

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Sandi PUŠNIK

**VALIDACIJA METODE PMA RT-PCR ZA
UGOTAVLJANJE ŠTEVILA *LACTOBACILLUS*
ACIDOPHILUS LA-5 IN *BIFIDOBACTERIUM*
ANIMALIS SSP. *LACTIS* BB-12 V LIOFILIZIRANIH
PROBIOTIČNIH IZDELKIH**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Sandi PUŠNIK

**VALIDACIJA METODE PMA RT-PCR ZA UGOTAVLJANJE
ŠTEVILA *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* LA-5 IN
BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS SSP. *LACTIS* BB-12 V
LIOFILIZIRANIH PROBIOTIČNIH IZDELKIH**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij- 2. stopnja Mikrobiologija

**VALIDATION OF A PMA RT-PCR METHOD FOR THE
ENUMERATION OF *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* LA-5 AND
BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS SSP. *LACTIS* BB-12 IN
LYOPHILISED PROBIOTIC PRODUCTS**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes: Field Microbiology

Ljubljana, 2013

Magistrsko delo je zaključek Magistrskega študijskega programa 2. stopnje Mikrobiologija. Delo je bilo opravljeno v laboratoriju Mikrobiološka kontrola farmacevtske družbe Lek d.d. v Ljubljani in na Katedri za mikrobiologijo in mikrobno biotehnologijo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Po sklepu komisije za študij 1. in 2. stopnje z dne 31.5.2012 je bil za mentorja magistrskega dela imenovan doc. dr. Tomaž Accetto, za somentorico dr. Mateja Kramer in za recenzenta prof. dr. Miroslav Petrovec.

Mentor: doc. dr. Tomaž Accetto
Somentorica: dr. Mateja Kramer
Recenzent: prof. dr. Miroslav Petrovec

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Peter Raspor
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: doc. dr. Tomaž Accetto
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: dr. Mateja Kramer
Farmacevtska družba Lek d.d.

Član: prof. dr. Miroslav Petrovec
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

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

Sandi Pušnik

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2
DK UDK 577.2.083+579.2.083(043)=163.6
KG probiotiki/*Bifidobacterium animalis*/*Lactobacillus acidophilus*/molekularne tehnike/metoda PMA RT PCR/validacija metod/liofilizirani izdelki
AV PUŠNIK, Sandi, dipl. biol. (UN)
SA ACCETTO, Tomaž (mentor) / KRAMER, Mateja (somentorica) / PETROVEC, Miroslav (recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije
LI 2013
IN VALIDACIJA METODE PMA RT-PCR ZA UGOTAVLJANJE ŠTEVILA *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* LA-5 IN *BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS* SSP. *LACTIS* BB-12 V LIOFILIZIRANIH PROBIOTIČNIH IZDELKIH
TD Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija)
OP XIV, 78 str., 34 pregl., 30 sl., 6 pril., 57 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Probiotične bakterije ali probiotiki so živi organizmi, ki, če jih zaužijemo v zadostnih količinah, pozitivno vplivajo na gostiteljev organizem. Nahajajo se v fermentiranih izdelkih, kot sta jogurt in sir, ter predstavljajo zelo pomemben delež človekove naravne črevesne mikrobiote. Največkrat omenjene in uporabljene probiotične bakterije pripadajo rodovoma *Bifidobacterium* in *Lactobacillus*. V farmacevtski industriji je uporaba razširjena predvsem v obliki liofiliziranih probiotičnih izdelkov. Probiotiki se v zdravstvu uporabljajo z namenom podporne terapije z antibiotiki, ki porušijo črevesno mikrobno združbo in povečajo tveganje za nastanek kasnejših okužb. Ker tradicionalne metode za ugotavljanje ustrezne kakovosti probiotičnih izdelkov temeljijo predvsem na gojenju bakterij, ki je velikokrat težavno in nenatančno, je vse večja potreba po novih, zmogljivejših in hitrejših metodah. Magistrska naloga se osredotoča na oceno, oziroma primerjavo klasične in molekularne metode za ugotavljanje števila probiotičnih bakterij, v liofiliziranih izdelkih. Izvedli smo validacijo metode PMA RT PCR in jo z ekvivalenco primerjali s klasično gojitveno metodo. V okviru validacije smo preverili točnost, linearnost, ekvivalenco, mejo detekcije in kvantifikacije, specifičnost, ponovljivost ter robustnost. Ugotovili smo, da v nobenem od parametrov metoda ne presega dovoljene meje odstopanj, predpisane s strani ameriške farmakopeje in je primerna za podporo tradicionalni uveljavljeni metodi posrednega štetja probiotičnih bakterij. Metoda PMA Real Time PCR je molekularna metoda, s katero je mogoče hitrejša in zanesljivejša ugotavljanje *Lactobacillus acidophilus* LA-5 in *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12 v liofiliziranih probiotičnih izdelkih.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2
DC UDC 577.2.083+579.2.083(043)=163.6
CX probiotics/*Bifidobacterium animalis*/*Lactobacillus acidophilus*/ molecular techniques/PMA RT PCR method/validation/lyophilized products
AU PUŠNIK, Sandi, dipl. biol. (UN)
AA ACCETTO, Tomaž (supervisor) / KRAMER, Mateja (co-advisor) / PETROVEC, Miroslav (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology
PY 2013
TY VALIDATION OF A PMA RT-PCR METHOD FOR THE ENUMERATION OF *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* LA-5 AND *BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS* SSP. *LACTIS* BB-12 IN LYOPHILISED PROBIOTIC PRODUCTS
DT M. SC. THESIS (Master Study Programmes: Field Microbiology)
NO XIV, 78 p., 34 tab., 30 fig., 6 ann., 57 ref.
LA sl
Al sl/en
AB Probiotic bacteria or probiotics are living organisms which, when consumed in sufficient quantity, have a positive impact on the host organism. The most frequently-mentioned and used probiotic bacteria belong to genera *Bifidobacterium* and *Lactobacillus*. In the pharmaceutical industry the most common use of probiotics is in the form of lyophilized products. As the old methods are based primarily on cultivation of bacteria which is a difficult and time consuming task, demand for new, faster and more efficient approaches has increased. To ensure adequate quality of probiotic products in the fast paced pharmaceutical industry the use of new, rapid and more efficient methods is essential. Master's thesis focuses on the evaluation and comparison of methods for the enumeration of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12, used in probiotic lyophilized products. In the thesis, the comparison of two molecular methods for the enumeration of probiotic bacteria has been done, namely PMA Real Time PCR and classic indirect method of counting bacteria. Selected methods were compared and analyzed, using equivalence as a standard validation criterion. The validation of the method PMA Real Time PCR has been done using the standard validation criteria such as accuracy, linearity, equivalence, limit of detection and quantitation, specificity, reproducibility, and robustness. Proposed and analyzed method PMA Real Time PCR does not exceed the well-established and rigorous validation limits in pharmaceutical industry in any of the selected validation criteria. Based on the evaluation results, it can be concluded that PMA Real Time PCR can be used to support the well-established indirect method of counting bacteria.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	IX
KAZALO SLIK	XI
KAZALO PRILOG	XII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	XIII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO	3
2.2 METODA PCR V REALNEM ČASU	3
2.2.1 Ugotavljanje števila probiotikov z metodo PCR v realnem času	3
2.3 PROBIOTIČNE BAKTERIJE	4
2.3.1 Rod <i>Lactobacillus</i>	5
2.3.1.1 <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5	6
2.3.2 Rod <i>Bifidobacterium</i>	6
2.3.2.1 <i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i> BB-12	7
2.3.3 Mehanizmi delovanja probiotikov	7
2.3.4 Prebiotiki	9
2.4 KAKOVOST PROBIOTIKOV	10
2.5 METODA ŠTETJA NA PETRIJEVIH PLOŠČAH	10
2.6 METODA ŠTETJA S PMA RT PCR.....	10
2.7 UGOTAVLJANJE ŽIVOSTI VZORCA.....	10
2.7.1 Propidijev monoazid.....	11
2.7.2 Pojem živosti bakterijskih celic	11
2.8 VALIDACIJA MOLEKULARNE METODE	11
2.8.1 Točnost.....	11
2.8.2 Ponovljivost	12
2.8.3 Specifičnost.....	12
2.8.4 Meja detekcije	12
2.8.5 Meja kvantifikacije.....	12

2.8.6	Linearnost	12
2.8.7	Ekvivalenca	12
2.8.8	Robustnost	13
3	MATERIAL IN METODE	14
3.1	MATERIALI	14
3.1.1	Bakterijski sevi	14
3.1.2	Vzorci	14
3.1.3	Gojišča za rast uporabljenih bakterij	14
3.1.4	Reagenti in raztopine	16
3.1.4.1	Pufri, raztopine in barvila	16
3.1.4.2	Propidijev monoazid.....	16
3.1.4.3	Antibiotiki.....	17
3.1.4.4	Ročna izolacija DNA.....	17
3.1.4.5	Avtomatizirana izolacija DNA	18
3.1.4.6	RT PCR.....	19
3.1.4.7	Začetni oligonukleotidi.....	20
3.1.5	Laboratorijski pribor in oprema	21
3.2	METODE	23
3.2.1	Gojitvene tehnike	23
3.2.2	Pregled bakterij z mikroskopom	23
3.2.3	Neposredno štetje bakterij z mikroskopom	24
3.2.4	Cepitev DNA z restrikcijsko endonukleazo	24
3.2.4.1	Ročna izolacija DNA.....	24
3.2.4.2	Pomnoževanje DNA za gen 16S rRNK z metodo verižne reakcije s polimerazo	25
3.2.4.3	Čiščenje DNA po pomnoževanju	26
3.2.4.4	Priprava agaroznega gela.....	27
3.2.4.5	Nanos vzorca	27
3.2.4.6	Barvanje agaroznega gela.....	27
3.2.4.7	Cepitev DNA z restrikcijsko endonukleazo <i>TaqI</i>	27
3.2.5	Načrtovanje začetnih oligonukleotidov	28
3.2.6	Metoda PMA Real Time PCR	32
3.2.6.1	Priprava standarda	32
3.2.6.2	Umeritev standarda.....	34
3.2.6.2.1	Nanos vzorcev za umeritev standarda na ploščo PCR.....	35

3.2.6.2.2	Priprava aparata PCR.....	36
3.2.6.2.3	Izračun uteži standarda	36
3.2.6.3	Priprava vzorca za analizo PMA RT PCR.....	37
3.2.6.3.1	Obdelava vzorca z reagentom PMA	38
3.2.6.3.2	Encimska obdelava vzorca.....	38
3.2.6.3.3	Izolacija DNA z aparatom Maxwell	38
3.2.6.3.4	Priprava aparata 7500 Fast Real-Time PCR	38
3.2.7	Analiza vzorca z metodo petrijevih plošč	38
4	REZULTATI.....	40
4.1	MORFOLOGIJA BAKTERIJ	40
4.2	SPREMLJANJE BAKTERIJSKE RASTI	40
4.3	CEPITEV DNA Z RESTRIKCIJSKO ENDONUKLEAZO <i>TaqI</i>	41
4.4	OPTIMIZACIJA METODE PMA REAL TIME PCR.....	41
4.4.1	Ugotavljanje količine DNA na celico pri bifidobakterijah	41
4.4.2	Primerjava metod fotoaktivacije reagenta PMA.....	43
4.4.3	Učinkovitost vezave reagenta PMA	44
4.4.4	Vpliv spremljevalne surovine probiotičnega izdelka	46
4.4.5	Vpliv dodatnega EDTA v vzorcu	46
4.4.6	Validacija začetnih oligonukleotidov	47
4.4.6.1	Preverjanje specifičnosti začetnih oligonukleotidov z metodo PMA RT PCR pri bifidobakterijah.....	50
4.5	VALIDACIJA METODE PMA REAL TIME PCR	52
4.5.1	Ekvivalenca	52
4.5.2	Meja detekcije in kvantifikacije	54
4.5.3	Točnost.....	56
4.5.4	Linearnost.....	58
4.5.5	Specifičnost.....	59
4.5.6	Robustnost.....	60
4.5.7	Ponovljivost	62
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	64
5.1	RAZPRAVA.....	64
5.1.1	Morfologija bakterij	64
5.1.2	Spremljanje bakterijske rasti	64
5.1.3	Cepitev DNA z restrikcijsko endonukleazo <i>TaqI</i>.....	64
5.1.4	Optimizacija metode PMA Real Time PCR.....	65

5.1.4.1	Ugotavljanje količine DNA na celico pri bifidobakterijah.....	65
5.1.4.2	Primerjava metod fotoaktivacije reagenta PMA	65
5.1.4.3	Učinkovitost vezave reagenta PMA	65
5.1.4.4	Vpliv spremljevalne surovine probiotičnega izdelka	66
5.1.4.5	Vpliv dodatnega EDTA v vzorcu	66
5.1.4.6	Validacija začetnih oligonukleotidov	66
5.1.5	Validacija metode PMA Real Time PCR	67
5.1.5.1	Ekvivalenca	67
5.1.5.2	Meja detekcije in kvantifikacije	68
5.1.5.3	Točnost	68
5.1.5.4	Linearnost	68
5.1.5.5	Specifičnost	68
5.1.5.6	Robustnost	69
5.1.5.7	Ponovljivost	69
5.2	SKLEPI.....	71
6	POVZETEK (SUMMARY)	72
6.1	POVZETEK.....	72
6.2	SUMMARY.....	72
7	VIRI	74
ZAHVALA		
PRILOGE		

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Rodovi bakterij, ki so uporabne kot probiotiki v človeški prehrani.....	4
Preglednica 2: Gojišča za rast bakterij	14
Preglednica 3: Pufri, fiziološka raztopina in barvila, uporabljena pri poskusih	16
Preglednica 4: Priprava propidijevega monoazida.....	16
Preglednica 5: Antibiotiki, uporabljeni pri validaciji.....	17
Preglednica 6: Reagenti, uporabljeni za ročno izolacijo DNA	17
Preglednica 7: Reagenti, uporabljeni pri avtomatizirani izolaciji DNA	18
Preglednica 8: Reagenti, uporabljeni pri PCR v realnem času	19
Preglednica 9: Začetni oligonukleotidi	20
Preglednica 10: Lastnosti uporabljenih začetnih oligonukleotidov	20
Preglednica 11: Laboratorijski pribor za izvedbo eksperimentalnega dela	21
Preglednica 12: Laboratorijski oprema za izvedbo eksperimentalnega dela	21
Preglednica 13: Uporabljeni računalniški programi	22
Preglednica 14: Uporabljena spletna orodja ter zbirke	23
Preglednica 15: Reagenti, uporabljeni pri reakciji PCR	25
Preglednica 16: Uporabljeni volumni reagentov pri reakciji PCR	26
Preglednica 17: Bakterijske vrste in pripadajoče kataloške številke	32
Preglednica 18: Uporabljeni volumni reagentov za pripravo mešanice SYBR Master Mix pri reakciji RT PCR	35
Preglednica 19: Prikaz odstopanja količine DNA na celico, izračunano iz enačb premic v točkah T1 in T2.....	43
Preglednica 20: Primerjava števila KE, dobljenih z neposredno oziroma posredno metodo štetja pri bifidobakterijah.....	43
Preglednica 21: Primerjava učinkovitosti uporabljenih začetnih oligonukleotidov	47
Preglednica 22: Specifičnost začetnih oligonukleotidov pri bifidobakterijah	50
Preglednica 23: Ujemanje teoretične meje detekcije in kvantifikacije z izmerjeno pri bifidobakterijah.....	55
Preglednica 24: Ujemanje teoretične meje detekcije in kvantifikacije z izmerjeno pri laktobacilih	56
Preglednica 25: Prikaz točnosti metode PMA RT PCR za zgornje koncentracijsko območje pri <i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i> BB-12.....	56
Preglednica 26: Prikaz točnosti metode PMA RT PCR za spodnje koncentracijsko območje pri <i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i> BB-12.....	57
Preglednica 27: Prikaz točnosti metode PMA RT PCR za zgornje koncentracijsko območje pri <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5.....	57
Preglednica 28: Prikaz točnosti metode PMA RT PCR za spodnje koncentracijsko območje pri <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5.....	57
Preglednica 29: Prikaz specifičnosti metode PMA RT PCR pri <i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i> BB-12.....	59
Preglednica 30: Prikaz specifičnosti metode PMA RT PCR pri <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5.....	59
Preglednica 31: Prikaz specifičnosti metode PMA RT PCR pri <i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i> BB-12 pri različnih mešanicah uporabljenih sevov	60
Preglednica 32: Prikaz specifičnosti metode PMA RT PCR pri <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5 pri različnih mešanicah uporabljenih sevov	60

Preglednica 33: Prikaz ponovljivosti metode PMA RT PCR <i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i> BB-12.....	63
Preglednica 34: Prikaz ponovljivosti metode PMA RT PCR pri <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5.....	63

KAZALO SLIK

Slika 1: Mehanizmi obrambe gostitelja proti črevesnim mikroorganizmom.....	9
Slika 2: Shematski prikaz temperaturnega in časovnega protokola metode PCR, uporabljenega pri encimski restrikciji	26
Slika 3: Prikaz preverjanja začetnega oligonukleotida v spletni zbirki 16S rRNA zaporedij	29
Slika 4: Prikaz preverjanja začetnega oligonukleotida v programu Primrose pri bifidobakterijah.....	30
Slika 5: Prikaz preverjanja začetnega oligonukleotida v programu Primrose pri laktobacilih	31
Slika 6: Shema redčitvene vrste iz alikvotiranih epruvetk matrice DNA.....	34
Slika 7: Shematski prikaz nanosa vzorcev standarda na ploščo PCR.....	35
Slika 8: Shematski prikaz temperaturnega in časovnega protokola metode PMA RT PCR, uporabljenega pri umerjanju matrice DNA	36
Slika 9: Shematski prikaz priprave vzorcev probiotičnega izdelka za analizo PMA RT PCR.....	37
Slika 10: Morfologija kolonij <i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i> BB-12 in <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5, zrastle na trdnem gojišču MRS po 72 urni anaerobni inkubaciji pri 37 °C.....	40
Slika 11: Prikaz profila DNA po cepitvi z restrikcijsko endonukleazo <i>TaqI</i>	41
Slika 12: Genom bakterije <i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i> BB-12	42
Slika 13: Primerjava osvetljevanja vzorca z dvema različnima metodama osvetlitve	44
Slika 14: Disociacijska krivulja pomnožka DNA iz mrtvih bifidobakterij brez obdelave z reagentom PMA.....	45
Slika 15: Disociacijska krivulja pomnožka DNA iz mrtvih bifidobakterij, obdelanih z reagentom PMA.....	45
Slika 16: Vpliv spremljevalne surovine probiotičnega izdelka pri bifidobakterijah	46
Slika 17: Vpliv dodatnega EDTA v vzorcu z bifidobakterijami.....	47
Slika 18: Shematski prikaz hibridizacije začetnih oligonukleotidov pri bifidobakterijah..	48
Slika 19: Shematski prikaz hibridizacije začetnih oligonukleotidov pri laktobacilih.....	49
Slika 20: Prikaz nastale DNA po pomnoževanju z vrstno (levo) oziroma rodovno specifičnimi (desno) začetnimi oligonukleotidi pri bifidobakterijah	50
Slika 21: Disociacijska krivulja nastale DNA pri pomnoževanju z vrstno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi pri bifidobakterijah	51
Slika 22: Disociacijska krivulja nastale DNA pri pomnoževanju z rodovno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi pri bifidobakterijah	52
Slika 23: Primerjava rezultatov štetja na ploščah z rezultati, dobljenimi z metodo PMA RT PCR za bifidobakterije.....	53
Slika 24: Primerjave rezultatov štetja na ploščah z rezultati, dobljenimi z metodo PMA RT PCR za laktobacile.....	53
Slika 25: Prikaz linearnosti metode PMA RT PCR za bifidobakterije	58
Slika 26: Prikaz linearnosti metode PMA RT PCR za laktobacile	58
Slika 27: Prikaz vpliva različnih lotov reagenta PMA za bifidobakterije	61
Slika 28: Prikaz vpliva različnih lotov reagenta PMA za laktobacile	61
Slika 29: Prikaz vpliva različnih lotov reagenta SYBR Master Mix za bifidobakterije	62
Slika 30: Prikaz vpliva različnih lotov reagenta SYBR Master Mix za laktobacile	62

KAZALO PRILOG

Priloga A: Primerjava rezultatov štetja na ploščah z rezultati pridobljenimi z metodo PMA RT PCR (ekvivalenca)

Priloga B: Rezultati točnosti metode PMA RT PCR

Priloga C: Rezultati linearnosti metode PMA RT PCR

Priloga D: Rezultati specifičnosti metode PMA RT PCR

Priloga E: Rezultati ponovljivosti metode PMA RT PCR

Priloga F: Rezultati neposrednega oziroma posrednega štetja enot kolonij

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

BLAST	spletno orodje za poravnavo zaporedij (angl. Basic Local Alignment Search Tool)
CFU	kolonijske enote (angl. colony forming units)
C _T	točka pri katerem fluorescentni signal preči zaznavni prag (angl. Treshold Cycle)
CTAB	heksadeciltrimetilamonijev bromid (angl. hexadecyltrimethyl ammonium bromide)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. deoxyribonucleic acid)
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DSMZ	nemška zbirka mikroorganizmov in celičnih kultur (nem. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen)
EBI	evropski bioinformacijski inštitut (angl. European Bioinformatics Institute)
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
EMA	etidijev monoazid
EMP	metabolna pot Embden-Meyerhof-Pernas
FAO	organizacija za hrano in kmetijstvo ZN (angl. Food and Agriculture Organization of the united Nations)
FDA	ameriška agencija za hrano in zdravila (angl. Food and Drug Administration)
FOS	fruktooligosaharidi
GOS	glukooligosaharidi
GRAS	splošno priznano kot varno (angl. Generally Regarded As Safe)
IL-10	interlevkin 10
IMO	izomaltooligosaharidi
KE	kolonijske enote
mM	10 ⁻³ mol/L
mRNA	sporočevalna RNK (angl. messenger RNA)
MRS	de Man Rogosa Sharpe agar
MRS-CL/CIP	gojišče MRS z dodanima antibiotikoma klindamicin in ciprofloksacin
Na ₂ EDTA	dinatrijevetilendiamintetraocetna kislina
NaCl	natrijev klorid
NTC	negativna kontrola (angl. Non Template Controle)
OD	optična gostota (angl. optical density)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
pH	negativni desetiški logaritem koncentracije vodikovih protonov
PI	propidijev jodid
PMA	propidijev monoazid
RNA	ribonukleinska kislina
rRNA	ribosomalna RNK
RT PCR	angl. Real Time Polymerase reaction, verižna reakcija s polimerazo v realnem času
s	vzorčni standardni odklon (standardna deviacija)

<i>SD</i>	vzorčni standardni odklon
TBE	Tris/Borate/EDTA
TE	Tris EDTA
T _H	celice T pomagalk
TGOS	transgalaktooligosaharidi
TOS	gojišče s transoligosaharidi
TOS-MUP	gojišče TOS z dodanim antibiotikom mupirocin
T _{Reg}	regulatorne celice T

1 UVOD

Probiotične bakterije ali probiotiki so živi organizmi, ki ob zaužitju v zadostni količini pozitivno vplivajo na gostiteljev organizem (FAO/WHO, 2002). Nahajajo se v fermentiranih izdelkih, kot sta jogurt in sir, ter predstavljajo pomemben delež človeške naravne črevesne mikrobiote (Ross in sod., 2008; Collado in sod., 2006). Največkrat omenjene in uporabljene bakterije pripadajo rodovoma *Bifidobacterium* in *Lactobacillus* (Ross in sod., 2008). Vendar pa je funkcionalna vloga organizmov vrstno specifična, pri tem pa imajo vrste zelo podobne fenotipske lastnosti (Monnet in sod., 2012). Probiotiki se uporabljajo z namenom podporne terapije z antibiotiki, ki porušijo črevesno mikrobo združbo in povečajo tveganje za nastanek kasnejših okužb. V farmacevtski industriji je izdelava razširjena predvsem v obliki liofiliziranih probiotičnih izdelkov čim boljše kakovosti. V okviru kakovosti se preverja stabilnost in mikrobiološka čistost preiskovanega vzorca.

Zagotavljanje kakovosti probiotičnih izdelkov je v zadnjem času deležno velike pozornosti, saj tradicionalne metode ne dosegajo več pričakovanih ciljev, novejša in zmogljivejša hitre metode pa raziskovalcem vedno znova ponujajo vedno večje izzive (Monnet in sod., 2012).

Tradicionalne metode temeljijo predvsem na gojenju probiotičnih bakterij, ki je zamudno in velikokrat težavno. Funkcionalna vloga probiotičnih mikroorganizmov je vrstno specifična, zato je pomembno ločevanje med taksonomskimi vrstami, ki so si po lastnosti zelo podobne. Z gojitvenimi tehnikami ne zajamemo vseh probiotičnih bakterij, ki bi lahko pozitivno vplivale na gostitelja, saj je vpliv probiotičnih celic odvisen od aktivnosti in ne od sposobnosti gojenja. (Kramer in sod., 2009; Monnet in Bogovič Matijašić, 2012).

1.1 NAMEN DELA

Optimizirati metodo PMA Real Time PCR (PMA RT PCR) za ugotavljanje števila *Lactobacillus acidophilus* LA-5 in *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12 v liofiliziranih probiotičnih izdelkih. V okviru optimizacije načrtovati vrstno specifične začetne oligonukleotide in pripraviti zanesljiv in stabilen standard.

Validirati metodo PMA RT PCR in jo preveriti po definiranih kriterijih kot so točnost, linearnost, ekvivalenca, meja detekcije in kvantifikacije, specifičnost, ponovljivost ter robustnost metode. V okviru ekvivalence preveriti metodo PMA RT PCR s hkratno primerjavo tradicionalne uveljavljene metode štetja probiotičnih bakterij *L. acidophilus* in *B. animalis* na petrijevih ploščah.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Metoda PMA RT PCR je molekularna metoda, s katero je mogoče hitrejša in zanesljivejša ugotavljanje količine *Lactobacillus acidophilus* LA-5 in *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12 v liofiliziranih probiotičnih izdelkih.

Število *Lactobacillus acidophilus* LA-5 in *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12, ugotovljeno z metodo PMA RT PCR je enako, oziroma večje od števila ugotovljenega s tradicionalno uveljavljeno metodo.

Metoda PMA RT PCR primerna za ugotavljanje količine *Lactobacillus acidophilus* LA-5 in *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12 v liofiliziranih probiotičnih izdelkih.

2 PREGLED OBJAV

2.1 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO

Metoda verižne reakcije s polimerazo (PCR) pomnoži odsek deoksiribonukleinske kisline (DNA), značilen za preiskovan organizem. V zelo kratkem času (2-3 ure) nastane milijon kopij tarčnega gena po principu medsebojnega reagiranja začetnih oligonukleotidov, encima polimeraze in nukleotidov z vzorcem DNA. Pripravljen reakcijsko mešanico ciklično segrevamo oziroma ohlajamo, pri čemer nastaja vedno več DNA. Vsak cikel se prične s segrevanjem, kar povzroči razprtje verige DNA (denaturacija), sledi znižanje temperature ter s tem hibridizacija začetnih oligonukleotidov. Encim polimeraza nato podaljša verigo DNA v smeri 3' konca. Pomnoževanje je tako sestavljeno iz treh faz, in sicer denaturacije tarčne DNA, hibridizacije začetnih oligonukleotidov in podaljševanja verige. Teoretično dobimo z vsakim ciklom 2-krat več fragmentov DNA (Innis in sod., 1988; PDA Technical Report No. 33, 2000).

2.2 METODA PCR V REALNEM ČASU

Metoda RT PCR temelji na zaznavi fluorescentnega signala, nastalega pri pomnoževanju kratkih odsekov DNA. Naraščanje fluorescence v vsakem ciklu je v sorazmerju s količino pomnožene DNA. Metoda omogoča ugotavljanje števila mikroorganizmov v populaciji glede na število cikla in velikost zaznanega signala. Iz vrednosti cikla (C_T) izračunamo število enot kolonij v preiskovanem vzorcu. Vrednost C_T je cikel, pri katerem fluorescentni signal preseže zaznavni prag (iz angl. threshold). Izmerjene vrednosti C_T s pomočjo umeritvene krivulje izrazimo kot število enot kolonij (CFU, iz angl. Colony Forming Units), število celic ali število tarčnih sekvenc v preiskovanem vzorcu. Ločimo dva načina ugotavljanja števila mikroorganizmov, in sicer absolutno in relativno kvantifikacijo. Za absolutno kvantifikacijo velja, da mora biti pri vsakem testu prisoten standard z znano količino tarčne DNA, ki ima predhodno določeno število enot kolonij. To tudi predstavlja glavno pomanjkljivost tega tipa reakcij, saj je potrebno standard pred vsakim testom redčiti skozi več koncentracijskih območji, pri čemer lahko zaradi nenatančnega pipetiranja, pride do napak (Pfaffl, 2001).

2.2.1 Ugotavljanje števila probiotikov z metodo PCR v realnem času

Metoda PCR v kombinaciji z gelsko elektroforezo je v zadnjih letih doživela razcvet in vpeljala popolnoma druge pristope ugotavljanja kakovosti probiotičnega izdelka. V vzorcih (izdelki ali biološki vzorci npr. feces) lahko z metodo PCR dokažemo probiotične organizme do rodu, vrste ali celo seva natančno. Probiotične bakterije s svojo funkcionalno vlogo pripomorejo k pozitivnim učinkom na gostitelja, zato jih moramo v vzorcu pravilno zaznati. Slabost metode RT PCR je, da se v vzorcu pomnožuje tudi DNA iz mrtvih celic, s tem pa ne dosežemo želene selektivnosti (Monnet in Bogovič Matijašić, 2012).

Skupina španskih raziskovalcev iz inštituta (Instituto del Frio) je leta 2009 prva opisala postopek ugotavljanja števila probiotičnih bakterij (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus casei* subsp. *casei* in *Lactobacillus acidophilus*) v fermentiranih mlečnih izdelkih. Postopek temelji na uporabi

propidijevega monoazida (PMA) v kombinaciji z molekularno metodo RT PCR (Garcisa-Cayuela in sod., 2009). Vzorec obdelamo z reagentom, kot je na primer propidijev monoazid, ki prepreči pomnoževanje DNA iz mrtvih celic (Monnet in Bogovič Matijašić, 2012).

2.3 PROBIOTIČNE BAKTERIJE

Probiotične bakterije ali probiotiki so živi organizmi, ki ob zaužitju v zadostni količini pozitivno vplivajo na gostiteljev organizem (FAO/WHO, 2002). Poznanih je kar nekaj bakterij s probiotičnimi učinki, in sicer vrste iz rodov *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* in *Weissella*. Probiotične učinke imajo tudi nekatere kvasovke kot sta *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii* in plesen *Aspergillus oryzae* (Axelsson, 2004).

Kot probiotiki so največkrat omenjene in uporabljene bakterije iz rodu *Bifidobacterium* in *Lactobacillus*, kar je delno posledica tega, da so naravno prisotne tako v prebavnem traktu kot tudi v fermentiranih izdelkih, pa tudi zaradi tako imenovanega statusa GRAS (iz angl. *Generally Regarded As Safe*) (Ross in sod., 2008). Bifidobakterije predstavljajo zelo pomemben delež črevesne populacije, saj predstavljajo do 91 % črevesnih bakterij v dojenčkih in med 3 % in 7 % bakterij v odraslem človeku (Collado in sod., 2006).

Preglednica 1 prikazuje probiotične bakterije uporabljene v človeški prehrani.

Preglednica 1: Rodovi bakterij, ki so uporabne kot probiotiki v človeški prehrani (Laura in sod., 1999)

Laktobacili	Bifidobakterije	Streptokoki	Enterokoki
<i>L. delbrueckii</i>	<i>B. animalis</i>		<i>E. faecalis</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. longum</i>	<i>S. thermophilus</i>	<i>E. faecium</i>
<i>L. rhamnosus</i>	<i>B. breve</i>		
<i>L. reuteri</i>	<i>B. infantis</i>		
<i>L. casei</i>			

Beseda probiotik izvira iz grških besed »pro« in »bios«, ki skupaj pomenita »za življenje«. Prva uporaba definicije sega v leto 1965 in je pomenila kakršno koli mikrobov snov, ki stimulira rast drugega mikroorganizma. Kasneje so besedo ponovno definirali kot snov, ki prispeva k črevesnemu ravnovesju mikrobov združbe. Ker lahko beseda »snov« pomeni tudi antibiotik, so le-to v nadaljnji definiciji zamenjali z mikroorganizmom (Laura in sod., 1999).

Ruski biolog Metchnikoff je trdil, da bolgarski kmetje živijo dlje, ker uživajo veliko fermentiranega mleka. Pri svojem raziskovanju je uporabljal po Gramu pozitivno bakterijo, ki jo je imenoval *Bulgarian bacillus*. Kasneje so jo preimenovali v *Bacillus bulgaricus*, to ime pa je bilo najverjetneje podlaga za današnje poimenovanje bakterije *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Slednja je skupaj z bakterijo *Streptococcus thermophilus* odgovorna za tradicionalno fermentacijo mleka v jogurt (Laura in sod., 1999).

Zanimanje za uporabo probiotičnih metod zdravljenja je vedno večje, saj zdravljenje z antibiotiki pogosto ni uspešno. Zdravljenje z antibiotiki poruši črevesno floro in poveča tveganje za kasnejše okužbe. Industrija z razvojem antibiotikov bo težko sledila hitremu naraščanju številu odpornih sevov, zato bo v prihodnosti pomembna uporaba probiotikov. Splošna naklonjenost javnosti uporabi probiotikov, prav tako povečuje zanimanje stroke za tovrsten razvoj (Laura in sod., 1999; Vasiljevic in sod., 2008).

2.3.1 Rod *Lactobacillus*

Laktobacili so po Gramu pozitivne, nesporogene, fermentativne bakterije. So mikroaerofilni, kemoorganotrofni, katalazno negativni bacili ali kokobacili z vsebnostjo nukleotidov GC manjšo od 54 %. Uspevajo v okolju z razpoložljivimi ogljikovimi hidrati, ki se nahajajo v mlečnih izdelkih, fermentiranemu mesu, zelenjavi, sadju, pijačah ter v prebavilih in spolovilih ljudi in živali (Felis in Dellaglio, 2007).

Znotraj rodu je opisanih preko 100 različnih bakterijskih vrst, ki pripadajo deblu *Firmicutes*, razredu *Bacilli*, redu *Lactobacillales* in družini *Lactobacillaceae*.

Laktobacile lahko po tipu fermentacije razvrstimo v tri skupine. Obligatni homofermentativni laktobacili fermentirajo heksozo po Embden-Meyerhof-Pernas (EMP) metabolni poti skoraj izključno do mlečne kisline (Vasiljevic in sod., 2008). Ne morejo pa fermentirati pentoze in glukonotov, saj nimajo potrebnega encima fosfoketolaze. V drugo skupino uvrščamo fakultativno heterofermentativne laktobacile, ki razgradijo heksozo do mlečne kisline po poti EMP. Prav tako pa lahko razgradijo pentozo in glukonate, saj imajo oba potrebna encima (aldolaza in fosfoketolaza). Tretji skupini pripadajo obligatni heterofermentativni laktobacili, ki po fosfoketolazni metabolni poti razgradijo heksozo na laktat, etanol ali očetno kislino in ogljikov dioksid (Felis in Dellaglio, 2007).

Laktobacili so občutljivi za snovi, ki zavirajo sintezo celične stene, med katerimi se največkrat omenja skupino penicilinskih antibiotikov. Večina vrst laktobacilov (z izjemo heterofermentativnih vrst) je odporna za glikopeptidne antibiotike, kot je vankomicin. Laktobacili so pogosto občutljivi tudi za antibiotike, ki zavirajo sintezo proteinov, med katere spadajo kloramfenikol, eritromicin, mupirocin in klindamicin. Pogosto so odporni proti skupini aminoglikozidnih antibiotikov kot so neomicin, kanamicin, streptomycin in gentamicin. Odpornost laktobacilov proti zaviralcem sinteze nukleinskih kislin, kot so norfloksacin, ciprofloksacin in trimetoprim, še ni popolnoma raziskana. Prav tako še niso v celoti raziskani mehanizmi odpornosti proti skupini tetraciklinskih antibiotikov (Korhonen, 2010).

Med probiotičnimi sevi so laktobacili odporni proti nalidiksični kislini, aztreonamu, cikloserinu, kanamicinu, metronidazolu, polimiksinu B in spektinomycinu. Občutljivi pa so za rifampicin, bacitracin, klindamicin, eritromicin, novobiocin, penicilin, ampicilin, cefalotin in vankomicin (D'Aimmo in sod., 2007).

Filogenetsko je rod *Lactobacillus* zelo raznolika taksonomska skupina z veliko metabolnimi značilnostmi. Naraščanje števila *de novo* opisanih vrst hitro spreminja filogenetsko obliko rodu (Felix in Dellaglio, 2007).

2.3.1.1 *Lactobacillus acidophilus* LA-5

Lactobacillus acidophilus LA-5 je komercialno dostopen sev, ki so ga pri proizvodnji probiotičnih mlečnih izdelkov prvi uporabili pri danskem podjetju Chr. Hansen. Sev je klinično dobro preučen in ne vpliva na okus, videz in vonj mlečnih izdelkov. Sev ima mnogo probiotičnih lastnosti. Odporen je na žolčne kisline in prebavne encime, zato lahko preživi prehod skozi želodec in zgornji del tankega črevesa, prav tako pa je sposoben pritrditve na črevesno sluznico (Lee in Salminen, 2009). V majhnih koncentracijah je sev odporen proti klindamicinu, kar se s pridom uporablja pri mešanih probiotičnih kulturah za ločevanje od sevov bifidobakterij (D'Aimmo in sod., 2007). Izloča bakteriocin CH5, ki deluje zaviralno na bakterije ter na nekatere kvasovke in plesni. Sev LA-5 je popolnoma varen za uporabo in nima negativnih stranskih učinkov (Lee in Salminen, 2009).

2.3.2 Rod *Bifidobacterium*

Znotraj bakterijske domene je deblo *Actinobacteria* eno večjih in pomembnejših taksonomskih skupin. Sestavlja ga 5 podrazredov ter 6 redov s 14 podredovi. Znotraj redu *Bifidobacteriales* je družina *Bifidobacteriaceae*, ki jo sestavljajo rodovi *Bifidobacterium*, *Aeriscardovia*, *Gardnerella*, *Parascardovia* in *Scardovia* (Lee in O'Sullivan, 2010).

Henri Tissier je leta 1899 iz blata dojenčkov prvi izoliral bifidobakterije. Sprva so vrsto opisali kot *Bacillus bifidus*, nato pa so jo leta 1924 predstavili v rod *Bifidobacterium*. Po tem so bifidobakterije še nekajkrat preimenovali, in sicer v *Bacillus bifidus*, *Bacteroides bifidus* in *Lactobacillus bifidus*. Leta 1973 so bifidobakterije razvrstili v samostojen takson *Bifidobacterium*, takrat sestavljen iz 11 vrst. Danes je rod *Bifidobacterium* sestavljen iz 31 znanih vrst bifidobakterij, ki so bile izolirane iz prebavnega trakta ljudi in živali, prav tako pa tudi iz človeškega zobnega kariesa in vagine ter surovega mleka (Lee in O'Sullivan, 2010).

Bifidobakterije so negibljive, nesporogene in po Gramu pozitivne bakterije, ki ne proizvajajo plina. So anaerobni, katalazno negativni bacili z visoko vsebnostjo G+C nukleotidov. Povezujejo se v nepravilne oblike podobne črkama V ali Y. Nastanek značilnih skupkov naj bi povzročili nizka koncentracija N-acetil amino sladkorjev, Ca^{2+} ionov in pomanjkanje nekaterih aminokislin v gojišču (Lee in O'Sullivan, 2010). Najbolje rastejo pri temperaturi 37-41 °C, ne rastejo pa nad temperaturo 46 °C (izjema je *B. thermacidophilum*) oziroma pod temperaturo 20 °C. So kislinsko tolerantni mikroorganizmi, ki najbolje rastejo pri pH 6,5 do 7,0, ne rastejo pa pri pH nižjem od 4,5 (izjema je *B. thermacidophilum*) in višjem od 8,5 (Biavati in sod., 2000). Razgrajujejo heksoze z encimom fruktoza-6-fosfat fosfoketolaza, ki heksozo-fosfat razgradi na eritrozo-4-fosfat in acetil fosfat. Omenjena katabolična pot predstavlja bistveno razliko v metabolizmu bifidobakterij in mlečno kislinskih bakterij. Končna produkta heterofermentativnega metabolizma bifidobakterij sta očetna in mlečna kislina (Biavati in sod., 2000).

Bifidobakterije sintetizirajo antimikrobne snovi proti različnim patogenim mikroorganizmom. Njihov mehanizem zaviralnega delovanja je najverjetneje povezan s sintezo ocatne oziroma mlečne kisline, ki ju bifidobakterije izločajo v okolje s čimer povzročijo neugodne pogoje za rast potencialno patogenih mikroorganizmov. Nekateri sevi bifidobakterij izločajo antimikrobne snovi oziroma bakteriocine s širokim spektrom delovanja proti po Gramu negativnim in pozitivnim bakterijam. Dokazana je antibakterijska aktivnost bifidobakterij proti bakterijam *Salmonella*, *Listeria*, *Campylobacter*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae* in *Yersinia enterocolitica*. V prebavnem traktu človeka ali živali anitimikrobne snovi predvsem preprečujejo nastanek gastroenteritisa (Biavati in sod., 2000).

Sevi, ki se uporabljajo kot probiotiki, so odporni proti kanamicinu, gentamicinu, streptomycinu, polimiksinu B, nalidiksični kislini paromomicinu in neomicinu. Občutljivi so za penicilin G, bacitracin, kloramfenikol, eritromicin, linkomicin, vankomicin, novobiocin, ampicilin, dikloksacilin, rifampicin in klindamicin. Delno so odporni proti metronidazolu, tetraciklinu, cefalotinu, aztreonamu in tetraciklinu. Čeprav so bifidobakterije občutljive za klindamicin, se ta lahko uporabi pri ločevanju laktobacilov od bifidobakterij. Pri nizkih koncentracijah (<4 ug/mL) antibiotik klindamicin deluje zaviralno na sev bifidobakterij, laktobacilom pa še vedno omogoča rast (D'Aimmo in sod., 2007).

2.3.2.1 *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12

Bifidobacterium animalis ssp. *lactis* BB-12 je komercialno dostopen sev, ki so ga pri proizvodnji probiotičnih mlečnih izdelkov prvi uporabili pri danskem podjetju Chr. Hansen. Sev ne vpliva na okus, videz in vonj mlečnih izdelkov, v katerih preživi vse do uporabe. Sev je klinično dobro preučen, med drugim se namreč uporablja tudi kot dodatek v prehrani dojenčkov. Sev lahko preživi prehod skozi želodec in zgornji del tankega črevesa, saj je tolerant na želodčno in žolčno kislino ter encimsko razgradnjo. Prav tako je sposoben pritrditve na črevesno sluznico. Sev BB-12 je nepatogen, netoksičen in popolnoma varen za uporabo, brez negativnih stranskih učinkov (Lee in Salminen, 2009).

2.3.3 Mehanizmi delovanja probiotikov

Črevo je zaradi svoje raznovrstne mikrobne združbe metabolno najaktivnejši človeški organ. vzdolž prebavnega trakta se variabilnost in število mikroorganizmov zelo spreminja. Povprečna koncentracija bakterij v želodcu je nižja od 10^3 bakterij/g, v tankem črevesu naraste na okoli 10^4 bakterij/g in v debelem črevesu doseže svojo največjo pestrost z 10^{12} bakterij/g (Laura in sod., 1999; Rinttila in sod., 2004). V lumnu debelega črevesa je opisanih nekaj 100 različnih vrst bakterij. Pestrost vzdolž prebavnega trakta je posledica anatomskih in fizikalno kemijskih sprememb. V prvem delu debelega črevesa (proksimalni del) je prisotno več hranil, pH je zaradi kislinskih produktov fermentacij nižji (5,5-6,0), gibanje znotraj črevesa pa hitrejše kot v distalnem delu. Mikrobna združba v črevesu je sestavljena iz saharolitičnih in proteolitičnih organizmov ter bakterij, ki lahko presnavljajo pline. Zaradi omenjenih lastnosti je rast bakterij v proksimalnem delu črevesa hitrejša kot v distalnem delu. Glavni končni produkti fermentacije bakterij v črevesju so kratkoverižne

maščobne kisline; acetat, propionat in butirat ter nekatere druge snovi kot so etanol, laktat, sukcinat, format, valerat in kaproat. Vendar pa pri metabolizmu ogljikovih hidratov nastajajo tudi produkti, ki so neškodljivi ali pa toksični za gostiteljev organizem. Takšni produkti so amonij, fenoli, indoli in amini (Laura in sod., 1999).

Najbolj verjetne mehanizme delovanja probiotikov razporedimo v tri skupine (Bron in sod., 2012):

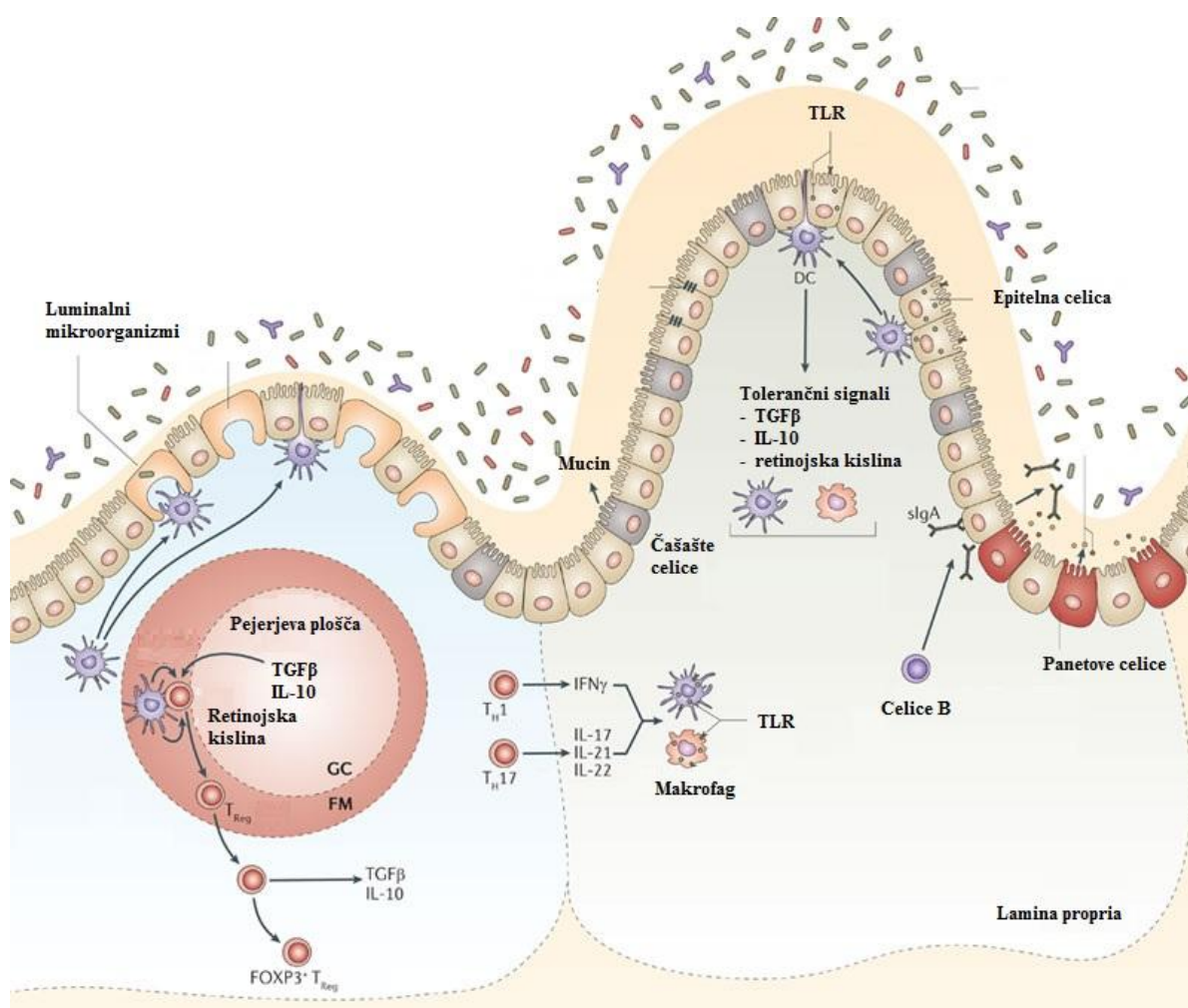
- Probiotične bakterije s kompetitivno prednostjo izločijo patogene bakterije ali z antimikrobnim delovanjem preprečijo njihovo rast, ter vplivajo na sestavo probiotične mikrobiote gostitelja.
- Specifične vrste probiotikov z modulacijo signalnih poti okrepijo funkcijo epitela ter povzročijo kopičenje sluzi in izločanje proteina defenzina, ki pomaga imunskim celicam v boju proti mikrobom. Delujejo tudi v smeri preprečevanja apoptoze celic epitela in krepitve tesnih celičnih stikov.
- Probiotiki sodelujejo pri uravnavanju imunskega sistema predvsem v tankem črevesu gostitelja, kjer je potencialna zmogljivost imunskega sistema visoka, hkrati pa je število bakterij relativno majhno.

Črevesna sluznica je sestavljena iz zgornje enocelične plasti - epitelijske, ki ločuje lumen črevesa od lamine proprije. Pomembni nalogi epitelijske sta omogočanje absorpcije hranil in preprečevanje prehoda telesu tujih snovi v lamino proprijo. Slednja je posebno sterilno vezivno tkivo, ki vsebuje veliko celic imunskega sistema (Bron in sod., 2012).

Panethove celice tankega črevesa izločajo vrsto protimikrobnih učinkovin kot sta antimikrobna peptida lizocim in defenzin. Čašaste celice proizvajajo sluz, ki ščiti epitelij pred neposrednim stikom z mikroorganizmi. Za delovanje imunskega sistema so pomembne Peyerjeve plošče, ki se nahajajo v lamini propriji tankega črevesa. To so območja, ki vsebujejo folikle, preko katerih se prične aktivacija imunskega odziva (Bron in sod., 2012).

Stroma znotraj lamine proprije sestoji iz vezivnega tkiva pretežno iz celic B (celice, ki proizvajajo protitelesa), makrofagov, dendritičnih celic in celic T. Pri probiotičnem vplivu so najpomembnejše celice T pomagalke in regulatorne celice T, ki uravnavajo ustrezeni imunski odziv in so glavni vir interleukina 10. Makrofagi so namenjeni predvsem odstranjevanju celičnih ostankov in patogenih mikroorganizmov. Dendritične celice, z aktivacijo regulatornih celic T ob prisotnosti retinojske kisline, regulirajo imunski odziv organizma (Bron in sod., 2012).

Slika 1 prikazuje mehanizme imunske obrambe gostitelja, Peyerjeve plošče, Panethove celice, celice B, celice T pomagalke (T_H), regulatorne celice T (T_{Reg}), interleukin 10 (IL-10) in še nekaterih drugih faktorjev regulacije imunske obrambe.



Slika 1: Mehanizmi obrambe gostitelja proti črevesnim mikroorganizmom (Bron in sod., 2012)

2.3.4 Prebiotiki

Prebiotik je za človeka neprebavljiva hrana, ki stimulira rast in aktivnost določenih bakterijskih vrst v črevesju ter izboljša zdravje gostitelja. Znanih je precej prebiotikov kot so fruktooligosaharidi (FOS), glukooligosaharidi (GOS), transgalaktooligosaharidi (TGOS), izomaltooligosaharidi (IMO). Da sestavino opredelimo kot prebiotik, mora ustrezati naštetim kriterijem (Laura in sod., 1999):

- se ne razgradi in absorbira v zgornjem delu prebavnega trakta
- izzove proces fermentacije samo ob prisotnosti potencialno koristnih črevesnih bakterij
- izzove vpliv, ki je koristen za gostitelja

Zelo znana je tudi uporaba sinbiotikov, kjer v kombinaciji probiotika in prebiotika, dosežemo optimalne probiotične učinke. Uporaba je razširjena predvsem pri liofiliziranih probiotičnih izdelkih, kjer v kapsuli poleg probiotičnih bakterij zaužijemo tudi prebiotik (Laura in sod., 1999).

2.4 KAKOVOST PROBIOTIKOV

Probiotični liofilizirani izdelki, ki so v uporabi za komercialne namene, morajo ohranjati kakovost skozi celoten proces proizvodnje in shranjevanja. Število probiotičnih mikroorganizmov v probiotičnem izdelku mora ostati nespremenjeno skozi celoten čas predpisanega roka uporabe (Tuomola in sod., 2001). V uporabi so trije preizkusi kakovosti probiotičnega izdelka, in sicer identifikacija probiotičnega seva, ugotavljanje števila bakterij med proizvodnjo in ob roku uporabe, ugotavljanje skupnega števila aerobnih mikroorganizmov, kvasovk in plesni ter prisotnost oziroma odsotnost patogenov (Kramer, 2009). Tradicionalna metoda za preverjanje ustreznosti števila probiotičnih mikroorganizmov je metoda štetja na petrijevih ploščah. Slednja za današnji čas ne dosega več pričakovanih ciljev, zato v veljavo stopajo novejša in zmogljivejša hitre metode.

2.5 METODA ŠTETJA NA PETRIJEVIH PLOŠČAH

Metoda štetja na ploščah je posredna ali gojitvena metoda, ki se uporablja za ugotavljanje števila mikroorganizmov v vzorcih, ki jih je mogoče suspendirati v tekočini. Metoda omogoča izračun števila živih bakterijskih celic v vzorcu. Na ploščah štejemo enote, ki tvorijo kolonije (KE). Običajno jih izrazimo na mililiter oziroma gram vzorca (Sutton, 2011). Slabost te metode je predvsem v dolgotrajnem času testiranja, saj je za analizo potrebno nekaj dni (Lahtinen in sod., 2005).

2.6 METODA ŠTETJA S PMA RT PCR

Metoda PMA RT PCR temelji na zaznavanju pomnoženega specifičnega nukleotidnega zaporedja, pri čemer se reagent PMA (propidium monoazid) kovalentno veže na DNA iz mrtvih celic (celice s poškodovano membrano) in tako omogoča učinkovito pomnoževanje le DNA iz živih celic (celice, ki imajo membrano nepoškodovano). S halogenim virom svetlobe reagent fotoaktiviramo, s čimer omogočimo navzkrižno povezovanje DNA z membrano poškodovanih bakterijskih celic (Fittipaldi in sod., 2012).

2.7 UGOTAVLJANJE ŽIVOSTI VZORCA

V okolju je DNA zelo stabilna in je še tedne po celični smrti prisotna v preiskovanem vzorcu (Nocker in sod., 2007a; Nocker in sod., 2007b). Pri klasični metodi PCR pomnožujemo tudi DNA iz mrtvih celic, zato jo moramo predhodno odstraniti. To lahko naredimo z obogatitvenim gojenjem bakterij pred izvedbo metode PCR (Herman, 1997) ali uporabimo kombinacijo metode PCR s fluorescentnimi barvili (Breeuwer in Abee, 2000). Eden od načinov je tudi ugotavljanje koncentracije mRNK (iz angl. messenger RNA). Molekula mRNK je zaporednje nukleotidov, na podlagi katerih, v procesu translacije (prevajanja) s pomočjo ribosomov, nastane določen protein. Molekula je zelo nestabilna, saj razpade že nekaj sekund po svojem nastanku, kar jo uvršča med pomembne pokazatelje živosti celic (Rauhut in Klug, 1999; Keer in Birch, 2003).

Leta 2003 so prvič predstavili koncept vezave etidijevega monoazida (EMA) za razlikovanje med živimi in mrtvimi celicami. Kot alternativna molekula se je leta 2006 na tržišču pojavil tudi propidijev monoazid (PMA). Razlikovanje med živimi in mrtvimi

celicami temelji na integriteti celične membrane. Vzorce obdelamo z reagentom, ki selektivno prodira v celice. V primeru poškodovane celične membrane reagent vstopi v celice in se po vzpostavitvi vzorca močni vidni svetlobi kovalentno veže z DNA. To vodi v nastanek netopne DNA, ki se tekom procesa izolacije izgubi. Svetloba pretvori azidno skupino molekule v zelo reaktiven radikal nitrena, ki lahko reagira z vrsto organskih molekul. Če membrana celice ni poškodovana, predstavlja za reagent neprehodno bariero in ne pride do vezave. Nevezane molekule reagenta reagirajo z vodo in tvorijo hidroksilamin. Slednji ni reaktiven in ne reagira pri nadaljnji izolaciji DNA (Fittipaldi in sod., 2012).

2.7.1 Propidijev monoazid

Propidijev monoazid je po strukturi zelo podobna molekula propidijevemu jodidu (PI), le da dodatna azidna skupina omogoča svetlobno aktivacijo molekule (Nocker in sod., 2007b). Zaradi dveh negativnih nabojev je propidijev monoazid bolj selektiven od etidijevega monoazida (EMA), ki ima samo enega. Prav tako lahko EMA do neke mere vstopa v notranjost nepoškodovanih celic in reagira nespecifično (Fittipaldi in sod., 2011; Fittipaldi in sod., 2012).

2.7.2 Pojem živosti bakterijskih celic

Glede na fiziološke oziroma morfološke parametre je živost celic težko definirati, saj se lahko celice nahajajo v različnih stanjih »živosti«. Z okoljem lahko izmenjujejo snovi ali pa so neaktivne, vendar še vedno žive. Trenutno ne poznamo kriterijev živosti, ki bi enoznačno ločili med živimi, oziroma mrtvimi celicami (Colwell, 2000). Prav tako ni poznana funkcija dormantnih probiotičnih celic, zato ne vemo, ali so takšne celice koristne za zdravje človeka (Lahtinen in sod., 2005).

2.8 VALIDACIJA MOLEKULARNE METODE

V splošnih načelih FDA (iz angl. Food and Drug Administration) je validacija definirana kot priprava dokumentiranega dokaza z visoko stopnjo zanesljivosti, ki zagotavlja, da bo specifični proces vedno proizvedel produkt, ki ustreza kakovosti in svojim, v naprej določenim, specifikacijam (PDA Technical Report No. 33, 2000).

Zato je za novo preiskusno metodo pomembno, da je ustrezna za predvideno analitsko uporabo in da ohranja zanesljivost rezultatov skozi daljše časovno obdobje (PDA Technical Report No. 33, 2000). Ameriška farmakopeja za preverjanje ustreznosti analitske metode opredeljuje osem definiranih parametrov, in sicer točnost, linearnost, ekvivalenco, mejo detekcije in kvantifikacije, specifičnost, ponovljivost ter robustnost (USP, 2011).

2.8.1 Točnost

Točnost metode je definirana kot odstopanje rezultatov, pridobljenih s preiskovano metodo, od predvidljivih rezultatov izračunanih za posamezno redčitev. Točnost je potrebno dokazati skozi celotno območje preiskovanih vzorcev. Kriterij točnosti je

navadno podan kot delež izplena mikroorganizmov za suspenzijo z določeno koncentracijo, ki ne sme odstopati od teoretične vrednosti 100 % za več kot ± 30 % oziroma, če je izplen metode med 70 in 130 % (Bustin in sod., 2009; USP, 2011).

2.8.2 Ponovljivost

Ponovljivost je stopnja ujemanja rezultatov, pridobljenih s preiskovano metodo, pri večkratnih zaporednih meritvah istega vzorca. Navadno ujemanje izrazimo kot koeficient variance pri normalnih pogojih, pri čemer mora biti slednji manjši ali enak 30 % (Bustin in sod., 2009; USP, 2011).

2.8.3 Specifičnost

Specifičnost je sposobnost metode, da brez kakršnega koli vpliva spremljevalnih surovin ali ozadja, zazna pravilno koncentracijo DNA v vzorcu. Če je prisotna DNA drugih vrst mikroorganizmov, tudi ta ne sme vplivati na zaznavo specifične tarčne DNA. Kriterij specifičnosti zahteva, da je DNA vseh mikroorganizmov pravilno izolirana in zaznana (Bustin in sod., 2009; USP, 2011).

2.8.4 Meja detekcije

Meja detekcije je parameter validacije, ki nam pove kolikšna je najmanjša koncentracija mikroorganizmov v vzorcu, ki jo še lahko uspešno zaznamo, vendar ne nujno ugotovimo z izbranimi pogoji metode (Bustin in sod., 2009; USP, 2011).

2.8.5 Meja kvantifikacije

Meja kvantifikacije je najmanjša koncentracija mikroorganizmov v vzorcu, ki jo lahko z izbranimi pogoji zaznamo in tudi ugotovimo. Ugotavljanje vzorca mora potekati s sprejemljivo točnostjo preiskovane metode. Meja kvantifikacije mora biti enaka oziroma boljša kot uveljavljena metoda. Pomembno je, da se meja kvantifikacije preverja z vsaj petimi ponovitvami poskusa (Bustin in sod., 2009; USP, 2011).

2.8.6 Linearnost

Linearnost je spodobnost naše metode, da zazna ustrezno koncentracijo DNA, ki je sorazmerna s koncentracijo mikroorganizmov v vzorcu, skozi obseg zaznavanja preiskovane metode. Ker ni mogoče pridobiti zanesljivega vzorca s točno znano koncentracijo mikroorganizmov, je bistveno, da se linearnost ugotovi za vsaj 5 različnih točk koncentracijskega območja preiskovane metode. Linearnost preiskovane metode mora ustrezati korelacijskemu koeficientu, ki mora biti večji ali enak 0,9 (USP, 2011).

2.8.7 Ekvivalenca

Ekvivalenca opredeljuje enakost izmerjenih rezultatov preiskovane metode v primerjavi s staro uveljavljeno metodo. Pomembno je, da so rezultati obeh metod pridobljeni iz istega

vzorca in da obe metodi potekata hkrati. Iz dobljenih rezultatov ugotavljamo če so rezultati primerljivi ter izračunamo faktor korelacije (USP, 2011).

2.8.8 Robustnost

Robustnost je sposobnost metode, da pri ponovitvah istega poskusa z različnimi serijami uporabljenih reagentov dobimo enake rezultate. Izbira reagentov različnih proizvajalcev ne sme vplivati na parametre preiskovane metode. Kriterij robustnosti dopušča odstopanja rezultatov poskusa za koeficient variance manjši ali enak 15 % (Bustin in sod., 2009; USP, 2011).

3 MATERIAL IN METODE

V tem poglavju so navedene metode in materiali, ki smo jih uporabili pri eksperimentalnem delu.

3.1 MATERIALI

3.1.1 Bakterijski sevi

Pri izvedbi poskusov smo kot glavna mikroorganizma uporabljali *Lactobacillus acidophilus* LA-5 ter *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12. Oba seva sta komercialno pripravljena bakterijska seva podjetja Chr. Hansen A/S (Horsholm, Danska) v liofilizirani obliki.

3.1.2 Vzorci

Validacija je potekala na 40 različnih serijah liofiliziranih probiotičnih izdelkov, proizvedenih v istem obratu podjetja Lek d.d. ob različnih časih. Vsak uporabljen probiotični izdelek ima deklarirano vsebnost *Lactobacillus acidophilus* LA-5 in *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12, vsakega v koncentraciji najmanj 10^9 KE/kapsulo. Vsaka kapsula vsebuje tudi spremljevalni surovini magnezijev stearat in Beneo Synergy 1.

3.1.3 Gojišča za rast uporabljenih bakterij

Preglednica 2 prikazuje uporabljena gojišča, njihovo sestavo in pripravo.

Preglednica 2: Gojišča za rast bakterij

Sestava	Priprava
Trdno gojišče TOS	
TOS propionat (Merck, 1000430100)	62,5 g dehidriranega gojišča smo raztopili v 950 mL deionizirane vode. Gojišče v steklenici smo segrevali ter pri tem pazili, da gojišče ni zavrelo. Ko se je gojišče popolnoma raztopilo, smo ga odstranili z magnetnega mešala in počakali, da se je ohladilo na približno 40 °C. S predhodno umerjenim pH metrom smo z dodatkom 1 M klorovodikove kisline uravnali pH na 6,2. Pripravljeno čašo z raztopino gojišča smo avtoklavirali po navodilu proizvajalca 15 min pri 115 °C in $1,013 \times 10^5$ Pa nadtlaka. Po avtoklaviranju smo gojišče ohladili na 48 °C ter ga uporabili.
Mupirocin (Merck, 1000450010)	
Klorovodikova kislina (Merck, 1.09057.1000)	

se nadaljuje

nadaljevanje

Preglednica 2: Gojišča za rast bakterij

Sestava	Priprava
Trdno gojišče tos z dodanim mupirocinom	
TOS propionat (Merck, 1000430100)	Pripravljeno trdno gojišče TOS smo ohladili na temperaturo okoli 40 °C ter mu dodali antibiotik mupirocin v končni koncentraciji 50 mg/L. Steklenico z gojiščem smo rahlo premešali, da se je antibiotik homogeno razporedil v gojišču.
Mupirocin (Merck, 1000450010)	
Klorovodikova kislina (Merck, 1.09057.1000)	
Trdno gojišče MRS	
M.R.S. AGAR (Oxoid, CM0361)	62 g dehidriranega gojišča smo raztopili v 1000 mL deionizirane vode. Gojišče v steklenici smo segrevali ter pri tem pazili, da gojišče ni zavrelo. Ko je bilo gojišče popolnoma raztopljeno, smo ga odstranili z magnetnega mešala in počakali, da se je ohladilo na približno 40 °C. S predhodno umerjenim pH metrom smo z dodatkom 1 M natrijevega hidroksida uravnali pH na 6,8. Pripravljeno čašo z raztopino gojišča smo avtoklavirali po navodilu proizvajalca 15 min pri 121 °C in 1,013x10 ⁵ Pa nadtlaka. Po avtoklaviranju smo gojišče ohladili na 48 °C ter ga uporabili.
Natrijev hidroksid (Merck, 1.09137.1000)	
Trdno gojišče MRS z dodanim klindamicinom in ciprofloksacinom	
M.R.S. AGAR (Oxoid, CM0361)	Pripravljeno trdno gojišče MRS smo ohladili na temperaturo okoli 40 °C ter mu dodali antibiotik ciprofloksacin v končni koncentraciji 10 mg/L in klindamicin v končni koncentraciji 0,1 mg/L. Steklenico z gojiščem smo rahlo premešali, da sta se antibiotika homogeno razporedila v gojišču.
Ciprofloksacin (Sigma-Aldrich, 17850)	
Klindamicin hidroklorid (Sigma-Aldrich, C5269)	
Tekoče gojišče MRS z dodanim 0,05 % cisteinom	
MRS bujon, (Merck, 1.10661.0500)	52,2 g dehidriranega gojišča smo raztopili v 1000 mL deionizirane vode ter mu dodali 0,5 g cisteina. Gojišče v steklenici smo segrevali ter pri tem pazili, da gojišče ni zavrelo. Ko se je gojišče popolnoma raztopilo smo, ga odstranili z magnetnega mešala in počakali, da se je ohladilo na približno 40 °C. S predhodno umerjenim pH metrom smo z dodatkom 1 M kloro vodikove kisline uravnali pH na 6,8. Pripravljeno čašo z raztopino gojišča smo avtoklavirali po navodilu proizvajalca 15 min pri 121 °C in 1,013x10 ⁵ Pa nadtlaka. Po avtoklaviranju smo gojišče ohladili na 48 °C.
L-cistein hidroklorid monohidrat (Sigma-Aldrich, C7880)	

3.1.4 Reagenti in raztopine

Reagente in raztopine smo pripravili po navodilu proizvajalca, nekateri od njih so bili predhodno komercialno pripravljene.

3.1.4.1 Pufri, raztopine in barvila

Preglednica 3 prikazuje pripravo pufrov, fiziološke raztopine in barvil, uporabljenih pri poskusih.

Preglednica 3: Pufri, fiziološka raztopina in barvila, uporabljena pri poskusih

Sestava	Priprava
Peptonski diluent	
Oxoid, LP0037	1 g peptona smo raztopili v 1 L deionizirane vode in dodali 8,5 g NaCl.
Fiziološka raztopina	
Natrijev klorid (Merck, 1064001000)	150 mM fiziološko raztopino smo si pripravili tako, da smo 0,88 g NaCl raztopili v 100 mL deionizirane vode in avtoklavirali 15 min pri 121 °C in $1,013 \times 10^5$ Pa nadtlaka.
Pufer TBE (5-kratni)	
0,45 M Borova kislina 0,5 M EDTA (pH 8,0) 0,45 M Tris	
Nanašalni pufer tip IV	
0,25 % barvilo bromfenolmodro v 40 % vodni raztopini saharoze	
Standardna lestvica	
O'RangeRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific, SM0613)	

3.1.4.2 Propidijev monoazid

Preglednica 4 prikazuje reagent propidijev monoazid, njegovo založno koncentracijo ter pripravo.

Preglednica 4: Priprava propidijevega monoazida

Sestavina	Založna konc.	Priprava
PMATM (Biotium, 40013)		
Propidijev monoazid	20 mM	V originalno vialo z 1 mg propidijevega monoazida smo dodali 97,8 µL vode brez nukleaz in jo shranili na -20 °C.
Voda brez nukleaz (Ambion, AM9937)	/	Komercialno pripravljeno.

3.1.4.3 Antibiotiki

Preglednica 5 prikazuje uporabljene antibiotike, njihove založne koncentracije ter načine priprave.

Preglednica 5: Antibiotiki, uporabljeni pri validaciji

Sestavina	Založna konc.	Priprava
Ciprofloksacin		
Ciprofloksacin (Sigma-Aldrich, 17850)	10 mg/mL	V epruvetko smo natehtali 10 mg ciprofloksacina in dodali 1 mL 0,1 M HCl.
Klorovodikova kislina (Merck, 1.09057.1000)		
Klindamicin		
Klindamicin hidroklorid (Sigma-Aldrich, C5269)	0,1 mg/mL	V original vialo s 50 mg klindamicina smo dodali 5 mL vode brez nukleaz in dobro resuspendirali. Nato smo v novo epruvetko odpipetirali 10 µL raztopine antibiotika in dodali 990 µL vode brez nukleaz.
Voda brez nukleaz (Ambion, AM9937)		
Mupirocin		
Mupirocin (Merck, 1000450010)	1 mg/mL	V original vialo s 25 mg mupirocina smo dodali 25 mL vode brez nukleaz in dobro premešali.
Voda brez nukleaz (Ambion, AM9937)		

3.1.4.4 Ročna izolacija DNA

Preglednica 6 prikazuje reagentne uporabljene pri ročni izolaciji DNA.

Preglednica 6: Reagenti, uporabljeni za ročno izolacijo DNA

Sestavina
Proteinaza K, izopropanol, 70 % etanol, pufer TE, 10 % reagent SDS, 5 M NaCl, CTAB/NaCl, kloroform, izoamilalkohol, fenol

3.1.4.5 Avtomatizirana izolacija DNA

Preglednica 7 prikazuje uporabljene reagente in raztopine, njihove založne koncentracije ter načini priprave pri avtomatiziranem postopku izolacije DNA.

Preglednica 7: Reagenti, uporabljeni pri avtomatizirani izolaciji DNA

Sestavina	Založna konc.	Priprava
Mutanolizin		
Mutanolizin (Sigma-Aldrich, M9901) Voda brez nukleaz (Ambion, AM9937)	13567 U/mL	V original vialo z 0,19 mg (2577 U) mutanolizina smo dodali 190 µL vode brez nukleaz in dobro resuspendirali.
Lizocim		
Lizocim (Sigma-Aldrich, L6876)	/	Komercialno pripravljen prašek.
Raztopina za encimsko obdelavo celic pred avtomatizirano izolacijo DNA		
Lizocim (Sigma-Aldrich, L6876) Mutanolizin (Sigma-Aldrich, M9901) Voda brez nukleaz (Ambion, AM9937)	25 mg/mL 125 U/mL	Na analitski tehtnici smo natehtali 37,5 mg lizocima in mu dodali 1465 µL vode brez nukleaz. Vsebinsko epruvetke smo dobro resuspendirali ter nato dodali še 34,8 µL pripravljene raztopine mutanolizina. Vsebinsko epruvetko smo ponovno dobro resuspendirali.
Pufer Tris		
Tris baza (Promega, H5135) Voda brez nukleaz (Ambion, AM9937)	1 M	Na analitski tehtnici smo natehtali 6,06 g Tris baze in jo raztopili v 50 mL vode brez nukleaz.
Raztopina EDTA		
EDTA (Sigma-Aldrich, E5134) Voda brez nukleaz (Ambion, AM9937)	0,1 M	Na analitski tehtnici smo natehtali 1,86 g prahu Na ₂ EDTA in ga raztopili v 50 mL vode brez nukleaz.

se nadaljuje

nadaljevanje

Preglednica 7: Reagenti, uporabljeni pri avtomatizirani izolaciji DNA

Sestavina	Založna konc.	Priprava
Pufer TE		
Tris baza (Promega, H5135) EDTA (Sigma-Aldrich, E5134) Voda brez nukleaz (Ambion, AM9937)	1x	0,5 mL pufru Tris smo dodali v 45 mL vode brez nukleaz in uravnali pH na 8,00. Nato smo dodali 0,5 mL raztopine EDTA in do 50 mL dopolnili z brez nukleazno vodo. Pripravljen pufer smo avtoklavirali 15 min pri 121 °C in 1,013x10 ⁵ Pa nadtlaka.
Maxwell 16 Tissue DNA Purification Kit (Promega, AS1030)		
Elucijski pufer Maxwell 16 Tissue DNA		Komercialno pripravljeno.
RNase A solution (Promega, A7973)		
Encim Rnaza A	4 mg/mL	Komercialno pripravljeno.

3.1.4.6 RT PCR

Preglednica 8 prikazuje pri metodi RT PCR uporabljene reagente, njihove založne koncentracije, ter način priprave.

Preglednica 8: Reagenti, uporabljeni pri PCR v realnem času

Sestavina	Založna konc.	Priprava
Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen, 11733 - 038)		
/	/	Komerzialno pripravljeno.
Voda brez nukleaz (Ambion, AM9937)		
/	/	Komerzialno pripravljeno.

3.1.4.7 Začetni oligonukleotidi

Preglednica 9 prikazuje uporabljene začetne oligonukleotide, njihova nukleotidna zaporedja ter velikosti nastalega pomnožka.

Preglednica 9: Začetni oligonukleotidi

Tarča	Naziv	Nukleotidno zaporedje (5' – 3')	Vel. pomn. (bp)
<i>Bifidobacterium animalis</i>	Bif_animalis-F	CGGATCGCCGTGGAGA	138
	Bif_animalis-R	CATCACCCGCTGGCAAC	
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	LB_acidophilus-F	TGTTGTTGGTGAAGAAGGATAGAG G	209
	LB_acidophilus-R	CAGTTTCCGATGCAGTTCCTC	
<i>Bifidobacterium</i> (Rinttila, 2004)	Bif-F	TCGCGTCYGGTGTGAAAG	243
	Bif-R	CCACATCCAGCRTCCAC	
<i>Lactobacillus</i> (Songjinda, 2007)	LactoR'F	CACAATGGACGMAAGTCTGATG	358
	LBFR	CGCCACTGGTGTCTTCCAT	
16S DNA (Frank, 2008)	1492r 27f-CM	TACCTTGTTACGACTT AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	1450*

*odvisno od bakterijskega seva

Preglednica 10 prikazuje uporabljene začetne oligonukleotide ter njihove lastnosti.

Preglednica 10: Lastnosti uporabljenih začetnih oligonukleotidov

Naziv	Tarčno mesto na 16S rRNK	Temperatura hibridizacije [T _m]	%GC	Dolžina zač. oligonukleotida (bp)
Bif_animalis-F	691-706	58,7	69	16
Bif_animalis-R	812-828	58,1	65	17
LB_acidophilus-F	458-482	59,5	44	25
LB_acidophilus-R	646-666	58,4	52	21
Bif-F	280-297	60,4	61	18
Bif-R	506-522	55,1	65	17
LactoR'F	391-412	60,1	50	21
LBFR	729-748	59,6	55	20

3.1.5 Laboratorijski pribor in oprema

Preglednica 11 prikazuje uporabljen pribor in opremo pri postopku validacije metode PMA RT PCR.

Preglednica 11: Laboratorijski pribor za izvedbo eksperimentalnega dela

Pribor	Oznaka	Proizvajalec
Anaerobne vrečke	Genbag Anaer, 45534	Biomérieux
Anaerobni indikatorji	Anaer Indicator, 96118	Biomérieux
Anaerobni lonci	Anaero Jar 2,5 L, Ago 25 A	Oxoid
Avtomatske pipete	Research PRO, 10-5000 uL	Eppendorf, Nemčija
Cepilne zanke		Labortechnika Golias
Halogenska žarnica	650 W, 230 V	Osram, Nemčija
Magnetno mešalo	550 M	Tehtnica, Železniki
Merilni valji		Plastibrand
Epruvetke	1,5 mL	Eppendorf, Brand
Nastavki za avtomatske pipete		Eppendorf, Nemčija
Palčka za razmazovanje		Labortechnika Golias
Petrijevke	F170	Labortechnika Golias
Petroff-Hausserjeva komora		Hausser Scientific
Redčitvena vrečka		
Ročni števec kolonij	EŠ KO 7L	LABO Ljubljana
Steklovina		Brand, Schott

Preglednica 12 prikazuje uporabljen pribor in laboratorijsko opremo za izvedbo eksperimentalnega dela.

Preglednica 12: Laboratorijski oprema za izvedbo eksperimentalnega dela

Oprema	Oznaka	Proizvajalec
Analitska tehtnica	Mettler AT261	Delta Range
Aparat za avtomatizirano izolacijo DNA	Maxwell [®] 16 Instrument	Promega, Madison, USA
Aparat za fotoaktivacijo	Phast blue	GeniuL
Aparat za PCR v realnem času	7500 Fast Real-Time PCR	Applied Biosystems [®]
Avtoklav	6-6-12 VS2	Belimed SouterAG
Centrifuga	Mini Spin, Centric 400	Eppendorf, Nemčija Tehtnica
Dilutor	Delta dilutor	IUL Instruments
Elektroforeza		BioRad
Hladilnik		Gorenje, Slovenija

se nadaljuje

nadaljevanje

Preglednica 12: Laboratorijski oprema za izvedbo eksperimentalnega dela

Pribor	Oznaka	Proizvajalec
Homogenizator	Masticator	IUL Instruments
Inkubator		Kambič laboratorijska oprema
Ledomat		Scotsman
Mikroskop		Olympus
Mikrovalovna pečica		Gorenje
pH meter	801 Stirrer	Metrohm
Plinski gorilnik		
Računalnik	Optiplex 755	DELL
Stresalnik za epruvete	Vibromix 10	Tehtnica, Slovenija
Tehtnice	XP2002S	Mettler Toledo, Švica Tehtnica, Slovenija
Termoblok	Bio TDB-100	Biosan
Vodna kopel		Memmert
Vorteksno mešalo	Lab dancer	IKA®
Zaščitna mikrobiološka komora	M15 MC15-2 MVRLFVP9	Iskra PIO, Slovenija
Zamrzovalnik (-20 °C)		Gorenje

Preglednica 13 prikazuje pri validaciji uporabljene računalniške programe, spletna orodja ter zbirke.

Preglednica 13: Uporabljeni računalniški programi

Program/orodje/zbirka	Naziv	Vir
Rač. program za analizo bakterijskih genomov	Artemis Release 13.2.0	Rutherford in sod., 2000
Rač. program za načrtovanje začetnih oligonukleotidov	Primrose 2.17	Ashelford in sod., 2002
Rač. program za načrtovanje začetnih oligonukleotidov	Primer Express 3.0	Applied Biosystems
Rač. program za napravo RT PCR	7500 Fast System with 21 CFR Part 11 Software	Applied Biosystems
Rač. program za poravnavo nukleotidnega zaporedja	Clustal	Higgins in sod., 1996

Preglednica 14: Uporabljena spletna orodja ter zbirke

Spletno orodje/zbirka	Naziv	Vir
Spletno orodje za analizo restrikcije bakt. genoma	Neb Cutter V 2.0	Vincze in sod., 2003
Spletno orodje za preverjanje začetnih oligonukleotidov	Probe Check	Loy in sod., 2008
Spletna zbirka bakt. genomov	EMBL-EBI	Hubbard in sod., 2001
Spletna zbirka bakterij in celičnih kultur	DSMZ	Braunschweig, Germany
Spletna zbirka dokumentiranih rRNA zaporedij	Silva ribosomal RNA databases	Pruesse in sod., 2007
Spletna zbirka dokumentiranih začetnih oligonukleotidov	Probe Base	Loy in sod., 2007

3.2 METODE

3.2.1 Gojitvene tehnike

V zaščitni mikrobiološki komori smo natehtali 0,1 g liofiliziranega prahu čiste kulture *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12 in ga raztopili v 10 mL peptonskega diluenta. Raztopino smo vorteksirali, da se je liofiliziran prah dobro raztopil. S sterilno cepilno zanko (0,1 mL) smo na ploščo s gojiščem TOS nacepili suspenzijo kulture. Ploščo z nacepljeno kulturo smo označili in jo shranili v anaerobni lonec, v katerega smo dodali listič za vezavo kisika oziroma generiranja anaerobnega okolja, ter dodali tudi indikator anaerobnega okolja. Lonec s petrijevo ploščo smo za 72 ur postavili v inkubator na 37 °C.

Za gojenje bakterij v tekočem gojišču MRS z 0,05 % cisteinom smo raztopili liofiliziran prah po zgoraj opisanem postopku in nato s pipeto odpipetirali 100 µL raztopljenega prahu v epruveto z aerobno atmosfero ter jo postavili preko noči na 37 °C. Naslednji dan smo iz kulture odpipetirali 100 µL gojišča v novo epruveto z gojiščem MRS z 0,05 % cisteinom in jo inkubirali pri 37 °C.

Po enakem postopku, kot je opisan pri bifidobakterijah, smo iz čiste kulture liofiliziranega seva *Lactobacillus acidophilus* LA-5 pripravili raztopino bakterij in jo cepili na plošče MRS. Enako metodologijo smo uporabili pri gojenju čiste kulture laktobacilov v tekočem MRS gojišču z 0,05 % cisteinom.

3.2.2 Pregled bakterij z mikroskopom

Naredili smo tri native preparate. Enega iz epruvete z aerobno atmosfero, enega iz epruvete z anaerobno atmosfero ter preparat bakterij iz trdnega gojišča – plošče. Kapljico iz vsakega vzorca smo kanili na objektno stekelce, jo prekrili s krovnikom ter pogledali

pod mikroskopom. Pri vzorcu iz trdnega gojišča smo postrgano kolonijo predhodno resuspendirali v kapljici fiziološke raztopine.

3.2.3 Neposredno štetje bakterij z mikroskopom

Pri štetju smo uporabljali fazno kontrasti mikroskop in Petroff-Hausserjevo števno komoro. Kapljico bakterijske kulture smo kanili pod krovno stekelce števne komore in pogledali z mikroskopom. V primeru prevelike koncentracije bakterij v vzorcu smo naredili 10 oziroma 100-kratno redčitev, da je bila prešteta koncentracija bakterij v vzorcu okoli 30 celic na kvader. Pri vsakemu poskusu smo z mikroskopom, pri 400-kratni povečavi, prešteli celice v 40 kvadrilih in iz podatkov dimenzij kvadra (0,2 mm · 0,2 mm · 0,02 mm) preračunali število bakterij na enoto 1 mL vzorca po matematični enačbi (1):

$$\text{Št. bakterij/mL} = \frac{\text{št. celic v 40 kvadratkih} \cdot 1250000 \cdot \text{redčitev}}{40} \quad \dots (1)$$

3.2.4 Cepitev DNA z restrikcijsko endonukleazo

Pri poskusih smo uporabljali komercialno pripravljen bakterijski sev podjetja Chr. Hansen v liofilizirani obliki. Za potrditev identitete uporabljenega seva smo se lotili cepitve DNA z encimom *TaqI*. Na spletni strani evropskega bioinformacijskega inštituta (*European Bioinformatics Institute*) smo pridobili pripadajočo sekvenco celotnega genoma bakterijskega seva BB-12. S pomočjo računalniškega programa Artemis smo pregledali genom in poiskali gene za 16S rRNK. S spletnim orodjem Clustal smo med seboj primerjali sekvence 16S rRNK in s programom NEB Cutter izdelali restrikcijski profil sekvenc.

3.2.4.1 Ročna izolacija DNA

Iz kulture, ki smo jo inkubirali preko noči smo odpipetirali 1,5 mL gojišča in naredili izolacijo DNA po spodnjem protokolu.

1. Očiščenje celic gojišča:
Celice smo centrifugirali 10 min/5000 g pri 2 °C ter nastavili počasno ustavljanje centrifuge. Nato smo previdno odpipetirali gojišče ter na dnu epruvetke ohranili usedlino. V epruvetko smo dodali 1,5 mL fiziološke raztopine ter resuspendirali in nato centrifugirali 10 min/5000 g pri 2 °C. Supernatant smo odpipetirali tako, da smo na dnu ohranili celično usedlino.
2. Liza celic:
Celični usedlini smo dodali 567 µL pufra TE, resuspendirali, in nato supernatant prenesli v epruvetko s kroglicami (Bead Beater). Celice smo izpostavili tresenju 3x po 30 sekund z vmesnim hlajenjem v ledeni kopeli. Nato smo dodali 3 µL proteinaze K (na ledu) in 30 µL 10 % reagenta SDS ter inkubirali eno uro pri 50 °C.

3. Čiščenje:

Lizirane celice smo dodatno očistili tako, da smo v epruvetko dodali 100 μ L 5 M NaCl ter zmešali. Nato smo dodali 80 μ L raztopine CTAB/NaCl, ki smo jo predhodno segreli na 65 °C (termo blok), ter nato zmešali. Sledila je 10 minutna inkubacija pri 65 °C (termo blok). Po inkubaciji smo v epruvetko dodali (v mikrobiološki brezprašni komori) enak volumen mešanice kloroform : izoamilalkohol, previdno premešali ter centrifugirali 10 min/5000 g pri 2 °C. Dobro se je ločila polarna in nepolarna faza. S pipeto smo previdno odpipetirali zgornjo vodno fazo v novo sterilno epruvetko. Nato smo dodali enak volumen mešanice fenola in kloroforma, previdno premešali in centrifugirali 10 min/5000 g. Po centrifugiranju smo ponovno odpipetirali zgornjo vodno fazo v novo epruvetko ter dodali enak volumen kloroform : izoamilalkohol in zopet centrifugirali 10 min/5000 g. Ločeno zgornjo vodno fazo smo nato prenesli v novo epruvetko.

4. Obarjanje DNA:

DNA smo oborili tako, da smo dodali 60 % volumna izopropanola in kloroforma in pustili na pultu stati 3 minute. Sledilo je centrifugiranje 10 min/5000 g. Zgornjo fazo izopropanola smo previdno odpipetirali iz epruvetke in jo zavrgli. V epruvetki je ostala oborjena DNA, ki smo ji dodali 1 mL 70 % etanola, rahlo premešali ter centrifugirali 10 min/5000 g. Po centrifugiranju smo previdno odpipetirali etanol (spodaj na steni epruvetke je bila DNA) in epruvetko pustili odprto na pultu v brezprašni mikrobiološki komori, da se posuši.

5. Raztapljanje DNA ter shramba:

Izolirano DNA smo raztopili v 50 μ L 1 mM Tris pufra s pH 8 in dodali 0,2 μ L encima RNAza A. Epruvetko z raztopljeno DNA smo za 5 minut postavili v termo blok na 37 °C. Nato smo jo za kratek čas centrifugirali in shranili pri -20 °C.

3.2.4.2 Pomnoževanje DNA za gen 16S rRNK z metodo verižne reakcije s polimerazo

Ko smo opravili izolacijo DNA, smo se lotili pomnoževanja z metodo PCR.

Preglednica 15 prikazuje reagente, ki smo jih uporabili pri metodi PCR.

Preglednica 15: Reagenti, uporabljeni pri reakciji PCR

Reagent	Založna koncentracija reagentov (mM)	Končna koncentracija reagentov (mM)
MgCl ₂	25	2
nukleotidi	2	0,2
PCR pufer	10x	10x
Začetni oligonukleotidi	2	0,2
PCR voda	/	/
Encim polimeraza	5E/ μ L	0,8E/20 μ L
Raztopina DNA	/	1 μ L

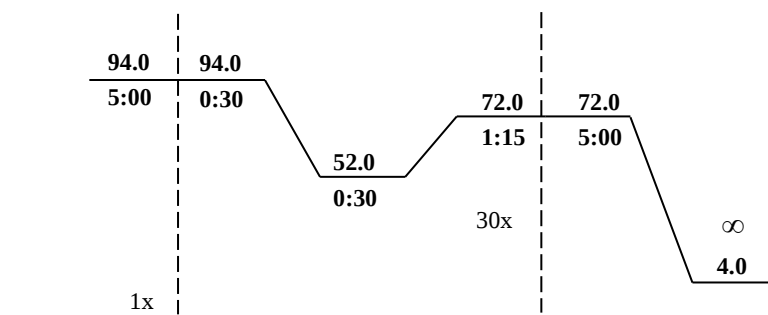
Preglednica 16 prikazuje uporabljene volumne reagentov.

Preglednica 16: Uporabljeni volumni reagentov pri reakciji PCR

Reagent	Uporabljeni volumni (μL)
MgCl ₂	1,6
nukleotidi	2
PCR pufer	2
Začetni oligonukleotidi	2
PCR voda	9,24
Encim polimeraza	0,16
Raztopina DNA	1

Skupni volumen (20 μL) dobro premešamo in epruvetko postavimo v aparat, ki omogoča potek verižne reakcije s polimerazo. Program pomnoževanja prikazuje

Slika 2.



Slika 2: Shematski prikaz temperaturnega in časovnega protokola metode PCR, uporabljenega pri encimski restrikciji

Po opravljenem pomnoževanju smo dobljeni produkt dodatno očistili po postopku opisanem v poglavju 3.2.4.3.

3.2.4.3 Čiščenje DNA po pomnoževanju

Iz epruvetke PCR smo prenesli vsebino v novo 1,5 mL epruvetko ter dodali deionizirano vodo do skupnega volumna 100 μL. Nato smo dodali 500 μL vezavnega pufra (Binding buffer) iz kompleta High pure PCR product purification kit (Roche, 11732668001), ter premešali. Tubico s filtrom (High Pure Filter Tube) smo vstavili v posebno epruvetko (Collection Tube) in celotno vsebino (600 μL) prenesli v zgornjo tubico s filtrom ter centrifugirali 30 sekund pri najvišjih obratih (vsaj 13000 g). Nato smo prefiltrirano tekočino, zbrano v spodnji epruvetki, odlili ter ponovno sestavili isto tubico z isto epruvetko.

Prvo in drugo spiranje:

V epruvetko smo dodali 500 μ L pufra za spiranje (Wash Buffer) v zgornji rezervoar tubice ter centrifugirali 30 sekund pri najvišjih obratih. Prefiltrirano tekočino smo odlili in ponovno sestavili isto tubico z isto epruvetko. Dodali smo 200 μ L pufra za spiranje (Wash Buffer) v zgornji rezervoar tubice ter centrifugirali 30 sekund pri najvišjih obratih. Spodnjo epruvetko s prefiltrirano tekočino smo zavrgli.

Elucija DNA:

Zgornjo tubico z vezano DNA smo postavili v navadno sterilno 1,5 mL epruvetko. V zgornjo tubico s filtrom smo dodali 50-100 μ L elucijskega pufra (Elution Buffer) in centrifugirali 30 sekund pri najvišjih obratih (vsaj 13000 g). Očiščeno DNA smo shranili pri 2-8 °C.

Očiščeno DNA smo pogledali z UV presvetljevalnikom po končani elektroforezi.

3.2.4.4 Priprava agaroznega gela

Za pripravo gela za elektroforezo smo pripravili 1,2 % raztopino agaroze z 0,5x pufrom TBE. V primerno erlenmajerico smo natehtali 0,5 g agaroze in dodali 42 mL pufra TBE. Erlenmajerico smo za približno 25 sekund postavili v mikrovalovno pečico (800 W). Nato smo jo za 2 minuti postavili na pult, rahlo premešali in počakali, da se ohladi. Nato smo erlenmajerico ponovno postavili za približno 20 sekund v mikrovalovno pečico. Agarosa se je z opisanim postopkom dobro raztopila v pufru. Istočasno smo pripravili elektroforezno banjico, ki smo jo vpeli v držalo in vanjo postavili primerni glavnik. Ko se je agarozna raztopina ohladila pod 60 °C, smo jo vlili v pripravljeno elektroforezno banjico. Morebitne nastale mehurčke smo odstranili s sterilnim plastičnim nastavkom za avtomatske pipete. Po približno 20 minutah smo banjico odpeli in jo skupaj z gelom prenesli v aparat za elektroforezo.

3.2.4.5 Nanos vzorca

Zmešali smo 1 μ L nanašalnega pufra in ga pomešali s 5 μ L vzorca, nato pa v posamezno luknjico prenesli 5 μ L pomešanega vzorca. Prav tako smo v eno izmed luknjic nanesti 3 μ L 50 bp velike standardne lestvice. Elektroforezo smo za 1 uro priključili na napetost 100 V.

3.2.4.6 Barvanje agaroznega gela

Gel smo z rokavicami ločili od banjice in ga za približno 10 minut postavili v raztopino z etidijevim bromidom. Nato smo gel za 10 minut prenesli v deionizirano vodo in ga razbarvali odvečnega barvila. Gel smo prenesli v posebno sobo, kjer smo pod ultravijolično svetlobo pogledali bakterijsko DNA.

3.2.4.7 Cepitev DNA z restrikcijsko endonukleazo *TaqI*

V novo epruvetko smo zmešali 16 μ L vode brez nukleaz in 2 μ L 10x pufru Taq1 ter dodali 10 μ L shranjene očiščene DNA. Epruvetko smo za 2 uri postavili v vodno kopel na 65 °C.

Po opravljeni cepitvi smo vzorec nanesti na agarozni gel in primerjali naš preučevani profil s profilom značilnim za ta sev.

3.2.5 Načrtovanje začetnih oligonukleotidov

Načrtovanja smo se lotili s pregledom literature in s seznanitvijo z morebitnimi ustreznimi dokumentiranimi začetnimi oligonukleotidi. Ker za uporabljeni vrsti bakterij nismo zasledili ustreznih vrstno specifičnih začetnih oligonukleotidov, smo se načrtovanja lotili sami. S spleta smo pridobili prosto dostopne genome in s pomočjo računalniškega programa Artemis poiskali zaporedja DNA za gen 16S rRNK. To smo naredili za več različnih vrst znotraj posameznega rodu (*Bifidobacterium* in *Lactobacillus*). Zbrana zaporedja smo nato poravnali s pomočjo računalniškega programa Clustal in na ta način prišli do informacij o spremenljivih oziroma ohranjenih regijah. Iskanja ustreznih vrsto specifičnih začetnih oligonukleotidov smo se lotili znotraj spremenljivih regij. Uporabili smo računalniško orodje Primrose, s katerim smo poiskali morebitne kandidate začetnih oligonukleotidov. Nato smo uporabili računalniški program Primer Express 3.0, s katerim smo preverili, kateri od predlaganih oligonukleotidnih parov je najprimernejši za nadaljnjo uporabo.

Pri izboru oligonukleotidnega para smo upoštevali naslednje kriterije:

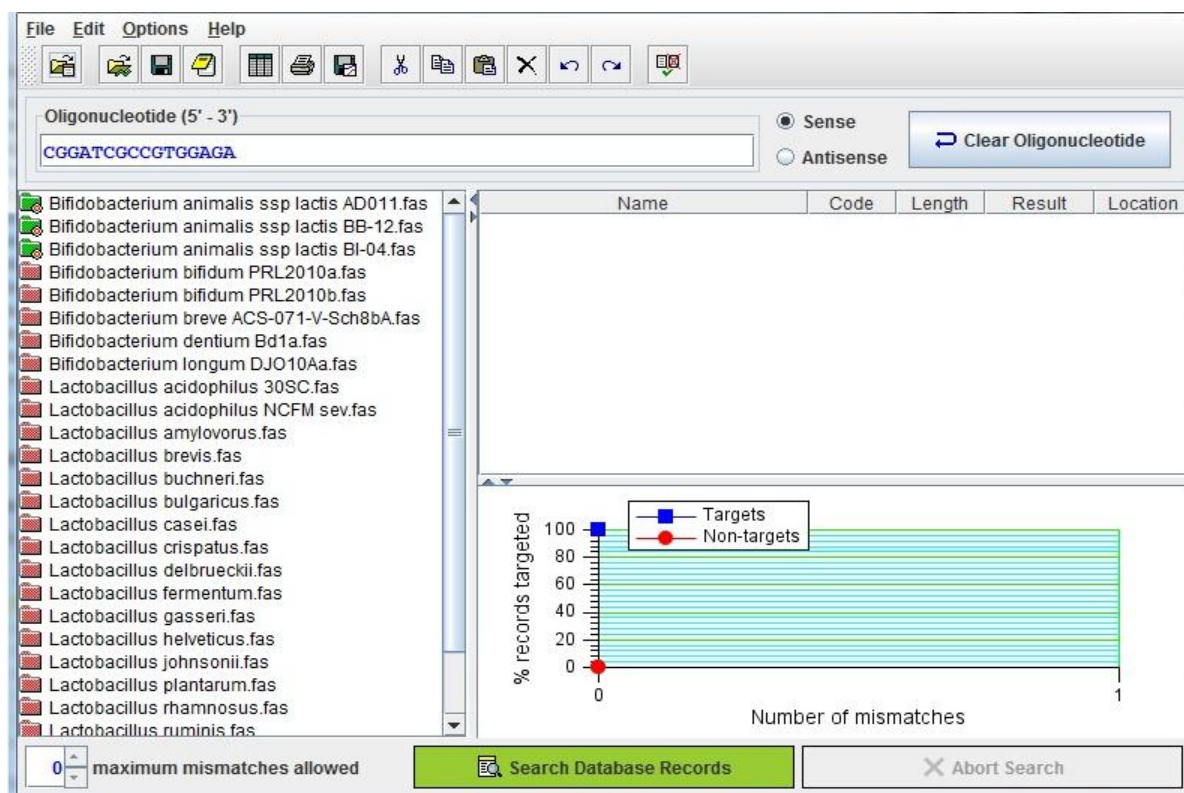
- Dolžina začetnega oligonukleotida je 15-30 baz.
- Vsebnost nukleotidov G+C je med 40 in 60 %.
- Ne tvorita notranjih sekundarnih struktur in lasnic.
- 3' konca obeh oligonukleotidnih začetkov se komplementarno ne prekrivata.
- V bližini 3' se moramo izogibati treh zaporednih G oziroma C nukleotidov.
- Oba začetna oligonukleotida hibridizirata pri podobni temperaturi.

Po opisanem postopku načrtovanja začetnih oligonukleotidov smo izbrali najprimernejše kandidate in jih, s pomočjo spletnega orodja Probe-Check, dodatno preverili kot prikazuje Slika 3.

probeCheck a central resource for evaluating probe and primer specificity							
home check databases help credits citation							
Major Update: probeCheck runs on 64 bit hardware now! The current releases of Silva (102) can be queried; other databases will be implemented again soon. Database: 16S/18S rRNA - SILVA Version: 102 Number of sequences: 460,783 SILVA SSU reference database containing high quality 16S/18S ribosomal RNA sequences with a minimum length of 1,200 bases for Bacteria and Eukarya and 900 bases for Archaea. Reference: Pruesse E, Quast C, Knittel K, Fuchs B, Ludwig W, Peplies J, Glöckner FO. 2007. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. Nucleic Acid Res. 35:7188							
Hits for (CGGATCGCCGTGGAGA) 25 out of 25 shown.							
Name	Acc.	MM	WM	ΔG	Pos.	Compl.	Sequence
CGGAUCGCCGUGGAGA							
<i>Bifidobacterium animalis</i>	AB027536		0		1000	0	GACAUGUC-----CACGGUUC
<i>Bifidobacterium animalis</i>	AB050138		0		1000	0	GACAUGUC-----CACGGUUC
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp.	AB050136		0		1000	0	GACAUGUC-----CACGGUUC
<i>Bifidobacterium animalis</i>	AB050137		0		1000	0	GACAUGUC-----CACGGUUC
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. lactis HN019	ABOT01000014		0		1000	0	GACAUGUC-----CACGGUUC
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. infantis	AJ311604		0		1000	0	GACAUGUC-----CACGGUUC
<i>Bifidobacterium animalis</i>	AY700230		0		1000	0	GACAUGUC-----CACGGUUC
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. lactis BI-04	CP001515		0		1000	0	GACAUGUC-----CACGGUUC
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. lactis DSM 10140	CP001606		0		1000	0	GACAUGUC-----CACGGUUC
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. lactis BI-04	CP001515		0		1000	0	GACAUGUC-----CACGGUUC
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. lactis DSM 10140	CP001606		0		1000	0	GACAUGUC-----CACGGUUC
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. lactis AD011	CP001213		0		1000	0	GACAUGUC-----CACGGUUC
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. lactis BI-04	CP001515		0		1000	0	GACAUGUC-----CACGGUUC
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. lactis DSM 10140	CP001606		0		1000	0	GACAUGUC-----CACGGUUC

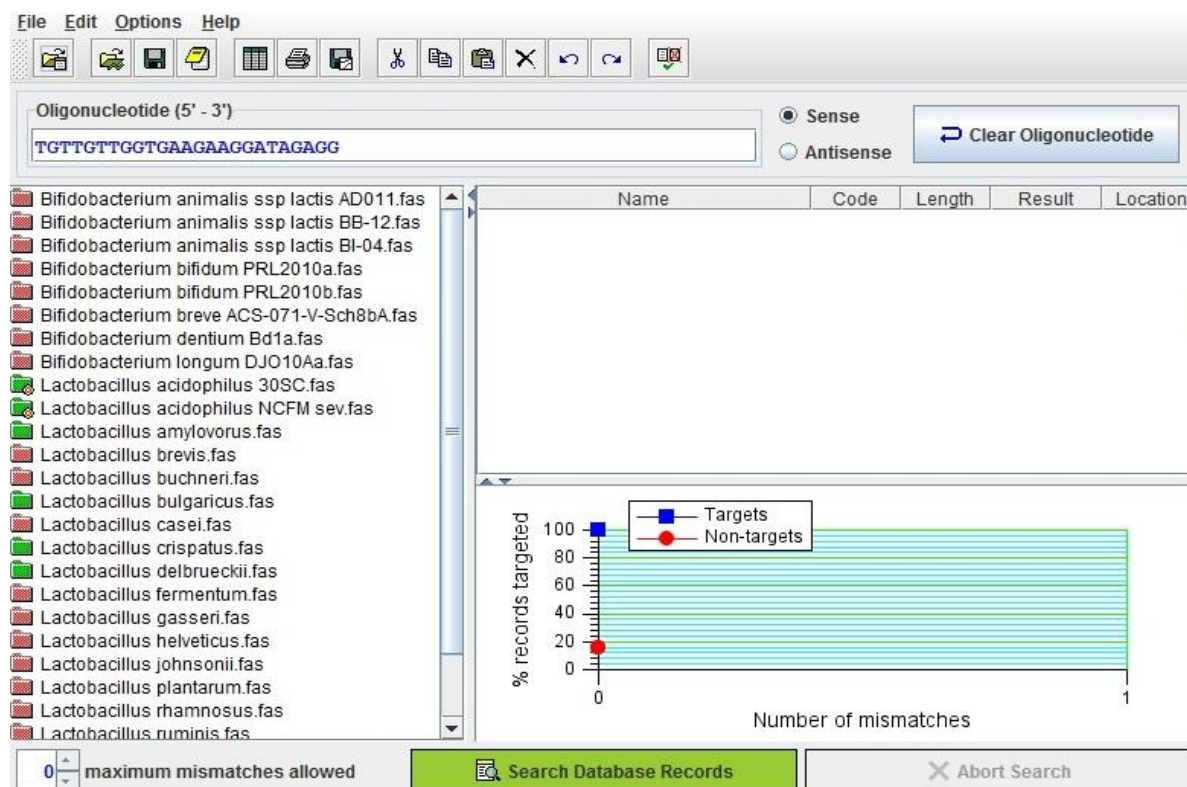
Slika 3: Prikaz preverjanja začetnega oligonukleotida v spletni zbirki 16S rRNK zaporedij (Loy in sod., 2008)

Slika 4 prikazuje preverjanje začetnega oligonukleotida v računalniškem programu Primrose pri bifidobakterijah.



Slika 4: Prikaz preverjanja začetnega oligonukleotida v programu Primrose pri bifidobakterijah (Ashelford in sod., 2002)

Slika 5 prikazuje preverjanje začetnega oligonukleotida v računalniškem programu Primrose pri laktobacilih.



Slika 5: Prikaz preverjanja začetnega oligonukleotida v programu Primrose pri laktobacilih

3.2.5.1 Priprava začetnih oligonukleotidov

Začetne oligonukleotide smo naročili pri podjetju MicroSynth, ki nam jih je poslalo v liofilizirani obliki. V vsako epruvetko z začetnimi oligonukleotidi smo dodali ustrezno količino čiste vode brez nukleaz, potrebno za koncentracijo 100 μ M. Volumen vode smo odčitali na spremljevalni specifikaciji za vsak oligonukleotid. Pipetiranje smo opravili v čim najbolj čistem okolju - v mikrobiološki komori. Po dodatku čiste vode smo epruvetke rahlo premešali in jih za 5 minut postavili v termo blok na 50 $^{\circ}$ C. Po pretečenem času smo epruvetke ponovno dobro premešali (vorteks) in jih shranili v zamrzovalnik pri -20 $^{\circ}$ C.

Za vsakodnevno odtaljevanje epruvetk smo si pripravili alikvote z 2 mM koncentracijo začetnih oligonukleotidov. To je 10x večja koncentracija kot smo jo potrebovali pri poskusih.

3.2.5.2 Preverjanje specifičnosti začetnih oligonukleotidov

Preverjanja vrstne specifičnosti začetnih oligonukleotidov smo se lotili le pri bifidobakterijah, saj nam pri laktobacilih teoretično ni uspelo načrtovati vrstno specifičnih začetnih nukleotidov. S pomočjo spletnega orodja Probe-Check smo poiskali tiste bakterijske vrste, ki se z vrstno specifičnim začetnim oligonukleotidnim parom ne ujemajo v enem, dveh, treh ali več nukleotidih. Pri nemškem inštitutu DSMZ smo za preverjanje specifičnosti začetnih oligonukleotidov kupili bifidobakterije v liofilizirani obliki, ki jih prikazuje Preglednica 17.

Preglednica 17: Bakterijske vrste in pripadajoče kataloške številke

Bakterijska vrsta	Kataloška številka
<i>B. gallicum</i>	DSM-20093
<i>B. tsurumiense</i>	DSM-17777
<i>B. magnum</i>	DSM-20222
<i>B. bifidum</i>	DSM-20456
<i>B. adolescentis</i>	DSM-20083
<i>B. breve</i>	DSM-20088
<i>B. longum</i>	DSM-20213

Liofilizirano tabletko vsakega seva smo posebej raztopili v epruveto z 10 mL tekočega gojišča MRS z dodanim 0,05 % cisteinom in predhodno uravnanim pH-jem na približno 6,2. Posebnih pogojev anaerobnosti nismo zagotavljali. Vsako epruveto smo zatesnili z zamaškom in jo postavili preko noči na 37 °C.

Naslednji dan smo iz vsake od epruvet odpipetirali 100 µL bakterijske kulture v nove epruvete z gojiščem MRS in jih postavili na 37 °C.

Pri optični gostoti približno 0,9 smo iz vsake od epruvet prenesli 1 mL bakterijske kulture v epruvetko in centrifugirali 5 min/5000 g. Nato smo odpipetirali supernatant, tako da smo na dnu ohranili usedlino bakterijskih celic. Epruvetke smo do nadaljnje analize shranili pri -20 °C.

Sledila je avtomatizirana izolacija DNA po že opisanem postopku, nato pa reakcija RT PCR po časovno-temperaturnem protokolu opisanem v poglavju 3.2.6.2.2.

Izolirano DNA smo preverili tako z vrstno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi, kot tudi tistimi specifičnimi za rod. Pri analizi smo v obeh primerih nanesti tudi znani vzorec DNA, izolirane iz *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12 (pozitivna kontrola) ter negativno kontrolo (NTC).

3.2.6 Metoda PMA Real Time PCR

Pred validacijo metode PMA RT PCR smo pripraviti umeritveni standard.

3.2.6.1 Priprava standarda

Iz komercialno pripravljenega seva smo v epruveto z 10 mL peptonskega diluenta prenesli 1 g liofiliziranega prahu bifidobakterij. Epruveto smo rahlo premešali, da se je material dobro raztopil. Iz pripravljene raztopine smo v tekoče gojišče MRS z 0,05 % dodatkom cisteina prenesli 100 µL kulture in epruveto postavili preko noči v inkubacijo na 37 °C. Vse epruvete smo pokrivali z navadnimi kovinskimi pokrovčki, pri čemer nismo zagotavljali posebnih anaerobnih pogojev. Naslednji dan smo epruveto rahlo premešali in ob gorilniku odpipetirali 100 µL bakterijske kulture, ki smo jo inkubirali preko noči, v 10

mL svežega tekočega gojišča MRS, ki smo ga predhodno za nekaj minut postavili v vodno kopel na 37 °C. Nacepljeni epruveti smo izmerili optično gostoto (OD) pri valovni dolžini 600 nm. Za referenčno meritev optične gostote smo uporabili enako gojišče MRS z dodanim z 0,05 % cisteinom brez bakterijskega inokuluma. Bakterije so začele hitro rasti in po nekaj urah smo dosegli OD okoli vrednosti 0,9. Pri tej vrednosti optične gostote smo po 1 mL gojišča alikvotirali v sterilne epruvetke. Te smo prenesli v centrifugo in jih centrifugirali 10 min/5000 g pri 2 °C. Po centrifugiranju smo odpipetirali supernatant in na dnu ohranili celično usedlino. V vsako izmed epruvetk smo dodali 1 mL 150 mM fiziološke raztopine in jih ponovno centrifugirali 10 min/5000 g pri 2 °C. Po končanem centrifugiranju smo odpipetirali supernatant in epruvetke do nadaljnje uporabe shranili na -20 °C. Celični usedlini smo dodali 400 µL pufra TE in 100 µL pripravljene raztopine lizocim-mutanolizin za encimsko obdelavo. Vsebinsko epruvetk smo dobro resuspendirali in epruvetke za 2 uri postavili v inkubator na 37 °C. Med encimsko obdelavo smo jih nekajkrat premešali. S tem smo lizirali celične stene in pripravili vzorec za avtomatiziran postopek izolacije DNA. Vsebinsko epruvetk smo prenesli v komercialno pripravljene kartuše za avtomatizirano izolacijo DNA po postopku, ki ga navaja proizvajalec. V elucijski pufer smo dodali tudi 1,5 µL encima RNAza za razgradnjo za nas neuporabnih RNK molekul. Po opravljeni avtomatizirani izolaciji DNA smo v elucijskem pufru raztopljeno DNA odpipetirali v sterilno epruvetko. DNA iz vseh elucijskih pufrov smo skupaj premešali v eni epruvetki. S tem smo se izognili morebitnim razlikam pri izplenu izolacije DNA med posameznimi kartušami. V skupni epruvetki zbran volumen elucijskega pufra smo alikvotirali po 20 µL v več epruvetk (približno 40 epruvetk). S tem smo se znebili vpliva slabšanja kvalitete DNA zaradi večkratnih zaporednih odtaljevanj, saj za vsako pripravo redčitvene vrste uporabimo drugo alikvotirano epruvetko (Rossmanith in sod., 2011). Tako pripravljene epruvetke smo do nadaljnje uporabe shranili na -20 °C.

Istočasno smo odvzeli tudi 1 mL kulture za potrditev čistosti seva z metodo petrijevih plošč. Pripravili smo si redčitveno vrsto iz 8 epruvet s po 9 mL peptonskega diluenta v vsaki. V prvo epruveto smo odpipetirali 1 mL gojišča z bakterijami in nadalje redčili vrsto do redčitve 10^{-8} . Vsako epruveto smo pred nadaljnjim prenosom za nekaj sekund vorteksirali. Iz redčitve 10^{-7} in 10^{-8} smo odpipetirali 100 µL redčitve na sterilno petrijevo ploščo s trdnim gojiščem MRS in jo s palčko do suhega razmazali. Delali smo v dvojnikih tako, da smo na koncu dobili štiri petrijeve plošče - dve za vsako redčitev. Plošče smo za 72 ur postavili v inkubator na 37 °C. Po inkubaciji smo preverili morfologijo zraslih kolonij in se prepričali o čistosti namnoženega seva. Prav tako smo pridobili okvirno število enot kolonij, ki smo jih kasneje uporabili pri umerjanju standarda.

Po enakem postopku smo se lotili priprave standarda za laktobacile.

3.2.6.2 Umeritev standarda

Tako pripravljeno standardno DNA smo pri metodi PMA RT PCR uporabili kot matrico DNA, ki jo je bilo potrebno predhodno umeriti, kar smo naredili neposredno iz probiotičnega izdelka. Iz kapsul probiotičnega izdelka smo natehtali 1 g prahu in 99 g peptonskega diluenta ter s homogenizatorjem (Masticator, IUL Instruments) dobro premešali, da se je prah raztopil. Pripravili smo redčitveno vrsto in iz redčitve 10^{-8} in 10^{-9} odpipetirali 1 mL kulture, ki smo jo z umešanjem nacepili tako v gojišče MRS z dodanima antibiotikoma ciprofloksacin in klindamicin, kot tudi v gojišče TOS z dodanim antibiotikom mupirocin (gojišča so bila ohlajena na 40°C). Po umešanju smo plošče nekajkrat pomešali s krožnimi gibi v desno in levo in jih pustili pri sobni temperaturi, da se strdijo. Plošče smo zložili v anaerobne lonce, dodali listič generiranja anaerobne atmosfere in indikator, ter jih postavili v inkubator za 72 ur na 37 °C. Vsako redčitev smo na plošče nacepili v treh ponovitvah. Po inkubaciji smo prešteli in jim izračunali pripadajoče kolonijske enote za 1 g raztopljenega prahu.

Istočasno smo za analizo s PMA RT PCR metodo v dve epruvetki odpipetirali 1 mL primarne redčitve. V vsako od epruvetk smo dodali 2,5 µL pripravljene raztopine reagenta PMA, dobro premešali in ju za 5 minut postavili v temo. Po pretečenem času smo epruvetki ponovno pretresli in jih z aparatom Phast Blue 2 minuti osvetljevali z modro svetlobo. Po fotoaktivaciji reagenta PMA smo epruvetki centrifugirali 5 min/5000 g in nato previdno odpipetirali supernatant. Ohranjeni usedlini smo dodali 400 µL pufra TE in 100 µL pripravljene raztopine lizocim-mutanolizin za encimsko obdelavo. Vsebino epruvetk smo dobro resuspendirali in ju za 2 uri postavili v inkubator na 37 °C. Med encimsko obdelavo smo epruvetki nekajkrat premešali. S tem smo lizirali celične stene in pripravili vzorec za avtomatiziran postopek izolacije DNA. Vsebino epruvetk smo prenesli v komercialno pripravljene kartuše za avtomatizirano izolacijo DNA po postopku, ki ga navaja proizvajalec. V elucijski pufer smo dodali tudi 1,5 µL encima RNAza za razgradnjo za nas neuporabnih RNK molekul. Po opravljeni avtomatizirani izolaciji DNA smo v elucijskem pufru raztopljeno DNA odpipetirali v sterilni epruvetki in ju do nadaljnje uporabe shranili na -20 °C.

Iz zmrzovalnika smo vzeli eno izmed alikvotiranih epruvetk standarda in pripravili redčitveno vrsto kot prikazuje Slika 6. V prvem koraku smo prenesli 15 µL DNA matrice v 30 µL čiste vode. V naslednjih korakih smo prenašali 40 µL vzorca DNA v 80 µL čiste vode. Vsako epruvetko smo pred prenosom raztopine DNA v naslednjo epruvetko dobro premešali.



Slika 6: Shema redčitvene vrste iz alikvotiranih epruvetk matrice DNA

3.2.6.2.1 Nanos vzorcev za umeritev standarda na ploščo PCR

Pripravili smo reagent SYBR Master Mix, kot prikazuje Preglednica 18, in ga po 16 μL razporedili v luknjice na plošči PCR. Iz epruvetk z redčitvami matrice DNA od 3^{-3} do 3^{-11} smo v trojnikih nanesti po 4 μL vzorca v luknjice. Na isto ploščo PCR smo v trojnikih nanesti tudi 100x redčen vzorec probiotičnega izdelka za vsako epruvetko posebej kot prikazuje Slika 7. V vrsticah A, B in C se nahaja redčitvena vrsta pripravljena iz epruvetke z matrico DNA. V vrsticah F, G in H se nahaja 100x redčena DNA, izolirana iz petih različnih liofiliziranih probiotičnih izdelkov. Izolirana DNA iz vsakega probiotičnega vzorca (Vz) se preverja v dveh ponovitvah celotnega postopka (1A, 1B...), kjer številka pomeni zaporedno številko vzorca, črka pa posamezno ponovitev. V celicah NTC se nahaja negativna kontrola reakcije RT PCR.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	3^{-3}	3^{-4}	3^{-5}	3^{-6}	3^{-7}	3^{-8}	3^{-9}	3^{-10}	3^{-11}			
B	3^{-3}	3^{-4}	3^{-5}	3^{-6}	3^{-7}	3^{-8}	3^{-9}	3^{-10}	3^{-11}			
C	3^{-3}	3^{-4}	3^{-5}	3^{-6}	3^{-7}	3^{-8}	3^{-9}	3^{-10}	3^{-11}			
D												
E												
F	Vz 1A	Vz 1B	Vz 2A	Vz 2B	Vz 3A	Vz 3B	Vz 4A	Vz 4B	Vz 5A	Vz 5B		NTC
G	Vz 1A	Vz 1B	Vz 2A	Vz 2B	Vz 3A	Vz 3B	Vz 4A	Vz 4B	Vz 5A	Vz 5B		NTC
H	Vz 1A	Vz 1B	Vz 2A	Vz 2B	Vz 3A	Vz 3B	Vz 4A	Vz 4B	Vz 5A	Vz 5B		NTC

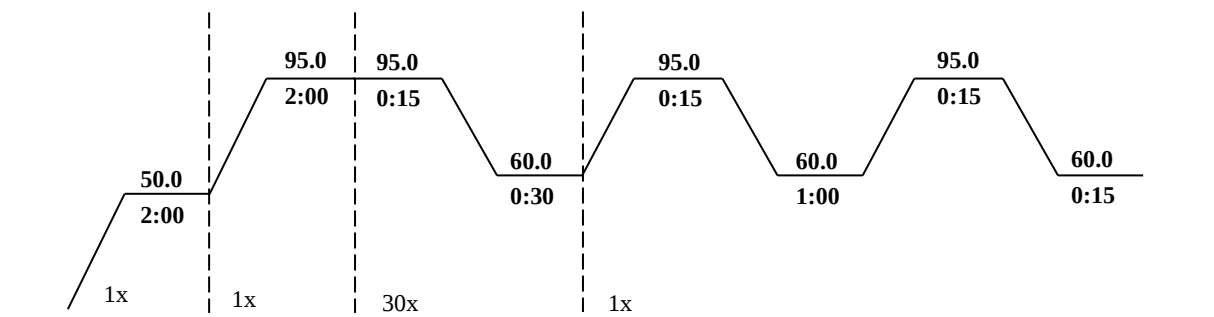
Slika 7: Shematski prikaz nanosa vzorcev standarda na ploščo PCR

Preglednica 18: Uporabljeni volumni reagentov za pripravo mešanice SYBR Master Mix pri reakciji RT PCR

Reagent	Uporabljeni volumni (μL)
SYBR	10
ROX	0,04
Začetni oligonukleotid 1	2
Začetni oligonukleotid 2	2
Voda brez nukleaz	1,96
Skupaj v luknjici	16

3.2.6.2.2 Priprava aparata PCR

Slika 8 prikazuje časovni in temperaturni protokol za pripravo analize z metodo PMA RT PCR.



Slika 8: Shematski prikaz temperaturnega in časovnega protokola metode PMA RT PCR, uporabljenega pri umerjanju matrice DNA

Redčitveno vrsto pripravljeno iz matrice DNA smo v računalniškem programu nastavili kot "standard" s pripadajočimi vrednostmi*, vzorec DNA izoliran iz probiotičnega izdelka pa kot "unknown". Celoten postopek umeritve matrice DNA smo ponovili za 5 različnih probiotičnih izdelkov.

*Standardu smo vrednosti enot kolonij, ki smo jih dobili pri pripravi standarda (poglavje 3.2.6.1), vpisali zgolj začasno, saj smo te v naslednjem koraku pomnožili z izračunano utežjo.

3.2.6.2.3 Izračun uteži standarda

Iz rezultatov pridobljenih z metodo PMA RT PCR smo ugotovili število bakterij za probiotični izdelek in izračunali utež w , s katero smo pomnožili posamezne vrednosti standarda. Utež w predstavlja povprečje posameznih odstopanj rezultatov metode PMA RT PCR od rezultatov metode štetja na petrijevih ploščah. Povprečje faktorjev odstopanja w za n meritev smo definirali kot prikazuje enačba 2.

Utež w smo izračunali po matematični enačbi (2):

$$w = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left(\frac{X_i}{Y_i} \right) \quad \dots (2)$$

kjer je,

w – povprečje faktorjev odstopanja

X – število KE izračunanih iz petrijevih plošč

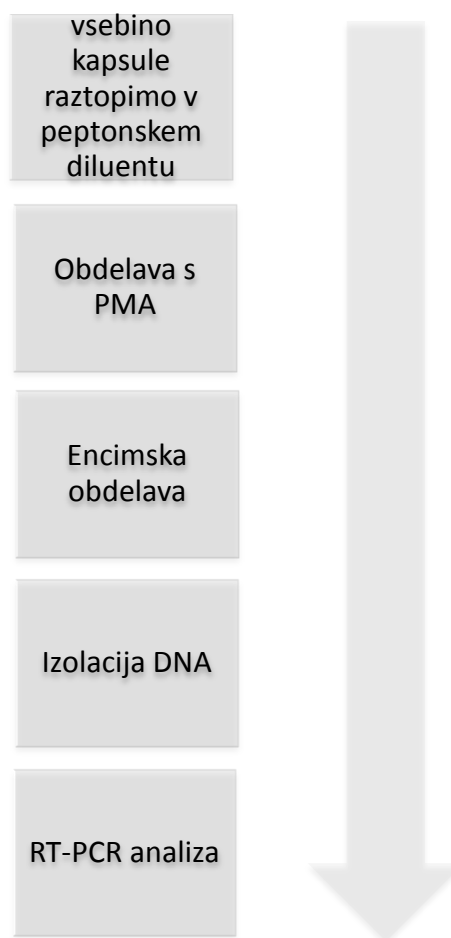
Y – število KE dobljenih z metodo PMA RT PCR

n – število probiotičnih izdelkov iz katerih smo analizirali kolonijske enote

3.2.6.3 Priprava vzorca za analizo PMA RT PCR

Iz kapsul probiotičnega izdelka smo v redčitveno vrečko natehtali 1 g probiotičnega prahu in dodali 99 g pripravljenega peptonskega diluenta. Vrečko smo za nekaj sekund postavili v homogenizator, da se je prah dobro raztopil. Nato smo v dveh ponovitvah v epruvetko odpipetirali 1 mL suspenzije za analizo PMA RT PCR.

Slika 9 prikazuje osnovne korake priprave vzorca za analizo z metodo PMA RT PCR.



Slika 9: Shematski prikaz priprave vzorcev probiotičnega izdelka za analizo PMA RT PCR

3.2.6.3.1 Obdelava vzorca z reagentom PMA

V epruvetko smo dodali 2,5 µL pripravljene raztopine reagenta PMA, dobro premešali in jo za natanko 5 minut postavili v temo. Po pretečenem času smo epruvetko ponovno pretresli in jo z aparatom Phast Blue 2 minuti osvetljevali z modro svetlobo. Po fotoaktivaciji reagenta PMA smo epruvetko centrifugirali 5 min/5000 g in nato previdno odpipetirali supernatant.

Kot primerjalno metodo osvetljevanja smo uporabili halogen vir svetlobe (650 W, 230 V, Osram, Nemčija). Vzorce smo horizontalno postavili na led, tako da je bila epruvetka oddaljena približno 20 cm od halogenega vira svetlobe in osvetljevali 2 minuti (Kramer in sod., 2009). Po fotoaktivaciji reagenta PMA smo epruvetko centrifugirali 5 min/5000 g in nato previdno odpipetirali supernatant.

3.2.6.3.2 Encimska obdelava vzorca

Usedlini smo dodali 400 µL pufra TE in 100 µL pripravljene raztopine lizocim-mutanolizin. Vsebinsko epruvetke smo dobro resuspendirali in jo za 2 uri postavili v inkubator pri 37 °C. Med encimsko obdelavo smo epruvetko nekajkrat premešali. S postopkom encimske obdelave smo delno razgradili celične stene in pripravili vzorec za avtomatiziran postopek izolacije DNA.

3.2.6.3.3 Izolacija DNA z aparatom Maxwell

Vsebinsko epruvetke smo prenesli v komercialno pripravljeno kartušo za avtomatizirano izolacijo DNA po postopku, ki ga navaja proizvajalec. V elucijski pufer smo dodali tudi 1,5 µL encima RNaza, ki razgradi za nas neuporabne molekule RNK. Po opravljeni avtomatizirani izolaciji smo v elucijskem pufru raztopljeno DNA odpipetirali v sterilno epruvetko in jo do nadaljnje uporabe shranili pri -20 °C.

3.2.6.3.4 Priprava aparata 7500 Fast Real-Time PCR

Časovni in temperaturni protokol za pripravo analize z metodo PMA RT PCR smo nastavili enako kot prikazuje

Slika 8. Pripravili smo reagent SYBR Master Mix (Preglednica 18) in ga po 16 µL razporedili v luknjice PCR. Na ploščo smo nanegli vzorce standarda in preiskovane vzorce, tako da je bil končni volumen v luknjici 20 µL. Razporeditev vzorcev na plošči je bila specifična za vsak preiskovan parameter posebej.

3.2.7 Analiza vzorca z metodo petrijevih plošč

Iz kapsul probiotičnega izdelka smo v redčitveno vrečko natehtali 1 g probiotičnega prahu in dodali 99 g pripravljenega peptonskega diluenta. Vrečko smo za nekaj sekund postavili v homogenizator, da se je prah dobro raztopil. Pripravili smo redčitveno vrsto in iz redčitve

10^{-7} in 10^{-8} odpipetirali 1 mL kulture, ki smo jo z umešanjem nacepili v gojišče MRS z dodanim ciprofloksacinom in klindamicinom ter tudi v gojišče TOS z dodanim mupirocinom. Po umešanju smo plošče pomešali s krožnimi gibi v desno in levo ter jih pustili pri sobni temperaturi, da se strdijo. Plošče smo zložili v anaerobne komore, dodali listič generiranja anaerobne atmosfere in indikator, ter jih postavili v inkubator za 72 ur na 37 °C. Vsako redčitev smo na plošče nacepili v treh ponovitvah. Po inkubaciji smo plošče prešteli in jim izračunali pripadajoče kolonijske enote za 1 g raztopljenega prahu po matematični enačbi (3) (ISO 4833, 2003):

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1 \cdot n_2)} \cdot d \quad \dots (3)$$

kjer je,

N – povprečna koncentracija enot kolonij

$\sum C$ – vsota kolonij na vseh ploščah

n_1 – število plošč prve razredčitve

n_2 – število plošč druge razredčitve

d – razredčitveni faktor prve razredčitve

4 REZULTATI

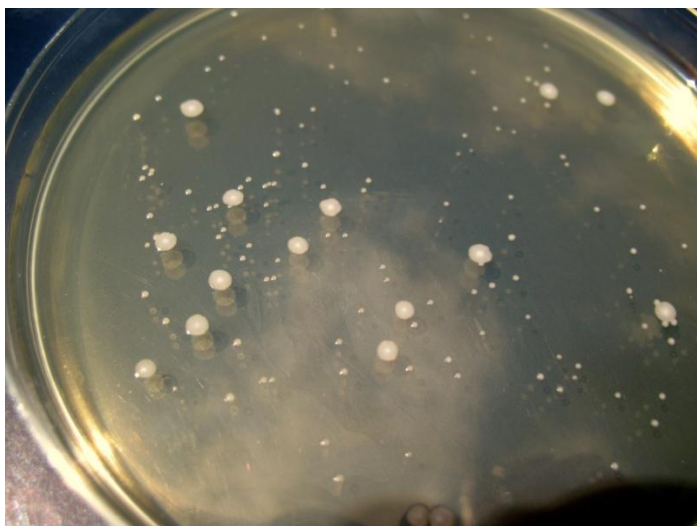
Poglavje povzema rezultate eksperimentalnega dela, ki so prikazani v obliki slik in preglednic, nekateri podrobnejši podatki pa so v poglavju Priloge.

4.1 MORFOLOGIJA BAKTERIJ

Sevi se na ploščah lepo ločijo po morfologiji zraslih kolonij. Bakterijske kolonije *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12 so bele barve, široke od 1,5 do 3 mm. Površina kolonije je hrapava s ploščatim profilom, ki se konča z robovi nepravilnih oblik.

Bakterijske kolonije *Lactobacillus acidophilus* LA-5 so svetleče in prozorne, široke okoli 1 mm. Površina kolonije je gladka z izbočenim profilom, ki se konča z gladkimi robovi.

Slika 10 prikazuje morfologijo kolonij *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12 in *Lactobacillus acidophilus* LA-5.



Slika 10: Morfologija kolonij *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12 in *Lactobacillus acidophilus* LA-5, zraslih na trdnem gojišču MRS po 72 urni anaerobni inkubaciji pri 37 °C

4.2 SPREMLJANJE BAKTERIJSKE RASTI

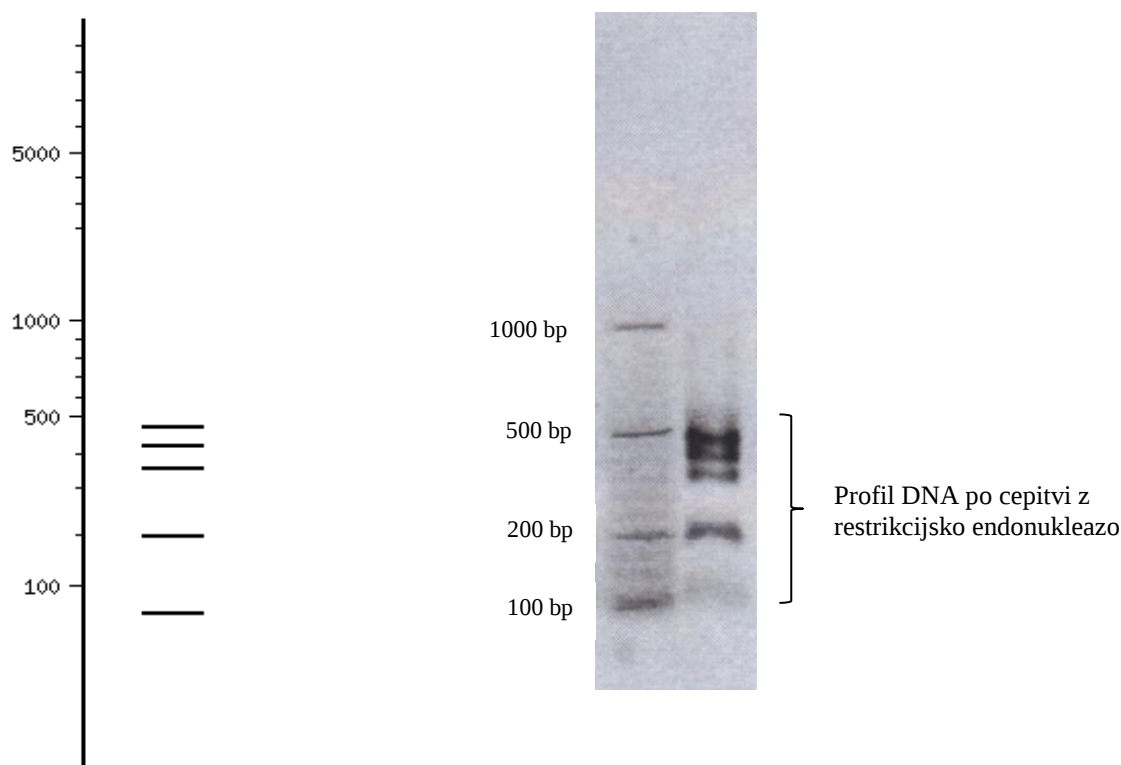
V tekočem gojišču MRS z 0,05 % cisteinom smo spremljali rast obeh vrst bakterij pri OD₆₀₀. Začetni inokulum bakterijske kulture, ki smo jo inkubirali preko noči, v epruveti s tekočim gojiščem MRS z 0,05 % cisteinom, je bil 100 µL. Epruveto smo inkubirali pri 37 °C in v približno enakih intervalih merili optično gostoto. Za referenčno meritev smo uporabili na enak način pripravljeno gojišče brez inokuluma bakterij.

Po približno 130 minutah inkubacije je optična gostota pričela eksponentno naraščati, iz česar sledi, da so se bakterije pričele intenzivno deliti. V prvih 130 minutah ni bilo opazene razlike v hitrosti naraščanja optične gostote. Po pretečenih 130 minutah smo opazili, da so pričeli laktobacili mnogo hitreje rasti kot sev bifidobakterij.

4.3 CEPITEV DNA Z RESTRIKCIJSKO ENDONUKLEAZO *TaqI*

Potrditve identitete seva z restrikcijsko endonukleazo smo se lotili le za sev bifidobakterij, saj za sev laktobacilov ni bilo dostopnega zaporedja za gen 16S rRNA. Na gelu prikazan profil se ujema s profilom, dobljenim bioinformacijsko v vseh prikazanih pasovih. Velikost nastalih odsekov je popolnoma pravilna in ustreza profilu značilnemu za *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12.

Slika 11 prikazuje bioinformacijski profil restrikcije. Opazimo pet kosov DNA, ki so veliki od okoli 80 do okoli 480 bp. Na desni strani slike, poleg standardne lestvice na agaroznem gelu, opazimo štiri dobro vidne kose DNA in enega s slabo ločljivostjo.



Slika 11: Prikaz profila DNA po cepitvi z restrikcijsko endonukleazo *TaqI*

4.4 OPTIMIZACIJA METODE PMA REAL TIME PCR

4.4.1 Ugotavljanje količine DNA na celico pri bifidobakterijah

Želeli smo ugotoviti ali prihaja do relevantnih razlik v razmerju dednega materiala na celico v različnih fazah celične rasti.

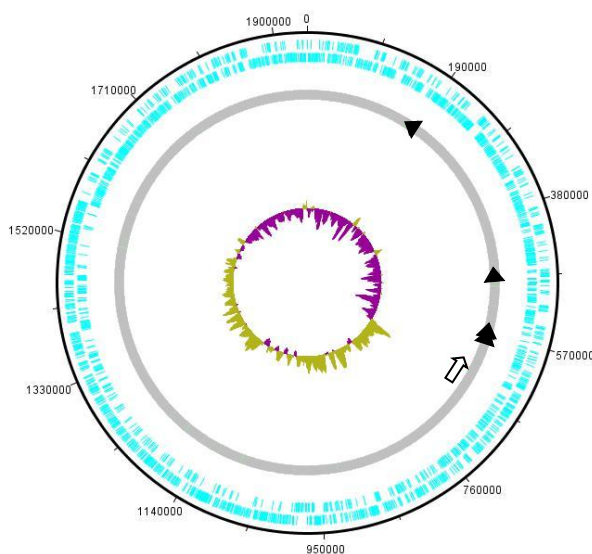
Pri OD₆₀₀ 0,91 smo za analizo z metodo PMA RT PCR odvzeli 2-krat po 1 mL vzorca (točka T1). Vzorcju smo odstranili gojišče, tako da smo celice centrifugirali 10 min pri 2 °C pri 5000 g, nato smo odpipetirali supernatant (gojišče), dodali 1 mL fiziološke raztopine in resuspendirali, ponovno centrifugirali (10min/5000 g), previdno odpipetirali supernatant ter shranili na -20 °C v zamrzovalniku.

Istočasno smo odvzeli tudi 1 mL vzorca in ga preko redčitvene vrste nacepili na trdni gojišči TOS in MRS, pri redčitvah 10^{-7} , 10^{-8} in 10^{-9} . Plošče smo do suhega razmazali s palčko za razmazovanje ter jih postavili v anaerobno inkubacijo pri 37 °C. Po 48 urah smo na ploščah prešteli kolonije in iz podatkov izračunali število enot kolonij v 1 mL tekočega gojišča. Podatek smo uporabili pri metodi PMA RT PCR. Za interno kontrolo smo primerjali število enot kolonij s številom bakterij, ugotovljenimi z neposrednim štetjem z mikroskopom.

Po enakem postopku smo analizirali vzorec v stacionarni fazi pri OD₆₀₀ 1,96 (točka T2).

Krožni kromosom *B. animalis* ssp. *lactis* BB-12 (Slika 12) je sestavljen iz 1942198 baznih parov, ki kodirajo 1642 različnih genov (na sliki so označeni z modro barvo). Genom vsebuje 4 rRNA operone (črne puščice) in 52 tRNA genov (Garrigues in sod., 2010). Mesto začetka podvojevanja (*oriC*) je označeno z belo puščico.

Z uporabo računalniškega programa Artemis smo pridobili podatek o lokaciji genov za 16S rRNK. V genomu seva BB-12 so štiri kopije istega gena. Vse kopije se nahajajo v prvi četrtini krožnega kromosoma od mesta začetka podvojevanja DNA kot prikazuje Slika 12 (črne puščice).



Slika 12: Genom bakterije *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12

Vzorec iz vsake točke (T1 in T2) smo analizirali z metodo PMA RT PCR, kjer smo vzorec na ploščo PCR nanesti v obliki redčitvene vrste, pri čemer smo v vsaki točki redčitvene vrste vpisali pripadajoče vrednosti enot kolonij, ki smo jih izračunali iz števila dobljenega na ploščah TOS in MRS. Pri vzorcu iz točke T1 smo zaznali več tarčne DNA na celico kot pri vzorcu iz točke T2, kar prikazuje Preglednica 19.

Preglednica 19: Prikaz odstopanja količine DNA na celico, izračunano iz enačb premic v točkah T1 in T2

Ponovitev	Enačba premice v točki T1	Enačba premice v točki T2	Absolutno odstopanje v Ct*
1	$Y = -3,5 + 43,5$	$Y = -3,5 + 44,3$	0,8 cikla
2	$Y = -3,6 + 44,1$	$Y = -3,6 + 45,8$	1,7 cikla
3	$Y = -3,5 + 43,6$	$Y = -3,6 + 45,5$	1,9 cikla

* odstopanje vrednosti Ct smo izračunali v točki, kjer je premica prečila os x (intercept)

Prav tako smo naredili dodatno primerjavo števila enot kolonij, ki smo jih dobili z metodo neposrednega štetja (Petroff-Hausserjeva števna komora) kot prikazuje Preglednica 20. Celotni rezultati so prikazani v prilogi F.

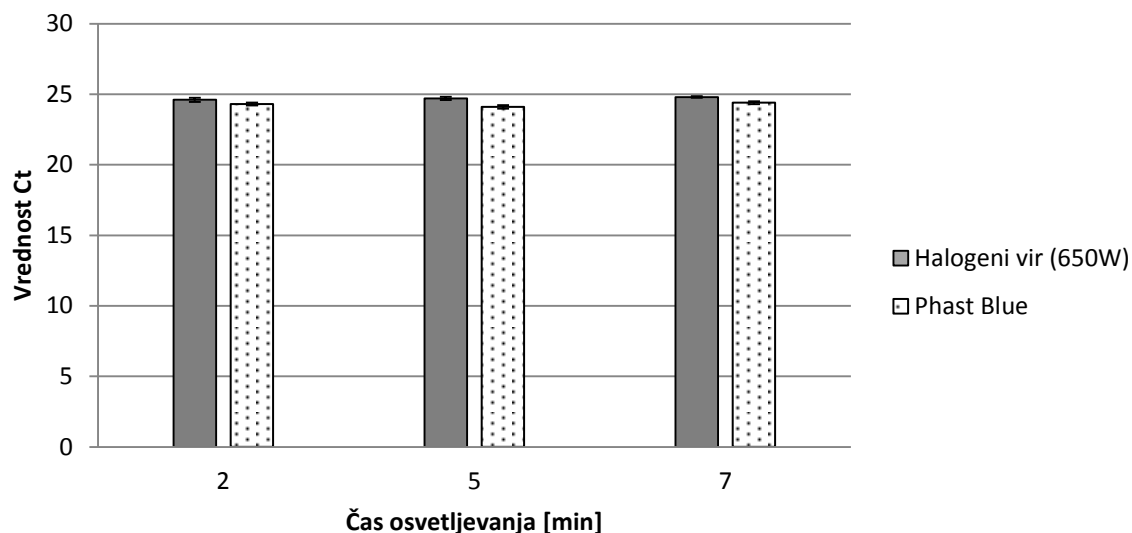
Preglednica 20: Primerjava števila KE, dobljenih z neposredno oziroma posredno metodo štetja pri bifidobakterijah

Točka odvzema vzorca	Neposredno štetje z mikroskopom (KE/mL)	Petrijeve plošče (KE/mL)
Ekspozicijska faza (T1)	$7,41 \cdot 10^8$ ($s = 1,3 \cdot 10^8$)	$7,45 \cdot 10^8$ ($s = 9,2 \cdot 10^7$)
Stacionarna faza (T2)	$1,78 \cdot 10^9$ ($s = 4,9 \cdot 10^8$)	$2,71 \cdot 10^9$ ($s = 2,5 \cdot 10^8$)

4.4.2 Primerjava metod fotoaktivacije reagenta PMA

Epruvetke z vzorcem probiotičnega izdelka in dodanim reagentom PMA smo z napravo Phast Blue (Aznar in sod., 2012) osvetljevali različno dolgo (2, 5, 7, 10 in 15 minut). Pri nobenem preiskovanem času osvetljevanja ni prišlo do signifikantnih razlik v številu bakterij. Istočasno smo epruvetke z enakim vzorcem in reagentom PMA osvetljevali s halogenim virom svetlobe (Kramer in sod., 2009) in primerjali rezultate.

Slika 13 prikazuje primerjavo rezultatov osvetljevanja vzorca z reagentom PMA, kjer sivi stolpci prikazujejo alternativno metodo osvetljevanja s halogenim virom svetlobe (650 W). Beli pikčasti stolpci prikazujejo rezultat pridobljen z metodo osvetljevanja z aparatom Phast Blue, ki temelji na osvetljevanju s svetlobo modre valovne dolžine.

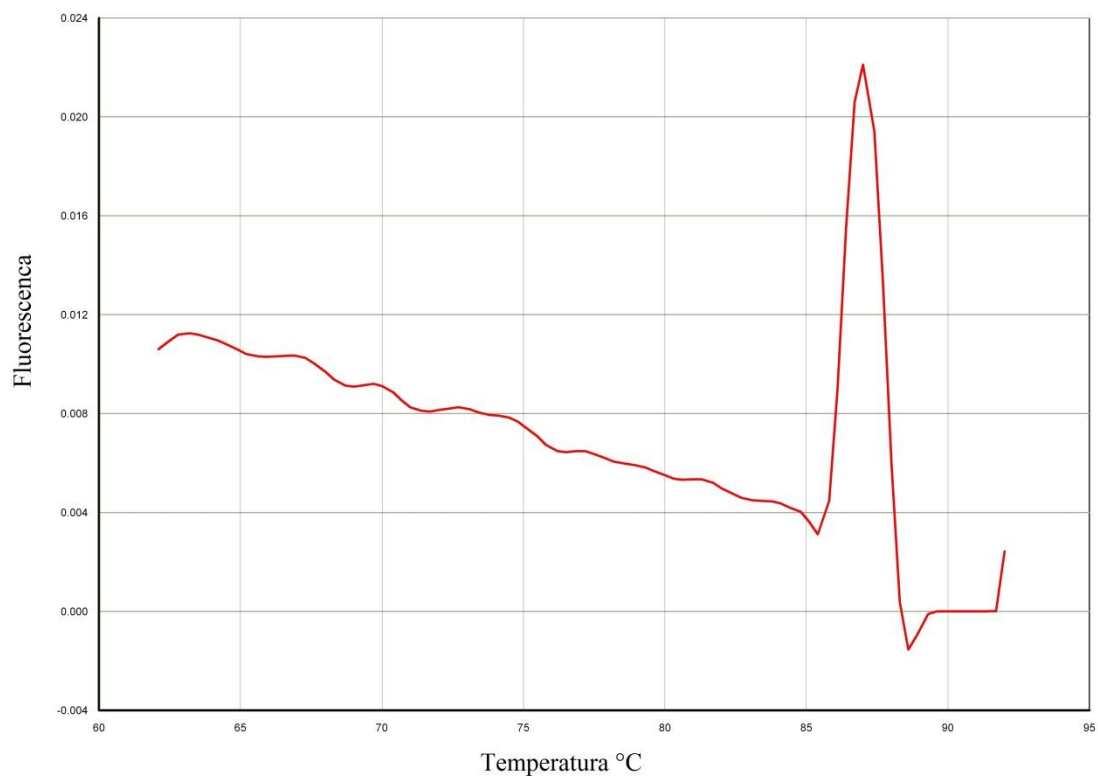


Slika 13: Primerjava osvetljevanja vzorca z dvema različnima metodama osvetlitve

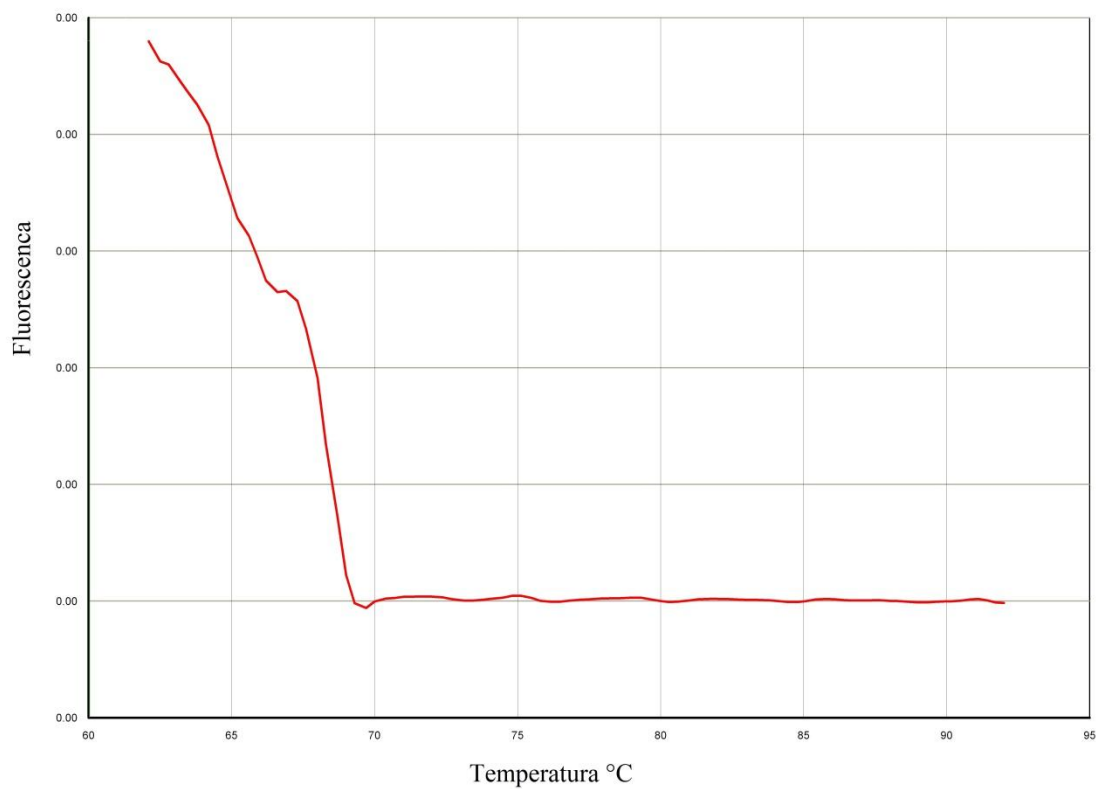
4.4.3 Učinkovitost vezave reagenta PMA

Preverili smo učinkovitost vezave reagenta PMA pri vzorcu z avtoklaviranimi bakterijskimi celicami (15 min pri 121 °C in $1,013 \times 10^5$ Pa nadtlaka) in rezultat primerjali z enakim vzorcem brez dodanega reagenta PMA.

V primeru, ko vzorcu nismo dodali reagenta PMA, smo dobili pomnožek PCR, kar prikazuje Slika 14. Na prikazani disociacijski krivulji smo zaznali pomnožek pri temperaturi približno 83 °C. Slika 14 in Slika 15 na ordinatni osi prikazujeta vrednosti odvoda funkcije fluorescence v odvisnosti od temperature.



Slika 14: Disociacijska krivulja pomnožka DNA iz mrtvih bifidobakterij brez obdelave z reagentom PMA



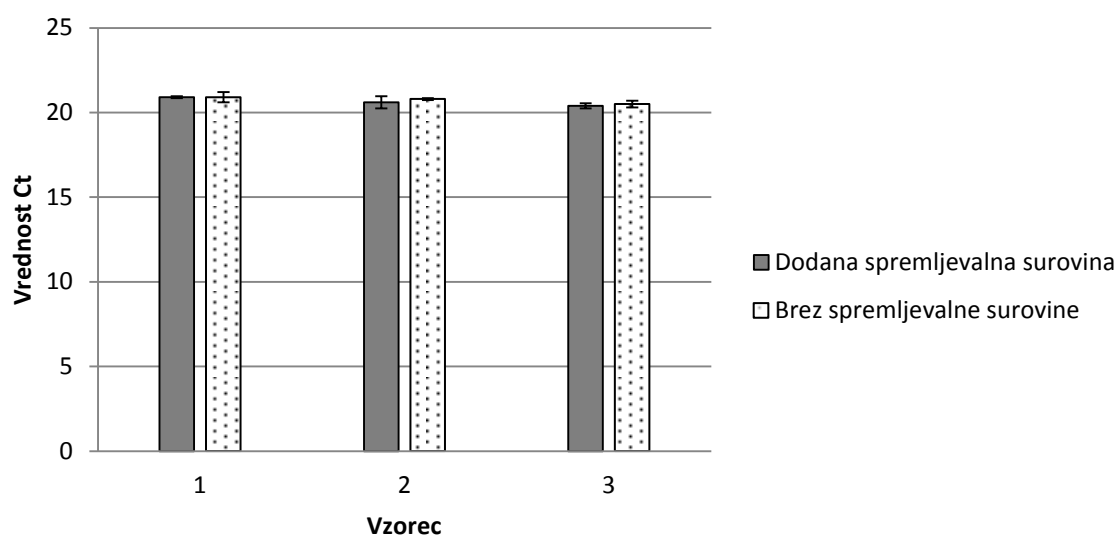
Slika 15: Disociacijska krivulja pomnožka DNA iz mrtvih bifidobakterij, obdelanimi z reagentom PMA

Enako smo preverili disociacijo nastalih pomnožkov pri laktobacilih, kjer smo dobili enak rezultat kot pri bifidobakterijah.

4.4.4 Vpliv spremljevalne surovine probiotičnega izdelka

Čistemu liofiliziranemu sevu smo dodali spremljevalno surovino v enakem razmerju kot ga navaja proizvajalec in opravili analizo. Pri nobenem od vzorcev nismo zaznali kakršnega koli vpliva spremljevalne surovine na končni rezultat števila bakterij.

Slika 16 prikazuje vpliv surovine probiotičnega izdelka pri bifidobakterijah. Sivi stolpci prikazujejo rezultat v primeru dodane spremljevalne surovine. Beli pikčasti stolpci prikazujejo rezultat metode brez spremljevalne surovine. Poskus smo ponovili tudi pri laktobacilih in dobili enak rezultat.

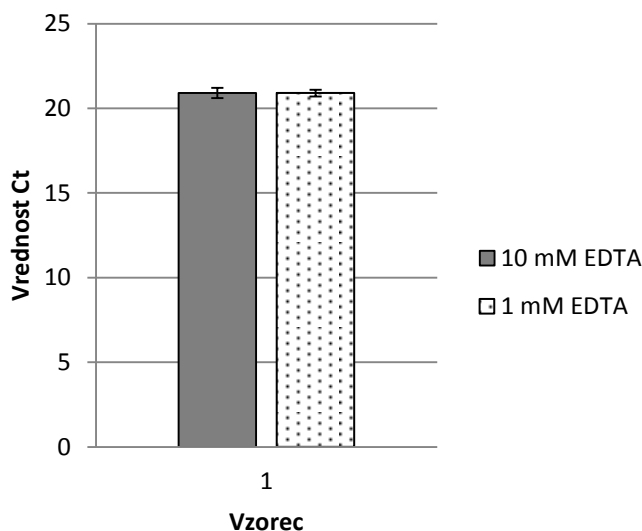


Slika 16: Vpliv spremljevalne surovine probiotičnega izdelka pri bifidobakterijah

4.4.5 Vpliv dodatnega EDTA v vzorcu

Preverili smo vpliv dodatnega EDTA v vzorcu preiskovanega probiotičnega izdelka, vendar zgolj za bifidobakterije. Rezultati z dodatnim EDTA se niso signifikantno razlikovali od rezultatov vzorca brez dodatnega EDTA.

Slika 17 prikazuje vpliv dodatnega EDTA, kjer je s sivim stolpcem prikazan vzorec z vsebovanim 10 mM EDTA in s pikčasto belim stolpcem vzorec z vsebovanim 1 mM EDTA.



Slika 17: Vpliv dodatnega EDTA v vzorcu z bifidobakterijami

4.4.6 Validacija začetnih oligonukleotidov

Vrstno specifične začetne oligonukleotide smo primerjali z učinkovitostjo začetnih oligonukleotidov, specifičnih za rod ter pri tem dokazali enako učinkovitost pomnoževanja, kar prikazuje Preglednica 21.

Preglednica 21: Primerjava učinkovitosti uporabljenih začetnih oligonukleotidov

Taksonomska skupina	Začetni oligonukleotidi	Naklon	Učinkovitost
Bifidobakterije	Vrstno specifični	-3,72	1,86
	Rodovno specifični	-3,57	1,90
Laktobacili	Vrstno specifični	-3,72	1,86
	Rodovno specifični	-3,73	1,85

Učinkovitost smo izračunali po matematični enačbi (4) (Pfaffl, 2001):

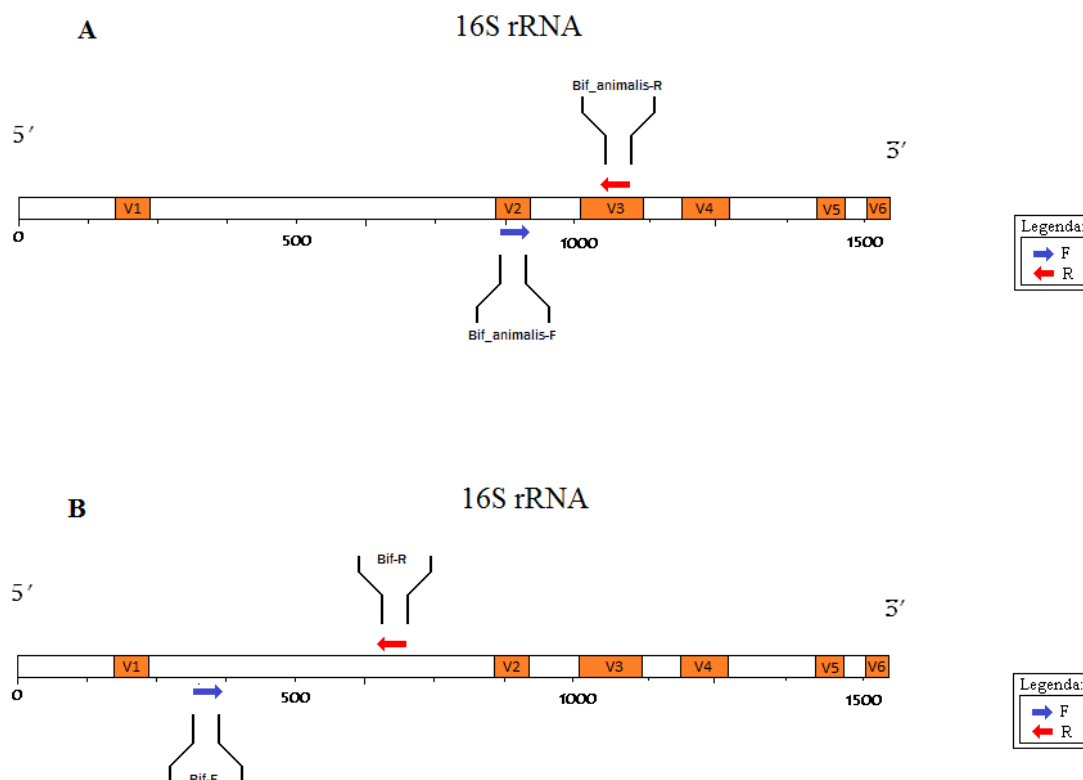
$$E = 10^{(-1/slope)} \quad \dots (4)$$

kjer je,

E – učinkovitost reakcije

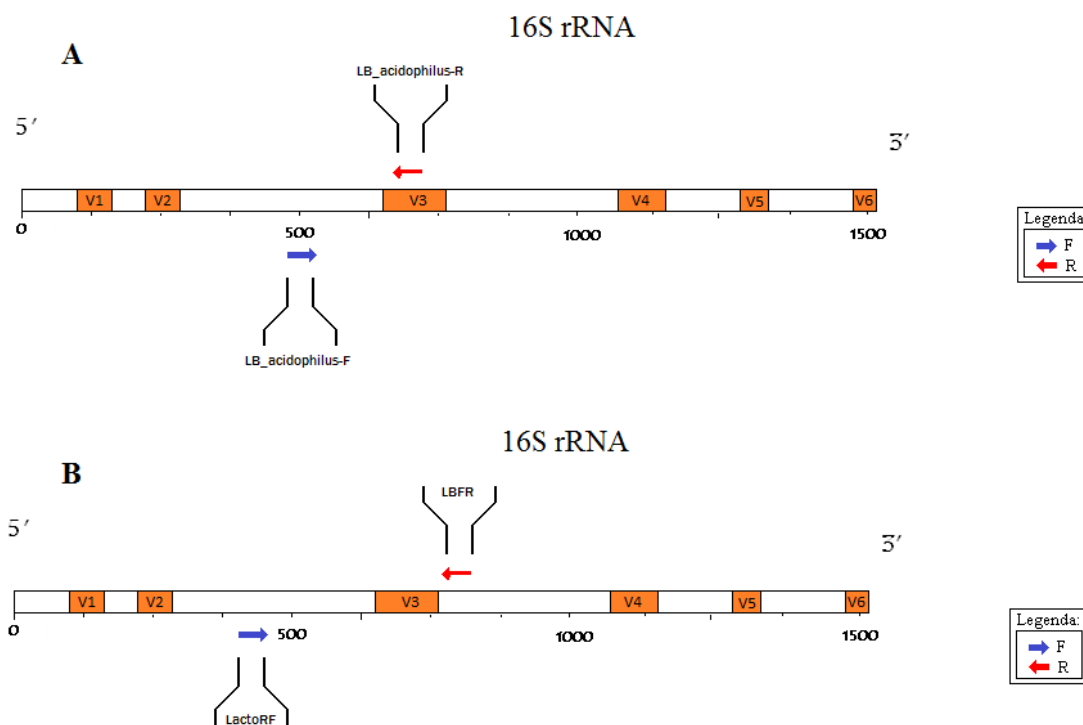
$Slope$ – naklon standardne premice

Slika 18 prikazuje mesto hibridizacije začetnih oligonukleotidov na gen za 16S rRNK. A del slike prikazuje vrstno specifične začetne oligonukleotide, ki hibridizirajo znotraj spremenljivih regij seva BB-12. B del slike pa prikazuje hibridizacijo začetnih oligonukleotidov, specifičnih za rod.



Slika 18: Shematski prikaz hibridizacije začetnih oligonukleotidov pri bifidobakterijah

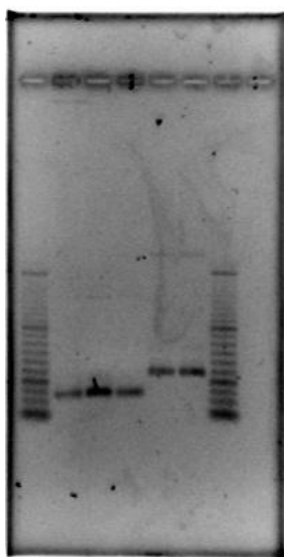
Slika 19 prikazuje mesto hibridizacije začetnih oligonukleotidov na shematsko prikazan gen za 16S rRNK. Na A delu slike so prikazani vrstno specifični začetni oligonukleotidi, ki hibridizirajo znotraj spremenljivih regij seva LA-5. B del slike prikazuje hibridizacijo začetnih oligonukleotidov, specifičnih za rod.



Slika 19: Shematski prikaz hibridizacije začetnih oligonukleotidov pri laktobacilih

Pomnožke s posameznimi oligonukleotidnimi pari bifidobakterij, nastalih pri temperaturi hibridizacije začetnih oligonukleotidov 60 °C, smo preverili na agarozni elektroforezi (Slika 20). Dokazali smo unikatno pomnožek vrstno specifičnih začetnih oligonukleotidov, v primerjavi z uporabljenim oligonukleotidnim parom specifičnim za rod, kjer smo zaznali nekaj dodatnega pomnožka.

Slika 20 iz leve proti desni prikazuje kose DNA, ločene z gelsko elektroforezo pri bifidobakterijah. V prvi jamici je nanešena standardna lestvica (O'RangeRuler 50 bp DNA Ladder), sledijo tri nanosi vzorca DNA, pomnoženega z vrstno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi, nato sledita dva nanosa vzorca, pomnoženega z začetnimi oligonukleotidi specifičnimi za rod. Čisto na desni je ponovno nanesena lestvica za lažje odčitavanje rezultatov.



Slika 20: Prikaz nastale DNA po pomnoževanju z vrstno (levo) oziroma rodovno specifičnimi (desno) začetnimi oligonukleotidi pri bifidobakterijah

4.4.6.1 Preverjanje specifičnosti začetnih oligonukleotidov z metodo PMA RT PCR pri bifidobakterijah

Izolirano DNA iz posamezne vrste smo analizirali z metodo PMA RT PCR, ki je pokazala, da pri pomnoževanju z vrstno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi DNA nastane le pri *B. animalis* in *B. tsurumiense*.

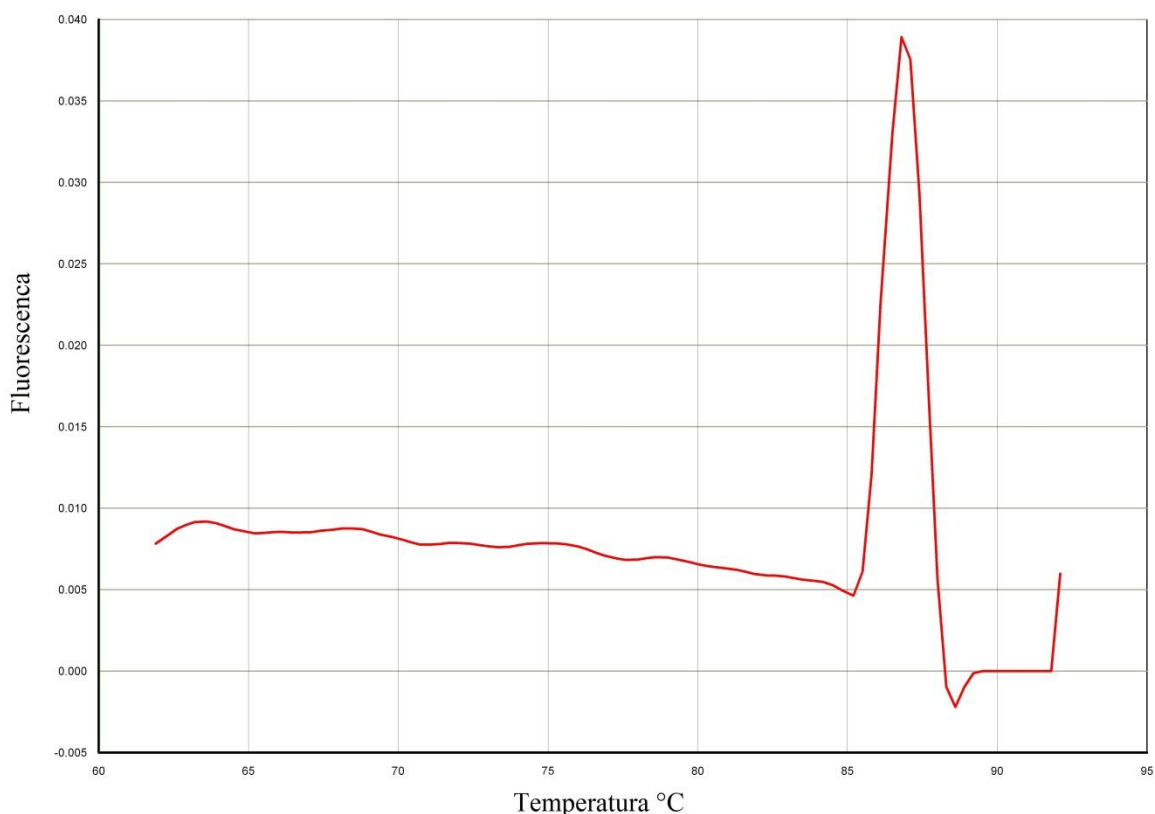
Preglednica 22 prikazuje rezultate analize specifičnosti uporabljenih začetnih oligonukleotidov.

Preglednica 22: Specifičnost začetnih oligonukleotidov pri bifidobakterijah

Bakterijska vrsta	Zaznani pomnožek		Število neujemanj*
	Zaznani pomnožek (vrstno specifični)	(rodovno specifični)	
<i>B. animalis</i>	DA	DA	0
<i>B. gallicum</i>	NE	DA	1
<i>B. tsurumiense</i>	DA	DA	2
<i>B. magnum</i>	NE	DA	3
<i>B. bifidum</i>	NE	DA	več
<i>B. adolescentis</i>	NE	DA	več
<i>B. breve</i>	NE	DA	več
<i>B. longum</i>	NE	DA	več
Negativna kontrola	NE	NE	/

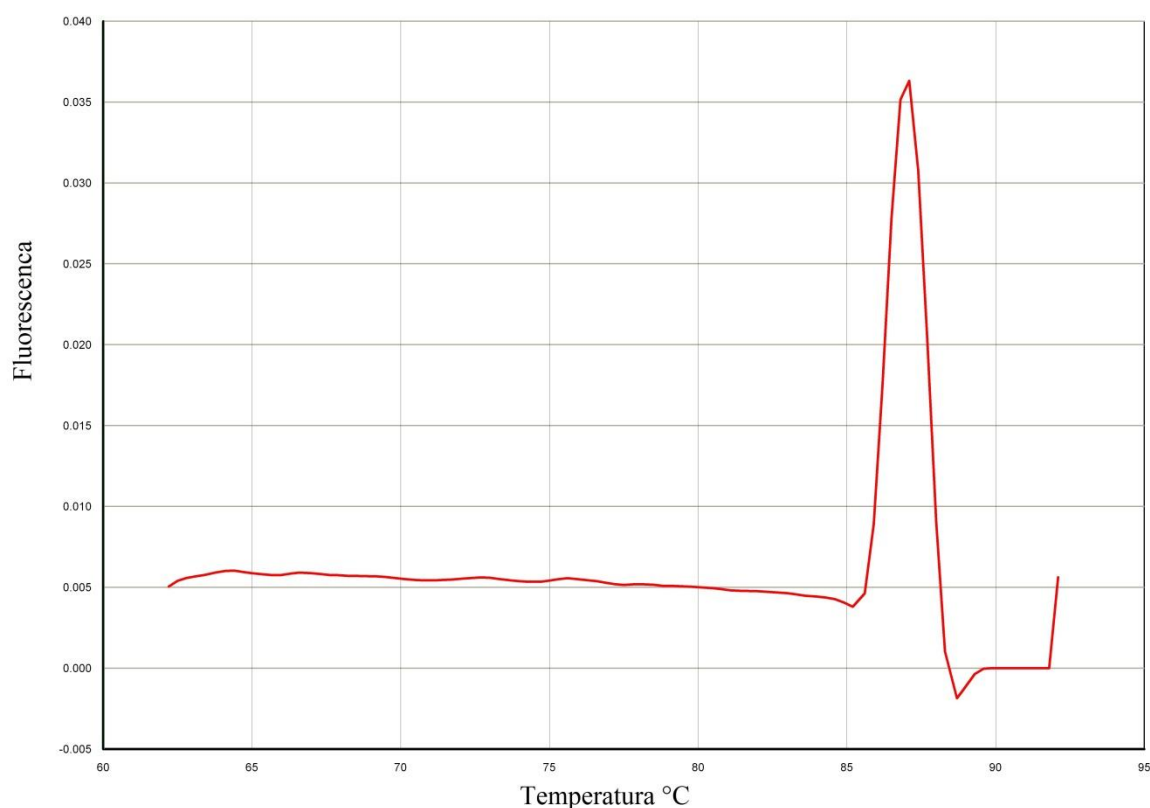
* Število neujemanj baznih parov vrstno specifičnih začetnih oligonukleotidov s tarčno DNA za posamezen sev.

Slika 21 prikazuje disociacijsko krivuljo nastalih produktov pri pomnoževanju z vrstno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi. Vidimo, da v primeru pomnoževanja z vrstno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi nastaneta dva signifikantna vrhova disociacijske krivulje. Nižji vrh pripada vrsti *B. tsurumiense*, višji pa pozitivni kontroli – *B. animalis*. Pri negativni kontroli signala nismo zaznali. Na abscisni osi so nanizane vrednosti temperature v stopinjah Celzija. Na ordinatni osi so prikazane vrednosti odvoda funkcije fluorescence v odvisnosti od temperature.



Slika 21: Disociacijska krivulja nastale DNA pri pomnoževanju z vrstno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi pri bifidobakterijah

Slika 22 prikazuje disociacijsko krivuljo nastalih produktov pri pomnoževanju z rodovno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi. Vidimo, da smo v primeru pomnoževanja z začetnimi oligonukleotidi specifičnimi za rod zaznali pomnožek pri vseh analiziranih vrstah bifidobakterij. Pri negativni kontroli signala nismo zaznali.



Slika 22: Disociacijska krivulja nastale DNA pri pomnoževanju z rodovno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi pri bifidobakterijah

4.5 VALIDACIJA METODE PMA REAL TIME PCR

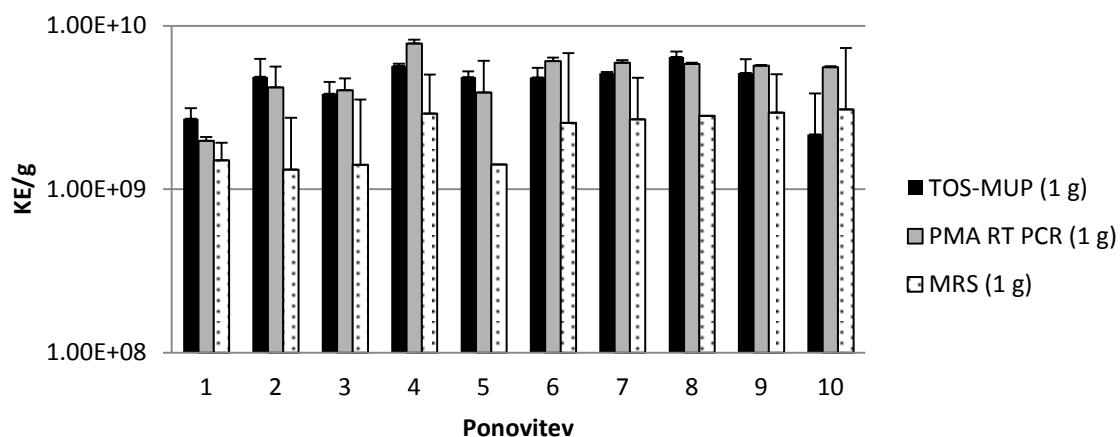
Validacijo smo izvedli v sedmih preiskovanih prametrih ter ugotavljali ustreznost rezultatov glede na predpisane kriterije.

4.5.1 Ekvivalenca

Iz primarne redčitvene vrečke smo v dvojniku odvzeli 1 mL vzorca za analizo. Po avtomatizirani izolaciji DNA (100-krat redčena DNA) smo vzorec še dodatno 100-krat redčili, tako da je bila končna redčitev 10^{-4} . Na ploščo PCR smo vzorec za vsakega od dvojnikov nanesti v treh ponovitvah. Rezultat števila bakterij za posamezno ponovitev je povprečje vseh 6 meritev (po 3 za vsako od dvojnikov). Ekvivalenco metode smo preverili pri 40-tih različnih liofiliziranih probiotičnih izdelkih. Na grafih so zaradi preglednosti prikazani rezultati prvih deset primerjav, ostali rezultati pa so zbrani v prilogi A.

Rezultate metode PMA RT PCR, smo primerjali z rezultati uveljavljene tradicionalne metode posrednega štetja na petrijevih ploščah. V primeru bifidobakterij smo naredili dve različni primerjavi, in sicer z rastjo bakterij na gojišču TOS z dodanim antibiotikom mupirocin (TOS-MUP) in z rastjo bakterij na gojišču MRS brez dodanih antibiotikov (MRS). Slednjo smo naredili pri 24-tih različnih liofiliziranih probiotičnih izdelkih.

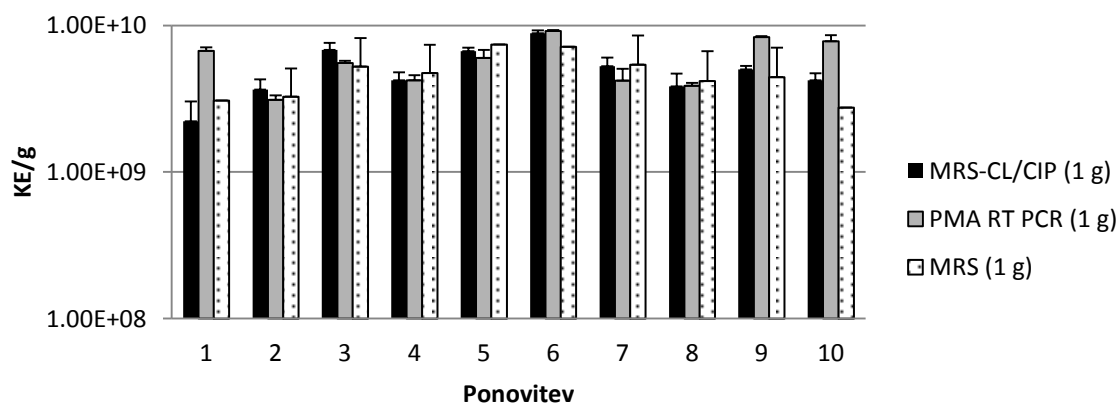
Slika 23 s črnimi stolpci prikazuje rezultat ekvivalence s štetjem na ploščah TOS-MUP. Sivi stolpci prikazujejo rezultat z metodo PMA RT PCR in beli, pikčasti stolpci pa rezultat, štetja na ploščah MRS brez dodanih antibiotikov.



Slika 23: Primerjava rezultatov štetja na ploščah z rezultati, dobljenimi z metodo PMA RT PCR za bifidobakterije

V primeru laktobacilov smo naredili dve različni primerjavi, in sicer z rastjo bakterij na gojišču MRS z dodanima antibiotikoma klindamicin in ciprofloksacin (MRS-CL/CIP) in z rastjo bakterij na gojišču MRS brez dodanih antibiotikov (MRS). Slednjo primerjavo smo naredili pri 35-tih različnih liofiliziranih probiotičnih izdelkih.

Slika 24 s črnimi stolpci prikazuje rezultat ekvivalence, s štetjem na ploščah MRS-CL/CIP. Sivi stolpci prikazujejo rezultat, z metodo PMA RT PCR in beli, pikčasti stolpci rezultat, štetja na ploščah MRS brez dodanih antibiotikov.



Slika 24: Primerjava rezultatov štetja na ploščah z rezultati, dobljenimi z metodo PMA RT PCR za laktobacile

4.5.2 Meja detekcije in kvantifikacije

Iz enačbe standardne premice smo izračunali teoretično število bakterij, ki jih lahko zaznamo z izbranim protokolom reakcije. Iz izolirane DNA smo okoli pričakovane meje detekcije pripravili serijo redčitev vzorca, ki smo ga za vsako redčitev nanašali v treh ponovitvah.

Vzorec za posamezno redčitev smo na plošče PCR nanašali v dveh ponovitvah. Mejo detekcije in kvantifikacije smo preverili za vsak sev posebej, in sicer pri petih različnih liofiliziranih probiotičnih izdelkih. Iz rezultatov smo za vsak izdelek posebej izračunali koeficient variance (KV) med izmerjenimi in teoretičnimi rezultati.

Kriterij: Ugotavljamo najnižjo koncentracijo bakterij v vzorcu, ki jih lahko zaznamo pri danih pogojih (30 ciklov), ter jo primerjamo s teoretično mejo zaznavnosti. Koeficient variance (KV) mora biti ≤ 30 %. Teoretično mejo detekcije in kvantifikacije smo izračunali iz spodnje formule.

Mejo detekcije in kvantifikacije (X) smo izračunali po matematični enačbi (5):

$$\log X = \frac{Y - a}{b} \quad \dots (5)$$

kjer je,

Y – skupno število ciklov uporabljeno v reakciji PCR (30 ciklov)

a – vrednost, kjer standardna krivulja seka os-y (intercept)

b – vrednost naklona standardne premice (slope)

X – teoretično število bakterij, ki jih zaznamo z nastavljenim protokolom

Vrednost X dobimo z antilogaritmiranjem

Koeficient variance (KV) smo izračunali iz naslednjih matematičnih enačb.

Aritmetično sredino ($\bar{x}$) smo izračunali po matematični enačbi (6) (Košmelj, 2007):

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n x_i \quad \dots (6)$$

kjer je,

x – absolutna vrednost posameznega odstopanja med rezultati

n – število vseh rezultatov

Vzorčni standardni odklon (s) smo izračunali po matematični enačbi (7) (Košmelj, 2007):

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad \dots (7)$$

kjer je,

x – absolutna vrednost posameznega odstopanja med rezultati

$\bar{x}$ – aritmetična sredina rezultatov absolutnih odstopanj

n – število vseh rezultatov

Koeficient variance (KV) smo izračunali po matematični enačbi (8) (Košmelj, 2007):

$$KV = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad \dots (8)$$

kjer je,

KV – koeficient variance

s – vzorčni standardni odklon

$\bar{x}$ – povprečna vrednost med teoretično in izmerjeno mejo zaznavnosti

Preglednica 23 in Preglednica 24 prikazujeta rezultate ujemanj teoretične meje detekcije in kvantifikacije z izmerjeno mejo za bifidobakterije oziroma laktobacile.

Preglednica 23: Ujemanje teoretične meje detekcije in kvantifikacije z izmerjeno pri bifidobakterijah

Standardna krivulja	Teoretična meja zaznavnosti (KE/g)	Izmerjena meja zaznavnosti (KE/g)	KV med teoretično in izmerjeno vrednostjo (%)
$y = -3.42x + 39.29$	5,13E+02	5,83E+02	9
$y = -3.42x + 39.29$	5,13E+02	5,70E+02	7
$y = -3.24x + 37.31$	1,79E+02	2,69E+02	28
$y = -3.32x + 37.40$	1,69E+02	2,57E+02	29
$y = -3.69x + 38.46$	1,94E+02	2,30E+02	12
* $y = -3.42x + 38.35$	3,14E+02	3,82E+02	17

* Vrstica s prikazanimi povprečji vseh petih vrednosti znotraj posameznega stolpca.

Preglednica 24: Ujemanje teoretične meje detekcije in kvantifikacije z izmerjeno pri laktobacilih

Standardna krivulja	Teoretična meja zaznavnosti (KE/g)	Izmerjena meja zaznavnosti (KE/g)	KV med teoretično in izmerjeno vrednostjo (%)
$y = -3.595x + 37.22$	1,03E+02	1,84E+02	40
$y = -3.674x + 39.52$	3,91E+02	4,93E+02	16
$y = -3.674x + 39.52$	3,91E+02	5,14E+02	19
$y = -3.605x + 38.33$	2,04E+02	2,31E+02	9
$y = -3.685x + 38.41$	1,93E+02	2,58E+02	20
* $y = -3.65x + 38.60$	2,56E+02	3,36E+02	21

* Vrstica s prikazanimi povprečji vseh petih vrednosti znotraj posameznega stolpca.

4.5.3 Točnost

Iz izolirane DNA smo pripravili niz razredčin. Preverili smo točnost pri redčitvi 10^{-4} (zgornji koncentracijski nivo) in pri redčitvi 10^{-6} (spodnji koncentracijski nivo). Ugotavljali smo delež izplena reakcije, pri čemer smo 100 % koncentraciji DNA pripisali vrednost 100 %.

Točnost metode smo preverili za vsak sev posebej, in sicer pri petih različnih liofiliziranih probiotičnih izdelkih. Vzorec za posamezno redčitev smo na ploščo PCR nanašali v treh ponovitvah. V tabelah so zaradi preglednosti prikazani rezultati enega vzorca, ostali rezultati pa so zbrani v prilogi B.

Kriterij: Metoda je točna, če delež izplena mikroorganizmov za suspenzijo z določeno koncentracijo ne odstopa od teoretične vrednosti 100 % za več kot ± 30 % oziroma, če je izplen metode med 70 in 130 % (USP, 2011).

Preglednica 25 prikazuje rezultate točnosti metode PMA RT PCR za zgornje koncentracijsko območje pri bifidobakterijah.

Preglednica 25: Prikaz točnosti metode PMA RT PCR za zgornje koncentracijsko območje pri *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12

Vzorec	Koncentracija DNA [%]	Povprečno število bakterij	Vzorčni standardni odklon	Delež izplena (%)
BB6789	100	6.58E+05	7.98E+04	100
	75	5.37E+05	1.51E+05	109
	50	2.96E+05	1.84E+04	90
	25	1.43E+05	2.47E+03	87
	10	5.51E+04	4.37E+03	84

Preglednica 26 prikazuje rezultate točnosti metode PMA RT PCR za spodnje koncentracijsko območje pri bifidobakterijah.

Preglednica 26: Prikaz točnosti metode PMA RT PCR za spodnje koncentracijsko območje pri *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12

Vzorec	Koncentracija DNA [%]	Povprečno število bakterij	Vzorčni standardni odklon	Delež izplena (%)
BB6790	100	6.65E+03	1.77E+03	100
	75	4.02E+03	5.14E+02	81
	50	3.41E+03	1.84E+03	102
	25	1.32E+03	1.35E+02	80
	10	6.27E+02	1.04E+02	94

Preglednica 27 prikazuje rezultate točnosti metode PMA RT PCR za zgornje koncentracijsko območje.

Preglednica 27: Prikaz točnosti metode PMA RT PCR za zgornje koncentracijsko območje pri *Lactobacillus acidophilus* LA-5

Vzorec	Koncentracija DNA [%]	Povprečno število bakterij	Vzorčni standardni odklon	Delež izplena (%)
BB6789	100	2.20E+05	2.46E+04	100
	75	1.58E+05	8.76E+03	96
	50	9.95E+04	1.24E+04	91
	25	5.18E+04	6.50E+03	94
	10	2.47E+04	3.74E+03	112

Preglednica 28 prikazuje rezultate točnosti metode PMA RT PCR za spodnje koncentracijsko območje pri laktobacilih.

Preglednica 28: Prikaz točnosti metode PMA RT PCR za spodnje koncentracijsko območje pri *Lactobacillus acidophilus* LA-5

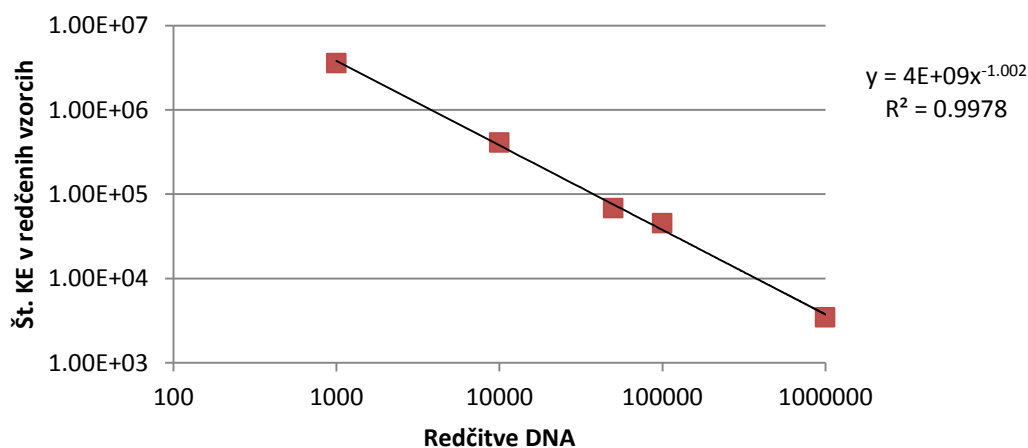
Vzorec	Koncentracija DNA [%]	Povprečno število bakterij	Vzorčni standardni odklon	Delež izplena (%)
BB6789	100	1.66E+03	3.27E+02	100
	75	1.30E+03	4.06E+01	105
	50	9.25E+02	2.05E+02	112
	25	4.27E+02	5.09E+02	103
	10	1.76E+02	4.88E+01	106

4.5.4 Linearnost

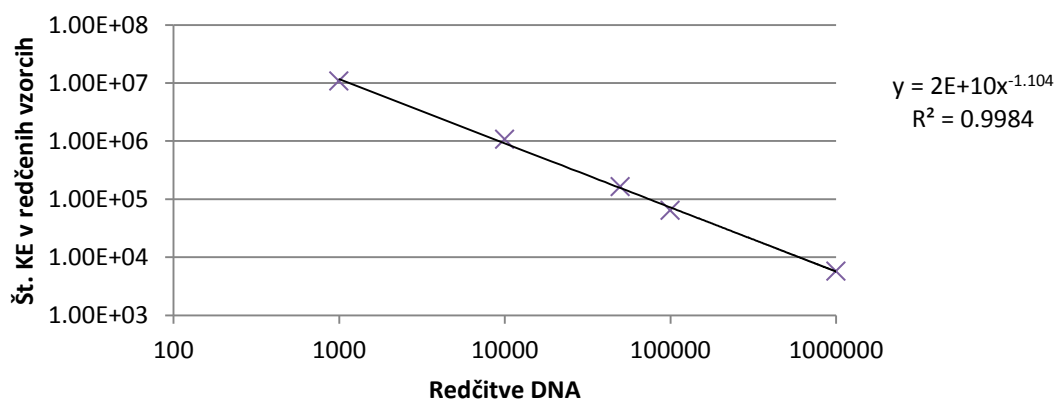
Iz izolirane DNA smo pripravili 5 padajočih redčitev, izrisali graf ter ugotovili korelacijski koeficient premice. Vzorec za posamezno redčitev smo na ploščo PCR nanašali v treh ponovitvah. Linearnost smo preverili za vsak sev posebej, in sicer za pet različnih liofiliziranih probiotičnih izdelkov. Na grafih so zaradi preglednosti prikazani rezultati enega vzorca, ostali rezultati pa so zbrani v prilogi C.

Kriterij: Linearnost preiskovane metode mora ustrezati korelacijskemu koeficientu premice, ki mora biti večji ali enak 0,9 (USP, 2011).

Slika 25 in Slika 26 prikazujeta graf števila enot kolonij v redčenih vzorcih v odvisnosti od redčitve, kjer 1000 pomeni 1000-kratna redčitev vzorca. Na grafu je prikazanih pet redčitvenih točk, ki so povezane s trendno premico. V zgornjem desnem kotu grafa je poleg enačbe prikazan tudi korelacijski koeficient premice (R^2).



Slika 25: Prikaz linearnosti metode PMA RT PCR za bifidobakterije



Slika 26: Prikaz linearnosti metode PMA RT PCR za laktobacile

4.5.5 Specifičnost

1 g vsebine kapsul smo raztopili v 99 g peptonskega diluenta ter nato nekaj raztopine odpipetirali v več epruvetk. Del epruvetk smo postavili v plovec iz stiropora in jih za 10 minut postavili v vrelo vodno kopel. S tem smo poškodovali bakterijske celice, ki so v našem poskusu predstavljale vzorec z mrtvimi celicami. Suspenzija celic iz epruvetk, ki jih nismo temperaturno obdelali, je v našem poskusu predstavljala vzorec z živimi celicami. V nove epruvetke smo namešali različna razmerja živih oziroma mrtvih bakterijskih celic in jih nato obdelali z reagentom PMA. Sledila je še encimska obdelava vzorca in avtomatizirana izolacija DNA po že opisanem postopku. Vzorec DNA smo na ploščo PCR nanašali pri končni redčitvi 10^{-4} . Ugotavljali smo odstopanje rezultata od dejanskega deleža živih bakterij.

Vzorec za posamezno redčitev smo na ploščo PCR nanašali v treh ponovitvah. Specifičnost smo preverili v enem koncentracijskem nivoju (10^{-4}) za vsak sev posebej, in sicer pri petih različnih liofiliziranih probiotičnih izdelkih. V preglednicah so prikazani rezultati enega vzorca, ostali rezultati pa so zbrani v prilogi D.

Preglednica 29 prikazuje rezultate specifičnosti metode PMA RT PCR pri bifidobakterijah.

Preglednica 29: Prikaz specifičnosti metode PMA RT PCR pri *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12

Delež živih bakterij v Suspenziji (%)	Ugotovljeno št. bakterij (KE/g)	SD PCR (KE/g)	Ugotovljen delež živih bakterij (%)	Odstopanje od dejanskega deleža živih bakterij (%)
100	1,24E+06	9,99E+04	100	0
75	1,01E+06	5,17E+03	81	6
50	7,60E+05	4,10E+04	61	11
25	3,76E+05	4,86E+03	30	5
0	1,56E+03	86,9	0	0

Preglednica 30 prikazuje rezultate specifičnosti metode PMA RT PCR pri laktobacilih.

Preglednica 30: Prikaz specifičnosti metode PMA RT PCR pri *Lactobacillus acidophilus* LA-5

Delež živih bakterij v Suspenziji (%)	Ugotovljeno št. bakterij (KE/g)	SD PCR (KE/g)	Ugotovljen delež živih bakterij (%)	Odstopanje od dejanskega deleža živih bakterij (%)
100	4,27E+05	1,40E+05	100	0
75	3,62E+05	2,37E+04	85	10
50	2,76E+05	1,07E+04	65	15
25	1,14E+05	1,31E+04	27	2
0	0	0	0	0

Specifičnost metode smo preverili z različnimi deleži laktobacilov in bifidobakterij v enakem vzorcu. 1 g liofiliziranega prahu posameznega seva smo raztopili v 99 g

peptonskega diluenta ter nato nekaj sekund homogenizirali, da se je prah dobro raztopil. V epruvetke smo prenesli nekaj mililitrov raztopine za vsak sev. Nato smo pripravili različna razmerja volumnov posamezne suspenzije. Sledila je encimska obdelava vzorca in avtomatizirana izolacija DNA po že opisanem postopku. Vzorec DNA smo na ploščo PCR nanašali pri končni redčitvi 10^{-4} . Ugotavljali smo odstopanje rezultata od dejanskega deleža bifidobakterij oziroma laktobacilov v vzorcu, kot prikazujeta Preglednica 31 in Preglednica 32.

Preglednica 31: Prikaz specifičnosti metode PMA RT PCR pri *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12 pri različnih mešanicah uporabljenih sevov

Delež bifidobakterij v Suspenziji (%)	Ugotovljeno št. bakterij (KE/g)	SD PCR (KE/g)	Ugotovljen delež bakterij (%)	Odstopanje od dejanskega deleža bifidobakterij (%)
100	5.35E+06	2.40E+05	100	0
75	4.58E+06	1.52E+05	85	10
50	2.81E+06	2.88E+04	52	2
25	1.11E+06	6.46E+04	21	4
0	0	0	0	0

Preglednica 32: Prikaz specifičnosti metode PMA RT PCR pri *Lactobacillus acidophilus* LA-5 pri različnih mešanicah uporabljenih sevov

Delež laktobacilov v Suspenziji (%)	Ugotovljeno št. bakterij (KE/g)	SD PCR (KE/g)	Ugotovljen delež Bakterij (%)	Odstopanje od dejanskega deleža laktobacilov (%)
100	1.88E+07	2.23E+06	100	0
75	1.21E+07	5.67E+05	64	11
50	1.03E+07	5.96E+05	55	5
25	6.75E+06	3.03E+05	36	11
0	0	0	0	0

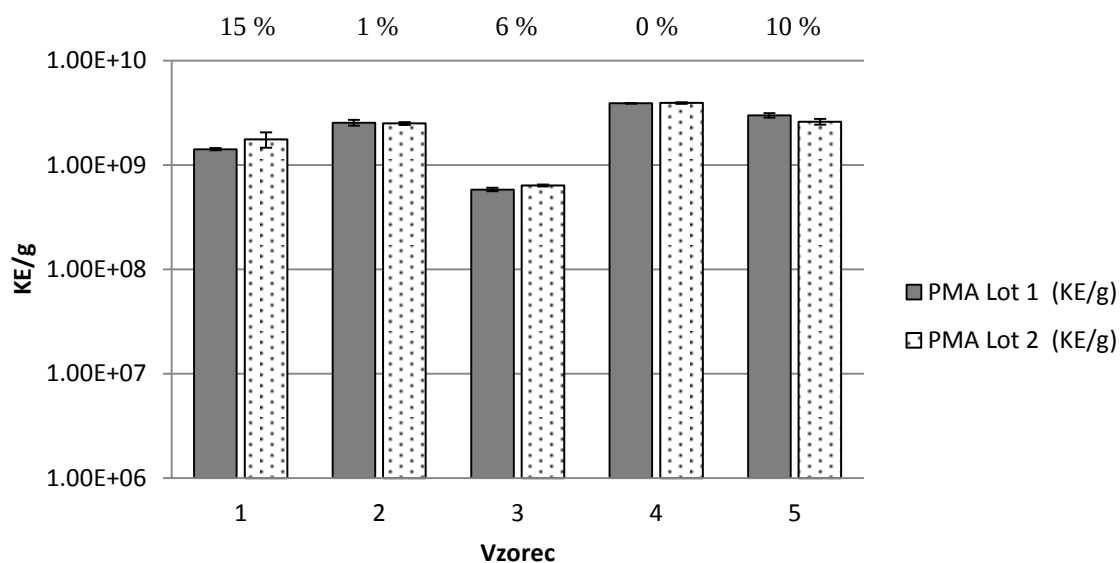
4.5.6 Robustnost

Vzorec izolirane DNA smo analizirali z metodo PMA RT PCR. Istočasno pa smo naredili vzporedno ponovitev, pri čemer smo ponovitev obdelali s reagentom PMA druge serijske številke ter preverili enakost rezultatov.

Vzorec končne redčitve 10^{-4} smo na plošče PCR nanašali v treh ponovitvah. Robustnost smo preverili za vsak sev posebej, in sicer pri petih različnih liofiliziranih probiotičnih izdelkih.

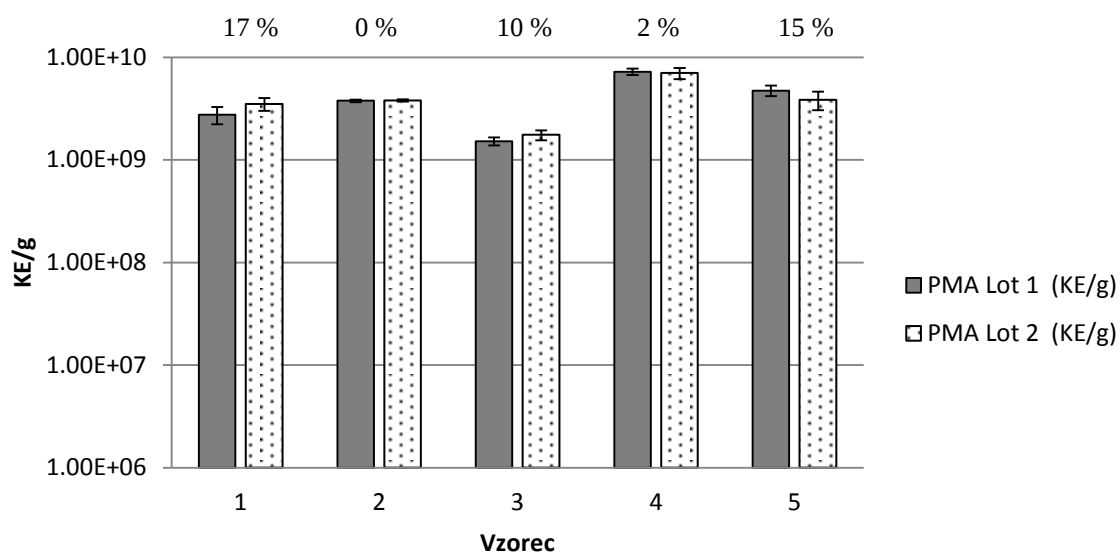
Kriterij robustnosti dopušča odstopanja rezultatov poskusa za koeficient variance manjši ali enak 15 % (USP, 2011).

Rezultate vpliva različnih serij reagenta PMA za bifidobakterije prikazuje Slika 27. Koeficienti variance so prikazani na grafu nad vsakim parom stolpcev.



Slika 27: Prikaz vpliva različnih lotov reagenta PMA za bifidobakterije

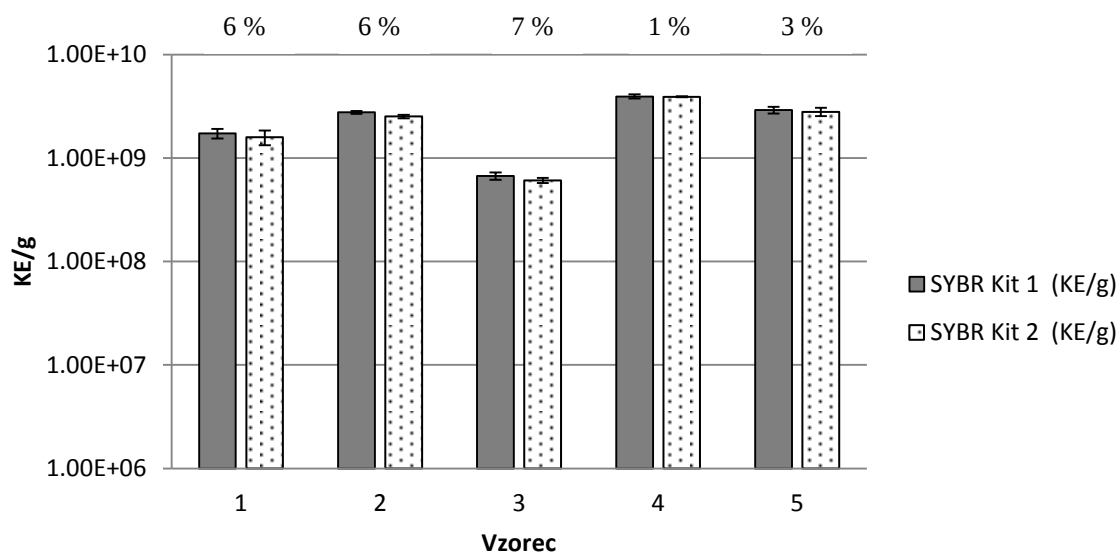
Rezultate vpliva različnih serij reagenta PMA za laktobacile prikazuje Slika 28. Koeficienti varianc so prikazani na grafu nad vsakim parom stolpcev.



Slika 28: Prikaz vpliva različnih lotov reagenta PMA za laktobacile

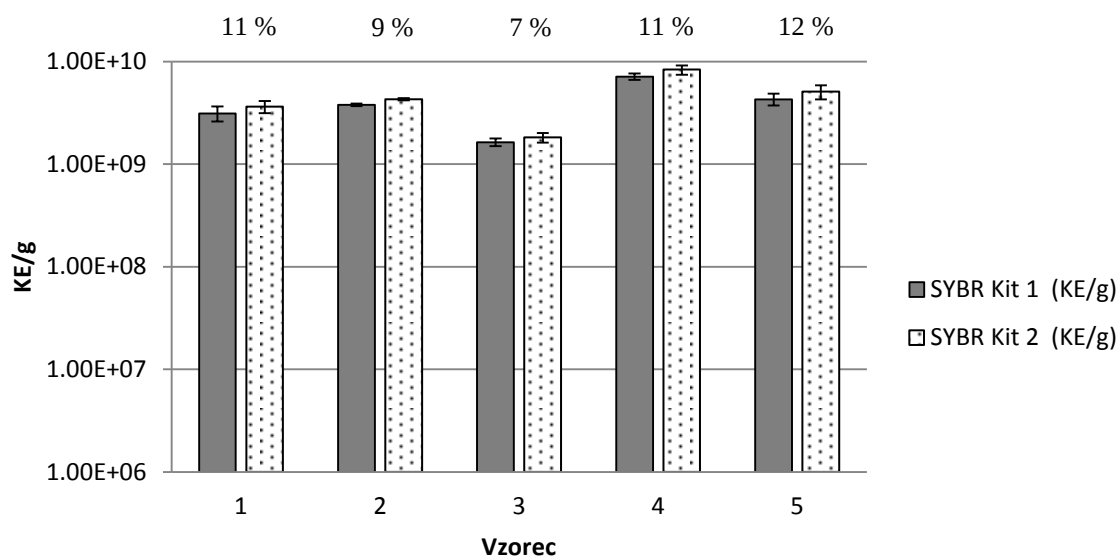
Vzorec izolirane DNA smo analizirali z metodo PMA RT PCR. Istočasno pa smo naredili vzporedno ponovitev, pri čemer smo pripravili reagent SYBR Master Mix druge serijske številke ter preverili enakost rezultatov.

Rezultati vpliva različnih lotov reagenta SYBR Master Mix za bifidobakterije prikazuje Slika 29. Koeficienti varianc so prikazani na grafu nad vsakim parom stolpcev.



Slika 29: Prikaz vpliva različnih lotov reagenta SYBR Master Mix za bifidobakterije

Rezultati vpliva različnih lotov reagenta SYBR Master Mix za laktobacile prikazuje Slika 30. Koeficienti varianc so prikazani na grafu nad vsakim parom stolpcev.



Slika 30: Prikaz vpliva različnih lotov reagenta SYBR Master Mix za laktobacile

4.5.7 Ponovljivost

Iz izolirane DNA smo pripravili 10 ponovitev poskusa enakega vzorca v 10-tih zaporednih dneh. Vsak dan smo na novo pripravili končno redčitev vzorca izolirane DNA (redčitev 10^{-4}), prav tako smo na novo pripravili redčitveno vrsto standarda.

Ponovljivost metode smo preverili za vsak sev posebej, in sicer pri petih različnih liofiliziranih probiotičnih izdelkih. Vzorec za posamezno ponovitev smo na plošče PCR nanašali v treh ponovitvah. Rezultat je povprečje vseh treh ponovitev. V tabelah so zaradi preglednosti prikazani rezultati enega vzorca, ostali rezultati pa so zbrani v prilogi E.

Po desetih ponovitvah smo analizirali rezultate in izračunali koeficient variance dobljenih rezultatov.

Kriterij: Metoda je ponovljiva, če je koeficient variance pri normalnih pogojih manjši ali enak 30 % (USP, 2011).

Preglednica 33 prikazuje rezultate ponovljivosti metode PMA RT PCR za bifidobakterije.

Preglednica 33: Prikaz ponovljivosti metode PMA RT PCR *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12

Vzorec 1	KE/g
Ponovitev 1	1,16E+10
Ponovitev 2	6,31E+09
Ponovitev 3	1,33E+10
Ponovitev 4	1,16E+10
Ponovitev 5	1,02E+10
Ponovitev 6	8,54E+09
Ponovitev 7	1,08E+10
Ponovitev 8	9,42E+09
Ponovitev 9	1,01E+10
Ponovitev 10	1,11E+10
KV	19 %

Preglednica 34 prikazuje rezultate ponovljivosti metode PMA RT PCR za laktobacile.

Preglednica 34: Prikaz ponovljivosti metode PMA RT PCR pri *Lactobacillus acidophilus* LA-5

Vzorec 1	KE/g
Ponovitev 1	5,19E+09
Ponovitev 2	5,15E+09
Ponovitev 3	5,01E+09
Ponovitev 4	9,65E+09
Ponovitev 5	5,35E+09
Ponovitev 6	7,35E+09
Ponovitev 7	5,47E+09
Ponovitev 8	5,93E+09
Ponovitev 9	5,39E+09
Ponovitev 10	6,84E+09
KV	24 %

RAZPRAVA IN SKLEPI

V naši raziskavi smo z optimizacijo sodobnih metod poskušali izboljšati zanesljivost rezultatov in z validacijo potrditi zastavljene delovne hipoteze. Poglavje povzema razpravo in sklepe, ki so nastali na podlagi rezultatov eksperimentalnega dela.

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Morfologija bakterij

Ločevanje kolonij, zraslih na površini petrijevih plošč, ni bilo težavno, saj se po 72-urni inkubaciji sevi lepo ločijo po velikosti kolonij. Čeprav bakterijam med razmazovanjem na plošče nismo nudili anaerobnih pogojev, z rastjo ni bilo težav.

Obe bakterijski vrsti smo pogledali tudi z mikroskopom in pri tem opazili, da je najočitnejša medsebojna razlika, razlika v velikosti bakterijskih celic. Laktobacili imajo večje, daljše, tanjše paličaste celice v primerjavi s celicami bifidobakterij, ki so manjše, bolj čokate, s terminalnimi zadebelitvami. Pri bifidobakterijah smo z mikroskopom opazili skupke celic v obliki črke »V«. Iz literature smo ugotovili, da so skupki najverjetneje rezultat pomanjkanja nekaterih hranil (Lee in O'Sullivan, 2010).

5.1.2 Spremljanje bakterijske rasti

Pri laktobacilih smo opazili hitrejše naraščanje optične gostote kot pri bifidobakterijah. Do razlik bi lahko prišlo tudi zaradi neustrezne atmosfere, saj med samim delom nismo zagotavljali posebnih anaerobnih pogojev dela. Naredili smo primerjavo rasti obeh vrst bakterij, tako v aerobnih kot tudi v anaerobnih pogojih inkubacije. Kljub gojenju bakterij v različnih atmosferah, razlik v naraščanju optične gostote nismo zaznali.

Ugotovili smo, da pri ponovitvah spremljanja bakterijske rasti za vsako vrsto posebej prihaja do odstopanj, zato univerzalne rastne krivulje za posamezen sev nismo podali. Do zamika najverjetneje prihaja zaradi različno dolgih faz prilagajanja celic na okolje (t.i. faza *lag*), ki je odvisna od večih dejavnikov kot so temperatura gojišča pred vbrizganjem inokuluma, količina inokuluma, živost celic, itd..

5.1.3 Cepitev DNA z restrikcijsko endonukleazo *TaqI*

Z encimom *TaqI* smo cepili namnoženo DNA gena za 16S rRNK seva bifidobakterij ter analizirali nastali profil. Profil se je popolnoma ujemal s teoretičnim načrtom profila restrikcije. Na agaroznem gelu se je zelo slabo videl najkrajši fragment restrikcije, kar je lahko posledica tega, da fragment nastane zgolj pri enem od štirih 16S rRNK operonov.

5.1.4 Optimizacija metode PMA Real Time PCR

5.1.4.1 Ugotavljanje količine DNA na celico pri bifidobakterijah

Predpostavili smo, da lahko prihaja do relevantnih razlik v količini DNA znotraj bakterijske celice v različnih fazah celične rasti.

Pri bioinformacijski analizi genoma bifidobakterij smo ugotovili, da se vsi štirje tarčni 16S rRNK operoni nahajajo v prvi četrtini genoma od mesta začetka podvajanja (*oriC*). Možno je, da je nekaj časa v celici prisotno 2-krat več 16S RNK operonov, kar pomeni 2-krat več tarčnih mest za začetne oligonukleotide ter posledično 2-krat več signala, zaznanega z metodo PMA RT PCR.

Iz rezultatov lahko sklepamo, da je v točki T1 (eksponentna faza rasti) prisotno več DNA na celico kot v točki T2 (stacionarna faza). To je skladno s pričakovanji, saj se celice v eksponentni fazi aktivno delijo, posledično pa je verjetnost, da bo prisotno več 16S rRNA operonov, večja. V stacionarni fazi se celice prenehajo deliti, zato ni pričakovati opisanega vpliva. Ker ne vemo v kakšnem fiziološkem stanju so liofilizirane celice probiotičnega izdelka, ne moremo ugotoviti, katera umeritvena krivulja bi bolj posnemala fiziološko stanje vzorca. Zato smo se lotili priprave standarda na način, ki bi izničil možne negativne vplive različnega razmerja DNA na celico v različnih fizioloških stanjih. Standard smo pripravili iz eksponentne faze rasti sveže bakterijske kulture ter ga nato umerili s preiskovanim vzorcem. Tako je izolirana DNA standarda predstavljala zgolj matrico DNA, ki smo ji naknadno pripisali pravilne vrednosti standarda.

5.1.4.2 Primerjava metod fotoaktivacije reagenta PMA

Med seboj smo primerjali dva načina osvetlitve epruvetk z reagentom PMA. Zanimalo nas je, ali prihaja do signifikantnih razlik med različnima metodama osvetlitve, ki bi lahko vplivale na končni rezultat metode PMA RT PCR. Epruvetke smo z vsako od metod osvetljevali različno dolgo (2, 5 in 7 minut) ter rezultate primerjali med seboj. Ugotovili smo, da pri nobenem poskusu ni prišlo do relevantnih odstopanj v rezultatu, zato lahko zaključimo, da osvetljevanje, ki je daljše od 2 minut, in način osvetljevanja ne vplivata na končni rezultat metode PMA RT PCR. Ker je osvetljevanje z metodo Phast Blue enostavnejše, smo za validacijo izbrali to metodo.

5.1.4.3 Učinkovitost vezave reagenta PMA

Pri poskusu smo dokazali, da reagent PMA dovolj dobro prepreči pomnoževanje DNA iz poškodovanih celic. Z avtoklaviranjem suspenzije celic smo ubili bakterije ter jim poškodovali celične membrane, tako da je lahko reagent PMA vstopal v celice in se kovalentno vezal na DNA. Dedni material je bil po avtoklaviranju zelo poškodovan, zato smo v primeru, ko celic nismo obdelali z reagentom PMA, dobili šibek disociacijski signal. Pri vzorcu obdelanem z reagentom PMA, signala nismo zaznali.

5.1.4.4 Vpliv spremljevalne surovine probiotičnega izdelka

V liofiliziranem probiotičnem izdelku je prisotna tudi spremljevalna surovina, ki bi lahko inhibirala verižno reakcijo s polimerazo ali kako drugače vplivala na končni rezultat metode PMA RT PCR. Pri poskusu smo dokazali, da spremljevalna surovina pri nobenem od liofiliziranih probiotičnih sevov ne vpliva na končni rezultat. Vzorec DNA smo analizirali pri končni redčitvi 10^{-4} .

5.1.4.5 Vpliv dodatnega EDTA v vzorcu

Med encimsko obdelavo probiotičnega izdelka smo vzorcu dodali pufer TE, ki vsebuje EDTA v končni koncentraciji 1 mM. Predpostavili smo, da je v vzorcu premalo EDTA, da bi uspela vezati vse pozitivne ione, ki aktivirajo encime kot je na primer DNaza. Pri poskusu, kjer smo vzorcu dodali EDTA v končni koncentraciji 10 mM, ni prišlo do razlik v rezultatu, zato smo zaključili, da dodatni EDTA v vzorcu nima pomembnega vpliva oziroma, da 1 mM EDTA v reakciji nastopa kot dovolj dober kelator.

5.1.4.6 Validacija začetnih oligonukleotidov

Slaba specifičnost začetnih oligonukleotidov lahko povzroči nastanek navzkrižnih kontaminacij in pripelje do odstopanj v točnosti končnega rezultata.

Predpostavili smo, da je za točnost rezultatov naše metode ključno, da uporabljamo vrstno specifične začetne oligonukleotide. Ker smo v literaturi zasledili začetne oligonukleotide specifične zgolj za rod, smo se načrtovanja vrstno specifičnih začetnih oligonukleotidov lotili sami.

Preverili smo učinkovitost *de novo* sintetiziranih začetnih oligonukleotidov reakcije RT PCR. Učinkovitost se ni pomembneje razlikovala v primerjavi z dokumentiranimi začetnimi oligonukleotidi, specifičnimi za rod.

Z računalniškim programom Primrose nam, pri laktobacilih ni uspelo načrtovati vrstno specifičnih začetnih oligonukleotidov, zato smo se preverjanja specifičnosti lotili le za sev bifidobakterij.

Teoretično vrstno specifičnost bifidobakterij smo analizirali s praktičnim poskusom, kjer smo 8 različnih vrst bifidobakterij analizirali, tako z vrstno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi kot tudi s tistimi specifičnimi za rod. Izbor mikroorganizmov je bil premišljen, saj smo jih izbrali glede na naraščajoče število neujemanj dušikovih baz v začetnem oligonukleotidnem paru.

Ugotovili smo, da v primeru analize z rodovno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi, nastane produkt pri vseh osmih bakterijskih vrstah, kar je skladno z našimi pričakovanji. Pri analizi z vrstno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi nastane produkt pri dveh bakterijskih vrstah, in sicer pri *B. animalis* in *B. tsurumiense*. Pri slednji bakterijski vrsti, ki se z začetnim oligonukleotidnim parom ne ujema v dveh dušikovih bazah, je produkt

nepričakovan. Zaključimo lahko, da so »*de novo*« načrtovani vrstno specifični začetni oligonukleotidi dovolj specifični za potrebe kvantitativne analize bakterij *B. animalis*.

5.1.5 Validacija metode PMA Real Time PCR

Z opravljeno validacijo smo metodo preverili po definiranih kriterijih kot so ekvivalenca, meja detekcije in kvantifikacije, točnost, linearnost, specifičnost, robustnost ter ponovljivost. S tem želimo dokazati, da je metoda PMA RT PCR s svojo specifičnostjo in natančnostjo v celoti primerna za zamenjavo tradicionalnih metod posrednega štetja probiotičnih bakterij.

5.1.5.1 Ekvivalenca

V primeru bifidobakterij smo naredili primerjavo rezultatov za 40 različnih liofiliziranih izdelkov. Po 24. primerjavi smo opustili primerjavo s ploščami MRS brez antibiotikov, saj so rezultati pri večini izdelkov odstopali od rezultata, dobljenega na ploščah TOS-MUP. Na ploščah MRS brez antibiotikov smo po trendu zaznali približno tretjino logaritma manj bifidobakterij kot na ploščah TOS-MUP. Razlogov za takšno odstopanje je verjetno več.

Pri ploščah MRS brez antibiotikov smo bakterije med seboj ločili po morfologiji. Bifidobakterije imajo v primerjavi z laktobacili veliko manjše kolonije, zato je do napak verjetno prišlo pri štetju enot kolonij, kar pri nekaterih vzorcih nakazuje relativno velik standardni odklon.

Ker gre tu za mešano bakterijsko kulturo, lahko laktobacili na sev bifidobakterij delujejo zaviralno, čeprav dokazov za to v literaturi nismo zasledili.

Pri razmazovanju bakterij na petrijeve plošče nismo zagotavljali anaerobnih pogojev, zato lahko sklepamo, da dokler se ne vzpostavi anaerobna atmosfera, kisik na bifidobakterije deluje toksično. To je v nasprotju z gojiščem TOS-MUP, kjer smo bakterijsko kulturo vcepili z vmešavanjem ter s tem bakterijam hitreje zagotovili anaerobne pogoje rasti.

Pri dokazovanju ekvivalence smo med seboj primerjali rezultate, dobljene z metodo PMA RT PCR in rezultate dobljene na ploščah TOS-MUP. Po 40 analiziranih probiotičnih izdelkih smo iz rezultatov absolutnih odstopanj izračunali aritmetično sredino odstopanj in standardni odklon ter zaključili, da je metoda za ugotavljanje števila *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12 enaka, oziroma bolj točna od tradicionalne uveljavljene metode petrijevih plošč.

V primeru laktobacilov smo naredili primerjavo rezultatov za 40 različnih liofiliziranih izdelkov. Po 35. primerjavi smo opustili gojenje bakterij na ploščah MRS brez antibiotikov, saj smo imeli dovolj velik vzorec za statistično primerjavo rezultatov. Pri laktobacilih so se rezultati plošč MRS brez antibiotikov in plošč z antibiotiki med seboj lepo ujemali. Laktobacili tvorijo večje, opaznejše kolonije, ki jih je lažje šteti, kar dokazuje tudi relativno majhen standardni odklon plošč z enako redčitvijo. Laktobacili so verjetno manj občutljivi za kisik, zato ta na njih ni deloval toksično kot v primeru bifidobakterij. Z

razliko od bifidobakterij so laktobacili, v obeh primerih, rastle na enakem gojišču, razlika je bila zgolj v prisotnosti/odsotnosti antibiotikov in načinu inokuliranja.

Pri laktobacilih smo za dokazovanje ekvivalence med seboj primerjali rezultate dobljene z metodo PMA RT PCR s tistimi dobljenimi na ploščah MRS-CL/CIP. Po 40 analiziranih probiotičnih izdelkih smo iz rezultatov absolutnih odstopanj izračunali aritmetično sredino odstopanj ter standardni odklon, s tem pa zaključili, da je metoda za ugotavljanje števila *Lactobacillus acidophilus* LA-5 enaka, oziroma bolj točna od tradicionalne, uveljavljene metode petrijevih plošč.

5.1.5.2 Meja detekcije in kvantifikacije

Pri validaciji smo parametra detekcije in kvantifikacije obravnavali skupaj, saj z izbranim protokolom pri meji detekcije uspešno kvantificiramo ustrezno količino bakterij. Pri laktobacilih smo v enem primeru zaznali rezultat nad dovoljeno mejo odstopanja v relativnem standardnem odklonu, vendar domnevamo, da je rezultat posledica odstopanja pričakovane teoretične meje zaznavnosti od dejanske teoretične meje. Pri pripravi redčitev vzorca smo se ravnali po pričakovani meji zaznavnosti, ki pa se od dejanske teoretične vrednosti malce razlikuje, saj je odvisna od naklona standardne premice. Slednji je specifičen za vsako reakcijo posebej pri tem pa je pomembno, da se med reakcijami ne razlikuje preveč. Tudi v našem primeru smo pokazali majhne spremembe v vrednostih standardnih premic med petimi preiskovanimi vzorci. Meja detekcije in kvantifikacije je med 100 in 1000 bakterijam v vzorcu, kar zadostuje za potrebe ugotavljanja bakterij v liofiliziranih probiotičnih izdelkih.

5.1.5.3 Točnost

Domnevamo, da je metoda točna, saj je bil delež izplena pri bifidobakterijah od 72 do 117 % za zgornji koncentracijski nivo. Pri spodnjem koncentracijskem nivoju sta dve vrednosti presegle dovoljeno mejo točnosti, vendar se obe vrednosti nahajata pri 10 % koncentraciji DNA, ki je ravno na meji detekcije in kvantifikacije. Kljub temu od dovoljenega kriterija točnosti ne odstopata veliko (4 oziroma 7 %). Delež izplena pri bifidobakterijah v spodnjem koncentracijskem območju je tako od 72 do 126 % in od vrednosti 100 % ne odstopa za več kot 30 % (vrednosti, ki sta ravno na meji detekcije nismo upoštevali).

Metoda PMA RT PCR je točna tudi za laktobacile, saj je bil delež izplena od 86 do 123 % za zgornji koncentracijski nivo in od 70 do 120 % za spodnjega, kjer je nekaj vrednosti ponovno na meji detekcije in jih pri končnem rezultatu nismo upoštevali.

5.1.5.4 Linearnost

Metoda je linearna, saj so bili vsi korelacijski koeficienti nad vrednostjo 0,9. Linearnost metode smo dokazali skozi pet različnih koncentracijskih območij, pri čemer mejo uspešne detekcije in kvantifikacije predstavljata najnižji in najvišji koncentracijski nivo.

5.1.5.5 Specifičnost

Domnevamo, da je metoda dovolj specifična za obe vrsti bakterij, saj s toplotno obdelavo, poškodovanih celic, ni zaznala kot žive.

To najbolje odraža rezultat, pridobljen za suspenzijo, ki je vsebovala le toplotno obdelane bakterije. V vseh primerih bakterij sploh nismo zaznali, oziroma je bil ugotovljeni delež bakterij zanemarljivo majhen (0,001 % pri bifidobakterijah), med tem ko bakterij pri laktobacilih nismo zaznali v nobenem primeru.

Z metodo PMA RT PCR, ugotovljeni delež bakterij v suspenzijah, ki smo jih sestavili iz različnih deležev mrtvih oziroma živih celic, pri bifidobakterijah odstopa od 1 do 17 %, pri laktobacilih pa od 2 do 22 %. Odstopanja so bila bodisi v prid deležu živih bakterij bodisi nasprotno, a niso bila večja od pričakovanih napak točnosti in ponovljivosti metode. Tako lahko zaključimo, da odstopanja niso rezultat nezadostne specifičnosti metode. Specifičnost metode smo preverili v koncentracijskem območju, kjer smo izvajali tudi druge meritve kot so ekvivalenca, ponovljivost in robustnost.

Tudi v primeru suspenzij z različnimi deleži posameznega seva smo DNA obeh mikroorganizmov pravilno izolirali in zaznali, kar ustreza zahtevanemu kriteriju specifičnosti preiskovane metode.

5.1.5.6 Robustnost

Domnevamo, da je metoda robustna, saj pri izvedbi poskusov ni prišlo do odstopanj večjih od okvirjev točnosti in ponovljivosti.

V primeru izvedbe poskusov z reagenti PMA različnih lotov je bil izračunan KV pri bifidobakterijah od 0 do 15 % ter pri laktobacilih od 0 do 17 %.

Prav tako domnevamo, da je metoda robustna v primeru izvedbe poskusov z reagenti SYBR Master Mix dveh različnih kitov, saj je bil KV pri bifidobakterijah od 1 do 7 % ter pri laktobacilih od 7 do 12 %.

5.1.5.7 Ponovljivost

Ponovljivost smo preverili na desetih različnih, zaporednih ponovitvah istih vzorcev, ki smo jih analizirali v različnih dneh.

Pri preverjanju ponovljivosti pri bifidobakterijah so bili štirje od petih izračunanih koeficientov variance znotraj mej dovoljenih odstopanj. Izračunani KV za en vzorec pa je za 7 % presegel dovoljeno mejo. Ker je do odstopanj prišlo le pri enem izdelku domnevamo, da to ne vpliva na ponovljivost metode. Odstotki koeficienta variance hitro narastejo, če se pojavi le ena slaba ponovitev pri devetih dobrih, kar se je zgodilo tudi v našem primeru. Zelo verjetno je, da bi ob nadaljevanju ponovitev istega vzorca, izračunani KV padel na ustrezno raven dovoljenega odstopanja.

Tudi pri laktobacilih je eden od izračunanih koeficientov variance le za 2 % presegel dovoljeno mejo odstopanj. Razlogi za rahlo povišanje koeficienta variance so enaki kot pri bifidobakterijah.

Metoda je v celoti ponovljiva s pričakovanim koeficientom variance od 21 do 24 % (izjemoma 37 %) pri bifidobakterijah ter od 18 do 30 % (izjemoma 32 %) pri laktobacilih.

5.2 SKLEPI

- Metoda PMA RT PCR je molekularna metoda, s katero je mogoče hitrejše in zanesljivejše ugotavljanje *Lactobacillus acidophilus* LA-5 in *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12 v liofiliziranih probiotičnih izdelkih.
- Metoda PMA Real Time PCR v nobenem od kriterijev, kot so točnost, linearnost, ekvivalenca, meja detekcije in kvantifikacije, specifičnost, ponovljivost ter robustnost, ne presega dovoljene meje odstopanj, predpisanih s strani farmakopeje.
- Metoda PMA Real Time PCR je primerna za podporo tradicionalni uveljavljeni metodi posrednega štetja probiotičnih bakterij.

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Probiotične bakterije ali probiotiki so živi organizmi, ki, če jih zaužijemo v zadostnih količinah, pozitivno vplivajo na gostiteljev organizem. Nahajajo se v fermentiranih izdelkih, kot sta jogurt in sir, ter predstavljajo zelo pomemben delež človekove naravne črevesne mikrobiote. Največkrat omenjene in uporabljene probiotične bakterije pripadajo rodovoma *Bifidobacterium* in *Lactobacillus*. V farmacevtski industriji je uporaba razširjena predvsem v obliki liofiliziranih probiotičnih izdelkov. Probiotiki se v zdravstvu uporabljajo z namenom podporne terapije z antibiotiki, ki porušijo črevesno mikrobno združbo in povečajo tveganje za nastanek kasnejših okužb. Ker tradicionalne metode za ugotavljanje ustrezne kakovosti probiotičnih izdelkov temeljijo predvsem na gojenju bakterij, ki je velikokrat težavno in nenatančno, je vse večja potreba po novih, zmogljivejših in hitrejših metodah. Magistrska naloga se osredotoča na oceno, oziroma primerjavo klasične in molekularne metode za ugotavljanje števila probiotičnih bakterij, v liofiliziranih izdelkih. Izvedli smo validacijo metode PMA RT PCR in jo z ekvivalenco primerjali s klasično gojitveno metodo. V okviru validacije smo preverili točnost, linearnost, ekvivalenco, mejo detekcije in kvantifikacije, specifičnost, ponovljivost ter robustnost. Ugotovili smo, da v nobenem od parametrov metoda ne presega dovoljene meje odstopanj, predpisane s strani ameriške farmakopeje in je primerna za podporo tradicionalni uveljavljeni metodi indirektnega štetja probiotičnih bakterij. Metoda PMA Real Time PCR je molekularna metoda, s katero je mogoče hitrejša in zanesljivejša ugotavljanje *Lactobacillus acidophilus* LA-5 in *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12 v liofiliziranih probiotičnih izdelkih.

6.2 SUMMARY

Probiotic bacteria or probiotics are living organisms which, when consumed in sufficient quantity, have a positive impact on the host organism. The most frequently-mentioned and used probiotic bacteria belong to genera *Bifidobacterium* and *Lactobacillus*. In the pharmaceutical industry the most common use of probiotics is in the form of lyophilized products. As the old methods are based primarily on cultivation of bacteria which is a difficult and time consuming task, demand for new, faster and more efficient approaches has increased. To ensure adequate quality of probiotic products in the fast paced pharmaceutical industry the use of new, rapid and more efficient methods is essential. Master's thesis focuses on the evaluation and comparison of methods for the enumeration of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12, used in probiotic lyophilized products. In the thesis, the comparison of two molecular methods for the enumeration of probiotic bacteria has been done, namely PMA Real Time PCR and classic indirect method of counting bacteria. Selected methods were compared and analyzed, using equivalence as a standard validation criterion. The validation of the method PMA Real Time PCR has been done using the standard validation criteria such as accuracy, linearity, equivalence, limit of detection and quantitation, specificity, reproducibility, and robustness. Proposed and analyzed method PMA Real Time PCR does not exceed the well-established and rigorous validation limits in pharmaceutical industry in any of the selected validation criteria. Based on the evaluation results, it can be concluded

that PMA Real Time PCR can be used to support the well-established indirect method of counting bacteria.

7 VIRI

- Ashelford E. K., Weightman A. J., Fry C. J. 2002. Primrose: a computer program for generating and estimating the phylogenetic range of 16S rRNA oligonucleotide probes and primers in conjunction with the RDP-II database. *Nucleic Acids Research*, 30, 15: 3481-3489
- Axelsson L. 2004. Lactic acid bacteria: Classification and physiology. V: *Lactic acid bacteria: Microbiology and functional aspects*. 3rd ed. Salminen S., von Wright A., Ouwehand A. (eds.). New York, Marcel Dekker: 1-66
- Aznar R., Elizaquivel P., Sanchez G., Selma M.V. 2012. Application of propidium monoazide-qPCR to evaluate the ultrasonic inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-cut vegetable wash water. *Food Microbiology*, 30: 316-320
- Biavati B., Vescovo M., Torriani S., Botazzi V. 2000. Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Annals of Microbiology*, 50: 117-131
- Breeuwer P., Abee T. 2000. Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques. *Food Microbiol*, 55: 193-200
- Bron A. P., Baarlen P., Kleerebezem M. 2012. Emerging molecular insights into the interection between probiotics and host intestinal mucosa. *Nature*, 10: 66-76
- Buh Gašparič M., Cankar K., Žel J., Gruden K. 2008. Comparison of different real-time PCR chemistries and their suitability for detection and quantification of genetically modified organism. *BMC Biotechnology*, 8: 26, doi:10.1186/1472-6750-8-26: 12 str.
- Bustin S. A., Benes V., Garson J. A., Helleman J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M. W., Shipley G. L., Vandesomple J., Wittwer C. T. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55, 4: 611-622
- Collado M. C., Moreno Y., Cobo J. M., Mateos J. A., Hernandez M. 2006. Molecular detection of *Bifidobacterium animalis* DN-173010 in human feces during fermented milk administration. *Food Research International*, 39: 530-535
- Colwell R. R. 2000. Viable but nonculturable bacteria: a survival strategy. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 6: 121-125
- D'Aimmo M. R., Modesto M., Biavati B. 2007. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* spp. isolated from dairy and pharmaceutical products. *International Journal of Food Microbiology*, 115: 35-42
- 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: 11 str.

- Felis E. G., Dellaglio F. 2007. Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 8: 44-61
- Fittipaldi M., Codony F., Adrados B., Camper K. A., Morato J. 2011. Viable real-time PCR in environmental samples: Can all data be interpreted directly? *Microbial Ecology*, 61: 7-12
- Fittipaldi M., Nocker A., Codony F. 2012. Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification. *Journal of Microbiological Methods*, 91, 4: 276-289
- Frank J. A., Reich C. I., Sharma S., Weisbaum J. S., Wilson B. A., Olsen J. G. 2008. Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 8: 2461-2470
- Furet J. P., Quénée P., Tailliez P. 2004. Molecular quantification of lactic acid bacteria in fermented milk products using real-time quantitative PCR. *Food Microbiology*, 97: 197- 207
- Garcisa-Cayuela T., Tabasco R., Pelaez C., Requena T. 2009. Simultaneous detection and enumeration of viable lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented milk by using propidium monoazide and real-time PCR. *International Dairy Journal*, 19: 405-409
- Garrigues C., Johansen E., Pedersen M. B. 2010. Complete genome sequence of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12, a widely consumed probiotic strain. *Journal of Bacteriology*, 192, 9: 2467-2468
- Herman L. 1997. Detection of viable and dead *Listeria monocytogenes* by PCR. *Food Microbiology*, 14: 103-110
- Higgins D. G., Thompson J. D., Gibson T. J. 1996. Using CLUSTAL for multiple sequence alignments. *Methods in Enzymology*, 266: 383-402
- Hubbard T., Barker D., Birney E., Cameron G., Chen Y., Clark L., Cox T., Cuff J., Curwen V., Down T., Durbin R., Eyraes E., Gilbert J., Hammond M., Huminiecki L., Kasprzyk A., Lehvaslaiho H., Lijnzaad P., Melsopp C., Mongin E., Pettett R., Pocock M., Potter S., Rust A., Schmidt E., Searle S., Slater G., Smith J., Spooner W., Stabenau A., Stalker J., Stupka E., Ureta-Vidal A., Vastrik I., Clamp M. 2002. The ENSEMBL genome database project. *Nucleic Acids Research*, 30, 1: 38-41
- Innis A. M., Myambo B. K., Gelfand D. H., Brow M. A. D. 1988. DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Biochemistry*, 85: 9436-9440
- ISO 4833. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of microorganisms. 2003: 9 str.

- Keer J. T., Birch L. 2003. Molecular methods for the assessment of bacterial viability. *Journal of Microbiological Methods*, 53: 175-183
- Korhonen J. 2010. Phenotypic antibiotic resistance of LAB. V: Antibiotic resistance of lactic acid bacteria. Pasanen P., Lehto T., Peiponen K. (eds.). Kuopio, University of Eastern Finland, 17-29
- Košmelj K. 2007. Uporabna statistika. Ljubljana, Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani: 239 str.
- Kramer M. 2009. Novi pristopi k zagotavljanju kakovosti in obstojnosti probiotičnih izdelkov z mlečnokislinskimi bakterijami. Doktorsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo: 122 str.
- Kramer M., Obermajer N., Bogovič Matijašić B., Rogelj I., Kmetec V. 2009. Quantification of live and dead probiotic bacteria in lyophilised product by real-time PCR and by flow cytometry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84: 1137-1147
- Lahtinen S. J., Gueimonde M., Ouwehand A., Reinikainen J. P., Salminen S. J. 2005. Probiotic bacteria may become dormant during storage. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 1662-1663
- Laura J. F., Fuller R., Gibson G. R. 1999. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. *International Dairy Journal*, 9: 53-61
- Lee J. H., O'Sullivan D. J. 2010. Genomic insights into bifidobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74, 3: 378-416
- Lee Y. K., Salminen S. 2009. Commercially available human probiotic microorganisms. V: Handbook of probiotics and prebiotics. 2nd ed. New Jersey, John Wiley & Sons: 441-532
- Loy A., Arnold R., Tischler P., Rattei T., Wagner M., Horn M. 2008. ProbeCheck - a central resource for evaluating oligonucleotide probe coverage and specificity. *Environmental Microbiology*, 10: 2894-2896
- Loy A., Maixner F., Wagner M., Horn M. 2007. ProbeBase—an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes: new features 2007. *Nucleic Acids Research*, 35: 800-804
- Masco L., Vanhoutte T., Temmerman R., Swings J., Huys G. 2007. Evaluation of real-time PCR targeting the 16S rRNA and *recA* genes for the enumeration of bifidobacteria in probiotic products. *International Journal of Food Microbiology*, 113: 351-357
- Monnet C., Bogovič Matijašić B. 2012. Application of PCR based methods to dairy products and non-dairy probiotic products. V: Polymerase chain reaction. Hernandez Rodriguez P., Ramirez Gomez A. P. (eds.). Rijeka, Intech cop: 11-50

- Nocker A., Sossa K. E., Camper A. K. 2007a. Molecular monitoring of disinfection efficacy using propidium monoazide in combination with quantitative PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 70: 252-260
- Nocker A., Sossa-Fernandez P., Burr D. M. Camper K. A. 2007b. Use of propidium monoazide for live/dead distinction in microbial ecology. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 16: 5111-5117
- Parvez S., Malik K. A., Kang A. H., Kim H. Y. 2006. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology*, 100: 1171-1185
- PDA Technical Report No. 33. 2000. Evaluation, validation and implementation of new microbiological testing methods. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 54, 3, Suppl. TR33: 1-39
- Pfaffl M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29, 9: 2002-2007
- Pruesse E., Quast C., Knittel K., Fuchs B. M. Ludwig W., Peplies J., Glockner F. O. 2007. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Research*, 35, 21: 7188-7196
- Rauhut R., Klug G. 1999. mRNA degradation in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 23: 353-370
- Reid G., Sanders M. E., Gaskins H. R., Gibson G. R., Mercenier A., Rastall R., Roberfroid M., Rowland I., Cherbut C., Klaenhammer T. R. 2003. New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 37: 105-118
- Rinttilä T., Kassinen A., Malinen E., Krogus L., Palva A. 2004. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 97: 1166-1177
- Ross J. J., Boucher P. E., Bhattacharyya S. P., Kopecko D. J., Sutkowski E.M., Rohan P. J., Chandler D. K. F., Vaillancourt J. 2008. Consideration in the development of live biotherapeutic products for clinical use. *Current Issues in Molecular Biology*, 10: 13-16
- Rossmann P., Röder B., Frühwirth K., Vogl C., Wagner M. 2011. Mechanisms of degradation of DNA standards for calibration function during storage. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89: 407-417
- Rutherford K., Parkhill J., Crook J., Horsnell T., Rice P. 2000. Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics*, 16: 944-945

- Songjiinda P., Nokayama J., Tateyama A., Tanaka S., Tsubouchi M., Kiyohara C., Shirakawa T., Sonomoto K. 2007. Differences in developing intestinal microbiota between allergic and non-allergic infants: a pilot study in japan. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 71: 2338-2342
- Sutton S. 2011. Accuracy of plate counts. Journal of Validation Technology, 17, 3: 42- 46
- Thitaram S. N., Siragusa G.R., Hinton A. 2005. Bifidobacterium-selective isolation and enumeration from chicken caeca by a modified oligosaccharide antibiotic-selective agar medium. Letters in Applied Microbiology, 41: 355-360
- Tuomola E., Crittenden R., Playne M., Isolauri E., Salminen S. 2001. Quality assurance criteria for probiotic bacteria. American Journal of Clinical Nutrition, 73, Suppl.: 393S-398S
- USP. 2011. <1225>Validation of compendial methods. USP-United States Pharmacopeia, 31, 2: 549-549
- Vasiljevic T., Shah N. P. 2008. Probiotics: From Metchnikoff to bioactives. International Dairy Journal, 18: 714-728
- Vincze T., Posfai J., Roberts J. R. 2003. NEB cutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes, Nucleic Acids Research, 31, 13: 3688-3691

ZAHVALA

Pri nastajanju magistrskega dela sem bil deležen pomoči veliko ljudi, ki pa jih v zahvali ne bom uspel vseh omeniti. Vsem se najlepše zahvaljujem.

Rad bi se zahvalil mentorju doc. dr. Tomažu Accettu za ključne napotke in usmeritve pri nastajanju magistrskega dela ter za pomoč pri izvedbi eksperimentalnega dela. Zahvaljujem se vam tudi za vse strokovne popravke magistrske naloge.

Hvala somentorici dr. Mateji Kramer za ponujeno priložnost izdelave naloge v gospodarstvu ter za vso izkazano pomoč in vzpodbudo. Zahvaljujem se vam tudi za vse strokovne popravke magistrske naloge.

Hvala prof. dr. Miroslavu Petrovcu za recenzijo magistrske naloge.

Hvala dr. Bojani Bogovič Matijašić za strokovne nasvete in pomoč.

Rad bi se zahvalil mladi raziskovalki Anji Mavrič iz Inštituta za mlekarstvo in probiotike, ki mi je pomagala pri začetku eksperimentalnega dela.

Zahvala gre tudi bratu Matevžu Pušniku za nesebično pomoč in motivacijo ter nasvete pri magistrski nalogi.

Zahvalil bi se Ines Blaž za izkazano pomoč pri lektoriranju magistrske naloge.

Magistrsko nalogo sem opravljal v podjetju Lek d.d., na oddelku za Mikrobiološko kontrolo, kjer je vedno prijetno delovno vzdušje. Hvala vsem sodelavcem za pomoč in nasvete.

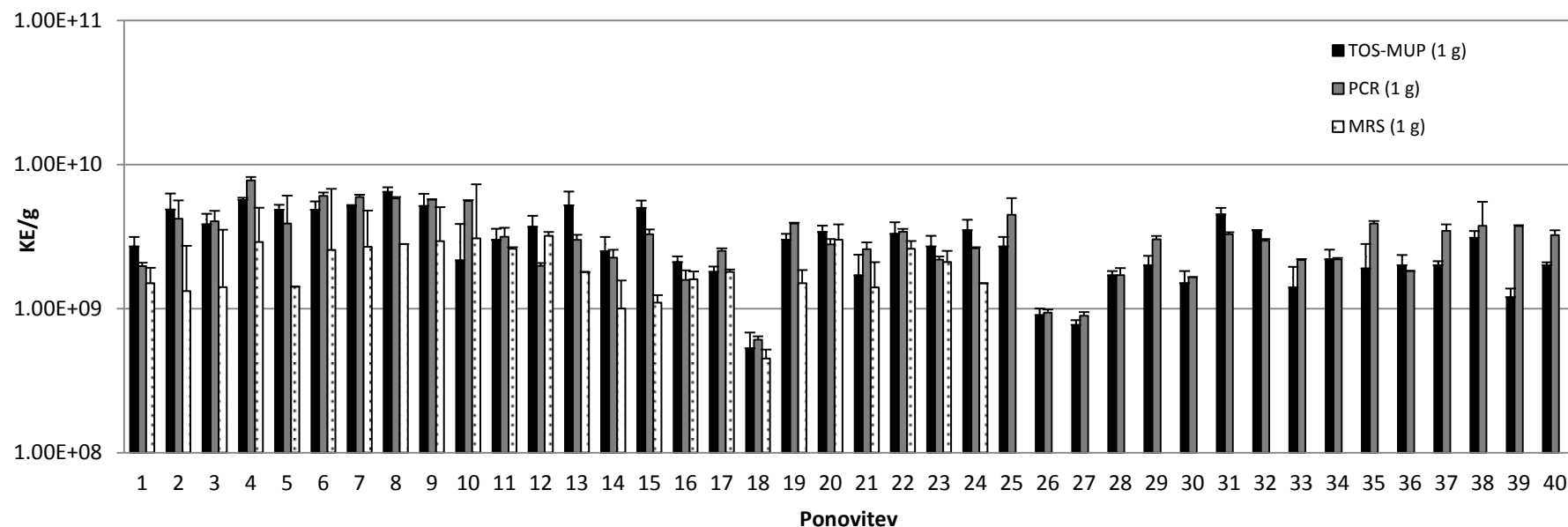
Posebna zahvala je namenjena mojima staršema, ki sta me pripeljala do zaključka univerzitetnega študija in me odkrito podpirala pri vsakem koraku na tej poti.

PRILOGE

Priloga A: Primerjave rezultatov štetja na ploščah z rezultati pridobljenimi z metodo PMA RT PCR za bifidobakterije

ID	TOS-MUP (1 g)	PCR (1 g)	MRS (1 g)	SD PCR	SD TOS-MUP	SD MRS
1	2.70E+09	1.98E+09	1.50E+09	1.08E+08	4.36E+08	4.24E+08
2	4.87E+09	4.21E+09	1.32E+09	1.43E+09	1.41E+09	1.41E+09
3	3.84E+09	4.04E+09	1.41E+09	7.37E+08	7.00E+08	2.12E+09
4	5.67E+09	7.78E+09	2.90E+09	4.24E+08	2.00E+08	2.12E+09
5	4.85E+09	3.91E+09	1.42E+09	2.19E+09	4.00E+08	0.00E+00
6	4.84E+09	6.07E+09	2.55E+09	3.21E+08	7.00E+08	4.24E+09
7	5.12E+09	5.95E+09	2.68E+09	2.23E+08	1.00E+08	2.12E+09
8	6.45E+09	5.83E+09	2.81E+09	1.25E+08	5.00E+08	0.00E+00
9	5.15E+09	5.71E+09	2.94E+09	2.73E+07	1.10E+09	2.12E+09
10	2.16E+09	5.59E+09	3.07E+09	7.06E+07	1.70E+09	4.24E+09
11	3.00E+09	3.16E+09	2.60E+09	4.82E+08	5.80E+08	7.00E+07
12	3.70E+09	1.98E+09	3.20E+09	8.91E+07	7.00E+08	2.10E+08
13	5.20E+09	3.01E+09	1.80E+09	2.44E+08	1.30E+09	0.00E+00
14	2.50E+09	2.26E+09	1.00E+09	3.02E+08	6.40E+08	5.70E+08
15	5.00E+09	3.29E+09	1.10E+09	2.54E+08	6.10E+08	1.40E+08
16	2.10E+09	1.59E+09	1.60E+09	2.60E+08	2.00E+08	2.12E+08
17	1.80E+09	2.52E+09	1.80E+09	1.04E+08	1.53E+08	7.07E+07
18	5.30E+08	6.08E+08	4.50E+08	3.46E+07	1.53E+08	7.07E+07
19	3.00E+09	3.90E+09	1.50E+09	4.31E+07	3.06E+08	3.54E+08
20	3.40E+09	2.79E+09	3.00E+09	2.59E+08	3.61E+08	8.49E+08
21	1.70E+09	2.59E+09	1.40E+09	2.91E+08	6.66E+08	7.07E+08
22	3.30E+09	3.42E+09	2.60E+09	1.70E+08	6.66E+08	3.54E+08
23	2.70E+09	2.19E+09	2.10E+09	1.04E+08	4.93E+08	4.24E+08
24	3.50E+09	2.62E+09	1.50E+09	5.30E+07	6.35E+08	0.00E+00
25	2.70E+09	4.49E+09		1.35E+09	4.40E+08	
26	9.00E+08	9.39E+08		4.88E+07	1.00E+08	
27	7.70E+08	8.95E+08		5.15E+07	6.00E+07	
28	1.70E+09	1.71E+09		2.02E+08	1.20E+08	
29	2.00E+09	3.03E+09		1.68E+08	3.21E+08	
30	1.50E+09	1.66E+09		3.17E+06	3.21E+08	
31	4.50E+09	3.29E+09		1.08E+08	5.00E+08	
32	3.50E+09	2.97E+09		7.81E+07	0.00E+00	
33	1.40E+09	2.18E+09		2.89E+07	5.51E+08	
34	2.20E+09	2.20E+09		4.68E+07	3.61E+08	
35	1.90E+09	3.91E+09		1.53E+08	9.06E+08	
36	2.00E+09	1.83E+09		3.73E+05	3.54E+08	
37	2.00E+09	3.47E+09		3.75E+08	1.27E+08	
38	3.10E+09	3.76E+09		1.75E+09	3.54E+08	
39	1.20E+09	3.74E+09		5.14E+07	1.77E+08	
40	2.00E+09	3.25E+09		2.49E+08	9.19E+07	

Nadaljevanje priloge A: Primerjave rezultatov štetja na ploščah z rezultati pridobljenimi z metodo PMA RT PCR za bifidobakterije



Legenda:

TOS-MUP – rezultati KE, pridobljeni na gojišču TOS z dodatkom antibiotika mupirocin

MRS – rezultati KE, pridobljeni na gojišču MRS brez dodanih antibiotikov

PCR – rezultati, pridobljeni z metodo PMA RT PCR

SD TOS-MUP – vzorčni standardni odklon za TOS-MUP

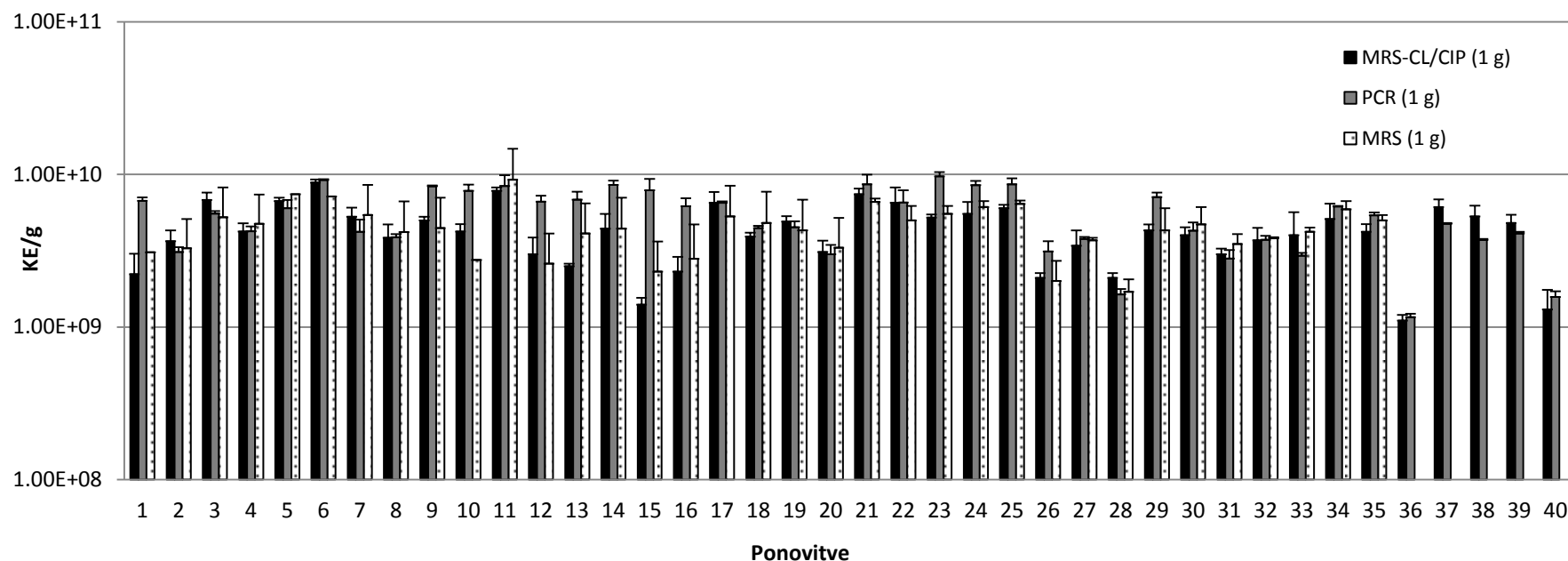
SD MRS – vzorčni standardni odklon za MRS

SD PCR – vzorčni standardni odklon za PCR

Nadaljevanje priloge A: Primerjave rezultatov štetja na ploščah z rezultati pridobljenimi z metodo PMA RT PCR za laktobacile

ID	MRS-CL/CIP (1 g)	PCR (1 g)	MRS (1 g)	SD PCR	SD MRS-CL/CIP	SD MRS
1	2.22E+09	6.71E+09	3.08E+09	3.69E+08	8.02E+08	0.00E+00
2	3.65E+09	3.10E+09	3.27E+09	2.28E+08	6.36E+08	1.82E+09
3	6.81E+09	5.54E+09	5.23E+09	2.06E+08	7.77E+08	2.97E+09
4	4.22E+09	4.23E+09	4.73E+09	3.39E+08	5.66E+08	2.65E+09
5	6.68E+09	6.00E+09	7.42E+09	7.92E+08	3.54E+08	0.00E+00
6	8.84E+09	9.16E+09	7.17E+09	1.28E+08	4.04E+08	0.00E+00
7	5.27E+09	4.21E+09	5.41E+09	8.54E+08	7.78E+08	3.13E+09
8	3.84E+09	3.88E+09	4.19E+09	1.85E+08	8.50E+08	2.47E+09
9	5.00E+09	8.34E+09	4.45E+09	1.05E+08	2.83E+08	2.59E+09
10	4.22E+09	7.80E+09	2.75E+09	7.68E+08	4.95E+08	0.00E+00
11	7.80E+09	8.38E+09	9.20E+09	1.48E+09	4.00E+08	5.52E+09
12	3.00E+09	6.61E+09	2.60E+09	6.53E+08	8.50E+08	1.50E+09
13	2.50E+09	6.82E+09	4.10E+09	8.67E+08	1.00E+08	2.34E+09
14	4.40E+09	8.54E+09	4.40E+09	5.62E+08	1.11E+09	2.64E+09
15	1.40E+09	7.85E+09	2.30E+09	1.50E+09	1.53E+08	1.33E+09
16	2.30E+09	6.19E+09	2.80E+09	7.77E+08	5.86E+08	1.90E+09
17	6.50E+09	6.50E+09	5.30E+09	1.66E+08	1.17E+09	3.12E+09
18	3.90E+09	4.45E+09	4.80E+09	1.49E+08	2.52E+08	2.89E+09
19	4.90E+09	4.51E+09	4.30E+09	4.23E+08	4.16E+08	2.52E+09
20	3.10E+09	3.00E+09	3.30E+09	4.43E+08	5.77E+08	1.88E+09
21	7.40E+09	8.60E+09	6.60E+09	1.35E+09	6.70E+08	3.50E+08
22	6.50E+09	6.53E+09	5.00E+09	1.33E+09	1.70E+09	1.20E+09
23	5.20E+09	9.71E+09	5.50E+09	6.61E+08	2.60E+08	7.10E+08
24	5.50E+09	8.51E+09	6.10E+09	5.43E+08	1.10E+09	5.70E+08
25	6.00E+09	8.60E+09	6.40E+09	8.33E+08	3.20E+08	3.50E+08
26	2.10E+09	3.12E+09	2.00E+09	5.26E+08	1.53E+08	7.07E+08
27	3.40E+09	3.78E+09	3.70E+09	1.08E+08	8.89E+08	1.41E+08
28	2.10E+09	1.64E+09	1.70E+09	1.37E+08	1.53E+08	3.54E+08
29	4.30E+09	7.11E+09	4.30E+09	5.05E+08	4.00E+08	1.70E+09
30	4.00E+09	4.28E+09	4.70E+09	5.68E+08	4.93E+08	1.41E+09
31	3.00E+09	2.81E+09	3.50E+09	3.84E+08	2.65E+08	5.66E+08
32	3.70E+09	3.73E+09	3.80E+09	2.39E+08	7.55E+08	7.07E+07
33	4.00E+09	2.93E+09	4.20E+09	1.21E+08	1.65E+09	2.83E+08
34	5.10E+09	6.16E+09	5.90E+09	6.08E+07	1.32E+09	7.78E+08
35	4.20E+09	5.40E+09	5.00E+09	2.28E+08	5.29E+08	4.24E+08
36	1.10E+09	1.16E+09		6.19E+07	1.00E+08	
37	6.10E+09	4.73E+09		6.26E+07	7.57E+08	
38	5.30E+09	3.72E+09		5.35E+07	9.29E+08	
39	4.80E+09	4.10E+09		1.06E+08	6.43E+08	
40	1.30E+09	1.57E+09		1.42E+08	4.51E+08	

Nadaljevanje priloge A: Primerjave rezultatov štetja na ploščah z rezultati pridobljenimi z metodo PMA RT PCR za laktobacile



Legenda:

MRS-CL/CIP – rezultati KE, pridobljeni na gojišču MRS z dodatkom antibiotika klindamicin in ciprofloksacin

MRS – rezultati KE, pridobljeni na gojišču MRS brez dodanih antibiotikov

PCR – rezultati, pridobljeni z metodo PMA RT PCR

SD MRS-CL/CIP – vzorčni standardni odklon za MRS-CL/CIP

SD MRS – vzorčni standardni odklon za MRS

SD PCR – vzorčni standardni odklon za PCR

Priloga B: Prikaz točnosti metode PMA RT PCR za spodnje koncentracijsko območje pri *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12

Vzorec	Koncentracija DNA [%]	Povprečno število bakterij znotraj posamezne redčitve	Deviacija znotraj posamezne redčitve	Delež izplena
BB6789	100	1.89E+03	1.26E+03	100 %
	75	1.22E+03	5.35E+02	86 %
	50	1.16E+03	7.22E+02	123 %
	25	3.42E+02	0.00E+00	72 %
	10	1.25E+02	0.00E+00	66 %

Vzorec	Koncentracija DNA [%]	Povprečno število bakterij znotraj posamezne redčitve	Deviacija znotraj posamezne redčitve	Delež izplena
AR7615	100	2.15E+03	1.36E+03	100 %
	75	1.97E+03	1.80E+03	122 %
	50	8.94E+02	0.00E+00	83 %
	25	6.78E+02	1.77E+02	126 %
	10	2.96E+02	0.00E+00	137 %

Vzorec	Koncentracija DNA [%]	Povprečno število bakterij znotraj posamezne redčitve	Deviacija znotraj posamezne redčitve	Delež izplena
BB6790	100	6.65E+03	1.77E+03	100 %
	75	4.02E+03	5.14E+02	81 %
	50	3.41E+03	1.84E+03	102 %
	25	1.32E+03	1.35E+02	80 %
	10	6.27E+02	1.04E+02	94 %

Vzorec	Koncentracija DNA [%]	Povprečno število bakterij znotraj posamezne redčitve	Deviacija znotraj posamezne redčitve	Delež izplena
AL0521	100	2.85E+03	9.60E+02	100 %
	75	2.24E+03	3.99E+02	105 %
	50	1.58E+03	6.85E+02	111 %
	25	7.55E+02	3.04E+02	106 %
	10	2.67E+02	4.01E+01	94 %

Vzorec	Koncentracija DNA [%]	Povprečno število bakterij znotraj posamezne redčitve	Deviacija znotraj posamezne redčitve	Delež izplena
BB8444	100	2.58E+03	6.52E+02	100 %
	75	1.78E+03	1.02E+03	92 %
	50	1.45E+03	3.32E+02	113 %
	25	5.07E+02	2.33E+02	79 %
	10	2.27E+02	0.00E+00	88 %

Nadaljevanje priloge B: Prikaz točnosti metode PMA RT PCR za zgornje koncentracijsko območje pri *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12

Vzorec	Koncentracija DNA [%]	Povprečno število bakterij znotraj posamezne redčitve	Deviacija znotraj posamezne redčitve	Delež izplena
BB6789	100	6.58E+05	7.98E+04	100 %
	75	5.37E+05	1.51E+05	109 %
	50	2.96E+05	1.84E+04	90 %
	25	1.43E+05	2.47E+03	87 %
	10	5.51E+04	4.37E+03	84 %

Vzorec	Koncentracija DNA [%]	Povprečno število bakterij znotraj posamezne redčitve	Deviacija znotraj posamezne redčitve	Delež izplena
AR7615	100	3.25E+05	3.61E+04	100 %
	75	2.55E+05	8.38E+03	105 %
	50	1.87E+05	1.52E+04	115 %
	25	9.00E+04	1.52E+04	111 %
	10	3.27E+04	8.06E+03	101 %

Vzorec	Koncentracija DNA [%]	Povprečno število bakterij znotraj posamezne redčitve	Deviacija znotraj posamezne redčitve	Delež izplena
BB6790	100	7.00E+05	1.18E+05	100 %
	75	4.96E+05	3.13E+04	95 %
	50	3.66E+05	3.01E+04	104 %
	25	1.80E+05	1.65E+04	103 %
	10	5.88E+04	5.69E+03	84 %

Vzorec	Koncentracija DNA [%]	Povprečno število bakterij znotraj posamezne redčitve	Deviacija znotraj posamezne redčitve	Delež izplena
AL0521	100	4.30E+05	2.51E+04	100 %
	75	3.26E+05	2.13E+04	101 %
	50	2.22E+05	1.52E+04	103 %
	25	1.09E+05	3.93E+03	102 %
	10	5.02E+04	7.95E+03	117 %

Vzorec	Koncentracija DNA [%]	Povprečno število bakterij znotraj posamezne redčitve	Deviacija znotraj posamezne redčitve	Delež izplena
BB8444	100	2.76E+05	3.46E+04	100 %
	75	1.83E+05	1.67E+04	89 %
	50	1.20E+05	8.91E+03	87 %
	25	5.91E+04	2.56E+03	86 %
	10	1.97E+04	4.95E+03	72 %

Nadaljevanje priloge B: Prikaz točnosti metode PMA RT PCR za spodnje koncentracijsko območje pri *Lactobacillus acidophilus* LA-5

Vzorec	Koncentracija DNA [%]	Povprečno število bakterij znotraj posamezne redčitve	Deviacija znotraj posamezne redčitve	Delež izplena
BB6789	100	1.66E+03	3.27E+02	100 %
	75	1.30E+03	4.06E+01	105 %
	50	9.25E+02	2.05E+02	112 %
	25	4.27E+02	5.09E+02	103 %
	10	1.76E+02	4.88E+01	106 %

Vzorec	Koncentracija DNA [%]	Povprečno število bakterij znotraj posamezne redčitve	Deviacija znotraj posamezne redčitve	Delež izplena
AR7615	100	1.78E+03	3.90E+02	100 %
	75	1.31E+03	1.00E+03	98 %
	50	1.07E+03	8.86E+02	120 %
	25	3.61E+02	1.03E+02	81 %
	10	3.00E+02	0.00E+00	168 %

Vzorec	Koncentracija DNA [%]	Povprečno število bakterij znotraj posamezne redčitve	Deviacija znotraj posamezne redčitve	Delež izplena
BB6790	100	1.92E+03	5.38E+02	100 %
	75	1.10E+03	3.67E+02	76 %
	50	9.94E+02	2.93E+02	104 %
	25	4.15E+02	8.46E+01	87 %
	10	2.25E+02	8.23E+01	117 %

Vzorec	Koncentracija DNA [%]	Povprečno število bakterij znotraj posamezne redčitve	Deviacija znotraj posamezne redčitve	Delež izplena
AL0521	100	5.60E+03	9.91E+02	100 %
	75	3.94E+03	9.05E+02	94 %
	50	2.12E+03	3.74E+02	76 %
	25	1.02E+03	2.82E+02	73 %
	10	4.11E+02	2.82E+02	73 %

Vzorec	Koncentracija DNA [%]	Povprečno število bakterij znotraj posamezne redčitve	Deviacija znotraj posamezne redčitve	Delež izplena
BB8444	100	2.29E+03	6.64E+01	100 %
	75	1.20E+03	4.11E+01	70 %
	50	8.68E+02	6.33E+02	76 %
	25	3.31E+02	0.00E+00	58 %
	10	1.26E+02	0.00E+00	55 %

Nadaljevanje priloge B: Prikaz točnosti metode PMA RT PCR za zgornje koncentracijsko območje pri *Lactobacillus acidophilus* LA-5

Vzorec	Koncentracija DNA [%]	Povprečno število bakterij znotraj posamezne redčitve	Deviacija znotraj posamezne redčitve	Delež izplena
BB6789	100	2.20E+05	2.46E+04	100 %
	75	1.58E+05	8.76E+03	96 %
	50	9.95E+04	1.24E+04	91 %
	25	5.18E+04	6.50E+03	94 %
	10	2.47E+04	3.74E+03	112 %

Vzorec	Koncentracija DNA [%]	Povprečno število bakterij znotraj posamezne redčitve	Deviacija znotraj posamezne redčitve	Delež izplena
AR7615	100	6.19E+05	2.02E+04	100 %
	75	4.01E+05	4.05E+04	86 %
	50	3.10E+05	1.90E+04	100 %
	25	1.50E+05	8.31E+03	97 %
	10	5.39E+04	5.52E+03	87 %

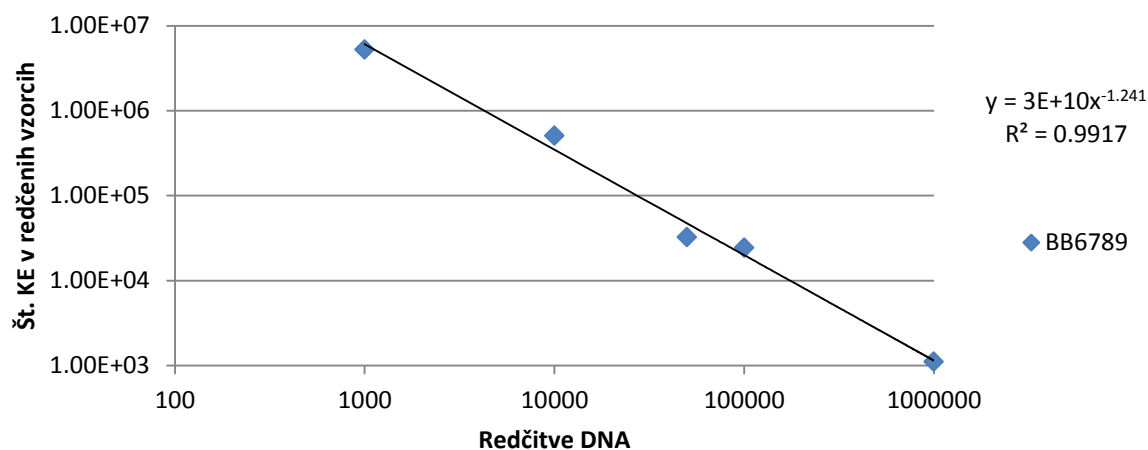
Vzorec	Koncentracija DNA [%]	Povprečno število bakterij znotraj posamezne redčitve	Deviacija znotraj posamezne redčitve	Delež izplena
BB6790	100	3.27E+05	3.24E+04	100 %
	75	3.02E+05	9.78E+03	123 %
	50	1.85E+05	1.59E+04	113 %
	25	9.19E+04	6.80E+03	112 %
	10	3.79E+04	4.96E+03	116 %

Vzorec	Koncentracija DNA [%]	Povprečno število bakterij znotraj posamezne redčitve	Deviacija znotraj posamezne redčitve	Delež izplena
AL0521	100	8.65E+05	5.57E+04	100 %
	75	6.29E+05	1.32E+04	97 %
	50	4.21E+05	5.25E+04	97 %
	25	2.29E+05	2.08E+04	106 %
	10	9.15E+04	3.04E+03	106 %

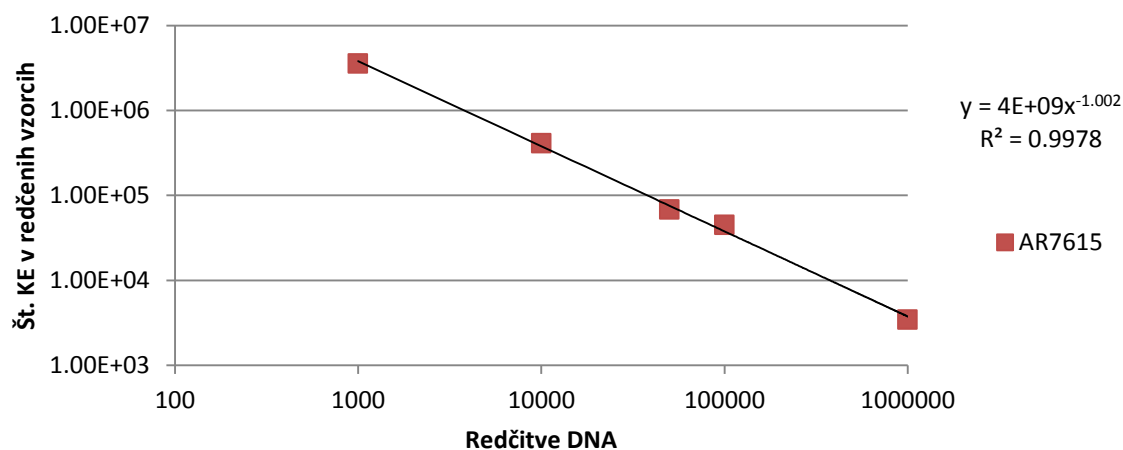
Vzorec	Koncentracija DNA [%]	Povprečno število bakterij znotraj posamezne redčitve	Deviacija znotraj posamezne redčitve	Delež izplena
BB8444	100	3.15E+05	7.66E+04	100 %
	75	2.34E+05	9.94E+03	99 %
	50	1.71E+05	1.82E+04	108 %
	25	8.40E+04	3.39E+03	107 %
	10	3.27E+04	6.84E+03	104 %

Priloga C: Prikaz linearnosti metode PMA RT PCR za bifidobakterije

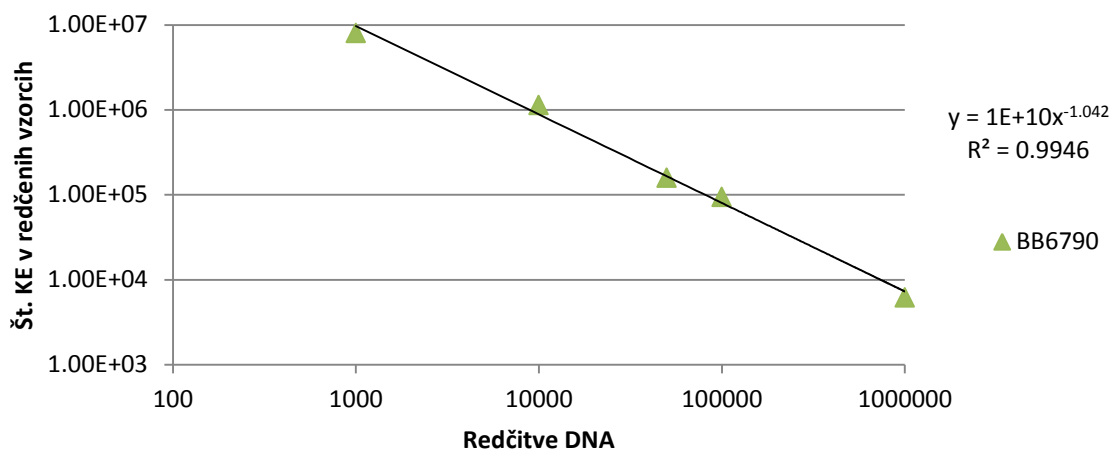
Vzorec	Redčitev	Povprečno število bakterij za posamezno redčitev	Deviacija znotraj posamezne redčitve
BB6789	1000	5.23E+06	5.09E+05
	10000	5.06E+05	2.18E+05
	50000	3.23E+04	1.15E+04
	100000	2.42E+04	7.86E+03
	1000000	1.10E+03	1.00E+03



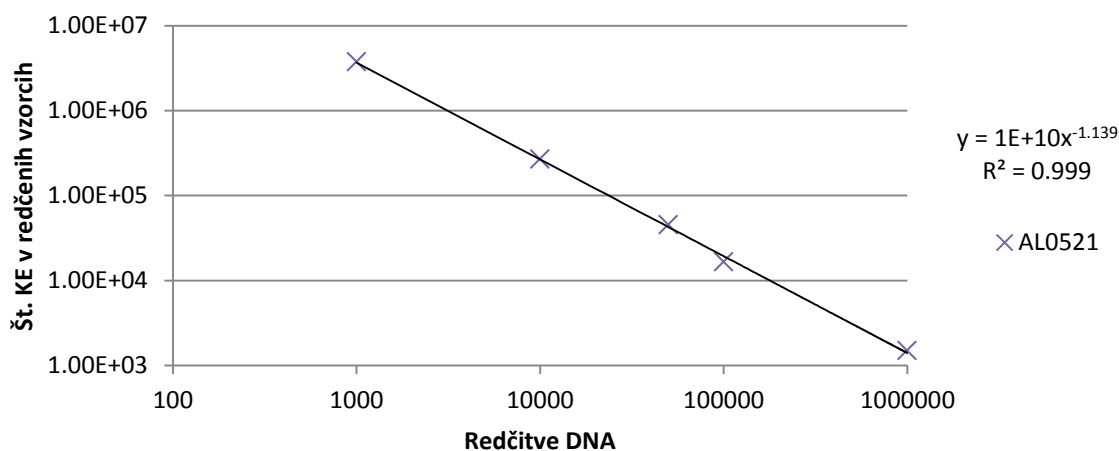
Vzorec	Redčitev	Povprečno število bakterij za posamezno redčitev	Deviacija znotraj posamezne redčitve
AR7615	1000	3.57E+06	1.54E+05
	10000	4.09E+05	6.93E+04
	50000	6.80E+04	1.69E+04
	100000	4.51E+04	7.90E+03
	1000000	3.45E+03	4.37E+03



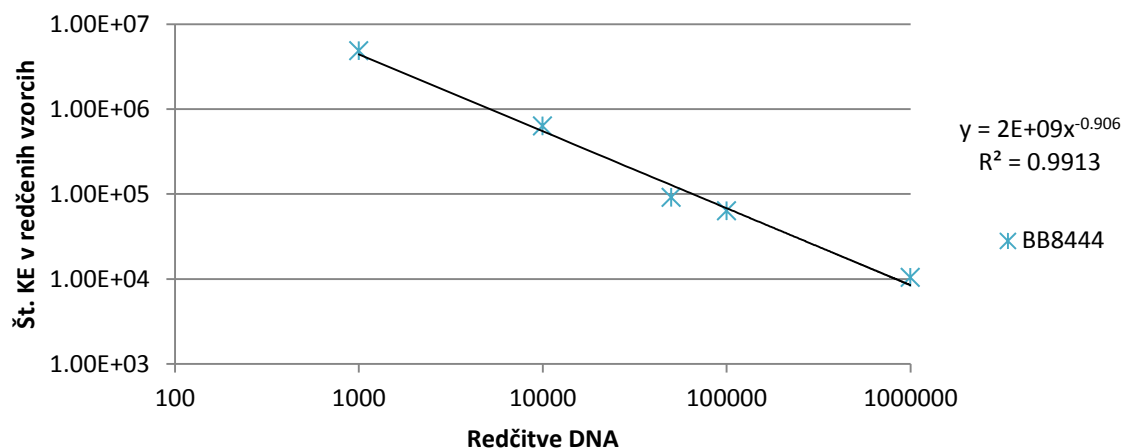
Vzorec	Redčitev	Povprečno število bakterij za posamezno redčitev	Deviacija znotraj posamezne redčitve
BB6790	1000	7.97E+06	1.51E+06
	10000	1.14E+06	2.33E+05
	50000	1.58E+05	3.01E+04
	100000	9.40E+04	2.74E+04
	1000000	6.19E+03	2.42E+03



Vzorec	Redčitev	Povprečno število bakterij za posamezno redčitev	Deviacija znotraj posamezne redčitve
AL0521	1000	3.74E+06	2.13E+05
	10000	2.69E+05	2.18E+05
	50000	4.54E+04	2.90E+03
	100000	1.66E+04	4.71E+03
	1000000	1.50E+03	2.41E+02

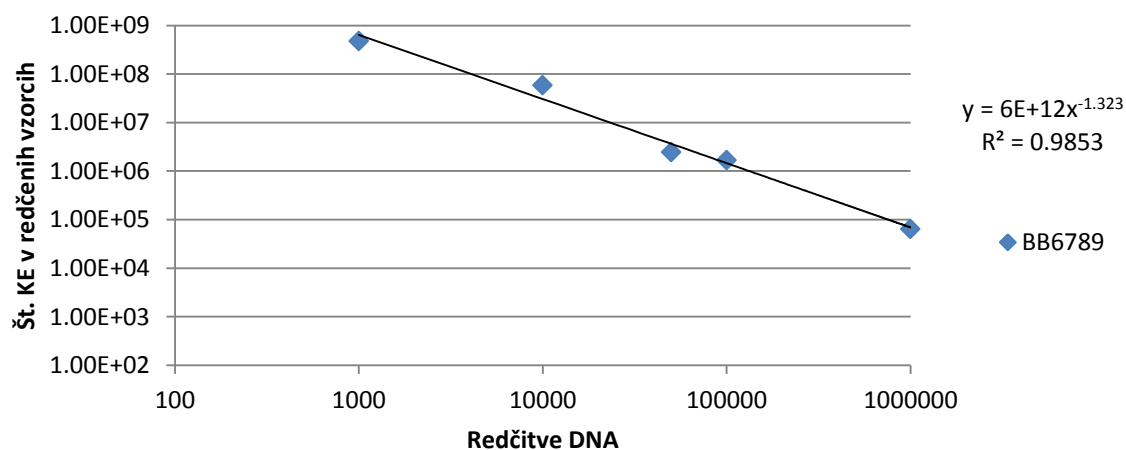


Vzorec	Redčitev	Povprečno število bakterij za posamezno redčitev	Deviacija znotraj posamezne redčitve
BB8444	1000	4.82E+06	4.30E+05
	10000	6.26E+05	1.74E+05
	50000	9.04E+04	1.80E+04
	100000	6.28E+04	2.69E+03
	1000000	1.04E+04	4.52E+03

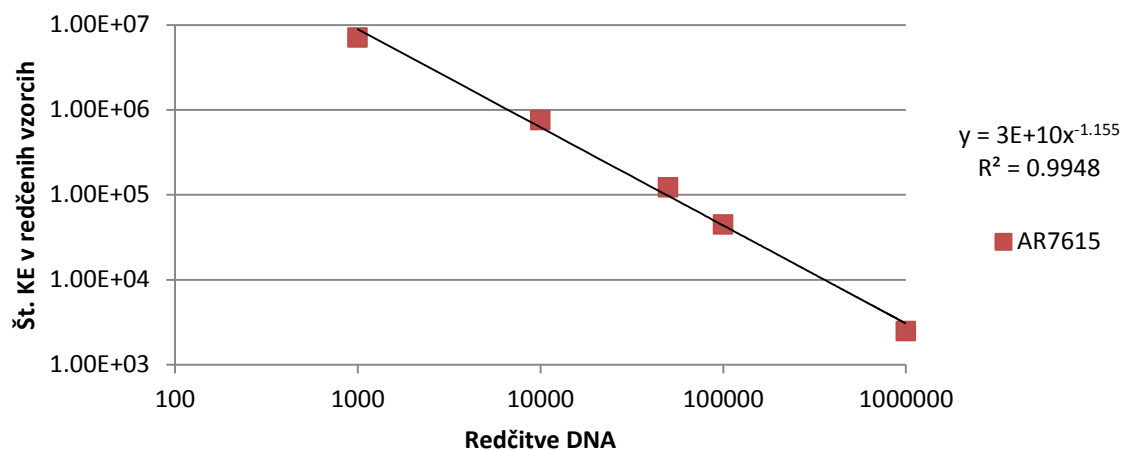


Nadaljevanje priloge C: Prikaz linearnosti metode PMA RT PCR za laktobacile

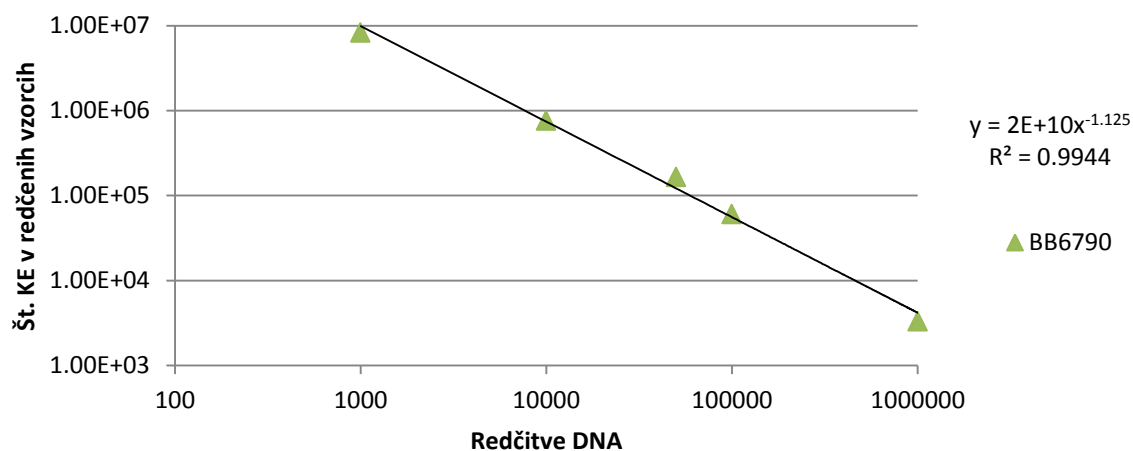
Vzorec	Redčitev	Povprečno število bakterij za posamezno redčitev	Deviacija znotraj posamezne redčitve
BB6789	1000	4.76E+08	1.51E+06
	10000	5.86E+07	8.45E+05
	50000	2.43E+06	1.00E+05
	100000	1.66E+06	4.79E+03
	1000000	6.43E+04	6.26E+01



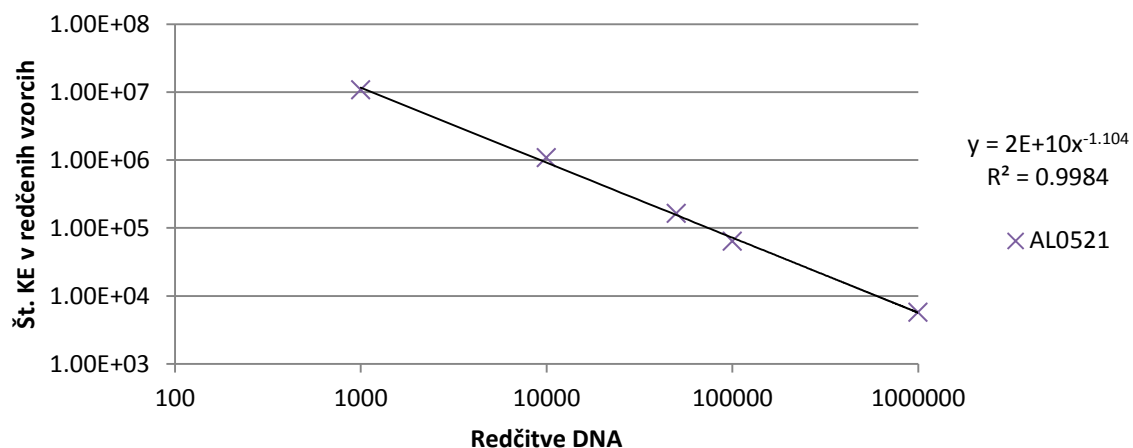
Vzorec	Redčitev	Povprečno število bakterij za posamezno redčitev	Deviacija znotraj posamezne redčitve
AR7615	1000	7.05E+06	7.13E+05
	10000	7.54E+05	2.91E+05
	50000	1.22E+05	1.20E+05
	100000	4.47E+04	6.16E+03
	1000000	2.48E+03	4.75E+02



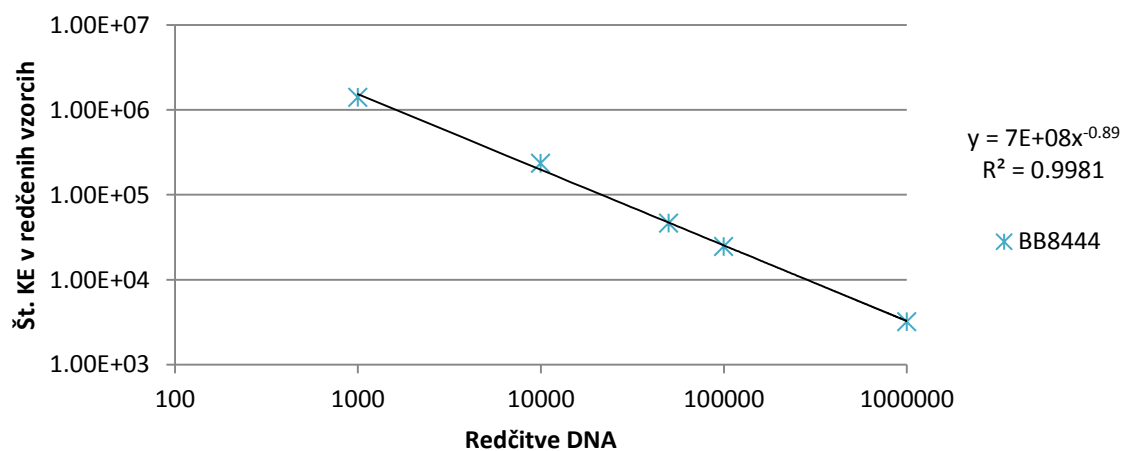
Vzorec	Redčitev	Povprečno število bakterij za posamezno redčitev	Deviacija znotraj posamezne redčitve
BB6790	1000	8.30E+06	5.83E+05
	10000	7.63E+05	1.89E+04
	50000	1.65E+05	7.43E+04
	100000	6.03E+04	3.82E+03
	1000000	3.30E+03	1.00E+02



Vzorec	Redčitev	Povprečno število bakterij za posamezno redčitev	Deviacija znotraj posamezne redčitve
AL0521	1000	1.07E+07	1.59E+06
	10000	1.07E+06	1.62E+05
	50000	1.63E+05	6.84E+03
	100000	6.33E+04	9.23E+03
	1000000	5.70E+03	1.10E+03



Vzorec	Redčitev	Povprečno število bakterij za posamezno redčitev	Deviacija znotraj posamezne redčitve
BB8444	1000	1.39E+06	2.99E+04
	10000	2.34E+05	5.38E+04
	50000	4.60E+04	9.01E+03
	100000	2.45E+04	5.04E+03
	1000000	3.19E+03	651



Priloga D: Rezultati specifičnosti metode PMA RT PCR pri bifidobakterijah

Delež bakterij v suspenziji	Ugotovljeno število bakterij (KE/g)	SD	Ugotovljeni delež živih bakterij (%)	Odstopanje od dejanskega deleža živih bakterij
100 %	1.24E+10	9.99E+08	100 %	0 %
75 %	1.01E+10	5.17E+07	81 %	6 %
50 %	7.60E+09	4.10E+08	61 %	11 %
25 %	3.76E+09	4.86E+07	30 %	5 %
0 %	1.56E+07	86.9	0 %	0 %

Delež bakterij v suspenziji	Ugotovljeno število bakterij (KE/g)	SD	Ugotovljeni delež živih bakterij (%)	Odstopanje od dejanskega deleža živih bakterij
100 %	1.18E+10	1.11E+09	100 %	0 %
75 %	9.31E+09	4.97E+08	79 %	4 %
50 %	7.20E+09	2.04E+08	61 %	11 %
25 %	3.48E+09	2.13E+08	30 %	5 %
0 %	2.19E+07	363	0 %	0 %

Delež bakterij v suspenziji	Ugotovljeno število bakterij (KE/g)	SD	Ugotovljeni delež živih bakterij (%)	Odstopanje od dejanskega deleža živih bakterij
100 %	4.05E+09	1.82E+08	100 %	0 %
75 %	3.54E+09	8.32E+07	87 %	12 %
50 %	2.25E+09	4.53E+07	55 %	5 %
25 %	1.13E+09	8.83E+07	28 %	3 %
0 %	0	0	0 %	0 %

Delež bakterij v suspenziji	Ugotovljeno število bakterij (KE/g)	SD	Ugotovljeni delež živih bakterij (%)	Odstopanje od dejanskega deleža živih bakterij
100 %	2.98E+09	8.96E+07	100 %	0 %
75 %	2.67E+09	1.91E+08	90 %	15 %
50 %	2.00E+09	2.84E+07	67 %	17 %
25 %	1.10E+09	5.65E+07	37 %	12 %
0 %	0	0	0 %	0 %

Delež bakterij v suspenziji	Ugotovljeno število bakterij (KE/g)	SD	Ugotovljeni delež živih bakterij (%)	Odstopanje od dejanskega deleža živih bakterij
100 %	3.90E+09	1.55E+08	100 %	0 %
75 %	2.75E+09	1.01E+08	71 %	-4 %
50 %	1.74E+09	2.73E+07	44 %	-6 %
25 %	1.03E+09	440	26 %	1 %
0 %	0	0	0 %	0 %

Nadaljevanje priloge D: Rezultati specifičnosti metode PMA RT PCR pri laktobacilih

Delež bakterij v suspenziji	Ugotovljeno število bakterij (KE/g)	SD	Ugotovljeni delež živih bakterij (%)	Odstopanje od dejanskega deleža živih bakterij
100 %	4.27E+09	1.40E+09	100 %	0 %
75 %	3.62E+09	2.37E+08	85 %	10 %
50 %	2.76E+09	1.07E+08	65 %	15 %
25 %	1.14E+09	1.31E+08	27 %	2 %
0 %	0	0	0 %	0 %

Delež bakterij v suspenziji	Ugotovljeno število bakterij (KE/g)	SD	Ugotovljeni delež živih bakterij (%)	Odstopanje od dejanskega deleža živih bakterij
100 %	4.15E+09	1.17E+09	100 %	0 %
75 %	3.45E+09	9.69E+08	83 %	8 %
50 %	2.73E+09	2.15E+08	66 %	16 %
25 %	1.35E+09	7.47E+07	33 %	8 %
0 %	0	0	0 %	0 %

Delež bakterij v suspenziji	Ugotovljeno število bakterij (KE/g)	SD	Ugotovljeni delež živih bakterij (%)	Odstopanje od dejanskega deleža živih bakterij
100 %	5.54E+09	1.63E+08	100 %	0 %
75 %	4.16E+09	3.50E+08	75 %	0 %
50 %	3.24E+09	2.91E+07	58 %	8 %
25 %	1.67E+09	6.51E+07	30 %	5 %
0 %	0	0	0 %	0 %

Delež bakterij v suspenziji	Ugotovljeno število bakterij (KE/g)	SD	Ugotovljeni delež živih bakterij (%)	Odstopanje od dejanskega deleža živih bakterij
100 %	4.53E+09	1.71E+08	100 %	0 %
75 %	3.98E+09	1.16E+08	88 %	13 %
50 %	3.27E+09	1.67E+08	72 %	22 %
25 %	1.74E+09	5.53E+07	38 %	13 %
0 %	0	0	0 %	0 %

Delež bakterij v suspenziji	Ugotovljeno število bakterij (KE/g)	SD	Ugotovljeni delež živih bakterij (%)	Odstopanje od dejanskega deleža živih bakterij
100 %	5.79E+09	1.47E+08	100 %	0 %
75 %	3.84E+09	1.73E+08	66 %	-9 %
50 %	2.74E+09	1.15E+08	47 %	-3 %
25 %	1.46E+09	6.75E+07	25 %	0 %
0 %	0	0	0 %	0 %

Priloga E: Rezultati ponovljivosti metode PMA RT PCR pri bifidobakterijah

Vzorec	Pon. 1 (KE/g)	Pon. 2 (KE/g)	Pon. 3 (KE/g)	Pon. 4 (KE/g)	Pon. 5 (KE/g)	Pon. 6 (KE/g)	Pon. 7 (KE/g)	Pon. 8 (KE/g)	Pon. 9 (KE/g)	Pon. 10 (KE/g)	SD	RSD (%)
BB6790	1.16E+10	6.31E+09	1.33E+10	1.16E+10	1.02E+10	8.54E+09	1.08E+10	9.42E+09	1.01E+10	1.11E+10	1.91E+09	19 %
AR7615	7.52E+09	1.06E+10	9.72E+09	1.02E+10	7.11E+09	6.25E+09	7.48E+09	6.57E+09	9.15E+09	7.18E+09	1.59E+09	19 %
AL0521	6.92E+09	8.66E+09	5.99E+09	5.93E+09	9.46E+09	7.10E+09	8.34E+09	7.12E+09	7.82E+09	9.78E+09	1.34E+09	17 %
AR7527	1.28E+10	1.15E+10	4.89E+09	1.10E+10	1.03E+10	7.36E+09	8.53E+09	7.21E+09	6.31E+09	8.00E+09	2.52E+09	29 %
AL0522	5.53E+09	6.85E+09	1.04E+10	4.61E+09	7.54E+09	6.01E+09	7.69E+09	6.18E+09	5.93E+09	7.52E+09	1.60E+09	23 %

Nadaljevanje priloge E: Rezultati ponovljivosti metode PMA RT PCR pri laktobacilih

Vzorec	Pon. 1 (KE/g)	Pon. 2 (KE/g)	Pon. 3 (KE/g)	Pon. 4 (KE/g)	Pon. 5 (KE/g)	Pon. 6 (KE/g)	Pon. 7 (KE/g)	Pon. 8 (KE/g)	Pon. 9 (KE/g)	Pon. 10 (KE/g)	SD	RSD (%)
BB6790	4.27E+09	3.06E+09	3.30E+09	6.30E+09	3.71E+09	3.58E+09	4.81E+09	3.67E+09	3.27E+09	8.13E+09	1.62E+09	37 %
AR7615	5.19E+09	5.15E+09	5.01E+09	9.65E+09	5.35E+09	7.35E+09	5.47E+09	5.93E+09	5.39E+09	6.84E+09	1.46E+09	24 %
AL0521	1.18E+10	8.40E+09	8.72E+09	8.16E+09	7.63E+09	9.17E+09	8.82E+09	8.64E+09	8.35E+09	1.08E+10	1.28E+09	14 %
AR7527	8.87E+09	6.45E+09	4.87E+09	9.08E+09	5.79E+09	5.37E+09	6.28E+09	5.14E+09	4.81E+09	6.03E+09	1.53E+09	24 %
AL0522	5.64E+09	4.83E+09	5.85E+09	9.62E+09	7.11E+09	7.22E+09	7.48E+09	5.61E+09	6.01E+09	7.65E+09	1.39E+09	21 %

Priloga F: Primerjava rezultatov dobljenih z neposredno oziroma posredno metodo štetja v točki T1 pri bifidobakterijah

Rezultati štetja na petrijevih ploščah

Vzorec	par.	TOS gojišče			
		10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	Izračun
<i>B. animalis</i>	A	N	65	10	$7,45 \times 10^8$
	B	N	78	11	celic/mL

Vzorec	par.	MRS gojišče			
		10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	Izračun
<i>B. animalis</i>	A	N	98	7	$8,68 \times 10^8$
	B	N	78	8	celic/mL

Rezultati štetja s Petroff-Hausserjevo števno komoro

Ponovitev	Epica A redčitev 10^{-1}		Epica B redčitev 10^{-1}	
	1	2	1	2
	51	73	34	78
	58	69	53	60
	59	70	59	63
	48	60	46	64
	57	64	59	73
	52	69	64	64
	53	63	46	63
	45	57	53	82
	34	66	49	68
	59	63	58	66

Povprečje	51,6	65,4
-----------	------	------

52,1	68,1
------	------

Izračun	$7,41 \times 10^8$ celic/mL
---------	-----------------------------

Nadaljevanje priloge F: Primerjava rezultatov dobljenih z neposredno oziroma posredno metodo štetja v točki T2 pri bifidobakterijah

Rezultati štetja na petrijevih ploščah

Vzorec	par.	TOS gojišče			
		10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	Izračun
<i>B. animalis</i>	A	290	20	2	$2,71 \times 10^9$ celic/mL
	B	255	29	5	

Vzorec	par.	MRS gojišče			
		10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	Izračun
<i>B. animalis</i>	A	206	27	1	$2,24 \times 10^9$ celic/mL
	B	240	19	5	

Rezultati štetja s Petroff-Hausserjevo števno komoro

Ponovitev	Epica A redčitev 10^{-2}		Epica B redčitev 10^{-2}	
	1	2	1	2
	16	14	14	13
	14	14	14	12
	22	16	8	14
	20	11	12	14
	11	10	11	13
	25	9	11	19
	24	13	15	11
	18	13	21	12
	12	11	13	11
	15	16	10	16
Povprečje	17,7	12,7	12,9	13,5

Izračun	$1,78 \times 10^9$ celic/mL
---------	-----------------------------