

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Miha BORDON

**OCENA UPORABNOSTI METOD ZA MOLEKULARNO
TIPIZACIJO MIKROBNIH ZDRUŽB IZ PREBAVNEGA
TRAKTA PITOVIH PIŠČANCEV**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Miha BORDON

**OCENA UPORABNOSTI METOD ZA MOLEKULARNO
TIPIZACIJO MIKROBNIH ZDRUŽB IZ PREBAVNEGA TRAKTA
PITOVNIH PIŠČANCEV**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**METHODS FOR MOLECULAR TYPING OF GUT MICROBIAL
COMMUNITIES FROM BROILERS AND EVALUATION OF THEIR
APPLICABILITY**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2014

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo na Katedri za mikrobiologijo in mikrobnio biotehnologijo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Za mentorja diplomskega dela je imenovan prof. dr. Gorazd Avguštin, za somentorico dr. Lijana Fanedl in za recenzentko prof. dr. Sonja Smole Možina.

Mentor: prof. dr. Gorazd Avguštin

Somentorica: dr. Lijana Fanedl

Recenzentka: prof. dr. Sonja Smole Možina

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja ŽGUR-BERTOK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Gorazd AVGUŠTIN

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: dr. Lijana FANEDL

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: prof. dr. Sonja SMOLE MOŽINA

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisani se strinjam z objavo svojega dela na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddal v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Miha Bordon

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.25/.26: 577.2.083: 636.5.087 (043) = 163.6
KG	mikrobne združbe/ pitovni piščanci/ črevesna mikrobiota/ krmni dodatki/ probiotiki/ molekularne tehnike/ T-RFLP/ DGGE/ tipizacija
AV	BORDON, Miha
SA	AVGUŠTIN, Gorazd (mentor)/ FANEDL, Lijana (somentorica)/ SMOLE MOŽINA, Sonja (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2014
IN	OCENA UPORABNOSTI METOD ZA MOLEKULARNO TIPIZACIJO MIKROBNIH ZDRUŽB IZ PREBAVNEGA TRAKTA PITOVIH PIŠČANCEV
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	X, 41 str., 4 pregl., 10 sl., 35 vir., 4 pril.
IJ	sl
JJ	sl/en
AI	Probiotiki predstavljajo zanimivo možnost vplivanja na učinkovitost prehrane pri gojeni perutnini. V diplomskem delu smo želeli ugotoviti, kako dodatek probiotika Toyocerin vpliva na črevesno mikrobioto piščancev. Pri delu smo preverjali ponovljivost izbrane metode izolacije DNK, mikrobiološko pestrost pa smo analizirali z molekularnima metodama DGGE in T-RFLP in primerjali rezultate. Opazili smo, da je bila uspešnost izolacije pri alikvotih istega vzorca zelo različna, ne glede na to, ali so bili alikvoti obdelani sočasno ali v različnih, zaporednih dneh. Ugotovili smo tudi, da uporabljeni molekularni metodi nista dali enakih rezultatov. Bolj primerna je bila metoda DGGE, s katero smo nato analizirali strukturo črevesne mikrobiote vseh 80 piščancev, ki so bili vključeni v poskus. Ugotovili smo, da dodatek probiotika ni imel tako močnega učinka, da bi razdelil črevesno mikrobioto na dve jasno ločeni skupini, da pa je določen vpliv obstajal, saj se je večina vzorcev uvrstila v ločene gruče, ki so vsebovale v večini primerov samo vzorce iz tretirane ali kontrolne skupine.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDC 579.25/.26: 577.2.083: 636.5.087 (043) = 163.6

CX microbial communities/ broilers/ gut microbiota/ feed additives/ probiotics/
molecular methods/ T-RFLP/ DGGE/ typing

AU BORDON, Miha

AA AVGUŠTIN, Gorazd (supervisor)/ FANEDL, Lijana (co-advisor)/ SMOLE
MOŽINA, Sonja (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in
Microbiology

PY 2014

TI METHODS FOR MOLECULAR TYPING OF GUT MICROBIAL
COMMUNITIES FROM BROILERS AND EVALUATION OF THEIR
APPLICABILITY

DT Graduation Thesis (University studies)

NO X, 41 p., 4 tab., 10 fig., 35 ref., 4 ann.

LA sl

AL sl/en

AB Probiotics represent an interesting opportunity to influence nutrition of farmed
poultry. Our goal was to find out, how probiotics affect intestinal microbiota of
chickens. We also evaluated repeatability of the chosen method for DNA isolation
and we used molecular techniques DGGE and T-RFLP for analyzing microbial
diversity. We found out, that the effectiveness of isolation in the aliquots of the
same sample varied, regardless of whether the aliquots were treated simultaneously
or in different, consequent days. We have also found that both molecular methods
yielded very different results. It turned out, that DGGE method was more suitable, so
we used it to analyze the structure of intestinal microbiota of 80 chickens included
in the experiment. The results of analysis showed that the addition of probiotics did
not impact the structure of intestinal microbiota enough to divide the samples in
two clearly separated groups, but obviously there was certain effect, which divided
the majority of samples in treated or control group.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA.....	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 PREBAVILA – MIKROBNI EKOSISTEM	2
2.2 MIKROBIOTA PREBAVIL KOKOŠI	3
2.3 PROBIOZA	4
2.4 METODE, KI OMOGOČAJO PREUČEVANJE STRUKTURE MIKROBNIH ZDRUŽB	6
2.4.1 Tradicionalne metode	6
2.4.2 Molekularne tehnike.....	7
2.4.2.1 Metode izolacije DNK	8
2.4.2.2 DGGE.....	9
2.4.2.3 T-RFLP.....	10
3 MATERIALI IN METODE	12
3.1 MATERIALI	12
3.1.1 Encimi, velikostni standard in začetni oligonukleotidi.....	12
3.1.2 Raztopine	12
3.1.3 Aparature.....	13
3.2 METODE.....	14
3.2.1 Shema poskusa	14
3.2.2 Priprava vzorcev	15
3.2.3 Razbijanje mikrobnih celic in izolacija nukleinskih kislin	15
3.2.4 T-RFLP	16
3.2.4.1 Priprava pomnožkov PCR.....	16
3.2.4.2 Čiščenje pomnožkov PCR.....	17
3.2.4.3 Cepitev DNK z restrikcijskimi endonukleazami tipa II.....	18
3.2.4.4 Analiza polimorfizma dolžin terminalnih restrikcijskih fragmentov.....	18
3.2.4.5 Analiza T-RFLP profilov.....	19
3.2.5 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v denaturirajočem gradientu – DGGE.....	19
3.2.5.1 Priprava pomnožkov PCR.....	19

3.2.5.2 Priprava poliakrilamidnih gelov in izvedba elektroforeze DGGE.....	20
3.2.5.3 Analiza DGGE profilov.....	21
4 REZULTATI.....	22
4.1 PRIMERJAVA UČINKOVITOSTI RAZLIČNIH METOD ZA IZOLACIJO DNK.....	22
4.2 POMNOŽEVANJE ODSEKOV GENOV ZA 16S rRNA V IZBRANIH VZORCIH.....	25
4.3 T-RFLP	26
4.4 DGGE	29
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	32
5.1 RAZPRAVA.....	32
5.1.1 Umestitev opravljenega dela v širši prehranski poskus.....	32
5.1.2 Izolacija DNK	33
5.1.3 T-RFLP	34
5.1.4 DGGE.....	34
5.2 SKLEPI.....	35
6 POVZETEK.....	36
7 VIRI	38
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Uporabljeni začetni oligonukleotidi.....	12
Preglednica 2: Seznam uporabljenih raztopin.....	12
Preglednica 3: Protokol reakcije PCR, s katero smo pomnoževali dele genov za 16S rRNK za analizo T-RFLP	17
Preglednica 4: Protokol reakcije PCR, s katero smo pomnoževali dele genov za 16S rRNK za analizo DGGE	20

KAZALO SLIK

Slika 1: Shema piščančjega prebavnega trakta	3
Slika 2: Shema metode osamitve DNK (Nordgård in sod., 2005).....	9
Slika 3: Shema poskusa.....	14
Slika 4: Fotografija 1 % agaroznega gela po gelski elektroforezi z izolirano DNK.....	23
Slika 5: Učinkovitost izolacije mikrobne DNK iz alikvotiranih vzorcev piščančjih iztrebkov glede na dan izolacije.....	24
Slika 6: Fotografija 1 % agaroznega gela po gelski elektroforezi s PCR pomnoženih odsekov genov za 16S rRNK	26
Slika 7: Dendrogram analize metode T-RFLP za izbrane vzorce, ki so bili izpostavljeni restrikcijskemu encimu <i>HhaI</i>	27
Slika 8: Dendrogram analize metode T-RFLP za izbrane vzorce, ki so bili izpostavljeni restrikcijskemu encimu <i>HaeIII</i> (<i>BsuRI</i>).	28
Slika 9: Dendrogram analize metode T-RFLP za izbrane vzorce, ki so bili izpostavljeni restrikcijskemu encimu <i>MspI</i>	28
Slika 10: Prikaz poliakrilamidnega gela po izvedbi metode DGGE.....	29
Slika 11: Dendrogram analize metode DGGE za izbrane vzorce, izračunan s Pearsonovim koeficientom korelacije in izrisan z metodo UPGMA.....	30
Slika 12: Dendrogram analize metode DGGE izračunan s Pearsonovim koeficientom korelacije in izrisan z metodo UPGMA za vse vzorce	31

PRILOGE

Priloga A: Koncentracije 10 x redčene izolirane DNK vzorcev iz kontrolne skupine in skupine, ki je imela v krmi dodan probiotik.

Priloga B1: Izmerjene koncentracije očiščenih pomnožkov PCR v ng/ μ L za vzorce s probiotikom.

Priloga B2: Izmerjene koncentracije očiščenih pomnožkov PCR v ng/ μ L za kontrolne vzorce.

Priloga C1: Sestava reakcijskih mešanic za kontrolne vzorce.

Priloga C2: Sestava reakcijskih mešanic za vzorce, ki so bili izolirani iz skupine piščancev, ki je imela v krmi dodan probiotik.

Priloga D: Rezultat analize metode DGGE, fotografija poliakrilamidnega gela.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AFLP	polimorfizem dolžin pomnoženih fragmentov (angl. Amplified Fragment Length Polymorphism)
DGGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza v denaturirajočem gradientu (angl. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)
DNK	deoksiribonukleinska kislina (angl. Deoxyribonucleic Acid)
FAME	metilni ester maščobnih kislin (angl. Fatty Acid Methyl Ester)
PLFA	maščobne kisline pridobljene iz fosfolipidov (angl. Phospholipid-derived Fatty Acids)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. Polymerase Chain Reaction)
RFLP	polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (angl. Restriction fragment length polymorphism)
rRNA	ribosomska ribonukleinska kislina (angl. Ribosomal Ribonucleic Acid)
TGGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza v temperaturnem gradientu (angl. Temperature gradient gel electrophoresis)
T-RFLP	polimorfizem dolžin terminalnih restrikcijskih fragmentov (angl. Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism)
UPGMA	metoda neponderirane aritmetične sredine (angl. Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic means)

1 UVOD

Diplomska naloga se navezuje na prehranski poskus, ki je potekal na Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete, v katerem so raziskovalci preučevali vpliv dveh komercialno dostopnih probiotičnih krmnih dodatkov na rast in rejske parametre pri reji pitovnih piščancev (Novak in sod., 2011). Poleg rejskih parametrov so pri takšnem poskusu zanimivi tudi podatki o spremembah v strukturi črevesne mikrobiote pri poskusnih živalih, na podlagi katerih bi lahko razložili način delovanja uporabljenih krmnih dodatkov. V omenjenem prehranskem poskusu so raziskovalci želeli preveriti vpliv dveh komercialno dostopnih probiotičnih dodatkov na karakteristike mesa, krvni serum in koncentracijo hlapnih maščobnih kislin v slepem črevesju poskusnih živali. V poskusu so uporabili pitovne piščance, t.i. brojlerje tradicionalne pasme težkega tipa slovenska pozno operjena kokoš. V diplomskem delu smo želeli ugotoviti, kako dodatek probiotika Toyocerin vpliva na črevesno mikrobioto piščancev.

1.1 NAMEN DELA

Ker so probiotiki, ki so jih v prehranskem poskusu uporabljali, verjetno delovali preko interakcij z drugimi črevesnimi mikroorganizmi v prebavilu piščancev, je seveda pomembno preučiti, ali je prišlo v strukturi črevesne mikrobiote do sprememb. Takšne raziskave danes potekajo z molekularno biološkimi metodami, s katerimi analiziramo informativne dele skupne mikrobne DNK, ki jo osamimo iz vzorca prebavne vsebine poskusnih živali. Postopek osamitve skupne mikrobne DNK je v mikrobno ekoloških raziskavah pogosto podcenjen v smislu izbora metode, vodi pa lahko v popačeno sliko stanja oz. sprememb v strukturi preučevane mikrobne združbe. Namen diplomske naloge je bil preverjanje ustreznosti izbrane metode za osamitev skupne mikrobne DNK, ter primernosti dveh molekularno tipizacijskih metod za ugotavljanje razlik v strukturah črevesne mikrobiote pri poskusnih živalih.

2 PREGLED OBJAV

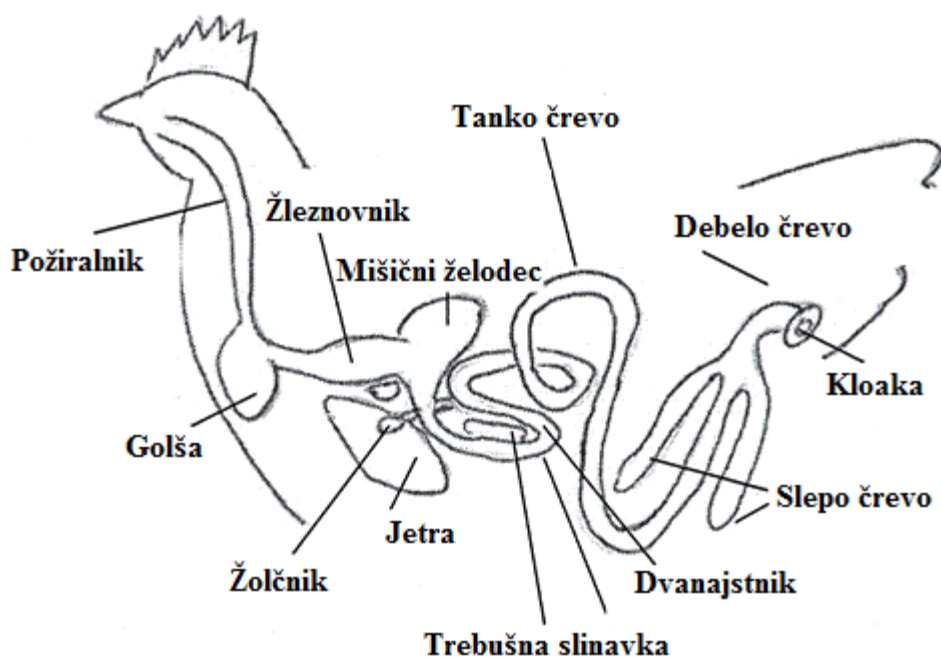
2.1 PREBAVILA – MIKROBNI EKOSISTEM

Mikroorganizmi v velikem številu naseljujejo nekatere dele živalskih teles, predvsem njihovo površino in seveda prebavni trakt. Črevesna mikrobiota ima pomembno vlogo pri prehrani gostitelja, ker sodeluje pri absorpciji hranil, poleg tega pa tudi ščiti prebavni trakt pred patogenimi mikroorganizmi, nadzira gostiteljev imunski sistem in celo preprečuje razvoj nekaterih bolezni (Stanley in sod., 2013). Mikrobna biomasa je najmanjša v požiralniku, želodcu in dvanajsterniku, največja pa v debelem črevesju, kjer živi kar do 10^{12} bakterijskih celic na gram črevesne vsebine, kar je 10-100x več, kot je vseh celic gostitelja. Zaradi tesnih povezav med črevesnimi mikroorganizmi in veliko raznolikostjo na vrstnem nivoju so prebavila tudi idealno okolje za horizontalne prenose genetskega materiala, kar omogoči mikrobni združbi lažje prilagajanje na okolje (Dillon in Dillon, 2004).

Mnoge študije poročajo, da pride ob odsotnosti črevesne mikrobiote do številnih vplivov na gostitelja, tako na fiziološkem, kot na prehranskem, imunološkem in tudi drugih nivojih (Smith in sod., 2007). Tako je na primer motena absorpcija proteinskih makromolekul, kar lahko privede do metabolnega stanja, podobnega stradanju (Bates in sod., 2006; Rawls in sod., 2004). Ugotovili so tudi, da pride ob odsotnosti mikrobiote do sprememb v nekaterih specifičnih funkcijah prebavnega trakta in do zaustavitve diferenciacije epitelijskega prebavila (Bates in sod., 2006). Prebavno mikrobioto zato zaradi njene pomembne funkcije označujejo tudi kot postnatalno pridobljeni organ, ki opravlja naloge, ki jih gostitelj sam ne more opravljati. Celotni set mikrobnih genomov v prebavnem traktu sestavlja t.i. prebavni mikrobiom, v katerem so zapisane mnoge lastnosti, pomembne za zdravje gostitelja (Jerman in Avguštin, 2010). Na strukturo črevesne mikrobiote in s tem črevesnega mikrobioma vpliva veliko različnih dejavnikov, med najpomembnejše sodi prehrana gostitelja (Hong in sod., 2012). Bakterije v prebavnem traktu morajo tekmovati za hranila z gostiteljem in med seboj. Izkoristijo lahko le del hrane, ki jo gostitelj zaužije, a ne razgradi in absorbira v srednjem delu prebavnega trakta. Bakterije izkoriščajo kot vir hranil tudi gostiteljevo sluznico, t.j. odmrle intestinalne epitelne celice, vir hranil pa predstavlja tudi samo kroženje metabolnih produktov med bakterijami (Olsen in sod., 2008).

2.2 MIKROBIOTA PREBAVIL KOKOŠI

Prebavila ptic, perutnine in seveda tudi najboljše preučenih med njimi, t.j. piščancev, so sestavljena iz različnih delov, vsak del pa ima svojo funkcijo pri prebavi krme, absorpciji hranil in splošnem zdravju živali. Ptičja golša in želodec imata pomembno funkcijo pri skladiščenju in razgradnji krme, v vitem in teščem črevesju pa poteka absorpcija hranil (Gong in sod., 2006). Mikrobiološko je najzanimivejše slepo črevo, zaradi največje aktivnosti in vrstne pestrosti, ki je v tem delu največja. V enem gramu sveže vsebine slepega črevesa je lahko tudi do 10^{11} bakterij (Zhu in sod., 2002). V tem delu prihaja do fermentacijskih procesov, ki dodatno pripomorejo k absorpciji hranil in istočasno preprečujejo kolonizacijo z patogenimi mikroorganizmi. Pomemben proces, ki poteka v slepem črevesju je tudi detoksifikacija škodljivih snovi (Gong in sod., 2006). Zanimivo je tudi, da so za človeka potencialno patogeni bakteriji *Salmonella enterica* in *Campylobacter jejuni* zelo pogosto prisotni v piščančji intestinalni mikrobioti (Zhu in sod., 2002).



Slika 1: Shema piščančjega prebavnega trakta.

V prebavnem traktu piščancev že 3 do 6 ur po tem, ko so se piščanci izvalili, pride do razvoja mikrobne združbe. Prve bakterije, ki ta mikrobni ekosistem naselijo, so

fakultativno anaerobni mikroorganizmi, ki so sposobni razgraditi sečno kislino. V treh do šestih dneh pride do kolonizacije tankega in slepega črevesja s streptokoki in enterobakterijami. Po prvem tednu začnejo v tankem črevesu prevladovati laktobacili, v slepem črevesju pa večinoma anaerobi, kot na primer tisti iz rodu *Bacteroides*, v manjšem številu pa so prisotni tudi fakultativni anaerobi. Tipična mikrobiota odraslih ptic se vzpostavi po približno šestih tednih (Chambers in Gong, 2011). Rezultati študij so pokazali, da večinski delež mikrobne združbe v slepem črevesju sestavljajo po Gramu pozitivne bakterije z nizkim deležem G+C, t.j. pripadniki debla *Firmicutes*. Med temi so najbolj zastopane bakterije iz skupine klostridijev (65 %), veliko pa je prisotnih tudi bakterij iz rodu *Faecalibacterium* (14 %) in *Lactobacillus* (8 %). Predstavnikov najbolj številčne populacije po Gramu negativnih bakterij iz debla *Bacteroidetes* je manj, okrog 5 % (Gong in sod., 2006). Mikrobi, ki jih je mogoče gojiti v *in vitro* razmerah na rastnih gojiščih so večinoma laktobacili, enterokoki in enterobakterije (Zhu in sod., 2002). Sama sestava črevesne mikrobiote se spreminja in je odvisna od različnih dejavnikov. V največji meri vpliva na združbe starost živali, prehrana in krmni dodatki, kot so antibiotiki in probiotiki (Zhou in sod., 2007).

2.3 PROBIOZA

Zaradi koristnega delovanja mlečnokislinskih bakterij v prebavnem traktu ljudi in živali se je v zadnjih tridesetih letih povečal interes za podrobnejše razumevanje vpliva probiotičnih dodatkov na spremembe v prebavnem traktu gostitelja. Pojem probiotik označuje kulture živih mikroorganizmov, ki koristno vplivajo na mikrobno ravnovesje v prebavilih ljudi in živali, izboljšujejo lastnosti indigene mikrobiote in posredno vplivajo na zdravje organizma, če jih zaužije v zadostni količini (Schrezenmeir in de Vrese, 2001).

Dober probiotični sev mora biti odporen na žolčne soli in želodčno kislino, genetsko stabilen in varen. Pomembno je tudi, da ima sposobnost adhezije na steno prebavnega trakta in ohranjanja aktivnosti. Nekateri sevi proizvajajo tudi protimikrobne snovi, s katerimi zavirajo rast patogenih bakterij (Vasiljevic in Shah, 2008).

Različni probiotiki izkazujejo mnoge ugodne vplive na zdravje gostitelja. Raziskave so pokazale, da učinkovito vplivajo na zdravljenje drisk, do katerih pride zaradi uživanja antibiotikov ali kemoterapevtikov, izboljšajo presnovo laktoze, nižajo raven holesterola in delujejo preventivno pri razvoju raka na debelem črevesju. Izboljšajo tudi celično in humoralno imunost in pomagajo pri humanih infekcijah s *Clostridium difficile* in *Helicobacter pylori* (Galdeano in sod., 2007).

V perutninski industriji je bila včasih uporaba antibiotikov zelo pogosta, ker so rejci želeli preventivno preprečiti morebitne okužbe. Prepogosta raba antibiotikov pa je povzročila pojav rezistentnih sevov patogenih bakterij. Izkazalo se je, da so antibiotiki povzročali nestabilnost črevesne mikrobiote z manjšim številom t.i. koristnih bakterij (Sen in sod., 2011). Problematično je bilo tudi nalaganje ostankov antibiotikov v tkivih živali in v okolju. Antibiotiki so bili prisotni v proizvodnih produktih (meso), zaradi česar so raba antibiotikov v perutninski industriji v mnogih državah prepovedali ali močno omejili. Sočasno so se povečevale zahteve po izboljšanju rejskih razmer in zdravja perutnine. Uporaba probiotikov se je izkazala kot najbolj učinkovita in zaradi varnosti tudi najbolj zaželeno metoda. V različnih študijah so pokazali ugoden vpliv probiotikov na rast živali, izkoriščanje hranil, zdravje prebavil in samo strukturo intestinalne mikrobiote (Ghadban, 2002; Patterson in Burkholder, 2003). Učinkovitost probiotikov je odvisna od mnogih dejavnikov, kot na primer prave izbire seva, uspešnosti dolgoročnega shranjevanja, količine uporabljenega probiotika in načina dodajanja (Sen in sod., 2011). Med različnimi vrstami probiotičnih bakterij so se zelo dobro izkazale bakterije iz rodu *Bacillus*, še posebno primerne zaradi njihove sposobnosti tvorjenja spor. Ta lastnost jim omogoča preživetje v težkih razmerah prebavnega trakta, ko potujejo skozi kisli želodec, poleg tega pa jih lahko tudi dalj časa hranimo pri sobni temperaturi. Ugodni učinki probiotika z bakterijami iz rodu *Bacillus* se kažejo pri piščancih predvsem v povečanem apetitu, večji aktivnosti prebavnih encimov in zmanjšani produkciji amonijevih spojin (Sen in sod., 2011). Pomembna je ugotovitev, da je populacija koristnih probiotičnih bakterij v mikrobni združbi prebavil stabilna in tako ščiti žival pred nezaželenimi mikrobi. Rezultati študije so pokazali, da so imeli piščanci, krmljeni z dodatkom probiotika, v prebavilih zmanjšano število klostridijev in koliformnih bakterij. Opazili so tudi spremenjeno intestinalno morfologijo. Živali so namreč imele daljše črevesne resice v vitem črevesju in

dvanajsterniku v primerjavi z živalmi iz kontrolne skupine. Dokazano pa je, da se pri krajših črevesnih resicah slabše absorbirajo hranila in prihaja do povečane sekrecije (Sen in sod., 2011).

Drugi pogosto uporabljeni probiotiki v perutninski industriji so še mikroorganizmi iz rodov *Lactobacillus*, *Saccharomyces*, *Streptococcus* in *Aspergillus* (Sen in sod., 2011).

2.4 METODE, KI OMOGOČAJO PREUČEVANJE STRUKTURE MIKROBNIH ZDRUŽB

Za analizo strukture in pestrosti mikrobnih združb raziskovalci uporabljajo različne metode, ki imajo vse svoje prednosti in slabosti. Katero metodo izberemo za preučevanje združbe je odvisno od vrste vzorca in zelenega nivoja ločljivosti. V osnovi lahko metode delimo na tradicionalne in na molekularne.

2.4.1 Tradicionalne metode

Pred razvojem molekularnih tehnik je bilo raziskovanje strukture in pestrosti mikrobnih združb omejeno samo na pristope, ki so kot osnovni korak vključevale osamitev in gojenje mikroorganizmov. Slabost takšnega pristopa je, da lahko preučimo le manjši del združbe, ki je sposoben rasti na uporabljenih gojiščih. V naslednjem koraku, pri identifikaciji vzgojenih mikroorganizmov, so raziskovalci najpogosteje uporabljali fenotipske teste in med njimi najpogosteje hitre teste, kot so na primer API in Biolog. Na osnovi rezultatov nekaterih študij raziskovalci ocenjujejo, da je možno gojiti in posledično identificirati le 10 do 60 % vrst bakterij, ki naseljujejo prebavni trakt. Zato danes za preučevanje črevesne mikrobiote skoraj izključno uporabljajo pristope, ki temeljijo na molekularnih tehnikah (Zhu in sod., 2002).

2.4.2 Molekularne tehnike

Strukturo mikrobnih združb lahko ugotavljamo z analizo membranskih lipidov, nukleinskih kislin ali proteinov, ki sestavljajo celice mikroorganizmov. Pri metodi FAME (Fatty Acid Methyl Esters) ali PLFA (Phospholipid Derived Fatty Acids) mikrobe prepoznavamo glede na različne profile membranskih maščobnih kislin. Te moramo iz mikrobnih celic izolirati in modificirati do metilnih estrov, nato pa vzorce analizirati s plinskim kromatografom (Shutter in Dick, 2000). Prednosti te metode so, da lahko analizo opravimo brez gojenja mikroorganizmov, da je metoda relativno enostavna in omogoča sočasno analizo velikega števila vzorcev, vendar pa s to metodo ne moremo identificirati še negojenih in neopisanih mikroorganizmov, ki pa predstavljajo v večini naravnih ekosistemov največji delež vseh mikrobov. Pomanjkljivost te metode je tudi, da ne moremo zaznati zelo nizkih koncentracij maščobnih kislin, ki so lahko pokazatelj pomembnega dela mikrobne združbe (Gong in Yang, 2012).

Strukturo mikrobne združbe zato večinoma preučujejo na osnovi analize DNK. Za preučevanje pestrosti mikrobne združbe pogosto uporabljajo t.i. molekularne tipizacijske metode, ki omogočajo primerjavo DNK profilov različnih vzorcev. Za analizo lahko uporabimo celotne genome (npr. metoda RFLP) v nekem vzocu prisotnih mikroorganizmov, ali pa samo specifične gene (npr. ribotipizacija). V primeru ribotipizacije moramo izbrane gene predhodno pomnožiti z verižno reakcijo s polimerazo (PCR). Raziskovalci so opisali veliko različnih molekularnih tipizacijskih metod. Primer takšne metode je AFLP, pri kateri DNK najprej izpostavimo restrikcijskim endonukleazam in nato z reakcijo PCR selektivno pomnožimo restrikcijske fragmente. Predhodno poznavanje specifičnih zaporedij DNK ni potrebno, uporablja pa se specifične začetne oligonukleotide. Metoda je primerna za tipizacijo DNK različnega izvora (Lucchini, 2003).

Pri molekularnih metodah najpogosteje uporabljamo kot tarčo gen za molekulo 16S rRNK. Ta gen je prisoten v vseh organizmih in se je med evolucijo relativno malo spreminjal, zato je zaradi ohranjenosti zelo primeren za preučevanje strukture mikrobnih združb. Večinoma ta gen najprej pomnožimo z reakcijo PCR, pri tem pa izkoristimo evolucijsko ohranjene dele gena kot prijemališča za začetne oligonukleotide, ki omogočijo uspešno

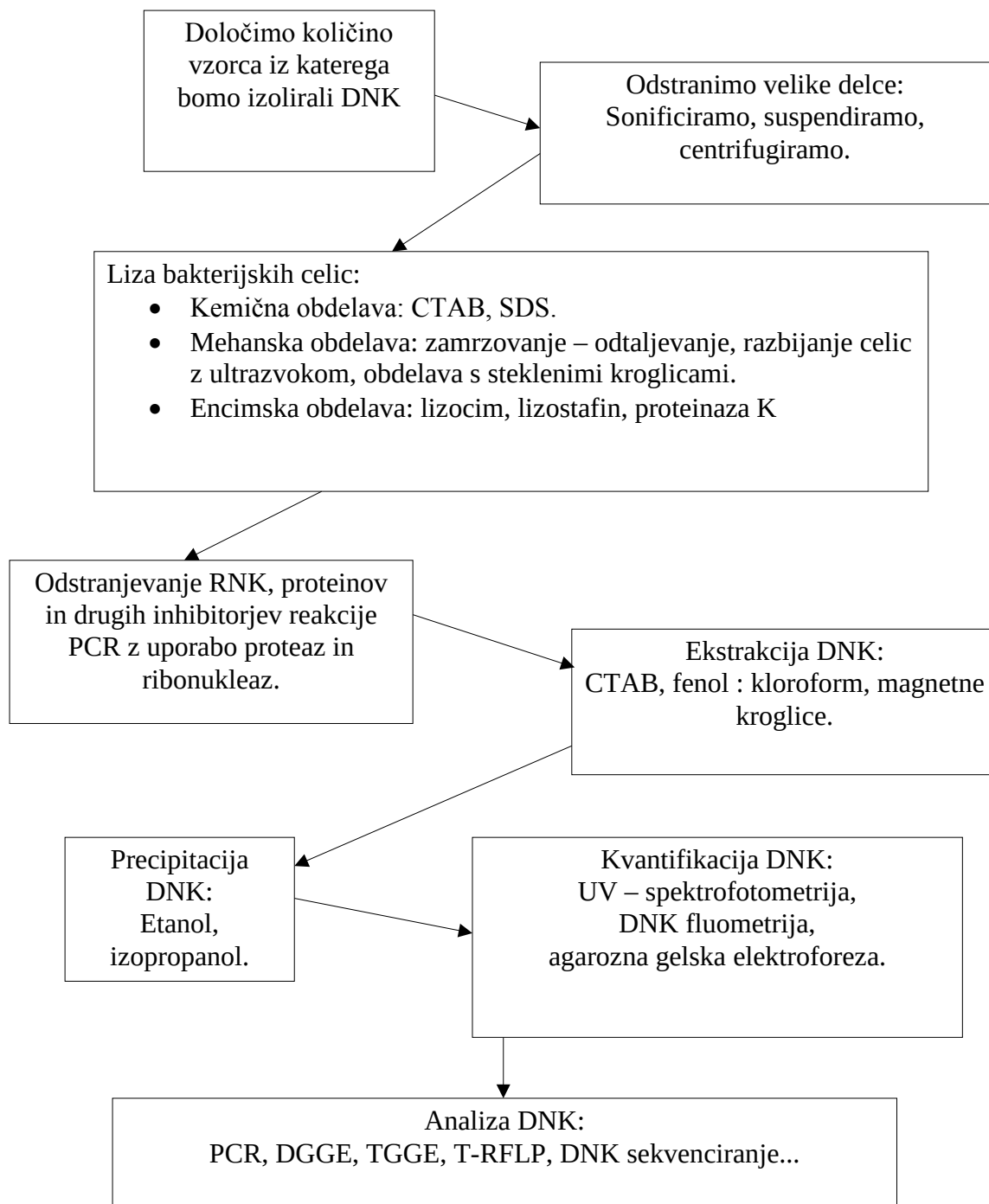
pomnoževanje tega gena pri skoraj vseh mikroroganizmi. Če želimo PCR pomnožke nato med seboj ločiti, nam samo gelska elektroforeza ne koristi, ker so si pomnožki po številu baznih parov enaki ali zelo podobni. Zato so razvili različne metode za ločevanje pomnožkov enakih velikosti, kot so na primer T-RFLP (Terminal Restriction Length Polymorphism), DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) in TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis).

Odločili smo se, da bomo za preučevanje strukture in pestrosti črevesne mikrobiote v prebavilu pitovnih piščancev uporabili najbolj pogosto uporabljani molekularni tipizacijski molekularni metodi, t.j. DGGE in T-RFLP in primerjali tako dobljene rezultate.

2.4.2.1. Metode izolacije DNK

Izolacija DNK iz organsko kompleksnih vzorcev, kot je na primer blato, predstavlja za raziskovalce velik izziv, saj vzorci pogosto vsebujejo inhibitorne snovi, ki lahko učinkovitost PCR reakcije zmanjšajo tudi za tisočkrat (Tang in sod., 2008). Za dobro metodo izolacije DNK velja tista, ki omogoča visok izplen čiste DNK s čim manjšo količino nečistoč, med katerimi so najpomembnejši različni encimi in inhibitorne snovi. Pomembna je tudi hitrost postopka izolacije in število stopenj v postopku, pri katerih lahko pride do napak ali navzkrižnih kontaminacij med vzorci (Fleischhacker sod., 2011). To je glavna prednost avtomatiziranih izolacij s komercialno pripravljenimi kompleti. Krajši postopek rokovanja z vzorci namreč zmanjša verjetnost kontaminacije in zagotavlja boljšo ponovljivost (Lee in sod., 2010). Kljub temu pa raziskovalci še vedno pogosto uporabljajo t.i. ročne tehnike izolacije DNK, ker te pogosto omogočajo večji izplen (Tang in sod., 2008).

Glavni koraki pri izolaciji DNK vključujejo homogeniziranje vzorca, lizo bakterijskih celic in ekstrakcijo ter precipitacijo DNK. Vsak korak metode lahko izvedemo na različne načine, ki so prikazani v naslednji shemi (Nordgård in sod., 2005).



Slika 2: Shema metode osamitve DNK (Nordgård in sod., 2005).

2.4.2.2 DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

Poliakrilamidna gelska elektroforeza v denaturirajočem gradientu je metoda, ki temelji na zmanjšanju elektroforetske mobilnosti delno denaturiranih pomnožkov DNK v poliakrilamidnem gelu, ki vsebuje linearni denaturirajoči gradient. Dvoverižna molekula

DNK, ki je večinoma do 500 bp dolg pomnožek verižne reakcije s polimerazo, potuje v gelu in ko doseže kritično točko, pride do denaturacije, zaradi česar se migracija molekule ustavi. Razlike v nukleotidnih zaporedjih sekvenc so odgovorne za to, da se različni odseki DNK ustavijo pri različnih koncentracijah denaturanta.

Teoretično lahko zaznamo celo razlike v enem samem nukleotidu. Z uporabo DGGE metode in njenih različic lahko zaznamo do 50 % razlik v sekvencah DNK dolžine do 500 baznih parov. Občutljivost metode izredno povečamo z uporabo začetnih oligonukleotidov s t.i. GC-čeljustmi. To so daljša zaporedja gvaninskih in citozinskih nukleotidov na 5' koncu enega od začetnih oligonukleotidov, ki jih uporabimo pri reakciji PCR. GC čeljusti obsegajo običajno 30 do 50 nukleotidov in deluje kot DNK domena, za katero je značilna visoka temperatura, pri kateri pride do denaturacije (T_m). Takšna GC čeljust preprečuje, da bi se dvoverižna DNK popolnoma ločila na dve verigi med potovanjem v gelu ob vedno večji koncentraciji v gel vklapljenega denaturanta. Taljenje DNK fragmenta brez GC-čeljusti ne vodi do nastanka stabilnih, delno razprtih molekul, ampak se nadaljuje do popolne disociacije, po kateri vsaka od nastalih enoverižnih DNK molekul potuje naprej s svojo hitrostjo (Neilson in sod., 2013).

2.4.2.3 T-RFLP (Terminal Restriction Length Polymorphism)

Pred izvedbo metode T-RFLP je tako kot pri metodi DGGE potrebno pomnožiti iskani informativni del mikrobne DNK z reakcijo PCR. Tudi pri tej tehniki najpogosteje uporabljajo gen za molekulo 16S rRNK. Pri reakciji PCR običajno uporabimo en fluorescentno označen začetni oligonukleotid. Pomnoženo DNK razrežemo z restrikcijskimi endonukleazami tipa II. in dolžino in število označenih fragmentov, t.i. terminalnih fragmentov analiziramo z ustrezno elektroforetsko metodo, v zadnjem času najpogosteje s kapilarno elektroforezo. Rezultati analize omogočajo opis strukture združbe, višina vrhov elektroferogramov pa nakazuje tudi relativne deleže posamezne mikrobne populacije v združbi. Pri interpretaciji rezultatov moramo biti previdni zaradi vpliva različnih dejavnikov, ki lahko končno sliko močno popačijo. Tako lahko pride do različne afinitete pri naleganju začetnih oligonukleotidov v verižni reakciji s polimerazo, možno pa je tudi, da so nekateri fragmenti z različno sekvenco enaki ali zelo podobni po velikosti.

Posledica tega so višji vrhovi elektroferograma, ki nas lahko zavedejo in ne odražajo dejanskega deleža populacije v vzorcu. Pri analizi profilov je potrebno določiti tudi minimalno vrednost fluorescence, ki se bo še upoštevala. Na rezultate analize seveda vplivajo tudi same sestavine in pogoji reakcije PCR. Največje razlike so opazili, kadar so pri PCR reakciji uporabljali različne polimeraze *Taq* DNK in različne koncentracije tarčne mikrobne DNK, medtem ko temperatura med reakcijo ne vpliva bistveno na rezultate (Osborn in sod., 2000).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Encimi, velikostni standard in začetni oligonukleotidi

- Restriksijske endonukleaze *BsuRI* (*HaeIII*), *HhaI*, *MspI* (Fermentas, ZDA)
- Velikostni standard za agarozno elektroforezo »1 kb DNA ladder, GeneRuler™ DNA Ladder Mix« (Fermentas, ZDA)

Preglednica 1: Uporabljeni začetni oligonukleotidi pri T-RFLP in DGGE.

Oznaka	Molekularna tehnika	Sekvenca 5' - 3'
HDA1-GC	DGGE	CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCA CGGGGGGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
HDA2	DGGE	GTATTACCG CGGCTGCTGGCA
27f-FAM	T-RFLP	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG
1492r	T-RFLP	TACGGYTACCTTGTTACGACTT

3.1.2 Raztopine

Preglednica 2: Seznam uporabljenih raztopin.

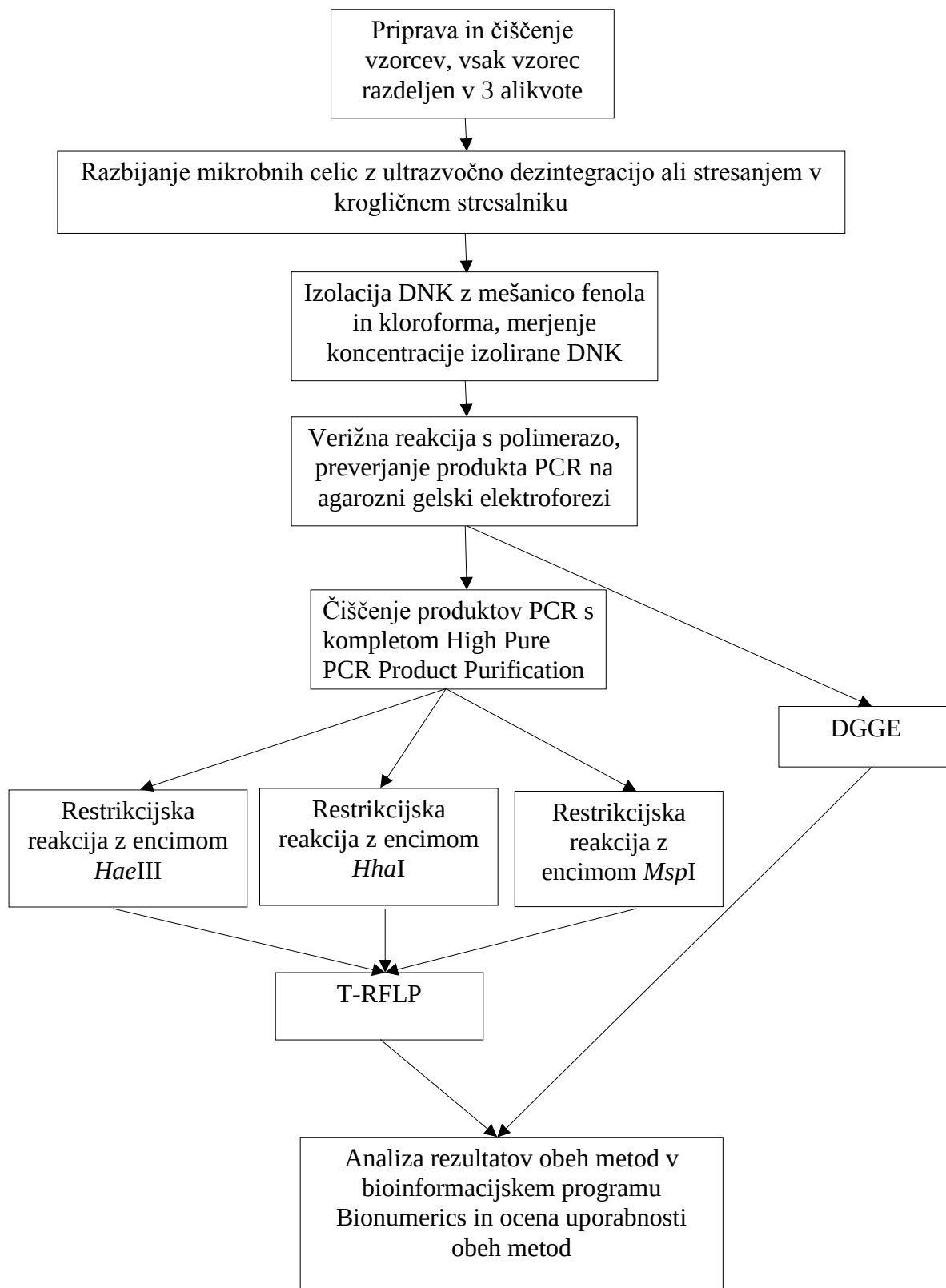
Raztopina	Sestava
Pufer TE, pH 8,0	10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, pH 8,0
Pufer PBS, pH 7,4	130 mM NaCl, 7 mM Na ₂ HPO ₄ , 3 mM NaH ₂ PO ₄
Pufer TBE 0,5 x	45 mM Tris-borat, 1 mM EDTA, pH 8,0
Pufer TAE 1 x	40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0
Fenol-kloroform-izoamil alkohol, SIGMA	25:24:1, nasičen z 10 mM TRIS, pH 8,0, 1 mM EDTA
Etanol	70 % etanol
CTAB/NaCl	10 % (ut.) heksadeciltrimetil amonijev bromid, 0,7 M EDTA, pH 8,0

3.1.3 Aparature

- Spektrofotometer: Za ugotavljanje koncentracije DNK smo uporabljali spektrofotometer znamke Nanovue (GeneQuant™ 1300, Švedska).
- Aparat za slikanje (dokumentiranje) gelov: Gel smo analizirali na UV transluminatorju pri valovni dolžini 365 nm in ga dokumentirali s sistemom GEL DOC 1000 (Bio-Rad, Hercules, CA, ZDA).
- Elektroforezni sistem za agarozno gelsko elektroforezo: Elektroforezo smo izvajali z aparaturo proizvajalca Bio-Rad (Mini-protean II, Bio-Rad, Hercules, CA, ZDA).
- Grelec: CH-100, Biosan
- Ultrazvočni razbijalec celic: Soniprep 150, ultrasonic disintegrator (ISTCP Inc., New Jersey, ZDA)
- Kroglični stresalnik: Mini – BeadBeater™ 3110BX, Biospec Products, Bartsville, ZDA
- Centrifuga: Mikro 200R, Hettich zentrifugen.
- Aparat za pomnoževanje DNK z verižno reakcijo s polimerazo: MyCycler, thermal cycler, Bio-Rad
- Tehnica: Mettler PN163
- Aparat za izvedbo DGGE: D Gene™ System, Denaturant Gel Electrophoresis, Bio-Rad.
- Vakuumska centrifuga za koncentriranje DNK: Concentrator 5301, Eppendorf
- Komplet za čiščenje produktov PCR: High Pure PCR Product Purification Kit, Roche.

3.2 METODE

3.2.1 Shema poskusa



Slika 3: Shema poskusa

3.2.2 Priprava vzorcev

V sklopu diplomske naloge smo uporabili vzorce vsebine slepega črevesa 40 piščancev, ki so bili krmljeni z dodatkom probiotika Toyocerin in 40 piščancev, ki so bili krmljeni brez dodatka probiotika in so predstavljali kontrolno skupino. Priprava vzorcev je potekala tako, da smo 1 g cekalne vsebine zatehtali v predhodno stehtane sterilne plastične centrifugirke (Falcon) in dopolnili do volumna 10 mL s pufrom PBS. Vzorce smo nato homogenizirali tako, da smo centrifugirke mešali 5 minut na vrtničnem mešalu. Homogenizirane vzorce smo alikvotirali v sterilne mikrocentrifugirke po 2 mL, kar pomeni, da smo imeli v mikrocentrifugirki raztopljenega 0,2 g vzorca. Čiščenje vzorcev je potekalo tako, da smo v mikrocentrifugirke dodali 1mL puфра PBS, vsebino centrifugirali 5 minut pri 12.000 x g, odlili supernatant in vzorce ponovno resuspendirali v 1 mL PBS ter postopek ponovili. Tako pripravljene vzorce smo do uporabe zamrznili pri -20 °C.

3.2.3 Razbijanje mikrobnih celic in izolacija nukleinskih kislin

Zamrznjene vzorce smo odmrznili pri sobni temperaturi in resuspendirali v 600 µL puфра TE. Mikrobne celice v vzorcih smo nato razbili z ultrazvočnim dezintegratorjem ali s krogličnim stresalnikom.

Ultrazvočni dezintegrator je naprava, ki električno napetost standardne frekvence 50/60 Hz pretvarja v visokofrekvenčno napetost in jo nato s pretvornikom spreminja v mehanske vibracije. Sonda v tekočini povzroči udarne valove, ob tem pa se poveča tudi pritisk in temperatura, zato je pomembno, da je vzorec med dezintegracijo celic oz. sonikacijo hlajen na ledu. Sonikacijo smo izvajali v treh cikli po 30 sekund, med cikli pa smo mikrocentrifugirke 60 sekund hladili na ledu. Drug nabor vzorcev smo stresali s krogličnim stresalnikom. V centrifugirke smo dodali 1,2 g mešanice sterilnih cirkonij-silikatnih kroglic premera 0,1 mm in 0,5 mm in jih trikrat stresali po 60 sekund, vmes pa smo vzorce 1 minuto hladili na ledu. Pri obeh postopkih se je zaradi nastalih mehanskih vibracij celična stena bakterij poškodovala in omogočila dostop do nukleinskih kislin. Po sonikaciji ali stresanju v stresalniku smo vzorec centrifugirali 10 minut pri 12.000 x g pri 4 °C. Supernatant smo prenesli v novo mikrocentrifugirko in mu dodali 100 µL 5 M

raztopine NaCl in vsebino dobro premešali na vrtničnem mešalu. Nato smo dodali 80 μL raztopine 10 % CTAB (cetyltrimethylammonium bromide, Sigma) in 0,7 % NaCl, ki je bila predhodno segreta na 65 °C. Vzorce smo premešali z obračanjem mikrocentrifugirke in inkubirali 10 minut pri 65 °C. Po inkubaciji smo dodali 780 μL kloroforma in vzorec premešali z obračanjem mikrocentrifugirke. Sledilo je centrifugiranje vzorca pri 12.000 x g pri 4 °C za 10 minut. Vodno fazo smo prenesli v novo sterilno mikrocentrifugirko, kloroform z raztopljenim organskim materialom pa smo zavrgli. Vzorcju smo nato dodali 780 μL raztopine fenol-kloroform-izoamil alkohola in tako odstranili proteine, lipide in drug organski material. Z obračanjem mikrocentrifugirke smo vzorec premešali in ga centrifugirali 10 minut pri 12.000 x g pri 4 °C. Zgornjo vodno fazo smo prenesli v novo mikrocentrifugirko in raztopljene nukleinske kisline oborili z dodatkom izopropanola (0,6 x volumna vzorca).

Sledilo je centrifugiranje pri 14.000 x g za 10 minut pri 4 °C. Supernatant smo zavrgli in usedlino ter stene mikrocentrifugirke sprali z 1 mL 70 % etanola, ki je bil ohlajen na -20 °C. Vzorec smo nato še zadnjič centrifugirali pri 14.000 x g za 10 minut pri 4 °C in odstranili supernatant. Nukleinske kisline v usedlini smo posušili na zraku v brezprašni komori (laminariju) in jih raztopili v 35 μL 10 mM pufru TE s pH 8,5.

3.2.4 T-RFLP

3.2.4.1 Priprava pomnožkov PCR

Pri pomnoževanju 16S rDNK smo naleteli na nekaj težav, ki pa smo jih z optimizacijo reakcije PCR uspešno odpravili. Po nekajkratnih poskusih smo pripravili protokol za določanje ustrezne redčitve izolirane DNK, ki smo jo nato uporabili v reakciji PCR. Koncentracijo izolirane DNK smo izmerili s spektrofotometrom Nanovue. Glede na rezultate, ki smo jih pridobili s spektrofotometrično analizo, smo uporabili 50 do 500-kratne redčitve izolirane kromosomske DNK. Pripravili smo reakcije PCR s končnim volumnom reakcijskih mešanic 25 μL . Posamezna reakcijska mešanica je vsebovala 2,5 μL 1 x pufru PCR z dodanim KCl, 1,5 μL 25 mM MgCl_2 , 1,5 μL 1,5 mM dimetilsulfoksida, 1 μL 0,2 mM vseh deoksiribonukleotidov, 0,2 μL 0,5 mM začetnega oligonukleotida 27f-FAM (nalega v 3' smeri kodirajoče verige) in isto količino začetnega

oligonukleotida 1492r (nalega v 5' smeri kodirajoče verige), 0,125 μ L 2,5 U/ μ L rekombinantne polimeraze DNK izolirane iz *Thermus aquaticus* (vse razen začetnih oligonukleotidov Fermentas Life Sciences; ZDA), 1 μ L matrične DNK in vodo (Sigma Aldrich, ZDA) do 25 μ L. DNK smo pomnoževali v cikličnem termostatu po programu, ki je prikazan v preglednici 3.

Preglednica 3: Protokol reakcije PCR, s katero smo pomnoževali dele genov za 16S rRNK za analizo T-RFLP

	T [°C]	Čas	Število ciklov
Začetna denaturacija	95	5 min	1
Denaturacija	95	30 s	25
Prileganje	54	30 s	
Podaljševanje	72	1 min 20 s	
Končno podaljševanje	72	10 min	1
Hlajenje	4	∞	-

Po koncu reakcije PCR smo preverili uspešnost pomnoževanja z gelsko elektroforezo v 1 % agaroznem gelu v 0,5 x pufru TBE.

Uporabili smo 1 % agarozni gel, 1 kb DNK lestvico (Gene Ruler, Fermentas) in z nalagalnim pufrom nanesti po 5 μ L pomnožka PCR. Gelska elektroforeza je potekala 35 minut pri 100 V in 400 mA. DNK pomnožke v gelu smo obarvali s fluorescenčnim barvilom etidijev bromid. Obarvan gel smo slikali pod UV svetlobo v transiluminatorju.

3.2.4.2 Čiščenje pomnožkov PCR

Čiščenje produktov PCR je potekalo po navodilih proizvajalca kompleta High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics GmbH, Nemčija). 20-im μ L pomnožka reakcije PCR smo dodali 500 μ L vezavnega puфра (angl. binding buffer) in premešali na vrtinčnem mešalu. Vse skupaj smo nato prenesli na filter iz kompleta za čiščenje pomnožkov PCR. Sledilo je centrifugiranje 1 minuto pri 13.000 x g. Vezavni pufer smo zavrgli, v kolono s filtrom pa smo dodali 500 μ L spiralnega puфра (angl. washing buffer) in ponovno centrifugirali 1 minuto pri 13.000 x g. Spiranje smo ponovili z 200 μ L spiralnega

pufra in centrifugirali pri istih pogojih. Nato smo filter prenesli v novo sterilno mikrocentrifugirko in dodali 50 μ L elucijskega pufra (angl. elution buffer) ter centrifugirali 1 minuto pri 13.000 x g. Filter smo zavrgli, očiščenim produktom PCR, ki so bili raztopljeni v elucijskem pufru, pa smo izmerili koncentracijo s spektrofotometrom NanoVue.

3.2.4.3 Cepitev DNK z restrikcijskimi endonukleazami tipa II

Za izvedbo molekularne tehnike T-RFLP moramo pomnožke PCR cepiti z ustreznim(i) restrikcijskim encimom. V našem delu smo uporabili tri različne restrikcijske endonukleaze (*Hae*III, *Hha*I in *Msp*I, Fermentas Life Sciences, ZDA) in nato primerjali rezultate. V sterilnih mikrocentrifugirkah smo pripravili reakcijske mešanice, ki so vsebovale 400 ng pomnožkov PCR. Končni volumen restrikcijskih mešanic je bil 30 μ L, od tega so bili 3 μ L 10 x ustreznega pufra, 1,5 μ L 10U/ μ L restriktaze, 400 ng pomnožka PCR in ostalo voda.

Restrikcija je potekala pri 37 °C preko noči, t.j. približno 16 ur. Po inkubaciji smo reakcijske mešanice segreli na 80 °C za 20 minut in tako inaktivirali restrikcijske endonukleaze. Po inaktivaciji smo encime odstranili s kompletom za čiščenje produktov PCR High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics GmbH, Nemčija) po navodilih proizvajalca. Uporabili smo enak protokol kot za čiščenje po verižni reakciji s polimerazo.

3.2.4.4 Analiza polimorfizma dolžin terminalnih restrikcijskih fragmentov

Metodo T-RFLP smo izvedli tako, da smo 5 μ L očiščenih in razrezanih pomnožkov PCR, ki so bili raztopljeni v elucijskem pufru, prenesli na mikrotitrsko ploščo in jim dodali 10 μ L deioniziranega formamida in 0,5 μ L internega standarda GenescanTM 500 ROXTM (Applied Biosystems, ZDA). Vzorce smo 3-5 minut denaturirali pri temperaturi 95 °C in jih nato ohladili na ledu. Vzorce smo analizirali s kapilarno elektroforezo ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems, ZDA). Postopek elektroforetske ločitve poteka v kapilarah iz

silicijevega dioksida, ki vsebujejo polimer POP6 (PE Applied Biosystems), in sicer pri visoki električni poljski jakosti.

3.2.4.5 Analiza T-RFLP profilov

Podatke, ki smo jih pridobili s kapilarno elektroforezo, smo vnesli v bioinformacijski program Bionumerics 5.1 (Applied Maths, Belgija). Podobnost T-RFLP profilov smo preverjali s Pearsonovim koeficientom korelacije. Dendrograme smo izrisali z metodo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic means, slovensko metoda neponderirane aritmetične sredine), pri tem pa smo fragmente, ki so bili krajši od 50 bp in daljši od 500 bp, izključili iz analize.

3.2.5 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v denaturirajočem gradientu – DGGE

3.2.5.1 Priprava pomnožkov PCR

Pripravili smo reakcije PCR s končnim volumnom reakcijskih mešanic 25 μ L. Posamezna reakcijska mešanica je vsebovala 2 μ L 1 x pufra PCR z dodanim KCl, 1,5 μ L 25 mM $MgCl_2$, 1,5 μ L 0,2 mM vseh deoksiribonukleotidov, 0,3 μ L 10x redčenega začetnega oligonukleotida HDA1-GC (nalega v 3' smeri kodirajoče verige) in isto količino začetnega oligonukleotida HDA2 (nalega v 5' smeri kodirajoče verige), 0,2 μ L 2,5 U/ μ L rekombinantne polimeraze DNK izolirane iz *Thermus aquaticus* (vse razen začetnih oligonukleotidov Fermentas Life Sciences; ZDA), 1 μ L matrične DNK in vodo (Sigma Aldrich, ZDA) do 25 μ L. DNK smo pomnoževali v cikličnem termostatu po programu, ki je prikazan v preglednici 4.

Preglednica 4: Protokol reakcije PCR, s katero smo pomnoževali dele genov za 16S rRNK za analizo DGGE

	T [°C]	Čas	Število ciklov
Začetna denaturacija	95	3 min	1
Denaturacija	95	30 s	30
Prileganje	58	30 s	
Podaljševanje	72	30 s	
Končno podaljševanje	72	5 min	1
Hlajenje	4	∞	-

3.2.5.2 Priprava poliakrilamidnih gelov in izvedba elektroforeze DGGE

Poliakrilamidne gele smo pripravili po navodilih proizvajalca aparature D GeneTM (Bio-Rad, ZDA). Poliakrilamidni gel za metodo DGGE pripravljamo iz dveh mešanic, ker je potrebno vzpostaviti gradient denaturanta. Kot denaturant smo uporabili ureo.

Založna raztopina 1 je vsebovala ureo in je bil pripravljena tako, da smo v stekleno čašo za tehtali 15,12 g 7 M uree, dodali 0,72 mL 50 x TAE pufra in 14,4 mL formamida. Uporabili smo že pripravljeno mešanico akrilamida in bisakrilamida (Sigma Aldrich, ZDA) v razmerju 37:1. Ureo smo popolnoma raztopili z mešanjem na magnetnem mešalu in z rahlim segrevanjem. Na koncu smo dolili še Milli-Q vodo do končnega volumna 36 mL in zmešali na mešalu.

Založna raztopina 2 ni vsebovala denaturanta. V 0,64 mL 50x TAE pufra smo dodali že pripravljeno mešanico akrilamida in bisakrilamida s končnim razmerjem 37:1 in dopolnili z Mili-Q vodo do 32 mL. Raztopino smo premešali na magnetnem mešalu. Do 32 mL smo dopolnili z Mili-Q vodo in premešali na magnetnem mešalu.

Nato smo v poliakrilamidnem gelu ustvarili 35 % do 65 % gradient denaturanta. Iz obeh založnih raztopin (opisano zgoraj) smo pripravili dve mešanici, tako da je bila v eni nižja koncentracija denaturanta (35 %), v drugi pa višja (65 %). Za raztopino z nižjo koncentracijo denaturacijskega gradienta smo zmešali 6,4 mL založne raztopine 1 in 9,6

mL založne raztopine 2. Za raztopino z višjim gradientom denaturanta pa smo zmešali 10,4 mL založne raztopine 1 in 5,6 mL založne raztopine 2.

Pred vlivanjem gela smo obema raztopinama dodali še 125 µL amonijevega persulfata in 5,2 µL TEMED-a. Gel smo vlili s pomočjo črpalke, ki izkorišča gravitacijo in z mešanjem obeh raztopin ustvari naraščajoči denaturacijski gradient. Pazljivo smo vstavili še glavnik, tako da v gelu ni bilo zračnih mehurčkov in pustili gel polimerizirati 3 ure. Po inkubaciji smo glavnik odstranili in žepke sprali z 1x pufrom TAE. Posodo, v kateri je potekala elektroforeza DGGE, smo napolnili z 1x pufrom TAE, ki smo ga segreli na 64 °C. Vzorcem smo dodali nalagalni pufer in jih prenesli v žepke poliakrilamidnega gela. DGGE elektroforeza je potekala 17 ur pri temperaturi 60 °C in konstantni napetosti 75 V.

Po končani elektroforezi smo gel previdno odstranili iz nosilnih steklenih plošč in ga prenesli v barvilo SYBR gold (Invitrogen SYBR gold nucleic acid gel stain, Molecular Probes), kjer se je barval 30 minut. Nato smo ga prenesli v destilirano vodo, kjer se je spiral 20 minut. DNK profil smo dokumentirali s sistemom za zajem slike ChemiGenius2 (Syngene, Velika Britanija), podatke pa smo analizirali v bioinformacijskem programu Bionumerics 5.1 (Applied Math, Belgija).

3.2.5.3 Analiza DGGE profilov

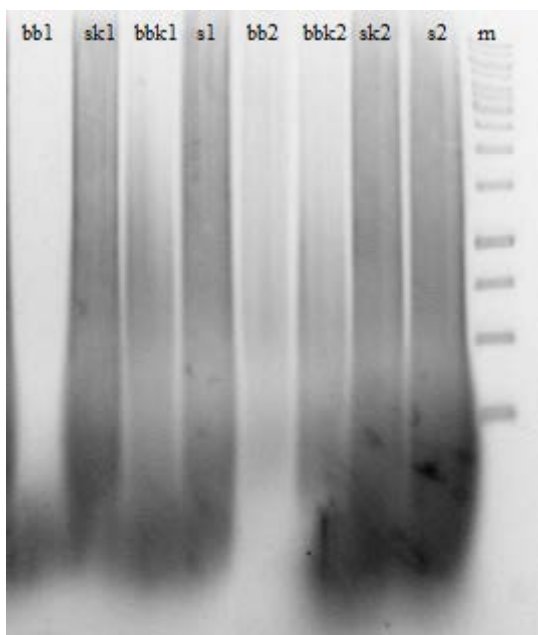
Sliko, ki smo jo dobili po končani poliakrilamidni gelski elektroforezi, smo vnesli v bioinformacijski program Bionumerics (Applied Maths, Belgija). Podobnost DGGE profilov smo preverjali s Pearsonovim koeficientom korelacije. Dendrograme smo izrisali z metodo UPGMA.

4 REZULTATI

DNK smo izolirali iz osemdesetih vzorcev vsebine piščančjega slepega črevesja. Pred izolacijo DNK smo iz vsakega vzorca pripravili tri alikvote. Ker smo želeli preveriti ponovljivost izbrane metode izolacije, smo iz dveh alikvotov izolirali DNK sočasno, iz tretjega pa naslednji dan.

4.1 PRIMERJAVA UČINKOVITOSTI RAZLIČNIH METOD ZA IZOLACIJO DNK

Najprej smo na manjšem številu vzorcev preizkusili več metod izolacije DNK, primerjali rezultate in se odločili za metodo, pri kateri smo presodili, da je bil izplen DNK največji. O tem smo se odločali na podlagi analize fotografij agaroznih gelov po gelski elektroforezi. Preizkusili smo različne načine razbijanja mikrobnih celičnih sten, po katerih smo nadaljevali z isto metodo izolacije DNK, t.j. z mešanico fenola in kloroforma. Za razbijanje celičnih sten smo uporabili kroglični stresalnik oziroma ultrazvočni razbijalec celic Soniprep 150. Preverili smo tudi učinkovitost dodajanja proteinaze K po razbijanju mikrobnih celičnih sten s krogličnim stresalnikom oz. ultrazvočnim dezintegratorjem. Po analizi rezultatov smo ugotovili, da dodajanje proteinaze K ne izboljša učinkovitosti metode izolacije in da je v obeh primerih fizikalnega razbijanja celičnih sten (s krogličnim stresalnikom in ultrazvočnim dezintegratorjem) izolirana DNK zelo fragmentirana (Slika 4). Ker smo z analizo rezultatov ocenili, da smo z ultrazvočno dezintegracijo izolirali nekaj več matrične DNK iz preučenih vzorcev, smo se odločili, da bomo v nadaljevanju dela za razbijanje mikrobnih celičnih sten uporabili omenjeno metodo.

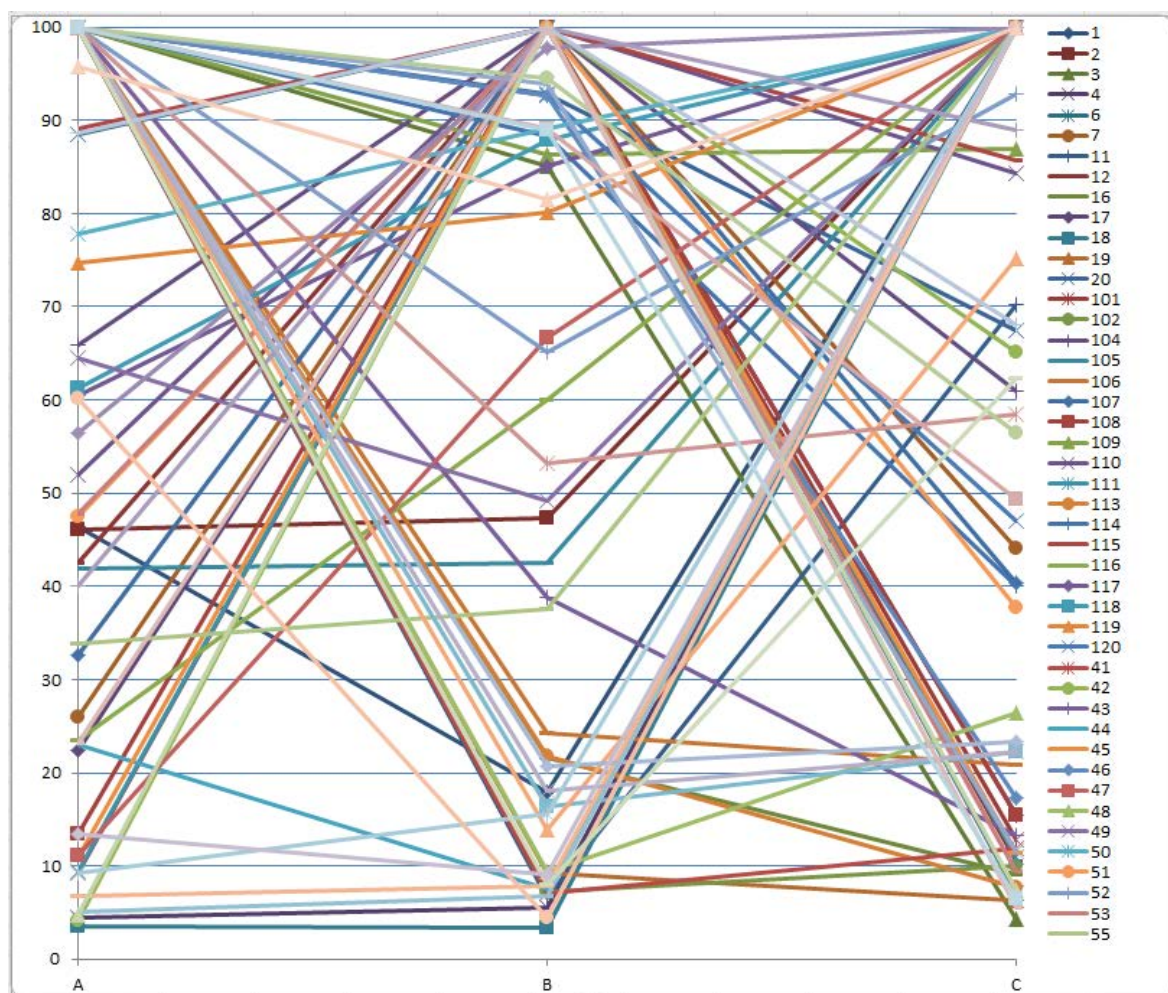


Slika 4: Fotografija 1 % agaroznega gela po gelski elektroforezi z izolirano matrično DNK. Elektroforeza je potekala 30 min pri 100 V, sledilo je 10 min barvanja v raztopini etidijevega bromida in 10 min razbarvanja v deionizirani vodi. M – velikostni standard (1 kb DNA ladder (2 μ L)); oznake nad linijami so oznake vzorcev; bb – izolacija s predhodno obdelavo celic s krogličnim stresalnikom, s – izolacija s predhodno obdelavo celic z ultrazvočnim dezintegratorjem, bbk – izolacija s predhodno obdelavo celic s krogličnim stresalnikom in dodatkom proteinaze K, sk – izolacija s predhodno obdelavo celic z ultrazvočnim dezintegratorjem in dodatkom proteinaze K. Števila ob oznakah predstavljajo različne vzorce. Na gel smo nanесли po 5 μ L izolirane DNK.

Uspešnost izolacije DNK po razbijanju celic z ultrazvočno dezintegracijo in obdelavo z detergentom cetil trimetil amonijevim bromidom (CTAB), fenolom in kloroformom, smo primerjali tudi z uspešnostjo izolacije DNK s komercialnimi kompleti za izolacijo DNK. Iz istih vzorcev je namreč v sklopu svoje doktorske disertacije DNK izoliral tudi Rok Novak (Novak, neobjavljeno). Pri svojem delu je uporabil dva kompleta za izolacijo DNK, in sicer QIAamp DNK Stool Mini Kit (QIAGEN, ZDA) in Maxwell-ov kit za izolacijo DNK (Promega, ZDA). Analiza rezultatov po gelski elektroforezi je pokazala, da je bila količina izolirane mikrobne DNK največja pri metodi izolacije s CTAB, fenolom in kloroformom po predhodni obdelavi celic z ultrazvočnim dezintegratorjem.

V nadaljevanju smo iz vseh 80. vzorcev oz. 240 alikvotov izolirali skupno mikrobno DNK z izbrano metodo. Ker smo želeli ugotoviti vpliv izvajalca izolacije DNK na uspešnost izolacije, smo iz dveh alikvotov vsakega vzorca izolirali DNK sočasno, iz tretjega pa v naslednjem dnevu. Po končanih izolacijah smo s spektrofotometrom izmerili koncentracijo pridobljene DNK in rezultate podali v preglednici, ki je prikazana v prilogi

A. Grafična predstavitev rezultatov na sliki 5 kaže, da je bila učinkovitost izplena mikrobne DNK v različnih vzorcih zelo različna in to neodvisno od tega, ali je bila mikrobna DNK izolirana iz dveh alikvotov istega vzorca v isti seriji ali naslednji dan.



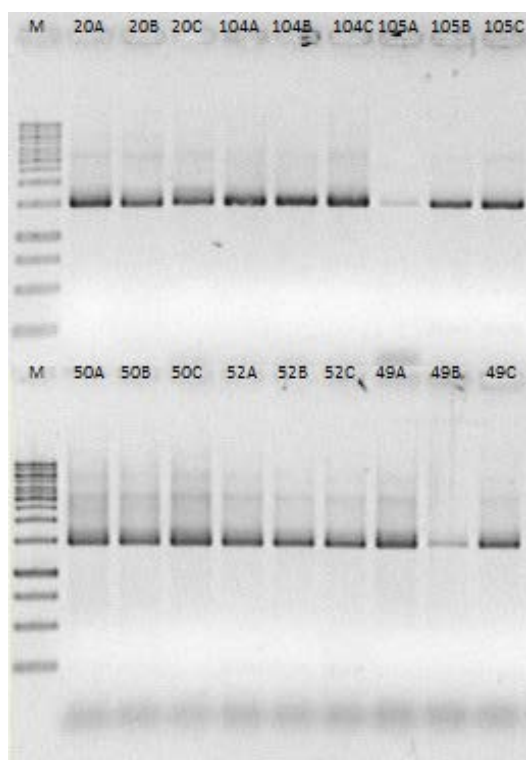
Slika 5: Učinkovitost izolacije mikrobne DNK iz alikvotiranih vzorcev piščančjih iztrebkov glede na dan izolacije. Oznaki A in B predstavljata alikvota vzorca, ki sta bila izolirana v istem dnevu, oznaka C pa predstavlja alikvot vzorca, ki je bil izoliran naslednji dan. Alikvotom z najvišjo koncentracijo izolirane DNK smo določili vrednost 100, drugima alikvotoma pa smo izračunali vrednost glede na vrednost najvišje koncentracije.

Ker smo ugotovili, da so razlike v učinkovitosti izplena pri različnih alikvotih istih vzorcev zelo velike, smo v nadaljevanju želeli ugotoviti, ali in kako uspešnost izolacije mikrobne DNK vpliva na rezultate molekularnih tehnik, ki smo jih nameravali uporabiti za analizo strukture mikrobnih združb v vzorcih. Zato smo iz vsake skupine piščancev (kontrolna,

testna) izbrali po tri vzorce in z uporabljenima molekularnima tehnikama (T-RFLP in DGGE) analizirali profile ribosomskih genov v njih. Za analizo smo izbrali vzorce, pri katerih je bila učinkovitost izolacije DNK med alikvoti čim bolj enaka. Iz kontrolne skupine smo izbrali vzorce z oznakami 20, 104 in 105, iz skupine piščancev, ki je imela v krmi dodan probiotik pa smo izbrali vzorce z oznakami 49, 50 in 52.

4.2 POMNOŽEVANJE ODSEKOV GENOV ZA 16S rRNA V IZBRANIH VZORCIH

Odseke genov za 16S rRNA iz skupne mikrobne DNK smo v verižni reakciji s polimerazo pomnoževali po protokolu, ki je zapisan v preglednici 3. Za vsak posamezen vzorec smo količino matrične DNK prilagodili na podlagi rezultatov, ki smo jih pridobili s spektrofotometričnim merjenjem koncentracije izolirane DNK. Uspešnost pomnoževanja v reakciji PCR smo preverili z gelsko elektroforezo v 1 % agaroznem gelu. Rezultati analize nekaterih izbranih vzorcev so prikazani na sliki 6.



Slika 6: Fotografija 1 % agaroznega gela po gelski elektroforezi s PCR pomnoženih odsekov genov za 16S rRNK. Elektroforeza je potekala 30 min pri 100 V, sledilo je 10 min barvanja v raztopini etidijevega bromida in 10 min razbarvanja v deionizirani vodi. M – velikostni standard (1 kb DNA ladder (2 μ L)); oznake nad linijami so oznake vzorcev oz. alikvotov. Na gel smo nanegli po 5 μ L pomnožka PCR.

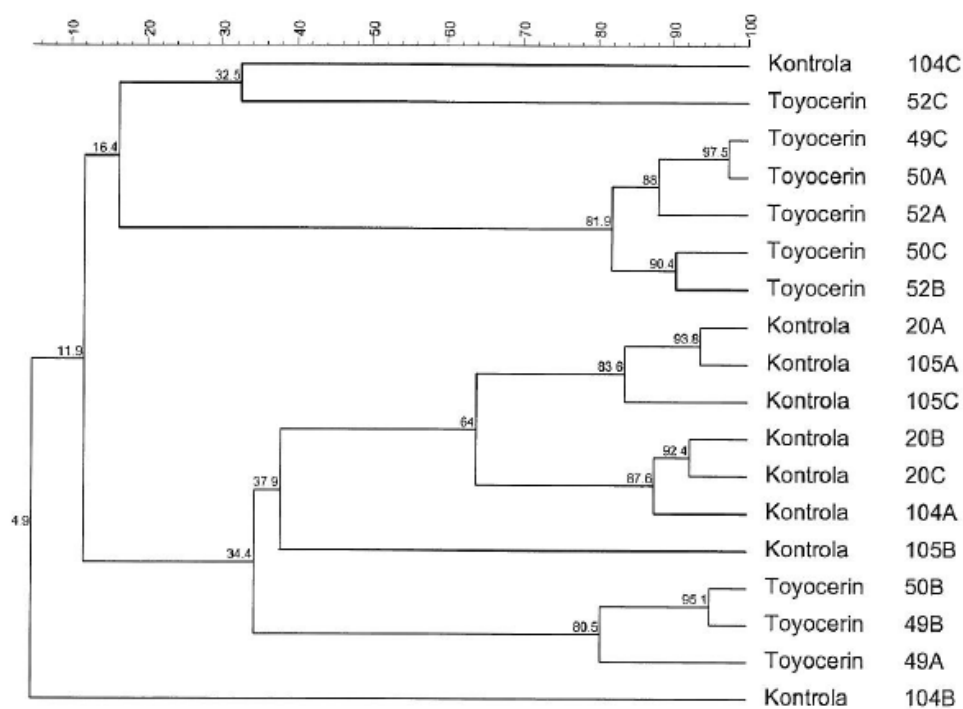
Sledila je priprava in inkubacija restrikcijskih mešanic. Delež posameznih reagentov za vsako reakcijo je podan v prilogi C za kontrolne vzorce in za vzorce s probiotikom.

Po restrikciji smo očiščene fragmente analizirali z metodama T-RFLP in DGGE in primerjali rezultate.

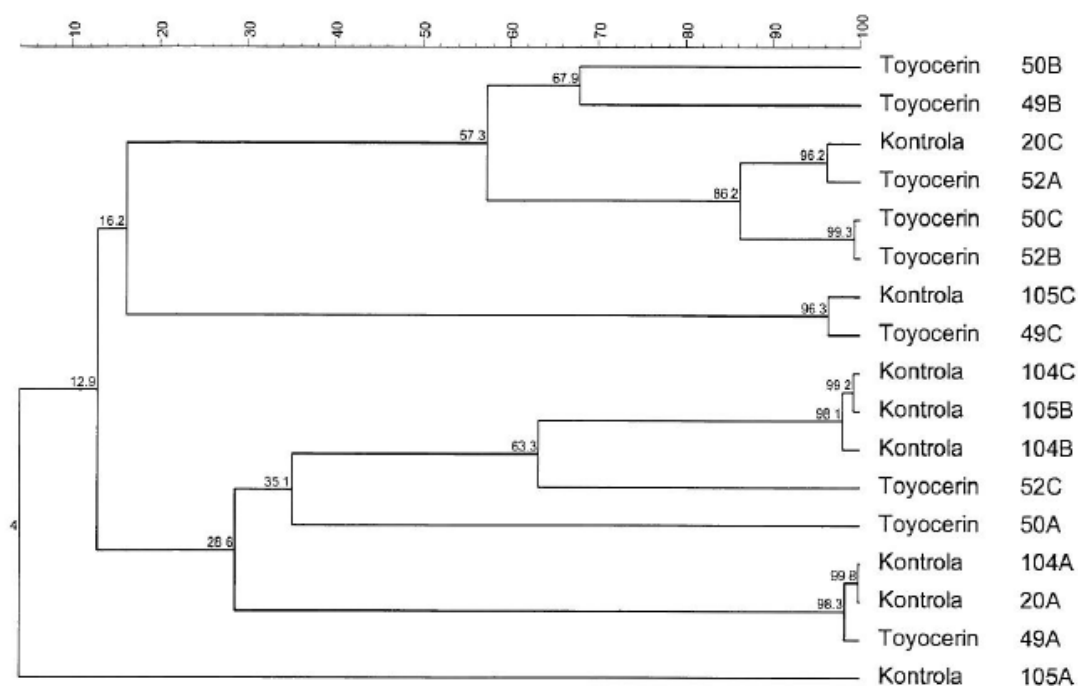
4.3 T-RFLP

Metodo T-RFLP smo izvedli na šestih izbranih vzorcih, ki so bili razdeljeni v 3 alikvote. Pred izvedbo T-RFLP je potrebno produkte PCR izpostaviti restrikcijskim endonukleazam. Uporabili smo encime *HaeIII*, *HhaI* in *MspI* (Fermentas, ZDA). Podobnost T-RFLP profilov smo preverjali s Pearsonovim koeficientom korelacije, dendrograme pa smo izrisali z metodo UPGMA. Analiza T-RFLP profilov, obdelanih z različnimi restrikcijskimi endonukleazami, je predstavljena na slikah 7, 8 in 9. Opazili smo, da pri

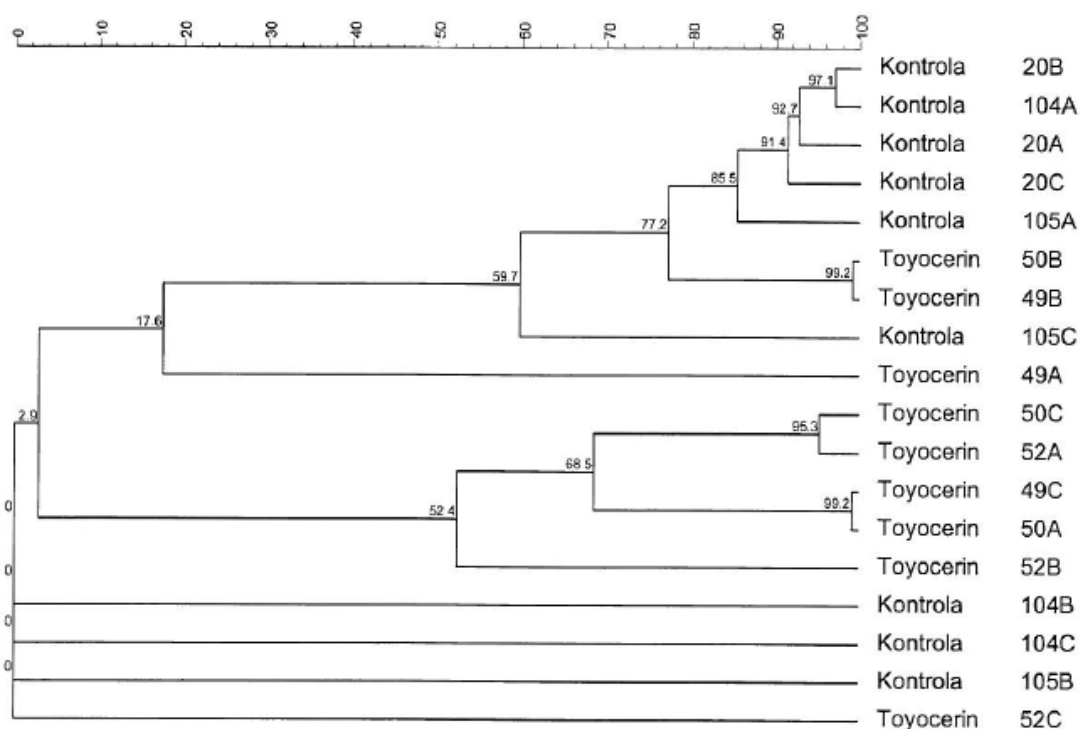
velikem številu vzorcev po cepitvi s *HaeIII* in *MspI* ni bilo vidnih profilov, kar pojasni velike razlike v podobnosti med vzorci.



Slika 7: Dendrogram analize metode T-RFLP za izbrane vzorce, ki so bili izpostavljeni restriktivnemu encimu *HhaI*.



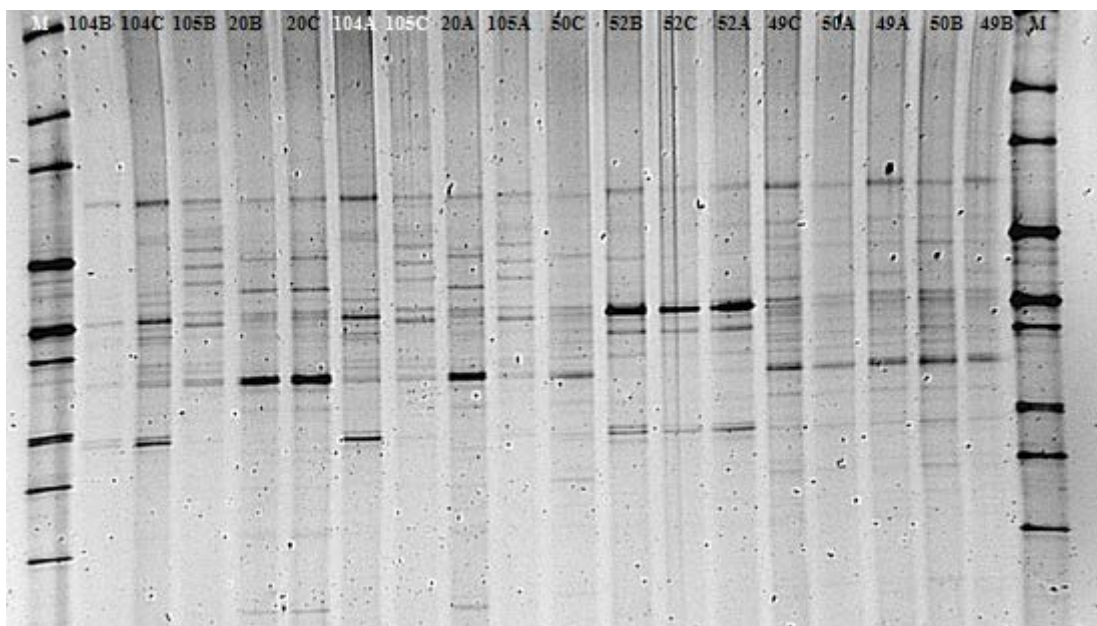
Slika 8: Dendrogram analize metode T-RFLP za izbrane vzorce, ki so bili izpostavljeni restriktivskemu encimu *HaeIII* (*BsuRI*).



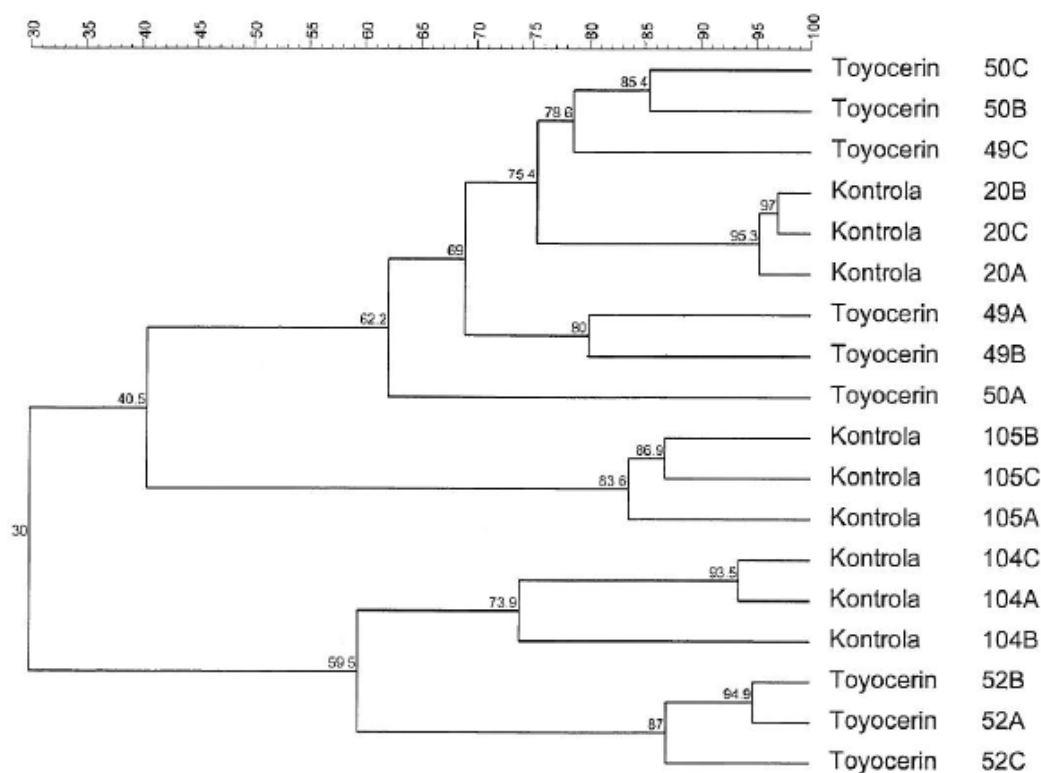
Slika 9: Dendrogram analize metode T-RFLP za izbrane vzorce, ki so bili izpostavljeni restriktivskemu encimu *MspI*.

4.4 DGGE

Za analizo vzorcev z metodo DGGE smo uporabili iste vzorce kot pri metodi T-RFLP. Skupaj torej 6 različnih vzorcev, ki so bili razdeljeni v 3 alikvote. Po izvedbi reakcije PCR smo produkte preverili s poliakrilamidno gelsko elektroforezo (Slika 10). Na sliki 11 je prikazan dendrogram analize vzorcev, izračunan s Pearsonovim koeficientom korelacije in izrisan z metodo UPGMA.

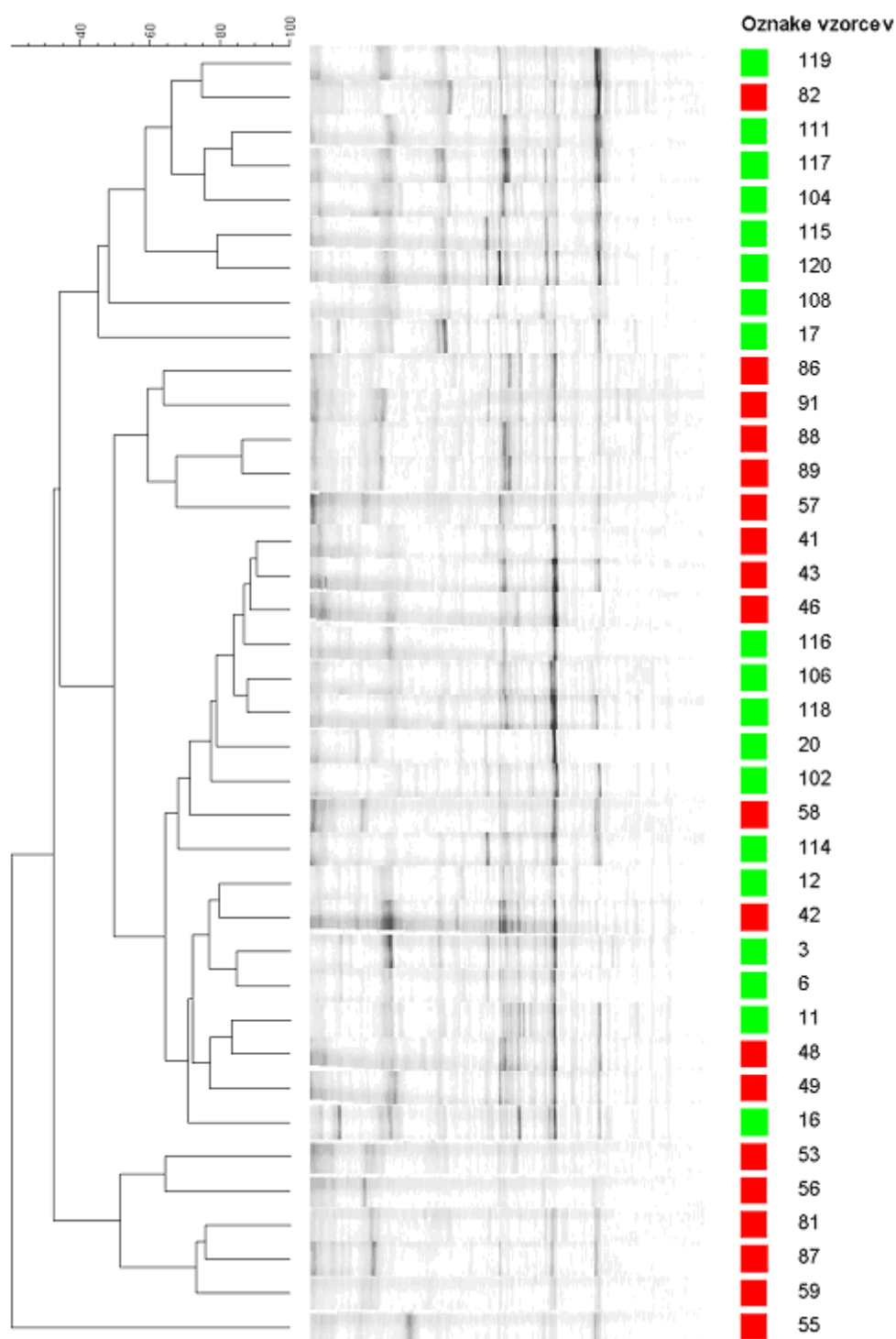


Slika 10: Prikaz poliakrilamidnega gela po izvedbi metode DGGE. Oznake nad linijami so oznake vzorcev oz. alikvotov.



Slika 11: Dendrogram analize metode DGGE za izbrane vzorce, izračunan s Pearsonovim koeficientom korelacije in izrisan z metodo UPGMA

Analiza je pokazala, da imajo alikvoti istega vzorca podobne profile, zaradi česar smo se odločili, da bomo z metodo DGGE primerjali mikrobne združbe prebavil še za preostale vzorce obeh skupin piščancev. Rezultati gelske elektroforeze na poliakrilamidnih gelih so priloženi v prilogi C. Dendrogram analize metode DGGE je prikazan na sliki 12. Izračunali smo ga s Pearsonovim koeficientom korelacije in izrisali z metodo UPGMA.



Slika 12: Dendrogram analize metode DGGE, izračunan s Pearsonovim koeficientom korelacije in izrisan z metodo UPGMA za vse vzorce. Številke predstavljajo oznake vzorcev. Zelena barva predstavlja vzorce iz kontrolne skupine, rdeča barva pa predstavlja vzorce iz skupine piščancev, ki je imela v krmi dodan probiotik Toyocerin.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Umestitev opravljenega dela v širši prehranski poskus

Rezultati prehranskega poskusa so pokazali večji prirast pri skupini poskusnih piščancev, ki je imela v krmi dodan probiotik Toyocerin (Novak Rok, neobjavljeno). Prav tako so zaznali spremembe v nivoju holesterola v krvnem serumu pri skupini, ki je bila krmljena z dodatkom probiotika. Povišana je bila koncentracija LDL in zmanjšana koncentracija HDL holesterola, kar je v mesni industriji nezaželeno. Probiotik je vplival tudi na fermentacijo v slepem črevesju, kar so zaznali z merjenjem koncentracije hlapnih maščobnih kislin. Ob zasnovi diplomske naloge smo se odločili, da bomo z molekularnimi tehnikami preverili spremembe v prebavni mikrobioti kontrolne skupine in skupine, ki je imela v krmi dodan probiotik. Zanimala nas je tudi primernost in ponovljivost izbrane metode osamitve DNK in primernost dveh molekularno tipizacijskih metod za ugotavljanje razlik v strukturah črevesne mikrobiote. V ta namen smo za vsak vzorec pripravili 3 alikvote. Pri dveh alikvotih smo izvedli izolacijo DNK isti dan, tretjo pa smo izolirali naslednji dan. Že med samim postopkom priprave vzorcev smo ugotovili kar nekaj kritičnih točk, zaradi katerih je lahko prišlo do odstopanj in razlik pri rezultatih.

Možne napake bi se lahko pojavile že pri pripravi alikvot, saj so nekateri vzorci piščančjega blata vsebovali trde, netopne delce, ki so se usedali na dno mikrocentrifugirk. Netopni delci so predstavljali določen delež fekalne mase pri izhodni redčitvi. Zaradi tega smo vsak vzorec pred odvzemom alikvot mešali na vrtničnem mešalu 5 minut in nato v najkrajšem možnem času izvedli alikvotacijo. V nadaljnjem postopku čiščenja alikvot s PBS pufrom je obstajala možnost, da bi del mikrobne populacije odlili s supernatantom. V izogib temu smo vsak vzorec z dodanim PBS pufrom centrifugirali 5 minut pri 6000 g. Upoštevati je potrebno tudi možnost kontaminacije PBS pufra in napake, ki se pojavijo med pipetiranjem, zaradi česar bi lahko pri nadaljnjih analizah vzorcev prišlo do odstopanj.

5.1.2 Izolacija DNK

Pri izolaciji DNK iz piščančjega blata smo uporabili metodo izolacije DNK z mešanico fenola in kloroforma, pri tem pa smo predhodno mikrobne celice obdelali na različne načine. Uporabili smo kroglični stresalnik in ultrazvočni dezintegrator. Glavni kriterij pri izbiri metode je bila količina izolirane DNK. Le-to smo preverili z gelsko elektroforezo in na podlagi slike 4 ugotovili, da je bil izplen DNK največji, kadar smo celice predhodno obdelali s sonifikatorjem in DNK nato ekstrahirali z mešanico fenola in kloroforma. Pri vzorcih, pri katerih smo celice obdelali s krogličnim stresalnikom, smo ob dodatku proteinaze K opazili večji izplen DNK, vendar še vedno manjši kot pri vzorcih, obdelanih z ultrazvočnim dezintegratorjem. Dodatek proteinaze K, pri vzorcih predhodno izpostavljenih delovanju ultrazvočnega dezintegratorja, ni bistveno vplival na izplen DNK. Iz slike agaroznega gela lahko razberemo, da je pri izbrani metodi izolirana DNK zelo fragmentirana, kar bi utegnilo vplivati na rezultate molekularnih tehnik.

Pri metodi izolacije DNK z mešanico fenola in kloroforma in obdelava celic z ultrazvočnim dezintegratorjem smo določili več kritičnih točk, zaradi katerih bi lahko prišlo do odstopanj med alikvoti istega vzorca. Do razlik bi lahko prišlo že med samo sonikacijo. Sonda, ki jo potopimo v vzorec, ustvarja močne mehanske vibracije, zaradi česar se v tekočini s celicami poviša pritisk in temperatura. Pri tem pa na udarno moč valov, ki posledično nastajajo, vpliva še položaj sonde. Do razlik med alikvoti istega vzorca, bi lahko prišlo zaradi različnega delovanja sonde, ki ima vpliv na izplen DNK in fragmentiranost DNK. V nadaljnjem postopku izolacije vzorcem dodamo kloroform, centrifugiramo, nato pa vodno fazo prenesemo v novo sterilno mikrocentrifugirko. Pri prenašanju vodne faze prihaja do razlik v količini prenesenega materiala in volumna vodne faze, pri vsakem vzorcu in njegovih ponovitvah. Podobna napaka se pojavi tudi v nadaljnjem postopku izolacije, ko vzorcem dodamo raztopino fenol-kloroform-izoamil alkohola, da odstranimo proteine, lipide in drugi organski material. Po dodatku fenol-kloroform-izoamil alkohola vzorec centrifugiramo, da se raztopina loči v dve fazi. Vodno fazo zatem prenesemo v novo mikrocentrifugirko, pri prenosu pa lahko spet prenesemo različne volumna vodne faze in s tem različno količino DNK.

5.1.3 T-RFLP

Preden smo primerjali strukturo mikrobnih združb obeh skupin vzorcev, smo želeli preveriti kakšna je podobnost med alikvoti istega vzorca. S tem smo naredili notranjo kontrolo poskusa, s katerim smo preverili primernost izbrane metode izolacije in s primerjavo obeh molekularnih tehnik, primernost same metode. Analizo T-RFLP profilov smo opravili na vseh alikvotih 6 izbranih vzorcev. Kriterij za izbiro vzorcev je bila podobna količina izolirane DNK pri vseh treh alikvotih. Uporabili smo 3 različne restrikcijske endonukleaze, in sicer *HaeIII*, *HhaI* in *MspI*. Rezultati analize T-RFLP profilov so pokazali velike razlike med alikvoti istega vzorca, neodvisno od izbire restrikcijske endonukleaze. Iz tega razloga je bila nadaljnja primerjava med vzorci obeh skupin nesmiselna. Pri encimih *MspI* in *HaeIII* smo naleteli še na dodatne težave, ker pri nekaterih vzorcih ni bilo vidnih T-RFLP profilov. Analiza profilov T-RFLP vzorcev, ki so bili cepljeni z restriktazo *HhaI*, je pokazala slabo ponovljivost izbrane metode izolacije DNK. Največ podobnosti je bilo med alikvoti vzorca z oznako 20, kjer je bila podobnost 64 %, najmanjša pa med alikvoti vzorca 104 z 4,9 % podobnostjo. Do takšnih razlik je lahko prišlo tudi zaradi napak, do katerih pride pri kritičnih točkah med postopkom osamitve DNK.

5.1.4 DGGE

Zanimalo nas je, ali so bili rezultati analize T-RFLP profilov posledica neprimerne metode izolacije DNK ali pa je bil problem v izbrani molekularni metodi, zato smo na istih vzorcih izvedli še DGGE. Analiza je pokazala, da imajo alikvote istega vzorca v tem primeru bolj podobne profile. Z izjemo alikvot 49C in 50A, so bili profili alikvot med seboj podobni v 73,9 % - 95,3 %. Od tega rezultata je najbolj odstopal vzorec z oznako 50A, ki je bil podoben drugima alikvotoma le v 62,2 %, medtem ko je vzorec 49C imel z drugima alikvotoma 69 % podobnost. Analiza DGGE profilov je pokazala, da so si strukture mikrobnih združb vzorcev iste serije podobne v povprečju v 77,4 %, če pa izjemi, ki sta izstopali, izključimo iz izračuna, pa v 87,5 %. Zaradi boljše ponovljivosti smo z metodo DGGE preverili strukture mikrobnih združb še pri ostalih vzorcih iz obeh skupin

piščancev. Rezultati te analize so predstavljeni na sliki 12. Iz dendrograma je razvidno, da se vzorci večinoma združujejo v gruče glede na prisotnost ali odsotnost probiotika v krmi, ni pa splošnega ločevanja v dve gruči na kontrolne vzorce in na vzorce piščancev, ki so imeli v krmi dodan probiotik. Zaradi tega lahko predvidevamo, da ima dodatek probiotika vpliv na strukturo mikrobne združbe. Upoštevati moramo, da je bila podobnost izračunana s Pearsonovim koeficientom korelacije, kar pomeni, da lahko ena močna lisa v profilu uvrsti vzorec med druge vzorce, ki sicer nimajo podobnega profila, vendar imajo prav tako podobno močno liso. To je vidno pri vzorcu z oznako 82, ki je sicer iz skupine piščancev, ki so imeli v krmi dodan probiotik. Profil vzorca 82 se vidno razlikuje od profilov kontrolnih vzorcev, katerim naj bi bil podoben.

5.2 SKLEPI

Pri preverjanju strukture mikrobnih združb se pogosto uporabljata molekularni metodi T-RFLP in DGGE. Rezultati naše diplomske naloge so pokazali, da je izbor metode izolacije DNK pomemben dejavnik, ki vpliva na rezultate molekularnih tehnik. Analiza T-RFLP profilov je pokazala velike razlike med profili alikvot istega vzorca. Metoda T-RFLP nam torej ni omogočala preučevanja strukture mikrobne združbe. Metoda DGGE se je pri tej nalogi izkazala kot primernejša. Rezultati so namreč pokazali veliko večjo podobnost med serijami izolacij istega vzorca. Vendar pa smo tudi pri tej metodi imeli dve izjemi, ki sta se razlikovali od drugih alikvotov. Analiza DGGE profilov vseh vzorcev kaže tudi na to, da probiotični dodatek vpliva na strukturo mikrobne združbe prebavil. Zaključimo torej lahko, da je izbrana metoda osamitve DNK bila primerna in ponovljiva. Izmed obeh molekularno tipizacijskih metod za ugotavljanje razlik v strukturah črevesne mikrobiote, je bila primernejša metoda DGGE.

Pri analizah mikrobnih združb bi bil potreben učinkovitejši metodološki pristop, ki bi upošteval napake, ki se lahko pojavijo v katerikoli fazi poskusa. Notranje kontrole poskusov bi tako zagotovile večjo verodostojnost predstavljenih rezultatov.

6 POVZETEK

Probiotiki koristno vplivajo na mikrobno ravnovesje v prebavnem traktu gostitelja in s tem posredno ali neposredno na njegovo zdravje, zato so pogosto predmet različnih raziskav. Naše delo se navezuje na prehranski poskus, v katerem so preučevali vpliv probiotika Toyocerin na rejske parametre gojenih piščancev. Zanimalo nas je, kako je probiotični dodatek vplival na spremembe v strukturi črevesne mikrobiote poskusnih živali. Diverziteto črevesne mikrobiote se danes raziskuje z molekularnimi metodami, pri katerih analiziramo skupno mikrobno DNK, ki jo izoliramo iz črevesne vsebine. Pri tem pa je izbira metode za osamitev DNK pomemben korak, saj le-ta lahko bolj ali manj vpliva na rezultate analiz molekularnih metod za preučevanje mikrobnih združb. Iz tega razloga smo preverjali ustreznost in ponovljivost izbrane metode za osamitev skupne mikrobne DNK in primernost dveh molekularno tipizacijskih tehnik za ugotavljanje razlik v strukturi črevesne mikrobiote pri piščancih iz kontrolne skupine in piščancih, ki so imeli v krmi dodan probiotik.

Iz vsakega vzorca piščančjega blata smo pripravili več alikvotov, iz katerih smo nato izolirali skupno mikrobno DNK. Ker smo želeli preveriti ponovljivost izbrane metode osamitve DNK, smo iz dveh alikvot izolirali DNK sočasno, iz tretjega pa naslednji dan. Preverjali smo tudi učinkovitost različnih metod razbijanja mikrobnih celičnih sten. Uporabili smo ultrazvočni dezintegrator in kroglični stresalnik. Preverjali smo tudi učinkovitost proteinaze K po razbijanju mikrobnih celičnih sten z ultrazvočnim dezintegratorjem in krogličnim stresalnikom. Analiza rezultatov je pokazala, da dodatek proteinaze K nima bistvenega vpliva na učinkovitost osamitve DNK in da je pri obeh metodah razbijanja mikrobnih celičnih sten DNK zelo fragmentirana. Na podlagi slike 4 smo ocenili, da smo z uporabo ultrazvočnega dezintegratorja izolirali več skupne mikrobne DNK. Iz tega razloga smo se odločili, da bomo nadaljevali z uporabo ultrazvočnega dezintegratorja. Po razbitju celičnih sten smo nadaljevali z metodo osamitve DNK, in sicer z obdelavo vzorcev s CTAB, fenolom in kloroformom. Po končanih izolacijah, smo s spektrofotometrom izmerili koncentracije izolirane DNK. Izkazalo se je, da je učinkovitost izplena mikrobne DNK zelo različna, neodvisno od tega ali je izolacija potekala sočasno

ali pa naslednji dan. Zanimalo nas je, ali bodo razlike v učinkovitosti izplena DNK imele vpliv na rezultate molekularnih tehnik, s katerimi smo želeli primerjati diverziteto črevesne mikrobiote piščancev iz tretirane in kontrolne skupine. V ta namen smo izbrali po tri vzorce iz vsake skupine in z molekularnima tehnikama T-RFLP in DGGE analizirali profile ribosomskih genov, ki smo jih predhodno pomnožili z reakcijo PCR. Glavni kriterij pri izbiri vzorcev je bila podobna koncentracija izolirane DNK v vseh treh alikvotih. Pred izvedbo T-RFLP smo pomnožke PCR izpostavili restrikcijskim endonukleazam. Uporabili smo encime *HaeIII*, *HhaI* in *MspI*. Podobnost profilov smo pri obeh metodah izračunali s Pearsonovim koeficientom korelacije, dendrograme pa smo izrisali z metodo UPGMA. Ugotovili smo, da sta uporabljeni metodi dali zelo različne rezultate. Kot bolj primerna metoda se je izkazala metoda DGGE. Analiza rezultatov metode T-RFLP je namreč pokazala velike razlike v strukturi mikrobioloških združb med alikvoti istega vzorca, rezultati analize metode DGGE pa so pokazali podobne profile mikrobnih združb med alikvoti istega vzorca. Iz tega razloga smo se odločili, da bomo z metodo DGGE primerjali strukturo črevesne mikrobiote vseh ostalih vzorcev iz kontrolne skupine in skupine, ki je imela v krmi dodan probiotik. Rezultati te analize so predstavljeni na sliki 12. Iz dendrograma je razvidno, da dodatek probiotika nima bistvenega vpliva na strukturo črevesne mikrobiote. Vzorci iz obeh skupin niso bili jasno ločeni v dve skupini. Razvidno pa je, da se vzorci večinoma združujejo v gruče glede na prisotnost ali odsotnost probiotika, kar kaže na to, da nek vpliv probiotka na črevesno mikrobioto vseeno obstaja.

7 VIRI

- Bates J. M., Mittge E., Kuhlman J., Baden K. N., Cheesman S. E., Guilleman K. 2006. Distinct signals from the microbiota promote different aspects of zebrafish gut differentiation. *Developmental Biology*, 297: 374 – 386.
- Chambers J. R., Gong J. 2011. The intestinal microbiota and its modulation for *Salmonella* control in chickens. *Food Research International*, 44, 10: 3149 – 3159.
- Dillon R. J., Dillon V. M. 2004. The gut bacteria of insects: Nonpathogenic interactions. *Annual Review of Entomology*, 46: 71 – 92.
- Fleischhacker M., Schmidt B., Weickmann S., Fersching D. M. I., Leszinski G. S., Siegele B., Stötzer O. J., Nagel D., Holdenrieder S. 2011. Methods for isolation of cell-free plasma DNA strongly affect DNA yield. *Clinica Chimica Acta*, 412, 23 – 24: 2085 – 2088.
- Galdeano C. M., Le Blanc A. M., Vinderola G., Bonet M. E., Perdígón G. 2007. Proposed model: Mechanisms of immunomodulation induced by probiotic bacteria. *Clinical and Vaccine Immunology*, 14, 5: 485 – 492.
- Ghadban G. S. 2002. Probiotics in broiler production - a review. *Archiv für Geflügelkunde*, 66: 49 - 58.
- Gong J., Si W., Jorster R. J., Huang R., Yu H., Yin Y., Yang C., Han Y. 2006. 16S rRNA gene-based analysis of mucosa-associated bacterial community and phylogeny in the chicken gastrointestinal tracts: from crops to ceca. *FEMS Microbiology Ecology*, 59: 147 – 157.

- Gong J., Yang C. 2012. Advances in the methods for studying gut microbiota and their relevance to the research of dietary fiber functions. *Food Research International*, 48, 2: 916 – 929.
- Hong J., Steiner T., Aufy A., Lien T. 2012. Effects of supplemental essential oil on growth performance, lipid metabolites and immunity, intestinal characteristics, microbiota and carcass traits in broilers. *Livestock Science*, 144, 3: 253-262.
- Jerman V., Avguštin G. 2010. Prebavna mikrobiota kot dejavnik pri razvoju debelosti. *Acta agriculturae Slovenica*, 96, 1: 27 – 36.
- Neilson J. W., Jordan F. L., Maier R. M. 2013. Analysis of artifacts suggests DGGE should not be used for quantitative diversity analysis. *Journal of Microbiological Methods*, 92, 3: 256 – 263.
- Nordgård L., Traavik T., Nielsen K. M. 2005. Nucleic acid isolation from ecological samples—Vertebrate gut flora. *Methods in Enzymology*, 395: 38 – 48.
- Novak R., Bogovič Matijašić B., Terčič D., Červek M., Gorjanc G., Holcman A., Levart A., Rogelj I. 2011. Effects of two probiotic additives containing *Bacillus* spores on carcass characteristics, blood lipids and cecal volatile fatty acids in meat type chickens. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 954: 424 - 433.
- Olsen K. N., Henriksen M., Bisgaard M., Nielsen O. L., Christensen H. 2008. Investigation of chicken intestinal bacterial communities by 16S rRNA targeted fluorescence *in situ* hybridization. *Antonie van Leeuwenhoek*, 94: 423 – 437.

- Osborn A. M., Moore E. R. B., Timmis K. N. 2000. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environmental Microbiology*, 2, 1: 39 – 50.
- Patterson J.A., Burkholder K.M. 2003. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poultry Science*, 82: 627–631.
- Rawls J. F., Samuel B. S., Gordon J. I. 2004. Gnotobiotic zebrafish evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101, 13: 4596 – 4601.
- Schrezenmeir J., de Vrese M. 2001. Probiotics, prebiotics and synbiotics – approaching a definition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73: 361S – 364S.
- Sen S., Ingale S. L., Kim Y. W., Kim J. S., Kim K. H., Lohakare J. D., Kim E. K., Kim H. S., Ryu M. H., Kwon I. K., Chae B. J. 2011. Effect of supplementation of *Bacillus subtilis* LS 1-2 to broiler diets on growth performance, nutrient retention, caecal microbiology and small intestinal morphology. *Research in Veterinary Science*, 93, 1: 264 - 268.
- Shutter M. E., Dick R. P. 2000. Comparison of fatty acid methyl ester (FAME) methods characterizing microbial communities. *Soil Science Society of America Journal*, 64: 1659 – 1668.
- Smith K., McCoy K.D., Macpherson A.J. 2007. Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. *Seminars in Immunology*, 19: 59-69.
- Stanley D., Geier S. M., Denman E. S., Haring V. R., Crowley T. M., Hughes R. J., Moore R. J. 2013. Identification of chicken intestinal microbiota correlated with the efficiency of energy extraction from feed. *Veterinary Microbiology*, 6093: 121 – 129.

- Tang J., Zeng Z., Wang H., Yang T., Zhang P., Li Y., Zhang A., Fan W., Zhang Y., Yang X., Zhao S., Tian G., Zou L. 2008. An effective method for isolation of DNA from pig faeces and comparison of five different methods. *Journal of Microbiological Methods*, 75, 3: 432 – 436.
- Lee J. H., Park Y., Choi J. R., Lee E. K., Kim H. S. 2010. Comparison of three automated systems for genomic DNA extraction in a clinical diagnostic laboratory. *Yonsei Medical Journal*, 51, 1: 104 – 110.
- Lucchini V. 2003. AFLP: a useful tool for biodiversity conservation and management. *Comptes Rendus Biologies*, 326: 43 – 48.
- Vasiljevic T., Shah N. P. 2008. Probiotics – from Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*, 18: 714 – 728.
- Zhou H., Gong J., Brisbin J. T., Yu H., Sanei B., Sabour P., Sharif S. 2007. Appropriate chicken sample size for identifying the composition of broiler intestinal microbiota affected by dietary antibiotics, using the polymerase chain reaction - denaturing gradient gel electrophoresis technique. *Poultry Science*, 86: 2541 – 2549.
- Zhu X. Y., Zhong T., Pandya Y., Joerger fR. D. 2002. 16S rRNA-based analysis of microbiota from the cecum of broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 124 – 137.

ZAHVALA

Zahvalil bi se rad vsem zaposlenim na Rodici, na Katedri za mikrobiologijo in mikrobno biotehnologijo, še posebej mojemu mentorju prof. dr. Gorazd Avguštinu in delovni mentorici dr. Lijani Fanedl, ki sta me vodila in mi pomagala pri diplomski nalogi.

Hvala mojima staršema, ki sta me podpirala tekom študija in me vzpodbujala, da sem uspešno zaključil z univerzitetno izobrazbo.

Največja zahvala pa moji Anji, ki mi je stala ob strani tudi ob težkih trenutkih. Hvala za potrpežljivost, podporo in brezpogojno ljubezen. Mala Gaja in Maks imata najboljšo mamico na svetu, jaz pa najboljšo punco!

PRILOGE

Priloga A: Koncentracije 10 x redčene izolirane DNK vzorcev iz kontrolne skupine in skupine, ki je imela v krmi dodan probiotik.

Oznaka vzorca	Koncentracija [ng/ μ L]			Delež [%]		
	A	B	C	A	B	C
1	292	113	629	46,4	18,0	100,0
2	35	36	76	46,1	47,4	100,0
3	603	513	26	100,0	85,1	4,3
4	44	55	996	4,4	5,5	100,0
6	453	512	36	88,5	100,0	7,0
7	13	50	22	26,0	100,0	44,0
11	572	38	402	100,0	6,6	70,3
12	346	815	86	42,5	100,0	10,6
16	485	105	44	100,0	21,6	9,1
17	165	734	113	22,5	100,0	15,4
18	35	34	1013	3,5	3,4	100,0
19	272	25	17	100,0	9,2	6,3
20	562	522	379	100,0	92,9	67,4
101	122	1091	139	9,3	100,0	12,7
102	620	45	62	100,0	7,3	10,0
104	135	205	125	65,9	100,0	61,0
105	64	65	153	41,8	42,5	100,0
106	508	123	106	100,0	24,2	20,9
107	98	300	121	32,7	100,0	40,3
108	96	717	111	13,4	100,0	15,5
109	160	138	139	100,0	86,3	86,9
110	133	256	216	52,0	100,0	84,4
111	116	1233	135	9,4	100,0	10,9
113	644	140	50	100,0	21,7	7,8
114	265	234	106	100,0	88,3	40,0
115	106	119	102	89,1	100,0	85,7
116	57	146	243	23,5	60,1	100,0
117	328	461	542	60,5	85,1	100,0
118	188	270	307	61,2	87,9	100,0
119	573	615	767	74,7	80,2	100,0
120	298	276	140	100,0	92,6	47,0
41	531	38	63	100,0	7,2	11,9
42	28	674	439	4,2	100,0	65,1
43	474	184	63	100,0	38,8	13,3
44	64	21	278	23,0	7,6	100,0

Se nadaljuje.

Nadaljevanje Priloge A: Koncentracije 10 x redčene izolirane DNK vzorcev iz obeh skupin

Oznaka vzorca	Koncentracija [ng/ µL]			Delež [%]		
	A	B	C	A	B	C
45	63	579	66	10,9	100,0	11,4
46	473	438	82	100,0	92,6	17,3
47	64	386	579	11,1	66,7	100,0
48	443	42	117	100,0	9,5	26,4
49	517	394	801	64,5	49,2	100,0
50	840	962	1079	77,8	89,2	100,0
51	29	61	23	47,5	100,0	37,7
52	83	54	77	100,0	65,1	92,8
53	153	320	30	47,8	100,0	9,4
55	138	153	408	33,8	37,5	100,0
56	26	45	46	56,5	97,8	100,0
57	360	59	80	100,0	16,4	22,2
58	246	34	185	100,0	13,8	75,2
59	803	754	93	100,0	93,9	11,6
81	94	50	55	100,0	53,2	58,5
82	200	189	113	100,0	94,5	56,5
83	18	45	40	40,0	100,0	88,9
84	48	65	957	5,0	6,8	100,0
85	65	75	952	6,8	7,9	100,0
86	620	128	145	100,0	20,6	23,4
87	83	74	41	100,0	89,2	49,4
88	28	586	43	4,8	100,0	7,3
89	293	53	65	100,0	18,1	22,2
90	49	83	530	9,2	15,7	100,0
91	547	40	908	60,2	4,4	100,0
92	345	389	265	88,7	100,0	68,1
93	209	903	50	23,1	100,0	5,5
95	274	22	171	100,0	8,0	62,4
96	62	42	460	13,5	9,1	100,0
97	804	715	52	100,0	88,9	6,5
98	135	115	141	95,7	81,6	100,0

Priloga B1: Izmerjene koncentracije očiščenih pomnožkov PCR v ng/ μ L za vzorce s probiotikom.

Vzorec št.	49A	49B	49C	50A	50B	50C	52A	52B	52C
1. meritev	184	116	187	147	42	116	127	32	36
2. meritev	102	155	139	121	43	136	145	46	30
3. meritev	105	157	134	-	-	-	-	41	40
Povprečje	130	143	153	134	43	126	136	40	35

Priloga B2: Izmerjene koncentracije očiščenih pomnožkov PCR v ng/ μ L za kontrolne vzorce.

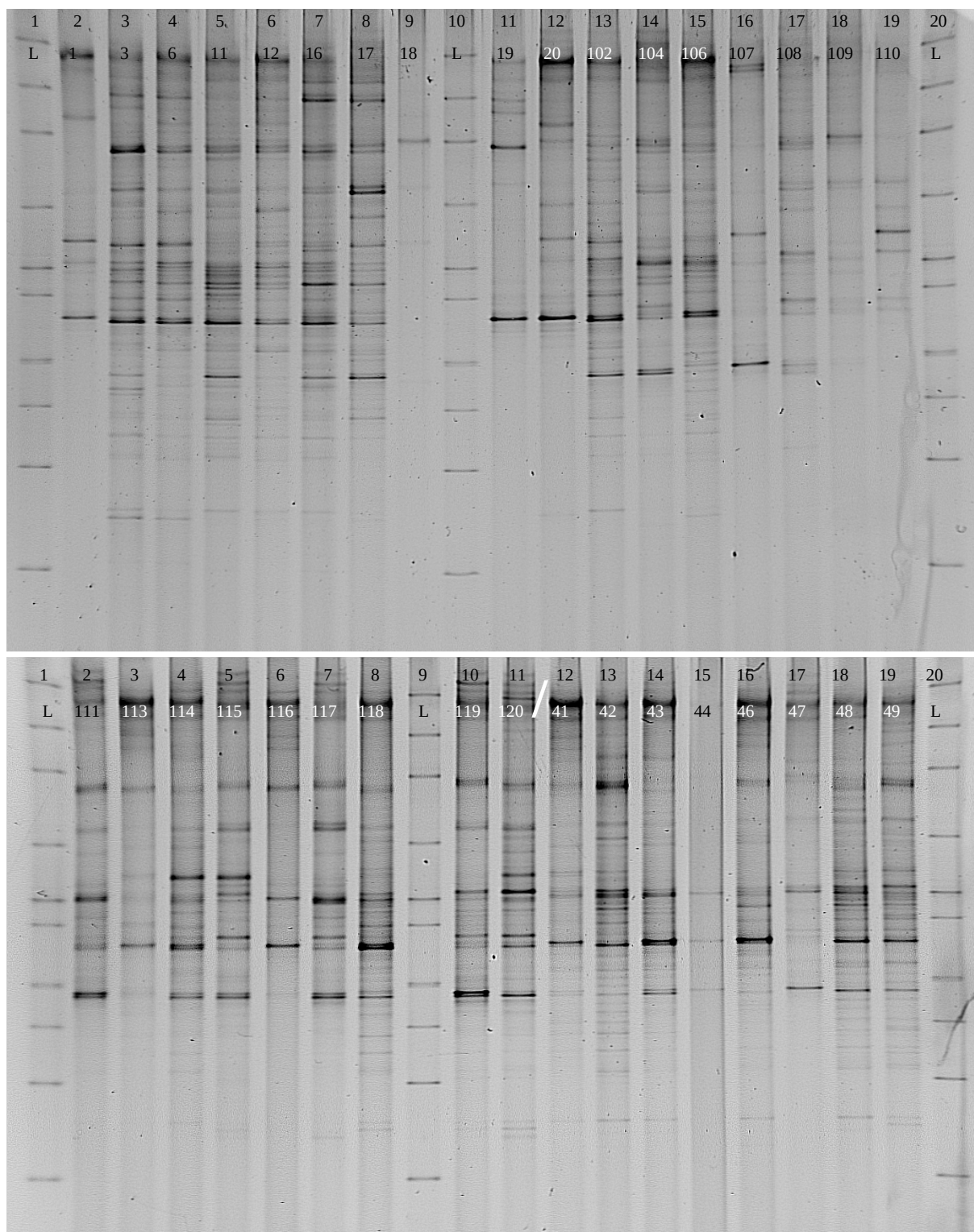
Vzorec št.	20A	20B	20C	104A	104B	104C	105A	105B	105C
1. meritev	54	95	98	144	63	122	151	95	136
2. meritev	81	81	95	143	54	192	85	115	125
3. meritev	64	-	-	-	-	170	95	-	-
Povprečje	66	88	96	143	58	161	110	105	130

Priloga C1: Sestava reakcijskih mešanic za kontrolne vzorce.

Vzorec številka	20A	20B	20C	104A	104B	104C	105A	105B	105C
Restriksijski pufer (10x)	3	3	3	3	3	3	3	3	3
restriktaza (10 ng/ μ L)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Sigma H ₂ O	19,5	21,0	21,4	22,7	18,7	23,0	21,9	21,7	22,4
DNK (400 ng)	6,0	4,5	4,1	2,8	6,8	2,5	3,6	3,8	3,1

Priloga C2: Sestava reakcijskih mešanic za vzorce, ki so bili izolirani iz skupine piščancev, ki je imela v krmi dodan probiotik.

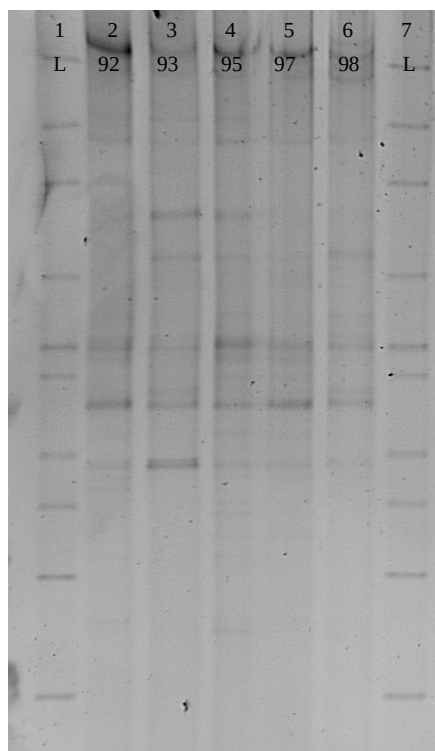
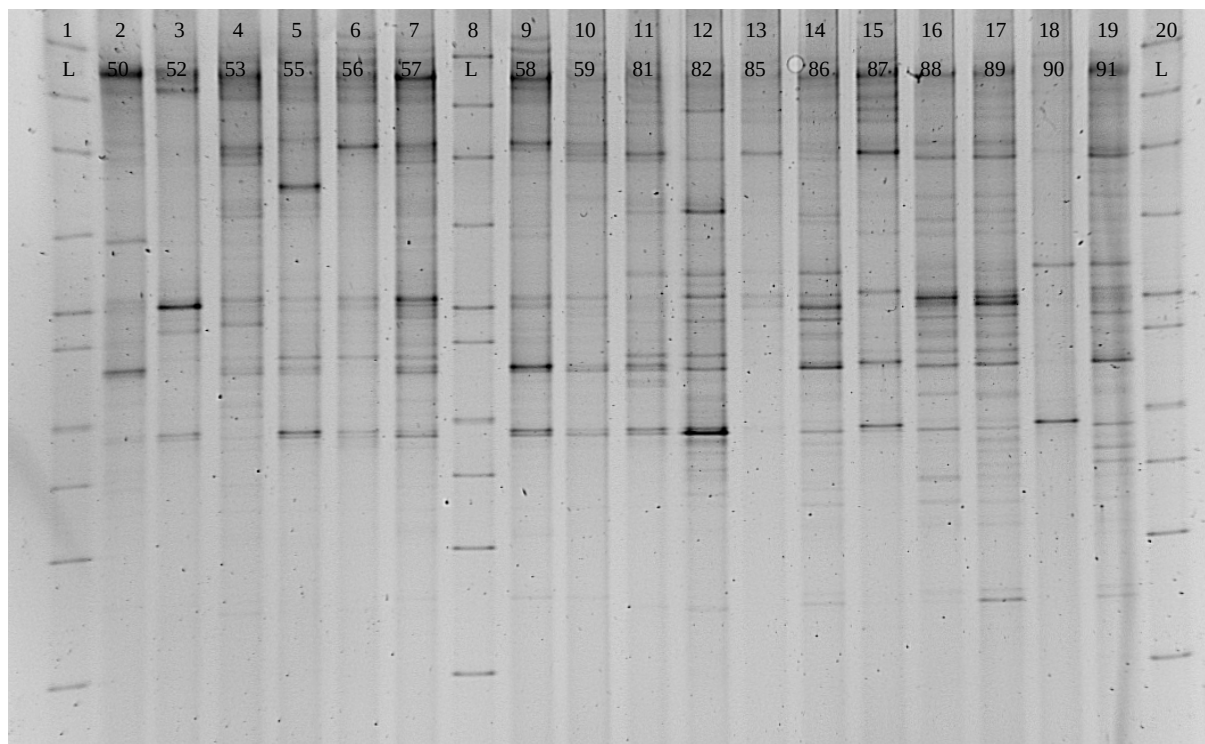
Vzorec številka	49A	49B	49C	50A	50B	50C	52A	52B	52C
Restriksijski pufer (10x)	3	3	3	3	3	3	3	3	3
restriktaza (10 ng/ μ L)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Sigma H ₂ O	22,4	22,7	22,9	22,5	16,1	22,3	22,6	15,4	14,2
DNK (400 ng)	3,1	2,8	2,6	3,0	9,4	3,2	2,9	10,1	11,3



Priloga D: Rezultat analize metode DGGE, fotografija poliakrilamidnega gela. Prva vrstica označuje številko kolone na DGGE gelu, druga vrstica oznako vzorca, L – velikostni standard (1 kb DNA ladder (2 μ L)).

Se nadaljuje.

Nadaljevanje priloge D.



Priloga D: Rezultat analize metode DGGE, fotografija poliakrilamidnega gela. Prva vrstica označuje številko kolone na DGGE gelu, druga vrstica oznako vzorca, L – velikostni standard (1 kb DNA ladder (2 μ L)).