavirajo širjenje nezaželenih MO. Študiral je na skupini Bolgarov, ki so živelji veliko dlje kot evropsko prebivalstvo. Po njegovem mnenju zaradi tega, ker so pojedli velike količine jogurta. Bakterije rodu *Lactobacillus*, ki jih je osamil iz jogurta, je zaradi tega poimenoval *Lactobacillus* »bulgarski« (*bulgaricus*). Vendar pa ni znano ali MO, ki so opredeljeni pod tem imenom, ustrezajo prvotnemu sevu, ki ga je imenoval Metchnikoff, saj je bil izgubljen (Brunser in Gotteland, 2010).

Najbolj raziskan probiotični MO pri črevesnih infekcijah je sev *Lb. rhamnosus* GG. Prvotno so ga izolirali zaradi dobre odpornosti proti kislinam in žolču, sposobnosti vezave na humano črevesno sluz, začasne naselitve prebavil in produkcije protimikrobnih snovi (Goldin in sod., 1992). Klinične študije so pokazale, da sev *Lb. rhamnosus* GG skrajša čas trajanja in zmanjša intenzivnost drisk pri otrocih, ki jih povzročajo rotavirusi (Raza in sod.,

1995; Sheen in sod., 1995; Pant in sod., 1996; Majamaa in sod., 1995). Omenjeni sev vzpodbuja tudi imunski odgovor proti virusom (Bogovič Matijašić, 2001).

Na temo uporabe probiotikov za driske kot posledice uživanja antibiotikov je bilo narejenih veliko raziskav. Eno izmed kliničnih študij so izvedli na Finskem na 119 otrocih z respiratornimi infekcijami, ki jih je bilo potrebno zdraviti z antibiotiki. Z uživanjem seva *Lb. rhamnosus* GG so dokazali, da je mogoče preprečiti pojav driske (Arvola in sod., 1999).

Nomoto (2005) je v svojih študijah dokazal, da se je v skupini otrok z rotavirusno drisko, ki je uživala probiotične bakterije *Lb. rhamnosus* GG, skrajšal čas driske v primerjavi s skupino otrok, ki je dobivala placebo. Da se pojavnost driske, ki jo povzročijo antibiotiki, da bistveno zmanjšati z jemanjem probiotikov, so dokazali za določene seve *Sac. boulardii*, *Lb. rhamnosus* GG, nekatere seve *Bif. longum* in *Ent. faecium* SF 68. Pri potovalnih driskah je bil učinek seva *Lb. rhamnosus* GG raziskan na 820 potnikih, ki so potovali v dve različni regiji v Turčiji. Pojav driske se je bistveno zmanjšal le za potnike v eni regiji. Druga študija je bila opravljena na 282 vojakih. V njej so raziskovali pozitiven vpliv sevov *Lb. acidophilus* LA in *Lb. fermentum* KLD, vendar ni bil ugotovljen.

V raziskavi, v katero je bilo vključenih 278 otrok v več evropskih centrih, so potrdili pozitivne učinke seva *Lb. rhamnosus* GG na skrajšanje časa in zmanjšanje intenzivnosti driske pri otrocih (Guandalini in sod., 2000).

Barrons in Tassone (2008) sta zapisala, da imajo laktobacili kot probiotiki koristne učinke pri zdravljenju bakterijskega vnetja vagine in pri infekcijah sečnega predela.

Pri bolnikih, ki so oboleli za enterokolitisom, sta se vnetje in vnetni odziv zmanjšala v primeru kolonizacije črevesja z laktobacili in bifidobakterijami (Nomoto, 2005; Mshvildadze in Neu, 2009; Geier in sod., 2007).

Bolni ljudje, predvsem tisti, ki so imeli drisko, vnetne črevesne bolezni ali nekatere nalezljive bolezni, so imeli koristi od uporabe probiotikov (Quigley, 2010).

Poskusi na živalih (miškah) so pokazali, da MO v prebavilih lahko stimulirajo imunski odgovor. Stimulacija imunskega odgovora lahko poteka na več načinov: z vezavo na enterocite črevesne mukoze in sprožitvijo kaskade signalnih molekul, z razgrajevanjem večjih proteinov v manjše imunogene molekule in s privabljanjem fagocitov in ostalih komponent imunskega sistema (McFarland, 2000; Naidu in sod., 1999). Probiotiki lahko izboljšajo imunski odziv, kar ima za posledico manj alergijskih reakcij (Saarela in sod., 2002).

Razgradnjo in s tem zmanjšanje oksalatnih kamnov so dokazali z uporabo različnih vrst bakterij rodu *Bifidobacterium* in *Lactobacillus*, vendar je bila pri slednjih dokazana razgradnja oksalata le v 61 % (samo 11 od 18 vrst laktobacilov je bilo sposobnih razgradnje), medtem ko je bila pri bifidobakterijah v 100 % (Murphy in sod., 2009).

Probiotiki v primeru nekaterih patoloških situacij ugodno spremenijo potek bolezni (Mattila-Sandholm in sod., 1999a,b; Bezkorovainy, 2001). Študije kažejo, da probiotiki lahko preprečijo ali zdravijo določena stanja, vključno z atopičnimi boleznimi pri dojenčkih, okužbami pri operacijah in akutnih diarejah (Carey in Kostrzynska, 2010).

Probiotiki imajo tudi različne metabolične učinke, kot so: izboljšana absorbcija vitaminov in mineralov, manjše število toksičnih in mutagenih reakcij (kar ima za posledico manjše tveganje za nastanek raka debelega črevesa), razgradnja in izločanje žolčnih soli (kar ima za posledico zmanjšanje koncentracije holesterola v serumu), hidroliza laktoze (Saarela in sod., 2002).

Starostniki imajo zmanjšano število bifidobakterij, zato bi jim izbrani probiotiki za starejše ljudi lahko pomagali pri obnavljanju črevesne mikrobne združbe in pri preprečevanju težav, povezanih s porušenjem ravnotežja črevesne mikrobiote (Saarela in sod., 2002). Na našem tržišču že imamo probiotična prehranska dopolnila, ki so namenjena prav točno določenim skupinam ljudi. Med analiziranimi so to naslednji izdelki: WAYA®, Bion®, BioGaia®.

Dokazani klinični učinki nekaterih proučevanih probiotičnih sevov (preglednica 3) vse bolj potrjujejo trditev, da lahko zaužiti probiotiki preživijo prehod do črevesja, ga vsaj začasno kolonizirajo, učinkujejo na črevesno bakterijsko ekologijo in metabolizem ter modulirajo gostiteljev imunski sistem (Rogelj, 2001).

Preglednica 3: Klinični učinki nekaterih probiotičnih sevov (Rogelj, 2001: 226; Salminen in Gueimonde, 2004)

Proučevani sev	Klinični učinki
<i>Lb. rhamnosus</i> GG ATCC 53103	<ul style="list-style-type: none">– vezava na črevesne celice– znižanje fekalne encimske aktivnosti– preprečevanje drisk (antibiotiki, akutne)– zdravljenje in preprečevanje rotavirusnih drisk– modulacija imunskega odgovora– zdravljenje driske, ki jo povzroča <i>Cl. difficile</i>
<i>Lb. johnsonii</i> LJ-1 (LA-1)	<ul style="list-style-type: none">– vezava na črevesne celice– preprečevanje potovalnih drisk– modulacija črevesne mikrobiote– blaženje simptomov laktozne intolerance– izboljšanje imunske odpornosti– »pomoč« pri zdravljenju okužb s <i>H. pylori</i>
<i>Lb. acidophilus</i> NCFB 1748	<ul style="list-style-type: none">– zmanjšanje aktivnost fekalnih bakterijskih encimov– zmanjševanje fekalne mutagenosti– preventivno delovanje pri driskah kot posledici z radioaktivnim žarčenjem– izboljšanje konsistence blata
<i>Lb. acidophilus</i> NCFM	<ul style="list-style-type: none">– zmanjšanje fekalne encimske aktivnosti– visoka laktazna aktivnost– omilitev laktozne intolerance– proizvajanje bakteriocinov
<i>Lb. acidophilus</i> LA-5	<ul style="list-style-type: none">– uravnoteženje črevesne mikrobiote– varovanje pred potovalno drisko– povečanje imunske odpornosti
<i>Lb. gasseri</i> (ADH)	<ul style="list-style-type: none">– zmanjšanje fekalne encimske aktivnosti– preživetje v črevesju
<i>Lb. reuteri</i> ATCC 55730	<ul style="list-style-type: none">– naselitev črevesja– skrajšanje rotavirusne driske– zdravljenje akutnih drisk
<i>Lb. casei</i> Shirota	<ul style="list-style-type: none">– preventivno delovanje pred črevesnimi motnjami– modulacija črevesne mikrobiote– zniževanje fekalne encimske aktivnosti– zaviranje karcinoma na mehurju
<i>Str. thermophilus</i> ; <i>Lb. bulgaricus</i>	<ul style="list-style-type: none">– izboljšanje laktozne intolerance je odvisno od specifične vrste bakterij– neučinkovitost na rotavirusno drisko in na izboljšanje imunske odpornosti med rotavirusno drisko– neučinkovitost na fekalne encime
<i>Bif. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12	<ul style="list-style-type: none">– preprečevanje potovalnih drisk– zdravljenje virusnih in rotavirusnih drisk– modulacija črevesne mikrobiote– izboljšanje imunske odpornosti
<i>Sac. boulardii</i>	<ul style="list-style-type: none">– preprečevanje drisk pri zdravljenju z antibiotiki– zdravljenje kolitisa, ki ga povzroči <i>Cl. difficile</i>

Naraščajoča odpornost bakterij proti antibiotikom, ki danes predstavlja velik problem, je povzročila novo zanimanje za bakterioterapijo. Bakterioterapija pomeni uporabo koristnih bakterij za preprečevanje kolonizacije gostitelja s patogenimi bakterijami. Princip te terapije temelji na tekmovanju (kompeticiji), pri čemer probiotične bakterije zasedejo prostor, kjer bi se sicer naselile potencialno patogene bakterije (Martin in sod., 2004).

V svoji raziskavi so Koebnick in sod. (2003) potrdili pozitiven vpliv bakterije *Lb. casei* Shirota pri kroničnem zaprtju. Raziskava je bila narejena na 70 ljudeh, starih med 18 in 70 let, ki je trajala štiri tedne. Med tem časom je polovica vključenih dobivala probiotični izdelek s $6,5 \times 10^8$ kolonijskih enot (KE)/ml *Lb. casei* Shirota, druga polovica pa placebo. Po koncu zdravljenja se je kronična zaprtost izboljšala pri 94 % vključenih v to raziskavo, ki so dobivali izdelek z *Lb. casei* Shirota, v primerjavi s 57 % vključenih v kontrolno skupino. Avtorji so zaključili, da redno uživanje probiotične bakterije *Lb. casei* Shirota izboljša gastrointestinalne parametre (prebavo in konsistenco blata pri ljudeh, ki so kronično zaprti).

Shimada in sod. (2009) so naredili raziskavo o učinkih seva *Ent. faecalis* FK-23 na imunske funkcije pri miših. Miši so bile zdravljene 30 dni s tremi različnimi odmerki (0,05, 0,1, 0,2, 0,6 g/kg telesne mase) tega seva. Rezultati te študije so pokazali, da sev *Ent. faecalis* FK-23 izboljša specifične in nespecifične imunske funkcije.

Uporaba probiotikov pri zdravljenju kroničnih bolezni nima stranskih učinkov, kar je značilno za uporabo večine zdravil. Ljudem, ki probiotike uživajo v takih primerih, se ni potrebno batiti, da bi prišlo do negativnih medsebojnih učinkov med probiotiki in ostalimi zdravili. Klinične študije so glede terapevtske uporabe probiotikov pokazale, da najbolj pozitivno vplivajo na preobčutljivo črevo, vnetno črevo, vnetje sklepov in alergije na hrano (Baelde in sod., 2005).

Pri ljudeh so v porastu kronične črevesne vnetne bolezni. Ni več dvomov o tem, da so za razvoj bolezni pomembne bakterije, ki so del črevesne biote, ni pa še zadostnih dokazov o posameznih povzročiteljih. To teorijo podpirajo tudi podatki testiranj na živalih. Pri bolnikih s Crohnovo boleznijo ali ulceroznim kolitisom so črevesni limfociti T hiperreaktivni, poleg tega pa se pospešeno izločajo protitelesa tipa IgG, ki delujejo vnetno. Prav tako lahko različne vrste bakterij različno učinkujejo na imunsko-vnetne mehanizme. Nekatere vrste bakterij, ki so sicer del običajne mikrobiote, vdrejo v sluznico in povzročijo vnetja. Antibiotiki so le omejeno učinkoviti pri vnetjih črevesja, ker bakterije postajajo odporne proti antibiotikom. Trenutno intenzivno preiskujejo, ali je v tem primeru ustrezna uporaba probiotikov namesto antibiotikov (Guarner in Malagelada, 2003).

Cilji današnjih študij so izboljšati razumevanje bakterijskih procesov in nastalih metabolitov ter posledično izboljšati učinkovitost probiotikov (Blaut in Clavel, 2007).

Danes se probiotiki uporabljajo pretežno z namenom ohranjanja zdravja in preventive pred obolenji, čedalje več pa tudi kot dopolnilo pri zdravljenju nekaterih obolenj. Številne študije so pokazale, da sevi MKB ali bifidobakterij delujejo na različne funkcije v prebavnem sistemu našega telesa, zato se bodo v prihodnje uporabljali bolj ciljano.

2.7.2 Možni negativni učinki probiotikov

Kaže, da so nekateri predstavniki MKB lahko vpleteni v infekcije pri ljudeh, čeprav ne ravno kot primarni povzročitelji infekcij (Aguirre in Collins, 1993). Največje tveganje pomenijo enterokoki, ki so lahko patogeni in po nekaterih podatkih odgovorni za 5–15 % endokarditisov (Adams, 1999), prav tako pa tudi nekateri predstavniki laktobacilov. Sevi enterokokov, ki lahko povzročajo bolezni, večinoma izhajajo iz vrst *Ent. faecalis* in v manjši meri *Ent. faecium*. Pogosto izolirajo enterokoke v primerih bolnišničnih infekcij. Enterokoki so bakterije, ki so oportunisti in se pri različnih infekcijskih obolenjih hitro širijo (Kayser, 2003).

Obstaja tudi tveganje zaradi zmožnosti prenosa genov za rezistenco proti antibiotikom. Pri kliničnih infekcijah so velikokrat ugotovili vpletost proti vankomicinu odpornih enterokokov. Znanstveniki so dokazali *in vitro* in na poskusih na miših, da je možen prenos genov za rezistenco proti vankomicinu iz enterokokov na druge G+ bakterije. Enterokokov, ki so odporni proti vankomicinu, naj ne bi uporabljali za probiotike namenjene ljudem in živalim (Salminen in sod., 1998; FAO/WHO, 2002).

Čeprav se tudi sevi *Ent. faecium* in *Ent. faecalis* uporabljam v probiotičnih prehranskih dopolnilih v humani prehrani, so vsaj predstavniki *Ent. faecalis* pogostejši v krmnih dodatkih. Februarja 2004 je npr. EU (List of ..., 2004) odobrila uporabo desetih pripravkov z devetimi različnimi sevi *Ent. faecium* kot dodatkov krmi. Za *Ent. faecium* so ugotovili, da je učinkovit pri preprečevanju driske, povezane z jemanjem antibiotikov, in pri zdravljenju driske pri otrocih. Uživanje takih probiotičnih bakterij naj bi zmanjšalo čas trajanja akutne driske pri odraslih ljudeh v bolnišnici. Uporaba enterokokov kot probiotikov ostaja še vedno sporna, saj so enterokoki najpogostejši patogeni MO v bolnišničnih infekcijah. Povzročajo lahko endokarditis, bakterimijo, okužbe sečil, trebušne okužbe. Vse več jih je odpornih proti antibiotikom in imajo virulentne dejavnike (Moreno in sod., 2006).

Kljub temu so številni raziskovalci mnenja, da nima smisla izločiti vseh enterokokov kot starterskih kultur ali probiotikov, saj so prisotni povsod. Potrebno pa je ugotavljanje in skrbno spremljanje prisotnosti virulentnih dejavnikov in rezistence proti antibiotikom. Kadar posamezen sev ni rezistenten proti antibiotikom ali če morebitna rezistenca ni prenosljiva, potem ga lahko uporabimo. Če pa obstaja možnost prenosa rezistence proti antibiotikom, sev ni primeren za uporabo (European Commission, 2003).

Tveganje vsekakor predstavlja tudi uporaba bakterijskih spor v probiotičnih prehranskih dopolnilih. Najbolj se uporabljam spore bakterijskih vrst *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. coagulans*, *B. clausii* in *B. licheniformis*, katere se tudi na največ preiskuje. Študije kažejo, da se te bakterije lahko razvijajo tudi znotraj prebavnega trakta in se štejejo kot začasni prebivalci, kar kaže na to, da omenjene bakterije niso tujci, ampak bi lahko imele simbolično razmerje s svojim gostiteljem (Cutting, 2011). Huynh in sod. (2005) so mnenja, da ne bi smeli uporabljati vseh spor *Bacillus* kot probiotikov, saj nekatere med njimi predstavljajo tveganja v smislu izločanja toksinov, zato so potrebni testi *in vivo*.

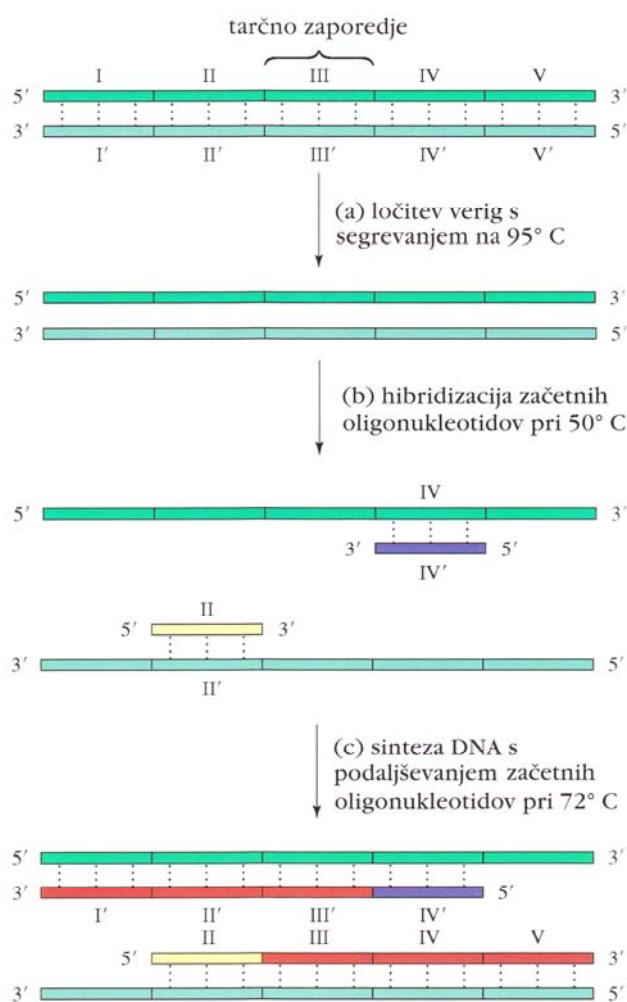
Posebno pozornost namenjajo raziskavam uporabe probiotikov pri osebah s pomanjkljivo imunsko sposobnostjo (dojenčki, otroci, starejši ljudje). Ker so ti ljudje ponavadi podvrženi dolgim zdravljenjem z antibiotiki, pride pri njih pogosteje do razvoja rezistentnih patogenih bakterij. Idealna rešitev za zaščito teh oseb pred infekcijami bi lahko bila uporaba probiotikov, vendar s posebno previdnostjo. Prvi pomislek je glede uporabe vrst, za katere vemo, da lahko povzročajo oportunistične infekcije. Drugi pomislek je povezan z enim od pomembnih mehanizmov delovanja probiotičnih bakterij, tj. stimulacijo imunskega sistema. Pri osebah s pomanjkljivo imunsko sposobnostjo bi bila imunostimulacija sicer dobrodošla, ampak samo v primeru, če bi probiotične bakterije aktivirale obrambni sistem gostitelja tako, da bi deloval proti patogenim bakterijam. Obstaja pa možnost prekomernega odziva, ki vodi v škodljive vnetne procese, ali pa v avtoimunski odziv, kar bi bilo pri osebah s pomanjkljivo imunsko sposobnostjo sploh škodljivo. Bakterijska stimulacija vnetne reakcije in avtoimunosti je bila že dokazana na miškah s pomanjkljivo imunsko sposobnostjo (Wagner in Balish, 1998; Borriello in sod., 2003). Tudi način aktiviranja imunskega sistema gostitelja se razlikuje od seva do seva, tako je potrebno s primernim testiranjem *in vitro* ter *in vivo* učinke dobro raziskati za vsak potencialni probiotik.

2.8 SODOBNA METODA UGOTAVLJANJA IN IDENTIFIKACIJE PROBIOTIČNIH BAKTERIJ: POMNOŽEVANJE DNA Z METODO PCR

Verižno pomnoževanje s polimerazo (PCR) je metoda za encimsko pomnoževanje specifičnih sekvenc DNA *in vitro*. V zelo kratkem času dobimo več kot milijon kopij originalne DNA.

V primeru, da poznamo vsaj del zaporedja DNA, je mogoče s PCR pridobiti zelo veliko število kopij želenega dela DNA. Metodo PCR je zasnoval Kary Mullis (Nobelov nagrjenec leta 1993). Princip delovanja ponazarja Slika 1. Predstavljamo si lahko, da matrično DNA sestavlja pet območij, ki so na Sliki 1 označena z I do V, komplementarna območja pa z I' do V'. Če želimo s PCR pomnožiti samo regijo III in III', moramo poznati nukleotidni zaporedji sosednjih regij II in IV. Za PCR potrebujemo:

- dva začetna oligonukleotida, dolga približno 20 nukleotidov, ki sta komplementarna sosednjima zaporedjem IV in II',
- termostabilno polimerazo,
- mešanico deoksiribonukleozidtrifosfatnih molekul (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (Boyer, 2005).



Slika 1: Verižna reakcija s polimerazo (Boyer, 2005: 350)

Legenda: (a) ločitev verig s segrevanjem na 95 °C, (b) pripenjanje začetnih oligonukleotidov, (c) podaljševanje začetnih oligonukleotidov ob sintezi DNA; segmenti na kodirajoči verigi so označeni z I, II, III, IV, V, segmenti na komplementarni verigi pa z I', II', III', IV', V'; začetni oligonukleotid II je prikazan z rumeno, začetni oligonukleotid IV' pa z modro; na novo sintetizirana DNA je označena rdeče.

PCR izvajamo v ciklih s po tremi stopnjami. Vsak cikel sestavlja:

1. Denaturacija, s katero ločimo verige matrične DNA. Mešanico vseh sestavin inkubiramo približno 30 sekund pri 95 °C.
2. Ohladitev mešanice na 37–63 °C kar omogoči, da se začetni oligonukleotidi hibridizirajo z ustreznimi komplementarnimi regijami. Začetna oligonukleotida sta na matrici orientirana tako, da sta njuna 3'-konca usmerjena drug proti drugemu. Sinteza DNA poteka po regijah III in III'.
3. Sintezo iskane DNA katalizira DNA-polimeraza *Taq* (tj. polimeraza izolirana iz MO *Thermus aquaticus*). Da pospešimo polimerizacijsko reakcijo, temperaturo dvignemo na 72 °C. Encim podaljšuje oba začetna oligonukleotida, pri čemer proizvaja dve novi verigi DNA, III-IV-V in I-II'-III'. Reakcija sinteze DNA je v vsakem ciklu običajno končana v približno 30 sekundah (Boyer, 2005).

Za pomnoževanje tarčnega dela DNA se uporablja dva začetna oligonukleotida, in sicer je prvi homogen sekvenči prve DNA, drugi pa sekvenči druge verige. Tako nastaneta s PCR dve vrsti novih DNA verig v prvem ciklu reakcije PCR. V drugem ciklu PCR se začetna oligonukleotida vežeta na originalno DNA in na nov pomnožek, ki je nastal v prvem ciklu in je krajši (Kuchta, 2006).

Analize DNA vse več uporabljajo za ugotavljanje gensko predelanih živil in patogenih MO v živilih, za identifikacijo posameznih živalskih in rastlinskih vrst v živilih, kakor tudi za detekcijo drugih sestavin biološkega izvora v živilih, kot so različni kontaminanti ali alergeni. PCR je zaradi velike občutljivosti (meja zaznave je ≥ 1 molekule), specifičnosti in hitrosti (15 min–2 h) zelo učinkovita metoda (Greiner in Konietzny, 2007).

Pomnožke lahko detektiramo z agarozno gelsko elektroforezo v prisotnosti molekularnega označevalca dolžin pomnožkov. Agarozna gelska elektroforeza ponavadi poteka horizontalno, pri čemer je agarozni gel potopljen v pufru. DNA je negativno nabita in v električnem polju potuje proti pozitivno nabiti elektrodi, anodi. Da lahko spremljamo potek elektroforeze, dodamo raztopini vzorca barvila (bromfenolmodro, ksilencianol ...), ki potujejo hitreje od molekul DNA. Po končani elektroforezi gel potopimo v raztopino barvila (etidijev bromid, SYBR Green ...), da lahko detektiramo molekule DNA na gelu (Abram in sod., 2006).

Najpopolnejšo nadaljno analizo pomnožkov PCR predstavlja sekvenciranje. V ta namen uporabimo za pomnoževanje običajno univerzalne začetne oligonukleotide, katerih zaporedja so komplementarna dobro ohranjenim zaporedjem bakterijskega gena za 16S rRNA. Takšna analiza omogoča identifikacijo prisotnih mikrobnih vrst (Ricke in Pillai, 1999; Tannock, 2001).

2.9 POMEN ODMERKA PROBIOTIKOV ZA POZITIVEN UČINEK NA ZDRAVJE UPORABNIKA

Probiotična prehranska dopolnila vsebujejo žive, dobro poznane probiotične bakterije.

V literaturi najdemo različne podatke o potrebnem vnosu probiotičnih bakterij za pozitiven učinek:

- Fasoli in sod. (2003) so mnenja, da je dnevni vnos 10^9 – 10^{10} KE živilih probiotičnih bakterij najmanjša količina, ki še zagotavlja pozitivne učinke na zdravja potrošnika,
- Gueimonde in sod. (2004) navajajo, da je 10^5 – 10^6 KE/g minimalno število probiotičnih MO za terapevtski učinek,
- po Müllerju in sod. (2000) naj bi probiotičen izdelek vseboval najmanj 10^6 – 10^8 KE/ml,
- Coeuret in sod. (2004) navajajo spodnjo mejo koncentracije 10^7 KE/g,
- Shortt (1999) pa priporoča v probiotičnih izdelkih koncentracijo najmanj 10^8 KE/ml.

Znano je, da je preživelost MO v liofiliziranih probiotičnih izdelkih slabša kot v probiotičnih mlečnih izdelkih (Coeuret in sod., 2004; Temmerman in sod., 2003; Lin in sod., 2006). Število probiotičnih bakterij v probiotičnih izdelkih mora biti dovolj visoko,

ker prehoda skozi gastrointestinalni trakt ne preživijo vse bakterije zaradi želodčne kisline, žolčnih soli in bazičnosti dvanajstnika (Saarela in sod., 2002). Pomembno pa je tudi dejstvo, da je tako sposobnost preživetja kot potreben odmerek potrebno ugotoviti za vsak sev posebej.

2.10 RAZISKAVE USTREZNOSTI PROBIOTIČNIH IZDELKOV V EVROPI IN DRUGOD PO SVETU

Zakonodaja in standardi za uporabo probiotikov za ljudi se še oblikujejo. Ti standardi bodo predpisovali, katere metode se bodo uporabljale za ugotavljanje ustreznosti probiotičnih izdelkov. Probiotični izdelek, ki pride v prodajo, mora biti pravilno deklariran, funkcionalen in varen. V preteklosti so se proizvajalci zanašali na to, da so vsi laktobacili in bifidobakterije varne bakterije s statusom GRAS, pri tem pa pozabljali, da imajo posamezni sevi omenjenih rodov lahko celo nekatere negativne učinke na zdravje (odpornost proti antibiotikom, virulentnost). Mikrobiološke analize probiotičnih izdelkov velikokrat razkrijejo tudi neskladja med številom in vrsto dejansko prisotnih MO v izdelku ter informacijo na deklaraciji (Fasoli in sod. 2003; Temmerman in sod., 2003; Bogovič Matijašić in Rogelj, 2006).

Ugotavljanje vrste in števila probiotičnih bakterij v izdelkih je zelo pomembno s stališča varnosti in učinkovitosti. V ta namen se uporablajo konvencionalne mikrobiološke metode (gojenje na hranljivih gojiščih), s katerimi lahko ugotavljamo le število določenih skupin oz. rodov probiotičnih bakterij v izdelku, ali pa molekularno-biološke metode. Predvsem metoda PCR omogoča hitro in specifično detekcijo širokega spektra bakterijskih vrst. Z uporabo izbranih vrstno-specifičnih začetnih oligonukleotidov lahko iz mešanice DNA, izolirane iz izdelkov ali iz konzorcijev zraslih kolonij, z metodo PCR ugotovimo prisotnost določene bakterijske vrste.

Za identifikacijo in klasifikacijo probiotičnih bakterij je najbolj zanesljivo ugotavljanje nukleotidnega zaporedja 16S rDNA in nato primerjava z zaporedji v genski banki (Matsuki in sod., 1999).

Fasoli in sod. (2003) so analizirali 14 probiotičnih dodatkov (7 fermentiranih mlečnih izdelkov in 7 pripravkov liofiliziranih bakterij v obliki kapsul), ki so jih dobili na italijanskem trgu. Za analizo so uporabili metodi PCR z vrstno-specifičnimi začetnimi oligonukleotidi in metodo DGGE (angl. denaturing gradient gel electrophoresis, tj. elektroforetsko ločevanje DNA na poliakrilamidnem gelu z gradientom denaturacijskega sredstva), ki temeljita na analizi DNA, pridobljene neposredno iz vzorcev hrane ali pripravkov, brez predhodne kultivacije mikrobiote. Identifikacijo so opravili z metodo PCR in primerjavo zaporedja 16S rDNA z zaporedji v genski banki. Rezultati so pokazali, da vsi probiotični jogurti ustrezajo deklaraciji glede vrst bakterij, medtem ko so pri liofiliziranih izdelkih naleteli na nepravilnosti. Izdelki so vsebovali probiotične bakterije, ki niso bile deklarirane. Fasoli in sod. so potrdili uporabnost metode DGGE z uporabo PCR z vrstno-specifičnimi začetnimi oligonukleotidi.

Temmerman in sod. (2003) so raziskali kar 55 probiotičnih izdelkov (30 izdelkov z liofiliziranimi bakterijami in 25 mlečnih izdelkov), ki se jih da dobiti v Evropi. Ugotavljalci so mikrobiološko sestavo izdelkov glede na deklaracijo in testirali odpornost izolatov iz izdelkov proti antibiotikom. Metode, ki so jih uporabljali, so bile gojitvene tehnike na selektivnih gojiščih in SDS-PAGE (angl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, tj. poliakrilamidna gelska elektroforeza proteinov v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata). Rezultati so pokazali, da je samo šest izdelkov vsebovalo vse deklarirane vrste bakterij, v ostalih 19 primerih pa so izolirali druge bakterijske seve, ki niso bili deklarirani. Ugotovili so tudi odpornost proti antibiotiku vankomicinu za kar 38 % izolatov enterokokov iz 4 izdelkov z liofiliziranimi bakterijami.

Coeuret in sod. (2004) so analizirali 10 probiotičnih izdelkov (dva krmna dodatka, eno prehransko dopolnilo, en sir, šest fermentiranih mlečnih izdelkov). Vseh 10 probiotičnih izdelkov so nacepili na trdna gojišča, iz izbranih kolonij so izolirali DNA, ki so jo analizirali z metodo PCR in PFGE (angl. pulsed field gel electrophoresis, tj. gelska elektroforeza v utripajočem polju). Rezultati štetja na ploščah so pokazali, da je bilo le v štirih izdelkih število laktobacilov ustrezno, v štirih je bilo število manjše od deklariranega, v enem izdelku je bilo število laktobacilov zelo majhno, v enem sploh niso ugotovili prisotnosti laktobacilov, v dveh izdelkih pa ne vrste *Lb. casei*. Ugotovili so tudi nepravilnosti glede poimenovanja probiotičnih bakterij. Prehransko dopolnilo je bilo najbolj neustrezeno glede števila, saj je bilo v njem število laktobacilov pod mejo detekcije.

Gueimonde in sod. (2004) so vzeli pod drobnogled 14 probiotičnih fermentiranih mlečnih napitkov, ki so jih kupili v Španiji. Izolate iz izdelkov so identificirali z ugotavljanjem sekvence gena za 16S rRNA. Razlike med sevi so ugotavljalci s pomočjo metode PFGE. Rezultati so pokazali, da je bil *Str. thermophilus* prisoten v vseh izdelkih, kjer je bil deklariran, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* je bil prisoten le v dveh izdelkih, *Lb. casei* in *Lb. acidophilus* pa sta bili najpogosteši vrsti laktobacilov, prisotni v izdelkih. Število laktobacilov je bilo v vseh izdelkih ob koncu uporabnosti višje kot 10^5 KE/ml, medtem ko je bilo število bifidobakterij v vseh primerih nižje od deklariranega. Sekvenciranje gena za 16S rRNA kakor tudi elektroforeza PFGE sta se izkazali za učinkoviti metodi za identifikacijo prisotnih MO oz. za razlikovanje med sevi. Rezultati so pokazali, da se deklaracije pogosto niso ujemale z dejanskim številom in vrsto MO v izdelkih.

Theunissen in sod. (2005) so z metodo PCR-DGGE analizirali dvajset probiotičnih izdelkov (enajst probiotičnih mlečnih izdelkov, osem izdelkov z liofiliziranimi bakterijami ter eno mlečno formulo za otroke) iz Južne Afrike. Deklarirano število KE/g so imeli le štirje od enajstih probiotičnih mlečnih izdelkov. Prisotnost deklariranih probiotičnih bakterij so potrdili za 55 % probiotičnih mlečnih izdelkov in za 33,3 % liofiliziranih izdelkov. Probiotični mlečni izdelki niso imeli popolnih deklaracij, saj je bil pogosto naveden samo rod bakterij, ne pa tudi vrsta. Poimenovanje MO je bilo večkrat nepravilno. Avtorji so mnenja, da bi morali proizvajalci izboljšati informacije za potrošnika na deklaracijah, kar naj ne bi predstavljalo prevelikega problema.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 NAČRT POSKUSA

Preden smo začeli z eksperimentalnim delom v laboratoriju, smo raziskali, koliko probiotičnih izdelkov za ljudi se lahko dobi v slovenskih lekarnah. Novembra 2009 je bilo mogoče kupiti kar 38 takih izdelkov, od katerih sta bili dve zdravili brez recepta (Linex® Forte in Linex®), ostalih 36 pa probiotičnih prehranskih dopolnil 18 proizvajalcev (preglednica 4). Med njimi je več takih, ki se jih da dobiti v različnih oblikah (v obliki kapsul, tablet, pastil, peroralnih praškov in peroralnih kapljic).

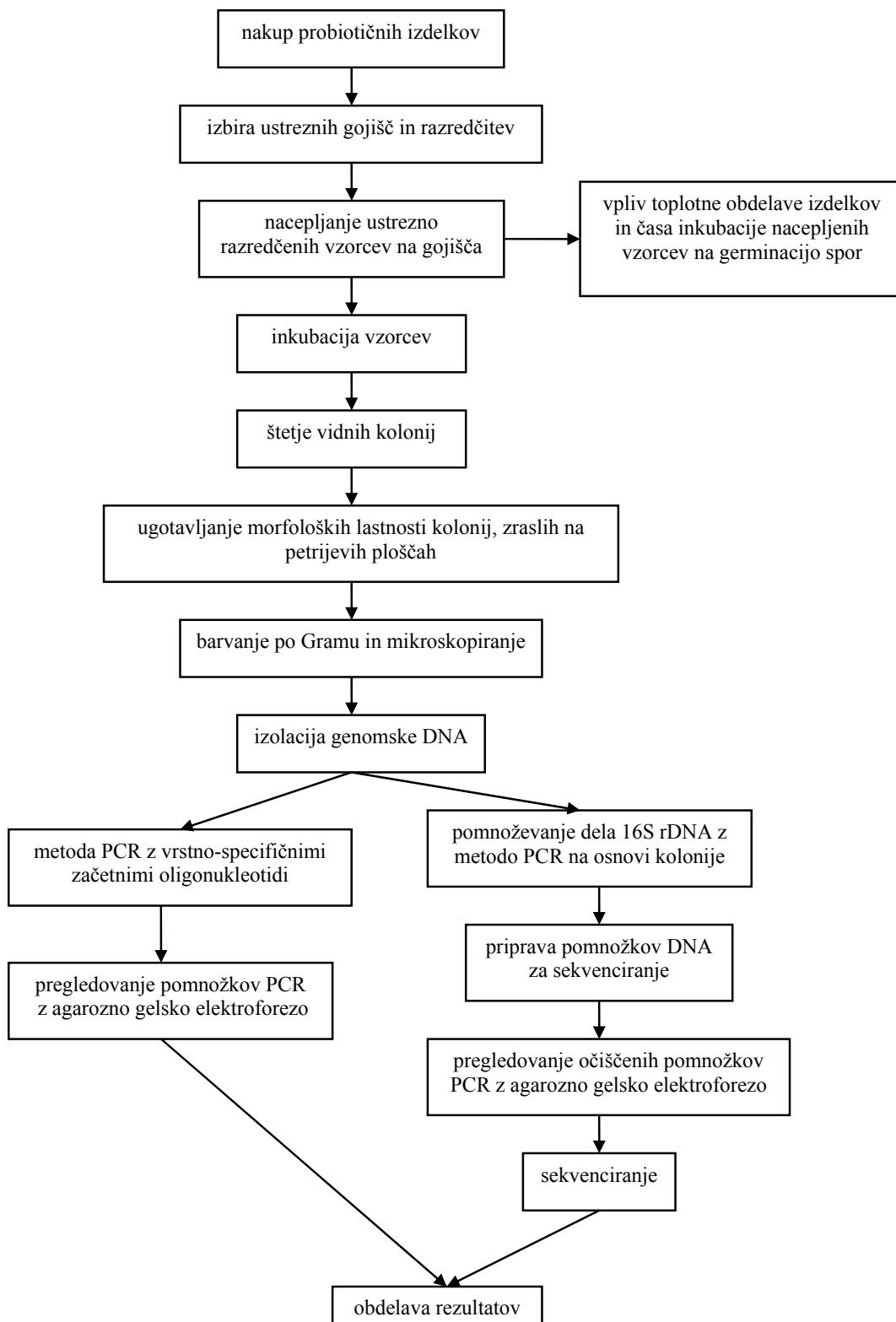
Preglednica 4: Probiotična prehranska dopolnila na slovenskem trgu (november 2009)

Izdelek	Proizvajalec
Linex® Forte (kapsule)	Lek d.d., Slovenija
Linex® (kapsule)	Lek d.d., Slovenija
BioGaia® (tablete)	BioGaia AB, Švedska
BioGaia® (kapljice)	BioGaia AB, Švedska
Probiolex® (kapsule)	Montefarmaco s.p.a., Italija
Probiolex® (prašek)	Montefarmaco s.p.a., Italija
Fermental® (suspenzija)	ESI s.p.a., Italija
Fermental® (kapsule)	ESI s.p.a., Italija
NEO® Fermental MAX (suspenzija)	ESI s.p.a., Italija
NEO® Fermental MAX (kapsule)	ESI s.p.a., Italija
WAYA® AD (prašek)	Medis d.o.o., Slovenija, v sodelovanju z Winclove, Nizozemska
WAYA® AB (prašek)	Medis d.o.o., Slovenija, v sodelovanju z Winclove, Nizozemska
WAYA® IT (prašek)	Medis d.o.o., Slovenija, v sodelovanju z Winclove, Nizozemska
Bion® 3 Juniors (tablete)	Merck Selbstmedikation GmbH, Nemčija
Bion® 3 (tablete)	Merck Selbstmedikation GmbH, Nemčija
Bion® 3 Seniors (tablete)	Merck Selbstmedikation GmbH, Nemčija
Bion® Transit (kapsule)	Merck Selbstmedikation GmbH, Nemčija
Yogermina® 100 (suspenzija)	Dietetics Pharma s.r.l., Italija
Yogermina® 100 (kapsule)	Dietetics Pharma s.r.l., Italija
Yogermina® 25 junior (suspenzija)	Dietetics Pharma s.r.l., Italija
Prolife® (pastile)	Zeta Pharmaceutici s.p.a., Italija
Prolife® (kapsule)	Zeta Pharmaceutici s.p.a., Italija
Prolife® (tekočina)	Zeta Pharmaceutici s.p.a., Italija
GranoFlor® (kapsule)	Fidimed d.o.o., Slovenija
Probio® junior (prašek)	Fidimed d.o.o., Slovenija
FloraZym® (kapsule)	Nutratec s.r.l., Italija
NutriFlor® (kapsule)	Nutratec s.r.l., Italija
Lactolady® (tablete)	Vitabalans Oy, Finska
Lactoseven® (tablete)	Vitabalans Oy, Finska
Laxobion® (prašek)	Abela Pharm, ZDA
Flobion® (kapsule)	Abela Pharm, ZDA
Acidophilus® 4×6 (kapsule)	Now Foods, ZDA
Probio aktiv® (prašek)	Medex d.d., Slovenija, v sodelovanju z Institut Rosell, Francija
ProBIO® (kapsule)	NutriLAB d.o.o., Slovenija
Probimix® (kapsule)	Akvapol Kft., Madžarska
Maxi-Flore® (tablete)	Synergia, Francija
LYOLACT® (kapsule)	Selur Pharma Ltd, Bolgarija
ErceFlora® duo (kapsule)	Sanofi Aventis, Francija

Odločili smo se analizirati 14 najbolj prodajanih probiotičnih prehranskih dopolnil. Izdelke smo kupili v lekarni in jih vse, razen BioGaia® (kapljice), ki so morale biti shranjene v hladilniku, do analize shranili na sobni temperaturi. Najprej smo pregledali deklaracije na vseh izdelkih in preverili pravilnost poimenovanja bakterij na seznamu veljavnih imen (Euzéby, 2010). Potem se je bilo potrebno odločiti za ustrezna selektivna gojišča za rast deklariranih vrst bakterij. To smo se odločili na podlagi deklariranih podatkov o številu in vrsti bakterij za posamezne izdelke.

Za analizo smo se poslužili naslednjih metod:

- konvencionalne metode štetja KE na hranljivih selektivnih gojiščih za ugotavljanje števila deklariranih bakterij;
- mikroskopiranja za ugotavljanje morfoloških lastnosti bakterij (laktobacili in bacili – palčke, bifidobakterije – odebeljene in razvejane palčke, koki – okrogli);
- izolacije DNA in PCR ter elektroforeze za potrditev prisotnosti deklariranih vrst bakterij;
- ugotavljanja zaporedja nukleotidov dela 16S rDNA za identifikacijo izolatov *Bacillus*.



Slika 2: Shema poteka dela od nakupa probiotičnih izdelkov do končne obdelave rezultatov

3.2 MATERIAL

3.2.1 Probiotični izdelki

Probiotične izdelke smo kupili v lekarni in jih do analize shranili na sobni temperaturi, razen BioGaia® (kapljice), ki so morale biti shranjene v hladilniku.

Preglednica 5: Probiotična prehranska dopolnila, ki smo jih analizirali

IZDELEK	DATUM ANALIZE	ROK TRAJANJA
Yogermina® 100 (suspenzija)	03. 11. 2009	do maja 2011
Bion® 3 Seniors (tablete)	03. 11. 2009	do marca 2011
BioGaia® (tablete)	06. 11. 2009	do septembra 2010
Probiolex® (kapsule)	06. 11. 2009	do maja 2011
Probiolex® (prašek)	06. 11. 2009	do decembra 2010
Bion® Transit (kapsule)	06. 11. 2009	do novembra 2010
Bion® 3 Juniors (tablete)	10. 11. 2009	do oktobra 2010
BioGaia® (kapljice)	10. 11. 2009	do septembra 2010
WAYA® AD (prašek)	13. 11. 2009	do 31. maja 2011
WAYA® AB (prašek)	13. 11. 2009	do 31. avgusta 2011
WAYA® IT (prašek)	13. 11. 2009	do 31. julija 2011
LYOLACT® (kapsule)	16. 11. 2009	do oktobra 2010
NEO® Fermental _{MAX} (suspenzija)	14. 12. 2009	do julija 2011
NEO® Fermental _{MAX} (kapsule)	14. 12. 2009	do julija 2011

3.2.2 Gojišča

Preglednica 6: Gojišča, katera smo uporabili v raziskavi, vrste bakterij, katerim je bilo gojišče namenjeno, ter posebnosti posameznih gojišč

Gojišče	Vrsta bakterij	Posebnosti gojišča
MRS	– <i>Lb. plantarum</i> – <i>Lb. paracasei</i> – <i>Lb. reuteri</i> – <i>Lb. casei</i> – <i>Lb. rhamnosus</i> – <i>Lb. salivarius</i> – <i>Lb. bulgaricus</i>	za <i>Lb. bulgaricus</i> gojišče MRS s pH=5,2
M17	– <i>Str. thermophilus</i> – <i>Lc. lactis</i>	/
BHI	<i>B. coagulans</i> (v topotno obdelanih in topotno neobdelanih vzorcih)	pred avtoklaviranjem smo gojišču dodali 15 g/l agar agarja (Agar Bios Special Biolife, Milano, Italija)
CATC	<i>Ent. faecium</i>	pred razlivanjem na plošče (pri 45 °C) smo vanj dodali še Na-karbonat (20 ml 10% založne raztopine/l gojišča), TTC (10 ml 1% založne raztopine/l gojišča) in Na-azid (4 ml 10% založne raztopine/l gojišča); založne raztopine smo pred uporabo sterilizirali s filtracijo (pore velikosti 0,22 µm) in jih hranili na sobni temperaturi
PCA	<i>B. coagulans</i> (v topotno obdelanih vzorcih)	raztopljenemu gojišču smo pred avtoklaviranjem primešali raztopino posnetega mleka v prahu (1 g mleka v prahu (Merck, Darmstadt, Nemčija) smo raztopili v cca. 20 ml destilirane vode, ki smo jo odvzeli od 1000 ml) ter uravnali pH gojišča na $7,0 \pm 0,2$

Gojišča MRS, M17, BHI, CATC in PCA smo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija). Vsa omenjena gojišča smo avtoklavirali 15 minut pri 115 °C.

Gojišče MRS (bujon) z dodanim klindamicinom in ciprofloksacinom (MRS+cly+cip) smo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija) s to razliko, da smo pred avtoklaviranjem umerili vrednost pH na pH=6,8 (po avtoklaviranju je bil pH=6,2 ± 0,2), ter dodali 15 g/l agar-agar (Agar Bios Special Biolife, Milano, Italija). Gojišče smo avtoklavirali 15 minut pri 115 °C. Pred razlivanjem na plošče smo ohlajenemu gojišču (45–50 °C) dodali še antibiotik klindamicin v koncentraciji 0,1 µg/ml (50 µl 0,02 % založne raztopine/l gojišča) in ciprofloksacin v koncentraciji 10 µg/ml (5 µl 0,2 % založne raztopine/l gojišča). Gojišče smo uporabili v mikrobioloških preiskavah za ugotavljanje števila laktobacilov skupine *Lb. acidophilus* (*Lb. acidophilus*, *Lb. gasseri*).

Gojišče MRS (bujon) z dodanim cisteinom in mupirocinom (MRS+cys+mup) smo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija) s to razliko, da smo pred avtoklaviranjem umerili vrednost pH na pH=6,9 (po avtoklaviranju je bil pH=6,2 ± 0,2), ter dodali cistein v končni koncentraciji 0,05 % (10 ml 5 % založne raztopine/l gojišča) ter 15 g/l agar-agar (Agar Bios Special Biolife, Milano, Italija). Gojišče smo avtoklavirali 15 minut pri 115 °C. Pred razlivanjem na plošče smo ohlajenemu gojišču (45–50 °C) dodali še antibiotik mupirocin v koncentraciji 50 µg/ml, ki zavira rast MKB, ne zavira pa bifidobakterij. Gojišče smo uporabili v mikrobioloških preiskavah za ugotavljanje števila KE bifidobakterij (*Bif. lactis*, *Bif. bifidum*, *Bif. longum*).

3.2.3 Antibiotiki

3.2.3.1 Ciprofloksacin

Antibiotik ciprofloksacin smo pripravili tako, da smo zatehtali 20 mg ciprofloksacina in dodali 10 ml sterilne vode. Ker je raztopina ostala motna, smo jo prefiltrirali (pore velikosti 0,22 µm). Založna raztopina tega antibiotika je bila 2 mg/ml, delovna oz. končna koncentracija antibiotika v gojišču pa 10 µg/ml (IDF Standard 192, 2006).

3.2.3.2 Klindamicin

Antibiotik klindamicin smo pripravili tako, da smo zatehtali 2 mg klindamicina in dodali 10 ml sterilne vode. Raztopina je ostala motna, zato smo jo prefiltrirali (pore velikosti 0,22 µm). Založna raztopina tega antibiotika je bila 0,2 mg/ml, delovna koncentracija pa 0,1 µg/ml (IDF Standard 192, 2006).

3.2.3.3 Mupirocin

Antibiotik mupirocin smo pripravili tako, da smo zatehtali 100 mg mupirocina v prahu in dodali 10 ml 96 % etanola ter premešali. Dobili smo založno raztopino s koncentracijo 10 mg/ml. Založno raztopino mupirocina smo pred uporabo sterilizirali z uporabo filtra (pore velikosti 0,22 µm) ter hranili na -20 °C. Delovna koncentracija antibiotika v gojišču pa je bila 50 µg/ml.

3.2.4 Raztopini za razredčevanje

3.2.4.1 Fiziološka raztopina

$\frac{1}{4}$ Ringerjevo raztopino smo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija). 1 Ringerjevo tableto in 1 g/l peptona (Merck, Darmstadt, Nemčija) smo raztoplili v 1 l destilirane vode, nato pa raztopino razdelili po 9 ml v epruvete in jih avtoklavirali 15 minut pri 121 °C. Raztopino smo uporabili za razredčevanje po Kochu in za izpiranje kolonij s površine trdnih gojišč za izolacijo DNA.

3.2.4.2 Pufer TAE

50-kratno založno raztopino pufra TAE (tris acetatni pufer) smo pripravili iz 242 g tris baze (Sigma, Steinheim, Nemčija), 57,1 ml ledocetne kislinske (Fluka, Buchs, Švica) in 100 ml 0,5 M EDTA (Sigma, Steinheim, Nemčija). Pripravljeno raztopino smo pred uporabo razredčili z vodo v razmerju 1:50. 1-kratni pufer TAE smo uporabili pri analizah pomnožkov PCR s pomočjo gelske elektroforeze.

3.2.5 Reagenti za pripravo mikroskopskega preparata

Preparate smo barvali po Gramu, in sicer po navodilih proizvajalca komercialnega seta (Bio-Mérieux, Marcy L'Etoile, Francija), ki je vseboval:

- kristal vijolično barvilo,
- lugovo oz. jodovo raztopino,
- mešanico etanola in acetona (1:1),
- barvilo safranin.

Pred ogledom mikroskopskega preparata smo nanesli na objektno stekelce imerzijsko olje.

3.2.6 Kemikalije in encimi za izolacijo DNA in reakcijo PCR

3.2.6.1 Kemikalije za izolacijo DNA

Za analizo smo uporabili naslednje kemikalije:

- komercialni set za izolacijo genomske DNA »Wizard® Genomic DNA Purification Kit« (Promega, Madison, WI, ZDA),
- 50 mM EDTA, pH=8,0 (Sigma Chemical, St. Louis, ZDA),
- 10 mg/ml lizocim (Sigma Chemical, St. Louis, ZDA),
- mutanolizin (2500 U/ml),
- izopropanol (Merck, Darmstadt, Nemčija),
- etanol (Merck, Darmstadt, Nemčija).

3.2.6.2 Kemikalije za reakcijo PCR

Za analizo smo uporabili naslednje kemikalije:

- 2 mM dNTP (Boehringer Manheim, Nemčija),
- 5× GoTaq® Flexi pufer za polimerazo brez MgCl₂ (Promega, Madison, WI, ZDA),
- 5× GoTaq® Flexi pufer za polimerazo z 1,5 mM MgCl₂ (Promega, Madison, WI, ZDA),
- 25 mM MgCl₂ (Promega, Madison, WI, ZDA),
- GoTaq® Flexi DNA-polimerazo (Promega, Madison, WI, ZDA),
- začetne oligonukleotide, 5µM (Invitrogen life technologies, Paisley, Velika Britanija),
- deionizirano, mikrofiltrirano vodo (mQ),
- pozitivne (DNA iz referenčnih sevov) in negativne kontrole (brez DNA),
- izolirano DNA iz vzorcev.

Preglednica 7: Začetni oligonukleotidi za posamezno vrsto bakterij

Vrsta bakterij	Začetni oligonukleotidi (viri)
<i>Bif. bifidum</i>	BiBIF-1/BiBIF-2 (Matsuki in sod., 2004)
<i>Bif. longum</i>	BILON-1/BILON-2 (Matsuki in sod., 2004)
<i>Bif. lactis</i>	Bflact-2/Bflact-5 (Matsuki in sod., 1999)
<i>Lb. acidophilus</i>	LacI/LacII (Walter in sod., 2000)
<i>Lc. lactis</i>	27f/Lla (Barakat in sod., 2000)
<i>Ent. faecium</i>	F1/F2 (Dutka-Malen in sod., 1995)
<i>Lb. casei</i>	PrI/CasII (Walter in sod., 2000)
<i>Lb. paracasei</i>	Y2/para ward (Ward in Timmins, 1999)
<i>Lb. gasseri</i>	Lgas-2/Lgas-3 (Song in sod., 2000)
<i>Lb. plantarum</i>	Lfpr/PlanII (Walter in sod., 2000)
<i>Lb. rhamnosus</i>	PrI/RhaII (Walter in sod., 2000)
<i>Lb. salivarius</i>	SAL1/LOW LAC (Chagnaud in sod., 2001)
<i>Lb. bulgaricus</i>	LB1/LLB1 (Torriani in sod., 1999)
<i>Str. thermophilus</i>	ThI/ThII (Tilsala-Timisjärvi in Alatossava, 1997)
<i>Lb. reuteri</i>	Lfpr/Reu (Walter in sod., 2000)
<i>B. coagulans</i>	P1/P4* (Klijn in sod., 1991)

Opomba k preglednici 7:

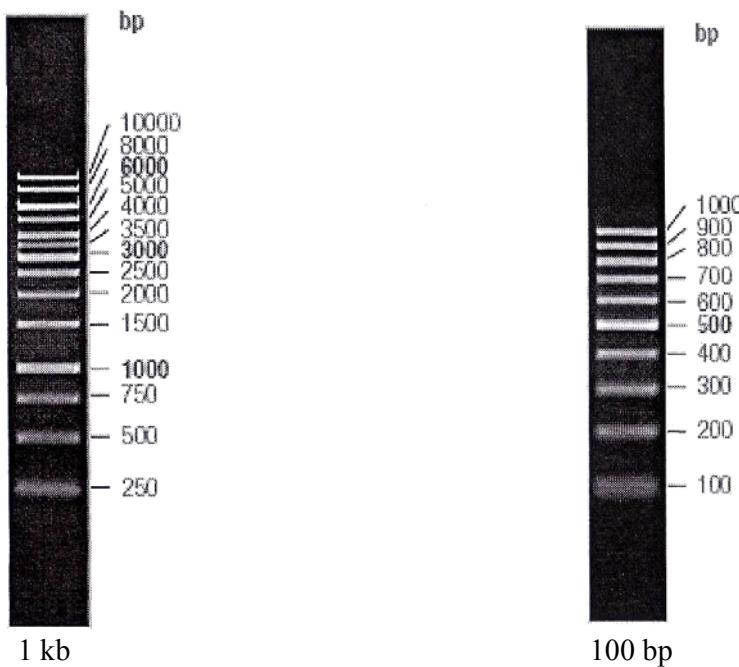
* pomnoževanje dela gena za 16S rRNA z univerzalnimi bakterijskimi začetnimi oligonukleotidi

Kemikalije za čiščenje pomnožkov PCR (PCR čistilni sistem):

- komercialni set »Wizard® SV gel and PCR Clean-Up System« (Promega, Madison, WI, ZDA) in
- pomnožki PCR iz vzorcev.

Kemikalije za ugotavljanje pomnožkov v agaroznem gelu (gelska elektroforeza):

- 0,5× pufer TAE,
- agaroza (Sigma Chemical, St. Louis, ZDA),
- raztopina SYBR Safe (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, Oregon, ZDA),
- molekulska označevalca pomnožkov DNA – 100 bp in 1 kb (100 bp, 1kb DNA Ladder, Fermentas, Litva),
- pomnožki PCR.



Slika 3: Molekulska označevalca (100 bp in 1 kb) dolžin pomnožkov DNA po gelski elektroforezi na agarovi

3.3 METODE

Za analize probiotičnih izdelkov smo uporabili naslednje metode:

- Standardne mikrobiološke tehnike:
 - gojitvene tehnike z uporabo selektivnih gojišč za bifidobakterije, laktobacile, enterokoke, laktokoke, bacile in *Str. thermophilus*,
 - ugotavljanje morfoloških lastnosti bakterij (barvanje po Gramu, mikroskopiranje s svetlobnim in fazno-kontrastnim mikroskopom).
- Molekularno-biološke metode:
 - osamitev DNA iz konzorcijev izraslih kolonij,
 - reakcija PCR z vrstno-specifičnimi začetnimi oligonukleotidi,
 - agarozna gelska elektroforeza za pregledovanje pomnožkov PCR,
 - ugotavljanje zaporedja nukleotidov dela 16S rDNA pri izbranih izolatih *Bacillus*.

3.3.1 Ugotavljanje števila MO v probiotičnih prehranskih dopolnilih

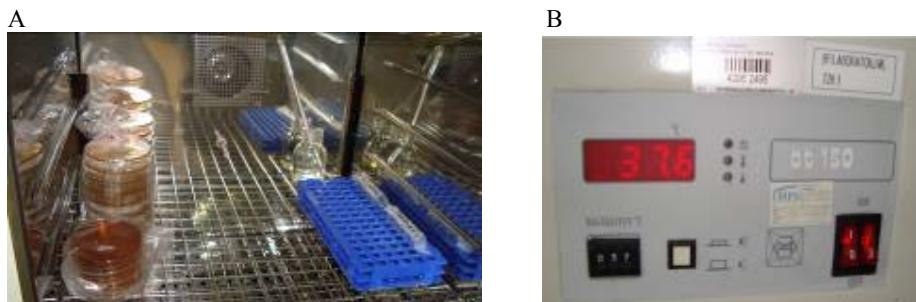
Probiotične izdelke, ki so v obliki suspenzije, smo dobro premešali, odprli sterilno ob ognju, s pomočjo tehtnice odpipetirali 1 g v sterilno stekleničko ter dopolnili do 100 g s fiziološko raztopino. Podobno smo pripravili izdelke v obliki praška, ki smo ga zatehtali po 1 g. Kapsule smo odprli ob ognju ter zatehtali približno 1 g vsebine (iz treh kapsul) v sterilne stekleničke in jih dopolnili s fiziološko raztopino do 100 g oz. do preračunane teže, ki je bila 100-krat večja od teže prahu. Tablet smo zatehtali toliko, da je bila teža blizu 1g ter dodali ustrezno količino fiziološke raztopine. Ko se je vsebina dobro raztopila (po 15–

30 minutah), smo vzorce razredčili po Kochu tako, da smo dobili po inkubaciji števne plošče (od 10 do 300 KE na plošči). Ta postopek smo izvajali aseptično (ob ognju).

Vzorce smo nacepljali na petrijeve plošče z metodo razmazovanja ali vmešavanja. Pri prvi smo na že razlite petrijeve plošče z gojišči (po 15 ml) nacepili po 0,1 ml ustrezne razredčitve vzorca ter ga s sterilno plastično palčko razmazali po celotni površini gojišča. Pri drugi metodi pa smo v prazno petrijevko odpipetirali po 1 ml ustrezno razredčenega vzorca, ga prelili z gojiščem, ohlajenim na 45 ± 1 °C, premešali ter pustili na sobni temperaturi, dokler se gojišče ni strdilo. Petrijevke smo inkubirali v ustreznih pogojih, kot je prikazano v preglednici 8.

Preglednica 8: Pogoji inkubacije in ustrezna gojišča za izbrane vrste bakterij

Gojišče	Vrsta bakterij	Pogoji inkubacije
MRS	<i>Lb. paracasei</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. plantarum</i>	30 °C/3 dni, anaerobno
MRS+cly+cip	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. gasseri</i>	
MRS+cys+mup	<i>Bif. lactis</i> , <i>Bif. longum</i> , <i>Bif. bifidum</i>	37 °C/3 dni, anaerobno
MRS	<i>Lb. salivarius</i> , <i>Lb. rhamnosus</i> , <i>Lb. reuteri</i>	
MRS (pH=5,2)	<i>Lb. bulgaricus</i>	42 °C/3 dni, anaerobno
M17	<i>Lc. lactis</i>	30 °C/3 dni, aerobno
BHI, PCA	<i>B. coagulans</i>	37 °C/2–4 dni, aerobno ali 42 °C/2 dni, aerobno
M17	<i>Str. thermophilus</i>	37 °C ali 42 °C/3 dni, aerobno
CATC	<i>Ent. faecium</i>	37 °C/3 dni, aerobno



Slika 4: Petrijeve plošče v inkubatorju (A), Zunanjost inkubatorja z notranjo temperaturo 37 °C (B)

Anaerobne razmere smo zagotovili z uporabo anaerobnih loncev in sistema GENbox (Bio-Mérieux, Marcy, L'Etoile, Francija).



Slika 5: Anaerobne razmere z uporabo GENbox-a

Po inkubaciji smo na petrijevih ploščah prešteli število kolonij s pomočjo elektronskega števca (EŠKO 7L, LABO, Ljubljana). Velja, da so števne plošče tiste, na katerih je med 10 in 300 kolonij. Število KE v ml ali g probiotičnega izdelka smo izračunali po naslednji formuli (IDF Standard 100B, 1991):

$$N = \Sigma KE / ((n_1 + 0,1 \times n_2) \times R) \quad \dots (1)$$

Legenda:

N.....število MO (KE/ml oz. KE/g)

ΣKE ...vsota kolonij, preštetih na vseh ploščah

n_1število števnih petrijevih plošč (10–300 kolonij) prve razredčitve

n_2število števnih petrijevih plošč (10–300 kolonij) druge razredčitve

R.....razredčitveni faktor prve razredčitve, ki smo jo šteli

Za izdelka ^{NEO®}Fermental_{MAX} (suspenzija) in ^{NEO®}Fermental_{MAX} (kapsule), ki sta vsebovala spore *Bacillus*, smo ugotavljali tudi morebitni vpliv toplotne obdelave izdelkov in časa inkubacije nacepljenih vzorcev na germinacijo spor. Vzorca smo toplotno obdelali v vodni kopeli (10 minut pri 80 °C) ter ju ohladili na sobno temperaturo. Ustrezne razredčitve vzorcev smo pred in po toplotni obdelavi ponovno nacepili na gojišče BHI ter plošče tokrat inkubirali 4 dni pri 37 °C. Tudi izdelek Probiolex[®] (prašek), ki je prav tako vseboval spore vrste *B. coagulans*, smo termično obdelali (10 minut pri 80 °C), da bi tako takso inaktivirali vegetativne celice in se prepričali, če so v izdelku res spore, ga ohladili in nacepili na gojišče PCA. Plošče smo inkubirali 2 dni pri 37 °C in 42 °C zato, da bi videli, če ima temperatura inkubacije vpliv na število izraslih kolonij na gojišču PCA.

3.3.2 Ugotavljanje morfoloških lastnosti kolonij in bakterijskih celic

Po inkubaciji smo na gojiščih pregledali izgled kolonij (barva, velikost, rob kolonije) in si izbrali iz vsakega gojišča po eno ali dve koloniji (eno majhno in eno veliko, če je bilo to mogoče), jih pobrvali po Gramu ter mikroskopirali pod svetlobnim in fazno-kontrastnim mikroskopom. Zanimale so nas morfološke lastnosti MO, kot so oblika, velikost,obarvanje po Gramu, združevanje celic.



Slika 6: Svetlobni mikroskop

Barvanje po Gramu smo izvedli s komercialnim setom (Bio-Mérieux, Marcy L'Etoile, Francija) po navodilih proizvajalca.

Pri odvzemu vzorca smo s cepilno zanko vzeli kolonijo iz gojišča, jo razmazali v fiziološki raztopini na objektnem steklu, posušili nad ognjem ter razmaz fiksirali. Uporabili smo aseptično tehniko dela.



Slika 7: Priprava mikroskopskega preparata

Po barvanju se G- bakterije obarvajo rdeče, G+ bakterije pa ostanejo vijolične barve.

3.3.3 Izolacija genomske DNA za izvedbo reakcije PCR

3.3.3.1 Priprava DNA za izolacijo

S površine različnih gojišč smo izprali kolonije: na površino smo odpipetirali 2 ml fiziološke raztopine, s pomočjo pipete resuspendirali kolonije in suspenzijo prenesli v 2 ml epruvete;

- pri $15000 \times g$ smo centrifugirali 2 minuti;
- supernatant smo odlili, usedlino pa obdržali;
- usedlino smo sprali z 1 ml fiziološke raztopine in ponovno centrifugirali (2 minuti pri $15000 \times g$);
- usedline smo shranili v zamrzovalniku do izolacije DNA.

3.3.3.2 Izolacija DNA

Postopek izolacije DNA z uporabo komercialnega seta »Wizard® Genomic DNA Purification Kit« (Promega, Madison, WI, ZDA) je vključeval fizikalno-kemijske postopke in obdelavo z encimi. Tako smo dobili precej čisto suspenzijo DNA. Nekatere korake smo prilagodili našim vzorcem.

Postopek izolacije genomske DNA za G+ bakterije smo povzeli po proizvajalcu (Promega, Madison, WI, ZDA). Spremenili smo le začetne korake, kakor sledi:

- Usedlino celic smo resuspendirali v $600 \mu\text{l}$ 50 mM EDTA z lizocimom, ki smo ga predtem zatehtali v pufer (10 mg/ml) in raztopili. Dodali smo tudi po $6 \mu\text{l}$ mutanolizina (2500 U/ml) ter premešali na vrtičniku.
- V vodni kopeli pri 37°C smo inkubirali 60 minut ter nadaljevali po navodilih proizvajalca.

Suspenzijo DNA, ki smo jo pripravili po zgoraj opisanem postopku, smo shranili v zamrzovalniku, dokler je nismo uporabili kot tarčno DNA v reakcijah PCR.

3.3.4 Ugotavljanje vrst bakterij z metodo PCR z vrstno-specifičnimi začetnimi oligonukleotidi

3.3.4.1 Reakcija PCR

Reakcija PCR z vrstno-specifičnimi začetnimi oligonukleotidi je poleg različnih hibridizacijskih tehnik in novejše tehnologije DNA-čipov ena izmed molekularnih metod, ki se uporablja tudi za določanje in ugotavljanje MO v živilih in različnih drugih vzorcih. Stopnje, ki so vključene v preiskavo vzorca s PCR:

- priprava DNA za izolacijo,
- izolacija DNA,
- priprava in izvedba PCR,
- ugotavljanje pomnožkov (Jeršek, 2003).

3.3.4.2 Princip reakcije PCR

Princip reakcije PCR je *in vitro* (procesi in poskusi zunaj živega organizma) pomnožitev dela tarčne DNA s termostabilno DNA-polimerazo v cikličnem termostatu. DNA-polimeraza je encim z optimalno temperaturo delovanja pri 72 °C in ohranja svojo aktivnost tudi, če je krajši čas na višjih temperaturah, ki so potrebne za denaturacijo dvoverižne DNA. Poseben termostat v »PCR cyclerju« zagotavlja zvezno spreminjanje temperature v ciklu, ki zajema tri faze:

- denaturacijo/razdvajanje dvoverižne DNA (npr.: 95 °C, 30 sekund),
- prileganje začetnih oligonukleotidov (npr.: 55–72 °C, 5–60 sekund),
- podaljševanje verige (npr.: 72 °C, 60 sekund) (Jeršek, 2003).

V vsakem ciklu se število tarčnih kopij podvoji (Jeršek, 2003).

Za pomnoževanje dela DNA je potrebna reakcijska mešanica, ki zajema:

- DNA-polimerazo,
- tarčne molekule DNA,
- deoksinukleotid trifosfate (dNTP),
- MgCl₂,
- reakcijski pufer,
- par začetnih oligonukleotidov (Jeršek, 2003).

Vsak potek PCR je potrebno optimizirati (določiti temperature in čase posameznega cikla, število ponovitev cikla in sestavo reakcijske mešanice) (Jeršek, 2003).

Izbira začetnih oligonukleotidov je odvisna od vrste reakcije PCR in vrste preiskovanih MO. V začetnih oligonukleotidih so baze v določenem zaporedju in komplementarne delu tarčne DNA, ki jo pomnožimo med izbranima začetnima oligonukleotidoma (Jeršek, 2003).

3.3.4.3 Reakcijska mešanica za PCR

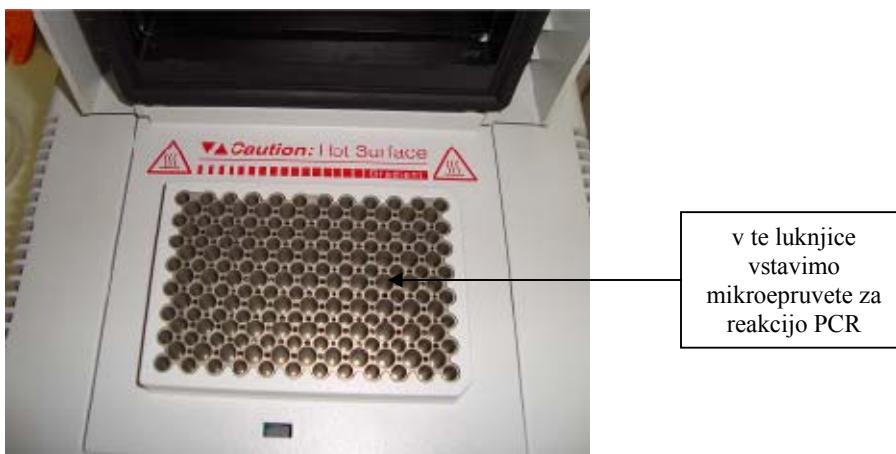
Priprava reakcijske mešanice za PCR:

- Pripravili smo jo v za to namenjenem prostoru v posebni komori, ki je vsebovala vso opremo in pripomočke.
- Pred in po delu smo komoro razkužili in osvetlili z UV lučjo za najmanj dve uri.
- Pri delu smo obvezno uporabljali rokavice.
- Kemikalije in reagenti, ki smo jih uporabili, so morali biti ves čas na ledu.
- Volumen posameznih sestavin reakcijske mešanice smo izračunali glede na število vzorcev (vključno s pozitivno in negativno kontrolo).
- Volumen reakcijske mešanice za en vzorec je znašal 30 µl. Vseboval je:
 - 6 µl 5× GoTaq® pufra za polimerazo z MgCl₂ (končna koncentracija MgCl₂ 1,5 mM) ali 5× GoTaq® Flexi pufra brez MgCl₂,
 - 3 µl MgCl₂ (samo v primeru uporabe 5× GoTaq® Flexi pufra brez MgCl₂, 25 mM ➔ 2,5 mM),
 - 1 µl začetnega oligonukleotida I (5 µM ➔ 0,1 µM),
 - 1 µl začetnega oligonukleotida II (5 µM ➔ 0,1 µM),
 - 2,5 µl dNTP (2 mM ➔ 0,05 mM),
 - 0,3 µl GoTaq® DNA-polimeraze (5 U/µl ➔ 0,05 U/µl),
 - 2 µl DNA,
 - H₂O ➔ dodali smo toliko vode, da je bil skupni volumen 30 µl.
- Reagente smo pred uporabo premešali na vrtičniku ali ročno.
- Najprej smo odpipetirali izračunan volumen vode, nato pa ostale reagente, pri čemer smo GoTaq® DNA-polimerazo dodali zadnjo.
- Reakcijsko mešanico smo premešali in razdelili v mikropruvete za PCR po 28 µl ter nato vsaki dodali še po 2 µl posameznega vzorca DNA.

V vsako reakcijo PCR smo dali še pozitivno in negativno kontrolo. Pozitivno kontrolo je predstavljala preverjena DNA, značilna za to vrsto. Negativno kontrolo pa mešanica, ki smo ji namesto DNA dodali deionizirano vodo. Mikropruvete, napolnjene s 30 µl reakcijske mešanice (28 µl mešanice + 2 µl tarčne DNA), smo nato prenesli v aparaturo za PCR (Mastercycler Gradient, Eppendorf) in vnesli ustrezni protokol za posamezno PCR reakcijo.



Slika 8: Aparatura za izvedbo reakcije PCR



Slika 9: Notranjost aparature za reakcijo PCR

3.3.4.4 Potek PCR

Podatki o začetnih oligonukleotidih, ki smo jih uporabili in velikosti specifičnih produktov, so prikazani v preglednici 9.

Preglednica 9: Imena, pričakovana velikost pomnožkov in viri za začetne oligonukleotide, ki smo jih uporabili v reakcijah PCR

Vrsta bakterij	Začetni oligonukleotid I	Začetni oligonukleotid II	Velikost pomnožkov	Vir
<i>Bif. bifidum</i>	BiBIF-1	BiBIF-2	278 bp	Matsuki in sod., 2004
<i>Bif. longum</i>	BILON-1	BILON-2	831 bp	Matsuki in sod., 2004
<i>Bif. lactis</i>	Bflact-2	Bflact-5	680 bp	Matsuki in sod., 1999
<i>Lb. acidophilus</i>	LacI	LacII	759 bp	Walter in sod., 2000
<i>Lc. lactis</i>	27f	Lla	87 bp	Barakat in sod., 2000
<i>Ent. faecium</i>	F1	F2	550 bp	Dutka-Malen in sod., 1995
<i>Lb. casei</i>	PrI	CasII	200 bp	Walter in sod., 2000
<i>Lb. paracasei</i>	Y2	para ward	290 bp	Ward in Timmins, 1999
<i>Lb. gasseri</i>	Lgas-2	Lgas-3	360 bp	Song in sod., 2000
<i>Lb. plantarum</i>	Lfpr	PlanII	200 bp	Walter in sod., 2000
<i>Lb. rhamnosus</i>	PrI	RhaII	186 bp	Walter in sod., 2000
<i>Lb. salivarius</i>	SAL1	LOW LAC	993 bp	Chagnaud in sod., 2001
<i>Lb. bulgaricus</i>	LB1	LLB1	1065 bp	Torriani in sod., 1999
<i>Str. thermophilus</i>	ThI	ThII	300 bp	Tilsala-Timisjärvi in Alatossava., 1997
<i>Lb. reuteri</i>	Lfpr	Reu	200-300 bp	Walter in sod., 2000
<i>B. coagulans</i> (pomnoževanje dela gena za 16S rRNA)	P1	P4	660 bp	Klijn in sod., 1991

Legenda:

bp... bazni pari

Reakcijo PCR za ugotavljanje prisotnosti DNA posameznih vrst bakterij smo izvedli po protokolih, ki so prikazani v preglednici 10.

Preglednica 10: Parametri reakcij PCR za ugotavljanje prisotnosti DNA posameznih vrst bakterij

Vrsta bakterij	Reakcija	Parametri	Število ciklov	Vir
<i>Bif. bifidum</i> <i>Bif. longum</i>	Začetek	95 °C/3 min	1	Matsuki in sod., 2004
	Denaturacija DNA	95 °C/30 s		
	Prileganje	55 °C/30 s	35	
	Podaljševanje	72 °C/1 min		
<i>Bif. lactis</i>	Zaključek	72 °C/10 min	1	Matsuki in sod., 1999
	Začetek	95 °C/5 min	1	
	Denaturacija DNA	95 °C/30 s		
	Prileganje	58 °C/30 s	30	
<i>Lb. acidophilus</i>	Podaljševanje	72 °C/1 min		Walter in sod., 2000
	Zaključek	72 °C/10 min	1	
	Začetek	95 °C/3 min	1	
	Denaturacija DNA	95 °C/30 s		
<i>Ent. faecium</i>	Prileganje	62 °C/30 s	30	Dutka-Malen in sod., 1995
	Podaljševanje	72 °C/30 s		
	Zaključek	72 °C/10 min	1	
	Začetek	95 °C/3 min	1	
<i>Lb. casei</i> <i>Lb. paracasei</i>	Denaturacija DNA	94 °C/30 s		Walter in sod., 2000 (<i>Lb. casei</i>); Ward in Timmins, 1999 (<i>Lb. paracasei</i>)
	Prileganje	55 °C/30 s	30	
	Podaljševanje	72 °C/30 s		
	Zaključek	72 °C/10 min	1	
<i>Lb. gasseri</i>	Začetek	94 °C/3 min	1	Song in sod., 2000
	Denaturacija DNA	55 °C/45 s		
	Prileganje	70 °C/1 min	30	
	Podaljševanje			
<i>Lb. plantarum</i>	Zaključek	94 °C/45 s		Walter in sod., 2000
	Začetek	55 °C/45 s	1	
	Denaturacija DNA	70 °C/5 min		
	Prileganje		35	
<i>Lb. rhamnosus</i>	Podaljševanje	72 °C/2 min		Walter in sod., 2000
	Zaključek	74 °C/2 min	1	
	Začetek	74 °C/10 min	1	
	Denaturacija DNA	74 °C/10 min		
	Prileganje		1	
	Podaljševanje		35	
	Zaključek	72 °C/10 min	1	
	Začetek	72 °C/10 min	1	

se nadaljuje

nadaljevanje

Preglednica 10: Parametri reakcij PCR za ugotavljanje prisotnosti DNA posameznih vrst bakterij

Vrsta bakterij	Reakcija	Parametri	Število ciklov	Vir
<i>Lb. salivarius*</i>	Začetek	Prvi program: 95 °C/10 min	1	Chagnaud in sod., 2001
	Denaturacija DNA	95 °C/30 s		
	Prileganje	50 °C/30 s	35	
	Podaljševanje	72 °C/1 min		
	Zaključek	72 °C/10 min	1	
	Začetek	Drugi program: 99 °C/5 min	1	
	Denaturacija DNA	94 °C/30 s		
	Prileganje	55 °C/45 s	35	
	Podaljševanje	72 °C/1 min		
	Zaključek	72 °C/3 min	1	
<i>Lb. bulgaricus</i>	Začetek	Tretji program: 95 °C/10 min	1	Torriani in sod., 1999
	Denaturacija DNA	95 °C/30 s		
	Prileganje	65 °C/30 s	35	
	Podaljševanje	72 °C/1 min		
<i>Str. thermophilus</i>	Zaključek	72 °C/10 min	1	Tilsala-Timisjärvi in Alatossava., 1997
	Začetek	95 °C/2 min	1	
	Denaturacija DNA	95 °C/45 s		
	Prileganje	58 °C/30 s	30	
<i>Lb. reuteri</i>	Podaljševanje	72 °C/30 s		Walter in sod., 2000
	Zaključek	72 °C/10 min	1	
	Začetek	92 °C/2 min	1	
	Denaturacija DNA	95 °C/30 s		
<i>Lc. lactis</i>	Prileganje	55 °C/30 s	30	Barakat in sod., 2000
	Podaljševanje	72 °C/30 s		
	Zaključek	72 °C/10 min	1	
	Začetek	99 °C/5 min	1	
	Denaturacija DNA	94 °C/30 s		
	Prileganje	55 °C/45 s	35	
	Podaljševanje	72 °C/1 min		
	Zaključek	72 °C/3 min	1	

Opomba k preglednici 10:

* Pri vrsti *Lb. salivarius* smo preskusili tri različne protokole, ker reakcije pomnoževanja niso bile uspešne.

3.3.5 Pregledovanje pomnožkov PCR z agarozno gelsko elektroforezo

Pomnožke PCR smo pregledovali z agarozno gelsko elektroforezo tako, da smo njihovo velikost primerjali z molekulskim označevalcem velikosti DNA. Ker molekule DNA same po sebi niso obarvane, jih po končani elektroforezi detektiramo na gelu tako, da gel potopimo v raztopino primernega barvila (SYBR Safe), ki se vrine med bazne pare DNA (Abram in sod., 2006).

3.3.5.1 Priprava agaroznega gela za agarozno gelsko elektroforezo

Priprava 100 ml 1,5% agaroznega gela:

- Zatehtali smo 1,5 g agaroznega gela in 100 ml 1-kratnega TAE pufra (z 50-kratno založno raztopino in pH=8,0) v stekleničko.
- Raztopino smo segrevali v mikrovalovni pečici toliko časa, da se je agarozna popolnoma raztopila in da je raztopina postala bistra.
- Vsebino v steklenički smo primerno shladili in nato raztopino gela vlili v model z glavnikom različnih velikosti.
- Počakali smo, da se je gel strdil in nato previdno odstranili glavnik (dobili prazne prostorčke za nanašanje vzorcev) ter gel prenesli v aparatujo za elektroforezo z 1-kratnim TAE pufrom.

3.3.5.2 Potek elektroforeze

Elektroforeza je potekala po naslednjem zaporedju:

- Na gel smo v prazne prostorčke nanesli po 15 µl pomnožkov PCR (vključno s pozitivno in negativno kontrolo), ki že vsebujejo barvilo, saj je le-to sestavina pufra GoTaq® ter po 15 µl mešanice molekulskega označevalca (100 bp in 1 kb DNA Ladder) in vode (2,5 µl raztopine molekulskega označevalca + 13 µl vode).
- Elektroforezo smo vodili pri 90 ali 95 V od 60 do 105 minut.
- Gel smo po končani elektroforezi obarvali z raztopino SYBR Safe in ga pustili od 45 do 65 minut.
- Po končanem barvanju smo gel pregledali z 12-bitno CCD kamero pri UV svetlobi ($\lambda = 302$ nm) s pomočjo sistema za dokumentacijo gelov in analizo slik Syngene Chemigenius2.



Slika 10: Nanašanje vzorcev v prazne prostorčke na gelu

3.3.6 Pomnoževanje dela 16S rDNA z metodo PCR na osnovi kolonije in priprava pomnožkov DNA za sekvenciranje

Z reakcijo PCR smo pomnožili del 16S rDNA (regiji V1/V3), pri čemer smo uporabili univerzalna začetna oligonukleotida za bakterije P1 in P4 z velikostjo produktov 660 bp, ki so ju opisali Klijn in sod. (1991). Matrično DNA za pomnoževanje je predstavljala bodisi DNA, izolirana iz mešanice kolonij, zraslih na gojiščih BHI in PCA (v reakcijsko mešanico smo dodali po 2 µl DNA, izolirane s pomočjo kompleta »Wizard® Genomic DNA Purification Kit« (Promega, Madison, WI, ZDA)), bodisi posamezne topotopno obdelane kolonije, ki so zrasle na gojiščih BHI in PCA (izbrali smo kolonije različnih velikosti – po dve majhni in dve veliki koloniji za izdelka ^{NEO®}Fermental_{MAX} (suspenzija) in ^{NEO®}Fermental_{MAX} (kapsule), medtem ko smo si za izdelek Probiolex® (prašek) izbrali eno veliko kolonijo iz gojišča PCA). Kolonije, ki smo jih uporabili za PCR, smo istočasno tudi z zobotrebcem nacepili na gojišče BHI.

3.3.6.1 Reakcijska mešanica za PCR

Priprava reakcijske mešanice za en vzorec (30 µl):

- 6 µl 5× GoTaq® Flexi pufra brez MgCl₂
 - 3 µl MgCl₂ (25 mM)
 - 1 µl začetnega oligonukleotida I (5 µM)
 - 1 µl začetnega oligonukleotida II (5 µM)
 - 2,5 µl dNTP (2 mM)
 - 11,5 µl H₂O
- $\Sigma = 25 \mu\text{l reakcijske mešanice}$

V 25 µl reakcijsko mešanico smo prenesli kolonijo iz gojišča in mikropruveto z reakcijsko mešanicijo vstavili v aparaturo za PCR na 99 °C za 10 minut (»HOT START«). Nato smo dodali po 5 µl GoTaq® DNA-polimeraze in vode na vzorec (0,1 µl GoTaq® DNA-polimeraze + 4,9 µl H₂O).

Preglednica 11: Parametri reakcije PCR za pomnoževanje dela 16S rDNA iz kolonij *B. coagulans* z začetnimi oligonukleotidi P1 in P4. Pomnožki so bili namenjeni za sekvenciranje.

Reakcija	Parametri	Število ciklov	Vir
Začetek	95 °C/5 min	1	Klijn in sod., 1991
Denaturacija DNA	93 °C/1 min		
Prileganje	52 °C/30 s	30	
Podaljševanje	72 °C/30 s		
Zaključek	72 °C/10 min	1	

3.3.6.2 Čiščenje pomnožkov PCR

Pred elektroforezo smo dobljene pomnožke PCR očistili po navodilih proizvajalca s kompletom »Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System« (Promega, Madison, WI, ZDA). Postopek smo na koncu malo prilagodili našim vzorcem:

- Po čiščenju pomnožkov PCR je sledilo izpiranje, kjer smo kolono z membrano prenesli v 1,5 ml mikropruveto in dodali 40 µl raztopine »Nuclease-Free Water« v kolono z membrano ter inkubirali 1 minuto na sobni temperaturi. Sledilo je dvominutno centrifugiranje pri 16000 × g. Zadnji korak pa smo izvedli po navodilih proizvajalca.

Z elektroforezo smo preverili velikost pomnožkov, čistost in koncentracijo DNA, kakor je že opisano v poglavju 3.3.5.

3.3.7 Sekvenciranje

Za nadaljno analizo smo izbrali pet očiščenih pomnožkov PCR (toploton obdelane kolonije):

- eno veliko kolonijo iz gojišča PCA (inkubacija: aerobna, 42 °C/2 dni) iz izdelka Probiolex® (prašek);
- po eno malo in eno veliko kolonijo iz gojišča BHI (inkubacija: aerobna, 37 °C/4 dni) iz izdelka ^{NEO®}Fermental_{MAX} (suspenzija);
- po eno malo in eno veliko kolonijo iz gojišča BHI (inkubacija: aerobna, 37 °C/4 dni) iz izdelka ^{NEO®}Fermental_{MAX} (kapsule).

Sekvenciranje oz. reakcije določanja nukleotidnega zaporedja so opravili v specializiranih laboratorijih Microsynth v Švici. Po sekvenciranju smo dobljena nukleotidna zaporedja analizirali in primerjali s tistimi, ki so shranjena v genski banki NCBI (angl. National Center for Biotechnology Informations, Rockville Pike, Bethesda, ZDA). To smo naredili s pomočjo programa BLAST (angl. Basic Local Alignment Search Tool) (NCBI, 2010).

4 REZULTATI

4.1 UGOTAVLJANJE USTREZNOSTI DEKLARACIJ PROBIOTIČNIH PREHRANSKIH DOPOLNIL

Pregledali smo deklaracije probiotičnih prehranskih dopolnil in ugotavljali njihovo ustreznost glede deklariranih bakterijskih vrst in deklariranega števila kultivabilnih probiotičnih bakterij.

Preglednica 12: Podatki na deklaracijah izbranih probiotičnih prehranskih dopolnil

Ime izdelka	Deklarirane probiotične bakterije	Deklarirano število probiotičnih bakterij	Namen
Yogermina® 100 (suspenzija)	<i>Lb. acidophilus</i> La-14 <i>Lb. paracasei</i> Lpc-37 <i>Lb. plantarum</i> Lp-115 <i>Bif. lactis</i> Bl-14	– najmanj 10^{11} probiotičnih kultur/stekl. ob izdelavi – žive celice do konca roka trajanja izdelka ne manj kot 32×10^9 u.f.c./stekl. (<i>Bif. lactis</i> : 24×10^9 u.f.c./stekl.; <i>Lb. acidophilus</i> : $6,4 \times 10^9$ u.f.c./stekl.; <i>Lb. plantarum</i> : $1,28 \times 10^9$ u.f.c./stekl.; <i>Lb. paracasei</i> : $0,32 \times 10^9$ u.f.c./stekl.)	– pomembna pri hitrem vzpostavljanju bakterijske biote in delovanja črevesja po zdravljenju z antibiotiki, diareji, stresu in prehranskih motnjah
Bion® 3 Seniors (tablete)	<i>Lb. gasseri</i> PA 16/8 <i>Bif. bifidum</i> MF 20/5 <i>Bif. longum</i> SP 07/3	10^7 probiotičnih kultur/tableto	– za osebe v zrelih letih – po 50. letu starosti – prispeva k dobri presnovi esencialnih hraničnih snovi v prebavilih
BioGaia® (tablete)	<i>Lb. reuteri</i> Protectis	10^8 živih aktivnih bakterij/tableto	– odporna na agresivno delovanje želodčnega soka – pomaga ohranjati in vzpostavljati ravnovesje v črevesni mikrobioti
Probiolex® (kapsule)	<i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb. bulgaricus</i> <i>Lb. sporogenes</i> <i>Str. thermophilus</i> <i>Bif. bifidum</i>	– skupaj najmanj $7,5 \times 10^8$ CFU/kapsulo – dnevni odmerek: $1,5 \times 10^9$ CFU/2 kapsuli	– pomaga hitro uravnotežiti črevesno bioto pri spremenjenih črevesnih funkcijah – zagotavlja normalno prebavno in imunske funkcije črevesja
Probiolex® (prašek)	<i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb. bulgaricus</i> <i>Lb. sporogenes</i> <i>Str. thermophilus</i> <i>Bif. bifidum</i>	– skupaj najmanj $1,5 \times 10^9$ CFU/vrečko – dnevni odmerek: skupaj najmanj $3,0 \times 10^9$ CFU/2 vrečki	– pomaga hitro uravnotežiti črevesno bioto pri spremenjenih črevesnih funkcijah – zagotavlja normalno prebavno in imunske funkcije črevesja

se nadaljuje

nadaljevanje

Preglednica 12: Podatki na deklaracijah izbranih probiotičnih prehranskih dopolnil

Ime izdelka	Deklarirane probiotične bakterije	Deklarirano število probiotičnih bakterij	Namen
Bion® Transit (kapsule)	<i>Lb. plantarum</i> 299 V	10^{10} probiotičnih kultur/kapsulo	– namenjen osebam, ki imajo občutljivo črevesje – vpliva na ravnovesje črevesne biote
Bion® 3 Juniors (tablete)	<i>Lb. gasseri</i> PA 16/8 <i>Bif. bifidum</i> MF/ 20/5 <i>Bif. longum</i> SP 07/3	10^7 probiotikov/tableto	– namenjen otrokom starim od 7 do 12 let – prispeva k dobri presnovi nujno potrebnih hranilnih snovi
BioGaia® (kapljice)	<i>Lb. reuteri</i> <td>10^8 živih aktivnih bakterij/5 kapljic</td> <td>– bakterija <i>Lb. reuteri</i> sodi med naravno mikrobioto materinega mleka pri zdravih materah – pomaga ohranjati in vzpostavljeni ravnovesje v črevesni mikrobioti, ki preprečuje razmnoževanje škodljivih MO</td>	10^8 živih aktivnih bakterij/5 kapljic	– bakterija <i>Lb. reuteri</i> sodi med naravno mikrobioto materinega mleka pri zdravih materah – pomaga ohranjati in vzpostavljeni ravnovesje v črevesni mikrobioti, ki preprečuje razmnoževanje škodljivih MO
WAYA® AD (prašek)	<i>Bif. bifidum</i> <i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb. casei</i> <i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. rhamnosus</i> <i>Lb. salivarius</i> <i>Lc. lactis</i>	– najmanj 5×10^9 živih probiotičnih bakterij/vrečko – probiotične bakterije (g): v 5 g (1 vrečka): 0,19 g; v 100 g 3,73 g	– deluje zaviralo na škodljive bakterije in tako pomaga vzdrževati ravnotežje v črevesni mikrobioti pri diarejah
WAYA® AB (prašek)	<i>Bif. bifidum</i> <i>Bif. lactis</i> <i>Lb. acidophilus</i> (2 seva) <i>Lb. paracasei</i> <i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. rhamnosus</i> <i>Lb. salivarius</i> <i>Ent. faecium</i>	– najmanj 5×10^9 KE živih probiotičnih kultur/vrečko – probiotične bakterije (g): v 5 g (1 vrečka) 0,26 g; v 100 g 5,1 g	– pomaga pri ohranjanju črevesne mikrobiote med zdravljenjem z antibiotiki in po njem ter s tem poveča raven koristnih bakterij v črevesju
WAYA® IT (prašek)	<i>Lb. casei</i> <i>Lb. rhamnosus</i> <i>Lb. plantarum</i> <i>Bif. bifidum</i> <i>Bif. lactis</i> <i>Bif. longum</i>	– najmanj 4×10^9 živih probiotičnih bakterij/vrečko – probiotične bakterije (g): v 4 g (1 vrečka) 0,08 g; v 100 g 2,13 g	– izboljšuje splošno počutje pri zaprtju – izboljšuje normalno prebavo
LYOLACT® (kapsule)	<i>Lb. bulgaricus</i> (2 seva) <i>Lb. gasseri</i> <i>Str. thermophilus</i>	10^{10} živih probiotičnih bakterij/kapsulo (1 kapsula=400 mg)	– uravnava ravnotežje mikrobiote v gastrointestinalnem traktu v primeru diareje, gastrointestinalnih infekcij, pri zdravljenju z antibiotiki – spodbuja imunski sistem – zmanjša alergične reakcije

se nadaljuje

nadaljevanje

Preglednica 12: Podatki na deklaracijah izbranih probiotičnih prehranskih dopolnil

Ime izdelka	Deklarirane probiotične bakterije	Deklarirano število probiotičnih bakterij	Namen
NEO®Fermental _{MAX} (suspenzija)	<i>B. coagulans</i> (<i>Lb. sporogenes</i>)	– 2×10^9 spor <i>B. coagulans</i> /stekl. (dnevni odmerek) – 20×10^9 spor <i>B. coagulans</i> /100 ml	– <i>B. coagulans</i> se ne aktivira v želodcu, zato hitreje izboljša stanje bakterijske biote – ugodno deluje na prebavo in pomaga vzdrževati črevesno mikrobioto
NEO®Fermental _{MAX} (kapsule)	<i>B. coagulans</i> (<i>Lb. sporogenes</i>)	– 2×10^9 spor <i>B. coagulans</i> /kapsulo (dnevni odmerek) – 500×10^9 spor <i>B. coagulans</i> /100g	– <i>B. coagulans</i> se ne aktivira v želodcu, zato hitreje izboljša stanje bakterijske biote – ugodno deluje na prebavo in pomaga vzdrževati črevesno mikrobioto

Legenda:

stekl....steklenička

u.f.c....celice, ki tvorijo kolonijo

CFU...enota, ki tvori kolonijo

Ugotovili smo, da ni bistvenih pomanjkljivosti oz. napak glede poimenovanja probiotičnih bakterij v izdelkih. Bakterijske vrste, ki so jih probiotična dopolnila vsebovala, so bile vedno navedene, ne pa tudi imena sevov. Slednji so bili navedeni na sledečih izdelkih:

- Yoggermina® 100 (suspenzija),
- Bion® 3 Seniors (tablete),
- Bion® Transit (kapsule),
- Bion® 3 Juniors (tablete).

Pravilnost imen MO, ki so na deklaracijah, smo preverili na seznamu veljavnih bakterijskih imen (»Approved Lists of Bacterial Names«), ki je dostopen na medmrežju (<http://www.bacterio.cict.fr/>) in ga redno obnavljajo (Euzéby, 2010). Rezultati preverjanja ustreznosti nomenklature so bili naslednji:

- Na izdelkih Probiolex® (kapsule) in Probiolex® (prašek) je bilo navedeno ime vrste *Lb. sporogenes*, ki je neobstoječa vrsta.
- Na izdelkih NEO®Fermental_{MAX} (suspenzija) in NEO®Fermental_{MAX} (kapsule) je bilo navedeno ime vrste *B. coagulans*, vendar v oklepaju še *Lb. sporogenes*, ki ne obstaja.
- Pri izdelkih BioGaia® (tablete) in BioGaia® (kapljice) je bila navedena bakterijska vrsta *Lb. reuteri* Protectis. Proizvajalec je kot del svojega trženja dodal k bakterijski vrsti še trivialno ime Protectis, ki je sicer za potrošnika informativno, ni pa pravilno.

Kar zadeva opis namena preiskovanih izdelkov in delovanja na človeški organizem, nismo naleteli na nepravilnosti.

Naleteli smo na pomanjkljive podatke o številu MO za vsako bakterijsko vrsto posebej. Večina izdelkov, z izjemo Yoggermina® 100 (suspenzija), je vsebovala samo podatke o številu vseh MO skupaj.

4.2 UGOTAVLJANJE ŠTEVILA PROBIOTIČNIH BAKTERIJ V POSAMEZNIH PREHRANSKIH DOPOLNILIH IN MORFOLOGIJA

Vzroki neskladnosti deklariranih števil probiotikov v izdelkih z rezultati štetja so posledica odmiranja bakterij med tehnološkim postopkom in med skladiščenjem.

4.2.1 Yogermina® 100 (suspenzija)

Preglednica 13: Rezultati štetja KE probiotičnih bakterij v izdelku Yogermina® 100 (suspenzija), morfološkega opazovanja bakterijskih kolonij na gojiščih in bakterijskih celic pod mikroskopom (barvanje po Gramu)

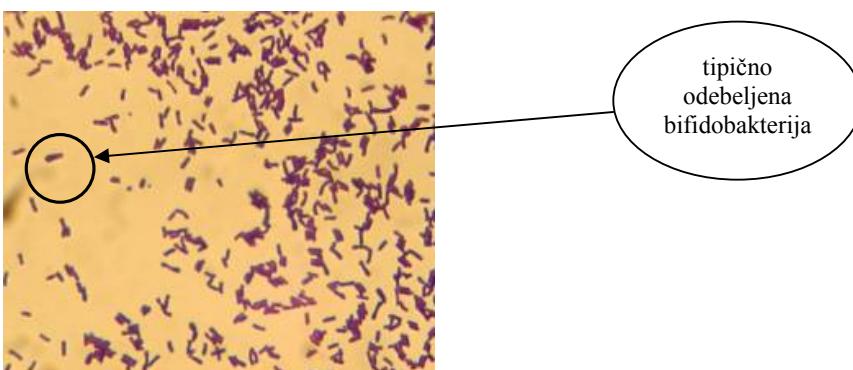
Vrsta bakterij (gojišče)	Deklarirano število probiotičnih bakterij (u.f.c./stekl.)	Rezultati štetja bakterij (KE/stekl.)	Opis kolonij na gojiščih	Opis celic pod mikroskopom	Skladnost z deklaracijo
<i>Lb. acidophilus</i> (MRS+cly+cip)	$6,4 \times 10^9$	$1,2 \times 10^7$	bele, okrogle kolonije	ravne, tanke G+ palčke, posamezne in tudi v verižicah	ne ustreza
<i>Bif. lactis</i> (MRS+cys+mup)	24×10^9	$1,8 \times 10^9$	bele, okrogle kolonije	odebeljene G+, razvezjane palčke (v obliki epsilonov, črke V, kot loparčki)	ne ustreza
<i>Lb. plantarum</i> in <i>Lb. paracasei</i> (MRS)	$1,6 \times 10^9$	$2,2 \times 10^7$	bele, okrogle kolonije	majhne, kratke, srednje debele G+ palčke	ne ustreza
skupaj	32×10^9	$1,8 \times 10^9$	/	/	ne ustreza

Komentar k preglednici 13:

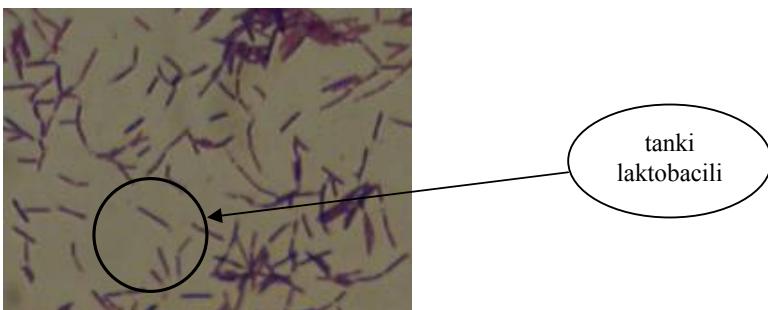
Deklarirana števila posameznih vrst bakterij in skupno število probiotičnih bakterij se niso ujemala z rezultati štetja, čeprav je ob času analize do konca roka uporabe tega izdelka manjkalo še eno leto in pol. Na gojiščih MRS+cly+cip in MRS je zraslo za približno dve log enoti manj, na gojišču MRS+cys+mup pa za eno log enoto manj kolonij, kot je navedeno število *Lb. acidophilus* oz. bifidobakterij na deklaraciji. Na podlagi morfologije smo sklepali, da gre za deklarirane rodove bakterij, saj so pod mikroskopom imele vse bakterijske celice značilno obliko, velikost inobarvanje po Gramu.



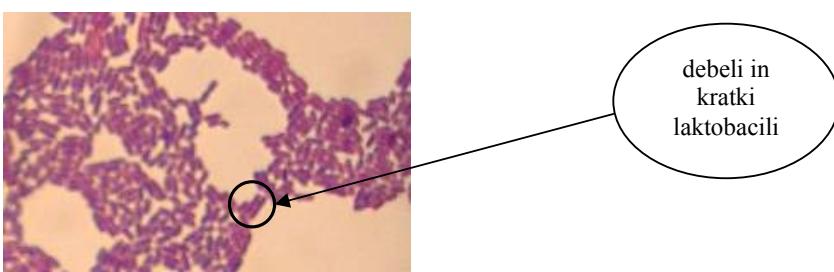
Slika 11: *Lb. plantarum* in *Lb. paracasei* na gojišču MRS; izdelek Yogermina® 100 (suspenzija)



Slika 12: *Bif. lactis* pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvane po Gramu; izdelek Yogermina® 100 (suspenzija)



Slika 13: *Lb. acidophilus* pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvane po Gramu; izdelek Yogermina® 100 (suspenzija)



Slika 14: *Lb. plantarum* in *Lb. paracasei* pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvane po Gramu; izdelek Yogermina® 100 (suspenzija)

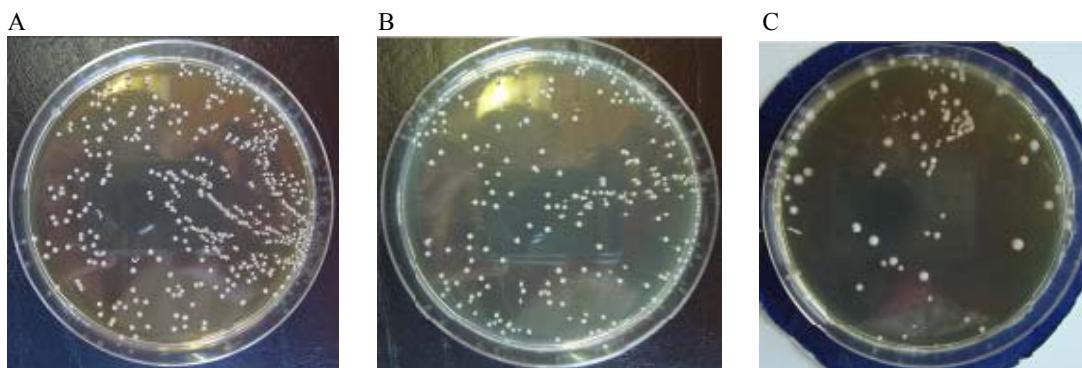
4.2.2 Bion® 3 Seniors (tablete)

Preglednica 14: Rezultati štetja KE probiotičnih bakterij v izdelku Bion® 3 Seniors (tablete), morfološkega opazovanja bakterijskih kolonij na gojiščih in bakterijskih celic pod mikroskopom (barvanje po Gramu)

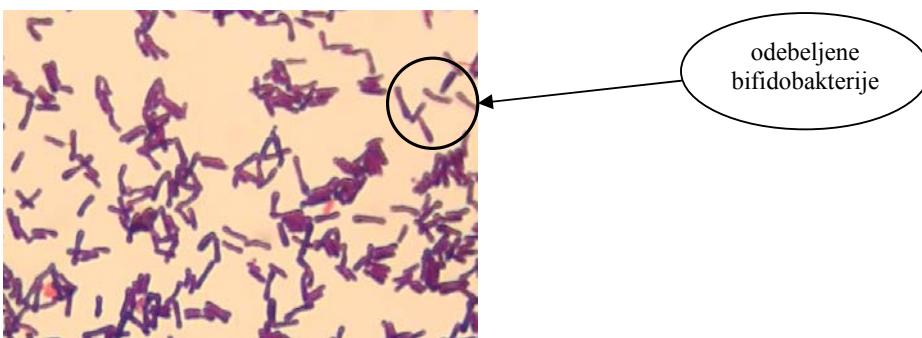
Vrsta bakterij (gojišče)	Deklarirano število probiotičnih bakterij (probiotične kulture/tableto)	Rezultati štetja bakterij (KE/tableto)	Opis kolonij na gojiščih	Opis celic pod mikroskopom	Skladnost z deklaracijo
<i>Lb. gasseri</i> (MRS+cly+cip)	10^7	$1,5 \times 10^7$	bele, okrogle kolonije	tanke, kratke, dolge G+ palčke, posamezne in v verižicah	ustreza
<i>Bif. bifidum</i> in <i>Bif. longum</i> (MRS+cys+mup)		$9,2 \times 10^4$	bele, okrogle kolonije	odebeljene G+, razvezjane palčke (v obliki črk Y in V)	
za skupno število bakterij (MRS)		skupaj: $1,5 \times 10^7$			
/		$1,4 \times 10^7$	bele, okrogle kolonije	tanke, kratke, dolge G+ palčke, posamezne, po dve skupaj, v verižicah	

Komentar k preglednici 14:

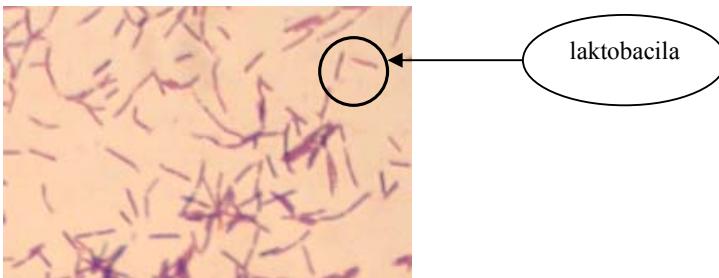
Rezultati štetja bakterij na petrijevih ploščah so bili višji od deklariranega števila, zato lahko zaključimo, da je bila deklaracija glede števila probiotičnih bakterij ustrezna. Kolonije na gojiščih in bakterijske celice pod mikroskopom so imele za navedene rodove značilno obliko, velikost inobarvanje po Gramu. MRS je neselektivno gojišče, ki omogoča rast velike večine probiotičnih bakterij. Skupno število bakterij, pridobljeno na gojišču MRS, se je ujemalo z vsoto števil posameznih vrst, ki smo jih ugotovili na selektivnih gojiščih.



Slika 15: Vse bakterije na gojišču MRS (A), *Lb. gasseri* na gojišču MRS+cly+cip (B), *Bif. bifidum* in *Bif. longum* na gojišču MRS+cys+mup (C); izdelek Bion® 3 Seniors (tablete)



Slika 16: *Bif. bifidum* in *Bif. longum* pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvane po Gramu; izdelek Bion® 3 Seniors (tablete)



Slika 17: *Lb. gasseri* pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvane po Gramu; izdelek Bion® 3 Seniors (tablete)

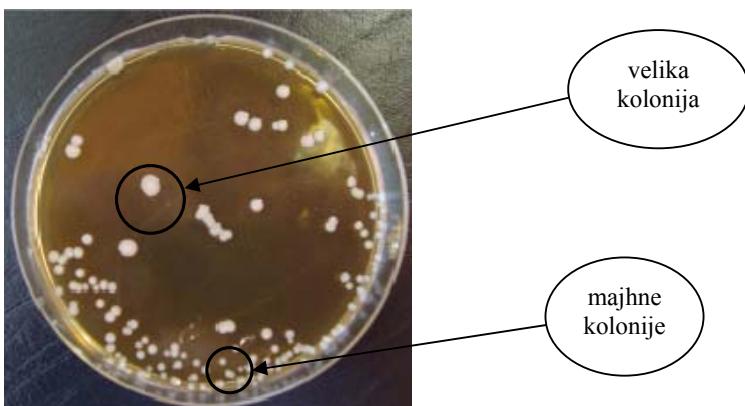
4.2.3 BioGaia® (tablete)

Preglednica 15: Rezultati štetja KE probiotičnih bakterij v izdelku BioGaia® (tablete), morfološkega opazovanja bakterijskih kolonij na gojiščih in bakterijskih celic pod mikroskopom (barvanje po Gramu)

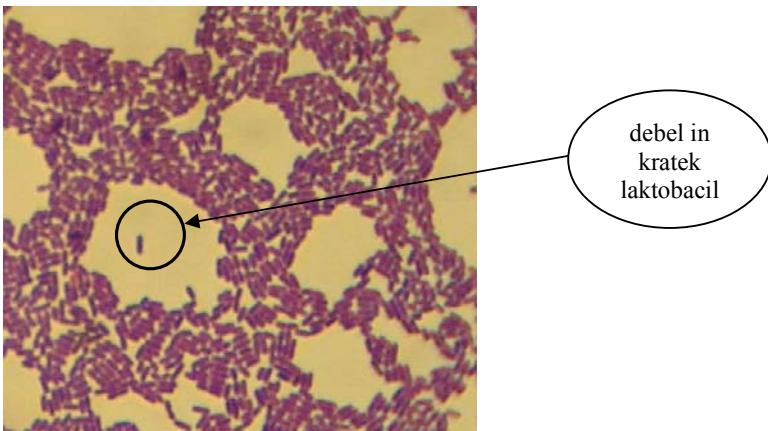
Vrsta bakterij (gojišče)	Deklarirano število probiotičnih bakterij (žive aktivne bakterije/tableto)	Rezultat štetja bakterij (KE/tableto)	Opis kolonij na gojiščih	Opis celic pod mikroskopom	Skladnost z deklaracijo
<i>Lb. reuteri</i> Protectis (MRS)	10^8	$1,4 \times 10^7$	nekaterе kolonije so bile majhne, bele, okrogle; nekatere pa velike (premera 0,5 cm), okrogle, bele kolonije	– ena kolonija: mešana kolonija debelih G+ palčk in G+ kokov ali kokobacilov – druga kolonija: različne, kratke, debele G+ palčke	ne ustreza

Komentar k preglednici 15:

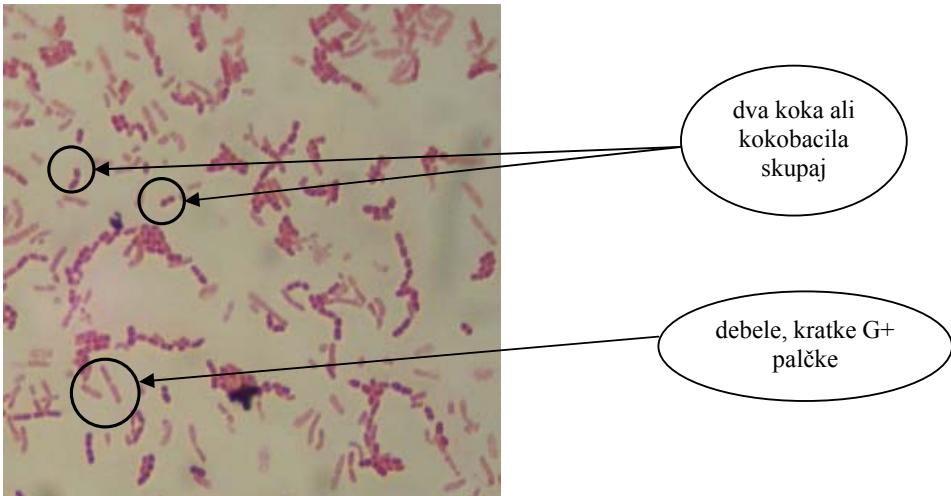
Deklarirano število *Lb. reuteri* Protectis je bilo višje od rezultata štetja KE na gojišču MRS. Izdelek smo analizirali deset mesecev pred iztekom roka uporabe, zato lahko rečemo, da izdelek ni ustrezan glede števila probiotičnih bakterij. Pregled kolonij z gojišča in bakterijskih celic pod mikroskopom (oblika, velikost, barvanje po Gramu, združevanje celic) je pokazal različne velikosti kolonij in različno morfologijo celic. Razen daljših pravilnih palčk smo opazili tudi kokobacile ali koke, čeprav naj bi izdelek vseboval en sam bakterijski sev.



Slika 18: *Lb. reuteri* na gojišču MRS; izdelek BioGaia® (tablete)



Slika 19: Kolonija iz gojišča MRS (*Lb. reuteri*) pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvana po Gramu; izdelek BioGaia® (tablete)



Slika 20: Kolonija iz gojišča MRS (laktobacili in koki ali kokobacili) pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvana po Gramu; izdelek BioGaia® (tablete)

4.2.4. Probiolex® (kapsule)

Preglednica 16: Rezultati štetja KE probiotičnih bakterij v izdelku Probiolex® (kapsule), morfološkega opazovanja bakterijskih kolonij na gojiščih in bakterijskih celic pod mikroskopom (barvanje po Gramu)

Vrsta bakterij (gojišče)	Deklarirano število probiotičnih bakterij (CFU/kapsulo)	Rezultati štetja bakterij (KE/kapsulo)	Opis kolonij na gojiščih	Opis celic pod mikroskopom	Skladnost z deklaracijo
<i>Lb. acidophilus</i> (MRS+cly+cip)	$7,5 \times 10^8$	manj kot 10×10^3	ni bilo izraslih kolonij na gojiščih	ni bilo izraslih kolonij na gojiščih	ne ustreza
<i>Lb. bulgaricus</i> (MRS, pH=5,2)		$1,0 \times 10^7$	majhne, bele, okrogle kolonije	dolge, kratke, tanke G+ palčke, posamezne	
<i>Bif. bifidum</i> (MRS+cys+mup)		manj kot 10×10^3	ni bilo izraslih kolonij na gojiščih	ni bilo izraslih kolonij na gojiščih	
<i>Str. thermophilus</i> oz. mezofilne MKB (M17, ink. pri 42 °C)*		$7,8 \times 10^5$	velike, bele, okrogle, diskaste kolonije	– ena kolonija: G+ palčke, posamezne, kratke, dolge, tanke, debelejše – druga kolonija: okrogle G+ koki, v veržicah, skupkih	
<i>Lb. sporogenes</i> (= <i>B. coagulans</i>) (BHI, ink. pri 37 °C/3dni)		$9,6 \times 10^5$	velike, bele, okrogle, zelo velike kolonije	dolge, tanke, G+ palčke, posamezne	
/		skupaj: $1,2 \times 10^7$	/	/	

Legenda:

ink....inkubacija

Opomba k preglednici 16:

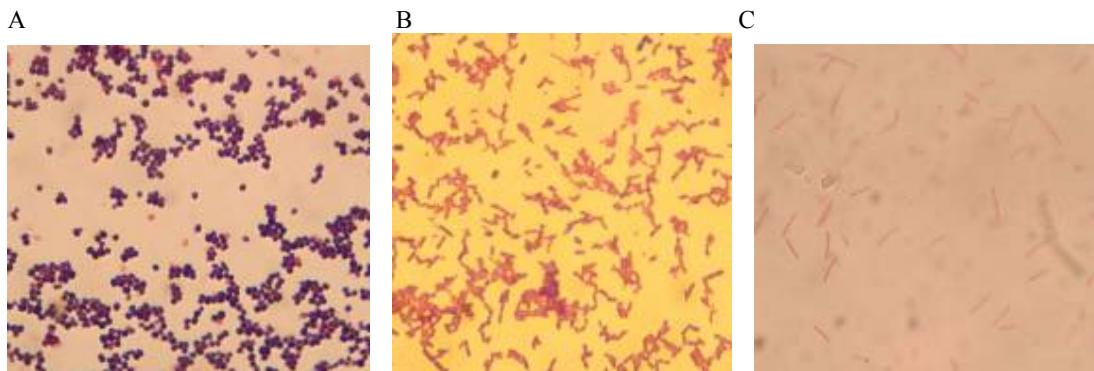
* Uporabili smo gojišče M17, ki omogoča rast vseh mezofilnih MKB, ker ni na voljo selektivnega gojišča za *Str. thermophilus*.

Komentar k preglednici 16:

Rezultati štetja KE na ploščah so pokazali, da je bilo v kapsulah Probiolex® premalo kultivabilnih bakterij. Izdelek ni bil ustrezan glede števila probiotičnih bakterij, čeprav je do konca roka uporabnosti manjkalo še eno leto in pol. Na gojiščih za *Lb. acidophilus* in za bifidobakterije (MRS+cly+cip in MRS+cys+mup) nismo zasledili vidnih kolonij, kar pomeni, da je bilo teh bakterij manj kot 10×10^3 KE/kapsulo. Kolonij *Lb. acidophilus* in bifidobakterij ni bilo tudi po nacepitvi koncentriranega izdelka (razredčitev 1:10). Pri pregledovanju kolonij z gojišča M17 in bakterijskih celic pod mikroskopom smo odkrili tako G+ palčke kakor tudi kokoidne bakterije. Rezultat dokazuje, da na gojišču M17 zrastejo različne mezofilne MKB in ne samo laktokoki in streptokoki, za katere je to gojišče sicer namenjeno.



Slika 21: *B. coagulans* na gojišču BHI; izdelek Probiolex® (kapsule)



Slika 22: Kolonija iz gojišča M17 (*Str. thermophilus*) pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvana po Gramu (A), Kolonija iz gojišča M17 (G+ palčke) pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvana po Gramu (B), *B. coagulans* pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvane po Gramu (C); izdelek Probiolex® (kapsule)

4.2.5 Probioplex® (prašek)

Preglednica 17: Rezultati štetja KE probiotičnih bakterij v izdelku Probioplex® (prašek), morfološkega opazovanja bakterijskih kolonij na gojiščih in bakterijskih celic pod mikroskopom (barvanje po Gramu)

Vrsta bakterij (gojišče)	Deklarirano število probiotičnih bakterij (CFU/vrečko)	Rezultati štetja bakterij (KE/vrečko)	Opis kolonij na gojiščih	Opis celic pod mikroskopom	Skladnost z deklaracijo
<i>Lb. acidophilus</i> (MRS+cly+cip)	$1,5 \times 10^9$	manj kot 10×10^3	bele, majhne, okrogle kolonije*	debelejše G+ palčke, kratke, daljše, posamezne, po dve skupaj, po tri skupaj	ne ustreza
<i>Lb. bulgaricus</i> (MRS, pH=5,2)		$2,8 \times 10^8$	majhne, bele, okrogle kolonije	dolge in kratke G+ palčke, posamezne, tanke	
<i>Bif. bifidum</i> (MRS+cys+mup)		manj kot 10×10^3	bele, majhne do srednje velike kolonije, različne oblike*	odebeljene, razvezjane G+ palčke (loparčki v obliku črke V in Y)	
<i>Str. thermophilus</i> oz. mezofilne MKB (M17, ink. pri 42 °C)**		2×10^8	velike, bele, okrogle kolonije	– ena kolonija: G+ koki v verižicah, v skupkih, posamezno, po dva ali tri skupaj – druga kolonija: G+ palčke, posamezne, kratke, dolge, debelejše	
<i>Lb. sporogenes</i> (= <i>B. coagulans</i>) (BHI, ink. pri 37 °C/3dni)		$3,6 \times 10^6$	velike, bele, okrogle kolonije	– ena kolonija: tanke, srednje dolge G+ palčke, posamezne – druga kolonija: G+ koki v skupkih, verižicah, po dva skupaj	
/		skupaj: $4,8 \times 10^8$	/	/	

Opombi k preglednici 17:

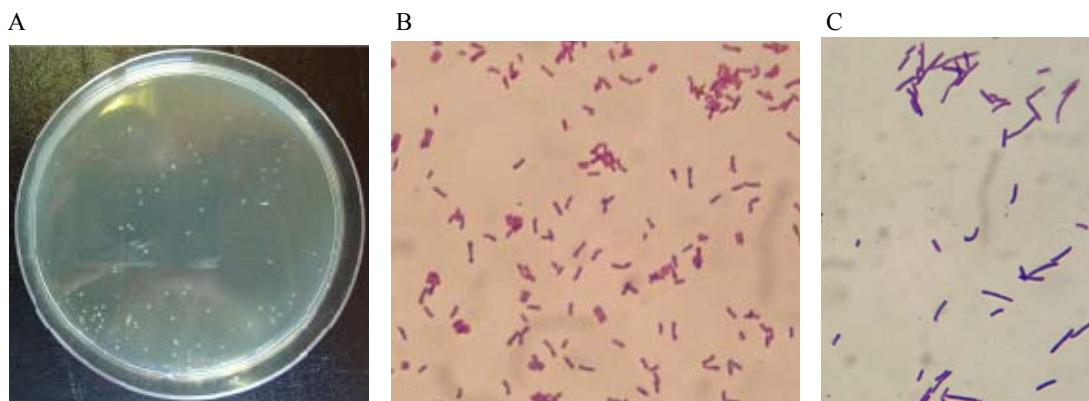
* Kolonije so zrasle na gojišču le, ko smo nacepili koncentriran izdelek (razredčitev 1:10).

** Uporabili smo gojišče M17, ki omogoča rast vseh mezofilnih MKB, ker ni na voljo selektivnega gojišča za *Str. thermophilus*.

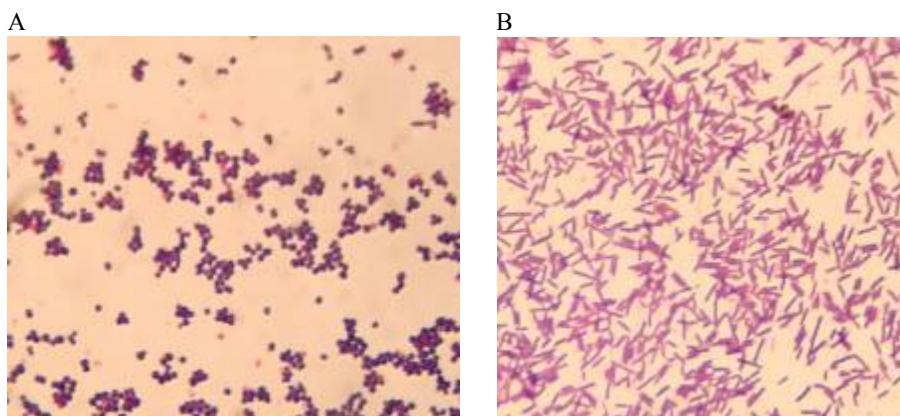
Komentar k preglednici 17:

Na gojiščih za *Lb. acidophilus* in za bifidobakterije (MRS+cly+cip in MRS+cys+mup) je zraslo manj kot 10×10^3 KE/vrečko, vseh bakterij pa je bilo približno polovico od deklarirane koncentracije, kar pomeni, da izdelek ni bil ustrezен glede števila probiotičnih bakterij. Število KE je bilo premajhno, čeprav je bila analiza opravljena leto pred iztekom roka uporabnosti. Na gojiščih M17 in BHI so rasle poleg pričakovanih kolonij *Str.*

thermophilus (M17) in *B. coagulans* (BHI) tudi druge bakterije, kar ni presenetljivo, saj gojišči nista selektivni.



Slika 23: *Lb. bulgaricus* na gojišču MRS (pH=5,2) (A), *Bif. bifidum* pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvane po Gramu (B), *Lb. acidophilus* pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvane po Gramu (C); izdelek Probiolex® (prašek)



Slika 24: Kolonija iz gojišča M17 (*Str. thermophilus*) pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvana po Gramu (A), Kolonija iz gojišča M17 (G+ palčke) pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvana po Gramu (B); izdelek Probiolex® (prašek)

Ker smo predvidevali, da so MO poimenovani kot *Lb. sporogenes* dejansko spore vrste *B. coagulans*, smo vzorec toplotno obdelali (pri 80 °C 10 minut), da bi tako inaktivirali vegetativne celice in se prepričali, če so v izdelku res spore.

Preglednica 18: Število KE *B. coagulans* v probiotičnem izdelku Probiolex® (prašek) po termični obdelavi na 80 °C/10 minut

Gojišče (način nanosa vzorca na gojišče)	Temperatura in čas ink.	Rezultati štetja bakterij po ink. (KE/vrečko)	Opis kolonij na gojiščih	Opis celic pod mikroskopom
PCA (razmaz)	37 °C in 42 °C/2 dni	– pri 37 °C: neštevno – pri 42 °C: neštevno	– pri 37 °C (razmaz): velike in majhne, okrogle, bele kolonije – pri 37 °C (vmešavanje): majhne in velike, okrogle, bele kolonije	– pri 37 °C: daljše, krajše, srednje debele G+ palčke, posamezne, po dve skupaj – pri 42 °C, (razmaz): velike, bele, okrogle kolonije
PCA (vmešavanje)	37 °C in 42 °C/2 dni	– pri 37 °C: $2,1 \times 10^6$ – pri 42 °C: $2,0 \times 10^6$	– pri 42 °C (vmešavanje): velike in majhne okrogle, bele kolonije	– pri 42 °C: daljše, krajše, srednje debele G+ palčke, posamezne, po dve skupaj

Komentarji k preglednici 18:

- Na gojišču PCA je bilo pri razmazovanju veliko več kolonij (neštevno).
- Temperatura inkubacije ni imela vpliva na izrasle kolonije na gojišču PCA.
- Po topotni obdelavi vzorca smo ugotovili, da so v izdelku res prisotne spore.



Slika 25: *B. coagulans* na gojišču PCA (vmešavanje) pri temperaturi ink. 42 °C (C); izdelek Probiolex® (prašek)

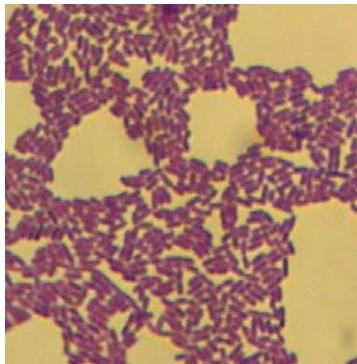
4.2.6 Bion® Transit (kapsule)

Preglednica 19: Rezultati štetja KE probiotičnih bakterij v izdelku Bion® Transit (kapsule) morfološkega opazovanja bakterijskih kolonij na gojiščih in bakterijskih celic pod mikroskopom (barvanje po Gramu)

Vrsta bakterij (gojišče)	Deklarirano število probiotičnih bakterij (probiotične kulture/kapsulo)	Rezultat štetja bakterij (KE/kapsulo)	Opis kolonij na gojiščih	Opis celic pod mikroskopom	Skladnost z deklaracijo
<i>Lb. plantarum</i> (MRS)	10^{10}	$3,8 \times 10^9$	okrogle, velike, bele kolonije	kratke, debele G+ palčke, posamezne, po dve skupaj	ne ustreza

Komentar k preglednici 19:

Rezultat štetja KE bakterij vrste *Lb. plantarum* na ploščah je bil nekoliko manjši od deklariranega števila, kar pomeni, da izdelek ni bil popolnoma ustrezan glede števila probiotičnih bakterij, čeprav je bil pregledan leto dni pred iztekom roka uporabnosti. Izgled kolonij na gojiščih in bakterijskih celic pod mikroskopom je kazal na to, da gre za bakterije rodu *Lactobacillus*.



Slika 26: *Lb. plantarum* pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvane po Gramu; izdelek Bion® Transit (kapsule)

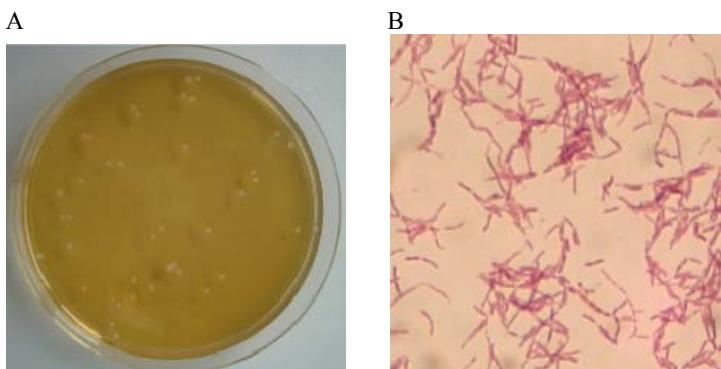
4.2.7 Bion® 3 Juniors (tablete)

Preglednica 20: Rezultati štetja KE probiotičnih bakterij v izdelku Bion® 3 Juniors (tablete), morfološkega opazovanja bakterijskih kolonij na gojiščih in bakterijskih celic pod mikroskopom (obarvanje po Gramu)

Vrsta bakterij (gojišče)	Deklarirano število probiotičnih bakterij (probiotiki/tableto)	Rezultati štetja bakterij (KE/tableto)	Opis kolonij na gojiščih	Opis celic pod mikroskopom	Skladnost z deklaracijo
<i>Lb. gasseri</i> (MRS+cly+cip)	10^7	$4,3 \times 10^6$	bele, okrogle kolonije	debeljše G+ palčke, krajše, daljše, posamezne, po dve skupaj, v verižicah	ne ustreza
<i>Bif. bifidum</i> in <i>Bif. longum</i> (MRS+cys+mup)		$2,2 \times 10^4$	bele, okrogle kolonije	odebeljene G+, razvezjane palčke (v obliki črk V in Y, loparčki)	
skupaj: $4,3 \times 10^6$					
za skupno število bakterij (MRS)	/	$3,4 \times 10^6$	bele, okrogle kolonije	debeljše G+ palčke, krajše, daljše, posamezne, po dve skupaj, v verižicah, nekatere tudi bolj tanke G+ palčke	

Komentar k preglednici 20:

Rezultati štetja KE na ploščah niso dosegli deklariranih koncentracij, torej izdelek ni bil ustrezen glede števila probiotičnih bakterij. Na podlagi pregledovanja kolonij na ploščah in bakterijskih celic pod mikroskopom smo sklepali, da gre za deklarirana rodova bakterij, saj so pod mikroskopom imele vse bakterijske vrste značilno obliko, velikost in obarvanje po Gramu. Na gojišču MRS, kjer rastejo tako laktobacili kakor tudi bifidobakterije, smo dobili podoben rezultat, podoben vsoti števil na posameznih selektivnih gojiščih, kar potrjuje točnost štetja.



Slika 27: *Lb. gasseri* na gojišču MRS+cly+cip (A), *Lb. gasseri* pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvane po Gramu (B); izdelek Bion® 3 Juniors (tablete)

4.2.8 BioGaia® (kapljice)

Preglednica 21: Rezultati štetja KE probiotičnih bakterij v izdelku BioGaia® (kapljice), morfološkega opazovanja bakterijskih kolonij na gojiščih in bakterijskih celic pod mikroskopom (obarvanje po Gramu)

Vrsta bakterij (gojišče)	Deklarirano število probiotičnih bakterij (žive aktivne bakterije/5 kapljic)	Rezultat štetja bakterij (KE/5 kapljic)	Opis kolonij na gojiščih	Opis celic pod mikroskopom	Skladnost z deklaracijo
<i>Lb. reuteri</i> Protectis (MRS)	10^8	$2,4 \times 10^7$	bele, okrogle kolonije	kratke, zelo debele G+ palčke, posamezne, po dve skupaj, tudi v verižicah	ne ustreza

Komentar k preglednici 21:

Rezultat štetja KE na ploščah se ni ujemal (za manj kot za eno log enoto) z deklariranim številom *Lb. reuteri* Protectis, čeprav je bilo do konca roka uporabe še deset mesecev. Izdelek ni bil ustrezan kar zadeva število probiotičnih bakterij. Po morfologiji kolonij in bakterijskih celic (oblika, velikost, obarvanje po Gramu, združevanje celic) smo sklepali, da gre za deklariran rod bakterij, saj so pod mikroskopom imele bakterijske celice značilno obliko, velikost in obarvanje po Gramu.



Slika 28: *Lb. reuteri* na gojišču MRS; izdelek BioGaia® (kapljice)

4.2.9 WAYA® AD (prašek)

Preglednica 22: Rezultati štetja KE probiotičnih bakterij v izdelku WAYA® AD (prašek), morfološkega opazovanja bakterijskih kolonij na gojiščih in bakterijskih celic pod mikroskopom (barvanje po Gramu)

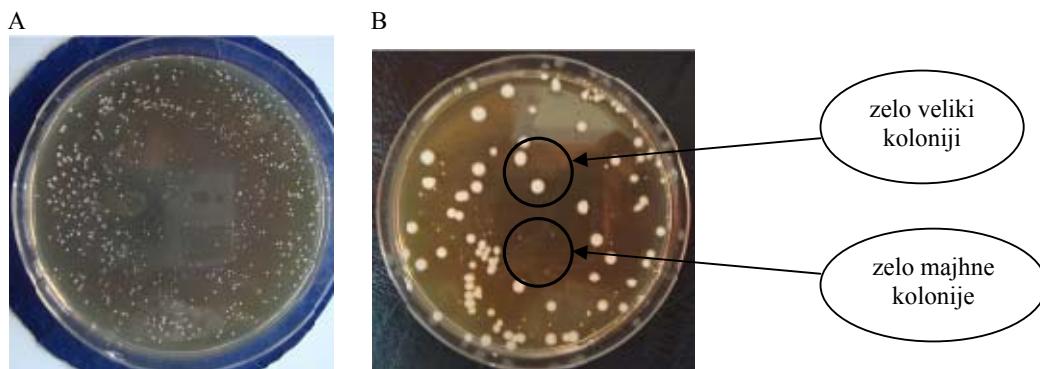
Vrsta bakterij (gojišče)	Deklarirano število probiotičnih bakterij (žive probiotične bakterije/vrečko)*	Rezultati štetja bakterij (KE/vrečko)*	Opis kolonij na gojiščih	Opis celic pod mikroskopom	Skladnost z deklaracijo
<i>Lb. acidophilus</i> (MRS+cly+cip)	5×10^9	$5,9 \times 10^8$	velike in zelo majhne, bele, okrogle kolonije	– velika kolonija: debele, kratke G+ palčke, večinoma posamezne, tudi po dve ali po tri skupaj – majhna kolonija: G+ koki in G+ palčke	ne ustreza
<i>Lb.casei</i> in <i>Lb. plantarum</i> (MRS, ink. pri 30 °C)		$1,5 \times 10^9$	velike in zelo majhne, bele, okrogle kolonije	velika in majhna kolonija: kratke, debele G+ palčke, posamezne, po dve skupaj	
<i>Lb. rhamnosus</i> in <i>Lb. salivarius</i> (MRS, ink. pri 37 °C)		$1,1 \times 10^9$	velike in zelo majhne, bele, okrogle kolonije	– velika kolonija: krajše, daljše, srednje debele G+ palčke, posamezne, po dve skupaj – majhna kolonija: kratke, zelo debele G+ palčke, posamezne, po dve skupaj	
<i>Bif. bifidum</i> (MRS+cys+mup)		$2,9 \times 10^8$	večje in manjše, bele, okrogle kolonije	velika in majhna kolonija: mešanica odebelenih in razvezanih G+ palčk (loparčki,, v obliki črk V in Y) in G+ palčk (laktobacili); lahko vmes prisotni celo G+ koki	
<i>Lc. lactis</i> (M17)		$9,7 \times 10^8$	velike in majhne, bele, okrogle kolonije	velika in majhna kolonija: okrogle G+ koki, posamezni, po dva skupaj, v skupkih	
/		skupaj: $3,5 \times 10^9$	/	/	

Opomba k preglednici 22:

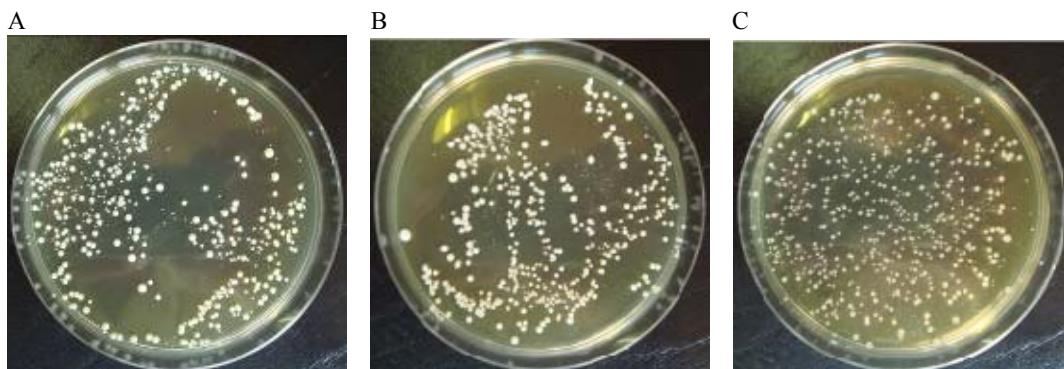
* Na gojiščih je bilo mogoče razlikovati velike in majhne kolonije; pri štetju pa smo upoštevali oboje.

Komentar k preglednici 22:

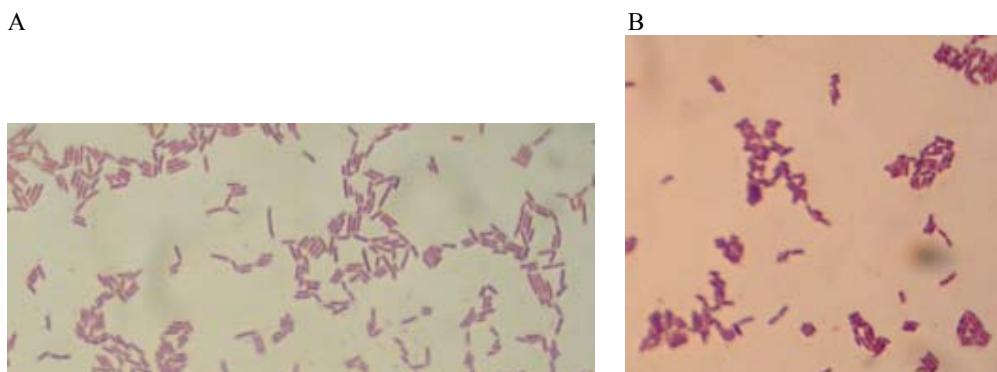
Vsota preštetih KE na različnih gojiščih je bila le malo manjša od deklarirane koncentracije. Glede na to, da gojišči M17 in MRS nista zelo selektivni, so bakterije posameznih vrst lahko zrasle na več gojiščih. To se je tudi pokazalo pri pregledovanju pod mikroskopom. Tudi na gojiščih za *Lb. acidophilus* in za bifidobakterije je zraslo nekaj kolonij drugih rodov bakterij. Zaključimo lahko, da je bil zaradi tega rezultat štetja precenjen, tako da izdelek gotovo ni vseboval zadostno število probiotičnih bakterij, pri tem pa so bile analize opravljene leto in pol pred pretekom roka uporabnosti. Pri opazovanju kolonij na gojišču MRS pri temperaturi inkubacije 37 °C smo opazili dva morfološka tipa kolonij, ki jih je bilo mogoče zlahka razlikovati med seboj, saj so bile nekatere kolonije zelo velike, druge zelo majhne. Na podlagi opazovanja celic pod mikroskopom smo sklepali, da gre za dve različni vrsti laktobacilov (velika kolonija je predstavljala krajše, daljše, srednje debele G+ palčke; majhna kolonija pa kratke in zelo debele G+ palčke), ne moremo pa trditi, da gre za vrsti, ki naj bi zrasli na omenjenem gojišču (*Lb. salivarius* in *Lb. rhamnosus*). Iz tega lahko potrdimo samo, da gre za rod *Lactobacillus*.



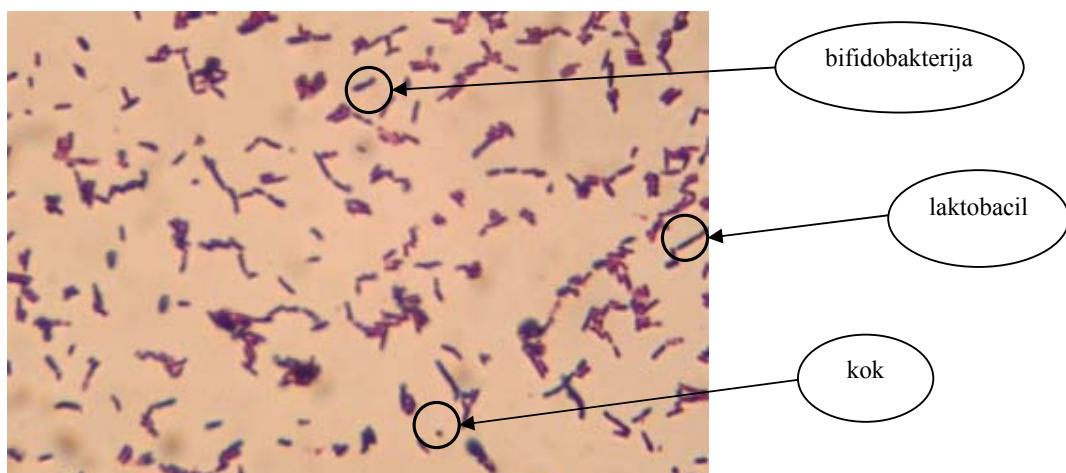
Slika 29: *Bif. bifidum* na gojišču MRS+cys+mup (A), *Lb. acidophilus* na gojišču MRS+cly+cip (B); izdelek WAYA® AD (prašek)



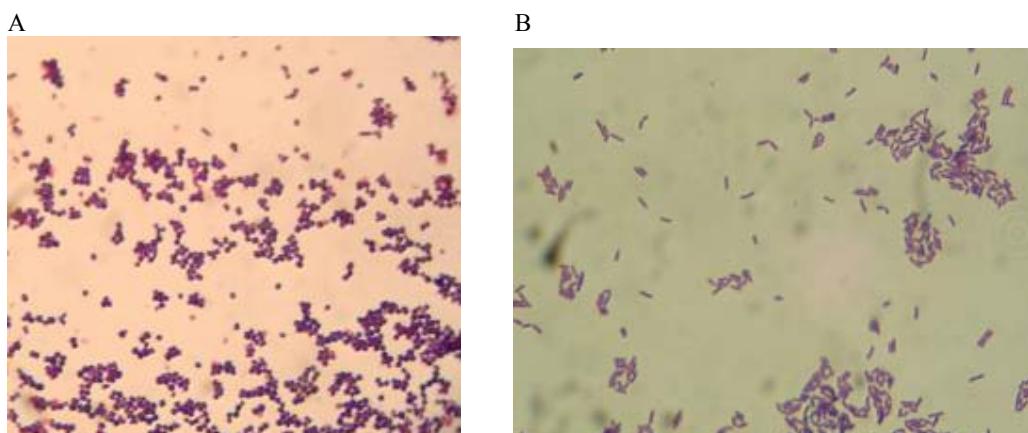
Slika 30: *Lb. casei* in *Lb. plantarum* na gojišču MRS pri temperaturi ink. 30 °C (A), *Lb. rhamnosus* in *Lb. salivarius* na gojišču MRS pri temperaturi ink. 37 °C (B), *Lc. lactis* na gojišču M17 (C); izdelek WAYA® AD (prašek)



Slika 31: Velika kolonija iz gojišča MRS pri temperaturi ink. 37 °C (laktobacili) pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvana po Gramu (A), Majhna kolonija iz gojišča MRS pri temperaturi ink. 37 °C (laktobacili) pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvana po Gramu (B); izdelek WAYA® AD (prašek)



Slika 32: *Bif. bifidum* pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvane po Gramu; izdelek WAYA® AD (prašek)



Slika 33: *Lc. lactis* pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvane po Gramu (A), *Lb. casei* in *Lb. plantarum* pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvane po Gramu (B); izdelek WAYA® AD (prašek)

4.2.10 WAYA® AB (prašek)

Preglednica 23: Rezultati štetja KE probiotičnih bakterij v izdelku WAYA® AB (prašek), morfološkega opazovanja bakterijskih kolonij na gojiščih in bakterijskih celic pod mikroskopom (barvanje po Gramu)

Vrsta bakterij (gojišče)	Deklarirano število probiotičnih bakterij (KE živih probiotičnih kultur/vrečko)	Rezultati štetja bakterij (KE/vrečko)*	Opis kolonij na gojiščih	Opis celic pod mikroskopom	Skladnost z deklaracijo
<i>Lb. acidophilus</i> (MRS+cly+cip)	5×10^9	$1,6 \times 10^9$	velike in majhne, bele, okrogle kolonije	– velika kolonija: debele, kraje, daljše G+ palčk, posamezne, po dve skupaj – majhna kolonija: mešanica G+ kokov in tanjših, debelejših, daljših, krajih G+ palčk, posamezne, po dve skupaj, v verižicah	ustreza
<i>Lb. paracasei</i> in <i>Lb. plantarum</i> (MRS, ink. pri 30 °C)		$3,5 \times 10^9$	velike in majhne, bele, okrogle kolonije	– velika kolonija: kratke, debele G+ palčke, posamezne, po dve ali tri skupaj – majhna kolonija: G+ koki	
<i>Lb.rhamnosus</i> in <i>Lb. salivarius</i> (MRS, ink. pri 37 °C)		$4,9 \times 10^9$	velike in majhne, bele, okrogle kolonije	– velika kolonija: kraje, daljše, debele G+ palčke, posamezne, po dve ali tri skupaj – majhna kolonija: mešana kultura G+ kokov in G+ palčk	
<i>Bif. bifidum</i> in <i>Bif. lactis</i> (MRS+cys+mup)		$9,6 \times 10^8$	večje in manjše, bele, okrogle kolonije	velika in majhna kolonija: mešana kultura odebelenih G+, razvejanih palčk (loparčki, v obliki črk V in Y) in G+ palčk (laktobacili)	
<i>Ent. faecium</i> (CATC)		$1,1 \times 10^9$	večje kolonije so imele rdeč center oz. cono, manjše pa ne	velika in majhna kolonija: okrogl G+ koki, posamezni, po dva skupaj, v skupkih, v verižicah	
/		skupaj: $1,2 \times 10^{10}$	/	/	

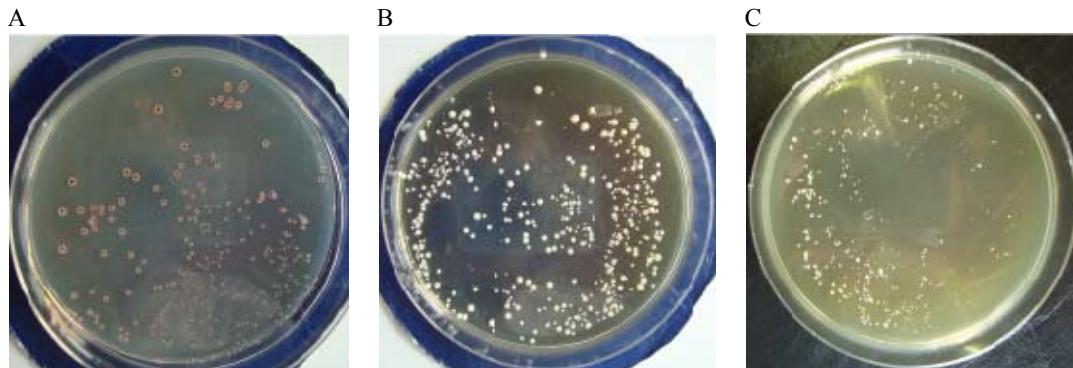
Opomba k preglednici 23:

* Na gojiščih je bilo mogoče razlikovati velike in majhne kolonije; pri štetju pa smo upoštevali oboje.

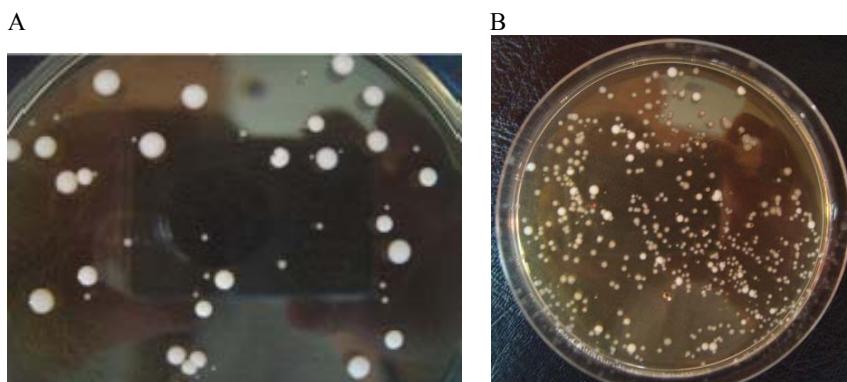
Komentar k preglednici 23:

V izdelku WAYA® AB (prašek) je skupno število bakterij, ki smo ga ugotovili s seštevanjem KE, zraslih na različnih gojiščih, preseglo deklarirano število bakterij, zato lahko zaključimo, da je bila deklaracija ustrezna, kar zadeva število probiotičnih bakterij. Potrebno pa je upoštevati, da je bilo dejansko skupno število verjetno malo manjše, saj so vsaj nekatere vrste zelo verjetno zrasle na več kot enem gojišču (npr. *Lb. acidophilus* in *Ent. faecium* na gojišču MRS brez antibiotikov). Dejansko smo opazili manjše število kokov tudi na gojiščih MRS in MRS+cly+cip ter laktobacile tudi na gojišču za bifidobakterije. Pri pregledovanju kolonij na gojiščih in bakterijskih celic pod mikroskopom (oblika, velikost, obarvanje po Gramu) smo opazili naslednje:

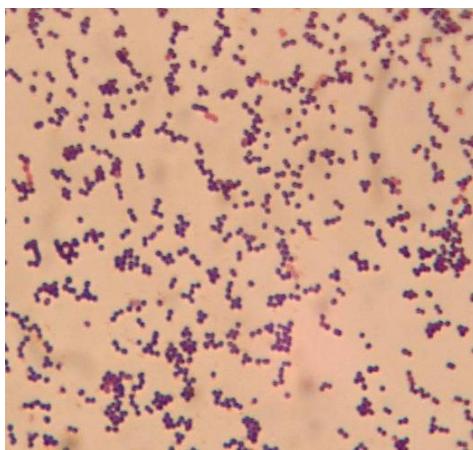
- Pri mikroskopskih preparatih z *Lb. acidophilus* ter z *Lb. rhamnosus* in *Lb. salivarius* smo zasledili tudi manjše število kokov.
- Pri pregledovanju kolonij z gojišča za štetje *Lb. paracasei* in *Lb. plantarum* smo opazili tudi manjše kolonije kokov.
- Pri preparatu z bifidobakterijami smo zelo verjetno naleteli tudi na laktobacile.



Slika 34: *Ent. faecium* na gojišču CATC (A), *Lb. paracasei* in *Lb. plantarum* na gojišču MRS pri temperaturi ink. 30 °C (B), *Bif. bifidum* in *Bif. lactis* na gojišču MRS+cys+mup (C); izdelek WAYA® AB (prašek)



Slika 35: *Lb. rhamnosus* in *Lb. salivarius* na gojišču MRS pri temperaturi ink. 37 °C (A), *Lb. acidophilus* na gojišču MRS+cly+cip (B); izdelek WAYA® AB (prašek)



Slika 36: *Ent. faecium* pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvane po Gramu; izdelek WAYA® AB (prašek)

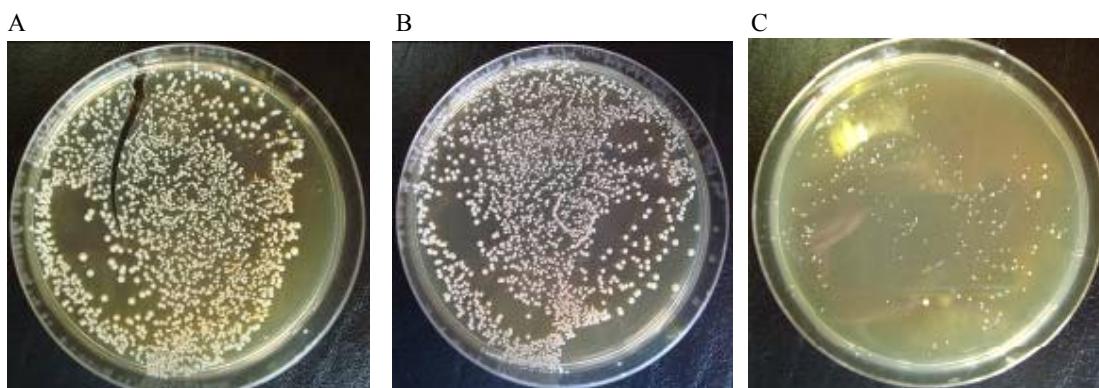
4.2.11 WAYA® IT (prašek)

Preglednica 24: Rezultati štetja KE probiotičnih bakterij v izdelku WAYA® IT (prašek), morfološkega opazovanja bakterijskih kolonij na gojiščih in bakterijskih celic pod mikroskopom (barvanje po Gramu)

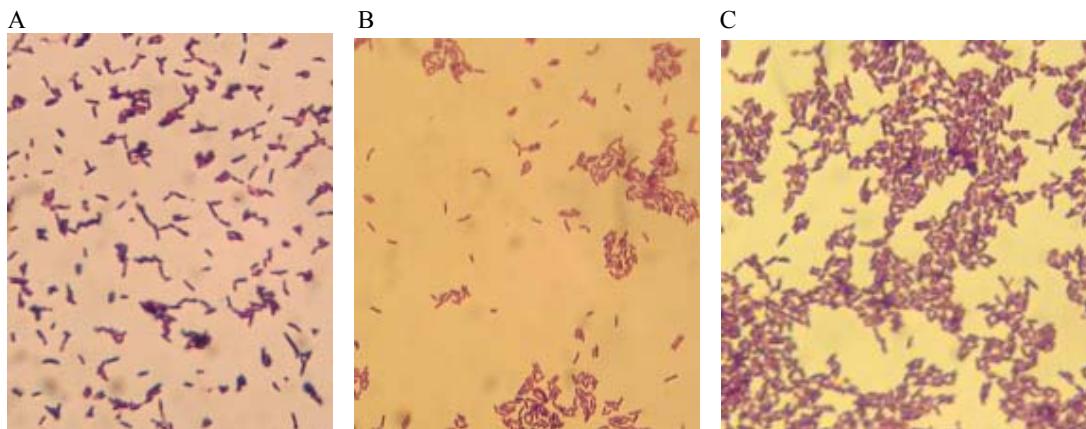
Vrsta bakterij (gojišče)	Deklarirano število probiotičnih bakterij (žive probiotične bakterije/vrečko)	Rezultati štetja bakterij (KE/vrečko)	Opis kolonij na gojiščih	Opis celic pod mikroskopom	Skladnost z deklaracijo
<i>Lb. casei</i> in <i>Lb. plantarum</i> (MRS, ink. pri 30 °C)	4×10^9	$7,6 \times 10^8$	večje in manjše, okrogle bele kolonije	velika in majhna kolonija: bolj kratke, debele G+ palčke, posamezne, po dve skupaj	ne ustreza
<i>Lb. rhamnosus</i> (MRS, ink. pri 37 °C)		$2,2 \times 10^8$	večje in manjše, okrogle bele kolonije	velika in majhna kolonija: debele, malo daljše G+ palčke, posamezne, po dve skupaj	
<i>Bif. bifidum</i> , <i>Bif. longum</i> in <i>Bif. lactis</i> (MRS+cys+mup)		$9,3 \times 10^8$	večje in manjše, okrogle bele kolonije	velika in majhna kolonija: mešana kultura odebelenih G+ palčk (bifidobakterije) in G+ palčk (laktobacili)	
/		skupaj: $1,9 \times 10^9$	/	/	

Komentar k preglednici 24:

Rezultati štetja KE, ki smo jih dobili tako, da smo sešteli število KE z različnih gojišč, so bili manjši od deklariranega, čeprav je bil rok uporabe še eno leto in osem mesecev. Upoštevati moramo tudi, da vrst *Lb. casei*, *Lb. plantarum* in *Lb. rhamnosus* ni mogoče zelo zanesljivo ločiti s pomočjo inkubiranja pri različnih temperaturah, tako da so verjetno posamezne bakterije teh vrst zrasle pri obeh temperaturah, posledica tega pa je malo precenjeno število laktobacilov. Nekaj kolonij z gojišča za bifidobakterije je po morfoloških lastnostih bolj spominjalo na laktobacile kot na bifidobakterije. Na gojišču MRS smo opazili samo laktobacile, ne pa bifidobakterij.



Slika 37: *Lb. casei* in *Lb. plantarum* na gojišču MRS pri temperaturi ink. 30 °C (A), *Lb. rhamnosus* na gojišču MRS pri temperaturi ink. 37 °C (B), *Bif. bifidum*, *Bif. longum* in *Bif. lactis* na gojišču MRS+cys+mup (C); izdelek WAYA® IT (prašek)



Slika 38: *Bif. bifidum*, *Bif. longum* in *Bif. lactis* pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvane po Gramu (A), *Lb. rhamnosus* pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvane po Gramu (B), *Lb. casei* in *Lb. plantarum* pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvane po Gramu (C); izdelek WAYA® IT (prašek)

4.2.12 LYOLACT® (kapsule)

Preglednica 25: Rezultati štetja KE probiotičnih bakterij v izdelku LYOLACT® (kapsule), morfološkega opazovanja bakterijskih kolonij na gojiščih in bakterijskih celic pod mikroskopom (barvanje po Gramu)

Vrsta bakterij (gojišče)	Deklarirano število probiotičnih bakterij (žive probiotične bakterije/kapsulo)	Rezultati štetja bakterij (KE/kapsulo)	Opis kolonij na gojiščih	Opis celic pod mikroskopom	Skladnost z deklaracijo
<i>Lb. gasseri</i> (MRS+cly+cip)	10^{10}	$7,3 \times 10^7$	večje in manjše, okrogle, bele kolonije	velika in majhna kolonija: daljše, krajše, srednje debele G+ palčke, povezane v verižice, nekatere tudi po dve ali tri skupaj, zelo redko posamezne	ne ustreza
<i>Lb. bulgaricus</i> (MRS, pH=5,2)		$7,5 \times 10^7*$	zelo velike in zelo majhne, okrogle, bele kolonije	– velika kolonija: daljše, krajše, srednje debele G+ palčke, povezane v verižice, nekatere po dve ali tri skupaj, zelo redko posamezne – majhna kolonija: G+ koki, v verižicah, skupkih, po dva ali tri skupaj, redko posamezni	
<i>Str. thermophilus</i> oz. mezofilne MKB (M17, ink. pri 37 °C)***		$2,4 \times 10^7$ **	velike sluzaste okrogle, bele kolonije in majhne, okrogle, bele kolonije	– velika kolonija: G+ koki, posamezni, po dva skupaj, v skupkih, verižicah – majhna kolonija: zelo dolge, tanke verižice G+ palčk (laktobacili)	
/		skupaj: $1,7 \times 10^8$	/	/	

Opombe k preglednici 25:

* Pri štetju smo upoštevali samo velike kolonije, ker so manjše predstavljale koke.

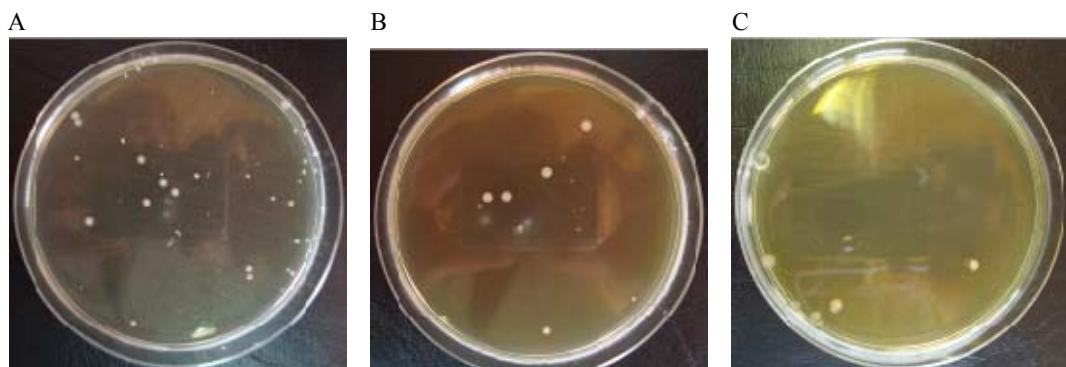
** Pri štetju smo upoštevali samo velike kolonije, ker so manjše predstavljale G+ palčke.

*** Uporabili smo gojišče M17, ki omogoča rast vseh mezofilnih MKB, ker ni na voljo selektivnega gojišča za *Str. thermophilus*.

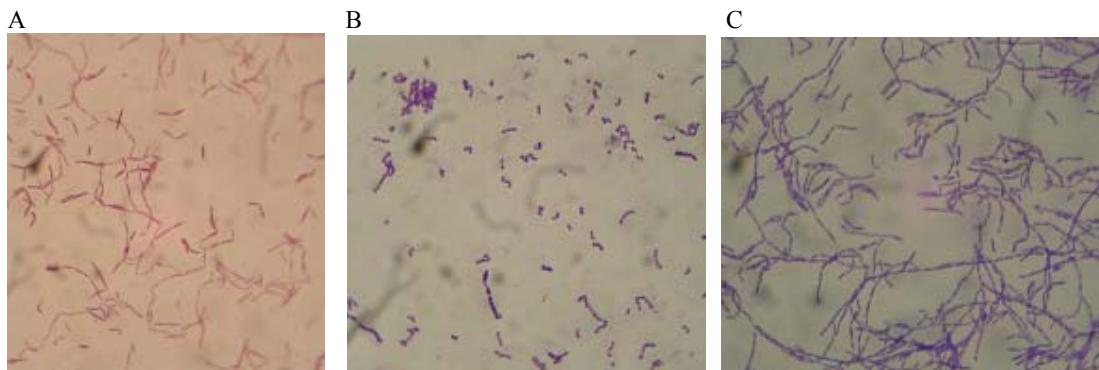
Komentar k preglednici 25:

Rezultati štetja bakterij na ploščah se niso ujemali z deklariranim številom probiotičnih bakterij, pač pa so bili veliko nižji, čeprav je do konca roka uporabe manjkalo še enajst mesecev. Ko smo pregledovali kolonije na gojiščih in bakterijske celice pod mikroskopom (oblika, velikost, obarvanje po Gramu) smo naleteli na nepravilnosti:

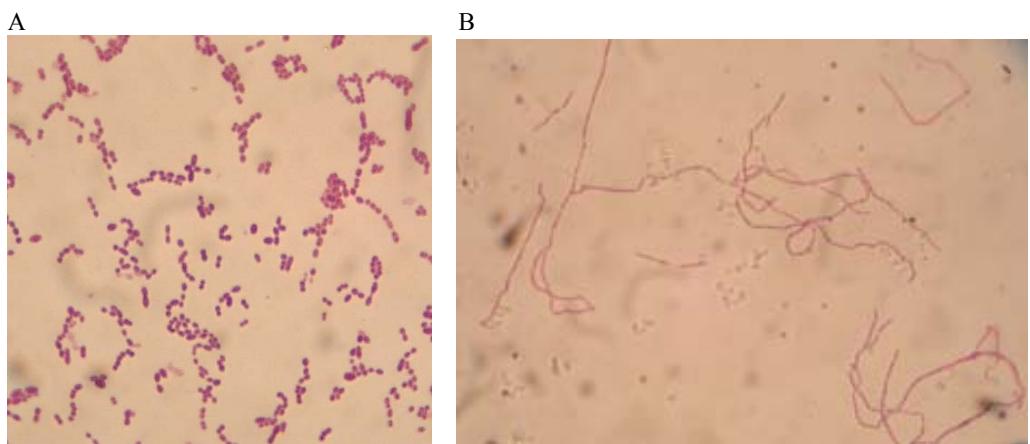
- Na gojišču MRS (pH=5,2) za *Lb. bulgaricus* so razen laktobacilov zrasle tudi kolonije kokov. Ker je bilo mogoče kolonije kokov (manjše) po velikosti zanesljivo ločevati od kolonij laktobacilov, njihova prisotnost ni povzročila napak pri štetju.
- Tudi na gojišču M17 so razen velikih kolonij (streptokoki) zrasle tudi manjše (laktobacili). Teh nismo šteli.



Slika 39: *Lb. bulgaricus* na gojišču MRS (pH=5,2) (A), *Lb. gasseri* na gojišču MRS+cly+cip (B), *Str. thermophilus* na gojišču M17 (C); izdelek LYOLACT® (kapsule)



Slika 40: *Lb. gasseri* pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvane po Gramu (A), Manjša kolonija iz gojišča MRS (pH=5,2) (kok) pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvana po Gramu (B), Večja kolonija iz gojišča MRS (pH=5,2) (*Lb. bulgaricus*) pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvana po Gramu (C); izdelek LYOLACT® (kapsule)



Slika 41: Večja kolonija iz gojišča M17 (*Str. thermophilus*) pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvana po Gramu (A), Manjša kolonija iz gojišča M17 (laktobacili) pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvana po Gramu (B); izdelek LYOLACT® (kapsule)

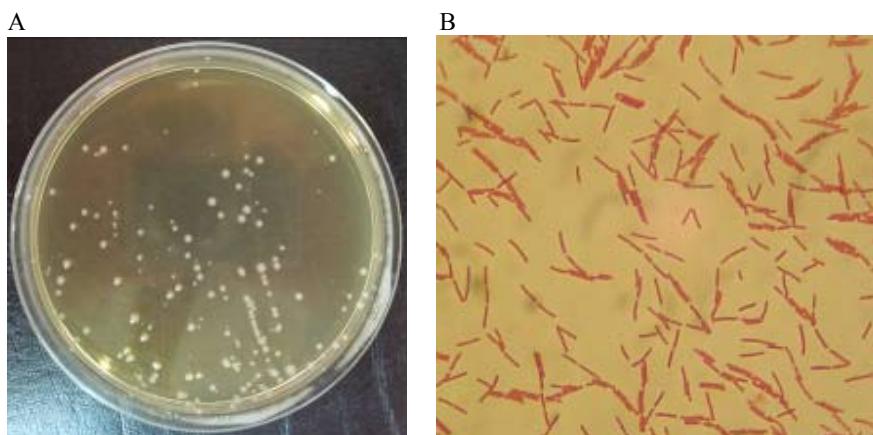
4.2.13 ^{NEO®}Fermental_{MAX} (suspenzija)

Preglednica 26: Rezultati štetja KE probiotičnih bakterij v izdelku ^{NEO®}Fermental_{MAX} (suspenzija), morfološkega opazovanja bakterijskih kolonij na gojiščih in bakterijskih celic pod mikroskopom (barvanje po Gramu)

Vrsta bakterij (gojišče)	Deklarirano število probiotičnih bakterij (spore <i>B. coagulans</i> /stekl.)	Rezultati štetja bakterij (KE/stekl.)	Opis kolonij na gojiščih	Opis celic pod mikroskopom	Skladnost z deklaracijo
<i>B. coagulans</i> (BHI)	2×10^9	-brez topotne obdelave (ink.: 37 °C/2 dni): $2,9 \times 10^6$ -pred topotno obdelavo (ink.: 37°C/4 dni): $8,4 \times 10^8$ -po topotni obdelavi (ink.: 37 °C/4 dni): $1,2 \times 10^8$	velike in majhne, bele, okrogle kolonije	debele, daljše, krajše G+ palčke, posamezne, po dve skupaj, tudi v verižicah	ne ustreza

Komentar k preglednici 26:

Število spor, zraslih po dveh dneh inkubacije pri 37 °C (standardni pogoji za rod *Bacillus*), je bilo za ta izdelek nižje od deklariranega (za približno tri log enote). Za dva dni podaljšana inkubacija je znatno pozitivno prispevala k številu KE, ki pa je bilo še vedno malo manjše od deklariranega (42 % deklariranega). Topotna obdelava spor ni toliko vplivala na izraslo število KE, kot čas inkubacije petrijevih plošč. Še več, po topotni obdelavi je v tem primeru zraslo celo nekoliko manjše število KE. Na podlagi morfologije kolonij in celic smo sklepali, da gre za deklarirano vrsto bakterij, saj so pod mikroskopom imele bakterijske celice značilno obliko, velikost in obarvanje po Gramu.



Slika 42: *B. coagulans* na gojišču BHI (A), *B. coagulans* pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvane po Gramu (B); izdelek ^{NEO®}Fermental_{MAX} (suspenzija)

4.2.14 ^{NEO®}Fermental_{MAX} (kapsule)

Preglednica 27: Rezultati štetja KE probiotičnih bakterij v izdelku ^{NEO®}Fermental_{MAX} (kapsule), morfološkega opazovanja bakterijskih kolonij na gojiščih in bakterijskih celic pod mikroskopom (barvanje po Gramu)

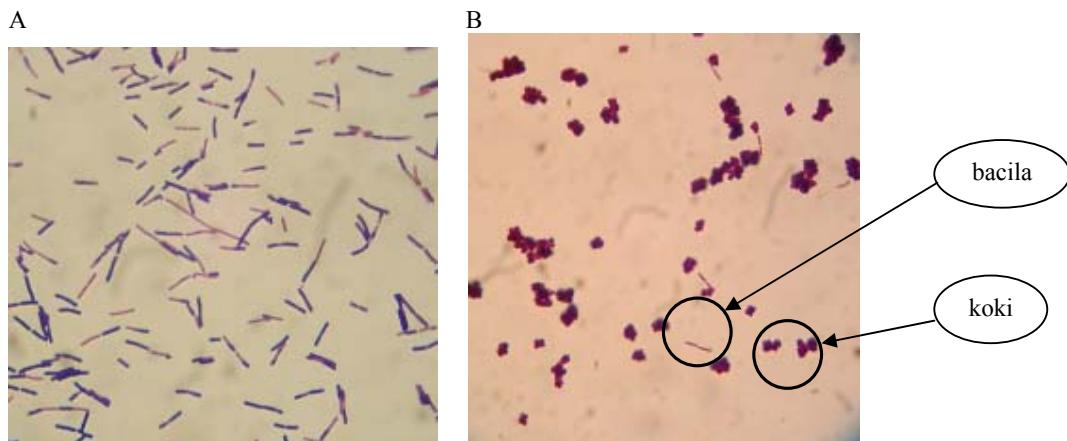
Vrsta bakterij (gojišče)	Deklarirano število probiotičnih bakterij (spore <i>B. coagulans</i> /kapsulo)	Rezultati štetja bakterij (KE/kapsulo)	Opis kolonij na gojiščih	Opis celic pod mikroskopom	Skladnost z deklaracijo
<i>B. coagulans</i> (BHI)	2×10^9	<ul style="list-style-type: none"> – brez topotne obdelave (ink.: 37 °C/2 dni): $1,2 \times 10^7$ – pred topotno obdelavo (ink.: 37 °C/4 dni): $1,7 \times 10^9$ – po topotni obdelavi (ink.: 37 °C/4 dni): $2,4 \times 10^9$ 	večje in manjše, bele, okrogle kolonije	<ul style="list-style-type: none"> – velika kolonija: mešana kultura G+ palčk (posamezne, po dve skupaj) in G+ kokov (v skupkih) – majhna kolonija: srednje debele G+ palčke, krajše, daljše, posamezne, po dve skupaj, tudi v verižicah 	ustreza

Komentar k preglednici 27:

Število spor, zraslih po dveh dneh inkubacije pri 37 °C (standardni pogoji za rod *Bacillus*), je za omenjen izdelek nižje od deklariranega (za približno dve log enoti). Zato smo podaljšali inkubacijo plošč še za dva dni, pri čemer je število zraslih kolonij naraslo. Če smo izdelek pred nacepljanjem tudi termično obdelali, je bilo prešteto število KE večje od deklariranega, kar kaže na ustrezost glede deklaracije. Vendar pa topotna obdelava v našem primeru ni imela bistvenega vpliva na število izraslih kolonij (pred topotno obdelavo $1,7 \times 10^9$ KE/kapsulo, po topotni obdelavi pa $2,4 \times 10^9$ KE/kapsulo). Poleg pričakovanih paličastih bakterij smo pri mikroskopskem opazovanju odkrili tudi manjše število kokov, ki pa v izdelku niso deklarirani.



Slika 43: *B. coagulans* na gojišču BHI; izdelek ^{NEO®}Fermental_{MAX} (kapsule)



Slika 44: Manjša kolonija iz gojišča BHI (bacili) pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvana po Gramu (A), Večja kolonija iz gojišča BHI (bacili in kokci) pod mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, obarvana po Gramu (B); izdelek ^{NEO®}Fermental_{MAX} (kapsule)

4.2.15 Povzetek rezultatov o ugotavljanju ustreznosti koncentracije probiotičnih bakterij v prehranskih dopolnilih

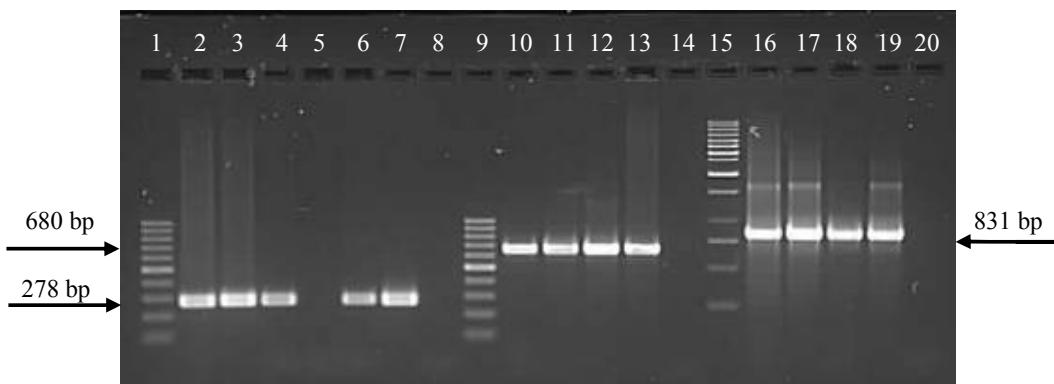
Preglednica 28: Zbrani rezultati štetja probiotičnih bakterij v različnih probiotičnih prehranskih dopolnilih

Izdelek	Deklarirano število probiotičnih bakterij	Rezultat štetja probiotičnih bakterij	Skladnost z deklaracijo
Yogermina® 100 (suspenzija)	– <i>Lb. acidophilus</i> : $6,4 \times 10^9$ u.f.c./stekl. – <i>Bif. lactis</i> : 24×10^9 u.f.c./stekl. – <i>Lb. plantarum</i> + <i>Lb. paracasei</i> : $1,6 \times 10^9$ u.f.c./stekl. – skupaj: 32×10^9 u.f.c./stekl.	– <i>Lb. acidophilus</i> : $1,2 \times 10^7$ KE/stekl. – <i>Bif. lactis</i> : $1,8 \times 10^9$ KE/stekl. – <i>Lb. plantarum</i> + <i>Lb. paracasei</i> : $2,2 \times 10^7$ KE/stekl. – skupaj: $1,8 \times 10^9$ KE/stekl.	ne ustreza deklaraciji
Bion® 3 Seniors (tablete)	10^7 probiotičnih kultur/tableto	$1,5 \times 10^7$ KE/tableto	ustreza deklaraciji
BioGaia® (tablete)	10^8 živih aktivnih bakterij/tableto	$1,4 \times 10^7$ KE/tableto	ne ustreza deklaraciji
Probioplex® (kapsule)	$7,5 \times 10^8$ CFU/kapsulo	$1,2 \times 10^7$ KE/kapsulo	ne ustreza deklaraciji
Probioplex® (prašek)	$1,5 \times 10^9$ CFU/vrečko	$4,8 \times 10^8$ KE/vrečko	ne ustreza deklaraciji
Bion® Transit (kapsule)	10^{10} probiotičnih kultur/kapsulo	$3,8 \times 10^9$ KE/kapsulo	ne ustreza deklaraciji
Bion® 3 Juniors (tablete)	10^7 probiotikov/tableto	$4,3 \times 10^6$ KE/tableto	ne ustreza deklaraciji
BioGaia® (kapljice)	10^8 živih aktivnih bakterij/5 kapljic	$2,4 \times 10^7$ KE/5 kapljic	ne ustreza deklaraciji
WAYA® AD (prašek)	5×10^9 živih probiotičnih bakterij/vrečko	$3,5 \times 10^9$ KE/vrečko	ne ustreza deklaraciji
WAYA® AB (prašek)	5×10^9 KE živih probiotičnih kultur/vrečko	$1,2 \times 10^{10}$ KE/vrečko	ustreza deklaraciji
WAYA® IT (prašek)	4×10^9 živih probiotičnih bakterij/vrečko	$1,9 \times 10^9$ KE/vrečko	ne ustreza deklaraciji
LYOLACT® (kapsule)	10^{10} živih probiotičnih bakterij/kapsulo	$1,7 \times 10^8$ KE/kapsulo	ne ustreza deklaraciji
NEO® Fermental _{MAX} (suspenzija)	2×10^9 spor <i>B. coagulans</i> /stekl.	$8,4 \times 10^8$ KE/stekl.	ne ustreza deklaraciji
NEO® Fermental _{MAX} (kapsule)	2×10^9 spor <i>B. coagulans</i> /kapsulo	$2,4 \times 10^9$ KE/kapsulo	ustreza deklaraciji

4.3 POTRJEVANJE PRISOTNOSTI DEKLARIRANIH VRST BAKTERIJ V PROBIOTIČNIH PREHRANSKIH DOPOLNILIH Z METODO PCR OZ. S SEKVENCIRANJEM (SAMO ZA *B. coagulans*) IN GELSKO ELEKTROFOREZO

DNA smo izolirali iz kolonij, izraslih na gojičih MRS, MRS+cly+cip, MRS+cys+mup, M17, BHI in CATC. Postopek izolacije genomske DNA za po G⁺ bakterije smo povzeli po proizvajalcu (Promega, Madison, WI, ZDA). Pri vseh vzorcih smo dobili pomnožke z univerzalnimi bakterijskimi začetnimi oligonukleotidi, kar dokazuje, da je bila izolacija DNA uspešna.

4.3.1 *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum* in *Bifidobacterium lactis*



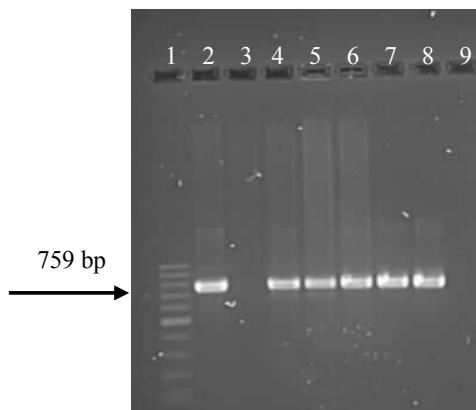
Slika 45: Pomnožki PCR z začetnimi oligonukleotidi za bakterijske vrste *Bif. bifidum*, *Bif. longum* in *Bif. lactis*. Stolpc 1 in 9: molekulska označevalca velikosti 100 bp, stolpec 15: molekulske označevalce velikosti 1 kb, stolpc 2–7: pomnožki PCR za bakterijsko vrsto *Bif. bifidum*, stolpc 10–13: pomnožki PCR za bakterijsko vrsto *Bif. lactis*, 16–19: pomnožki PCR za bakterijsko vrsto *Bif. longum*, stolpc 8, 14 in 20: negativne kontrole.

Uporabljena tarčna DNA:

- Stolpca 2 in 16: Bion® 3 Seniors (tablete)
- Stolpca 3 in 17: Bion® 3 Juniors (tablete)
- Stolpec 4: WAYA® AD (prašek)
- Stolpca 5 in 11: WAYA® AB (prašek)
- Stolpci 6, 12, 18: WAYA® IT (prašek)
- Stolpec 10: Yogermina® 100 (suspenzija)

Velikost produktov PCR za bakterijsko vrsto *Bif. bifidum* je bila za vse vzorce pričakovana (278 bp). Reakcija je bila v vseh primerih pozitivna, kar pomeni, da je bila bakterijska vrsta v kultivabilni mikrobioti prisotna, razen pri izdelku WAYA® AD, kjer je nismo potrdili. Tudi PCR reakcija za bakterijsko vrsto *Bif. lactis* je dala produkte ustrezne velikosti (680 bp), prav tako je bila reakcija v vseh izdelkih pozitivna, kar potrjuje prisotnost te bakterijske vrste. Velikost produktov PCR za bakterijsko vrsto *Bif. longum* je bila za vse vzorce ustrezna (831 bp). Reakcija je bila v vseh primerih pozitivna, kar potrjuje prisotnost živih predstavnic *Bif. longum* v izdelkih.

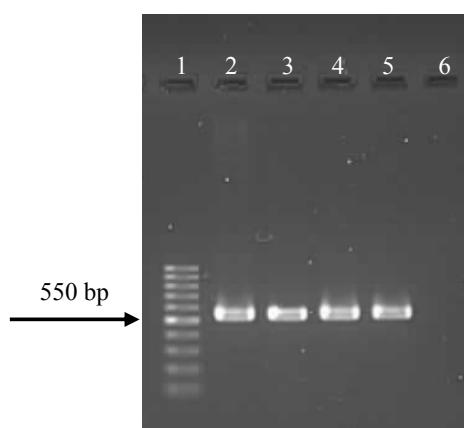
4.3.2 *Lactobacillus acidophilus*



Slika 46: Pomnožki PCR z začetnimi oligonukleotidi za bakterijsko vrsto *Lb. acidophilus*. Stolpec 1: molekulski označevalec velikosti 100 bp, stolci 2 in 4–8: pomnožki PCR za bakterijsko vrsto *Lb. acidophilus*, stolpec 3: pomnožek PCR za bakterijsko vrsto *Lb. bulgaricus*, stolpec 9: negativna kontrola.
Uporabljena tarčna DNA:
Stolpec 2: Yogermina® 100 (suspenzija)
Stolpec 3: Probioplex® (kapsule)
Stolpec 4: Probioplex® (prašek)
Stolpec 5: WAYA® AD (prašek)
Stolpec 6: WAYA® AB (prašek)

Reakcija je bila v vseh primerih pozitivna, kar pomeni, da je bila bakterijska vrsta *Lb. acidophilus* prisotna v kultivabilnem delu bakterijske populacije. DNA iz kolonij izdelka Probioplex® (kapsule) smo uporabili tudi v reakciji PCR za vrsto *Lb. bulgaricus*, da bi potrdili, da te vrste ni v izdelku. Dobili smo pričakovani negativen rezultat. Velikost produkta je bila za vse vzorce ustreznega (759 bp).

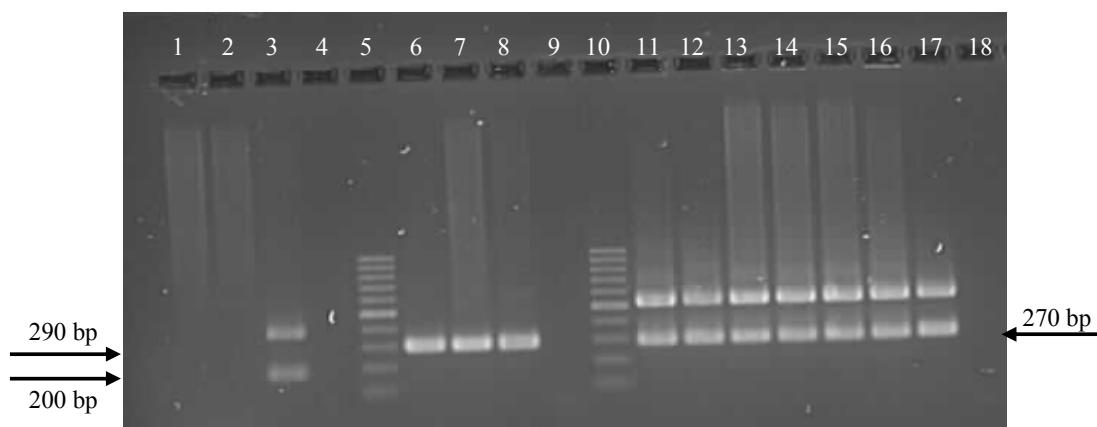
4.3.3 *Enterococcus faecium*



Slika 47: Pomnožki PCR z začetnimi oligonukleotidi za bakterijsko vrsto *Ent. faecium*. Stolpec 1: molekulski označevalec velikosti 100 bp, stolci 2–5: pomnožki PCR za bakterijsko vrsto *Ent. faecium*, stolpec 6: negativna kontrola.
Uporabljena tarčna DNA:
Stolpec 2: WAYA® AB (prašek)

V izdelku WAYA® AB so bile prisotne kultivabilne bakterije vrste *Ent. faecium*, saj smo jih dokazali s PCR, pri čemer smo DNA izolirali iz izraslih kolonij na ploščah. Velikost produkta je bila v vseh vzorcih ustrezna (550 bp).

4.3.4 *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* in *Lactobacillus plantarum*



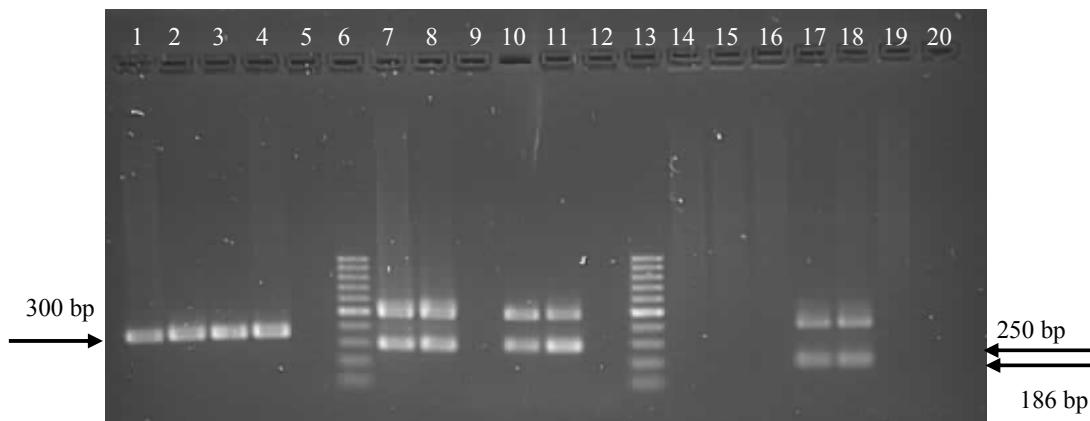
Slika 48: Pomnožki PCR z začetnimi oligonukleotidi za bakterijske vrste *Lb. casei*, *Lb. paracasei* in *Lb. plantarum*. Stolpca 5 in 10: molekulska označevalca velikosti 100 bp, stolpci 1–3: pomnožki PCR za bakterijsko vrsto *Lb. casei*, stolpci 6–8: pomnožki PCR za bakterijsko vrsto *Lb. paracasei*, stolpci 11–17: pomnožki PCR za bakterijsko vrsto *Lb. plantarum*, stolpca 4, 9 in 18: negativne kontrole.

Uporabljena tarčna DNA:

- Stolpca 1 in 13: WAYA® AD (prašek)
- Stolpca 2 in 15: WAYA® IT (prašek)
- Stolpca 6 in 11: Yogermina® 100 (suspenzija)
- Stolpca 7 in 14: WAYA® AB (prašek)
- Stolpec 12: Bion® Transit (kapsule)

Produkte PCR za vrsto *Lb. casei* smo dobili le pri pozitivni kontroli (progi velikosti približno 200 bp in 350 bp), ne pa tudi z DNA iz kolonij izdelkov WAYA® AD (prašek) in WAYA® IT (prašek). Dve progi namesto pričakovane ene (200 bp) sta posledica ne najbolj optimizirane reakcije PCR. Ker nismo dobili pomnožkov tudi z DNA iz izdelkov, se optimizacije nismo lotili. Rezultati PCR za bakterijsko vrsto *Lb. paracasei* so bili v vseh primerih pozitivni, kar pomeni, da izdelka Yogermina® 100 (suspenzija) in WAYA® AB (prašek) vsebujeta žive bakterije te vrste. Prav tako je bila ustrezna velikost produkta (290 bp). Tudi bakterijsko vrsto *Lb. plantarum* smo dokazali v vseh omenjenih izdelkih. PCR za *Lb. plantarum* ni bil optimiziran, saj smo dobili dve progi namesto ene. Ker pa sta bili progi tako pri pozitivnih kontrolah kakor tudi pri testnih vzorcih na istih mestih, smo sklepali, da gre za iste, vrstno-specifične pomnožke.

4.3.5 *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus reuteri* in *Lactobacillus rhamnosus*



Slika 49: Pomnožki PCR z začetnimi oligonukleotidi za bakterijske vrste *Lb. gasseri*, *Lb. reuteri* in *Lb. rhamnosus*. Stolpec 6 in 13: molekulska označevalca velikosti 100 bp, stolpci 1–4: pomnožki PCR za bakterijsko vrsto *Lb. gasseri*, stolpcii 7–11: pomnožki PCR za bakterijsko vrsto *Lb. reuteri*, stolpcii 14–19: pomnožki PCR za bakterijsko vrsto *Lb. rhamnosus*, stolpcii 5,12 in 20: negativne kontrole.

Uporabljena tarčna DNA:

- Stolpec 1: Bion® 3 Seniors (tablete)
- Stolpec 2: Bion® 3 Juniors (tablete)
- Stolpec 3: LYOLACT® (kapsule)
- Stolpec 7: BioGaia® (tablete)
- Stolpec 8: BioGaia® (kapljice)
- Stolpec 14: WAYA® AD (prašek)
- Stolpec 15: WAYA® AB (prašek)
- Stolpec 16: WAYA® IT (prašek)

Reakcija za bakterijsko vrsto *Lb. gasseri* je bila v vseh primerih pozitivna, s čimer smo dokazali, da so bile v vseh izdelkih z deklarirano vrsto *Lb. gasseri* prisotne žive bakterije te vrste. Velikost produkta je bila v vseh vzorcih ustrezna (300 bp). Tudi vrsto *Lb. reuteri* smo potrdili v izdelkih BioGaia® (tablete in kapljice). Poleg proge pričakovane velikosti (250 bp) smo dobili še drugo (500 bp), vendar tako pri pozitivnih kontrolah kot tudi pri vzorcih. Pri nobenem od izdelkov, ki bi morali vsebovati vrsto *Lb. rhamnosus* (WAYA® AD (prašek), WAYA® AB (prašek) in WAYA® IT (prašek)), pa živilih predstavnic bakterij te vrste nismo dokazali.

4.3.6 *Lactobacillus bulgaricus* in *Streptococcus thermophilus*



Slika 50: Pomnožki PCR z začetnimi oligonukleotidi za bakterijski vrsti *Lb. bulgaricus* in *Str. thermophilus*. Stolpec 1: molekulski označevalec velikosti 1 kb, stolpec 8: molekulski označevalec velikosti 100 bp, stolpci 1–6: pomnožki PCR za bakterijsko vrsto *Lb. bulgaricus*, stolpci 9–14: pomnožki PCR za bakterijsko vrsto *Str. thermophilus*, stolpca 7 in 15: negativni kontroli.

Uporabljena tarčna DNA:

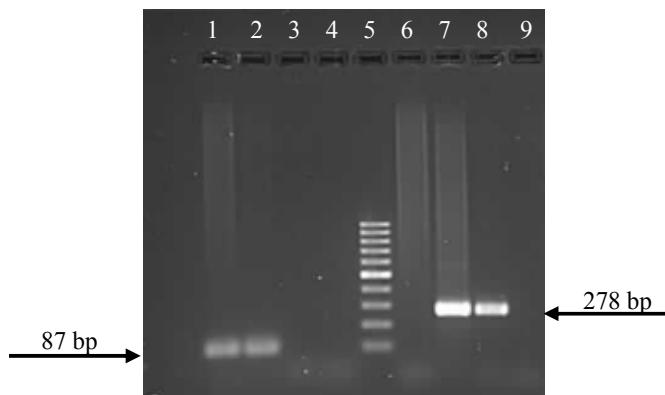
Stolpca 2 in 9: Probiolex® (kapsule)

Stolpca 3 in 10: Probiolex® (prašek)

Stolpca 4 in 11: LYOLACT® (kapsule)

Pri izdelku LYOLACT® (kapsule) smo dokazali prisotnost *Lb. bulgaricus* v kultivabilni mikrobioti, ne pa tudi pri ostalih dveh izdelkih Probiolex® kapsule in prašek, ki bi bakterije te vrste morala vsebovati. Velikost produkta je ustrezala pričakovani dolžini 1065 bp. Sмо pa v vseh treh izdelkih z deklarirano vrsto *Str. thermophilus* dobili pozitiven rezultat pri PCR na DNA iz kolonij z gojišča M17 ter tako potrdili njihovo prisotnost. Pomnožki so ustrezali pričakovani velikosti 250 bp.

4.3.7 *Lactococcus lactis* in *Bifidobacterium bifidum*



Slika 51: Pomnožki PCR z začetnimi oligonukleotidi za bakterijski vrsti *Lc. lactis* in *Bif. bifidum*. Stolpec 5: molekulski označevalec velikosti 100 bp, stolpci 1–3: pomnožki PCR za bakterijsko vrsto *Lc. lactis*, stolpci 6–8: pomnožki PCR za bakterijsko vrsto *Bif. bifidum*, stolpca 4 in 9: negativni kontroli.

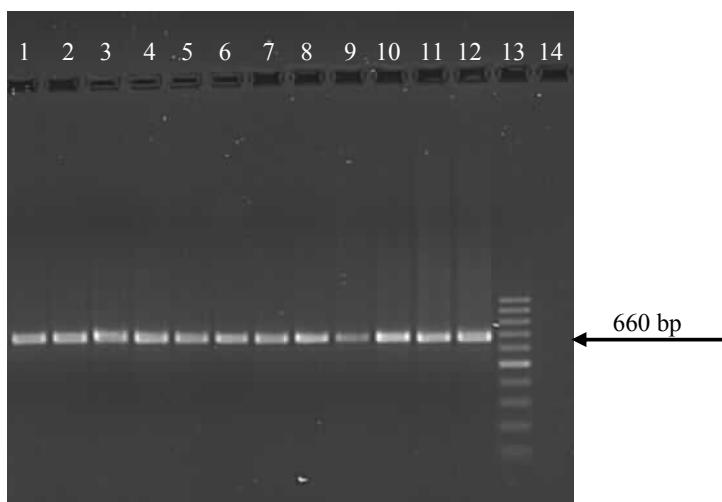
Uporabljena tarčna DNA:

Stolpec 1 WAYA® AD (prašek)

Stolpec 6: Probiolex® (prašek)

Specifična reakcija PCR za vrsto *Lc. lactis* je bila za izdelek WAYA® AD pozitivna, iz česar lahko sklepamo, da so živi predstavniki te vrste prisotni v izdelku. Ena izmed pozitivnih kontrol je sicer zatajila, a smo dobili pomnožek z drugo. Velikost pomnožka je ustreza pričakovani dolžini (87 bp). Vrste *Bif. bifidum* pa v kultivabilni mikrobioti izdelka Probiolex® (prašek) nismo potrdili. Pri pozitivnih kontrolah je velikost produkta ustreza pričakovani velikosti 278 bp.

4.3.8 Potrjevanje prisotnosti bakterij vrste *Bacillus coagulans* s pomočjo ugotavljanja nukleotidnega zaporedja



Slika 52: Očiščeni pomnožki PCR velikosti 660 bp (kar je bila pričakovana velikost produktov), pripravljeni za analize nukleotidnega zaporedja. Stolpec 13: molekulski označevalec velikosti 100 bp, stolpci 1–12 in stolpec 14: pomnožki PCR z začetnima oligonukleotidoma P1 in P4 (stolci 1–9: kolonije iz gojišča, stolci 10–12: izolirana DNA, stolpec 14: negativna kontrola).

Uporabljena tarčna DNA:

- Kolonije iz gojišča:

Stolpec 1: velika kolonija iz gojišča PCA (temperatura ink.: 42 °C), izdelek Probiolex® (prašek)

Stolpca 2 in 3: majhni koloniji iz gojišča BHI, izdelek ^{NEO®}Fermental_{MAX} (suspenzija)

Stolpca 4 in 5: veliki koloniji iz gojišča BHI, izdelek ^{NEO®}Fermental_{MAX} (suspenzija)

Stolpca 6 in 7: majhni koloniji iz gojišča BHI, izdelek ^{NEO®}Fermental_{MAX} (kapsule)

Stolpca 8 in 9: veliki koloniji iz gojišča BHI, izdelek ^{NEO®}Fermental_{MAX} (kapsule)

- Izolirana DNA:

Stolpec 10: iz gojišča PCA (temperatura ink.: 42 °C), izdelek Probiolex® (prašek)

Stolpec 11: iz gojišča BHI, izdelek ^{NEO®}Fermental_{MAX} (suspenzija)

Stolpec 12: iz gojišča BHI, izdelek ^{NEO®}Fermental_{MAX} (kapsule)

Za nadaljnjo analizo smo izbrali pet očiščenih pomnožkov PCR (iz ene majhne in ene velike kolonije iz izdelkov ^{NEO®}Fermental_{MAX} (suspenzija) in ^{NEO®}Fermental_{MAX} (kapsule) in iz ene velike kolonije iz izdelka Probiolex® (prašek)). Reakcije določanja nukleotidnega zaporedja so izvedli v švicarskem laboratoriju Microsynth. Dobljena nukleotidna zaporedja smo primerjali z vnosi v genski banki. Pomagali smo si s programom BLAST (NCBI, 2010). Rezultati so zbrani v preglednici 29.

Preglednica 29: Analiza nukleotidnega zaporedja DNA iz različnih kolonij iz izdelkov ^{NEO®}Fermental_{MAX} (suspenzija), ^{NEO®}Fermental_{MAX} (kapsule) in Probiolex® (prašek)

Izdelek	Deklarirana vrsta	Tip kolonije	Ugotovljena vrsta (rezultati analize BLAST)
NEO®Fermental _{MAX} (suspenzija)	<i>B. coagulans</i> (<i>Lb. sporogenes</i>)	majhna velika	<i>B. coagulans</i> <i>B. coagulans</i>
NEO®Fermental _{MAX} (kapsule)	<i>B. coagulans</i> (<i>Lb. sporogenes</i>)	majhna velika	<i>B. coagulans</i> <i>B. coagulans</i>
Probiolex® (prašek)	<i>Lb. sporogenes</i> (= <i>B. coagulans</i>)	velika	<i>B. coagulans</i>

Komentar k preglednici 29:

Pri vseh poslanih očiščenih pomnožkih PCR je analiza nukleotidnega zaporedja pokazala 99–100% identičnost s sevi *B. coagulans*. Vrsto *B. coagulans* smo torej potrdili v izdelkih ^{NEO®}Fermental_{MAX} (suspenzija), ^{NEO®}Fermental_{MAX} (kapsule) in Probiolex® (prašek) za vse izbrane tipe kolonij, kar pomeni, da so spore omenjene vrste prisotne v vseh treh izdelkih. Po sekvenciranju smo na podlagi podobnosti morfologije in rastnih lastnosti bakterij vrste *B. coagulans* v izdelku Probiolex® (prašek) prisotnost omenjene bakterijske vrste potrdili tudi za izdelek Probiolex® (kapsule).

4.3.9 Povzetek rezultatov prisotnosti živih bakterij deklariranih vrst v probiotičnih prehranskih dopolnilih z metodo PCR oz. s sekvenciranjem (samo za *B. coagulans*)

Preglednica 30: Povzetek rezultatov prisotnosti/odsotnosti deklariranih vrst bakterij z metodo PCR oz. s sekvenciranjem (samo za *B. coagulans*) in agarozno gelsko elektroforezo v različnih probiotičnih prehranskih dopolnilih

Izdelek	Vrsta bakterij	Prisotnost deklariranih vrst bakterij
Yogermina® 100 (suspenzija)	– <i>Lb. acidophilus</i> – <i>Lb. paracasei</i> – <i>Lb. plantarum</i> – <i>Bif. lactis</i>	+
Bion® 3 Seniors (tablete)	– <i>Lb. gasseri</i> – <i>Bif. bifidum</i> – <i>Bif. longum</i>	+
Probiolex® (kapsule)	– <i>Lb. acidophilus</i> – <i>Lb. bulgaricus</i> – <i>B. coagulans</i> – <i>Str. thermophilus</i> – <i>Bif. bifidum</i>	-
Probiolex® (prašek)	– <i>Lb. acidophilus</i> – <i>Lb. bulgaricus</i> – <i>B. coagulans</i> – <i>Str. thermophilus</i> – <i>Bif. bifidum</i>	+

se nadaljuje

nadaljevanje

Preglednica 30: Povzetek rezultatov prisotnosti/odsotnosti deklariranih vrst bakterij z metodo PCR oz. s sekvenciranjem (samo za *B. coagulans*) in agarozno gelsko elektroforezo v različnih probiotičnih prehranskih dopolnilih

Izdelek	Vrsta bakterij	Prisotnost deklariranih vrst bakterij
Bion® Transit (kapsule)	<i>Lb. plantarum</i>	+
Bion® 3 Juniors (tablete)	- <i>Lb. gasseri</i> - <i>Bif. bifidum</i> - <i>Bif. longum</i>	+
BioGaia® (kapljice)	<i>Lb. reuteri Protectis</i>	+
BioGaia® (tablete)	<i>Lb. reuteri Protectis</i>	+
WAYA® AD (prašek)	- <i>Bif. bifidum</i> - <i>Lb. acidophilus</i> - <i>Lb. casei</i> - <i>Lb. plantarum</i> - <i>Lb. rhamnosus</i> - <i>Lb. salivarius</i> - <i>Lc. lactis</i>	+
WAYA® AB (prašek)	- <i>Bif. bifidum</i> - <i>Bif. lactis</i> - <i>Lb. acidophillus</i> - <i>Lb. paracasei</i> - <i>Lb. plantarum</i> - <i>Lb. rhamnosus</i> - <i>Lb. salivarius</i> - <i>Ent. faecium</i>	- + + + + - n.p. +
WAYA® IT (prašek)	- <i>Lb. casei</i> - <i>Lb. rhamnosus</i> - <i>Lb. plantarum</i> - <i>Bif. bifidum</i> - <i>Bif. lactis</i> - <i>Bif. longum</i>	- - + + + +
LYOLACT® (kapsule)	- <i>Lb. bulgaricus</i> - <i>Lb. gasseri</i> - <i>Str. thermophilus</i>	+
NEO® Fermental _{MAX} (suspenzija)	<i>B. coagulans</i>	+
NEO® Fermental _{MAX} (kapsule)	<i>B. coagulans</i>	+

Legenda:

+...prisotnost bakterijske vrste v kultivabilni mikrobioti iz izdelka

-...odsotnost bakterijske vrste v kultivabilni mikrobioti iz izdelka

n.p....ni podatka

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Ustreznost deklaracij probiotičnih izdelkov

Zakonodaja o probiotičnih prehranskih dopolnilih se šele oblikuje, zato še ni primerne kontrole kakovosti probiotičnih izdelkov za ljudi. To se odraža tudi v rezultatih raziskave, predstavljene v tem diplomskem delu. Veliko živil na trgu je označenih in oglaševanih s prehranskimi in zdravstvenimi trditvami, zato je EU na tem področju sprejela enotno zakonodajo, da bi preprečili zavajanje potrošnikov. Uporabo prehranskih in zdravstvenih trditev na živilih ureja Uredba (ES) št. 1924/2006 Evropskega parlamenta in Sveta o prehranskih in zdravstvenih trditvah na živilih. Ta uredba uskljuje določbe zakonov ali predpisov v državah članicah, ki se nanašajo na prehranske in zdravstvene trditve, da bi zagotovili ustrezno varstvo potrošnikov. Da bi neko živilo lahko imelo navedene zdravstvene trditve na deklaraciji, je potrebno predložiti vlogo za odobritev v skladu z uredbo (ES) št. 1924/2006. Vlogo se pošlje pristojnemu nacionalnemu organu države članice, ta pa predá vlogo agenciji EFSA. Agencija je bila oblikovana kot del celovitega programa za izboljšanje varnosti živil v EU, za zagotavljanje visoke ravni varstva potrošnikov ter za ponovno vzpostavitev in ohranitev zaupanja v oskrbo s hrano v EU (Uredba ..., 2006; MKGP, 2010).

Tudi Zakon o zdravstveni ustreznosti živil in izdelkov ter snovi, ki prihajajo v stik z živili, pravi, da se živilom ne sme pripisovati zdravilnih lastnosti v smislu preprečevanja, zdravljenja bolezni ter jih oglaševati s sliko, znamenji ali besedili, ki bi porabnika lahko zavedli v zmoto glede sestave, lastnosti, namena uporabe ali učinka delovanja živila (Zakon ..., 2000).

Interes potrošnikov za probiotična prehranska dopolnila je v Sloveniji in drugod po Evropi vse večji, zato bo potrebno področje probiotičnih izdelkov zakonsko urediti in določiti kriterije, kot so minimalno število KE probiotičnih bakterij v izdelku in natančne oznake sevov, kar je pri analiziranih izdelkih bila prej redkost kot pravilo. Probiotični izdelki s slovenskega trga, ki smo jih vzeli pod drobnogled, ne zavajajo potrošnika z nedovoljenimi trditvami. Zbrali smo jih v preglednici 12. Noben od teh izdelkov ni imel zdravstvenih trditev v smislu, da zdravi in ozdravlja bolezni ter jih preprečuje. Čeprav so bile deklaracije včasih pomanjkljive oz. nepravilne, je bilo na vsakem izdelku navedeno vsaj skupno število probiotičnih bakterij ter bakterijske vrste, ki naj bi jih izdelki vsebovali. Zupančič (2002) je v svoji diplomski nalogi analiziral trg v nutricevtski dejavnosti, kamor spadajo tudi probiotična prehranska dopolnila. Že tam je izpostavil potrebo po zakonski reguliraciji področja probiotičnih izdelkov in po razvoju primernih metod za njihovo kontrolo.

Kot smo pričakovali, je naša raziskava potrdila domnevo, da so deklaracije vsaj na nekaterih probiotičnih izdelkih pomanjkljive. Na nekaterih deklaracijah je bilo neveljavno ime bakterijske vrste *Lb. sporogenes*, druge so vsebovale samo skupno število za vse bakterije. Na dveh izdelkih je proizvajalec dodal imenu bakterijske vrste še komercialno ime (*Lb. reuteri Protectis*), kar ni zaželeno, saj to ni pravo ime seva.

Proizvajalci niso dosledni pri pravilnem navajanju števila probiotičnih bakterij v izdelku. Po definiciji morajo biti probiotiki živi. Po drugi strani pa za rutinsko kontrolo kvalitete vsi uporabljajo kultivacijsko metodo štetja na ploščah, ki daje podatek o številu KE (CFU)/enoto izdelka, kar pa ni mogoče enačiti z živostjo, saj je v tovrstnih izdelkih gotovo tudi del bakterij v stanju VBNC (angl. viable but not culturable, tj. žive, ampak nekultivabilne). Pravilno navajanje na deklaracijah je torej v KE (CFU)/enoto izdelka.

Na deklaracijah so bili večinoma le podatki o skupnem številu bakterij, ne pa o posameznih vrstah. Le trije (Bion® 3 Seniors (tablete), WAYA® AB (prašek), NEO®Fermental_{MAX} (kapsule)) od štirinajstih analiziranih izdelkov so vsebovali ustrezno skupno število KE glede na podatke o številu probiotičnih bakterij na deklaraciji.

Na rezultate ugotavljanja števila spor *Bacillus* v izdelkih NEO®Fermental_{MAX} (suspenzija) in NEO®Fermental_{MAX} (kapsule) termična obdelava vzorcev, s katero uničimo vegetativne bakterijske celice, ni vplivala, pač pa dolžina inkubacije (2 ali 4 dni). Po podaljšani inkubaciji je iz spor zraslo za več kot dve log enoti več kolonij.

Z metodo PCR smo dokazali prisotnost večine bakterijskih vrst, z izjemo *Lb. casei* in *Lb. rhamnosus*. Devet od štirinajstih izdelkov je v celoti ustrezalo deklarirani vrstni sestavi. Izstopal je izdelek Probioplex® v obliki kapsule, v katerem nismo potrdili kultivabilnih celic *Lb. acidophilus*, *Lb. bulgaricus* in *Bif. bifidum*. Podobno tudi v prašku Probioplex® nismo uspeli potrdili vrst *Lb. bulgaricus* in *Bif. bifidum*. Pri vseh treh izdelkih WAYA® so bile pod mejo detekcije kultivabilne *Lb. rhamnosus*, pri WAYA® AD (prašek) in WAYA® IT (prašek) tudi *Lb. casei*, pri WAYA® AB (prašek) pa *Bif. bifidum*.

Rezultati sekvenciranja so potrdili prisotnost bakterij vrste *B. coagulans* v treh izdelkih (Probioplex® (prašek), NEO®Fermental_{MAX} (suspenzija) in NEO®Fermental_{MAX} (kapsule)). V izdelku Probioplex® (kapsule) pa smo prisotnost omenjene bakterijske vrste potrdili na podlagi podobnosti morfologije in rastnih lastnosti bakterij vrste *B. coagulans* v izdelku Probioplex® (prašek).

Tudi v podobni slovenski raziskavi iz leta 2006, v kateri so pregledali sedem liofiliziranih izdelkov s probiotičnimi bakterijami, so ugotovili nekaj nepravilnosti pri deklarirajuji vrste in števila probiotičnih bakterij, premajhne koncentracije kultivabilnih probiotičnih bakterij ter odsotnost nekaterih deklariranih vrst. Po slabem preživetju v izdelkih sta izstopali predvsem vrsti *Lb. acidophilus* in *Bif. bifidum* (Bogovič Matijašič in Rogelj, 2006).

O številnih pomanjkljivostih so pred tem poročali že raziskovalci iz drugih držav. Temmerman in sod. (2003) skoraj v nobenem od 55 probiotičnih izdelkov niso potrdili živih *Lb. acidophilus* in bifidobakterij, čeprav sta bila ta pogosto deklarirana. Samo 6 izdelkov je vsebovalo vse od navedenih probiotičnih bakterij, v 19 izdelkih pa so našli povsem druge bakterijske vrste. Coeuret in sod. (2004) so našli enterokoke v izdelkih, kjer niso bili deklarirani. Gueimonde in sod. (2004) so v 14 fermentiranih mlečnih probiotičnih izdelkih v Španiji ugotovili prisotnost laktobacilov in bifidobakterij, kakor tudi *Str. thermophilus*, ki je predstavnik jogurtove kulture. Na splošno je preživetje probiotičnih bakterij v fermentiranih mlečnih izdelkih boljše kot v liofiliziranih. Tudi Fasoli in sod. (2003) so v Italiji v svoji raziskavi zajeli 14 probiotičnih izdelkov, pri čemer so naleteli na

nepravilnosti v zvezi z identifikacijo MO, poimenovanjem ter označevanjem. Grand in sod. (2003) pa navajajo, da so bili MO iste vrste na treh izdelkih različno poimenovani. Hartemink (2006) je mnenja, da so pri večini probiotičnih dopolnil sestavine na izdelku nepravilno navedene. Če je deklaracija napačna oz. pomanjkljiva, o funkcionalni hrani ne moremo govoriti, saj sta vprašljivi tako varnost kot učinkovitost izdelka (Salminen in sod., 1998).

Na deklaracijah probiotičnih izdelkov naj bi bile navedene naslednje informacije:

- oznaka rodu, vrste in seva,
- minimalna koncentracija bakterijskega seva ob koncu roka uporabnosti,
- priporočena dnevna doza probiotikov, ki še zagotavlja učinkovitost,
- trditve o učinkovitosti delovanja na zdravje,
- pogoji skladiščenja,
- ime in naslov proizvajalca (FAO/WHO, 2002).

Bakterijske vrste morajo biti napisane v celoti, v ležečem tisku (Reid, 2006).

5.1.2 Rezultati ugotavljanja morfologije kolonij in celic ter števila deklariranih vrst bakterij v probiotičnih izdelkih

Izvedba mikrobiološke preiskave probiotičnih izdelkov vključuje naslednje stopnje:

- vzorčenje in transport v mikrobiološki laboratorij,
- priprava vzorca za mikrobiološko preiskavo (zatehta in homogenizacija, izbira ustreznega koncentracijskega območja),
- izbor in izvedba ustrezne analitske metode,
- odčitanje in obdelava rezultatov (Smole Možina, 2003).

Kultivacijske metode predstavljajo metodološko osnovo živilski mikrobiologiji in služijo obogatitvi, izolaciji in identifikaciji MO ter so osnova za večino kvantitativnih mikrobioloških analiz (Smole Možina, 2003).

Pri omenjenih metodah uporabljam selektivna hranljiva gojišča z namenom, da inhibirajo rast čim večjega števila prisotnih MO, omogočajo pa rast tarčnega MO. Selektivnost gojišč povečamo z ustreznim pH in a_w -gojišča ter ustreznimi razmerami inkubacije (s temperaturo, sestavo atmosfere) (Smole Možina, 2003). Prednost pred nekaterimi drugimi tehnikami je predvsem ta, da vedno določimo le prisotnost živih MO. Relativno veliko napako določanja koncentracije MO v vzorcih živil lahko delno zmanjšamo s pripravo večjega števila petrijevih plošč, ki jih pripravimo v različnih koncentracijskih območjih in med njimi izberemo za štetje le plošče s 30–300 kolonij, kjer je napaka štetja najmanjša (Smole Možina, 2003).

Klasične kultivacijske mikrobiološke tehnike imajo več slabosti, med njimi zahtevnost, zamudnost pri aseptični pripravi vzorcev in ostalega materiala za preiskavo. Delo lahko pospešimo z nekaterimi aparaturami, kot so avtomatski razredčevalnik vzorcev, homogenizator, pulzilnik in aparat za krožno nasajanje (Smole Možina, 2003). Razen tega, da zahtevajo veliko časa in materiala, ne zmorejo dovolj dobro razločevati med vrstami

bakterij in sevov na osnovi morfoloških in fenotipskih lastnosti. Nezadostna selektivnost gojišč pa lahko vodi v precenjeno število bakterij, ki jih štejemo. Zaradi omenjenih pomanjkljivosti so rezultati štetja MO na petrijevih ploščah velikokrat bodisi podcenjeni bodisi precenjeni. Prav tako te metode ne omogočajo dovolj zanesljive identifikacije vrst ali sevov. Zato so se začeli posluževati molekularno-bioloških metod identifikacije in tipizacije probiotičnih sevov (Bogovič Matijašić in Rogelj, 2006).

Tako konvencionalne mikrobiološke kot molekularno-biološke metode so uporabne za izbor novih, potencialno uporabnih probiotičnih sevov in spremeljanje njihove preživelosti in funkcionalne stabilnosti med proizvodnjo in skladiščenjem izdelkov ter v prebavnem traktu po zaužitju (Smole Možina in Jeršek, 2001).

Ena najbolj uporabnih molekularno-bioloških metod, ki predstavlja alternativo konvencionalnim metodam štetja bakterij, je gotovo PCR v realnem času (Bogovič Matijašić in Rogelj, 2006).

V naši raziskavi je rezultat štetja pokazal, da so le trije od štirinajstih probiotičnih izdelkov ustrezali deklariranemu številu probiotičnih bakterij, med njimi Bion® 3 Seniors (tablete), WAYA® AB (prašek) in NEO®FermentalMAX (kapsule). Število KE je bilo v vseh drugih izdelkih nižje od deklariranega. Vzroke lahko iščemo v premajhnem izhodiščnem številu probiotičnih bakterij, slabem preživetju med tehnološkim postopkom in slabem preživetju med skladiščenjem.

Pri tej raziskavi je precejšen problem predstavljal štetje *Str. thermophilus*, saj gojišče M17, ki ga največ uporablajo za te namene, ni zelo selektivno in lahko na njem zrasejo tudi nekateri laktobacili, enterokoki in druge bakterije. Tudi de Carvalho Lima in sod. (2009) so poročali o neselektivnosti tega gojišča. Po mnenju van de Casteele in sod. (2006) je za *Str. thermophilus* najbolj primereno gojišče M17, za *Lb. bulgaricus* gojišče MRS (pH=5,2), za *Lb. acidophilus* pa gojišče MRS+cly. Seveda pa je izbira gojišča za selektivno štetje komercialnih probiotičnih sevov odvisna od izdelka, ciljne skupine in taksonomske ranolikosti bakterijske biote izdelka.

Že Simpson in sod. (2004) so ugotovili, da je gojišče MRS z dodanim mupirocinom primerno za bifidobakterije, kar smo potrdili tudi pri našem eksperimentalnem delu.

Z mikroskopiranjem smo v naši raziskavi do neke mere med seboj lahko razlikovali rodove bakterij. Mikroskop je edini instrument, ki omogoča neposredno opazovanje MO, zato je klasičen del opreme živilsko-mikrobiološkega laboratorija (Smole Možina, 2003). Običajno preparat pobarvamo po Gramu, kjer se G- bakterije obarvajo rdeče, G+ pa ostanejo vijolične. Barvanje po Gramu smo uporabili tudi za pregledovanje kolonij iz izdelkov Yogermina® 100 (suspenzija), Bion® 3 Seniors (tablete), Bion® Transit (kapsule), Bion® 3 Juniors (tablete), BioGaia® (kapljice) in NEO®FermentalMAX (suspenzija). Uspešno smo razlikovali laktobacile od enterokokov in bifidobakterij. Nemogoče pa je zanesljivo razlikovati posamezne vrste laktobacilov, ali laktokoke od enterokokov. Pri izdelku WAYA® AD (prašek) je bilo npr. mogoče s pomočjo mikroskopiranja lepo razlikovati različne kolonije z gojišča MRS, ki so pripadale različnim vrstam laktobacilov.

Kot je pokazala identifikacija posameznih kolonij s pomočjo PCR, so na selektivnih gojiščih pogosto zrasle tudi kolonije drugih MO, ne samo tiste, ki smo jih pričakovali. Razlikovanje vrst po morfološkem izgledu pa ni bilo vedno mogoče, zato pri nekaterih izdelkih ni bilo mogoče izključiti precenjenih rezultatov štetja.

5.1.3 Potrjevanje deklariranih vrst bakterij v probiotičnih izdelkih z metodo PCR oz. s sekvenciranjem (samo za *B. coagulans*)

Za potrjevanje prisotnosti posameznih vrst bakterij se največ uporablja analiza skupne DNA, izolirane neposredno iz izdelka, pri čemer pa k rezultatu prispevajo tudi nežive celice. Ker so nas zanimale samo žive probiotične bakterije v izdelkih, smo analizirali DNA iz mešanice kolonij. Če bi izolirali DNA iz posameznih kolonij, bi lahko zgrešili predstavnice nekaterih vrst.

V primeru, da smo na mešanici kolonij dobili za kakšno vrsto pozitivni rezultat, na posamezni tipični koloniji pa ne, to pomeni, da na tistem gojišču, s katerega smo naključno tipično kolonijo pobrali, rastejo tudi druge vrste bakterij, torej gojišče ni najbolj selektivno. Če smo na skupni DNA, izolirani neposredno iz izdelka, dobili pozitiven rezultat, na posamezni koloniji ali mešanici več kolonij iz posameznega selektivnega gojišča pa ne, to lahko pomeni, da bakterije niso bile kultivabilne, DNA pa je bila še nerazgrajena (Bogovič Matijašič in Rogelj, 2006).

Metoda PCR se je že izkazala za uspešno in primerno za identifikacijo probiotičnih bakterij po mnenju številnih avtorjev, ki so jo uporabili v svojih raziskavah. Zato smo od njih povzeli univerzalne začetne oligonukleotide in parametre za reakcije PCR, ki so jih sami sestavili za deklarirane vrste bakterij in so se skoraj v vseh primerih izkazali za uspešne. Po Walterju in sod. (2000) smo povzeli začetne oligonukleotide za bakterije vrste *Lb. acidophilus*, *Lb. plantarum*, *Lb. casei*, *Lb. rhamnosus* in *Lb. reuteri*, po Barakatu in sod. (2000) za bakterijsko vrsto *Lc. lactis*, po Dutka-Malen in sod. (1995) za *Ent. faecium*, po Matsuki in sod. (2004) za *Bif. bifidum*, *Bif. longum* in *Bif. lactis*, po Torriani in sod. (1999) za vrsto *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, po Wardu in Timmins (1999) za bakterije vrste *Lb. paracasei*, po Tilsala-Timisjärvi in Alatossavi (1997) za *Str. thermophilus* ter po Songu in sod. (2000) za *Lb. gasseri*. Chagnaud in sod. (2001) so setavili začetne oligonukleotide med drugimi tudi za bakterijsko vrsto *Lb. salivarius*, vendar so se v našem primeru izkazali za neuspešne, ker je bilo verjetno nekaj narobe z našimi začetnimi oligonukleotidi in tako reakcije PCR za to bakterijsko vrsto kljub trem različnim programom nikakor nismo mogli izpeljati. Klijn in sod. (1991) pa so v svoji raziskavi pomnožili del gena za 16S rRNA z metodo PCR in pri tem uporabili univerzalna začetna oligonukleotida (P1 in P4). Prav tako smo mi pomnožili del gena za 16S rRNA in uporabili enaka začetna oligonukleotida za bakterije *B. coagulans* kot omenjeni raziskovalci. Reakcija PCR za omenjeno vrsto je bila uspešna.

Tudi Silvi in sod. (2003) so mnenja, da je metoda PCR primerna za identifikacijo probiotičnih bakterij, saj je hitra, zanesljiva, natančna in dokaj poceni.

Obstaja veliko različnih izvedb PCR in kombinacij z drugimi molekularnimi metodami. Primer je restrikcijska analiza, ki jo pred reakcijo PCR vključuje tehnika AFLP (angl.

amplified fragment length polymorphism, tj. študij polimorfizma dolžin pomnožkov DNA), katera ima odlično sposobnost razlikovanja zelo sorodnih sevov iste vrste in dobro ponovljivost rezultatov. Restriktijsko analizo po pomnoževanju DNA s PCR vključuje analiza RFLP (angl. restriction fragment length polymorphism, tj. restriktijska analiza pomnožkov PCR) (Smole Možina in Jeršek, 2001). Po mnenju Fasoli in sod. (2003) ter Walter in sod. (2000) se metoda PCR lahko uporablja v kombinaciji z DGGE in je tako primerna za hitro ugotavljanje prisotnih MO v probiotičnih izdelkih. Nekateri avtorji pa pravijo, da se lahko PCR uporablja tudi v kombinaciji s PFGE (Gueimonde in sod., 2004; Coeuret in sod., 2004; Yeung in sod., 2004). Edina analiza PCR, ki razlikuje seve iste bakterijske vrste, je RAPD (angl. randomly amplified polymorphic DNA, tj. verižna reakcija s polimerazo z naključno izbranimi začetnimi oligonukleotidi). Slabost te tehnike je slaba ponovljivost rezultatov (Smole Možina in Jeršek, 2001). Možna alternativa konvencionalnim metodam je real-time PCR (tj. PCR v realnem času), vendar ne omogoča razlikovanja med DNA živih ali mrtvih celic, zato lahko prispeva k lažno pozitivnemu rezultatu (Bogovič Matijašić in Rogelj, 2006).

Tudi v naši raziskavi smo uspešno uporabili metodo PCR z vrstno-specifičnimi začetnimi oligonukleotidi, ki so se izkazali že v predhodnih raziskavah. V izdelkih z *Lb. rhamnosus* in *Lb. casei* prisotnosti kultivabilnih bakterij teh vrst nismo potrdili. Podobno v kultivabilni populaciji iz izdelkov Probiolex® (kapsule), Probiolex® (prašek) in WAYA® AB (prašek) nismo potrdili vrste *Bif. bifidum*. Tudi živih bakterij *Lb. acidophilus* in *Lb. bulgaricus* ni bilo povsod, kjer so bile deklarirane. Rezultati kažejo na morebitno slabše preživetje predstavnikov omenjenih vrst v pregledanih izdelkih.

Velja pa, da preživetje ni toliko pogojeno z vrsto, ampak se razlikuje od seva do seva. Temmerman in sod. (2003) so v svojih raziskavah potrdili, da bakterije vrste *Lb. acidophilus* pogosteje izoliramo iz probiotičnih mlečnih izdelkov kot iz liofiliziranih zaradi boljšega preživetja te vrste v probiotičnih mlečnih izdelkih. To je zaradi nižjih temperatur skladiščenja (liofilizirane navadno shranujemo na sobni temperaturi), kraješega roka uporabnosti (liofilizirani izdelki imajo rok uporabe najmanj 24 mesecov, mlečni izdelki okoli 30 dni) in zaščitnega vpliva samega matriksa.

Na deklaracijah nekaterih izdelkov so bile navedene bakterijske vrste, ki sploh niso bile prisotne ali obratno, se pravi, da so vsebovale bakterijsko vrsto, ki ni bila deklarirana.

Kadar nimamo na voljo dovolj specifičnih začetnih oligonukleotidov, uporabimo metodo sekvenciranja, ki je primerna za identifikacijo MO v izdelkih. Sama metoda je hitra, ampak zahteva predhodno izolacijo DNA, reakcijo PCR, čiščenje PCR pomnožkov, ugotavljanje pomnožkov z elektroforezo ter izbiro kolonij, ki jih bomo kasneje poslali na sekvenciranje. Fasoli in sod. (2003) so menili, da je metoda sekvenciranja najbolj zanesljiva za identifikacijo bakterij v probiotičnih izdelkih. Tudi pri tem delu se je sekvenciranje izkazalo za uporabno in zanesljivo za identifikacijo *B. coagulans*, za katere v literaturi nismo našli dovolj specifičnih začetnih oligonukleotidov. Kadar imamo le-te na voljo, pa je bolj smiselno uporabiti vrstno-specifično PCR.

5.2 SKLEPI

- Na slovenskem trgu se je ponudba probiotičnih prehranskih dopolnil in zdravil brez recepta v zadnjih štirih oz. petih letih zelo povečala. Leta 2005 so v podobni raziskavi pregledali 7 tovrstnih izdelkov, saj jih več ni bilo naprodaj v slovenskih lekarnah. Leta 2009 (oktober), ko smo začeli s to raziskavo, pa je bilo v lekarnah in specializiranih prodajalnah naprodaj najmanj 38 probiotičnih izdelkov in zdravil brez recepta.
- Na deklaracijah so bile vedno navedene bakterijske vrste, ki so jih izdelki vsebovali, česar ne moremo reči za oznake bakterijskih sevov, ki so bili le redko navedeni.
- Na deklaracijah štirih izdelkov je bilo navedeno ime probiotične bakterije, ki ne obstaja oz. ni več veljavno.
- Na dveh izdelkih je proizvajalec bakterijski vrsti dodal še tržno ime, kar ni zaželeno.
- Opisi namena pregledanih izdelkov in delovanja na človeški organizem so bili v skladu z obstoječo zakonodajo.
- Deklaracije pregledanih izdelkov so bile pomanjkljive glede podatkov o številu KE za vsako bakterijsko vrsto posebej. Na večini so bili samo podatki o številu vseh KE skupaj.
- Le trije od štirinajstih analiziranih izdelkov so vsebovali zadosti kultivabilnih probiotičnih bakterij glede na podatke na deklaraciji.
- Devet od štirinajstih probiotičnih izdelkov je v celoti ustrezalo deklaraciji glede prisotnosti navedenih bakterijskih vrst. Pri ostalih petih izdelkih nismo potrdili bakterij vseh vrst v kultivabilnem delu bakterijske mikrobiote izdelkov.
- Pri dveh izdelkih smo zasledili tudi bakterije (koke), ki niso bile navedene na deklaraciji.
- Gojišča, ki jih uporabljamo za štetje probiotičnih bakterij, niso vedno dovolj selektivna. Tako npr. za laktokoke in *Str. thermophilus* uporabljamo gojišče M17, ki omogoča tudi rast nekaterih laktobacilov in enterokokov. Če na gojiščih zrastejo kolonije različnih velikosti, ki jih je mogoče po morfologiji dobro razlikovati, lahko selektivno upoštevamo pri štetju le tiste, za katere smo pod mikroskopom po morfologiji celic ugotovili, da pripadajo posameznemu rodu ali skupini. Večkrat pa jasno ločevanje kolonij po morfologiji ni mogoče in moramo upoštevati, da je število lahko precenjeno.
- Izolacija DNA neposredno iz konzorcijev kolonij, pridobljenih s posameznih selektivnih gojišč, s komercialnim setom za izolacijo genomske DNA se je izkazala za uspešno metodo, saj smo z metodo PCR v vseh vzorcih ugotovili prisotnost bakterijske DNA. S PCR z različnimi vrstno-specifičnimi začetnimi oligonukleotidi in gelsko elektroforezo je bilo mogoče uspešno potrditi deklarirane probiotične bakterije.
- Kadar ni na voljo ustreznih vrstno-specifičnih začetnih oligonukleotidov za reakcijo PCR, je smiselno analizirati izolate z ugotavljanjem nukleotidnega zaporedja delov 16S rDNA.

6 POVZETEK

Na slovenskem trgu je čedalje več probiotičnih prehranskih dopolnil. V okviru tega dela smo se odločili za pregled 14-ih. Označevanje teh izdelkov je ponavadi pomanjkljivo ali neustrezno glede števila kultivabilnih probiotičnih bakterij in navedenih vrst, saj se zakonodaja o probiotičnih prehranskih dopolnilih šele oblikuje. Žeeli smo preveriti ustreznost izdelkov glede bakterijskih vrst in števila KE probiotičnih bakterij, ki so navedeni na deklaracijah. S konvencionalnimi gojitvenimi metodami smo lahko ugotavljali le prisotnost KE določenih skupin oz. rodov probiotičnih bakterij v izdelku, nismo pa mogli potrditi prisotnosti posameznih navedenih vrst, saj ni na voljo tako selektivnih gojišč. Zato smo si pomagali tudi z molekularno-biološkimi metodami. Uspešno smo uporabili PCR z različnimi pari vrstno-specifičnih začetnih oligonukleotidov. V vzorcih DNA, izoliranih iz konzorcijev kolonij, ki so zrasle na posameznih selektivnih gojiščih, smo s PCR in agarozno gelsko elektroforezo ugotavljali prisotnost posameznih bakterijskih vrst. Če bi DNA pridobili neposredno iz izdelka, bi pozitiven rezultat za posamezno vrsto lahko dobili tudi zaradi prisotnosti neživih bakterij, ne samo živih.

Bistvenih pomanjkljivosti v poimenovanju probiotičnih bakterij nismo ugotovili. Dva izdelka sta vsebovala bakterije (koke), ki niso bile deklarirane. Po večini pa so bila napisana imena vseh vrst probiotičnih bakterij, ki naj bi jih izdelki vsebovali, ne pa tudi imena sevov. Na deklaracijah štirih izdelkov je bilo ime bakterijske vrste (*Lb. sporogenes*), ki je napačno oz. neveljavno. Dva izdelka sta imela poleg bakterijske vrste napisano še komercialno ime kulture (*Lb. reuteri Protectis*). Deklaracije so bile pomanjkljive v smislu podatka o številu za vsako bakterijsko vrsto posebej. Samo trije od štirinajstih izdelkov so vsebovali dovolj kultivabilnih probiotičnih bakterij glede na deklaracijo. Devet od štirinajstih izdelkov je v celoti ustrezalo deklaraciji, kar zadeva prisotnosti bakterijskih vrst, medtem ko pri ostalih petih izdelkih živih predstavnici nekaterih bakterijskih vrst (*Lb. bulgaricus*, *Lb. casei*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. acidophilus* in *Bif. bifidum*) nismo dokazali.

Pri mikrobioloških analizah probiotičnih prehranskih dopolnil se srečamo s problemom nezadostne selektivnosti gojišč, saj so si probiotične bakterije med seboj zelo podobne in jih s konvencionalnimi metodami težko razlikujemo. Na gojišču MRS za laktobacile dobro rastejo tudi nekateri drugi predstavniki MKB (laktokoki, enterokoki ipd.), na gojišču M17 pa poleg laktokokov, ki jim je gojišče v prvi vrsti namenjeno, rastejo tudi nekateri laktobacili, enterokoki in streptokoki. Tudi gojišče BHI, ki smo ga uporabili za rast sevov *Bacillus*, je neselektivno. Na njem smo zasledili tudi koke. Na gojišču za bifidobakterije, ki vsebuje antibiotik mupirocin (MRS+cys+mup), smo pri nekaterih izdelkih opazili prisotnost laktobacilov, pri enem izmed izdelkov pa celo še prisotnost kokov. Na gojišču s klindamicinom (MRS+cly+cip), ki je praviloma selektivno za skupino *Lb. acidophilus*, kamor poleg *Lb. acidophilus* sodi tudi *Lb. gasseri*, smo zasledili tudi koke. Na gojišču MRS, ki smo mu znižali pH na pH=5,2, da bi bil selektiven za vrsto *Lb. bulgaricus*, smo prav tako poleg palčk opazili še koke. Rezultati potrjujejo, da so gojišča, ki jih običajno uporabljajo za štetje različnih MKB, nezadostno selektivna. Tudi na podlagi morfologije bakterijskih celic s pomočjo mikroskopa je težko soditi o vrsti, prepoznavamo lahko v najboljšem primeru posamezne rodove, kakor npr. bifidobakterije. Zato smo se poslužili molekularno-bioloških metod, ker so precej hitrejše od konvencionalnih mikrobioloških in bolj selektivne. Pomanjkljivosti gojitvenih metod pa lahko odpravimo ali omilimo tako, da

vključimo še molekularno-biološke metode, od katerih je najbolj razširjena metoda PCR v kombinaciji z agarozno gelsko elektroforezo. S PCR smo v vzorcih DNA, pridobljenih iz konzorcijev kolonij, izraslih na različnih gojiščih, potrdili prisotnost deklariranih bakterijskih vrst. Prednosti PCR so predvsem hitrost, občutljivost in natančnost. Mogoče jo je tudi nadgraditi za namene kvantifikacije (PCR v realnem času). Ima pa tudi pomanjkljivosti, in sicer, da ne omogoča razlikovanja živih in mrtvih celic, kar lahko pripelje do lažno pozitivnih rezultatov. V predstavljenem delu smo vpliv neživih celic izključili tako, da DNA nismo izolirali neposredno iz izdelka, pač pa iz kolonij. Ker za vse vrste bakterij ni mogoče najti dovolj specifičnih začetnih oligonukleotidov, je včasih potrebno tudi ugotavljanje nukleotidnega zaporedja gena za 16S rRNA ter primerjava sekvenc s poznanimi. Na ta način smo potrdili vrsto *B. coagulans*. V izdelkih se je nahajala v obliki spor.

Kot smo predpostavljali v hipotezah, so tudi na slovenskem tržišču probiotična prehranska dopolnila z nepopolnimi deklaracijami ali z neustrezno sestavo, predvsem v smislu nedoseganja navedenega števila kultivabilnih probiotičnih bakterij. Rezultati dela nakazujejo na potrebo po boljši kontroli kakovosti probiotičnih prehranskih dopolnil.

7 VIRI

- Abram V., Cigić Blaž, Poklar Ulrich N., Skrt M. 2006. Eksperimentalna biokemija: za študente biotehnologije in živilske tehnologije. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 111 str.
- 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.
- Adams M.R. 1999. Safety of industrial lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology*, 68, 2–3: 171–178.
- Aguirre M., Collins M.D. 1993. Lactic acid bacteria and human clinical infections. *Journal of Applied Microbiology*, 75, 2: 95–107.
- Arvola T., Laiho K., Torkkeli S., Mykkänen H., Salminen S., Maunula L., Isolauri E. 1999. Prophylactic *Lactobacillus GG* reduces antibiotic-associated diarrhea in children with respiratory infections: A randomized study. *Pediatrics*, 104, 5: 1–4.
- Baelde D., Brassart D., Corthier M.G., Dore M.J., Heyman M., Michel C., Berta L., Bocle J.-C., Antoine J.-M., Auger I., Caers W., Farrokh C., Rousseau B. 2005. Effect of pre- and probiotics on the immune system. V: Effects of probiotics and prebiotics on flora and immunity in adults. Bocle J.-C., Thomann C. (eds.). Paris, Agence Francaise de Securite Sanitaire des Aliments: 89–94.
- Barakat R.K., Griffiths M.W., Harris L.J. 2000. Isolation and characterization of *Carnobacterium*, *Lactococcus*, and *Enterococcus* spp. from cooked, modified atmosphere packaged, refrigerated, poultry meat. *International Journal of Food Microbiology*, 62, 1–2: 83–94.
- Barrons R., Tassone D. 2008. Use of *Lactobacillus* probiotics for bacterial genitourinary infections in women: A review. *Clinical Therapeutics*, 30, 3: 453–468.
- Bezkrovainy A. 2001. Probiotics: Determinants of survival and growth in the gut. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 2: 399–405.
- Blaut M., Clavel T. 2007. Metabolic diversity of the intestinal microbiota: Implications for health and disease. *Journal of Nutrition*, 137, 3, Suppl. S: 751S–755S.
- 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: 153–165.

- Bogovič Matijašić B., Rogelj I. 2006. Demonstration of suitability of probiotic products: An emphasis on survey of commercial products obtained on Slovenian market. AgroFOOD industry hi-tech, 17, 3: 38–40.
- Borriello S.P., Hammes W.P., Holzapfel W., Marteau P., Schrezenmeir J., Vaara M., Valtonen V. 2003. Safety of probiotics that contain lactobacilli or bifidobacteria. Clinical Infectious Diseases, 36, 6: 775–780.
- Boyer R.F. 2005. Temelji biokemije. Ljubljana, Študentska založba: 349–351.
- Brunser O., Gotteland M. 2010. Probiotics and prebiotics in human health: An overview. V: Bioactive foods in promoting health: Probiotics and prebiotics. Watson R.R., Preedy V.R. (eds.). Amsterdam, Elsevier: 73–93.
- Carey C.M., Kostrzynska M. 2010. Microarray analysis of probiotics effectiveness. V: Bioactive foods in promoting health: Probiotics and prebiotics. Watson R.R., Preedy V.R. (eds.). Amsterdam, Elsevier: 479–495.
- Chagnaud P., Machinis K., Coutte L.A., Marecat A., Mercenier A. 2001. Rapid PCR-based procedure to identify lactic acid bacteria: Application to six common *Lactobacillus* species. Journal of Microbiological Methods, 44, 2: 139–148.
- Coeuret V., Gueguen M., Vernoux J.P. 2004. Numbers and strains of lactobacilli in some probiotic products. International Journal of Food Microbiology, 97, 2: 147–156.
- Cutting S.M. 2011. *Bacillus* probiotics. Food Microbiology, 28, 2: 214–220.
- De Carvalho Lima K.G., Kruger M.F., Behrens J., Destro M.T., Landgraf M., Gombossy de Melo Franco B.D. 2009. Evaluation of culture media for enumeration of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium animalis* in the presence of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. LWT – Food Science and Technology, 42, 2: 491–495.
- Dutka-Malen S., Evers S., Courvalin P. 1995. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. Journal of Clinical Microbiology, 33, 1: 24–27.
- European Commission. 2003. Opinion of the scientific committee on animal nutrition on the criteria for assessing the safety of micro-organisms resistant to antibiotics of human clinical and veterinary importance. Brussels, European Commission: 21 str.
http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scan/out108_en.pdf (avgust 2010)
- Euzéby J.P. 2010. LPSN – List of prokaryotic names with standing in nomenclature. Toulouse, Societe de Bacteriologie Systematique et Veterinaire: 126 str.
<http://www.bacterio.cict.fr/> (avgust 2010)

- Ezendam J., van Loveren H. 2008. Immune effects, safety and efficacy evaluation of probiotics. *Toxicology Letters*, 180, Suppl. 1: S5–S5.
- FAO/WHO. 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food: Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations: 11 str.
<ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf> (avgust 2010)
- Fasoli S., Marzotto M., Rizzotti L., Rossi F., Dellaglio F., Torriani S. 2003. Bacterial composition of commercial probiotic products as evaluated by PCR-DGGE analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 82, 1: 59–70.
- Feord J. 2002. Lactic acid bacteria in a changing legislative environment. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82, 1–4: 353–360.
- Fujii A., Cook E.S. 1973. Probiotics. Antistaphylococcal and antifibrinolytic activities of omega-guanidine acids and omega-guanidinoacyl-L-histidines. *Journal of Medical Chemistry*, 16, 12: 1409–1411.
- Fuller R. 1989. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66, 5: 365–378.
- Gardiner G.E., Ross R.P., Collins J.K., Fitzgerald G., Stanton C. 1998. Development of probiotic Cheddar cheese containing human-derived *Lactobacillus paracasei* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 6: 2192–2199.
- Gardiner G.E., Ross R.P., Kelly P.M., Stanton C., Collins J.K., Fitzgerald G. 2002. Microbiology of therapeutic milks. V: Dairy microbiology handbook: The microbiology of milk and milk products. 3rd ed. Robinson R.K. (ed.). New York, John Wiley & Sons: 431–478.
- Geier M.S., Butler R.N., Howarth G.S. 2007. Inflammatory bowel disease: Current insights into pathogenesis and new therapeutic options; probiotics, prebiotics and synbiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 115, 1: 1–11.
- Goldin B.R., Gorbach S.L., Saxelin M., Barakat S., Gualtieri L., Salminen S. 1992. Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract. *Digestive Diseases and Sciences*, 37, 1: 121–128.
- Grand M., Küffer M., Baumgartner A. 2003. Quantitative analysis and molecular identification of bifidobacteria strains in probiotic milk products. *European Food Research and Technology*, 217, 1: 90–92.
- Greiner R., Konietzny U. 2007. Modern molecular methods (PCR) in food control: GMO, pathogens, species identification, allergens. *World of Food Science*, 3: 8 str.
<http://www.worldfoodscience.org/cms/?pid=1003869> (avgust 2010)

- Guandalini S., Pensabene L., Abu Zikri M.A., Dias J.A., Casali L.G., Hoekstra H., Kolaček S., Massar K., Mičetić-Turk D., Papadopoulou A., de Sousa J.S., Sandhu B., Szajewska H., Weizman Z. 2000. *Lactobacillus GG* administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhea: A multicenter European trial. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 30, 1: 54–60.
- Guarner F., Malagelada J.-R. 2003. Gut flora in health and disease. *Lancet*, 361, 9356: 512–519.
- Guarner F., Schaafsma G.J. 1998. Probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 39, 3: 237–238.
- Gueimonde M., Delgado S., Mayo B., Ruas-Madiedo P., Margolles A., Reyes-Gavilan C.G. 2004. Viability and diversity of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* populations included in commercial fermented milks. *Food Research International*, 37, 9: 839–850.
- Hamilton-Miller J.M.T., Shah S., Winkler J.T. 1999. Public health issues arising from microbiological and labelling quality of foods and supplements containing probiotic microorganisms. *Public Health Nutrition*, 2, 2: 223–229.
- Hartemink R. 2006. Functional Foods: Probiotics. Wageningen, Food-Info/Wageningen University: 5 str.
<http://www.food-info.net/uk/ff/probiotics.htm> (avgust 2010)
- Havenaar R., Huis in't Veld J.H.J. 1992. Probiotics: A general view. V: Lactic acid bacteria in health and disease. Wood B.J. (ed.). London, Elsevier: 151–170.
- Holzapfel 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, 2: 85–101.
- Holzapfel W.H., Schillinger U. 2002. Introduction to pre- and probiotics. *Food Research International*, 35, 2–3: 109–116.
- Huynh H.A., Duc Le H., Cutting S.M. 2005. The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 4: 813–835.
- IDF Standard 100B. Milk and milk production – Enumeration of microorganisms – Colony-count technique at 30 °C. 1991: 3 str.
- IDF Standard 192. Milk products – Enumeration of presumptive *Lactobacillus acidophilus* on a selective medium – Colony-count technique at 37 °C. 2006: 6 str.
- Jeršek B. 2003. Higiena živil: Laboratorijske vaje za predmet Higiena živil. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 21–26.

- Kayser F.H. 2003. Safety aspects of enterococci from medical point of view. International Journal of Food Microbiology, 88, 2–3: 255–262.
- Klaenhammer T.R., Kullen M.J. 1999. Selection and design of probiotics. International Journal of Food Microbiology, 50, 1–2: 45–57.
- Klijn N., Weerkamp A. H., de Vos W.M. 1991. Identification of mesophilic lactic acid bacteria by using polymerase chain reaction-amplified variable regions of 16S rRNA and specific DNA probes. Applied and Environmental Microbiology, 57, 11: 3390–3393.
- Koebnick C., Wagner I., Leitzmann P., Stern U., Zunft H.J.F. 2003. Probiotic beverage containing *Lactobacillus casei* Shirota improves gastrointestinal symptoms in patients with chronic constipation. Canadian Journal of Gastroenterology, 17, 11: 655–659.
- Kuchta T. 2006. Polymerase chain reaction as a method for food analysis. V: Application of polymerase chain reaction to food analysis. Kuchta T., Drahovska H., Pangallo D., Siekel P. (eds.). Bratislava, VUP Research Institute: 13–25.
- Lick S., Drescher K., Heller K.J. 2001. Survival of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in the terminal ileum of fistulated Göttingen minipigs. Applied and Environmental Microbiology, 67, 9: 4137–4143.
- Lin W.-H., Hwang C.-F., Chen L.-W., Tsen H-Y. 2006. Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products. Food Microbiology, 23, 1: 74–81.
- List of the authorised additives in feedingstuffs published in application of Article 9t (b) of Council Directive 70/524/EEC concerning additives in feedingstuffs. 2004. Official Journal of the European Union, 47, C 50: 1–144.
- Majamaa H., Isolauri E., Saxelin M., Vesikari T. 1995. Lactic acid bacteria in the treatment of acute rotavirus gastroenteritis. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 20, 3: 333–338.
- Martin R., Langa S., Reviriego C., Jimenez E., Marin M. L., Olivares M., Boza J., Jimenez J., Fernandez L., Xaus J., Rodriguez J. M. 2004. The commensal microflora of human milk: New perspectives for food bacteriotherapy and probiotics. Trends in Food Science and Technology, 15, 3–4: 121–127.
- Matsuki T., Watanabe K., Fujimoto J., Kado Y., Takada T., Matsumoto K., Tanaka R. 2004. Quantitative PCR with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers for analysis of human intestinal bifidobacteria. Applied and Environmental Microbiology, 70, 1: 167–173.

- Matsuki T., Watanabe K., Tanaka R., Fukuda M., Oyaizu H. 1999. Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 4506–4512.
- Mattila-Sandholm T., Mättö J., Saarela M. 1999a. Lactic acid bacteria with health claims – interactions and interference with gastrointestinal flora. *International Dairy Journal*, 9: 25–35.
- Mattila-Sandholm T., Blum S., Collins J.K., Crittenden R., de Vos W., Dunne C., Fonden R., Grenov G., Isolauri E., Kiely B., Marteau P., Morelli L., Ouwehand A., Reniero R., Saarela M., Salminen S., Saxelin M., Schiffriin E., Shanahan F., Vaughan E., von Wright A. 1999b. Probiotics: Towards demonstrating efficacy. *Trends in Food Science and Technology*, 10, 12: 393–399.
- Mattila-Sandholm T., Mylläriinen P., Crittenden R., Mogensen G., Fonden R., Saarela M. 2002. Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal*, 12, 2–3: 173–182.
- McFarland L.V. 2000. A review of the evidence of health claims for biotherapeutic agents. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 12, 2: 65–76.
- MKGP. 2010. Prehranske in zdravstvene trditve. Ljubljana, MKGP – Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano: 1 str.
http://www.mkgp.gov.si/si/delovna_področja/varna_hrana/prehranske_in_zdravstvene_trditve/ (september 2010)
- Moreno M.R.F., Sarantinopoulos P., Tsakalidou E., de Vuyst L. 2006. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 1: 1–24.
- Mshvildadze M., Neu J. 2009. Probiotics and prevention of necrotizing enterocolitis. *Early Human Development*, 85, 10, Suppl. 1: S71–S74.
- Murphy C., Murphy S., O'Brien F., O'Donoghue M., Boileau T., Sunvold G., Reinhart G., Kiely B., Shanahan F., O'Mahony L. 2009. Metabolic activity of probiotics – oxalate degradation. *Veterinary Microbiology*, 136, 1–2: 100–107.
- Murphy S., Roberts R. 2006. »Black box« 101: How the Food and Drug Administration evaluates, communicates, and manages drug benefit/risk. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117, 1: 34–39.
- Müller M.R.A., Ehrmann M.A., Vogel R.F. 2000. Multiplex PCR for the detection of *Lactobacillus pontis* and two related species in a sourdough fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 5: 2113–2116.
- Myers D. 2007. Probiotics. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 16, 3: 195–197.

- Naidu A.S., Bidlack W.R., Clemens R.A. 1999. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38, 1: 13–126.
- NCBI. 2010. BLAST database: Nucleotide blast. Bethesda, NCBI – National Center for Biotechnology Information : database.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast> (avgust 2010)
- Nomoto K. 2005. Prevention of infections by probiotics. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100, 6: 583–592.
- Pant A.R., Graham S.M., Allen S.J., Harikul S., Sabchareon A., Cuevas L., Hart C.A. 1996. *Lactobacillus GG* and acute diarrhoea in young children in the tropics. *Journal of Tropical Pediatrics*, 42, 3: 162–165.
- Parker R.B. 1974. Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Animal Nutrition and Health*, 29: 4–8.
- Perdigon G., Alvarez S., Rachid M., Agüero G., Gobbato N. 1995. Immune system stimulation by probiotics. *Journal of Dairy Science*, 78, 7: 1597–1606.
- Pfeiler E.A., Klaenhammer T.R. 2007. The genomics of lactic acid bacteria. *Trends in Microbiology*, 15, 12: 546–553.
- Piano M., Morelli L., Strozzi G.P., Allesina S., Barba M., Deidda F., Lorenzini P., Ballaré M., Montino F., Orsello M., Sartori M., Garello E., Carmagnola S., Pagliarulo M., Capurso L. 2006. Probiotics: From research to consumer. *Digestive and Liver Disease*, 38, Suppl. 2: S248–S255.
- Quigley E.M.M. 2010. Prebiotics and probiotics; modifying and mining the microbiota. *Pharmacological Research*, 61, 3: 213–218.
- Raza S., Graham S.M., Allen S.J., Sultana S., Cuevas L., Hart C.A. 1995. *Lactobacillus GG* promotes recovery from acute nonbloody diarrhea in Pakistan. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 14, 2:107–111.
- Reid G. 2006. Safe and efficacious probiotics: What are they? *Trends in Microbiology*, 14, 8: 348–352.
- Ricke S.C., Pillai S.D. 1999. Conventional and molecular methods for understanding probiotic bacteria functionality in gastrointestinal tracts. *Critical Reviews in Microbiology*, 25, 1: 19–38.
- Roberfroid M.B. 1996. Functional affects of food components and the gastrointestinal system: Chicory fructooligosaccharides. *Nutrition Reviews*, 54, 11: 38–42.

- Rogelj I. 2001. Sinbiotični mlečni izdelki – učni primer 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: 219–229.
- Rogelj I., Bogovič Matijašić B. 2004. Probiotiki in varnost. V: Varnost živil. 22. Bitenčevi živilski dnevi, Radenci, 18. in 19. marec 2004. Gašperlin L., Žlender B. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 181–189.
- Rogelj I., Perko B. 2003. Mikrobiologija mleka in mlečnih izdelkov. 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: 541–577.
- Ruseler-van Embden J.G.H., van Lieshout L.M.C., Gosselink M.J., Marteau P. 1995. Inability of *Lactobacillus casei* strain GG, *L. acidophilus*, and *Bifidobacterium bifidum* to degrade intestinal mucus glycoproteins. Scandinavian Journal of Gastroenterology, 30, 7: 675–680.
- Saarela M., Lähteenmäki L., Crittenden R., Salminen S., Mattila-Sandholm T. 2002. Gut bacteria and health foods – the European perspective. International Journal of Food Microbiology, 78, 1–2: 99–117.
- Saarela M., Mogensen G., Fonden R., Mätto J., Mattila-Sandholm T. 2000. Probiotic bacteria: Safety, functional and technological properties. Journal of Biotechnology, 84, 3: 197–215.
- Salminen S., Gueimonde M. 2004. Human studies on probiotics: What is scientifically proven. Journal of Food Science, 69, 5: 137–140.
- Salminen S., von Wright A., Morelli L., Marteau P., Brassart D., de Vos W.M., Fondén R., Saxelin M., Collins K., Mogensen G., Birkeland S.-E., Mattila-Sandholm T. 1998. Demonstration of safety of probiotics – a review. International Journal of Food Microbiology, 44, 1–2: 93–106.
- Sanders M.E., Huis in't Veld J. 1999. Bringing a probiotic-containing functional food to the market: Microbiological, product, regulatory and labeling issues. Antonie van Leeuwenhoek., 76, 1–4: 293–315.
- Sanders M.E., Tompkins T., Heimbach J.T., Kolida S. 2004. Weight of evidence needed to substantiate a health effect for probiotics and prebiotics, Regulatory considerations in Canada, E.U. and U.S. European Journal of Nutrition, 44, 5: 303–310.
- Sheen P., Oberhelman R.A., Gilman R.H., Cabrera L., Verastegui M., Madico H. 1995. Short report: A placebo-controlled study of *Lactobacillus* GG colonization in one-to-three-year-old Peruvian children. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 52, 5: 389–392.

- Shimada T., Cai Y., Cheng L., Motonaga C., Fukada K., Kitamura Y., Wu J. 2009. Immunomodulation effects of heat-treated *Enterococcus faecalis* FK-23 (FK-23) in mice. Journal of Nanjing Medical University, 23, 3: 173–176.
- Shortt C. 1999. The probiotic century: Historical and current perspectives. Trends in Food Science and Technology, 10: 411–417.
- Silvi S., Vardenelli M.C., Orpianesi C., Cresci A. 2003. EU project Crownalife: Functional foods, gut microflora and healthy ageing: Isolation and identification of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains from faecal samples of elderly subjects for a possible probiotic use in functional foods. Journal of Food Engineering, 56, 2–3: 195–200.
- Simpson P.J., Fitzgerald G.F., Stanton C., Ross R.P. 2004. The evaluation of a mupirocin-based selective media for the enumeration of bifidobacteria from probiotic animal feed. Journal of Microbiological Methods, 57, 1: 9–16.
- 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, Univerza v Ljubljani, 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.
- Song Y.-L., Kato N., Liu C.-X., Matsumiya Y., Kato H., Watanabe K. 2000. Rapid identification of 11 human intestinal *Lactobacillus* species by multiplex PCR assays using group- and species-specific primers derived from the 16S–23S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA. FEMS Microbiology Letters, 187, 2: 167–173.
- Sperti G.S. 1971. Probiotics. West Point, Avi Publishing Co.: 120 str.
- Tannock G.W. 2001. Molecular assessment of intestinal microflora. American Journal of Clinical Nutrition, 73, 2: 410–414.
- Temmerman R., Pot B., Huys G., Swings J. 2003. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. International Journal of Food Microbiology, 81, 1: 1–10.
- Theunissen J., Britz T.J., Torriani S., Witthuhn R.C. 2005. Identification of probiotic microorganisms in South African products using PCR-based DGGE analysis. International Journal of Food Microbiology, 98, 1: 11–21.
- Tilsala-Timisjärvi A., Alatossava T. 1997. Development of oligonucleotide primers from the 16S–23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. International Journal of Food Microbiology, 35, 1: 49–56.

- Torriani S., Zapparoli G., Dellaglio F. 1999. Use of PCR-based methods for rapid differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*. Applied and Environmental Microbiology, 65, 10: 4351–4356.
- Tuohy K.M., Probert H.M., Smejkal C.W., Gibson G.R. 2003. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. Drug Discovery Today, 8, 15: 692–700.
- Uredba (ES) št. 1924/2006 Evropskega parlamenta in sveta z dne 20. decembra 2006 o prehranskih in zdravstvenih trditvah na živilih. Uradni list Evropske unije, 49, L 404: 9–25.
- Van de Castele S., Vanheuverzwijn T., Ruyssen T., van Assche P., Swings J., Huys G. 2006. Evaluation of culture media for selective enumeration of probiotic strains lactobacilli and bifidobacteria in combination with yoghurt or cheese starters. International Dairy Journal, 16, 12: 1470–1476.
- Verhagen H., Vos E., Franch S., Heinonen M., van Loveren H. 2010. Status of nutrition and health claims in Europe. Archives of Biochemistry and Biophysics, 501, 1: 6–15.
- Wagner R.D., Balish E. 1998. Potential hazards of probiotic bacteria for immunodeficient patients. Bulletin de l'Institut Pasteur, 96, 3: 165–170.
- 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, 1: 297–303.
- Ward L.J.H., Timmins M.J. 1999. Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. Letters in Applied Microbiology, 29, 2: 90–92.
- Warfel K., Aso Y., Gee D.L. 2007. Regulation of functional foods in Japan: Foods for Specialized Health Uses (FOSHU). Journal of the American Dietetic Association, 107, 8, Suppl. 1: A34–A34.
- Yeung P.S.M., Kitts C.L., Cano R., Tong P.S., Sanders M.E. 2004. Application of genotypic and phenotypic analyses to commercial probiotic strain identity and relatedness. Journal of Applied Microbiology, 97, 5: 1095–1104.
- Zakon o zdravstveni ustreznosti živil in izdelkov ter snovi, ki prihajajo v stik z živili. 2000. Uradni list Republike Slovenije, 10, 52: 6949–6951.
- Zhou J.S., Pillidge C.J., Gopal P.K., Gill H.S. 2005. Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. International Journal of Food Microbiology, 98, 2: 211–217.

Zupančič D. 2002. Analiza trga v nutricevtski dejavnosti. Diplomska naloga. Ljubljana,
Univerza v Ljubljani, Ekonomski fakulteta: 48 str.

ZAHVALA

Mentorici, viš. znan. sod. dr. Bojani Bogovič Matijašić, za vsestransko nesebično pomoč, nasvete pri raziskovalnem delu in pisanju diplomske naloge ter za ves trud, razumevanje in vzpodbudne besede.

Somentorici, dr. Metodi Zorič Peternel, ki me je spremajala, pomagala in svetovala pri laboratorijskem delu in pisanju diplomske naloge ter me ves čas vzpodbujala in navdajala z optimizmom.

Recenzenti, prof. dr. Sonji Smole Možina, za hiter, strokoven pregled in koristne nasvete za izboljšavo diplomske naloge.

Vidi Novak za lektoriranje diplomske naloge.

Lini Burkan za pregled referenc.

Katji Černe za njeno pomoč pri tiskanju in vezavi diplomske naloge.

Mojima staršema, ki sta mi omogočila študij in me pri tem podpirala ter vzpodbujala.

Primožu za vso ljubezen, potrpežljivost in podporo ter pomoč pri oblikovanju celotne diplomske naloge.

Saši za prijetno družbo v laboratoriju v času eksperimentalnega dela diplomske naloge in nepozabna študentska leta, kjer nikoli ni manjkalo smeha.

Vsem, ki vas nisem omenila, pa ste tudi kakorkoli pripomogli k ustvarjanju te diplomske naloge.

Najlepša hvala vsem.

PRILOGE

Priloga A: Rezultati sekvenciranja dela V1/V3 gena za 16S rRNA izolatov *B. coagulans*

A1, Premium RUN

9130244 12019

PRO-1.P1 **Probiolex® (prašek)** – velika kolonija; **BLAST: *B. coagulans***

TTGCTTTAAAAGGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGCAACCTGCC
TGTAAGATCGGGATAACGCCGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAGTTTTTC
CTCCGCATGGAGGAAAAAGGAAAGACGGCTTNKGCTGTCACTTACAGATGGG
CCCGCGCGCATTAGCTNGTGGTGGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGC
GTAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACATTGGACTGAGACACGGCCCAA
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGAAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGAC
GGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGCC
GGGAAGAACAAAGGCCGTTCGAACAGGGCGGCCCTGACGGTACCCGGCC
AGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCA
AGCGTTGCCGGAATTATTGGCGTAAAGCGCGCAGGCGGCTTCTTAAGTC
TGATGTGAAATCTGCGGCTAACCGCAAGCGGTATTGGAAACTGGGAGGCT
TGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGATTCCACGTAGCGGTGAAATGCG

A1, Premium RUN

9130245 12020

FER-ST-4.P1 ^{NEO®}**Fermental_{MAX} (suspenzija)** – majhna kolonija; **BLAST: *B. coagulans***

CTTGCTTTAAAAGGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGCAACCTGC
CTGTAAGATCGGGATAACGCCGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAGTTTTTC
CCTCCGCATGGAGGAAAAAGGAAAGACGGCTTNNGCTGTCACTTACAGATGG
GCCCGCGCGCATTAGCTNGTGGTGGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATG
CGTAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACATTGGACTGAGACACGGCCCAA
AACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGAAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGA
CGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGC
CGGGGAAGAACAAAGGCCGTTCGAACAGGGCGGCCCTGACGGTACCCGGC
CAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGC
AAGCGTTGCCGGAATTATTGGCGTAAAGCGCGCAGGCGGCTTCTTAAGTC
CTGATGTGAAATCTGCGGCTAACCGCAAGCGGTATTGGAAACTGGGAGGCT
TTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGATTCCACGTAGCGGTGAAATGCG

A1, Premium RUN

9130246 12021

FER-ST-5.P1 ^{NEO®}**Fermental_{MAX} (suspenzija)** – velika kolonija; **BLAST: *B. coagulans***

CTTGCTTTAAAAGGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGCAACCTGC
CTGTAAGATCGGGATAACGCCGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAGTTTTTC
CCTCCGCATGGAGGAAAAAGGAAAGACGGCTTNNGCTGTCACTTACAGATGG
GCCCGCGCGCATTAGCTNGTGGTGGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATG
se nadaljuje

nadaljevanje

Priloga A: Rezultati sekvenciranja dela V1/V3 gena za 16S rRNA izolatov *B. coagulans*

CGTAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCA
AACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGAAATCTCCGAATGGACGAAAGTCTGA
CGGAGCAACGCCCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTGTTAAAAGTCTGTC
CGGGGAAGAACAAAGTGCCTCGAACAGGGCGGCCCTGACGGTACCCGGC
CAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGTGGC
AAGCGTTGCCGGATTATTGGCGTAAAGCGCGCAGGGCTTCTTAAGT
CTGATGTGAAATCTGCGGCTAACCGCAAGCGGTATTGGAAACTGGGAGGC
TTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCG

A1, Premium RUN

9130247 12022

FER-KAP-8.P1 ^{NEO®}**Fermental_{MAX} (kapsule)** – majhna kolonija; **BLAST: *B. coagulans***

CTTGCTTTAAAAGGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGCAACCTGC
CTGTAAGATCGGGATAACGCCGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAGTTTTT
CCTCCGCATGGAGGAAAAAGGAAAGACGGCTTNKGCTGTCACTTACAGATGG
GCCCGCGCGCATTAGCTNGTTGGTGGGTAAACGGCTCACCAAGGCAACGATG
CGTAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCA
AACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGAAATCTCCGAATGGACGAAAGTCTGA
CGGAGCAACGCCCGTGAGTGAAGAACGGCTTCGGGTGTTAAAAGTCTGTC
CGGGGAAGAACAAAGTGCCTCGAACAGGGCGGCCCTGACGGTACCCGGC
CAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGTGGC
AAGCGTTGCCGGATTATTGGCGTAAAGCGCGCAGGGCTTCTTAAGT
CTGATGTGAAATCTGCGGCTAACCGCAAGCGGTATTGGAAACTGGGAGGC
TTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCG

A1, Premium RUN

9130248 12023

FER-KAP-10.P1 ^{NEO®}**Fermental_{MAX} (kapsule)** – velika kolonija; **BLAST: *B. coagulans***

CTTGCTTTAAAAGGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGCAACCTGC
CTGTAAGATCGGGATAACGCCGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAGTTTTT
CCTCCGCATGGAGGAAAAAGGAAAGACGGCTTNKGCTGTCACTTACAGATGG
GCCCGCGCGCATTAGCTNGTTGGTGGGTAAACGGCTCACCAAGGCAACGATG
CGTAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCA
AACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGAAATCTCCGAATGGACGAAAGTCTGA
CGGAGCAACGCCCGTGAGTGAAGAACGGCTTCGGGTGTTAAAAGTCTGTC
CGGGGAAGAACAAAGTGCCTCGAACAGGGCGGCCCTGACGGTACCCGGC
CAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGTGGC
AAGCGTTGCCGGATTATTGGCGTAAAGCGCGCAGGGCTTCTTAAGT
CTGATGTGAAATCTGCGGCTAACCGCAAGCGGTATTGGAAACTGGGAGGC
TTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCG