

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Janja KOCJAN

**SELEKTIVNOST GOJIŠČ ZA UGOTAVLJANJE
ŠTEVILA LAKTOBACILOV V PROBIOTIČNIH
IZDELKIH**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Janja KOCJAN

**SELEKTIVNOST GOJIŠČ ZA UGOTAVLJANJE ŠTEVILA
LAKTOBACILOV V PROBIOTIČNIH IZDELKIH**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**MEDIA SELECTIVITY FOR THE ENUMERATION OF
LACTOBACILLI IN PROBIOTIC PRODUCTS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2015

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Raziskovalno delo je bilo opravljeno v laboratoriju Katedre za mlekarstvo, Oddelka za zootehniko, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Za mentorico diplomskega dela je imenovana doc. dr. Andreja Čanžek Majhenič, za somentorico izr. prof. dr. Barbara Jeršek in za recenzentko izr. prof. dr. Polona Jamnik.

Mentorica: doc. dr. Andreja Čanžek Majhenič

Somentorica: izr. prof. dr. Barbara Jeršek

Recenzentka: izr. prof. dr. Polona Jamnik

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno nemejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Janja Kocjan

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.24.083.1:579.86 (043)=163.6
KG	probiotične bakterije/rod <i>Lactobacillus</i> /probiotični mlečni izdelki/probiotična prehranska dopolnila/gojitvene metode/gojišča/selektivnost gojišč/molekularne tehnike/metoda PCR
AV	KOCJAN, Janja
SA	ČANŽEK MAJHENIČ, Andreja (mentorica)/JERŠEK, Barbara (somentorica)/JAMNIK, Polona (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2015
IN	SELEKTIVNOST GOJIŠČ ZA UGOTAVLJANJE ŠTEVILA LAKTOBACILOV V PROBIOTIČNIH IZDELKIH
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XII, 90 str., 22 pregl., 18 sl., 2 pril., 77 vir.
IJ	sl
JJ	sl/en
AI	Mlečnokislinske bakterije (MKB) in bifidobakterije so najpomembnejši predstavniki probiotičnih kultur, zato jih tudi najpogosteje najdemo v probiotičnih živilih ali pripravkih kot so mlečni izdelki ali prehranska dopolnila. Preverjanje njihovega števila v teh izdelkih je ključnega pomena, saj le ob zaužitju v zadostnih količinah lahko s pozitivnimi učinki delujejo na zdravje gostitelja. Ker pa so v probiotičnih izdelkih največkrat zastopani dve ali več različnih probiotičnih kultur, ki so si med seboj zelo sorodne, je izbira primerne selektivne metode za ugotavljanje velikosti populacije posameznega mikroorganizma ključnega pomena. V nalogi smo analizirali štiri probiotična prehranska dopolnila in pet probiotičnih mlečnih izdelkov, ki so poleg laktobacilov vsebovali še druge probiotične bakterije. Za selektivno rast laktobacilov iz analiziranih izdelkov smo uporabili tehniko razmaza na trdna gojišča, pri čemer smo iz literaturnih podatkov in komercialne dostopnosti izbrali gojitvena oz. selektivna gojišča za laktobacile kot so MRS, M-MRS (modificirano gojišče MRS z maltozo), MRS-ŽS (MRS z žolčnimi solmi), Rogosa, LAMVAB (MRS z dodanim vankomicinom in bromkrezol zelenim), LAMVAB-ZKV (LAMVAB z znižano koncentracijo vankomicina), LAC (MRS s ciprofloksacinom in klindamicinom). Po inkubaciji cepljenih plošč pri ustrezni temperaturi in v različnih atmosferskih razmerah, smo selektivnost posameznega gojišča za laktobacile ugotavljali z identifikacijo zraslih kolonij z barvanjem po Gramu in z metodo PCR z za rod specifičnimi začetnimi oligonukleotidi za bakterije rodov <i>Lactobacillus</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Lactococcus</i> , ter za bakterije vrste <i>Lb. acidophilus</i> . Na podlagi naših rezultatov smo zaključili, da sta za selektivno rast laktobacilov iz mešanih kultur, bodisi iz probiotičnih prehranskih dopolnil ali probiotičnih mlečnih izdelkov, najprimernejši gojišči LAC in LAMVAB-ZKV. Uporabo gojišča LAC priporočamo za selektivno rast skupine <i>Lb. acidophilus</i> . V primeru, da so v analiziranem izdelku prisotni <i>Lb. salivarius</i> ali bakterije iz skupine <i>Lb. casei</i> pa je bolj primerno gojišče LAMVAB-ZKV. Za gojišče MRS smo, kljub pogostim literaturnim navedbam o njegovi selektivnosti za laktobacile, potrdili njegovo uporabnost predvsem kot gojitvenega in ne selektivnega gojišča, manjšo selektivnost od pričakovane pa je izkazalo tudi gojišče Rogosa. Glede na rezultate naše analize lahko zaključimo, da tudi gojišči M-MRS in MRS-ŽS ne izkazujejo ustrezne selektivnosti za rast laktobacilov iz probiotičnih izdelkov.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
 DC UDC 579.24.083.1:579.86 (043)=163.6
 CX probiotic bacteria/genus *Lactobacillus*/ probiotic dairy products/probiotic nutritional supplements/culture dependent methods/media/selectivity of the media/molecular techniques/ PCR method
 AU KOCJAN, Janja
 AA ČANŽEK MAJHENIČ, Andreja (supervisor)/JERŠEK, Barbara (co-advisor)/JAMNIK, Polona (reviewer)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
 PY 2015
 TI MEDIA SELECTIVITY FOR THE ENUMERATION OF LACTOBACILLI IN PROBIOTIC PRODUCTS
 DT Graduation Thesis (University studies)
 NO XII, 90 p., 22 tab., 18 fig., 2 ann., 77 ref.
 LA Sl
 AL sl/en
 AB Lactic acid bacteria (LAB) and bifidobacteria are of the most important among probiotic cultures, therefore they are commonly found in probiotic foods or products such as dairy products or food supplements. To determine their counts in these products is of crucial importance, because only when ingested in sufficient quantities they can positively affect the health of the host. However, since the probiotic products usually contain two or more probiotic bacteria that are closely related, the use of an appropriate selective method is of the greatest significance. In the present study four probiotic food supplements and five probiotic dairy products were analyzed, that contained lactobacilli along with other probiotic bacteria. For selective outgrowth of lactobacilli from analyzed products the surface inoculation method was used, where according to literature data and commercial accessibility cultivable or selective media for lactobacilli such as MRS, M-MRS (MRS modified with maltose), MRS-ŽS (MRS with bile salts), Rogosa, LAMVAB (MRS with Vancomycin and Bromcresol green), LAMVAB-ZKV (LAMVAB with reduced concentration of vankomycin) and LAC (MRS with ciprofloxacin and clindamycin) were selected. After incubation of surface inoculated plates at appropriate temperature and under different atmospheric conditions the selectivity of each medium for lactobacilli was evaluated by Gram staining and PCR methods of outgrown colonies. Genera-specific primers for bacteria genera *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*. and species-specific primers for bacteria species *Lb. acidophilus* were used. Based on our results LAC and LAMVAB-ZKV media are highly recommended for selective outgrowth of lactobacilli from mixed cultures, either from probiotic food supplements or probiotic dairy products. The LAC medium is recommended for the selective outgrowth of *Lb. acidophilus* group. If analyzed product contains *Lb. salivarius* or bacteria from *Lb. casei* group, the use of LAMVAB-ZKV medium is most appropriate. Although some literature data classify MRS as selective medium for lactobacilli, it was proven to be more as cultivating than selective medium. Also Rogosa medium proved lower selectivity as was expected. It was also concluded that M-MRS and MRS-ŽS media did not demonstrate appropriate selectivity for lactobacilli outgrowth from probiotic products.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 CILJI NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 GOJIŠČA.....	3
2.1.1 Definicija gojišča.....	3
2.1.2 Vrste gojišč	3
2.2 GOJIŠČA ZA LAKTOBACILE	3
2.2.1 Osnovna gojišča	4
2.2.1.1 MRS.....	4
2.2.2 Specialna gojišča	5
2.2.3 Selektivna gojišča.....	6
2.2.3.1 M-MRS.....	6
2.2.3.2 MRS-ŽS.....	7
2.2.3.3 Rogosa	7
2.2.3.4 LAMVAB.....	8
2.2.3.5 LAC	9
2.2.3.6 M-17	9
2.2.4 Ostala gojišča	10
2.3 PROBIOTIČNE BAKTERIJE	10
2.3.1 Definicija probiotikov	11
2.3.2 Oblike probiotikov na tržišču.....	11
2.3.3 Označevanje probiotičnih izdelkov.....	12
2.3.4 Kriteriji za izbiro probiotičnih sevov.....	13
2.3.4.1 Varnostni vidik	13
2.3.4.2 Funkcionalni vidik.....	13
2.3.4.3 Tehnološki vidik	14
2.3.5 Bakterijska odpornost proti antibiotikom	14
2.3.6 Rod <i>Lactobacillus</i>	15
2.3.7 Rod <i>Bifidobacterium</i>	16
2.3.8 Rod <i>Enterococcus</i>	16
2.3.9 Rod <i>Lactococcus</i>	16
2.3.10 Rod <i>Streptococcus</i>	16
2.4 METODE SELEKCIJE IN IDENTIFIKACIJE BAKTERIJ RODU <i>Lactobacillus</i>	16
2.4.1 Klasične gojitvene metode	17
2.4.2 Metoda barvanja po Gramu.....	17

2.4.3 Metoda PCR	17
2.4.3.1 Priprava DNA	18
2.4.3.2 Princip metode PCR	18
3 MATERIAL IN METODE	20
3.1 NAČRT POSKUSA	20
3.2 MATERIAL	22
3.2.1 Bakterijski sevi	22
3.2.1.1 Bakterijski sevi, uporabljeni kot pozitivne kontrole v metodi PCR	23
3.2.2 Probiotična prehranska dopolnila	23
3.2.3 Probiotični mlečni izdelki	24
3.2.4 Trdna gojišča in dodatki	25
3.2.4.1 Trdna gojišča	25
3.2.4.1.1 MRS	25
3.2.4.1.2 M-MRS	25
3.2.4.1.3 MRS-ŽS	26
3.2.4.1.4 Rogosa	26
3.2.4.1.5 LAMVAB	26
3.2.4.1.6 LAMVAB-ZKV	26
3.2.4.1.7 LAC	26
3.2.4.1.8 M-17	27
3.2.4.2 Dodatki	27
3.2.4.2.1 Založna raztopina ciprofloksacina	27
3.2.4.2.2 Založna raztopina klindamicina	27
3.2.4.2.3 Založna raztopina vankomicina	27
3.2.4.2.4 Založna raztopina žolčnih soli	27
3.2.5 Tekoče gojišče	28
3.2.5.1 MRS	28
3.2.6 Raztopini za razredčevanje	28
3.2.6.1 Ringerjeva raztopina	28
3.2.6.2 Natrijev citrat	28
3.2.7 Reagenti za barvanje po Gramu	28
3.2.8 Reagent za osamitev DNA na osnovi kolonije	28
3.2.9 Reagenti za metodo PCR	28
3.2.10 Reagenti za gelsko elektroforezo	29
3.2.10.1 Reagenti za analizo pomnožkov z gelsko elektroforezo	29
3.2.10.2 Pufer TAE (tris acetatni pufer)	29
3.3 LABORATORIJSKA OPREMA	29
3.4 METODE	30
3.4.1 Priprava bakterijskih sevov, vzorcev prehranskih dopolnil in mlečnih izdelkov in kvantifikacija bakterij z metodo štetja kolonij na trdnem gojišču	30
3.4.1.1 Bakterijski sevi	31
3.4.1.2 Probiotična prehranska dopolnila	31
3.4.1.3 Probiotični mlečni izdelki	31
3.4.2 Ugotavljanje morfoloških lastnosti laktobacilov	33
3.4.3 Metoda PCR	34
3.4.3.1 Osamitev DNA iz kolonij	34
3.4.3.2 Priprava reakcijske mešanice	34

3.4.3.3 Časovno temperaturni potek metode PCR	36
3.4.3.4 Analiza pomnožkov z agarozno gelsko elektroforezo.....	37
3.4.3.5 Priprava agaroznega gela.....	37
3.4.3.6 Potek agarozne gelske elektroforeze	38
3.4.4 Statistična obdelava podatkov	38
4 REZULTATI.....	39
4.1 UGOTAVLJANJE RASTI BAKTERIJSKIH ČISTIH KULTUR NA RAZLIČNIH GOJIŠČIH	39
4.1.1 Opis in kvantifikacija rasti	39
4.1.2 Izbira gojišč za izolacijo laktobacilov	48
4.2 MIKROBIOLOŠKE PREISKAVE PREHRANSKIH DOPOLNIL IN MLEČNIH IZDELKOV TER IDENTIFIKACIJA IZOLATOV Z METODO PCR.....	49
4.2.1 Prehranska dopolnila	49
4.2.1.1 BioGaia®	49
4.2.1.2 Yogermina®	51
4.2.1.3 Waya AB®	54
4.2.1.4 Waya AD®	55
4.2.2 Mlečni izdelki	58
4.2.2.1 Fermentirano mleko Ego	58
4.2.2.2 Jogurt LGG.....	60
4.2.2.3 Napitek LCA	63
4.2.2.4 Skuta Spar Vital.....	66
4.2.2.5 Sir LCA	67
4.2.3 Ocena selektivnosti gojišč in razmer pri njihovi inkubaciji	71
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	72
5.1 RAZPRAVA.....	72
5.1.1 Primerjava selektivnosti gojišč za čiste kulture in laktobacile iz probiotičnih izdelkov	72
5.1.1.1 MRS.....	73
5.1.1.2 M-MRS.....	73
5.1.1.3 MRS-ŽS.....	74
5.1.1.4 Rogosa	75
5.1.1.5 LAMVAB in LAMVAB-ZKV	75
5.1.1.6 LAC	77
5.1.1.7 M-17	77
5.1.2 Vsebnost probiotičnih kultur v izdelkih	78
5.2 PRIPOROČILA ZA IZBIRO NAJPRIMERNEJŠEGA SELEKTIVNEGA GOJIŠČA ZA OSAMITEV LAKTOBACILOV IZ RAZLIČNIH PROBIOTIČNIH IZDELKOV IN OCENA UPORABNOSTI KLASIČNIH MIKROBIOLOŠKIH METOD.....	78
5.3 SKLEPI.....	81
6 POVZETEK.....	82
7 VIRI	84
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Sevi laktobacilov, ki se pogosto uporabljajo v probiotičnih izdelkih, in smo jih uporabili pri določitvi selektivnosti gojišč.	22
Preglednica 2: Sevi drugih bakterijskih vrst, ki se pogosto uporabljajo v probiotičnih izdelkih, in smo jih uporabili pri določitvi selektivnosti gojišč.	22
Preglednica 3: Analizirana prehranska dopolnila.	23
Preglednica 4: Analizirani mlečni izdelki.	24
Preglednica 5: Trdna gojišča.	25
Preglednica 6: Začetni oligonukleotidi, specifični za posamezen bakterijski rod oz. vrsto.	29
Preglednica 7: Gojišča in razmere inkubacije čistih bakterijskih kultur ter cepljenih prehranskih dopolnil in mlečnih izdelkov.	33
Preglednica 8: Sestava 20 µl reakcijske mešanice za metodo PCR.	35
Preglednica 9: Razmere metode PCR, uporabljene za določanje posameznega rodu oz. vrste.	37
Preglednica 10: Kvantifikacija sevov bakterij rodu <i>Lactobacillus</i> na različnih gojiščih. ...	41
Preglednica 11: Povprečno število bakterij rodu <i>Lactobacillus</i> zraslih na različnih gojiščih.	43
Preglednica 12: Kvantifikacija sevov bakterij rodu <i>Bifidobacterium</i> na različnih gojiščih.	45
Preglednica 13: Kvantifikacija sevov bakterij rodov <i>Enterococcus</i> , <i>Lactococcus</i> in <i>Streptococcus</i> na različnih gojiščih.	47
Preglednica 14: Kvantifikacija bakterij, osamljenih iz prehranskega dopolnila BioGaia® in identifikacija izbranih kolonij z metodo PCR.	50
Preglednica 15: Kvantifikacija bakterij, osamljenih iz prehranskega dopolnila Yogermina® in identifikacija izbranih kolonij z metodo PCR.	52
Preglednica 16: Kvantifikacija bakterij, osamljenih iz prehranskega dopolnila Waya AB® in identifikacija izbranih kolonij z metodo PCR.	54
Preglednica 17: Kvantifikacija bakterij, osamljenih iz prehranskega dopolnila Waya AD® in identifikacija izbranih kolonij z metodo PCR.	56
Preglednica 18: Kvantifikacija bakterij, osamljenih iz fermentiranega mleka Ego in identifikacija izbranih kolonij z metodo PCR.	58
Preglednica 19: Kvantifikacija bakterij, osamljenih iz jogurta LGG in identifikacija izbranih kolonij z metodo PCR.	61
Preglednica 20: Kvantifikacija bakterij, osamljenih iz napitka LCA in identifikacija izbranih kolonij z metodo PCR.	63
Preglednica 21: Kvantifikacija bakterij, osamljenih iz skute Spar Vital in identifikacija izbranih kolonij z metodo PCR.	66
Preglednica 22: Kvantifikacija bakterij, osamljenih iz sira LCA in identifikacija izbranih kolonij z metodo PCR po inkubaciji pri 30 °C in 37 °C.	68

KAZALO SLIK

Slika 1: Shema poteka raziskovalnega dela.....	21
Slika 2: Analizirana prehranska dopolnila (foto: Kocjan J.).	24
Slika 3: Analizirani mlečni izdelki (foto: Kocjan J.).	25
Slika 4: Aseptična priprava vzorca sira LCA (A) in homogenizacija vzorca sira LCA (B).	32
Slika 5: Notranjost inkubatorja in anaerobne razmere z uporabo GENbox-a ter vrečk za zagotavljanje anaerobnih razmer.	32
Slika 6: Komora za pripravo reakcijske mešanice za metodo PCR.	34
Slika 7: Mikroepruvete z reakcijsko mešanico.	35
Slika 8: Ciklični termostat za izvedbo metode PCR.	36
Slika 9: Agarozna gelska elektroforeza (A) in barvanje gela z barvilom SYBR® Safe (B).	38
Slika 10: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov bakterij, osamljenih iz prehranskega dopolnila BioGaia®, pomnoženih z začetnima oligonukleotidoma, specifičnima za rod <i>Lactobacillus</i> , (A): gel 1, (B): gel 2.....	51
Slika 11: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov bakterij, osamljenih iz prehranskega dopolnila Yogermina®, pomnoženih z začetnima oligonukleotidoma, specifičnima za rod <i>Lactobacillus</i> , (A): gel 1, (B): gel 2, in specifičnima za rod <i>Bifidobacterium</i> (C): gel 3....	53
Slika 12: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov bakterij, osamljenih iz prehranskega dopolnila Waya AB®, pomnoženih z začetnima oligonukleotidoma, specifičnima za rod <i>Enterococcus</i> , (A): gel 1.....	55
Slika 13: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov bakterij, osamljenih iz prehranskega dopolnila Waya AD®, pomnoženih z začetnima oligonukleotidoma, specifičnima za rod <i>Lactobacillus</i> , (A): gel 1, (B): gel 2, (C): gel 3, (D): gel 4.....	57
Slika 14: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov bakterij, osamljenih iz fermentiranega mleka Ego, pomnoženih z začetnima oligonukleotidoma, specifičnima za rod <i>Lactobacillus</i> , (A): gel 1, specifičnima za vrsto <i>Lactobacillus acidophilus</i> , (B): gel 2, in specifičnima za rod <i>Bifidobacterium</i> , (C): gel 3.....	60
Slika 15: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov bakterij, osamljenih iz jogurta LGG, pomnoženih z začetnima oligonukleotidoma, specifičnima za rod <i>Lactobacillus</i> , (A): gel 1, (B): gel 2, (C): gel 3.	62
Slika 16: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov bakterij, osamljenih iz napitka LCA, pomnoženih z začetnima oligonukleotidoma, specifičnima za rod <i>Lactobacillus</i> , (A): gel 1, (B): gel 2.....	65
Slika 17: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov bakterij, osamljenih iz skute Spar Vital, pomnoženih z začetnima oligonukleotidoma, specifičnima za rod <i>Lactobacillus</i> , (A): gel 1, (B): gel 2.....	67
Slika 18: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov bakterij, osamljenih iz sira LCA, pomnoženih z začetnima oligonukleotidoma, specifičnima za rod <i>Lactobacillus</i> , (A): gel 1 po inkubaciji gojišč pri 37 °C, (B): gel 2 po inkubaciji gojišč pri 37 °C, (C): gel 1 po inkubaciji gojišč pri 30 °C, (D): gel 2 po inkubaciji gojišč pri 30 °C.	70

KAZALO PRILOG

Priloga A: Barvni preparati bakterij, osamljenih iz prehranskih dopolnil BioGaia® (1), Yogermina® (2), Waya AB® (3) in Waya AD® (4), pri 1000x povečavi.

Priloga B: Barvni preparati bakterij, osamljenih iz mlečnega izdelka fermentirano mleko Ego (1), jogurta LGG (2), napitka LCA (3), skute Spar Vital (4) in sira LCA (5), pri 1000x povečavi.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Okrajšava ali simbol	Pomen
APT	gojišče APT (angl. All Purpose Tween)
<i>B.</i>	<i>Bifidobacterium</i>
Bb-12	sev <i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i> Bb-12
bp	bazni par
DNA	deoksiribonukleinska kislina
<i>E.</i>	<i>Enterococcus</i>
FAO	Organizacija za prehrano in kmetijstvo (angl. Food and Agriculture Organization)
GG	sev <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG
GRAS	splošno priznan kot varen (angl. Generally Recognized as Safe)
H ₂ O _{PCR}	mikrofiltrirana (miliQ) in avtoklavirana voda
IML PRO	Inštitut za mlekarstvo in probiotike, Biotehniška fakulteta, Domžale, Slovenija
kb	kilobazni par
KE	število kolonijskih enot
LAC	gojišče MRS s ciprofloksacinom in klindamicinom
LAC anaerobno	gojišče LAC, inkubirano v anaerobnih razmerah
LAMVAB	gojišče MRS za laktobacile, z dodanim vankomicinom in bromkrezol zelenim (angl. <i>Lactobacillus</i> Anaerobic MRS with Vancomycin and Bromocresol green)
LAMVAB anaerobno	gojišče LAMVAB, inkubirano v anaerobnih razmerah
LAMVAB-ZKV	gojišče LAMVAB z znižano koncentracijo vankomicina
LAMVAB-ZKV anaerobno	gojišče LAMVAB ZKV, inkubirano v anaerobnih razmerah
La-5	sev <i>Lactobacillus acidophilus</i> La-5
<i>Lb.</i>	<i>Lactobacillus</i>
LC	selektivno gojišče za vrsto <i>Lb. casei</i>
<i>Lc.</i>	<i>Lactococcus</i>
M-17	obogateno gojišče za koke
M-17 anaerobno	gojišče M-17, inkubirano v anaerobnih razmerah
MKB	mlečnokislinske bakterije
MRS	gojišče po De Man, Rogosa in Sharpe
MRS aerobno	gojišče MRS, inkubirano v aerobnih razmerah
MRS anaerobno	gojišče MRS, inkubirano v anaerobnih razmerah
MRS-AC	gojišče MRS z znižano vrednostjo pH z očetno kislino
M-MRS	modificirano gojišče MRS z maltozo
M-MRS aerobno	gojišče M-MRS, inkubirano v aerobnih razmerah
M-MRS anaerobno	gojišče M-MRS, inkubirano v anaerobnih razmerah
MRS-ŽS	gojišče MRS z žolčnimi solmi
MRS-ŽS anaerobno	gojišče MRS-ŽS, inkubirano v anaerobnih razmerah
N	povprečno število
NA-salicin	hranljivo gojišče s salicinom
metoda PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. Polymerase Chain Reaction)
RCABC	gojišče z vrednostjo pH 5,5, bromkrezol zelenim in klindamicinom (angl. reinforced clostridium agar with bromocresol green and clindamycin)
RCABV	gojišče z vrednostjo pH 5,5, bromkrezol zelenim in vankomicinom (angl. reinforced clostridium agar with bromocresol green and vancomycin)

Rogosa	selektivno gojišče za laktobacile (angl.: <i>Lactobacillus</i> selective agar)
Rogosa aerobno	gojišče Rogosa, inkubirano v aerobnih razmerah
Rogosa anaerobno	gojišče Rogosa, inkubirano v anaerobnih razmerah
SD	standardna deviacija
sp.	vrsta (angl. species)
ssp.	podvrsta (angl. subspecies)
Str.	<i>Streptococcus</i>
TAE	tris acetatni EDTA pufer
T-MRS	modificirano gojišče MRS s trehalozo
U/ μ l	enota za specifično aktivnost encima (1 μ mol/min/ μ l)
VBNC	žive, a ne kultivabilne kolonije (angl. viable but not culturable)
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija (angl. World Health Organization)

1 UVOD

Bakterije rodov *Lactobacillus* in *Bifidobacterium* so najpomembnejše probiotične kulture. Njihov prvotni življenjski prostor je črevo zdravega človeka, kjer predstavljajo del zelo kompleksne in raznolike mikrobne združbe (Smole Možina in Jeršek, 2001).

Dokazi, da je mikrobiota prebavnega trakta pri človeku pomemben del intestinalne imunološke in neimunološke obrambe, so osnova koncepta probiotikov. Definicija probiotikov, ki sta jo povzeli tudi FAO (angl. Food and Agriculture Organization) in WHO (angl. World Health Organization) pravi, da so probiotiki živi mikroorganizmi, ki zaužiti v zadostnih količinah koristno učinkujejo na zdravje gostitelja, pri čemer je pomembno, da je učinke možno znanstveno dokazati (FAO/WHO, 2002).

Izraz »probiotik« izhaja iz grškega izraza »pro bios«, kar pomeni »za življenje« (Mičetić-Turk in Šikić-Pogačar, 2011).

Ob poplavi najrazličnejših probiotičnih izdelkov in oglaševanju njihovih zdravju pozitivnih učinkov, je predpogoj za kakršnokoli izkazovanje blagodejnih učinkov zadostno število probiotičnih bakterij v takšnem izdelku.

Pomemben parameter pri ocenjevanju kakovosti probiotičnih izdelkov je ugotavljanje števila živih mikroorganizmov, ki ga izvedemo s pomočjo kultivabilnih tehnik. Ker pa imamo v probiotičnih izdelkih navadno več vrst mikroorganizmov, ki so si podobni po fizioloških lastnostih, prehranskih zahtevah in rasti v podobnih okoljskih razmerah, je zelo pomembna izbira ustreznih gojišč, ki omogočijo selektivno rast in štetje posamezne bakterijske vrste oz. rodu probiotičnega mikroorganizma (Desai in sod., 2006).

Za oceno preživetja in živosti probiotičnih bakterij je pomembno, da je delovna metoda za selektivno rast želenih mikroorganizmov predhodno vpeljana in ustrezno optimizirana (Tharmaraj in Shah, 2003).

V komercialni uporabi probiotikov, torej tudi laktobacilov, je pomembno, da poznamo orodja, ki omogočajo identifikacijo posameznih vrst, sevov, razumevanje njihove sorodnosti, kontrolo genetskih lastnosti in stabilnosti ter njihovo klasifikacijo znotraj rodu oz. vrste (Desai in sod., 2006).

Kljub temu, da so predstavniki rodu *Lactobacillus* vodilna skupina probiotičnih bakterij, prisotnih v probiotičnih izdelkih, zaenkrat še ni enotnih navodil oz. standardov (z izjemo standarda ISO za ugotavljanje števila bakterij iz skupine *Lb. acidophilus*), ki bi predlagali najprimernejša selektivna gojišča zanje. Poleg tega tudi v literaturi naletimo na nasprotujoča si mnenja o selektivnosti določenih gojišč, zato smo v nalogi testirali selektivnost in primernost najpogostejše uporabljenih gojišč za rast laktobacilov.

Z rezultati bomo pomembno prispevali k ovrednotenju posameznega gojišča z vidika selektivnosti in s tem zanesljivosti ugotavljanja števila laktobacilov v mlečnih izdelkih in v prehranskih dopolnilih, ki vsebujejo probiotične kulture.

1.1 CILJI NALOGE

Namen diplomske naloge je bil preveriti selektivnost sedmih različnih gojišč, in sicer MRS (gojišče po De Man, Rogosa in Sharpe), MRS z maltozo (M-MRS), MRS z žolčnimi solmi (MRS-ŽS), Rogosa (selektivno gojišče za laktobacile), LAMVAB z dvema različnima koncentracijama vankomicina (LAMVAB in LAMVAB-ZKV), MRS s ciprofloksacinom in klindamicinom (LAC) v različnih razmerah inkubacije, glede odnosa do kisika (aerobno, anaerobno) za ugotavljanje števila laktobacilov v probiotičnih izdelkih.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Uporaba različnih dodatkov (maltoza, žolčne soli, očetna kislina, vankomicin, ciprofloksacin, klindamicin) v gojišča, bo omogočila selektivno rast laktobacilov,
- in s tem uspešno ločevanje laktobacilov od ostalih bakterij, ki so prisotne v probiotičnih izdelkih, tako v prehranskih dopolnilih kot tudi v mlečnih izdelkih, ki vsebujejo probiotične kulture.

2 PREGLED OBJAV

2.1 GOJIŠČA

Klasična mikrobiološka preiskava za ugotavljanje prisotnih mikroorganizmov v živilih vključuje gojitev mikroorganizmov v laboratoriju. Za gojitev se, odvisno od namena preiskave, uporablja različna gojišča, na primer osnovna, selektivna gojišča (obogatitvena-modificirana, diferencialna) in gojišča za ugotavljanje biokemijskih lastnosti. Pri klasični identifikaciji bakterij je najprej potrebno osamiti čisto kulturo na primernem osamitvenem gojišču ter nato izvesti serijo biokemijskih in seroloških testov. Postopek je največkrat dolgotrajen (Jeršek, 2009).

2.1.1 Definicija gojišča

Gojišča so kompleksno sestavljena iz mineralov (makroelementi in mikroelementi), ogljikovih hidratov (običajno saharoza), aminokislin, vitaminov in rastlinskih rastnih regulatorjev. Gojišča so lahko trdne, tekoče ali poltrdne oblike. Za pripravo trdnih gojišč dodajamo hranilnim raztopinam različne strjevalce, največkrat agar ali agarozo (Ravnikar, 1996).

2.1.2 Vrste gojišč

Glede na namen uporabe določenega gojišča se poslužujemo osnovnih in specialnih gojišč (obogatena gojišča, kompleksna gojišča, definirana gojišča, selektivna gojišča). Osnovna gojišča so namenjena ohranjanju vitalnosti, takšna gojišča so navadno neselektivna. Pri gojitveni tehniki lahko uporabimo tudi selektivna gojišča. Selektivnost povečamo z dodatki, ki prednostno omogočajo boljšo in lažjo rast določenega rodu oz. vrste bakterij, kakor tudi s količino kisika (aerobne ali anaerobne razmere), spremembo vrednosti pH, temperature in časa inkubacije.

Učinkovita osamitev tarčnih mikroorganizmov je odvisna od sestave gojišča, razmer inkubacije (čas, temperatura, sestava atmosfere, ...) ter od kompleksnosti sestave analiziranega vzorca (Talwalkar in Kailasapathy, 2004; De Carvalho Lima in sod., 2009).

2.2 GOJIŠČA ZA LAKTOBACILE

Kljub mnogim raziskavam še vedno ne poznamo najbolj primerne selektivnega gojišča za gojitev posameznega rodu ali vrste MKB (mlečnokislinske bakterije) in bifidobakterij. Izjema je standard ISO 20128 (2006), ki predlaga selektivno gojišče LAC za rast bakterij iz skupine *Lb. acidophilus* (*Lb. acidophilus*, *Lb. amylovorus*, *Lb. crispatus*, *Lb. gallinarum*, *Lb. gasseri*, *Lb. johnsonii*), osamljenih iz fermentiranih mlečnih izdelkov in standard ISO 29981 (2010), ki opisuje selektivno gojišče za bifidobakterije, prav tako osamljene iz fermentiranih mlečnih izdelkov. Skupina *Lb. casei* (*Lb. casei*, *Lb. paracasei* ssp. *paracasei*, *Lb. paracasei* ssp. *tolerans*, *Lb. rhamnosus*) je najbolj raziskana med laktobacili, saj veliko sevov izkazuje probiotični potencial, še vedno pa nimamo gojišča, ki bi omogočal njihovo selektivno rast (Colombo in sod., 2014).

Za gojitev MKB uporabljamo prehransko kompleksna gojišča, ki tem bakterijam omogočajo rast. Čeprav je poznanih mnogo gojišč, je najbolj pogosto uporabljeno gojišče MRS, ki je lahko delno spremenjeno glede na namen uporabe (Jeršek, 2013).

Gojišča, ki so primerna za rast laktobacilov, morajo zadostiti njihovim zahtevnim prehranskim potrebam in mikroaerofilnemu odnosu do kisika. Najbolj splošno uporabljena gojišča za laktobacile so MRS agar, APT agar (angl. All Purpose Tween) ter Rogosa. Vsa ta gojišča omogočajo selektivno rast laktobacilov, a predvsem v primeru, da so v izdelku prevladujoča skupina bakterij in v njem ni prisotnih veliko ostalih bakterijskih kultur (Hartemink in sod., 1997).

Do prvih poskusov priprave selektivnega gojišča za osamitev laktobacilov je prišlo že pred dobrimi 60 leti z vpeljavo gojišča Rogosa (Rogosa in sod., 1951). Temu sta sledili gojišči MRS (De Man in sod., 1960) in LAMVAB (Hartemink in sod., 1997). Gojišča lahko podpirajo rast laktobacilov, vsa pa niso dovolj selektivna, saj omogočajo rast tudi drugim MKB in ostalim bakterijskim rodovom (Jackson in sod., 2002).

Gojišča z laktobacili naj bi inkubirali v anaerobnih razmerah, običajno 48 ur pri temperaturi 30 °C ali 37 °C. Za zagotavljanje anaerobnih razmer, lahko dodamo v gojišče 0,05 % cisteina, ki je vir dušika in pomaga zmanjševati koncentracijo kisika. Laktobacili so tolerantni za kisle razmere, kar pomeni, da lahko rastejo in proizvajajo mlečno kislino tudi pod vrednostjo pH 5,5 (De Angelis in Gobbetti, 2011).

2.2.1 Osnovna gojišča

Osnovna gojišča so namenjena ohranjanju vitalnosti bakterij in ne toliko selektivni rasti posamezne bakterijske vrste ali rodu. So kompleksna gojišča, na njih raste večina heterotrofnih bakterij.

2.2.1.1 MRS

Gojišče MRS so leta 1960 vpeljali raziskovalci De Man, Rogosa in Sharpe. Namenjeno je obogatitvi, kultivaciji in osamitvi laktobacilov iz različnih vzorcev. Vsebuje polisorbit, acetat, magnezij in mangan, ki so znani kot rastni faktorji in bogata hranila za rast laktobacilov. Gojišče pa, poleg laktobacilom, omogoča rast tudi nekaterim drugim MKB, predvsem vrstam iz rodov *Pediococcus* in *Leuconostoc* (Microbiology manual, 2005).

Tudi kultura *Str. thermophilus* dobro uspeva na gojišču MRS, a njene kolonije izkazujejo karakteristično morfologijo, različno morfologiji laktobacilov. Kolonije laktobacilov so na gojišču MRS nepravilne oblike in svetlo sive barve ali kremno bež barve ter okrogle oblike, kolonije *Str. thermophilus* na gojišču MRS so majhne, točkaste in bele (Bergamini in sod., 2005; Karimi in sod., 2012).

Gojišče MRS je referenčno za namnožitev laktobacilov (Van de Castele in sod., 2006).

2.2.2 Specialna gojišča

Specialna gojišča pripravljamo iz osnovnih gojišč z dodatkom posameznih sestavin. Poznamo različne vrste specialnih gojišč, in sicer (Cvitković-Špik in sod., 2010):

- obogatena gojišča,
- kompleksna gojišča,
- kromogena in fluorogena gojišča,
- definirana gojišča,
- selektivna gojišča (obogatitvena gojišča, diferencialna gojišča, minimalna gojišča).

Obogatena gojišča dobimo z dodatkom posameznih naravnih komponent (ogljikovi hidrati, plazma, serum, posneto mleko, ekstrakti naravnih substratov, ...), ki izboljšajo in obogatijo gojišče (Cvitković-Špik in sod., 2010).

Kompleksna gojišča vsebujejo poleg definiranih mineralnih komponent še naravne sestavine, ki kemijsko niso popolnoma definirane (Cvitković-Špik in sod., 2010).

Kromogena in fluorogena gojišča vsebujejo umetne kromogene oz. fluorogene encimske substrate, ki omogočajo hitro, direktno identifikacijo mikroorganizmov. Če kromogene in fluorogene encimske substrate dodamo v selektivna gojišča, se ta lahko uporabljajo kot primarna izolacijska gojišča. S tem dosežemo, da za identifikacijo izolatov ni potrebna nova kultivacija in serije biokemijskih testov, tako skrajšamo čas preiskave, prihranimo material in delo. Interakcije med mikroorganizmi in kemijskimi sestavinami gojišč so različne in večinoma odvisne od strukture kromoforov in fluoroforov (Jeršek, 2009).

Pri definiranih gojiščih poznamo natančno kemijsko sestavo komponent. Takšna gojišča so sestavljena iz natančno odmerjenih količin čistih anorganskih in organskih snovi (Cvitković-Špik in sod., 2010; Ashraf in Shah, 2011).

Selektivna gojišča prednostno podpirajo rast določenih bakterij pred drugimi, uporabljamo jih, kadar želimo osamiti določen rod ali vrsto mikroorganizma. Med selektivna gojišča prištevamo obogatitvena, diferencialna in minimalna gojišča (Ashraf in Shah, 2011).

Obogatitvena gojišča ali namnoževalna gojišča uporabljamo za namnožitev določene bakterijske vrste ali skupine bakterij, ki jo želimo osamiti iz določenega materiala, v katerem sicer ni števna (npr.: pospeševanje razmnoževanja posameznih vrst patogenih bakterij, če jih je v kužnini malo in zaviranje rasti bakterij normalne mikrobiote) (Cvitković-Špik in sod., 2010).

Na diferencialnem gojišču ne pride do inhibicije ali pospešene rasti, na njem se zrasle kolonije razlikujejo po vidnih fenotipskih lastnostih, kot so oblika in/ali barva kolonij, sprememba barve gojišča okrog kolonij, pojav cone okoli kolonije, ... Diferencialna gojišča vsebujejo enega ali več ogljikovih hidratov in indikatorsko barvilo, ki spremeni barvo pri različnih vrednostih pH (Ashraf in Shah, 2011; Talwalkar in Kailasapathy, 2004).

Minimalna gojišča ne vsebujejo nekaterih osnovnih rastnih faktorjev, veliko sevov na njih tako ni sposobnih tvoriti kolonij, večinoma zrastejo le divji sevi, ki so prisotni v populaciji (Cvitković-Špik in sod., 2010).

2.2.3 Selektivna gojišča

K povečanju selektivnosti gojišč lahko pripomorejo različni dodatki k osnovnemu gojišču, vrednost pH, čas in temperatura inkubacije ter ostali, zaenkrat še manj raziskani dejavniki.

Selektivna gojišča vsebujejo specialne dodatke, ki v mešanih kulturah omogočajo selektivno rast izbranih bakterij in inhibicijo ostale prisotne bakterijske populacije. Težko je poiskati najbolj optimalno gojišče, saj so laktobacili zelo sorodni z ostalimi MKB in bifidobakterijami in je tako njihovo ločevanje na gojiščih lahko oteženo. Poleg tega imata rodova *Leuconostoc* in *Pediococcus* ter nekatere kvasovke sposobnost rasti v gojiščih z znižano vrednostjo pH okoli 5,0, zato nobeno gojišče, kjer je vrednost pH nižja, ni popolnoma selektivno za rast laktobacilov. Potreben je mikroskopski ter tudi molekularni pregled osamljenih bakterij za določitev bakterijskega rodu oz. vrste (De Angelis in Gobbetti, 2011).

Literaturni podatki navajajo uporabo različnih dodatkov, kot so (Karimi in sod., 2012):

- antibiotiki (klindamicin, vankomicin, eritromicin, nalidiksična kislina, metronidazol, paramocin sulfat, neomicin sulfat),
- sladkorji (maltoza, riboza, galaktoza, arabinoza, celobioza, rafinoza, melibioza, trehaloza, fruktoza),
- sladkorni alkoholi (sorbitol, manitol),
- barvila (bromkrezol zeleno),
- rastni faktorji,
- sredstva za znižanje vrednosti pH (HCl, očetna kislina),
- glukozidi (eskulin, salicin),
- ostali dodatki (mesni ekstrakt, tripton, NaCl, žolčne soli, litijev klorid, natrijev propionat).

2.2.3.1 M-MRS

Gojišče M-MRS je bilo razvito s strani raziskovalcev Hull in Roberts (1984). Modificirala sta gojišče MRS, in sicer tako da sta namesto sladkorja glukoza uporabila vrsto drugih sladkorjev. Pri tako pripravljenem gojišču je namesto glukoze uporabljena ustrezna količina bodisi maltoze, salicina, celobioze, rafinoze ali melibioze.

V iskanju primerne selektivnega gojišča za *Lb. acidophilus* je bilo ugotovljeno, da modificirano gojišče MRS z maltozo preprečuje rast starterski kulturi, ki sodeluje pri proizvodnji jogurta. Analiziranih je bilo 33 sevov vrste *Str. thermophilus* in noben ni pokazal sposobnosti izkoriščanja maltoze, fruktoze, manoze, salicina, celobioze, melobioze, trehaloze ali rafinoze, pri fermentaciji pa so uspešno izkoriščali glukozo, laktozo in saharozo. Hkrati pa gojišče M-MRS omogoča dobro rast in preživelost vrste *Lb. acidophilus*, osamljene iz probiotičnega jogurta, saj ta kultura lahko izkorišča vse zgoraj naštetje sladkorje (Hull in Roberts, 1984).

Gojišče M-MRS je bilo predlagano kot selektivno za rast vrste *Lb. acidophilus*, inkubirano v anaerobnih razmerah, 48 ur pri 37 °C (IDF, 1995). Vrsta *Lb. acidophilus* lahko dobro izkorišča maltozo ali sorbitol kot vir ogljikovih hidratov (Tharmaraj in Shah, 2003). Obenem pa je gojišče M-MRS ustrezno tudi za namnožitev bifidobakterij, zato za selektivno namnožitev vrste *Lb. acidophilus* raje uporabljamo gojišče MRS s salicinom (MRS-salicin) ali s sorbitolom (MRS-sorbitol) (Shah, 2000).

2.2.3.2 MRS-ŽS

Z dodatkom žolčnih soli v gojišče simuliramo razmere, ki vladajo v prebavnem traktu, kar nam omogoči selektivno rast bakterij, katerih glavno nahajališče je prebavni trakt in imajo predznak potencialnih probiotikov, medtem ko je rast ostalih bakterij zavrnjena (De Carvalho Lima in sod., 2009).

Že Hull in Roberts (1984) sta želela izkoristiti lastnost vrste *Lb. acidophilus*, ki izkazuje toleranco na prisotnost žolčnih soli. Tudi Vinderola in Reinheimer (1999) sta predlagala gojišče MRS-ŽS za rast kulture *Lb. acidophilus*. Gojišče je primerno za selektivno kultivacijo vrst *Lb. acidophilus* in *Lb. casei*, ko se pojavljata posamično ali pa v mešanici z drugimi MKB, na primer v fermentiranih mlečnih izdelkih ali probiotičnih prehranskih dopolnilih (Vinderola in Reinheimer, 2000). Gojišče MRS-ŽS je predvsem ugodno za selektivno rast kulture *Lb. paracasei* (Bergamini in sod., 2005). Gojišče ni ustrezno za rast jogurtovih kultur, *Str. thermophilus* in *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (Vinderola in Reinheimer, 1999).

Inkubacija gojišča v aerobnih razmerah onemogoča rast bifidobakterijam, saj so te glede odnosa do kisika striktno anaerobne (Vinderola in Reinheimer, 1999). Gojišče MRS-ŽS z aerobno inkubacijo je tako primerno za selektivno namnožitev vrste *Lb. acidophilus* v prisotnosti jogurtovih kultur ali bifidobakterij (IDF, 1995). V anaerobnih razmerah je gojišče ustrezno tudi za bifidobakterije; vrste *B. longum*, *B. pseudolongum* in *B. infantis* so pokazale veliko toleranco na prisotnost žolčnih soli (Shah, 2000).

2.2.3.3 Rogosa

Gojišče Rogosa so razvili raziskovalci Rogosa, Mitchell in Wisemann leta 1951 (Rogosa in sod., 1951), za osamitev in namnožitev laktobacilov iz ustne in črevesne mikrobiote, iz vzorcev mesa, mleka in ostalih živilskih izdelkov (Microbiology manual, 2005). De Angelis in Gobbetti (2011) navajajo, da je gojišče Rogosa uporaben medij za selektivno rast laktobacilov iz mlečnih izdelkov. Vrednost pH znaša 5,3-5,0 kar poveča njegovo selektivnost in tako prepreči rast bakterij iz rodov *Lactococcus*, *Enterococcus* in *Streptococcus*. Tudi visoka vsebnost očetne kisline torej pripomore k selektivni rasti sevov rodu *Lactobacillus* (Jackson in sod., 2002). Koncentracije mangana, magnezija in železa omogočajo rast laktobacilom (Microbiology manual, 2005). Vrsti *Lb. acidophilus* in *Lb. gasseri* lahko zrastle na gojišču Rogosa, sta pa občutljivi za antibiotik vankomicin, zato njune rasti na gojišču LAMVAB ni zaznati (Jackson in sod., 2002). Gojišče Rogosa se je izkazalo selektivno za nestarterske MKB (Rogosa in sod., 1951; Darukaradhyia in sod., 2006).

2.2.3.4 LAMVAB

Gojišče LAMVAB (angl. *Lactobacillus* Anaerobic MRS with Vancomycin and Bromcresol green) je visoko selektivno gojišče za laktobacile zaradi nizke vrednosti pH in prisotnosti glikopeptidnega antibiotika vankomicin. Poleg tega gojišče vsebuje cistein-hidroklorid, ki je močan reducent, znižuje redoks potencial ter tako pripomore k zagotavljanju ugodnejših razmer za rast mikroaerofilnih bakterij ter preprečuje negativne vplive kisika. Gojišče vsebuje še bromkrezol zeleno kot indikator vrednosti pH. Nizka vrednost pH omejuje rast enterobakterij, klostridijev in drugih po Gramu negativnih anaerobov. Prisotnost vankomicina pa omejuje predvsem rast po Gramu negativnih bakterij ter nekaterih po Gramu pozitivnih bakterij, na primer enterokokov, bifidobakterij in klostridijev, izjema so laktobacili, saj lahko rastejo v navzočnosti vankomicina. Gojišče omogoča osamitev bakterij iz rodu *Lactobacillus* iz kompleksnih vzorcev, kot sta na primer humano blato in probiotični izdelki, ki vsebujejo mešane populacije laktobacilov, bifidobakterij, enterokokov. Kot selektivno gojišče ga ne moremo uporabiti pri analizi vzorcev, kjer so poleg laktobacilov prisotni še predstavniki rodov *Leuconostoc* in *Pediococcus*, saj so ti odporni na vankomicin in na gojišču LAMVAB rastejo prav tako kot laktobacili. Ugotovili so, da naj bi bili tudi nekateri enterokoki zmožni rasti na gojišču LAMVAB (Hartemink in sod., 1997).

Hartemink in sod. (1997) pravijo, da gojišče LAMVAB inhibira rast določenih črevesnih bakterij, zato so primerjali različno modificirana gojišča LAMVAB, in sicer gojišče LAMVAB z vrednostjo pH 6,5 ter gojišče LAMVAB brez antibiotika vankomicin. V primerjalni analizi so ugotovili, da po Gramu pozitivne bakterije lahko rastejo na gojišču LAMVAB brez vankomicina, medtem ko na gojišču LAMVAB njihova rast ni najbolj uspešna. Rezultati so pokazali še, da je rast po Gramu negativnih bakterij inhibirana pod vplivom nizke vrednosti pH.

Tipične kolonije laktobacilov na gojišču LAMVAB izkoriščajo barvilo bromkrezol zeleno, rezultat tega so modro-zeleno obarvane kolonije (Hartemink in Rombouts, 1999). Vendar pa nekatere vrste oz. sevi laktobacilov ne morejo izkoristiti barvila bromkrezol zeleno, zato se pojavljajo kot rumene ali bele kolonije. Barva kolonij tako ni dovolj selektiven pokazatelj za določanje rodovne pripadnosti laktobacilov (Hartemink in sod., 1997).

Coeuret in sod. (2004) so v raziskavi potrdili, da *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* in *Lb. acidophilus* ne raste na gojišču LAMVAB. Ugotovljeno je bilo, da se občutljivost bakterij na vankomicin tudi znotraj skupine *Lb. acidophilus* lahko močno razlikuje. Nekatere imajo sposobnost rasti na gojišču LAMVAB, spet druge ne (Hartemink in Rombouts, 1999). Tudi vrsta *Lb. delbrueckii* je za razliko od večine laktobacilov občutljiva za vankomicin in tako njena rast na gojišču LAMVAB ni mogoča (Hartemink in Rombouts, 1999). Skupina *Lb. casei* na gojišču LAMVAB dobro uspeva (Vinderola in Reinheimer, 1999). Po zastopanosti probiotičnih kultur v različnih izdelkih prevladujeta rodova *Lactobacillus* ter *Bifidobacterium*. Raziskovalca Hartemink in Rombouts priporočata gojišče LAMVAB kot medij za selektivno kultivacijo laktobacilov iz probiotičnih izdelkov, saj rasti bifidobakterij na gojišču LAMVAB nista opazila (Hartemink in Rombouts, 1997). Hartemink in Rombouts (1999) sta v študiji, kjer sta analizirala blato človeka, mačke in prašiča, potrdila selektivnost gojišča LAMVAB v

primerjavi z gojišči MRS in Rogosa, saj je bila rast na gojišču LAMVAB za 5 logaritmskih enot nižja kot na ostalih dveh gojiščih.

Gojišči MRS-vankomicin (72-urna inkubacija pri 37 °C v anaerobnih razmerah) in LC (selektivno gojišče za *Lb. casei* vsebuje pepton, kvasni ekstrakt, KH_2PO_4 , natrijev acetat, tri-amonijev citrat, MgSO_4 , MnSO_4 , kazeinski hidrolizat, Tween 80, bromkrezol zeleno, agar) sta selektivni za rast vrste *Lb. casei*, če hkrati ni prisotna vrsta *Lb. rhamnosus* (Tharmaraj in Shah, 2003; Ravula in Shah, 1998).

Gojišče LC (gojišče, ki vsebuje pepton, kvasni ekstrakt, KH_2PO_4 , natrijev acetat, tri-amonijev citrat, MgSO_4 , MnSO_4 , kazeinski hidrolizat, Tween 80, bromkrezol zeleno, agar) je selektivno za rast *Lb. casei* pri inkubaciji v anaerobnih razmerah pri 27 °C v času od 72 h do 96 h, inhibitorno pa deluje na *Str. thermophilus* in *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lb. acidophilus* in bifidobakterije (Ravula in Shah, 1998).

2.2.3.5 LAC

Gojišče LAC je sestavljeno iz gojišča MRS, ki mu dodamo klindamicin in ciprofloksacin. Antibiotika klindamicin in ciprofloksacin zavirata rast mnogih mikroorganizmov, ki jih najdemo v fermentiranih in ne-fermentiranih mlečnih izdelkih, kot so *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis*, *Str. thermophilus*, bifidobakterije, laktokoki, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* ssp. *paracasei*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. reuteri* in vrste *Leuconostoc* (ISO 20128:2006).

Gojišče je primerno za selektivno rast bakterij skupine *Lb. acidophilus* iz vzorcev fermentiranih ali ne-fermentiranih mlečnih izdelkov, mleka v prahu, začetnih formul za dojenčke, kjer je vrsta prisotna samostojno ali pa v kombinaciji z ostalimi MKB oz. bifidobakterijami (ISO 20128:2006). Gojišče ni uporabno, kadar je koncentracija *Lb. acidophilus* manjša kot 10^4 KE/g in je koncentracija bakterij *Lb. rhamnosus*, *Lb. reuteri*, *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* večja kot 10^6 KE/g (ISO 20128:2006). Van de Castele in sod. (2006) menijo, da je gojišče MRS s klindamicinom zelo uporabno za selektivno gojitev probiotične bakterijske vrste *Lb. acidophilus*, tudi v primeru, če so v vzorcu prisotne še bifidobakterije, saj v njihovi študiji nobena bifidobakterija ni izkazala rasti na omenjenem gojišču.

Antibiotik klindamicin deluje inhibitorno za rod *Bifidobacterium*, saj noben od preiskovanih sevov bifidobakterij v mešani populaciji z laktobacili, na gojišču MRS s klindamicinom, ni pokazal rasti (Bergamini in sod., 2005).

2.2.3.6 M-17

Gojišči MRS in M-17 sta bili predlagani za selektivno gojitev vrst *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* in *Str. thermophilus*, kjer je vzorec jogurt (IDF. 1995). Gojišče M-17 je selektivno za kultivacijo jogurtove starterske kulture, in sicer za *Str. thermophilus* (Van de Castele in sod., 2006). Darukaradhya in sod. (2006) so pri analizi gojišč ugotovili, da Rogosa in M-17 omogočata rast vrsti *Lb. acidophilus*, rodu *Bifidobacterium* ssp. in sevom starterskih MKB.

2.2.4 Ostala gojišča

Karimi in sod. (2012) so pripravili pregled gojišč, ki so bila v preteklosti definirana kot bolj ali manj selektivna za rast laktobacilov.

Gojišče MRS z vrednostjo pH 5,2 (gojišče MRS, kjer je vrednost pH znižana na 5,2 s HCl) je najbolj primerno za kultivacijo jogurtove starterske kulture, in sicer za *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (Van de Castele in sod., 2006).

Vrsti *Lb. rhamnosus* in *Lb. paracasei* najbolje uspevata na gojišču LC, če sta osamljeni iz jogurta ali iz drugega fermentiranega mlečnega izdelka, ter na gojišču MRS-AC (gojišče MRS, kjer je vrednost pH znižana na 5,2 z očetno kislino), če sta osamljeni iz sira. Gojišče MRS-AC podpira še rast bakterij *Lb. acidophilus*, *Bifidobacterium* sp. in *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (Van de Castele in sod., 2006). Jogurtovi kulturi *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* in *Str. thermophilus* ter bifidobakterije na gojišču LC ne kažejo rasti (Ravula in Shah, 1998; Shah, 2000). Tudi za rast *Lb. acidophilus* gojišče LC ni primerno (Shah, 2000), medtem ko sta Ravula in Shah (1998) določila rast dveh sevov *Lb. acidophilus* na omenjenem gojišču.

Gojišče NA-salicin (hranljivo gojišče s salicinom) so predlagali Van de Castele in sod. (2006) kot gojišče, ki omogoča selektivno rast vrste *Lb. paracasei*.

Rasti jogurtovih kultur, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* in *Streptococcus thermophilus*, gojišče NA-salicin ne podpira (Lankaputhra in Shah, 1996).

Gojišče RCABC (gojišče z vrednostjo pH 5,5, barvilom bromkrezol zeleno in klindamicinom) je bilo odkrito kot relativno selektivno gojišče za vrsto *Lb. acidophilus* (Darukaradhya in sod., 2006).

Van de Castele in sod. (2006) navajajo primernost gojišča RCABV (gojišče z vrednostjo pH 5,5, barvilom bromkrezol zeleno in vankomicinom) za rast skupine *Lb. casei*. Na gojišču RCABV uspevajo nestarterske MKB, medtem ko njegova sestava deluje inhibitorno za vrsto *Lb. acidophilus*, rod *Bifidobacterium* sp. in seve starterskih MKB (Darukaradhya in sod., 2006).

Gojišče T-MRS (modificirano gojišče MRS s trehalozo) je selektivno za rast *Lb. acidophilus*, ki uspešno izkorišča sladkor trehaloza, medtem ko je *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* in *Str. thermophilus* ter *B. bifidum* ne morejo uporabiti kot glavni vir ogljikovih hidratov (IDF. 1995).

2.3 PROBIOTIČNE BAKTERIJE

Najpogosteje uporabljene probiotične kulture so iz rodov *Lactobacillus* (*Lb. rhamnosus* GG, *Lb. reuteri*, *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*), *Bifidobacterium* (*B. breve*, *B. infantis*, *B. bifidum*, *B. longum*) in *Enterococcus* (*E. faecium* SF68) ter bakterija *Escherichia coli* Nissle 1917 in kvasovka *Saccharomyces boulardii* (Mičetić-Turk in Šikić-Pogačar, 2011; Rogelj in Perko, 2003).

2.3.1 Definicija probiotikov

Leta 1965 sta Lilly in Stillwell uporabila ime probiotik za opis snovi, ki jih proizvaja en mikroorganizem in spodbujajo rast drugih mikroorganizmov (Lilly in Stillwell, 1965).

Fuller je vpeljal osnovno definicijo probiotikov. Probiotike je poimenoval kot žive dodatke h krmi, ki koristno vplivajo na žival gostiteljico z vzdrževanjem ali izboljšanjem njenega mikrobnega ravnotežja v črevesju (Fuller, 1989).

Definicija probiotikov je bila v začetku omejena le na živalsko prehrano, zato sta jo Huis in't Veld in Havenaar leta 1992 razširila še na humano prehrano. Probiotik sta definirala kot mono ali mešano kulturo živih mikroorganizmov, ki ugodno vplivajo na človeka ali žival, z uravnavanjem lastne intestinalne mikrobiote (Havenaar in Huis in't Veld, 1992).

Danes uveljavljena definicija probiotikov, ki sta jo sprejeli tudi organizaciji FAO in WHO pravi, da so probiotiki živi mikroorganizmi, ki ob zaužitju v zadostni količini s pozitivnimi učinki delujejo na zdravje gostitelja (Guarner in Schaafsma, 1998; FAO/WHO, 2002).

Kot najpomembnejšo lastnost probiotikov štejemo njihovo sposobnost preživetja v kislem okolju ob prisotnosti žolčnih soli (Shah, 2000).

Ugotovili so tudi, da delovanje v smislu stimulacije imunskega sistema ni omejeno zgolj na žive celice, ampak pri tem sodelujejo tudi celični kompleksi (mrtve celice ali deli celic) MKB, ki prav tako vplivajo na funkcijo črevesne sluznice in na imunski odgovor. Imenujemo jih probiotično aktivna snov (Naidu in sod., 1999).

2.3.2 Oblike probiotikov na tržišču

Med najbolj obetavnimi primeri funkcionalne hrane so gotovo probiotiki, samostojno ali v kombinaciji s prebiotiki (Bogovič Matijašić, 2001).

Na trgu so probiotiki na voljo v obliki funkcionalnih živil, prehranskih dopolnil in zdravil brez recepta (Bogovič Matijašić in sod., 2010).

Med funkcionalnimi živili s probiotiki prevladujejo fermentirani mlečni izdelki, predvsem jogurti in mlečni napitki, sledijo jim siri in mlečni namazi s probiotiki, vse več je tudi živil rastlinskega izvora, namenjenih predvsem vegetarijancem (Bogovič Matijašić in sod., 2010).

Prehranska dopolnila so živila, katerih namen je dopolnjevati običajno prehrano. So koncentriran vir posameznih ali kombiniranih hranil ali drugih snovi s hranilnim ali fiziološkim učinkom, ki se dajejo v promet v obliki kapsul, pastil, tablet in v drugih podobnih oblikah, v vrečkah s praškom, v ampulah s tekočino, v kapalnih stekleničkah in v drugih podobnih oblikah s tekočino in praškom, ki so oblikovane tako, da se jih lahko uživa v odmerjenih majhnih količinskih enotah (Pravilnik o prehranskih dopolnilih, 2013).

Prehranska dopolnila lahko vsebujejo vitamine, minerale, aminokisline, maščobne kisline, vlaknine, rastline in rastlinske izvlečke, mikroorganizme ter druge snovi s hranilnim ali fiziološkim učinkom, pod pogojem, da je njihova varnost v prehrani ljudi, znanstveno utemeljena (Pravilnik o prehranskih dopolnilih, 2013).

Probiotična prehranska dopolnila in zdravila vsebujejo liofilizirane probiotične mikroorganizme (Bogovič Matijašič in sod., 2010).

Na trgu je mnogo več prehranskih dopolnil kot zdravil s probiotiki, saj so regulatorne zahteve za prehranska dopolnila bistveno milejše od tistih, ki veljajo za zdravila. Posebnost pri zdravilih s probiotiki je, da lahko navajajo neposredne učinke na bolezenska stanja, ki so dokazani, medtem ko pri prehranskih izdelkih in s tem tudi pri prehranskih dopolnilih to ni dovoljeno, oz. so trditve in navedbe lahko le splošne narave (Bogovič Matijašič in sod., 2010).

2.3.3 Označevanje probiotičnih izdelkov

Na slovenskem trgu proizvajalci prehranskih dopolnil s probiotiki ne navajajo funkcionalnih učinkov in zdravilnih lastnosti, zato se ti lahko prodajajo v prosti prodaji. Za patentiranje posameznih aplikacij zdravljenja, je potrebno opraviti obsežne študije ob precejšnjem finančnem vložku, medtem ko je potrebno za nov prehranski izdelek oz. prehransko dopolnilo, ki ga obravnavamo podobno kot živila, zadostiti zgolj osnovnim zahtevam za hrano glede kvalitete, zdravstvene neoporečnosti in trajnosti (Bogovič Matijašič, 2001).

Pri tem morajo biti izpolnjene določene zahteve z vidika zdravja potrošnikov (Hamilton-Miller in sod., 1999):

- izdelki morajo biti varni; v primeru da gre za živilo, morajo biti varni vsaj toliko kot je varno konvencionalno živilo,
- v primeru, da so navedeni učinki na zdravje, morajo biti ti dokazani v kliničnih raziskavah pri ljudeh,
- izdelki morajo biti jasno in ustrezno označeni, se pravi, da mora deklaracija vsebovati ustrezne informacije, kot so:
 - zaznamek, ali so prisotne žive bakterije,
 - natančen opis bakterij,
 - velikost populacije posamezne bakterije,
 - minimalno količino bakterij, ki še ima zdravju koristne učinke,
 - število živih mikroorganizmov do konca roka obstojnosti izdelka.

Z decembrom 2014 je prišlo do uvedbe nove uredbe o dietetičnih in prehranskih izdelkih ter o alergenih. Vsebina dokumentacije se je dotaknila tudi označevanja izdelkov z dodanimi mikroorganizmi, kjer se spremembe nanašajo na poimenovanje izdelkov z omejitvijo rabe »probiotičen izdelek«, npr.: probiotičen jogurt, in se poimenuje zgolj izdelek, npr.: jogurt, medtem ko je vsebnost probiotičnih kultur potrebno ustrezno deklarirati na embalaži. Ob tem je potrebno opraviti klinične študije ter natančno identifikacijo in karakterizacijo (genska tipizacija) na ravni seva s pomočjo uporabe mednarodno priznanih molekularnih metod (EFSA, 2015).

Pri tem morata biti za identifikacijo bakterij izpolnjena dva kriterija, in sicer določitev vrste s hibridizacijo DNA-DNA ali s sekvenčno analizo robustnih taksonomskih markerjev (npr.: sekvenciranje 16S rRNA) ter identifikacija seva z mikrorestrikcijo DNA, ki ji sledi gelska elektroforeza v pulzirajočem električnem polju (angl. Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE), naključno pomnožena polimorfna DNA (angl. Randomly Amplified Polymorphic DNA, RAPD) ali uporaba druge mednarodno sprejete molekularne metode za genotipizacijo. Šele nato lahko bakterijo obravnavamo kot dejavnik, ki povzroča ugodne učinke na gostitelja in ustrezne zdravstvene trditve deklariramo na embalaži izdelka (EFSA, 2015).

2.3.4 Kriteriji za izbiro probiotičnih sevov

Sev, ki ga uporabljamo kot probiotik mora biti natančno taksonomsko definiran, poznane morajo biti njegove karakteristike. Zaželeno je, da je vrstno specifičen, torej je humani izolat. Nujne so potrditve, da je nepatogen in netoksičen. Najbolj priljubljeni so sevi, ki pripadajo vrstam MKB s statusom GRAS (angl. Generally Recognized as Safe) (Rogelj in Bogovič Matijašić, 2004). Pri izbirnem postopku probiotičnih sevov bakterij moramo tako upoštevati selekcijske kriterije, ki vključujejo varnostni, funkcionalni ter tehnološki vidik. Vse te tri lastnosti pa določajo kakovost probiotičnih izdelkov (Smole Možina in Jeršek, 2001).

2.3.4.1 Varnostni vidik

Glede varnostnega aspekta morajo biti zagotovljene naslednje zahteve za sev (Saarela in sod., 2000):

- sev za humano uporabo naj bi bil humanega izvora in osamljen iz prebavnega trakta zdravega človeka,
- biti mora netoksičen in nepatogen,
- ne sme konjugirati žolčnih soli,
- ne sme povečevati možnosti prebavnih težav,
- ne sme imeti prenosljivih genov za odpornost proti antibiotikom.

2.3.4.2 Funkcionalni vidik

Funkcionalna plat probiotika naj vključuje vsaj nekatere od naslednjih karakteristik (Saarela in sod., 2000):

- sposobnost krepitev imunskega sistema,
- sposobnost preživetja in ohranitve aktivnosti pri prehodu skozi prebavni trakt in z njim povezano odpornost proti kislini (nizka vrednost pH) in želodčnemu ter pankreatičnemu soku,
- odpornost proti žolčnim solem (pomembna lastnost za preživetje in kolonizacijo v tankem črevesju),
- sposobnost vezave in poselitev črevesnih epitelnih celic (omogoča selektivno stimulacijo koristnih bakterij in zaviranje/izločanje patogenih bakterij, ki bi lahko sprožile okužbo - protimikrobna aktivnost),
- antikancerogeno in antimutageno delovanje,

- antagonistično delovanje proti patogenim bakterijam (*Helicobacter pylori*, *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes*, *Clostridium difficile*,...).

2.3.4.3 Tehnološki vidik

Poleg varnostnih in funkcionalnih lastnosti potencialnega probiotičnega seva, je potrebno zadostiti še potrebnim tehnološkim zahtevam. Da potencialni probiotični sev lahko uporabimo v proizvodnji živil, mora imeti (Rogelj in Perko, 2003; Saarela in sod., 2000):

- ustrezne senzorične lastnosti,
- dobro sposobnost preživetja in obstojnosti v izdelku tekom proizvodnje, skladiščenja in distribucije,
- zagotovljeno fenotipsko in genotipsko stabilnost v pogojih proizvodnje, v živilu in po zaužitju tega ter odpornost proti fagom.

2.3.5 Bakterijska odpornost proti antibiotikom

Tudi dodatek antibiotika je eden od načinov povečanja selektivnosti gojišč. Če so določeni sevi odporni proti določenemu antibiotiku, ki je prisoten v gojišču, je izražena rast te populacije. To pomeni prednost pred sevi, ki so za to substanco občutljivi. Glede na odpornost ali občutljivost za določen antibiotik tako pripomoremo k selektivni kultivaciji zelene mikrobne populacije.

Mikroorganizmi lahko pridobijo odpornost proti protibakterijskim učinkovinam in tako lahko postanejo tudi antibiotiki za njih neučinkoviti. Bakterijsko odpornost proti antibiotikom delimo na prirojeno ali intrinzično ter pridobljeno (angl. acquired) (Berce in sod., 2004).

Nekatere bakterije so odporne proti antibiotikom že po naravi, torej je informacija o odpornosti zapisana že v njihovih genih. Ta odpornost je prirojena in je nastala zaradi genetskih, strukturnih ali fizioloških lastnosti mikroorganizmov. Vedno je značilna za določeno bakterijsko skupino, rod ali vrsto in navadno ni prenosljiva. Vse po Gramu negativne bakterije so naravno odporne proti vankomicinu, rod *Mycoplasma* je naravno odporen proti penicilinskim antibiotikom, po Gramu pozitivni koki pa so odporni proti aztreonamu. Sulfonamidi ne morejo delovati na bakterijska rodova enterokokov in laktobacilov, saj folne kisline ne sintetizirajo sami. Vse bakterije so naravno odporne proti polienskim antibiotikom (npr.: amfotericin B), ker ne vsebujejo sterolov v citoplazemski membrani (Seme, 2002; Berce in sod., 2004).

Bakterije lahko odpornost proti antibiotikom tudi pridobijo. Značilna je samo za posamezne seve določene bakterijske vrste ali rodu in je nepredvidljiva. Takšna odpornost je rezultat spremenjene celične fiziologije ter strukture in je nastala zaradi genetskih sprememb mikroorganizma. Lahko je posledica spontanij mutacij kromosomskega ali plazmidnega gena posamezne bakterijske celice ali pa pridobitve nove genetske informacije z genskim prenosom ali transformacijo (Berce in sod., 2004).

Rod *Lactobacillus* ima visoko prirojeno odpornost na bacitracin, cefoksitin, ciprofloksacin, fusidno kislino, kanamicin, gentamicin, metronidazol, norfloksacin, streptomycin, sulfadiazin, trimetoprim/sulfametoksazol in vankomicin (Danielsen in Wind, 2003).

2.3.6 Rod *Lactobacillus*

Bakterije iz rodu *Lactobacillus* je prvi opisal Beijerinck leta 1901 kot po Gramu pozitivne bakterije in tako ločil MKB od koliformnih bakterij (Stiles in Holzapfel, 1997). Postopoma je sledila organizacija v skupine, ki temeljijo na fenotipskih lastnostih. Sprva glede na optimalno temperaturo rasti in pot fermentacije heksoz, ter kasneje delitev po odnosu do kisika (obvezno/fakultativno anaerobne bakterije) ter po tipu fermentacije (homo ali heterofermentativne bakterije) (Bernardeau in sod., 2008).

Laktobacili so po Gramu pozitivne, katalaza negativne, nesporogene, anaerobne ali fakultativno anaerobne palčke, ki so odporne na znižano vrednost pH. Proizvajajo mlečno kislino kot glavni končni produkt mlečnokislinske fermentacije. Imajo kompleksne prehranske zahteve, za rast in razmnoževanje potrebujejo ogljikove hidrate, maščobne kisline ali estre maščobnih kislin, soli, derivate nukleinskih kislin in vitamine. Rod *Lactobacillus* je tesneje povezan z rodovoma *Leuconostoc* in *Pediococcus*, manj pa z rodovoma *Streptococcus* in *Carnobacterium* ter aerobnimi predstavniki rodu *Bacillus* (De Angelis in Gobbetti, 2011).

Rod *Lactobacillus* je raznolika mikrobna skupina, ki dandanes vsebuje približno 217 vrst in 29 podvrst (Parte, 2014).

Laktobacili so najštevilčnejši rod med MKB. Najpogosteje se uporabljajo v proizvodnji fermentiranih mlečnih izdelkov, mesa, zelenjave ali pa jih uporabljajo kot probiotične dodatke (Bernardeau in sod., 2008). Splošna uporaba laktobacilov je povezana z njihovim statusom GRAS in uporabljenimi metodami za proizvodnjo živil, ki omogočajo ohranitev živih kultur v končnih izdelkih. Laktobacile uporabljamo kot starterske ali kot probiotične kulture, lahko tudi sintetizirajo bakteriocine in eksopolisaharide, ki prispevajo k okusu različnih mlečnih izdelkov (De Angelis in Gobbetti, 2011).

Laktobacili naseljujejo številne ekološke niše, saj jih najdemo pri ljudeh in živalih (ustna votlina, želodec, črevesje, vagina), v rastlinskih virih ter fermentiranih živilskih izdelkih (Hartemink in sod., 1997).

Laktobacili so po morfoloških lastnostih paličaste oblike, in sicer približna velikost znaša 0,5-1,2x1,0-10 µm. Lahko se pojavljajo posamično ali v skupkih, predvsem dolge palčke lahko opazimo samostojne, krajše pa se pogosto formirajo v kratke verige (De Angelis in Gobbetti, 2011).

Skupina *Lb. acidophilus* obsega 6 vrst, in sicer *Lb. acidophilus*, *Lb. amylovorus*, *Lb. crispatus*, *Lb. gallinarum*, *Lb. gasseri* in *Lb. johnsonii* (ISO 20128:2006).

Skupino *Lb. casei* sestavljajo vrste *Lb. casei*, *Lb. paracasei* ssp. *paracasei*, *Lb. paracasei* ssp. *tolerans*, *Lb. rhamnosus*. Omenjene vrste spadajo med fakultativno heterofermentativne laktobacile in so si taksonomsko zelo podobne (Sato in sod., 2012).

2.3.7 Rod *Bifidobacterium*

Bifidobakterije so anaerobne, negibljive, nesporogene in po Gramu pozitivne bakterije, ki so lahko paličastih, ukrivljenih ali razvejanih oblik. Za njih je značilen metabolizem heksoz po fruktoza-6-fosfat-fosfoketolazni poti, kjer sta glavna produkta očetna in mlečna kislina, ki nastaneta v razmerju 3:2. Posamezne vrste lahko tolerirajo prisotnost kisika, večinoma pa so obvezni anaerobi. Bifidobakterije lahko rastejo v temperaturnem območju 25 do 45 °C. Optimalna vrednost pH za njihovo rast je 6,5 do 7. Zrasle kolonije bifidobakterij so navadno gladke, konveksne, svetleče in kremne ali bele barve (Adamič in sod., 2003; Shah, 2011).

2.3.8 Rod *Enterococcus*

Bakterije rodu *Enterococcus* so po Gramu pozitivni koki, ki se pojavljajo v parih ali v kratkih verižicah. Ne tvorijo spor, so katalazno negativni, večinoma negibljivi, fakultativno anaerobni. Običajno rastejo v temperaturnem območju med 10 in 45 °C in pri vrednosti pH do 9,6. Najdemo jih v fermentiranih izdelkih, predvsem v sirih pa tudi v pasteriziranem mleku (Adamič in sod., 2003; Garcia de Fernando, 2011).

2.3.9 Rod *Lactococcus*

Laktokoki so sferične ali ovalne oblike, pojavljajo se samostojno ali v verigah, rastejo v temperaturnem območju od 20 do 30 °C. So po Gramu pozitivne, fakultativno anaerobne, katalaza negativne, negibljive, nesporogene MKB, ki so zelo pomembne v proizvodnji fermentiranih mlečnih izdelkov. Prisotne so v surovem mleku in fermentirajo laktozo v mlečno kislino, tvorijo pa še druge produkte, pomembne za aromo fermentiranih izdelkov (Adamič in sod., 2003; Mills in Ross, 2011).

2.3.10 Rod *Streptococcus*

So sferični do ovalni negibljivi, po Gramu pozitivni, fakultativni do obvezno anaerobni koki. Pojavljajo se v parih, krajših ali daljših verižicah, so katalaza negativni, njihova presnova je homofermentativna. Razmnožujejo se pri temperaturi od 0 do 45 °C, sicer pa je optimalna temperatura rasti od 40 do 45 °C ter pri vrednosti pH od 4,0 do 9,6. So termotolerantni in lahko preživijo blage pogoje pasterizacije. Najdemo jih v vodi, zemlji kakor tudi v mnogih živilih, predvsem živalskega izvora, kot so pasterizirani mesni izdelki, mleko in mlečni izdelki (Adamič in sod., 2003; Harnett in sod., 2011).

2.4 METODE SELEKCIJE IN IDENTIFIKACIJE BAKTERIJ RODU *Lactobacillus*

Pomemben kriterij kakovosti probiotičnih izdelkov je število živih probiotičnih mikroorganizmov, ki zagotavljajo njihovo učinkovitost (Bogovič Matijašić in sod., 2010). Število probiotičnih bakterij v izdelku mora biti dovolj visoko, da lahko po zaužitju izdelka premagajo ovire na poti do črevesja (odpornost proti želodčni kislini, žolčnim solem) in se tam zadržijo tako dolgo, da lahko izkažejo pričakovano pozitivno delovanje (Fasoli in sod., 2003). Zelena raven vsebnosti živih kultivabilnih probiotičnih bakterij v izdelkih je $\geq 10^6$ KE/g oz. KE/ml proizvoda (Ashraf in Shah, 2011).

Probiotične bakterije niso sposobne trajno poseliti črevesja, zato jih je, za vzdrževanje primerne mikrobiote debelega črevesja, potrebno vnašati v zadostnih količinah. Priporočena dnevna količina zaužitih živih probiotičnih mikroorganizmov, ki izkazuje terapevtske lastnosti, je 10^9 - 10^{10} KE (Mičetić-Turk in Šikić-Pogačar, 2011).

2.4.1 Klasične gojitvene metode

Ker imajo MKB, vključno z laktobacili, podobne prehranske in rastne zahteve, je za njihovo identifikacijo težko uporabiti zgolj klasične gojitvene metode, pri katerih bakterije najprej osamimo in gojimo na ustreznih selektivnih gojiščih ter jih nato identificiramo z ugotavljanjem fenotipskih oz. biokemijskih lastnosti (Dubernet in sod., 2002).

S konvencionalnimi gojitvenimi metodami lahko ugotavljamo le določene skupine oz. rodove probiotičnih bakterij v izdelku, ne moremo pa potrditi prisotnosti posameznih navedenih vrst, zato uporabimo tudi molekularno biološke metode (Bogovič Matijašić in sod., 2010).

2.4.2 Metoda barvanja po Gramu

Barvanje po Gramu je ena najpomembnejših tehnik barvanja v mikrobiologiji. Z neposrednim opazovanjem celic pod svetlobnim mikroskopom lahko razlikujemo bakterije glede na celično steno (Smole Možina, 2003).

Barvanje po Gramu je empirična metoda za diferenciacijo bakterij v dve skupini. Po Gramu pozitivne bakterije se obarvajo modro vijolično in po Gramu negativne rdeče. Značilno obarvanje je posledica razlik v zgradbi bakterijske celične stene. Po Gramu pozitivne bakterije imajo večjo vsebnost peptidoglikana in manjšo vsebnost lipidov kot po Gramu negativne bakterije (Cvitković-Špik in sod., 2010).

2.4.3 Metoda PCR

Prvi korak pri identifikaciji in selekciji bakterij je ustrezna priprava vzorca, z namenom zagotavljanja njegove reprezentativnosti. Mikrobiološke analize je potrebno opraviti v aseptičnih razmerah z uporabo aseptičnih pripomočkov (Bernardeau in sod., 2008).

Po oživitvi in osamitvi mikroorganizmov izvedemo identifikacijo bakterijskega rodu, ki temelji na fizioloških in biokemijskih tehnikah. Rezultati teh analiz so večinoma šibko selektivni, zato za dodatno potrditev bakterijskega rodu ali vrste velikokrat posežemo še po molekularnih tehnikah. Molekularni pristopi, kot je verižna reakcija s polimerazo (angl. Polymerase Chain Reaction, PCR), so bistvenega pomena za prepoznavanje bakterijskih organizmov na ravni rodu in tudi vrste. Raziskovalci so razvili hitre in enostavne postopke za natančno opredelitev rodov in vrst bakterij, z uporabo rodovno in vrstno specifičnih začetnih oligonukleotidov (Bernardeau in sod., 2008).

Metoda PCR je poleg različnih hibridizacijskih tehnik in novejših tehnologij DNA-čipov ena od molekularnih metod, ki se uporablja tudi za določanje in ugotavljanje prisotnosti mikroorganizmov v živilih in različnih drugih vzorcih.

Stopnje, ki so vključene v preiskavo vzorca z metodo PCR (Jeršek, 2009):

- priprava DNA,
- priprava in izvedba metode PCR,
- analiza pomnožkov.

2.4.3.1 Priprava DNA

Priprava DNA vključuje različne fizikalno kemijske in/ali encimske metode, s katerimi dobimo bolj ali manj čisto suspenzijo DNA, ki nam služi kot tarčna DNA v metodi PCR. Molekule DNA, ki so v notranjosti bakterijskih celic, iz celice sprostimo z lizo celične stene (s toplotnim, kemijskim, mehanskim ali encimskim delovanjem). Kot vzorec za metodo PCR lahko uporabimo suspenzijo vseh celičnih sestavin po celični lizi ali pa DNA še osamimo in očistimo (Jeršek, 2009).

2.4.3.2 Princip metode PCR

Princip same metode PCR je *in vitro* pomnožitev dela tarčne DNA z DNA-polimerazo v cikličnem termostatu. Termostabilna DNA-polimeraza je encim, ki so ga osamili iz termofilnih bakterij vrste *Thermus aquaticus*. Encim ima optimalno temperaturo delovanja pri 72 °C in ohranja svojo aktivnost tudi, če je krajši čas izpostavljen višjim temperaturam, ki so potrebne za denaturacijo dvoverižne DNA. Poseben ciklični termostat (angl. PCR cycler) zagotavlja zvezno spreminjanje temperaturno/časovnih režimov v ciklu, ki zajema tri faze (Jeršek, 2009; Boyer, 2005):

- denaturacija/razdvajanje dvoverižne DNA v dve enoverižni verigi s povišanjem temperature na 95 °C (npr.: 95 °C, 30 s),
- prileganje začetnih oligonukleotidov na komplementarno mesto tarčne DNA pri temperaturi, ki je odvisna od sestave začetnih oligonukleotidov. Navadno se mešanica ohladi na 37-55 °C. Začetna oligonukleotida sta na matrici orientirana tako, da sta njuna 3'-konca usmerjena drug proti drugemu (npr.: 55-72 °C, 5-60 s),
- podaljševanje molekule DNA s pomočjo termostabilnega encima DNA-polimeraza (npr.: 72 °C, 60 s).

Vsaka novo sintetizirana veriga DNA lahko služi kot matrica, koncentracija tarčne DNA torej narašča eksponentno (Boyer, 2005).

V vsakem ciklu se število tarčnih kopij podvoji. S 25 do 35 ponovitvami cikla se koncentracija pomnoženega dela DNA eksponentno pomnoži tudi do 10^9 kopij (Jeršek, 2009).

Za uspešno pomnoževanje dela DNA je potrebno pripraviti reakcijsko mešanico, ki jo sestavljajo (Jeršek, 2009):

- tarčne molekule DNA,
- termostabilna DNA-polimeraza,
- mešanica deoksinukleotid trifosfatov (dNTP),
- ioni Mg^{2+} ,
- reakcijski pufer,

- par začetnih oligonukleotidov.

Vsak potek metode PCR moramo, glede na izvedbo in namen, optimizirati z vidika temperaturno/časovnih režimov v ciklu, števila ponovitev cikla in sestave reakcijske mešanice (Jeršek, 2009).

Izbira začetnih oligonukleotidov je odvisna od vrste metode PCR in vrste preiskovanih mikroorganizmov. Zaporedja baz adenin, timin, gvanin, citozin v začetnih oligonukleotidih so komplementarna delu tarčne DNA. Pri metodi PCR pomnožimo del tarčne DNA med izbranimi začetnima oligonukleotidoma. Število pomnožkov, katerih velikost je določena z razdaljo med začetnima oligonukleotidoma, se podvoji v vsakem ciklu (Jeršek, 2009).

Pomnožke metode PCR najenostavneje analiziramo z agarozno gelsko elektroforezo tako, da njihovo velikost primerjamo z molekularnim označevalcem z znanimi velikostmi odsekov. Specifičnost pomnožitve moramo kontrolirati s hibridizacijo z interno DNA-sondo, z restrikcijo ali s sekveniranjem pomnožka (Jeršek, 2009).

PCR je hitra, občutljiva in natančna metoda, ki je tudi dobro ponovljiva. Pomanjkljivo je, da ne omogoča razlikovanja med živimi in neživimi celicami, kar lahko vodi do lažno pozitivnih rezultatov. Živih mikroorganizmov je lahko več kot kultivabilnih. Vpliv mrtvih celic izključimo tako, da DNA osamimo iz kolonij (gojitvena tehnika) in ne neposredno iz izdelka (od gojenja neodvisna tehnika) (Jeršek, 2009).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 NAČRT POSKUSA

Naš poskus je bil razdeljen na dva dela.

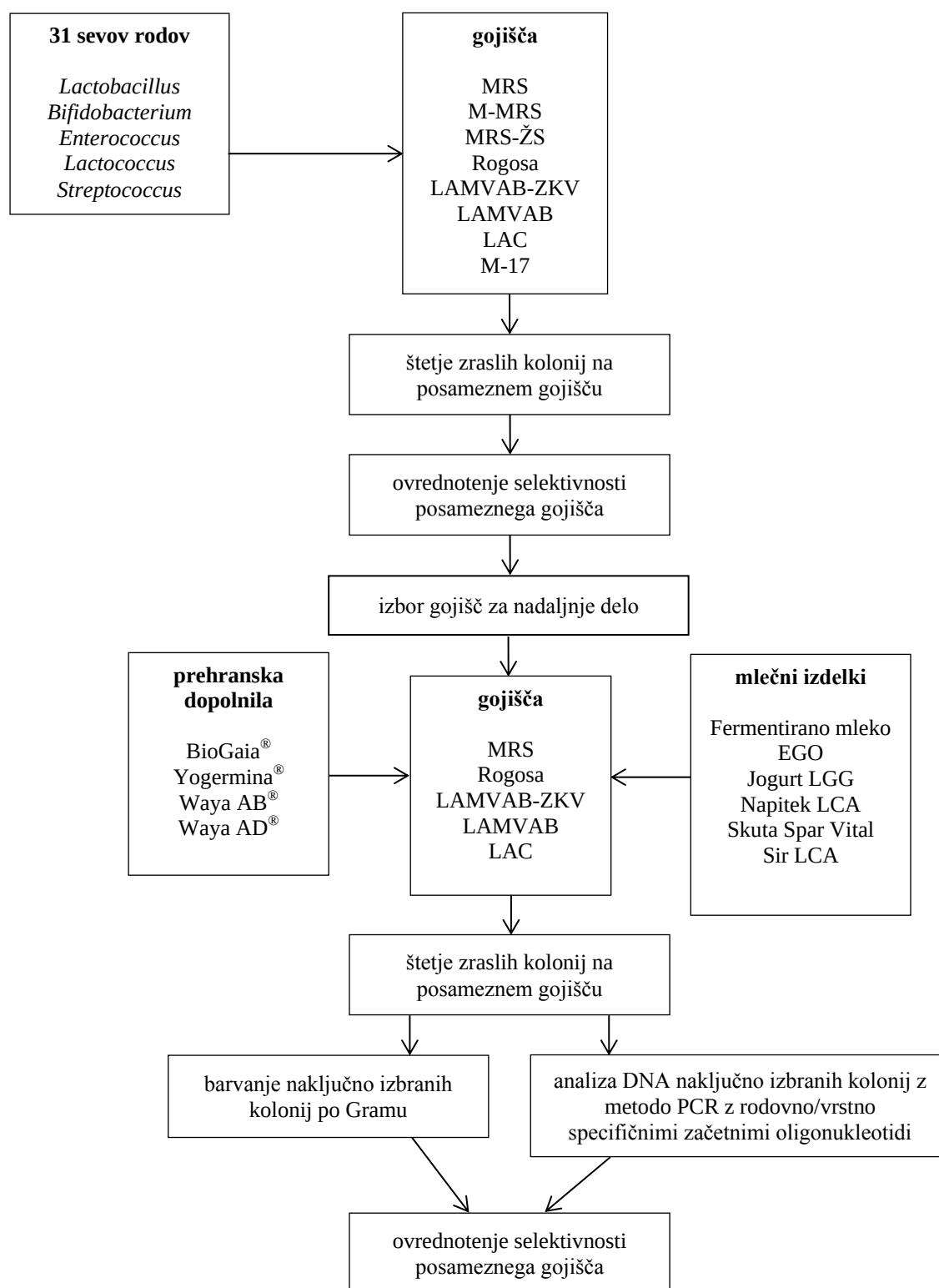
V prvem delu smo na podlagi literaturnih podatkov najprej pripravili izbor gojitvenih in selektivnih gojišč, ki smo jih nato uporabili pri analizi probiotičnih laktobacilov. Selektivnost celotnega nabora gojišč za laktobacile smo najprej preverili z nacepljanjem čistih bakterijskih sevov laktobacilov ter drugih MKB in bifidobakterij, ki se pogosto uporabljajo v probiotičnih izdelkih. Na ta način smo dobili grobo oceno, katera gojišča izkazujejo najbolj obetaven nivo selektivnosti in jih izbrali za nadaljnje delo.

V drugem delu poskusa smo selektivnost izbranih gojišč preverili z nacepljanjem prehranskih dopolnil in mlečnih izdelkov, v katerih so bili prisotni samo laktobacili ali laktobacili v kombinaciji z drugimi probiotičnimi bakterijami.

Odločili smo se za analizo štirih prehranskih dopolnil in petih mlečnih izdelkov. Prehranska dopolnila smo kupili v lekarni in jih do analize hranili na sobni temperaturi. Mlečne izdelke smo kupili v trgovini z živili in jih do analize hranili v hladilniku. Izdelke smo analizirali znotraj roka uporabe. Poskus smo izvedli v času od februarja do junija 2011.

V nalogi smo uporabili naslednje metode dela:

- aseptična priprava gojišč, raztopin in dodatkov,
- konvencionalne mikrobiološke metode (metode nacepljanja, osamitev laktobacilov in drugih probiotičnih bakterij iz izdelkov, inkubacija v aerobnih in anaerobnih razmerah, štetje KE na gojitvenih in selektivnih gojiščih za ugotavljanje števila zraslih laktobacilov),
- barvanje po Gramu in pregled pod mikroskopom za ugotavljanje morfoloških lastnosti laktobacilov,
- osamitev DNA in potrjevanje rodovne/vrstne specifičnosti zraslih laktobacilov in ostalih probiotičnih bakterij na različnih gojiščih z metodo PCR.



Slika 1: Shema poteka raziskovalnega dela.

3.2 MATERIAL

3.2.1 Bakterijski sevi

Pri analizi smo uporabili bakterijske seve, ki se pogosto uporabljajo kot probiotiki v prehranskih dopolnilih in mlečnih izdelkih. V preglednici 1 so prikazani predstavniki laktobacilov, v preglednici 2 pa predstavniki ostalih MKB in bifidobakterij, ki smo jih pri analizi uporabili. Bakterijske seve smo pridobili na Inštitutu za mlekarstvo in probiotike.

Preglednica 1: Sevi laktobacilov, ki se pogosto uporabljajo v probiotičnih izdelkih, in smo jih uporabili pri določitvi selektivnosti gojišč.

Vrsta	Oznaka*
<i>Lb. acidophilus</i>	IM 116
<i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	IM 396
<i>Lb. casei</i>	IM 305
<i>Lb. casei immunitas</i>	IM 387
<i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	IM 348
<i>Lb. gasseri</i>	IM 105 IM 243
<i>Lb. johnsonii</i>	IM 240 IM 306
<i>Lb. paracasei</i>	IM 307
<i>Lb. paracasei ssp. paracasei</i>	IM 242
<i>Lb. plantarum</i>	IM 212 IM 308
<i>Lb. reuteri</i>	IM 109
<i>Lb. rhamnosus GG</i>	IM 239 IM 310
<i>Lb. salivarius</i>	IM 124
<i>Lb. salivarius ssp. salivarius</i>	IM 352

* IM=zbirka mikroorganizmov Inštituta za mlekarstvo in probiotike.

Preglednica 2: Sevi drugih bakterijskih vrst, ki se pogosto uporabljajo v probiotičnih izdelkih, in smo jih uporabili pri določitvi selektivnosti gojišč.

Vrsta	Oznaka*
<i>B. animalis ssp. animalis</i>	IM 417
<i>B. animalis ssp. lactis Bb-12</i>	IM 414
<i>B. animalis ssp. lactis</i>	IM 418
<i>B. bifidum</i>	IM 419
<i>B. infantis</i>	IM 343 IM 344
<i>B. longum</i>	IM 275
<i>E. faecium</i>	IM 273 IM 312
<i>Lc. lactis ssp. cremoris</i>	IM 241
<i>Lc. lactis ssp. lactis</i>	IM 407
<i>Str. thermophilus</i>	IM 377 IM 410

* IM= zbirka mikroorganizmov Inštituta za mlekarstvo in probiotike.

3.2.1.1 Bakterijski sevi, uporabljeni kot pozitivne kontrole v metodi PCR

Za metodo PCR smo glede na specifične začetne oligonukleotide (preglednica 6) uporabili DNA (predhodno osamljeno s komercialnim kompletom (3.2.8)) ustreznega seva (pozitivna kontrola):

- za rod *Lactobacillus*: *Lb. plantarum* IM 308,
- za vrsto *Lb. acidophilus*: *Lb. acidophilus* IM 116,
- za rod *Bifidobacterium*: *B. animalis* ssp. *lactis* IM 418,
- za rod *Enterococcus*: *E. faecium* IM 271,
- za rod *Lactococcus*: *Lc. lactis* ssp. *lactis* IM 407. Kot negativno kontrolo smo pri vsaki metodi PCR uporabili ustrezno reakcijsko mešanico za metodo PCR in namesto DNA dodali H₂O_{PCR} (mikrofiltrirana (miliQ) in avtoklavirana voda).

3.2.2 Probiotična prehranska dopolnila

Izdelki so prikazani v preglednici 3 in na sliki 2. Kupili smo jih v lekarni in jih do analize hranili pri sobni temperaturi. Analizirali smo jih pred iztekom roka uporabe.

Preglednica 3: Analizirana prehranska dopolnila.

Izdelek	Oblika	Deklarirane probiotične bakterije	Proizvajalec	Datum analize	Rok uporabe
BioGaia®	tablete	<i>Lactobacillus reuteri</i> Protectis	BioGaia AB, Švedska	21.4.2011	10.2011
Yogermana®	kapsule	<i>Lactobacillus acidophilus</i> La-14 <i>Lactobacillus paracasei</i> Lpc-37 <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Bifidobacterium lactis</i>	Dietetics Pharma s.r.l, Italija	27.4.2011	4.2012
Waya AB®	prašek	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus paracasei</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i> <i>Lactobacillus salivarius</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Bifidobacterium lactis</i> <i>Enterococcus faecium</i>	Medis d.o.o., Slovenija, v sodelovanju z Winclove, Nizozemska	31.3.2011	21.10.2012
Waya AD®	prašek	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i> <i>Lactobacillus salivarius</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Lactococcus lactis</i>	Medis d.o.o., Slovenija, v sodelovanju z Winclove, Nizozemska	18.4.2011	31.8.2011



Slika 2: Analizirana prehranska dopolnila (foto: Kocjan J.).

3.2.3 Probiotični mlečni izdelki

Izdelki so prikazani v preglednici 4 in na sliki 3. Kupili smo jih v trgovini z živili in jih do analize hranili v hladilniku. Analizirali smo jih pred iztekom roka uporabe.

Preglednica 4: Analizirani mlečni izdelki.

Izdelek	Okrajšava izdelka	Deklarirane probiotične bakterije	Proizvajalec	Datum analize	Rok uporabe
Probiotično fermentirano mleko Ego	Fermentirano mleko Ego	<i>Lactobacillus acidophilus</i> La-5 <i>Bifidobacterium</i> Bb-12	Ljubljanske mlekarne, Slovenija	12.5.2011	27.5.2011
B Aktiv LGG jogurt češnja	Jogurt LGG	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> Gorbach&Goldin ATCC 53103	Mlekarna Dukat, Hrvaška	9.5.2011	20.6.2011
Mlečni sadni probiotični napitek s sladili LCA Zelene doline	Napitek LCA	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Bifidobacterium</i> Bb-12	Mlekarna Celeia, Slovenija	19.5.2011	20.6.2011
SPAR Vital probiotična posneta skuta	Skuta Spar Vital	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Bifidobacterium</i> (nu-trish™)	Pomurske mlekarne, Slovenija	31.5.2011	1.6.2011
LCA probiotični sir Zelene doline	Sir LCA	<i>Lactobacillus casei</i>	Mlekarna Celeia, Slovenija	23.5.2011	17.6.2011



Slika 3: Analizirani mlečni izdelki (foto: Kocjan J.).

3.2.4 Trdna gojišča in dodatki

3.2.4.1 Trdna gojišča

Za gojitev bakterij smo uporabili trdna gojišča, ki so prikazana v preglednici 5.

Preglednica 5: Trdna gojišča.

Gojišče	Sestava gojišča		Vir/proizvajalec
	Osnovno gojišče	Dodatki	
MRS	MRS	/	De Man in sod., 1960/Merck, Darmstadt, Nemčija
M-MRS	MRS	maltoza	Hull in Roberts, 1984/Merck
MRS-ŽS	MRS	žolčne soli	Vinderola in Reinheimer, 2000/Merck
Rogosa	Rogosa	ocetna kislina	Rogosa in sod., 1951/Merck
LAMVAB	MRS	cistein hidroklorid bromkrezol zeleno vankomicin hidroklorid	Hartemink in sod., 1997/Merck
LAMVAB-ZKV	MRS	cistein hidroklorid bromkrezol zeleno vankomicin hidroklorid	IML PRO/Merck
LAC	MRS	ciprofloksacin klindamicin	ISO 20128:2006/Merck
M-17	M-17	/	Terzaghi in Sandine, 1975/Merck

/=gojišče ne vsebuje dodatkov

3.2.4.1.1 MRS

Gojišče MRS smo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck) tako, da smo zatehtali 68,2 g dehidriranega gojišča MRS agar ter dodali 1 l demineralizirane vode. Gojišče smo 15 minut avtoklavirali pri 118 °C.

3.2.4.1.2 M-MRS

Gojišče M-MRS smo sestavili sami. Za 1 l gojišča smo uporabili 10,0 g peptona iz kazeina, 4,0 g kvasnega ekstrakta, 20,0 g maltoze, 2,0 g dikalijevega hidrogen fosfata, 1,0 g Tween-

a 80, 2,0 g diamonijevega hidrogen citrata, 5,0 g natrijevega acetata, 0,2 g magnezijevega sulfata in 0,04 g manganovega sulfata. Sestavine smo raztopili v 1 l demineralizirane vode in umerili vrednost pH na 5,7. V stekleničke smo dodali 3 g agarja (Merck) in dodali 200 ml pripravljenega tekočega gojišča. Gojišče smo avtoklavirali 15 minut pri 118 °C.

3.2.4.1.3 MRS-ŽS

Gojišče MRS-ŽS smo pripravili iz 68,2 g dehidriranega gojišča MRS agar in 1 l demineralizirane vode po navodilu proizvajalca (Merck). Gojišče smo avtoklavirali 15 minut pri 118 °C. Tik pred prelivanjem na petrijeve plošče smo v 200 ml gojišča MRS dodali 2 ml založne raztopine žolčnih soli s koncentracijo 0,15 g/ml.

3.2.4.1.4 Rogosa

Gojišče Rogosa smo pripravili po navodilu proizvajalca (Merck). Zatehtali smo 14,9 g Rogosa agarja in dodali 200 ml demineralizirane vode ter mešanico segrevali v mikrovalovni pečici do popolne raztopitve. Nato smo gojišče ohladili v vodni kopeli na 45 °C in uravnali vrednost pH na 5,5 z dodatkom 260 µl ocetne kisline (Merck)/200 ml gojišča.

3.2.4.1.5 LAMVAB

Za pripravo gojišča LAMVAB smo zatehtali 52,2 g dehidriranega gojišča MRS bujon, ki smo mu dodali 0,25 g cistein-hidroklorida (Merck) in 0,025 g barvila bromkrezol zeleno (Fluka Chemie GmbH, Švica) ter vse skupaj raztopili v 1 l demineralizirane vode. Pred avtoklaviranjem smo gojišču uravnali vrednost pH na 5,0. V stekleničke smo zatehtali po 4 g agarja (Merck) in dodali po 200 ml pripravljenega tekočega gojišča. Gojišče smo avtoklavirali 15 minut pri 118 °C, ga ohladili v vodni kopeli na 45 °C in na 200 ml gojišča dodali 2 ml založne raztopine vankomicina (založna raztopina: 1 mg/ml) neposredno pred razlivanjem gojišča na petrijeve plošče. Končna koncentracija antibiotika v gojišču je bila 10 mg/l.

3.2.4.1.6 LAMVAB-ZKV

Gojišče LAMVAB-ZKV smo pripravili enako kot gojišče LAMVAB le s to razliko, da smo na 200 ml pripravljenega gojišča dodali manjšo količino založne raztopine vankomicina, in sicer 200 µl založne raztopine vankomicina (založna raztopina: 1 mg/ml). Končna koncentracija antibiotika v gojišču je bila 1 mg/l.

3.2.4.1.7 LAC

Gojišče LAC smo pripravili iz tekočega gojišča MRS (Merck) z dodanima antibiotikoma ciprofloksacin in klindamicin. Zatehtali smo 52,2 g dehidriranega gojišča MRS bujon, ga raztopili v 1 l demineralizirane vode in mu pred avtoklaviranjem umerili vrednost pH na 6,7 (po avtoklaviranju je vrednost pH=6,2±2). Gojišču smo dodali 15 g/l agarja (Merck), ga avtoklavirali 15 minut pri 118 °C ter ga nato ohladili v vodni kopeli na 45 °C.

Neposredno pred razlivanjem na petrijeve plošče smo dodali še 5 ml založne raztopine ciprofloksacina/l gojišča in 0,5 ml založne raztopine klindamicina/l gojišča.

3.2.4.1.8 M-17

Gojišče M-17 smo pripravili po navodilu proizvajalca (Merck) tako, da smo zatehtali 55 g dehidriranega gojišča M-17 agar ter dodali 1 l demineralizirane vode. Gojišče smo avtoklavirali 15 minut pri 121 °C.

3.2.4.2 Dodatki

3.2.4.2.1 Založna raztopina ciprofloksacina

Za pripravo založne raztopine antibiotika ciprofloksacin smo zatehtali 20 mg ciprofloksacin hidroklorida (Fluka, Sigma-Aldrich, Buchs, Kitajska) in ga raztopili v 10 ml demineralizirane vode. Raztopino smo prefiltrirali skozi mikrofilter z velikostjo por 0,22 µm (Millipore) ter hranili pri -20 °C. Končna koncentracija antibiotika v gojišču je bila 10 mg/l (ISO 20128:2006). Prisotnost ciprofloksacina omogoča selektivno rast laktobacilov skupine *Lb. acidophilus*.

3.2.4.2.2 Založna raztopina klindamicina

Za pripravo založne raztopine antibiotika klindamicin smo zatehtali 2 mg klindamicin hidroklorida (Fluka, Sigma-Aldrich) in ga raztopili v 10 ml demineralizirane vode. Raztopino smo prefiltrirali skozi mikrofilter z velikostjo por 0,22 µm (Millipore) ter hranili pri -20 °C. Končna koncentracija antibiotika v gojišču je bila 0,1 mg/l (ISO 20128:2006). Prisotnost klindamicina omogoča selektivno rast laktobacilov skupine *Lb. acidophilus*.

3.2.4.2.3 Založna raztopina vankomicina

Za pripravo založne raztopine antibiotika vankomicin smo zatehtali 10 mg vankomicin hidroklorida (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija) in ga raztopili v 10 ml demineralizirane vode (založna raztopina: 1 mg/ml). Raztopino smo prefiltrirali skozi mikrofilter z velikostjo por 0,22 µm (Millipore) ter hranili pri -20 °C.

3.2.4.2.4 Založna raztopina žolčnih soli

Za pripravo založne raztopine žolčnih soli smo zatehtali 3 g žolčnih soli (Bile salts No3; Biolife, Milano, Italija) in jih raztopili v vodi do skupnega volumna 20 ml. Založno raztopino žolčnih soli smo sterilizirali s filtracijo preko mikrofiltra z velikostjo por 0,22 µm (Millipore) ter hranili v hladilniku.

3.2.5 Tekoče gojišče

3.2.5.1 MRS

Tekoče gojišče smo pripravili po navodilu proizvajalca (Merck) tako, da smo zatehtali 52,2 g dehidriranega gojišča MRS bujon ter dodali 1 l demineralizirane vode. Gojišče smo razdelili po 10 ml v epruvete in avtoklavirali 15 minut pri 118 °C.

3.2.6 Raztopini za razredčevanje

Pri raziskovalnem delu smo kot raztopini za razredčevanje uporabili Ringerjevo raztopino raztopino (0,25-kratna) in natrijev citrat.

3.2.6.1 Ringerjeva raztopina

Ringerjevo raztopino (0,25-kratna) smo pripravili po navodilu proizvajalca (Merck), kjer smo 2 Ringerjevi tableti raztopili v 1 l demineralizirane vode. Nato smo raztopini umerili vrednost pH na $6,9 \pm 0,2$ pri 25 °C (ISO 6887-5:2010), jo razdelili v epruvete po 9 ml in avtoklavirali 15 minut pri 121 °C. Raztopino smo uporabili za razredčevanje po Kochu.

3.2.6.2 Natrijev citrat

Za pripravo raztopine natrijevega citrata smo raztopili 20,0 g trinatrijevega citrat dihidrata (Merck) v 1 l demineralizirane vode. Umerili smo vrednost pH na $7,5 \pm 0,2$ pri 25 °C (ISO 6887-5:2010). Raztopino smo avtoklavirali 15 minut pri 121 °C.

3.2.7 Reagenti za barvanje po Gramu

Za barvanje po Gramu smo uporabili komercialni komplet Color Gram 2 in postopek izvedli po navodilu proizvajalca (Bio-Mérieux, Marcy-L'Etoile, Francija), ki vsebuje naslednje reagente:

- barvilo kristal vijolično,
- lugol,
- mešanica etanola in acetona (1:1),
- barvilo safranin.

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

3.2.8 Reagent za osamitev DNA na osnovi kolonije

Za osamitev DNA iz kolonije smo uporabili:

- 5× GoTaq[®] pufer za polimerazo z 1,5 mM MgCl₂ (Promega, Madison, ZDA).

3.2.9 Reagenti za metodo PCR

Za metodo PCR smo uporabili:

- mešanico dNTP-jev, vsak v koncentraciji 10 mM (Fermentas, Vilna, Litva),
- 10× GoTaq[®] Flexi pufer za polimerazo (Promega),
- 25 mM MgCl₂ (Promega),
- GoTaq[®] Flexi DNA-polimeraza, 5 U/μl (Promega),
- začetne oligonukleotide, 5 μM (Invitrogen, Molecular probes, Oregon, ZDA),
- H₂O_{PCR}.

V preglednici 6 so prikazani začetni oligonukleotidi, ki smo jih uporabljali v metodi PCR.

Preglednica 6: Začetni oligonukleotidi, specifični za posamezen bakterijski rod oz. vrsto.

Tarčni rod/vrsta bakterij	Oznaka začetnih oligonukleotidov	Pričakovana velikost pomnožka (bp)	Vir
<i>Lactobacillus</i>	LbLMA-1rev / R16-1	250	Dubernet in sod., 2002
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Lac I / Lac II	759	Ward in sod., 1999
<i>Bifidobacterium</i>	Bif 164-f / Bif 662-r	520	Satokari in sod., 2000
<i>Enterococcus</i>	E1 / E2	737	Deasy in sod., 2000
<i>Lactococcus</i>	L1 / L2	587	Deasy in sod., 2000

3.2.10 Reagenti za gelsko elektroforezo

3.2.10.1 Reagenti za analizo pomnožkov z gelsko elektroforezo

Uporabili smo naslednje reagente:

- agarosa (SeaKem[®] LE Agarose, Lonza, Rockland, ZDA),
- DNA barvilo SYBR[®] Safe DNA (Invitrogen),
- 0,5-kratni pufer TAE, pH=8,
- molekulska označevalca pomnožkov DNA-GeneRuler[®] 100 bp DNA Ladder in 1 kb DNA Ladder (Fermentas).

3.2.10.2 Pufer TAE (tris acetatni pufer)

Za pripravo 50-kratne založne raztopine pufra TAE (pH=8) smo uporabili 242 g tris baze (Sigma Chemical, Steinheim, Nemčija), 100 ml 0,5 M EDTA (Sigma Chemical) ter 57,1 ml ledocetne kisline (Fluka, Buchs, Švica). Za nadaljnje delo smo uporabljali 0,5-kratni pufer TAE.

3.3 LABORATORIJSKA OPREMA

- Laboratorijska oprema: avtomatske in klasične pipete, cepilne zanke, halja, hokej palčke, kuhalnik, mikrocentrifugirke 1,5 ml in 2 ml, nastavki za pipete, pincete, petrijeve plošče, plinski gorilnik, steklovina, sterilni zobotrebc, stojala, tehtnice, zaščitne rokavice,
- avtoklav (A-21 CA Kambič, Semič, Slovenija),
- anaerobne posode (GENbox) in generatorji anaerobnih razmer (BioMérieux, Marcy, L'Etoile, Francija),

- brezprašna komora (M12, Iskra Pio, Slovenija),
- ciklični termostat (Mastercycler gradient, Eppendorf, Nemčija; Gene Cycler BIO-RAD, ZDA),
- centrifuga (MIKRO 22 R, Hettich Zentrifugen, Nemčija; Sigma 3K18, Nemčija),
- elektronski števec (EŠKO, 7L, LABO, Ljubljana, Slovenija),
- gnetilnik (Bag Mixer 400, Interscience, Saint-Nom-la-Bretèche, Francija),
- hladilna omara (Gorenje, Velenje, Slovenija; LTH, Škofja Loka, Slovenija),
- inkubator (BT150, Krokter Marijan, Slovenija),
- komora za pripravo mešanic za metodo PCR (UV Sterilizing cabinets and workstation UVP),
- mikrovalovna pečica (32L Bosch, Nemčija),
- pH meter (Toledo MP 220, Mettler, Nemčija),
- SUB-CELL GT (BIO-RAD),
- svetlobni mikroskop (Reichert, Avstrija),
- tehnica (EB-300M Železniki, Slovenija),
- transiluminator Chemi Genius² (Bio imaging system),
- vodna kopel (WB-30, Kambič, Slovenija),
- vrtinčni mešalnik (Vibromix Železniki, Slovenija),
- zamrzovalna omara (Gorenje, Slovenija).

3.4 METODE

Za ugotavljanje selektivnosti gojišč za kultivacijo bakterij iz prehranskih dopolnil in mlečnih izdelkov smo uporabili naslednje metode:

- Standardne mikrobiološke tehnike:
 - gojitvene tehnike z uporabo gojitvenih in selektivnih gojišč za laktobacile,
 - štetje kolonij z elektronskim števcem,
 - ugotavljanje morfoloških lastnosti bakterij (barvanje po Gramu, mikroskopiranje s svetlobnim mikroskopom).
- Molekularno-biološke metode:
 - osamitev DNA iz zraslih kolonij,
 - metoda PCR z rodovno in vrstno specifičnima začetnima oligonukleotidoma,
 - analiza pomnožkov metode PCR s pomočjo agarozne gelske elektroforeze.

3.4.1 Priprava bakterijskih sevov, vzorcev prehranskih dopolnil in mlečnih izdelkov in kvantifikacija bakterij z metodo štetja kolonij na trdnem gojišču

Še pred začetkom mikrobiološke analize prehranskih dopolnil in mlečnih izdelkov smo preverili stanje embalaže, podatke o vzorcu, ki so napisani na deklaraciji in morebitna odstopanja od značilnih lastnosti. Zapisali smo si rok uporabe vzorca ter lastnosti vzorca. Pri embaliranih živilih smo embalažo obrisali s 70 % etanolom in jo ožgali s plamenom v primerih, ko je bila embalaža steklo ali kovina. Embalažo smo odprli aseptično in vzorec odvzeli s sterilnim priborom (Jeršek, 2013).

Pripravili smo vzorce bakterijskih sevov, prehranskih dopolnil in mlečnih izdelkov.

3.4.1.1 Bakterijski sevi

Uporabili smo vzorce čistih bakterijskih sevov iz zamrznjenih kultur (-80 °C), ki so shranjene v mikrobnih zbirkah Inštituta za mlekarstvo in probiotike. Vzorce smo revitalizirali s cepitvijo v ustrezno tekoče gojišče, in nato kvantitativno ovrednotili z metodo štetja kolonij na trdnem gojišču. Uporabili smo gojišča MRS (anaerobno, aerobno), M-MRS (anaerobno, aerobno), MRS-ŽS, Rogosa (anaerobno, aerobno), LAMVAB-ZKV, LAMVAB, LAC in M-17. Gojišča smo 3 dni inkubirali pri 37 °C (preglednica 7).

3.4.1.2 Probiotična prehranska dopolnila

Prehranska dopolnila, ki smo jih analizirali, so bila v obliki kapsul, praška in tablet.

Embalažo kapsul smo ob ognju sterilno odprli in v aseptičnih razmerah zatehtali 1 g vsebine v sterilno epruveto.

Vrečko s praškom smo ob ognju sterilno odprli in v aseptičnih razmerah zatehtali 1 g vsebine v sterilno epruveto.

Pri izdelku v obliki tablet, smo ob ognju tablete najprej strli v terilnici ter nato v aseptičnih razmerah zatehtali 1 g vsebine v sterilno epruveto.

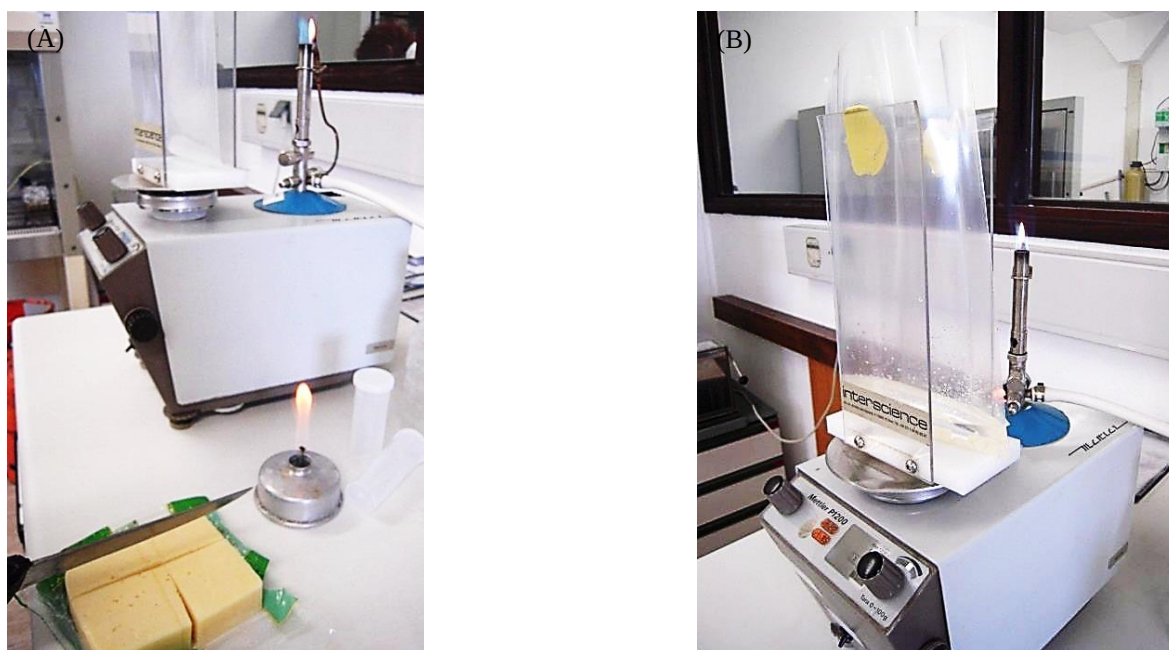
Dodali smo 9 ml Ringerjeve raztopine (0,25-kratna) in vsebino premešali. V vzorcih smo mlečnokislinske bakterije kvantitativno ovrednotili z metodo štetja kolonij na trdnem gojišču. Postopek smo izvajali v aseptičnih razmerah z uporabo sterilne opreme.

3.4.1.3 Probiotični mlečni izdelki

Embalažo sira LCA in skute Spar Vital smo ob ognju sterilno odprli in v aseptičnih razmerah zatehtali 10 g vsebine v sterilno vrečko, kot je prikazano na sliki 4(A). Dodali smo 90 g natrijevega citrata, ker imata živila visoko vsebnost maščob. Vzorca smo homogenizirali v gnetilniku, kot lahko vidimo na sliki 4(B), da smo zagotovili čim bolj enakomerno porazdelitev mikroorganizmov v vzorcu.

Embalažo fermentiranega mleka Ego, jogurta LGG in napitka LCA smo odprli ob ognju in v aseptičnih razmerah zatehtali 1 g vsebine v sterilno epruveto.

Dodali smo 9 ml Ringerjeve raztopine (0,25-kratna) in vsebino premešali. V vzorcih smo mlečnokislinske bakterije kvantitativno ovrednotili z metodo štetja kolonij na trdnem gojišču. Postopek smo izvajali v aseptičnih razmerah z uporabo sterilne opreme.



Slika 4: Aseptična priprava vzorca sira LCA (A) in homogenizacija vzorca sira LCA (B).

Petrijeve plošče z gojišči in vzorci smo inkubirali pri razmerah, ki so prikazane v preglednici 7. Anaerobne razmere smo zagotovili z uporabo sistema GenBox in generatorjev anaerobnih razmer (BioMérieux) kot je prikazano na sliki 5.



Slika 5: Notranjost inkubatorja in anaerobne razmere z uporabo GENbox-a ter vrečk za zagotavljanje anaerobnih razmer.

Preglednica 7: Gojišča in razmere inkubacije čistih bakterijskih kultur ter cepljenih prehranskih dopolnil in mlečnih izdelkov.

Gojišče	Razmere inkubacije	
MRS	aerobno	37 °C/3 dni
		30 °C*/3 dni
	anaerobno	37 °C/3 dni
		30 °C*/3 dni
M-MRS	aerobno	37 °C/3 dni
	anaerobno	37 °C/3 dni
MRS-ŽS	anaerobno	37 °C/3 dni
Rogosa	aerobno	37 °C/3 dni
		30 °C*/3 dni
	anaerobno	37 °C/3 dni
		30 °C*/3 dni
LAMVAB	anaerobno	37 °C/3 dni
		30 °C*/3 dni
LAMVAB-ZKV	anaerobno	37 °C/3 dni
		30 °C*/3 dni
LAC	anaerobno	37 °C/3 dni
		30 °C*/3 dni
M-17	aerobno	37 °C/3 dni

*=T inkubacije pri cepitvi sira LCA

Po končani inkubaciji smo prešteli število zraslih kolonij na petrijevih ploščah s pomočjo elektronskega števca. Število kolonijskih enot (KE) v mililitru oz. v gramu izdelka smo izračunali po formuli (1). Kot števne plošče smo upoštevali tiste petrijevke, na katerih je zrastle med 30 in 300 kolonijskih enot (ISO 7218:2007).

$$N = \frac{\Sigma C}{n1+0,1*n2 *R} \quad \dots (1)$$

Legenda:

N...število mikroorganizmov v vzorcu (KE/ml oz. KE/g),

Σ C...vsota kolonij, zraslih na dveh števnihih ploščah zaporednih razredčitev, kjer vsaj ena vsebuje najmanj 30 kolonij in največ 300 kolonij (30-300 kolonij),

n1...število petrijevk-gojišč pri prvi razredčitvi vzorca,

n2... število petrijevk-gojišč pri drugi razredčitvi vzorca,

R...prva razredčitev vzorca, pri kateri smo prešteli kolonije.

3.4.2 Ugotavljanje morfoloških lastnosti laktobacilov

Za ugotavljanje morfoloških značilnosti smo izbrali kolonije na posameznih gojiščih in iz njih pripravili preparate z metodo barvanja po Gramu. Opazovali smo obliko in velikost celic, formacijo celic in reakcijo na barvanje po Gramu.

Preparate smo pripravili tako, da smo ob gorilniku na objektno stekelce kanili kapljico sterilne fiziološke raztopine in vanjo s cepilno zanko vmešali vzorec kolonije. Razmaz smo pustili na zraku, da se posuši in ga fiksirali s trikratnim potegom skozi plamen gorilnika (Jeršek, 2008).

Postopek barvanja (Jeršek, 2008):

1. barvanje z barvilom kristal violet, pustimo 2 minuti in speremo z vodo,

2. barvanje z barvilom lugol, pustimo 2 minuti in speremo z vodo,
3. razbarvanje z alkoholom (96 %), speremo z vodo,
4. barvanje z barvilom safranin, pustimo 30 sekund, speremo z vodo,
5. preparat osušimo s papirnato brisačko.

S pomočjo svetlobnega mikroskopa in imerzijskega olja smo preparate opazovali pri 1000-kratni povečavi (Jeršek, 2008).

3.4.3 Metoda PCR

3.4.3.1 Osamitev DNA iz kolonij

Za osamitev DNA smo uporabili naključno izbrane kolonije, ki so zrasle na gojiščih po nacepljanju prehranskih dopolnil in mlečnih izdelkov. S površine gojišč smo s sterilnimi zobotrebci v aseptičnih razmerah pobrali naključno izbrane kolonije, jih prenesli v mikrocentrifugirke ter dodali 15 µl 5×GoTaq Flexi pufra. Nato smo mikrocentrifugirke prenesli v ciklični termostat in celice lizirali s pomočjo segrevanja 15 minut pri 99 °C. Tako osamljeno bakterijsko DNA smo hranili pri -20 °C za nadaljnje analize.

3.4.3.2 Priprava reakcijske mešanice

Reakcijske mešanice za metodo PCR smo pripravili s kompletom GoTaq® Flexi DNA Polymerase. Priprava je potekala v komori za pripravo mešanic za metodo PCR, prikazani na sliki 6. Komoro smo pred in po delu ustrezno razkužili in osvetlili z UV lučjo za najmanj 30 minut. Pri delu smo uporabljali zaščitne rokavice za enkratno uporabo. Vse uporabljane kemikalije in reagente smo ves čas hranili na ledu.



Slika 6: Komora za pripravo reakcijske mešanice za metodo PCR.

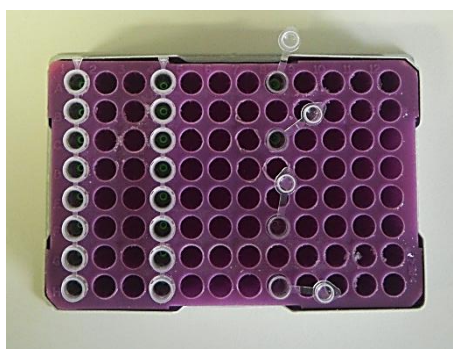
Glede na število vzorcev DNA, vključno s pozitivno in negativno kontrolo, smo izračunali volumnne posameznih sestavin za celokupno reakcijsko mešanico. Preglednica 8 prikazuje sestavo reakcijske mešanice v skupnem volumnu 20 µl za posamezno metodo PCR, specifično za bakterijske rodove *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus* ter bakterijsko vrsto *Lb. acidophilus*.

Preglednica 8: Sestava 20 μ l reakcijske mešanice za metodo PCR.

Količina	Sestavina
2 μ l	DNA vzorec v GoTaq [®] Flexi pufer za polimerazo (5 $\times$)
2 μ l	GoTaq [®] pufer za polimerazo (5 $\times$)
1,2 μ l	MgCl ₂ (25 mM)
0,1 μ l	začetni oligonuklotid 1 (5 μ M)
0,1 μ l	začetni oligonuklotid 2 (5 μ M)
0,2 μ l	dNTP (10 mM)
0,1 μ l	GoTaq [®] DNA polimeraza (5 U/ μ l)
14,3 μ l	H ₂ O _{PCR}

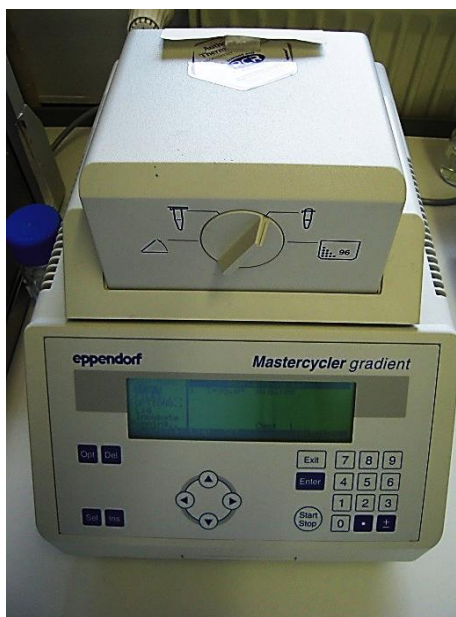
Reagente smo pred uporabo premešali na vrtinčniku. Pri pripravi celokupne reakcijske mešanice za metodo PCR smo odpipetirali izračunan volumen vode, dodali ostale reagente in na koncu GoTaq[®] DNA polimerazo. Zatem smo reakcijsko mešanico premešali na vrtinčniku in jo razdelili v mikroeprovete za metodo PCR po 18 μ l ter nato vsaki dodali še po 2 μ l posameznega vzorca DNA. Mikroeprovete s pripravljenimi reakcijskimi mešanicami za metodo PCR prikazuje slika 7.

Pri metodi PCR dodamo še pozitivno in negativno kontrolo. Za pozitivno kontrolo vzamemo preverjeno DNA, ki je značilna za posamezen rod oz. vrsto. Negativno kontrolo predstavlja reakcijska mešanica za metodo PCR, ki ji namesto DNA dodamo H₂O_{PCR}.



Slika 7: Mikroeprovete z reakcijsko mešanico.

Metodo PCR začnemo izvajati, ko mikroeprovete prenesemo v ciklični termostet (slika 8) ter vanj vnesemo ustrezen program za posamezno metodo PCR.



Slika 8: Ciklični termostat za izvedbo metode PCR.

3.4.3.3 Časovno temperaturni potek metode PCR

V metodi PCR smo kot tarčno DNA uporabili osamljeno DNA iz kolonij, ki so zrasle po nacepljanju vzorcev prehranskih dopolnil in mlečnih izdelkov na gojitvenih in selektivnih gojiščih. Osamljeno DNA smo z metodo PCR pomnoževali z za rod oz. vrsto specifičnima začetnima oligonukleotidoma (preglednica 6).

V preglednici 9 so prikazane razmere metode PCR, specifične za bakterijski rod ali bakterijsko vrsto.

Preglednica 9: Razmere metode PCR, uporabljene za določanje posameznega rodu oz. vrste.

Rod/vrsta	Faza	Razmere	Število ponovitev	Vir
<i>Lactobacillus</i>	Začetna denaturacija DNA	95 °C, 3 min	1	Dubernet in sod., 2002
	Denaturacija DNA	95 °C, 30 s		
	Prileganje začetnih oligonukleotidov	55 °C, 30 s	40	
	Podaljševanje verige DNA	72 °C, 30 s		
	Zaključno podaljševanje verige DNA	75 °C, 5 min	1	
<i>Bifidobacterium</i>	Začetna denaturacija DNA	95 °C, 3 min	1	Satokari in sod., 2000
	Denaturacija DNA	95 °C, 30 s		
	Prileganje začetnih oligonukleotidov	62 °C, 30 s	35	
	Podaljševanje verige DNA	72 °C, 40 s		
	Zaključno podaljševanje verige DNA	72 °C, 5 min	1	
<i>Enterococcus</i>	Začetna denaturacija DNA	95 °C, 3 min	1	Deasy in sod., 2000
	Denaturacija DNA	95 °C, 1 min		
	Prileganje začetnih oligonukleotidov	60 °C, 1 min	35	
	Podaljševanje verige DNA	72 °C, 1 min		
	Zaključno podaljševanje verige DNA	75 °C, 5 min	1	
<i>Lactococcus</i>	Začetna denaturacija DNA	95 °C, 5 min	1	Deasy in sod., (2000)
	Denaturacija DNA	94 °C, 1 min		
	Prileganje začetnih oligonukleotidov	55 °C, 1 min	25	
	Podaljševanje verige DNA	72 °C, 1 min		
	Zaključno podaljševanje verige DNA	72 °C, 5 min	1	
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Začetna denaturacija DNA	95 °C, 3 min	1	Ward in sod., (1999)
	Denaturacija DNA	95 °C, 30 s		
	Prileganje začetnih oligonukleotidov	62 °C, 30 s	35	
	Podaljševanje verige DNA	72 °C, 40 s		
	Zaključno podaljševanje verige DNA	72 °C, 5 min	1	

3.4.3.4 Analiza pomnožkov z agarozno gelsko elektroforezo

Pomnožke metode PCR smo analizirali z agarozno gelsko elektroforezo, tako da smo njihovo velikost primerjali z molekulskimi označevalci z znano velikostjo odsekov DNA (100 bp in 1 kb) (Jeršek, 2009).

Molekule DNA same po sebi niso obarvane, zato smo jih po končani elektroforezi detektirali z barvanjem gela v raztopino barvila SYBR® Safe, ki se veže v dvoverižno DNA (Abram in sod., 2006).

3.4.3.5 Priprava agaroznega gela

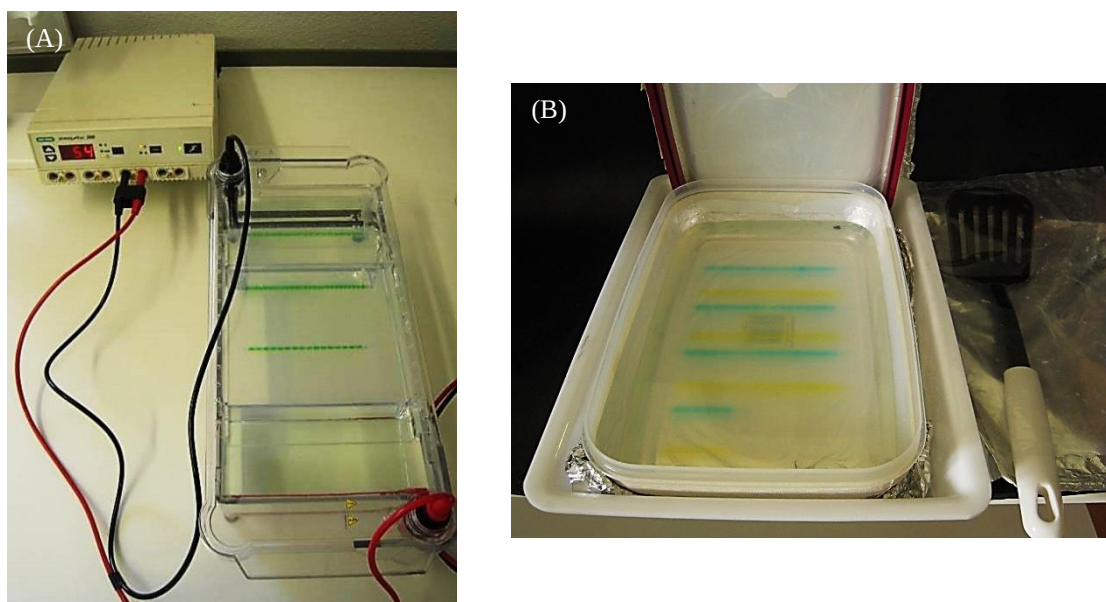
Priprava 100 ml 1,0 % agaroznega gela:

- Zatehtali smo 1,0 g agaroze in dodali 100 ml 0,5-kratnega TAE pufra (vrednost pH 8,0) v laboratorijsko stekleničko.
- Stekleničko z vsebino smo segrevali v mikrovalovni pečici do vrenja oz. toliko časa, da je postala raztopina bistra. Ohladili smo jo v vodni kopeli na približno 50 °C.
- Pripravili smo model za elektroforezo z glavniki različnih velikosti in gel vlili vanj.
- Ko se je gel strdil in polimeriziral, smo glavnike previdno odstranili, in tako dobili prazne žepke za nanašanje vzorcev. Gel smo prenesli v aparaturu za elektroforezo z 0,5-kratnim TAE pufrom.

3.4.3.6 Potek agarozne gelske elektroforeze

Elektroforeza je potekala po naslednjem zaporedju:

- Na gel smo v prazne žepke nanesli po 20 μ l pomnožkov metode PCR ter pozitivno in negativno kontrolo, velikost pomnožkov metode PCR pa smo ovrednotili s pomočjo molekularnih označevalcev z znano velikostjo odsekov DNA 100 bp ali 1 kb, ki smo jih na gel nanesli po 2,5 μ l.
- Elektroforezo smo vodili pri 90 ali 95 V od 60 do 105 minut; odvisno od velikosti gela in produktov. Na sliki 9(A) je predstavljen potek elektroforeze.
- Gel smo po končani elektroforezi izpostavili delovanju DNA barvila SYBR[®] Safe, kar lahko opazimo na sliki 9(B). Barvilo se veže na odseke pomnožene DNA.
- Dokumentacijo gela smo izvedeli s pomočjo transiluminatorja s presvetljevanjem z UV-svetlobo, kjer je barvilo SYBR[®] Safe fluoresciralo. Gel smo računalniško dokumentirali.



Slika 9: Agarozna gelska elektroforeza (A) in barvanje gela z barvilom SYBR[®] Safe (B).

3.4.4 Statistična obdelava podatkov

Podatke smo statistično ovrednotili s programskim orodjem SPSS za Windows, verzija 22.0 (angl. Statistical Package for the Social Sciences), ki vsebuje nabor orodij za podatke in napovedovalno analitiko. Parametrične teste uporabljamo, kadar imamo zagotovljeno normalno distribucijo podatkov, torej so podatki razporejeni po Gaussovi krivulji. V primeru, da omenjeni pogoj ni izpolnjen, se poslužujemo uporabe neparametričnih testov. Za analizo naših podatkov smo uporabili parametrični t-test za neodvisne vzorce in neparametrični Mann-Whitney U test. Razlike smo sprejemali pri 5 % stopnji tveganja (Field, 2013).

4 REZULTATI

4.1 UGOTAVLJANJE RASTI BAKTERIJSKIH ČISTIH KULTUR NA RAZLIČNIH GOJIŠČIH

Rast čistih kultur rodov *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus* in *Streptococcus* smo ugotavljali z njihovim nacepljanjem na različna gojitvena in selektivna gojišča za laktobacile (preglednica 7).

4.1.1 Opis in kvantifikacija rasti

Vseh 18 sevov laktobacilov je na gojišču MRS izkazalo dobro rast (10^7 - 10^9 KE/ml). Iz rezultatov vidimo, da je bila rast primerljiva v anaerobnih in v aerobnih razmerah inkubacije. Laktobacili so anaerobi do fakultativni anaerobi, torej ne preseneča, da so bili uspešni tako v prisotnosti kot tudi v odsotnosti kisika (preglednica 10).

Z namenom povečanja selektivnosti gojišča MRS smo uporabili modificirano gojišče M-MRS. Vseh 18 sevov laktobacilov je uspešno raslo na gojišču M-MRS v anaerobnih in aerobnih razmerah inkubacije in enako kot na gojišču MRS (10^7 - 10^9 KE/ml) (preglednica 10).

Na gojišču MRS-ŽS je od 18-ih laktobacilov kar 11 sevov slabo raslo ($<10^6$ KE/ml), medtem ko so po en sev iz vrst *Lb. casei*, *Lb. paracasei* in *Lb. gasseri* ter po dva seva iz vrst *Lb. plantarum* in *Lb. rhamnosus* zrasli bolje (10^8 - 10^9 KE/ml) (preglednica 10).

Rast laktobacilov na gojišču Rogosa anaerobno je bila enaka rasti na gojiščih MRS in M-MRS anaerobno (10^7 - 10^9 KE/ml). Na gojišču Rogosa aerobno pa je pet sevov laktobacilov izkazalo rast $<10^6$ KE/ml (preglednica 10).

Na gojišču LAMVAB-ZKV je 12 sevov laktobacilov izkazalo dobro rast (10^8 - 10^9 KE/ml), medtem ko je bila za predstavnike skupine *Lb. acidophilus* (*Lb. acidophilus*, *Lb. gasseri*, *Lb. johnsonii*) in *Lb. bulgaricus* koncentracija vankomicina previsoka ($<10^6$ KE/ml). Večina sevov omenjenih skupin tudi po literaturnih podatkih ne uspeva na gojišču z dodanim vankomicinom, saj naj bi bili zanj občutljivi. Tudi vrsta *Lb. bulgaricus* naj bi bila občutljiva za vankomicin (Hartemink in Rombouts, 1999), naši rezultati pa so pokazali, da je vrsta občutljiva tudi že za znižano koncentracijo antibiotika. Ker smo ugotovili, da je že znižana koncentracija vankomicina v gojišču LAMVAB-ZKV dovolj selektivna za laktobacile, selektivnosti na običajnem LAMVAB gojišču, razen za tri laktobacile, po eno bifidobakterijo in enega enterokoka ter dva streptokoka, nismo preverjali. V poskusu je vseh sedem testiranih bakterij na gojišču LAMVAB izkazalo rast $<10^6$ KE/ml (preglednica 10).

Bakterijski sevi skupine *Lb. acidophilus* so na gojišču LAC različno zrasli, vrsti *Lb. acidophilus* in *Lb. gasseri* sta zrasli v koncentracijah 10^7 - 10^8 KE/ml, medtem ko je bila rast sevov *Lb. johnsonii* manjša kot 10^6 KE/ml. Dobro rast v koncentraciji 10^7 - 10^9 KE/ml smo opazili tudi pri po enem sevu vrst *Lb. bulgaricus*, *Lb. paracasei* in *Lb. reuteri* ter pri dveh sevih vrste *Lb. plantarum*. Za skupino *Lb. casei* je znano, da na gojišču LAC ne uspeva

dobro (ISO 20128:2006). To se je pokazalo tudi v našem poskusu, ko smo pri petih (po dva seva *Lb. casei* in *Lb. rhamnosus* in en sev *Lb. paracasei*) od šestih analiziranih čistih kultur iz *Lb. casei* skupine na gojišču LAC ugotovili rast $<10^6$ KE/ml (preglednica 10).

Preglednica 10: Kvantifikacija sevov bakterij rodu *Lactobacillus* na različnih gojiščih.

Sev	Število bakterij (KE/ml)									
	MRS		M-MRS		MRS-ŽS		Rogosa	LAMVAB -ZKV	LAMVAB	LAC
	anaerobno	aerobno	anaerobno	aerobno	anaerobno	anaerobno	aerobno	anaerobno	anaerobno	anaerobno
<i>Lb. acidophilus</i> IM 116	$2,48 \times 10^8$	$1,34 \times 10^8$	$1,87 \times 10^8$	$1,42 \times 10^8$	$<10^4$	$2,01 \times 10^8$	$1,08 \times 10^8$	$4,45 \times 10^5$	/	$1,68 \times 10^8$
<i>Lb. bulgaricus</i> IM 396	$1,03 \times 10^8$	$8,45 \times 10^7$	$9,82 \times 10^7$	$8,8 \times 10^7$	$<10^6$	$1,41 \times 10^8$	$<10^6$	$<10^6$	/	$1,55 \times 10^8$
<i>Lb. casei</i> IM 305	$6,10 \times 10^8$	$1,10 \times 10^9$	$1,03 \times 10^9$	$9,18 \times 10^8$	$3,60 \times 10^8$	$5,90 \times 10^8$	$6,20 \times 10^8$	$6,30 \times 10^8$	/	$<10^6$
<i>Lb. casei immunitas</i> IM 387	$8,64 \times 10^8$	$8,00 \times 10^8$	$1,08 \times 10^9$	$1,07 \times 10^9$	$<10^6$	$8,40 \times 10^8$	$9,72 \times 10^8$	$1,35 \times 10^9$	/	$<10^6$
<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> IM 348	$2,64 \times 10^8$	$5,10 \times 10^8$	$3,40 \times 10^8$	$6,20 \times 10^8$	$<10^6$	$1,45 \times 10^8$	$<10^6$	$<10^6$	/	$<10^6$
<i>Lb. gasseri</i> IM 243	$6,70 \times 10^8$	$2,30 \times 10^8$	$6,20 \times 10^8$	$4,00 \times 10^8$	$<10^6$	$2,80 \times 10^7$	$3,20 \times 10^7$	$<10^6$	$<10^6$	$2,20 \times 10^7$
<i>Lb. gasseri</i> IM 105	$4,20 \times 10^9$	$4,60 \times 10^9$	$5,30 \times 10^9$	$4,90 \times 10^9$	$3,50 \times 10^9$	$4,10 \times 10^9$	$3,90 \times 10^9$	$4,40 \times 10^9$	/	$4,10 \times 10^8$
<i>Lb. johnsonii</i> IM 240	$1,27 \times 10^8$	$5,45 \times 10^7$	$1,12 \times 10^8$	$5,90 \times 10^7$	$<10^6$	$1,80 \times 10^7$	$<10^6$	$<10^6$	$<10^6$	$<10^6$
<i>Lb. johnsonii</i> IM 306	$1,78 \times 10^8$	$1,91 \times 10^8$	$2,05 \times 10^8$	$2,15 \times 10^8$	$<10^6$	$1,71 \times 10^8$	$<10^6$	$<10^6$	$<10^6$	$<10^6$
<i>Lb. paracasei</i> IM 307	$2,76 \times 10^9$	$2,65 \times 10^9$	$2,89 \times 10^9$	$2,51 \times 10^9$	$2,67 \times 10^9$	$2,93 \times 10^9$	$2,65 \times 10^9$	$2,93 \times 10^9$	/	$2,90 \times 10^8$
<i>Lb. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> IM 242	$1,06 \times 10^9$	$7,36 \times 10^8$	$1,03 \times 10^9$	$9,20 \times 10^8$	$<10^6$	$6,45 \times 10^8$	$1,18 \times 10^9$	$1,09 \times 10^9$	/	$<10^6$
<i>Lb. plantarum</i> IM 212	$2,55 \times 10^9$	$8,70 \times 10^9$	$2,85 \times 10^9$	$4,70 \times 10^9$	$3,00 \times 10^9$	$2,50 \times 10^9$	$2,73 \times 10^9$	$3,50 \times 10^9$	/	$2,30 \times 10^9$
<i>Lb. plantarum</i> IM 308	$3,00 \times 10^9$	$2,82 \times 10^9$	$2,75 \times 10^9$	$4,60 \times 10^9$	$2,89 \times 10^9$	$2,43 \times 10^9$	$2,61 \times 10^9$	$2,50 \times 10^9$	/	$2,40 \times 10^7$

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 10: Kvantifikacija sevov bakterij rodu *Lactobacillus* na različnih gojiščih.

Sev	Število bakterij (KE/ml)									
	MRS		M-MRS		MRS-ŽS	Rogosa		LAMVAB-ZKV	LAMVAB	LAC
	anaerobno	aerobno	anaerobno	aerobno	anaerobno	anaerobno	anaerobno	anaerobno	anaerobno	anaerobno
<i>Lb. reuteri</i> IM 109	1,31×10 ⁹	1,18×10 ⁹	1,24×10 ⁹	1,05×10 ⁹	<10 ⁶	1,18×10 ⁹	1,28×10 ⁹	9,73×10 ⁸	/	1,25×10 ⁹
<i>Lb. rhamnosus</i> IM 239	5,82×10 ⁸	8,18×10 ⁸	8,82×10 ⁸	7,20×10 ⁸	4,30×10 ⁸	3,00×10 ⁸	5,80×10 ⁸	7,20×10 ⁸	/	<10 ⁶
<i>Lb. rhamnosus</i> IM 310	1,05×10 ⁹	7,50×10 ⁸	1,10×10 ⁹	5,90×10 ⁸	7,70×10 ⁸	6,66×10 ⁸	4,40×10 ⁸	4,64×10 ⁸	/	<10 ⁶
<i>Lb. salivarius</i> IM 124	2,42×10 ⁸	2,70×10 ⁸	2,45×10 ⁸	1,97×10 ⁸	<10 ⁶	2,46×10 ⁸	<10 ⁶	2,84×10 ⁸	/	<10 ⁶
<i>Lb. salivarius</i> ssp. <i>salivarius</i> IM 352	1,32×10 ⁹	1,35×10 ⁹	1,40×10 ⁹	1,29×10 ⁹	<10 ⁶	1,27×10 ⁹	8,36×10 ⁸	1,11×10 ⁹	/	<10 ⁶

Legenda: /=analize nismo izvedli, MRS=gojišče po De Man, Rogosa in Sharpe, M-MRS=modificirano gojišče MRS z maltozo, MRS-ŽS=MRS z žolčnimi solmi, Rogosa=selektivno gojišče za laktobacile, LAMVAB=MRS z dodanim vankomicinom in bromkrezol zelenim, LAMVAB-ZKV=LAMVAB z znižano koncentracijo vankomicina, LAC=MRS s ciprofloksacinom in klindamicinom

Preglednica 11: Povprečno število bakterij rodu *Lactobacillus* zraslih na različnih gojiščih.

Gojišče		P-vrednost								
		MRS		M-MRS		MRS-ŽS	Rogosa	LAMVAB-ZKV	LAC	
		anaerobno	aerobno	anaerobno	aerobno	anaerobno	anaerobno	aerobno	anaerobno	anaerobno
Povprečno število in standardna deviacija bakterij (N±SD (KE/ml))		1,17×10 ⁹ ±1,18×10 ⁹ 1,18×10 ⁹	1,50×10 ⁹ ±2,15×10 ⁹ 2,15×10 ⁹	1,30×10 ⁹ ±1,36×10 ⁹ 1,36×10 ⁹	1,39×10 ⁹ ±1,65×10 ⁹ 1,65×10 ⁹	7,57×10 ⁸ ±1,17×10 ⁹ 1,17×10 ⁹	1,02×10 ⁹ ±1,18×10 ⁹ 1,18×10 ⁹	9,97×10 ⁸ ±1,19×10 ⁹ 1,19×10 ⁹	1,11×10 ⁹ ±1,34×10 ⁹ 1,34×10 ⁹	2,57×10 ⁸ ±5,93×10 ⁸ 5,93×10 ⁸
MRS anaerobno	1,17×10 ⁹ ±1,18×10 ⁹	/	/	/	/	/	/	/	/	/
MRS aerobno	1,50×10 ⁹ ±2,15×10 ⁹	p>0,05	/	/	/	/	/	/	/	/
M-MRS anaerobno	1,30×10 ⁹ ±1,36×10 ⁹	p>0,05	p>0,05	/	/	/	/	/	/	/
M-MRS aerobno	1,39×10 ⁹ ±1,65×10 ⁹	p>0,05	p>0,05	p>0,05	/	/	/	/	/	/
MRS-ŽS anaerobno	1,02×10 ⁹ ±1,18×10 ⁹	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,01	/	/	/	/	/
Rogosa anaerobno	1,02×10 ⁹ ±1,18×10 ⁹	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p<0,05	/	/	/	/
Rogosa aerobno	9,97×10 ⁸ ±1,19×10 ⁹	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	/	/	/
LAMVAB-ZKV anaerobno	1,11×10 ⁹ ±1,34×10 ⁹	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	/	/
LAC anaerobno	2,57×10 ⁸ ±5,93×10 ⁸	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p>0,05	p<0,001	p<0,05	p<0,05	/

Legenda: / =izračun za enak par skupin smo opravili enkrat, p>0,05=ni statistično značilne razlike med skupinama, p<0,05=statistično značilna razlika med skupinama, p<0,01=statistično zelo značilna razlika med skupinama, p<0,001=statistično visoko značilna razlika med skupinama, MRS=gojišče po De Man, Rogosa in Sharpe, M-MRS=modificirano gojišče MRS z maltozo, MRS-ŽS=MRS z žolčnimi solmi, Rogosa=selektivno gojišče za laktobacile, LAMVAB-ZKV=LAMVAB z znižano koncentracijo vankomicina, LAC=MRS s ciprofloksacinom in klindamicinom

Pri bakterijah rodu *Bifidobacterium* smo zaznali uspešno rast na gojišču MRS anaerobno v koncentraciji 10^8 - 10^9 KE/ml. Rast na gojišču MRS aerobno je bila omejena, saj so bifidobakterije obvezni anaerobi in v okolju s kisikom ne uspevajo dobro. Od sedmih sevov bifidobakterij smo rast na gojišču MRS aerobno zaznali le pri dveh sevih, pri ostalih pa je bila rast nižja kot 10^6 KE/ml (preglednica 12).

Podobno kot laktobacili tudi bifidobakterije lahko izkoriščajo maltozo, zato je bila njihova rast na gojišču M-MRS v anaerobnih razmerah zelo dobra in je dosegla 10^8 - 10^9 KE/ml. Precej slabša je bila rast bifidobakterij na gojišču M-MRS aerobno, z izjemo dveh sevov, ki sta dosegla rast $<10^6$ KE/ml (preglednica 12).

Podobno kot navajata že Vinderola in Reinheimer (1999), smo tudi v naši analizi potrdili domnevo, da bifidobakterije slabo oz. ne rastejo na gojišču MRS-ŽS. Razen pri enem sevu bifidobakterij ($4,70 \times 10^8$ KE/ml) smo opazili rast, pri ostalih pa je bila rast $<10^6$ KE/ml (preglednica 12).

Rast bifidobakterij na gojišču Rogosa anaerobno je bila primerljiva z rastjo bifidobakterij na gojiščih MRS anaerobno in M-MRS anaerobno (10^8 - 10^9 KE/ml). V aerobnih razmerah je bila rast vseh sevov bifidobakterij na gojišču Rogosa, razen enega, $<10^6$ KE/ml (preglednica 12). Vzrok lahko iščemo predvsem v neugodnih razmerah za bifidobakterije z vidika prisotnosti kisika, saj so se v anaerobnih razmerah izkazale veliko bolje. Sklepamo lahko, da za selektivnost niso bile odgovorne sestavine gojišča Rogosa, temveč razmere inkubacije.

Bifidobakterijam gojišči LAMVAB in LAMVAB-ZKV nista ustrezali, saj v prisotnosti vankomicina ne uspevajo dobro, zrasel je le en sev ($4,00 \times 10^8$ KE/ml) (preglednica 12).

Iz rezultatov v preglednici 12 je razvidno, da je gojišče LAC za bifidobakterije neustrezno, saj so občutljive na prisotnost antibiotikov ciprofloksacin in klindamicin, kar se je izkazalo v njihovi slabi rasti ($<10^6$ KE/ml).

Preglednica 12: Kvantifikacija sevov bakterij rodu *Bifidobacterium* na različnih gojiščih.

Sev	Število bakterij (KE/ml)									
	MRS		M-MRS		MRS-ŽS		Rogosa		LAMVAB-ZKV	LAC
	anaerobno	aerobno	anaerobno	aerobno	anaerobno	anaerobno	aerobno	anaerobno	anaerobno	anaerobno
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> IM 417	7,18×10 ⁸	<10 ⁶	1,14×10 ⁹	<10 ⁶	<10 ⁶	6,50×10 ⁸	<10 ⁶	<10 ⁶	/	<10 ⁶
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> IM 414	9,18×10 ⁸	<10 ⁶	7,73×10 ⁸	<10 ⁶	<10 ⁶	4,40×10 ⁸	<10 ⁶	<10 ⁶	/	<10 ⁶
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> IM 418	1,18×10 ⁹	<10 ⁶	8,36×10 ⁸	<10 ⁶	<10 ⁶	9,36×10 ⁸	<10 ⁶	<10 ⁶	/	<10 ⁶
<i>B. bifidum</i> IM 419	1,60×10 ⁹	3,00×10 ⁸	1,69×10 ⁹	4,40×10 ⁸	<10 ⁶	1,20×10 ⁹	<10 ⁶	<10 ⁶	<10 ⁶	<10 ⁶
<i>B. infantis</i> IM 343	7,82×10 ⁸	<10 ⁶	5,10×10 ⁸	<10 ⁶	<10 ⁶	4,50×10 ⁸	<10 ⁶	<10 ⁶	/	<10 ⁶
<i>B. infantis</i> IM 344	8,40×10 ⁸	4,80×10 ⁸	8,82×10 ⁸	4,70×10 ⁸	4,70×10 ⁸	9,10×10 ⁸	3,30×10 ⁸	4,00×10 ⁸	/	<10 ⁶
<i>B. longum</i> IM 275	5,20×10 ⁸	<10 ⁶	8,40×10 ⁸	<10 ⁶	<10 ⁶	7,82×10 ⁸	<10 ⁶	<10 ⁶	/	<10 ⁶

Legenda: /=analize nismo izvedli, MRS=gojišče po De Man, Rogosa in Sharpe, M-MRS=modificirano gojišče MRS z maltozo, MRS-ŽS=MRS z žolčnimi solmi, Rogosa=selektivno gojišče za laktobacile, LAMVAB=MRS z dodanim vankomicinom in bromkrezol zelenim, LAMVAB-ZKV=LAMVAB z znižano koncentracijo vankomicina, LAC=MRS s ciprofloksacinom in klindamicinom

Vsi sevi enterokokov in laktokokov so dobro rasli na gojiščih MRS in M-MRS ne glede na aeroben ali anaeroben način inkubacije (10^8 - 10^9 KE/ml). Streptokoki so na gojišču MRS anaerobno zrasli do koncentracij 10^5 - 10^7 KE/ml, medtem ko je bila njihova rast na gojišču MRS aerobno nižja kot 10^6 oz. 10^2 KE/ml. Rast obeh sevov streptokokov na gojišču M-MRS je bila $<10^6$ KE/ml (preglednica 13).

Pri enterokokih, laktokokih in streptokokih je po en sev zrasel na gojišču MRS-ŽS v koncentraciji 10^7 - 10^8 KE/ml, po en sev pa je izkazal rast $<10^6$ KE/ml (preglednica 13).

Selektivnost gojišča Rogosa naj bi se kazala v njegovi znižani vrednosti pH na okoli 5,5, kar ne predstavlja ovire za laktobacile, saj so odporni na nižjo vrednost pH, vendar pa tudi bifidobakterij in enterokokov ne inhibira dovolj, kar se je pokazalo tudi v našem poskusu. Oba seva enterokokov sta na gojišču Rogosa anaerobno zrasla v koncentraciji 10^8 KE/ml, medtem ko je na gojišču Rogosa aerobno en sev zrasel (10^8 KE/ml), rast drugega pa je bila manjša ($<10^6$ KE/ml). Rast laktokokov in streptokokov na gojišču Rogosa je bila pri obeh razmerah inkubacije $<10^6$ KE/ml (preglednica 13).

Nekateri enterokoki naj bi bili odporni na vankomicin, kar smo dokazali tudi v našem poskusu, saj sta oba seva enterokokov na gojišču LAMVAB-ZKV zrasla (10^9 KE/ml). dodatno je zrasel še en sev laktokokov, medtem ko drugi sev laktokokov ter oba seva streptokokov niso izkazali rasti ($<10^6$ KE/ml) (preglednica 13).

Na gojišču LAC smo opazili slabšo rast enterokokov, laktokokov in streptokokov (preglednica 13).

Gojišče M17 je primerno za rast kokov, zato smo nanj cepili po dva seva enterokokov, laktokokov in streptokokov. Seva *E. faecium* IM 273 in *E. faecium* IM 312 sta na gojišču M-17 zrasla do 10^9 KE/ml, medtem ko sta streptokoka, *Str. thermophilus* IM 377 in *Str. thermophilus* IM 410 zrasla do 10^7 KE/ml. Analizirali smo še *Lc. lactis* ssp. *cremoris* IM 241, ki je zrasel v koncentraciji 10^9 KE/ml ter *Lc. lactis* ssp. *lactis* IM 407, kjer je bila izkazana rast v koncentraciji 10^8 KE/ml (preglednica 13).

Preglednica 13: Kvantifikacija sevov bakterij rodov *Enterococcus*, *Lactococcus* in *Streptococcus* na različnih gojiščih.

Sev	Število bakterij (KE/ml)										
	MRS		M-MRS		MRS-ŽS		Rogosa	LAMVAB -ZKV	LAMVAB	LAC	M 17
	anaerobno	aerobno	anaerobno	aerobno	anaerobno	anaerobno	aerobno	anaerobno	anaerobno	anaerobno	anaerobno
<i>E. faecium</i> IM 273	2,90×10 ⁹	1,10×10 ⁹	1,60×10 ⁹	3,30×10 ⁹	<10 ⁶	1,39×10 ⁸	<10 ⁶	1,43×10 ⁹	<10 ⁶	<10 ⁶	3,30×10 ⁹
<i>E. faecium</i> IM 312	1,71×10 ⁹	1,76×10 ⁹	1,73×10 ⁹	1,92×10 ⁹	1,09×10 ⁸	7,91×10 ⁸	6,10×10 ⁸	1,15×10 ⁹	/	<10 ⁶	1,83×10 ⁹
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> IM 241	2,91*10 ⁹	2,34*10 ⁹	2,70*10 ⁹	2,36*10 ⁹	1,60*10 ⁷	<10 ⁶	<10 ⁶	1,69*10 ⁹	/	<10 ⁶	2,11*10 ⁹
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> IM 407	2,80*10 ⁹	5,18*10 ⁸	2,59*10 ⁸	1,24*10 ⁸	<10 ⁶	<10 ⁶	<10 ⁶	<10 ⁶	/	<10 ⁶	7,50*10 ⁸
<i>Str. thermophilus</i> IM 377	1,70×10 ⁷	<10 ⁶	<10 ⁶	<10 ⁶	5,30×10 ⁷	<10 ⁶	<10 ⁶	<10 ⁶	<10 ⁶	<10 ⁶	7,18×10 ⁷
<i>Str. thermophilus</i> IM 410	5,30×10 ⁵	<10 ²	<10 ⁶	<10 ⁶	<10 ⁶	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ⁶	<10 ²	6,00×10 ⁷

Legenda: /=analize nismo izvedli, MRS=gojišče po De Man, Rogosa in Sharpe, M-MRS=modificirano gojišče MRS z maltozo, MRS-ŽS=MRS z žolčnimi solmi, Rogosa=selektivno gojišče za laktobacile, LAMVAB=MRS z dodanim vankomicinom in bromkrezol zelenim, LAMVAB-ZKV=LAMVAB z znižano koncentracijo vankomicina, LAC= MRS s ciprofloksacinom in klindamicinom, M-17=obogateno gojišče za koke

4.1.2 Izbira gojišč za izolacijo laktobacilov

Na podlagi rezultatov rasti različnih čistih sevov MKB in bifidobakterij na gojiščih, ki so v literaturi najpogosteje predlagani in uporabljeni za selektivno rast laktobacilov (preglednice 10-13), smo izbrali najprimernejša gojišča za nadaljnje delo, kjer smo ugotavljali selektivno rast laktobacilov iz mlečnih izdelkov in prehranskih dopolnil. Ključno vlogo pri izbiri gojišča sta imela predvsem sestava gojišča in razmere pri inkubaciji.

Rast čistih kultur smo ugotavljali na gojiščih MRS (anaerobno, aerobno), M-MRS (anaerobno, aerobno), MRS-ŽS, Rogosa (anaerobno, aerobno), LAMVAB-ZKV, LAMVAB, LAC in M-17, kjer smo petrijeve plošče z nacepljenimi čistimi kulturami inkubirali 3 dni pri 37 °C. Zrasle kolonije smo pošteli s pomočjo elektronskega števca in na podlagi velikosti populacije ugotavljali primernost gojišč za selektivno rast določenega bakterijskega seva znotraj posameznega rodu.

Iz rezultatov rasti in kvantifikacije sevov na različnih gojitvenih in selektivnih gojiščih smo ugotovili, da je rast laktobacilov na gojišču M-MRS anaerobno primerljiva z rastjo laktobacilov na gojišču MRS anaerobno ($p > 0,05$, preglednica 11). Tudi v aerobnih razmerah smo prišli do enakega zaključka. Rast na gojišču M-MRS aerobno in MRS aerobno je bila podobna ($p > 0,05$, preglednica 11). Tudi ostale preiskovane čiste kulture so rasle primerljivo na gojišču M-MRS ali gojišču MRS, z izjemo vrste *Str. thermophilus*, za katero je znano, da sladkorja maltoza ne zmore izkoriščati (preglednice 10, 12 in 13).

Rezultati rasti čistih kultur na gojišču MRS-ŽS kažejo, da gojišče ni zelo selektivno za gojitev laktobacilov, saj je njegovo sestavo izkoriščalo le sedem predstavnikov laktobacilov, poleg tega so na njem lahko uspevale še bifidobakterije, enterokoki, streptokoki in laktokoki (preglednice 10, 12 in 13). Ugotovili smo, da je rast laktobacilov na gojišču MRS-ŽS v primerjavi z rastjo na gojišču MRS anaerobno slabša ($p < 0,05$, preglednica 11). Gojišče MRS-ŽS je tako v primerjavi z gojiščem MRS izkazalo prenizko mero selektivnosti za rast laktobacilov.

Na gojišču LAMVAB-ZKV so, poleg 12 sevov laktobacilov, zrasli po en sev bifidobakterij in laktokokov ter oba seva enterokokov, medtem ko je preostalih šest sevov bifidobakterij, en sev laktokokov in oba seva streptokokov slabo raslo (preglednice 10, 12 in 13).

Gojišče LAC je selektivno za rast laktobacilov, še posebej iz skupine *Lb. acidophilus* z izjemo vrste *Lb. johnsonii* (preglednica 10).

Za nadaljnje analize mlečnih izdelkov in prehranskih dopolnil z dodanimi probiotičnimi kulturami smo uporabili gojišča MRS, Rogosa, LAMVAB-ZKV, LAMVAB in LAC.

4.2 MIKROBIOLOŠKE PREISKAVE PREHRANSKIH DOPOLNIL IN MLEČNIH IZDELKOV TER IDENTIFIKACIJA IZOLATOV Z METODO PCR

Na petrijeve plošče z gojišči smo nacepili vzorce prehranskih dopolnil in mlečnih izdelkov in jih inkubirali. Gojišči MRS in Rogosa smo izpostavili tako anaerobnim kot aerobnim razmeram, medtem ko smo gojišča LAMVAB-ZKV, LAMVAB in LAC inkubirali le v anaerobnih razmerah. Inkubacija je potekala 3 dni pri 37 °C, razen v primeru izdelka sir LCA, ko smo gojišča dodatno inkubirali 3 dni še pri 30 °C.

Z barvanjem po Gramu smo pregledali naključno izbrane kolonije bakterij. Vzorci preiskovanih izdelkov so vsebovali laktobacile, bifidobakterije, enterokoke in laktokoke. Z opazovanjem celic pod svetlobnim mikroskopom smo opazili po Gramu pozitivne bakterije v obliki palčk in kokov. Rezultati mikroskopskih preparatov so prikazani v prilogah A in B.

V nadaljevanju smo s posameznih gojišč s cepljenimi izdelki naključno odbrali po 5, 10 ali 20 kolonij in preverili selektivnost gojišč za laktobacile z metodo PCR. Pri tem smo uporabili za rod *Lactobacillus* specifična začetna oligonukleotida. V primeru negativnega rezultata smo DNA kolonij, glede na podatke z deklaracije o prisotnosti drugih bakterijskih rodov, analizirali z metodo PCR, kjer smo uporabili bodisi za rod *Bifidobacterium*, *Enterococcus* ali *Lactococcus* specifične začetne oligonukleotide. V primeru prisotnosti bakterijske vrste *Lb. acidophilus*, smo uporabili vrstno specifična začetna oligonukleotida. Pomnožke bakterij smo analizirali z agarozno gelsko elektroforezo ter gele barvali v barvilo SYBR[®] Safe in jih fotografirali po osvetlitvi z UV-svetlobo. Pri tem dopuščamo možnost slabše kakovosti fotografij.

4.2.1 Prehranska dopolnila

V analizi smo uporabili komercialno dostopna prehranska dopolnila BioGaia[®], Yogermana[®], Waya AB[®] ter Waya AD[®].

4.2.1.1 BioGaia[®]

Prehransko dopolnilo BioGaia[®] vsebuje probiotično kulturo *Lactobacillus reuteri* Protectis. Na barvnem preparatu naključno izbrane, za laktobacile značilne, kolonije (priloga A(1)) so vidne po Gramu pozitivne palčke, v parih ali verižicah, ki so mikromorfološke lastnosti laktobacilov. Opazimo pa tudi daljše po Gramu negativne palčke, ki lahko nakazujejo možnost navzkrižne kontaminacije.

Rezultati rasti bakterij na različnih gojiščih in metod PCR so prikazani v preglednici 14. Z agarozno gelsko elektroforezo smo izvedli analizo pomnožkov z za rod *Lactobacillus* specifičnima začetnima oligonukleotidoma (slika 10).

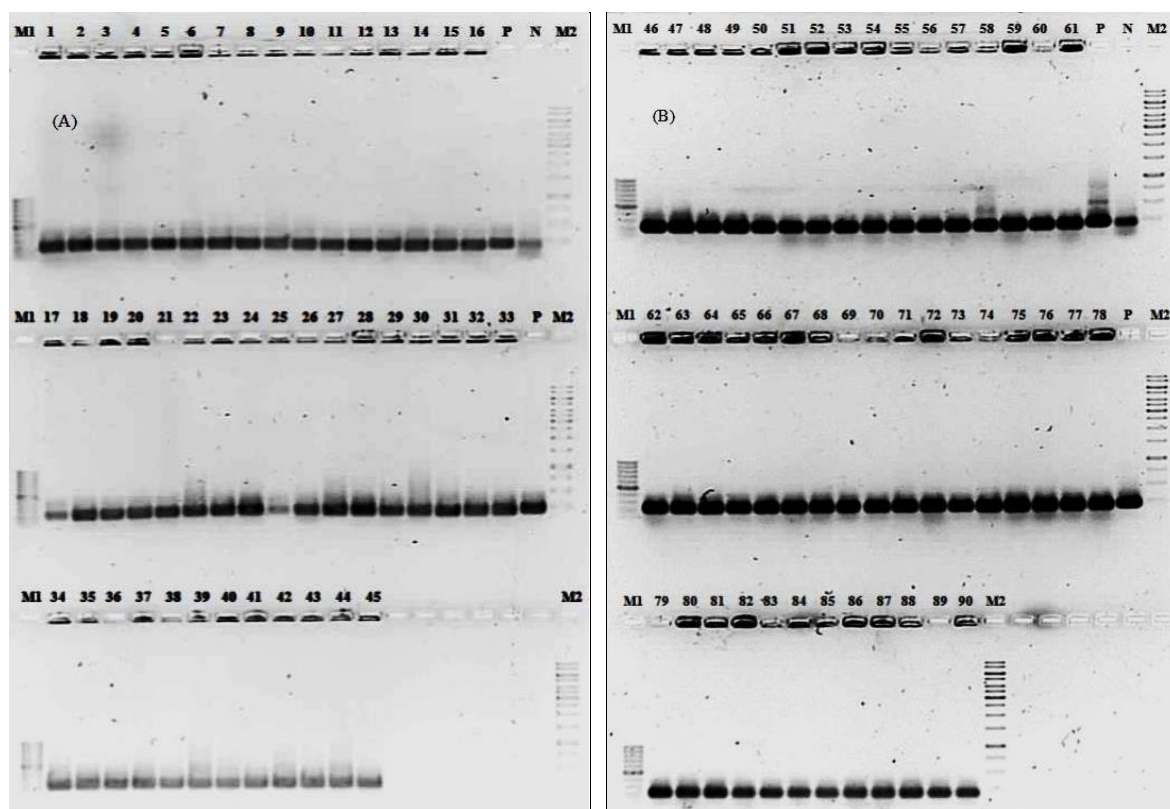
Preglednica 14: Kvantifikacija bakterij, osamljenih iz prehranskega dopolnila BioGaia® in identifikacija izbranih kolonij z metodo PCR.

Gojišče	MRS		Rogosa		LAMVAB-ZKV	LAMVAB	LAC
Razmere inkubacije	anaerobno	aerobno	anaerobno	aerobno	anaerobno	anaerobno	anaerobno
Preiskava	Število bakterij (KE/g) na gojišču						
Kvantifikacija na trdnih gojiščih	$6,60 \times 10^7$	$1,60 \times 10^7$	$4,60 \times 10^7$	$<10^6$	$2,60 \times 10^7$	$3,20 \times 10^7$	$<10^6$
	Število pozitivnih kolonij/število analiziranih kolonij						
Identifikacija laktobacilov z metodo PCR	20/20	10/10	20/20	/	20/20	20/20	/

Legenda: /=metode PCR nismo izvedli, MRS=gojišče po De Man, Rogosa in Sharpe, Rogosa=selektivno gojišče za laktobacile, LAMVAB=MRS z dodanim vankomicinom in bromkrezol zelenim, LAMVAB-ZKV=LAMVAB z znižano koncentracijo vankomicina, LAC=MRS s ciprofloksacinom in klindamicinom

Na preizkušenih gojiščih je zraslo različno število bakterij, od $<10^6$ KE/g do $6,6 \times 10^7$ KE/g (preglednica 14).

Z metodo PCR (preglednica 14, slika 10, gel (A) in gel (B)) smo vseh 90 preiskovanih kolonij iz izdelka BioGaia® potrdili za pripadnike rodu *Lactobacillus* (pri pomnožkih negativne kontrole dopuščamo možnost navzkrižne kontaminacije). Dobljen rezultat je bil pričakovan, saj probiotično prehransko dopolnilo BioGaia® vsebuje le eno probiotično bakterijo - *Lactobacillus reuteri* Protectis, ki je zelo uspešno in v enakih koncentracijah zrasla na gojiščih MRS anaerobno, MRS aerobno, Rogosa anaerobno, LAMVAB-ZKV in LAMVAB. Na gojiščih Rogosa aerobno in LAC rasti mikroorganizmov ni bilo ($<10^6$ KE/g), zato metode PCR nismo izvedli, medtem ko je čista kultura *Lactobacillus reuteri* IM 109 na omenjenih gojiščih uspešno zrasla do velikosti populacije 10^9 KE/ml (preglednica 10).



Slika 10: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov bakterij, osamljenih iz prehranskega dopolnila BioGaia®, pomnoženih z začetnima oligonukleotidoma, specifičnima za rod *Lactobacillus*, (A): gel 1, (B): gel 2.

Legenda: P=pozitivna kontrola, N=negativna kontrola, M1=molekulski označevalec velikosti DNA 100 bp, M2=molekulski označevalec velikosti DNA 1 kb, proge 1-20: pomnožki bakterij z gojišča MRS anaerobno, proge 21-30: pomnožki bakterij z gojišča MRS aerobno, proge 31-45: pomnožki bakterij z gojišča Rogosa anaerobno, proge 46-50: pomnožki bakterij z gojišča Rogosa anaerobno, proge 51-70: pomnožki bakterij z gojišča LAMVAB-ZKV, proge 71-90: pomnožki bakterij z gojišča LAMVAB

4.2.1.2 Yogermina®

Prehransko dopolnilo Yogermina® vsebuje probiotične seve *Lactobacillus acidophilus* La-14TM, *Lactobacillus paracasei* Lpc-37TM, *Lactobacillus plantarum* Lp-115TM in *Bifidobacterium lactis* BI-04TM. Na barvnem preparatu naključno izbrane, za laktobacile značilne, kolonije (priloga A(2)) so vidne po Gramu pozitivne palčke, v parih ali verižicah, ki so mikromorfološke lastnosti laktobacilov.

Rezultati rasti bakterij na različnih gojiščih in metod PCR so prikazani v preglednici 15. Z agarozno gelsko elektroforezo smo izvedli analizo pomnožkov z za rod *Lactobacillus* ter z za rod *Bifidobacterium* specifičnima začetnima oligonukleotidoma (slika 11).

Preglednica 15: Kvantifikacija bakterij, osamljenih iz prehranskega dopolnila Yogermina® in identifikacija izbranih kolonij z metodo PCR.

Gojišče	MRS		Rogosa		LAMVAB-ZKV	LAMVAB	LAC
Razmere inkubacije	anaerobno	aerobno	anaerobno	aerobno	anaerobno	anaerobno	anaerobno
Preiskava	Število bakterij (KE/g) na gojišču						
Kvantifikacija na trdnih gojiščih	$3,30 \times 10^9$	$2,07 \times 10^9$	$3,80 \times 10^9$	$8,91 \times 10^9$	$2,50 \times 10^7$	$2,10 \times 10^7$	$2,65 \times 10^9$
	Število pozitivnih kolonij/število analiziranih kolonij						
Identifikacija laktobacilov z metodo PCR	20/20	19/20	20/20	20/20	20/20	19/20	20/20
Identifikacija bifidobakterij z metodo PCR	/	1/1	/	/	/	0/1	/

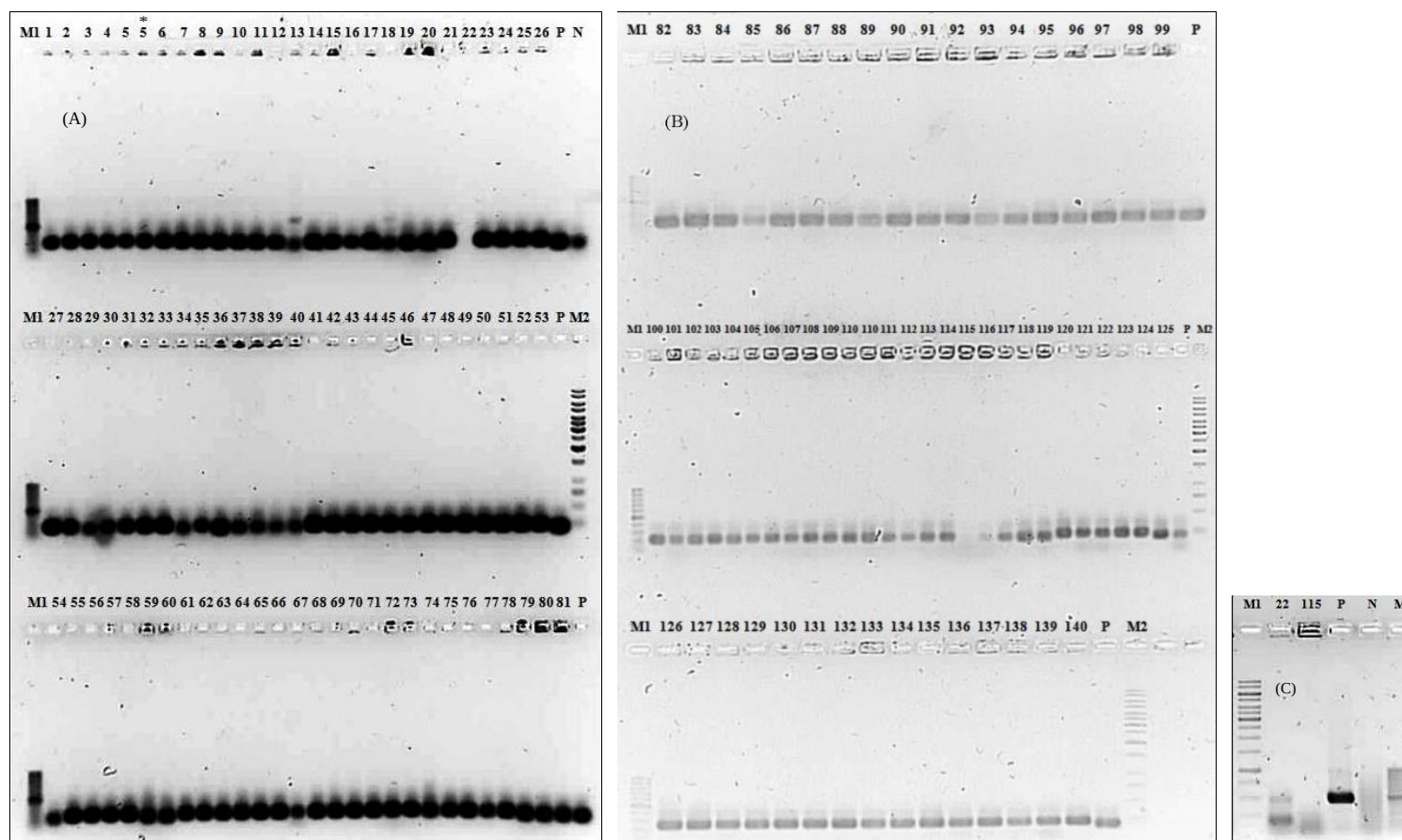
Legenda: /=metode PCR nismo izvedli, MRS=gojišče po De Man, Rogosa in Sharpe, Rogosa=selektivno gojišče za laktobacile, LAMVAB=MRS z dodanim vankomicinom in bromkrezol zelenim, LAMVAB-ZKV=LAMVAB z nižano koncentracijo vankomicina, LAC=MRS s ciprofloksacinom in klindamicinom

Mikroorganizmi so zrasli na vseh uporabljenih gojiščih zelo uspešno in v koncentracijah 10^7 - 10^9 KE/g, kar je razvidno iz preglednice 15.

Uspešno smo identificirali 139/140 kolonij (pri pomnoških negativne kontrole dopuščamo možnost navzkrižne kontaminacije), osamljenih iz izdelka Yogermina®, od tega smo 138 kolonij, osamljenih z vseh uporabljenih gojišč, potrdili za predstavnike rodu *Lactobacillus* (slika 11, gel (A) in gel (B)).

Eno kolonijo, osamljeno z gojišča MRS aerobno, smo potrdili za bifidobakterijo (slika 11, gel (C), proga 22), kar je sicer presenetljivo glede na striktno anaeroben odnos bifidobakterij do kisika. Predstavniki bifidobakterij v izdelku je *Bifidobacterium lactis*, ki sicer velja za bolj robustno bifidobakterijo glede odnosa do kisika, medtem ko sta dva seva čiste kulture *B. animalis* ssp. *lactis* IM 414 in *B. animalis* ssp. *lactis* IM 418 na omenjenem gojišču zrasla manj kot 10^6 KE/ml (preglednica 12).

Preostale kolonije, zrasle na gojišču LAMVAB, z uporabljenimi metodami nismo uspeli določiti (preglednica 15).



Slika 11: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov bakterij, osamljenih iz prehranskega dopolnila Yogermana®, pomnoženih z začetnima oligonukleotidoma, specifičnima za rod *Lactobacillus*, (A): gel 1, (B): gel 2, in specifičnima za rod *Bifidobacterium* (C): gel 3.

Legenda: P=pozitivna kontrola, N=negativna kontrola, M1=molekulski označevalec velikosti DNA 100 bp, M2=molekulski označevalec velikosti DNA 1 kb, proge 1-20: pomnožki bakterij z gojišča MRS anaerobno, proge 21-40: pomnožki bakterij z gojišča MRS aerobno, proge 41-60: pomnožki bakterij z gojišča Rogosa anaerobno, proge 61-80: pomnožki bakterij z gojišča Rogosa aerobno, proga 81: pomnožki bakterij z gojišča LAMVAB-ZKV, proge 82-100: pomnožki bakterij z gojišča LAMVAB-ZKV, proge 101-120: pomnožki bakterij z gojišča LAMVAB, proge 121-140: pomnožki bakterij z gojišča LAC, proga 22: pomnožki bakterij z gojišča MRS aerobno, proga 115: pomnožki bakterij z gojišča LAMVAB

* dvakraten nanos vzorca (proga 5)

4.2.1.3 Waya AB[®]

Prehransko dopolnilo Waya AB[®] vsebuje po Gramu pozitivne bakterije; pet laktobacilov različnih vrst (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus salivarius*), dve vrsti bifidobakterij (*Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*) in eno vrsto *Enterococcus faecium*. Na barvnem preparatu naključno izbrane, za laktobacile značilne, kolonije (priloga A(3)) so vidne po Gramu pozitivne palčke, v parih ali verižicah, ki so mikromorfološke lastnosti laktobacilov. Opazimo pa tudi daljše po Gramu negativne palčke, ki lahko nakazujejo možnost navzkrižne kontaminacije.

Rezultati rasti bakterij na različnih gojiščih in metod PCR so prikazani v preglednici 16. Z agarozno gelsko elektroforezo smo izvedli analizo pomnožkov z za rod *Enterococcus* specifičnima začetnima oligonukleotidoma (slika 12).

Preglednica 16: Kvantifikacija bakterij, osamljenih iz prehranskega dopolnila Waya AB[®] in identifikacija izbranih kolonij z metodo PCR.

Gojišče	MRS		Rogosa		LAMVAB-ZKV	LAMVAB	LAC
Razmere inkubacije	anaerobno	aerobno	anaerobno	aerobno	anaerobno	anaerobno	anaerobno
Preiskava	Število bakterij (KE/g) na gojišču						
Kvantifikacija na trdnih gojiščih	$7,50 \times 10^8$	$1,03 \times 10^9$	$7,40 \times 10^8$	$4,40 \times 10^8$	$5,60 \times 10^8$	$5,60 \times 10^8$	$4,30 \times 10^8$
	Število pozitivnih kolonij/število analiziranih kolonij						
Identifikacija laktobacilov z metodo PCR	17/20	18/20	8/20	9/20	11/20	12/20	20/20
Identifikacija bifidobakterij z metodo PCR	0/3	0/2	0/12	2/11	0/9	3/8	/
Identifikacija enterokokov z metodo PCR	3/3	1/2	0/12	0/9	0/9	0/5	/

Legenda: /=metode PCR nismo izvedli, MRS=gojišče po De Man, Rogosa in Sharpe, Rogosa=selektivno gojišče za laktobacile, LAMVAB=MRS z dodanim vankomicinom in bromkrezol zelenim, LAMVAB-ZKV=LAMVAB z nižano koncentracijo vankomicina, LAC=MRS s ciprofloksacinom in klindamicinom

Na podlagi rezultatov metode PCR (preglednica 16) smo ugotovili, da so probiotične kulture iz izdelka Waya AB[®] zelo dobro in v približno enakih koncentracijah 10^8 - 10^9 KE/g uspevale na vseh analiziranih gojiščih.

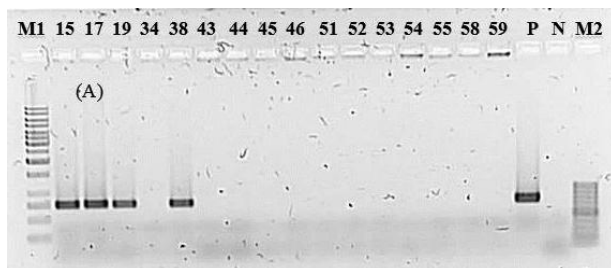
Z metodo PCR smo preverili 140 naključno izbranih kolonij z gojišč, na katera smo cepili izdelek Waya AB[®]. Od tega smo 95 kolonij, osamljenih z vseh uporabljenih gojišč, potrdili za predstavnike rodu *Lactobacillus* (preglednica 16).

Dodatno smo identificirali še pet kolonij, osamljenih z gojišč Rogosa aerobno in LAMVAB, in sicer za predstavnike rodu *Bifidobacterium* (preglednica 16, rezultata 2/11 in

3/8), medtem ko so čiste kulture *B. bifidum* IM 419, *B. animalis* ssp. *lactis* IM 414 in *B. animalis* ssp. *lactis* IM 418 na omenjenem gojišču zrasle v koncentraciji manj kot 10^6 KE/ml (preglednica 12). Rast bifidobakterij na gojišču LAMVAB je rahlo presenetljiva, saj naj bi bile po literaturnih podatkih občutljive za antibiotik vankomicin, prisoten v omenjenem gojišču, vendar pa je iz opažene rasti treh kolonij bifidobakterij na tem gojišču moč zaključiti, da je odpornost proti vankomicinu najverjetneje sevno značilna.

Na gojiščih MRS anaerobno in MRS aerobno smo skupaj identificirali štiri kolonije za predstavnike rodu *Enterococcus* (preglednica 16, rezultata 3/3 in 1/2, slika 12, gel (A)). Probiotična kultura *Enterococcus faecium*, ki je prisotna v izdelku Waya AB[®], je tudi kot čista kultura uspešno zrasla na gojiščih MRS, tako v aerobnih kot anaerobnih razmerah, do velikosti populacije 10^9 KE/ml (preglednica 13).

Preostalih 36 kolonij, osamljenih z gojišč MRS aerobno, Rogosa anaerobno, Rogosa aerobno, LAMVAB-ZKV in LAMVAB, z uporabljen metodo nismo uspeli določiti (preglednica 13).



Slika 12: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov bakterij, osamljenih iz prehranskega dopolnila Waya AB[®], pomnoženih z začetnima oligonukleotidoma, specifičnima za rod *Enterococcus*, (A): gel 1.

Legenda: P=pozitivna kontrola, N=negativna kontrola, M1=molekulski označevalec velikosti DNA 100 bp, M2=molekulski označevalec velikosti DNA 1 kb, proge 15, 17, 19: pomnožki bakterij z gojišča MRS anaerobno, progi 34, 38: pomnožki bakterij z gojišča MRS aerobno, proge 43-46, 51-55, 58, 59: pomnožki bakterij z gojišča Rogosa anaerobno

4.2.1.4 Waya AD[®]

Prehransko dopolnilo Waya AD[®] vsebuje pet različnih vrst laktobacilov (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus salivarius*), eno vrsto *Bifidobacterium bifidum* in eno vrsto *Lactococcus lactis*. Na barvnem preparatu naključno izbrane, za laktobacile značilne, kolonije (priloga A(4)) so vidne po Gramu pozitivne palčke, v parih ali verižicah, ki so mikromorfološke lastnosti laktobacilov. Opazimo lahko tudi koke in bacile ter daljše po Gramu negativne palčke, ki lahko nakazujejo na možnost navzkrižne kontaminacije.

Rezultati rasti bakterij na različnih gojiščih in metode PCR so vidni v preglednici 17. Z agarozno gelsko elektroforezo smo izvedli analizo pomnožkov z za rod *Lactobacillus* specifičnima začetnima oligonukleotidoma (slika 13).

Preglednica 17: Kvantifikacija bakterij, osamljenih iz prehranskega dopolnila Waya AD[®] in identifikacija izbranih kolonij z metodo PCR.

Gojišče	MRS		Rogosa		LAMVAB-ZKV	LAMVAB	LAC
Razmere inkubacije	anaerobno	aerobno	anaerobno	aerobno	anaerobno	anaerobno	anaerobno
Preiskava	Število bakterij (KE/g) na gojišču						
Kvantifikacija na trdnih gojiščih	$8,73 \times 10^8$	$7,55 \times 10^8$	$6,90 \times 10^8$	$6,45 \times 10^8$	$6,90 \times 10^8$	$5,60 \times 10^8$	$5,30 \times 10^7$
	Število pozitivnih kolonij/število analiziranih kolonij						
Identifikacija laktobacilov z metodo PCR	13/20	18/20	20/20	20/20	8/20	13/20	20/20
Identifikacija bifidobakterij z metodo PCR	0/7	0/2	/	/	0/12	0/7	/
Identifikacija laktokokov z metodo PCR	0/7	0/2	/	/	0/12	0/7	/

Legenda: /=metode PCR nismo izvedli, MRS=gojišče po De Man, Rogosa in Sharpe, Rogosa=selektivno gojišče za laktobacile, LAMVAB=MRS z dodanim vankomicinom in bromkrezol zelenim, LAMVAB-ZKV=LAMVAB z znižano koncentracijo vankomicina, LAC=MRS s ciprofloksacinom in klindamicinom

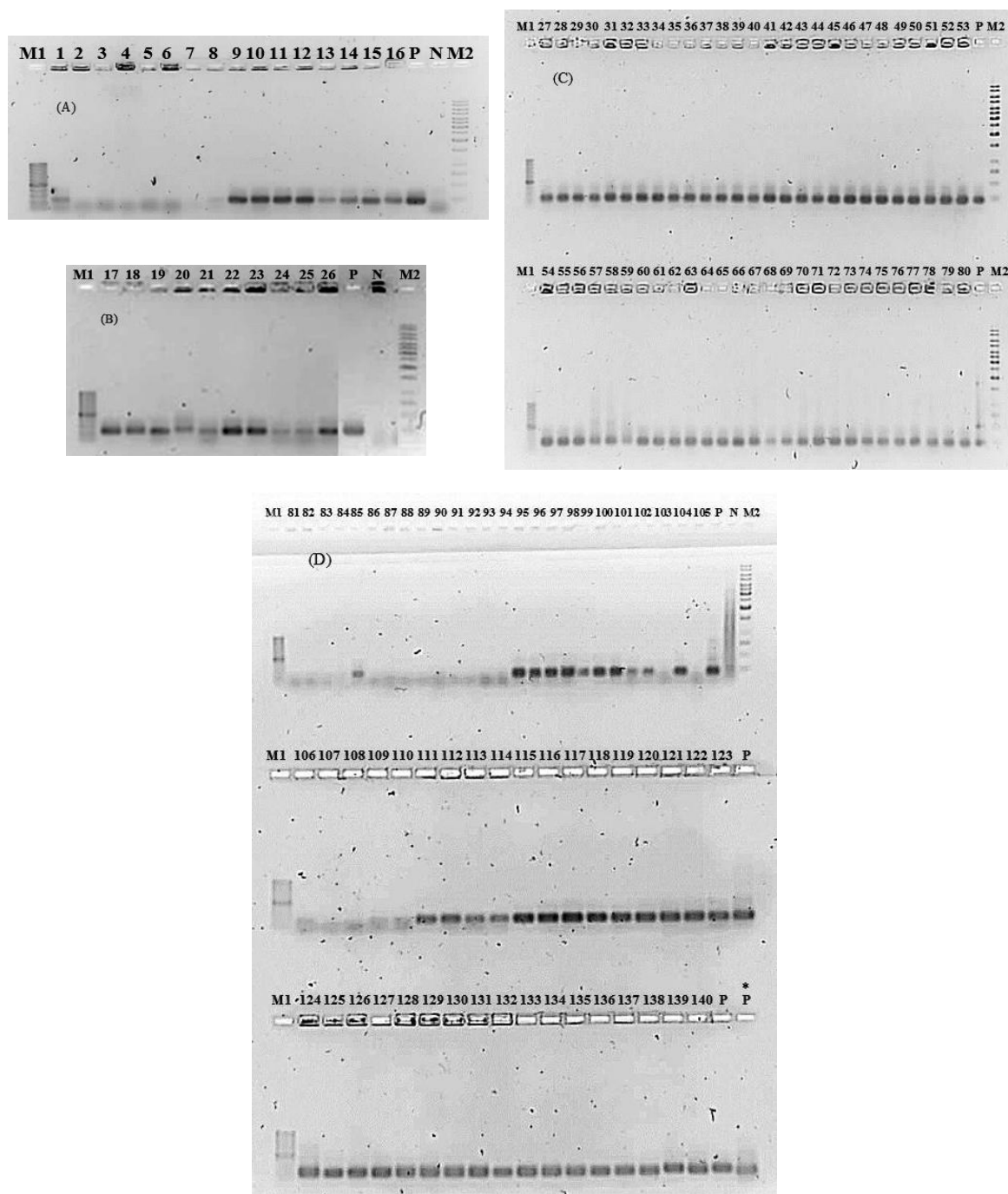
Rast mikroorganizmov iz izdelka Waya AD[®] je bila zelo dobra in v približno enakih koncentracijah 10^7 - 10^8 KE/g na vseh uporabljenih gojiščih (preglednica 17).

Z metodo PCR smo 112 od 140 analiziranih kolonij, osamljenih iz izdelka Waya AD[®] (preglednica 17, slika 13, gel (A), gel (B), gel (C), gel (D)), potrdili za pripadnike rodu *Lactobacillus*.

Poleg laktobacilov, izdelek vsebuje še *Bifidobacterium lactis*, njene prisotnosti nismo potrdili, sta pa dva seva čiste kulture *B. animalis* ssp. *lactis* IM 414 in *B. animalis* ssp. *lactis* IM 418 na gojiščih MRS anaerobno, M-MRS anaerobno in Rogosa anaerobno uspešno zrasla, medtem ko je bila njuna rast na ostalih gojiščih manj kot 10^6 KE/ml (preglednica 12).

Glede na deklaracijski opis izdelka, ta vsebuje tudi predstavnika laktokokov, in sicer *Lactococcus lactis*, vendar njegove prisotnosti z metodo PCR in uporabo z za rod *Lactococcus* specifičnima začetnima oligonukleotidoma nismo potrdili (preglednica 17). Čista kultura *Lc. lactis* ssp. *cremoris* IM 241 je na gojiščih MRS anaerobno, MRS aerobno, M-MRS anaerobno, M-MRS aerobno, LAMVAB-ZKV, MRS-ŽS in M-17 zrasla najmanj do velikosti populacije 10^7 KE/ml (preglednica 13). Tudi čista kultura *Lc. lactis* ssp. *lactis* IM 407 je pokazala rast na gojiščih MRS anaerobno, MRS aerobno, M-MRS anaerobno, M-MRS aerobno in M-17 najmanj do velikosti populacije 10^8 KE/ml (preglednica 13).

Skupno 28 kolonij, osamljenih z gojišč MRS aerobno, MRS anaerobno, LAMVAB-ZKV in LAMVAB, z uporabljen metodo nismo uspeli določiti (preglednica 17).



Slika 13: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov bakterij, osamljenih iz prehranskega dopolnila Waya AD®, pomnoženih z začetnima oligonukleotidoma, specifičnima za rod *Lactobacillus*, (A): gel 1, (B): gel 2, (C): gel 3, (D): gel 4.

Legenda: P=pozitivna kontrola, N=negativna kontrola, M1=molekulski označevalec velikosti DNA 100 bp, M2=molekulski označevalec velikosti DNA 1 kb, proge 1-20: pomnožki bakterij z gojišča MRS anaerobno, proge 21-40: pomnožki bakterij z gojišča MRS aerobno, proge 41-60: pomnožki bakterij z gojišča Rogosa anaerobno, proge 61-80: pomnožki bakterij z gojišča Rogosa aerobno, proga 81: pomnožki bakterij z gojišča LAMVAB-ZKV, proge 82-100: pomnožki bakterij z gojišča LAMVAB-ZKV, proge 101-120: pomnožki bakterij z gojišča LAMVAB, proge 121-140: pomnožki bakterij z gojišča LAC

* dvakraten nanos vzorca (proga P)

4.2.2 Mlečni izdelki

V analizi smo uporabili naslednje mlečne izdelke, fermentirano mleko Ego, jogurt LGG, napitek LCA, skuto Spar Vital ter sir LCA.

4.2.2.1 Fermentirano mleko Ego

Fermentirano mleko Ego vsebuje bakterijska seva *Lactobacillus acidophilus* La-5 ter *Bifidobacterium* Bb-12. Na barvnem preparatu naključno izbrane, za laktobacile značilne, kolonije (priloga B(1)) so vidne po Gramu pozitivne palčke, v verižicah, ki so mikromorfološke lastnosti laktobacilov. Opazimo pa tudi daljše po Gramu negativne palčke, ki lahko nakazujejo na možnost navzkrižne kontaminacije.

Rezultati rasti bakterij na posameznih gojiščih in metod PCR so prikazani v preglednici 18. Z agarozno gelsko elektroforezo smo izvedli analizo pomnožkov z za rod *Lactobacillus*, z za vrsto *Lactobacillus acidophilus* ter za rod *Bifidobacterium* specifičnima začetnima oligonukleotidoma (slika 14).

Preglednica 18: Kvantifikacija bakterij, osamljenih iz fermentiranega mleka Ego in identifikacija izbranih kolonij z metodo PCR.

Gojišče	MRS		Rogosa		LAMVAB-ZKV	LAMVAB	LAC
Razmere inkubacije	anaerobno	aerobno	anaerobno	aerobno	anaerobno	anaerobno	anaerobno
Preiskava	Število bakterij (KE/g) na gojišču						
Kvantifikacija na trdnih gojiščih	$1,11 \times 10^8$	$4,60 \times 10^7$	$6,00 \times 10^7$	$2,50 \times 10^7$	$2,02 \times 10^8$	$1,52 \times 10^8$	$5,00 \times 10^7$
	Število pozitivnih kolonij/število analiziranih kolonij						
Identifikacija laktobacilov z metodo PCR	19/20	10/10	9/10	5/5	10/10	10/10	10/10
Identifikacija bifidobakterij z metodo PCR	1/1	/	1/1	/	/	/	/
Identifikacija <i>Lb. acidophilus</i> z metodo PCR	19/20	5/10	9/10	0/5	0/10	0/10	4/10

Legenda: /=metode PCR nismo izvedli, MRS=gojišče po De Man, Rogosa in Sharpe, Rogosa=selektivno gojišče za laktobacile, LAMVAB=MRS z dodanim vankomicinom in bromkrezol zelenim, LAMVAB-ZKV=LAMVAB z znižano koncentracijo vankomicina, LAC=MRS s ciprofloksacinom in klindamicinom

Mikrobiota fermentiranega mleka Ego je zrasla v koncentraciji 10^7 - 10^8 KE/g na vseh uporabljenih gojiščih (preglednica 18).

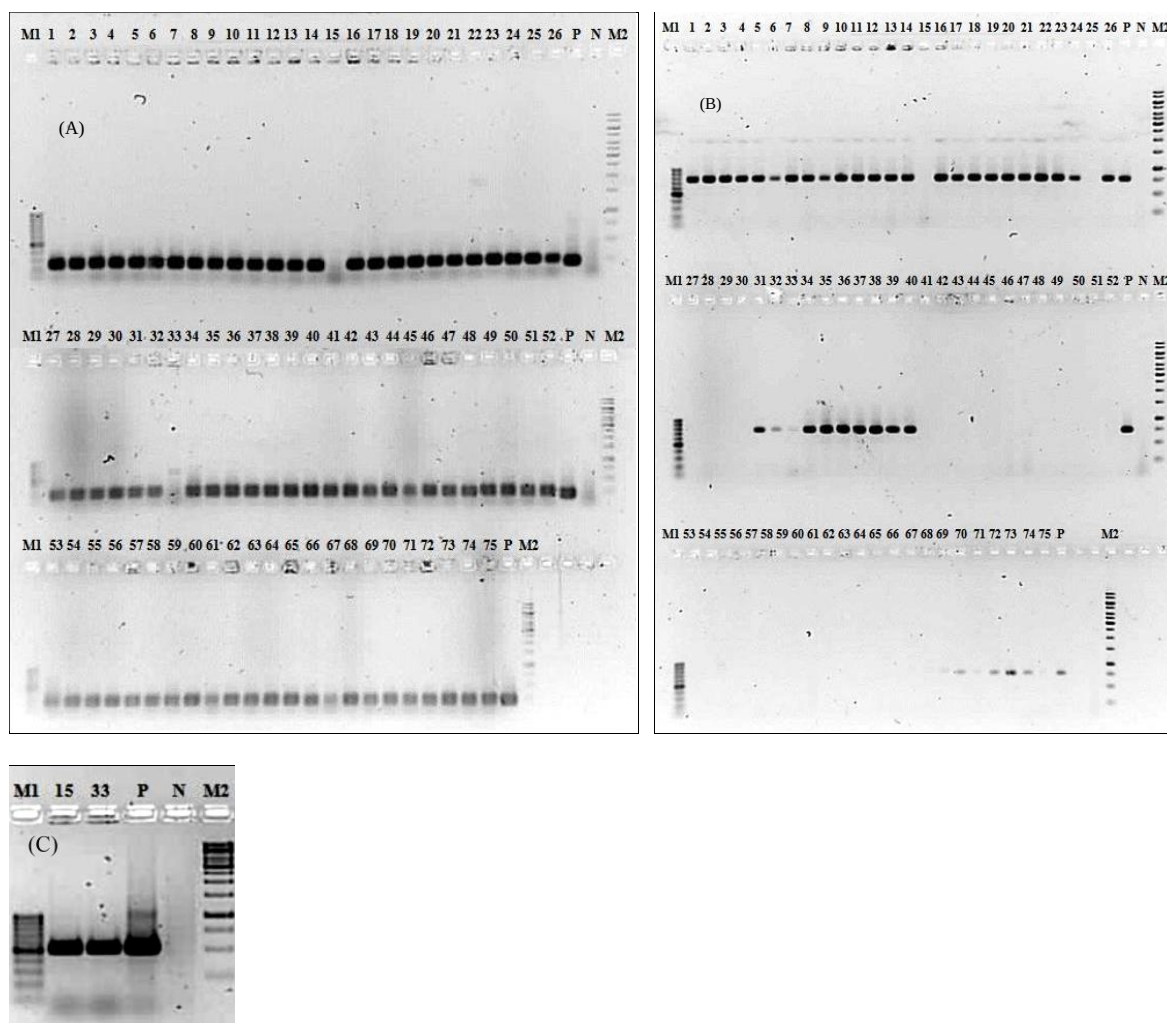
Z metodo PCR smo analizirali 75 naključno izbranih kolonij. Na podlagi rezultatov metode PCR smo skupno 73 kolonij, osamljenih z vseh analiziranih gojišč, potrdili za predstavnike rodu *Lactobacillus* (preglednica 18, slika 14, gel (A)). Izdelek vsebuje jogurtovo startersko

kulturo ter probiotični kulturi *Lactobacillus acidophilus* La-5 in *Bifidobacterium* Bb-12. Čista kultura *Lb. acidophilus* IM 116 je uspešno zrasla na vseh uporabljenih gojiščih do velikosti populacije 10^8 KE/ml (preglednica 10).

Dodatno smo potrdili še dve koloniji, osamljeni z gojišč MRS anaerobno in Rogosa anaerobno (preglednica 18, rezultata 1/1 in 1/1), in sicer za predstavnici rodu *Bifidobacterium* (slika 14, gel (C)). Bakterija *Bifidobacterium* Bb-12, ki je zastopana v izdelku, je tudi kot čista kultura uspešno zrasla na gojiščih MRS anaerobno in Rogosa anaerobno, do velikosti populacije 10^9 KE/ml (preglednica 12).

Z uporabljenno metodo smo na nivoju rodu uspeli identificirati vseh 75 preiskovanih kolonij iz fermentiranega mleka Ego (preglednica 18).

Pri kolonijah, ki smo jih z metodo PCR z za rod *Lactobacillus* specifičnima začetnima oligonukleotidoma potrdili za laktobacile, smo izvedli dodatno metodo PCR, in sicer z začetnima oligonukleotidoma, specifičnima za vrsto *Lb. acidophilus*. Od 73 preiskovanih kolonij, potrjenih za laktobacile, smo jih le 37, osamljenih z gojišč MRS anaerobno, MRS aerobno, Rogosa anaerobno in LAC potrdili za predstavnike vrste *Lb. acidophilus* (preglednica 18, slika 14, gel (B)). Za ostale, na nivoju vrste neidentificirane laktobacile bi lahko predpostavili, da so najverjetneje pripadniki vrste *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, ki je v Ego dodana kot starterska kultura. Kot prikazuje preglednica 10 je tudi čista kultura *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* IM 348 na gojiščih MRS anaerobno, MRS aerobno in Rogosa anaerobno uspešno zrasla do velikosti populacije 10^8 KE/ml. Obstaja verjetnost, da bi z dodatno metodo PCR, ob uporabi za vrsto *Lb. delbrueckii* specifičnih oligonukleotidov, preostalih 36 vrstno neidentificiranih kolonij lahko identificirali. Tako bi morda lahko določili prisotnost startarske kulture *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. Glede na to, da smo vsem preiskovanim kolonijam določili rodovno specifičnost, predpostavljamo, da starterske kulture *Str. thermophilus* med našimi analiziranimi kolonijami ni bilo.



Slika 14: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov bakterij, osamljenih iz fermentiranega mleka Ego, pomnoženih z začetnima oligonukleotidoma, specifičnima za rod *Lactobacillus*, (A): gel 1, specifičnima za vrsto *Lactobacillus acidophilus*, (B): gel 2, in specifičnima za rod *Bifidobacterium*, (C): gel 3.

Legenda: P=pozitivna kontrola, N=negativna kontrola, M1=molekulski označevalec velikosti DNA 100 bp, M2=molekulski označevalec velikosti DNA 1 kb, proge 1-20: pomnožki bakterij z gojišča MRS anaerobno, proge 21-30: pomnožki bakterij z gojišča MRS aerobno, proge 31-40: pomnožki bakterij z gojišča Rogosa anaerobno, proge 41-45: pomnožki bakterij z gojišča Rogosa aerobno, proge 46-55: pomnožki bakterij z gojišča LAMVAB-ZKV, proge 65-75: pomnožki bakterij z gojišča LAMVAB, proga 15: pomnožki bakterij z gojišča MRS anaerobno, proga 33: pomnožki bakterij z gojišča Rogosa anaerobno

4.2.2.2 Jogurt LGG

Izdelek jogurt LGG vsebuje bakterijski sev *Lactobacillus rhamnosus* Gorbach&Goldin ATCC 53103 Na barvnem preparatu naključno izbrane, za laktobacile značilne, kolonije (priloga B(2)) so vidne po Gramu pozitivne palčke, ki so mikromorfološke lastnosti laktobacilov.

Rezultati rasti bakterije na različnih gojiščih in metode PCR so prikazani v preglednici 19. Z agarozno gelsko elektroforezo smo izvedli analizo pomnožkov z za rod *Lactobacillus* specifičnima začetnima oligonukleotidoma (slika 15).

Preglednica 19: Kvantifikacija bakterij, osamljenih iz jogurta LGG in identifikacija izbranih kolonij z metodo PCR.

Gojišče	MRS		Rogosa		LAMVAB-ZKV	LAMVAB	LAC
Razmere inkubacije	anaerobno	aerobno	anaerobno	aerobno	anaerobno	anaerobno	anaerobno
Preiskava	Število bakterij (KE/g) na gojišču						
Kvantifikacija na trdnih gojiščih	$1,72 \times 10^6$	$9,82 \times 10^5$	$1,44 \times 10^6$	$7,70 \times 10^5$	$9,30 \times 10^5$	$7,80 \times 10^5$	$<10^4$
	Število pozitivnih kolonij/število analiziranih kolonij						
Identifikacija laktobacilov z metodo PCR	20/20	20/20	19/20	20/20	13/20	15/20	/

Legenda: /=metode PCR nismo izvedli, MRS=gojišče po De Man, Rogosa in Sharpe, Rogosa=selektivno gojišče za laktobacile, LAMVAB=MRS z dodanim vankomicinom in bromkrezol zelenim, LAMVAB-ZKV=LAMVAB z znižano koncentracijo vankomicina, LAC=MRS s ciprofloksacinom in klindamicinom

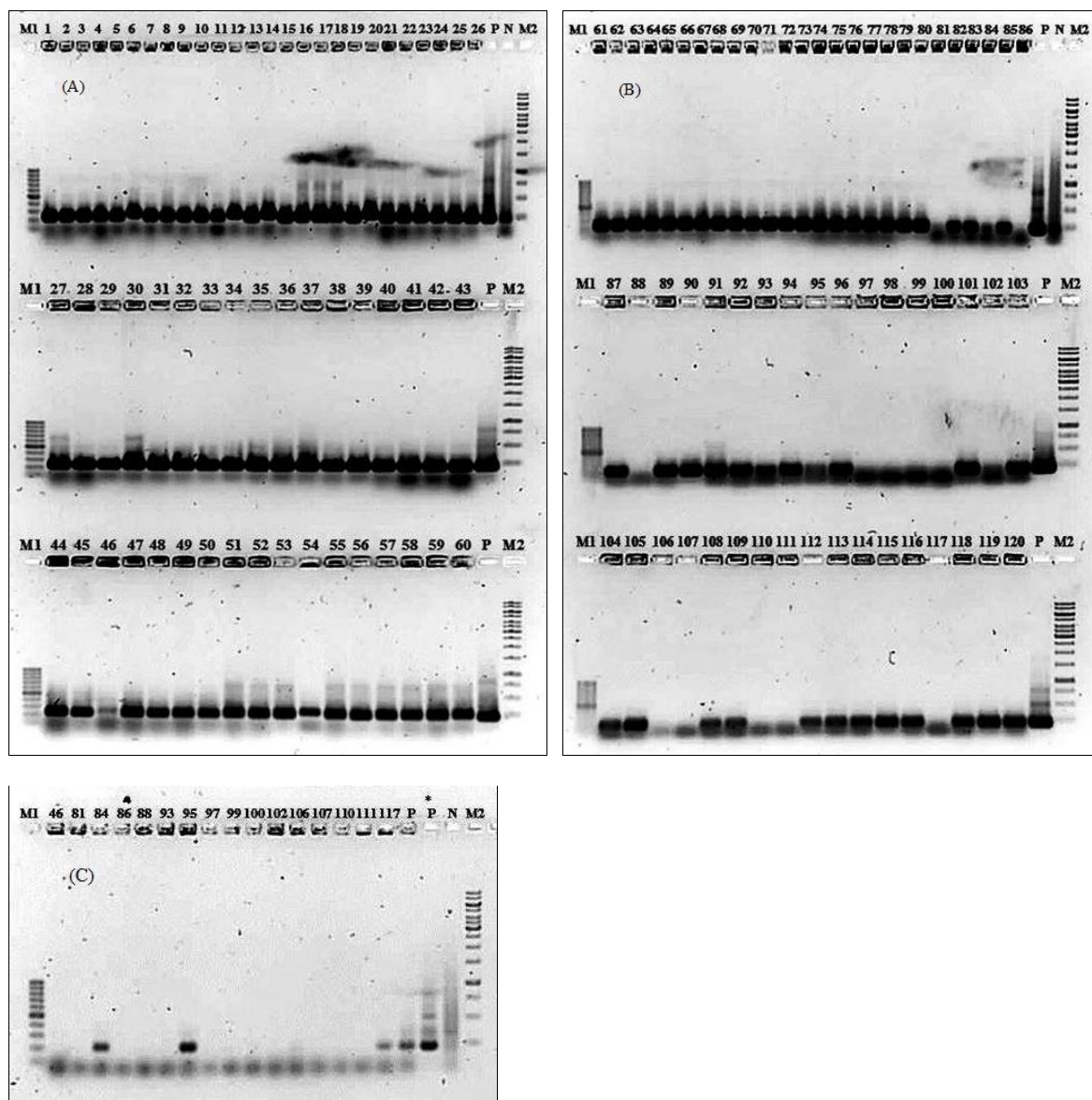
Rast bakterij iz izdelka jogurt LGG smo določili v približno enakih koncentracijah 10^5 - 10^6 KE/g na gojiščih MRS anaerobno, MRS aerobno, Rogosa anaerobno, Rogosa aerobno, LAMVAB ZKV in LAMVAB (preglednica 19).

Z metodo PCR smo 107 od 120 preiskovanih kolonij potrdili za predstavnike rodu *Lactobacillus* (preglednica 19). Jogurt LGG vsebuje starterski kulturi *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* in *Str. thermophilus* ter eno probiotično bakterijo, in sicer *Lactobacillus rhamnosus*. Na gojišču LAC pa rasti pri uporabljenih razredčitvah nismo opazili (preglednica 19), medtem ko sta tudi seva čistih kultur *Lb. rhamnosus* IM 239 ter *Lb. rhamnosus* IM 310 na omenjenem gojišču zrasla v koncentraciji manj kot 10^6 KE/ml (preglednica 10).

Pri izdelku jogurt LGG smo z metodo PCR določili le laktobacile, ki torej dobro uspevajo na vseh uporabljenih gojiščih (preglednica 19).

Preostalih 13 kolonij, ki so zrasle na gojiščih Rogosa anaerobno, LAMVAB-ZKV in LAMVAB nismo uspeli identificirati, sklepali smo, da gre najverjetneje za predstavnike jogurtove starterske kulture. Čeprav smo na 13-ih neidentificiranih kolonijah metodo PCR z za rod *Lactobacillus* začetnima oligonukleotidoma ponovili trikrat, smo vsakič dobili negativne rezultate in s tem z veliko verjetnostjo potrdili da ne gre za laktobacile (preglednica 19). Čista kultura *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* IM 348 je na gojiščih MRS anaerobno, MRS aerobno, M-MRS anaerobno, M-MRS aerobno in Rogosa anaerobno sicer zrasla do velikosti populacije 10^8 KE/ml (preglednica 10), kar pa ne velja nujno tudi za sev *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* iz jogurta LGG. Po drugi strani pa je čista kultura *Str. thermophilus* IM 377 uspevala do velikosti populacije 10^7 KE/ml le na gojiščih MRS anaerobno, MRS-ŽS in M-17, drug sev čiste kulture *Str. thermophilus* IM 410 pa je rasel le na gojiščih MRS anaerobno do velikosti populacije 10^5 KE/ml in M-17 do velikosti populacije 10^7 KE/ml (preglednica 13), medtem ko rasti na ostalih gojiščih pri uporabljenih razredčitvah nismo zasledili. Prav tako opažanj rasti čistih kultur *Str. thermophilus* IM 377 ter *Str. thermophilus* IM 410 ne moremo preslikati na sev *Streptococcus thermophilus* iz jogurta LGG, ki pa bi lahko vseeno zrasel na gojiščih

Rogosa anaerobno, LAMVAB-ZKV in LAMVAB, zato ne moremo izključiti možnosti, da bi bile neidentificirane kolonije lahko pripadniki rodu *Streptococcus*, kar bi lahko potrdili z ustrežno metodo PCR.



Slika 15: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov bakterij, osamljenih iz jogurta LGG, pomnoženih z začetnima oligonukleotidoma, specifičnima za rod *Lactobacillus*, (A): gel 1, (B): gel 2, (C): gel 3.

Legenda: P=pozitivna kontrola, N=negativna kontrola, M1=molekulski označevalec velikosti DNA 100 bp, M2=molekulski označevalec velikosti DNA 1 kb, proge 1-20: pomnožki bakterij z gojišča MRS anaerobno, proge 21-40: pomnožki bakterij z gojišča MRS aerobno, proge 41-60: pomnožki bakterij z gojišča Rogosa anaerobno, proge 61-80: pomnožki bakterij z gojišča Rogosa aerobno, proge 81-100: pomnožki bakterij z gojišča LAMVAB-ZKV, proge 101-120: pomnožki bakterij z gojišča LAMVAB

* dvakraten nanos vzorca (proga P)

4.2.2.3 Napitek LCA

Napitek LCA vsebuje bakterijske vrste *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* in *Bifidobacterium* Bb-12. Na barvnem preparatu naključno izbrane za laktobacile značilne kolonije (priloga B(3)) so vidne po Gramu pozitivne palčke, ki so mikromorfološke lastnosti laktobacilov. Opazimo pa tudi ukrivljene in/ali razvejane palčke, najverjetneje gre za bifidobakterije.

Rezultati rasti bakterij na različnih gojiščih in metod PCR so prikazani v preglednici 20. Z agarozno gelsko elektroforezo smo izvedli analizo pomnožkov z za rod *Lactobacillus*, z za vrsto *Lactobacillus acidophilus* ter za rod *Bifidobacterium* specifičnima začetnima oligonukleotidoma (slika 16).

Preglednica 20: Kvantifikacija bakterij, osamljenih iz napitka LCA in identifikacija izbranih kolonij z metodo PCR.

Gojišče	MRS		Rogosa		LAMVAB-ZKV	LAMVAB	LAC
Razmere inkubacije	anaerobno	aerobno	anaerobno	aerobno	anaerobno	anaerobno	anaerobno
Preiskava	Število bakterij (KE/g) na gojišču						
Kvantifikacija na trdnih gojiščih	$1,98 \times 10^8$	$1,43 \times 10^8$	$9,18 \times 10^6$	$2,34 \times 10^7$	$1,34 \times 10^8$	$1,13 \times 10^7$	$4,70 \times 10^7$
	Število pozitivnih kolonij/število analiziranih kolonij						
Identifikacija laktobacilov z metodo PCR	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	13/20
Identifikacija bifidobakterij z metodo PCR	/	/	/	/	/	/	0/7

Legenda: /=metode PCR nismo izvedli, MRS=gojišče po De Man, Rogosa in Sharpe, Rogosa=selektivno gojišče za laktobacile, LAMVAB=MRS z dodanim vankomicinom in bromkrezol zelenim, LAMVAB-ZKV=LAMVAB z nižano koncentracijo vankomicina, LAC=MRS s ciprofloksacinom in klindamicinom

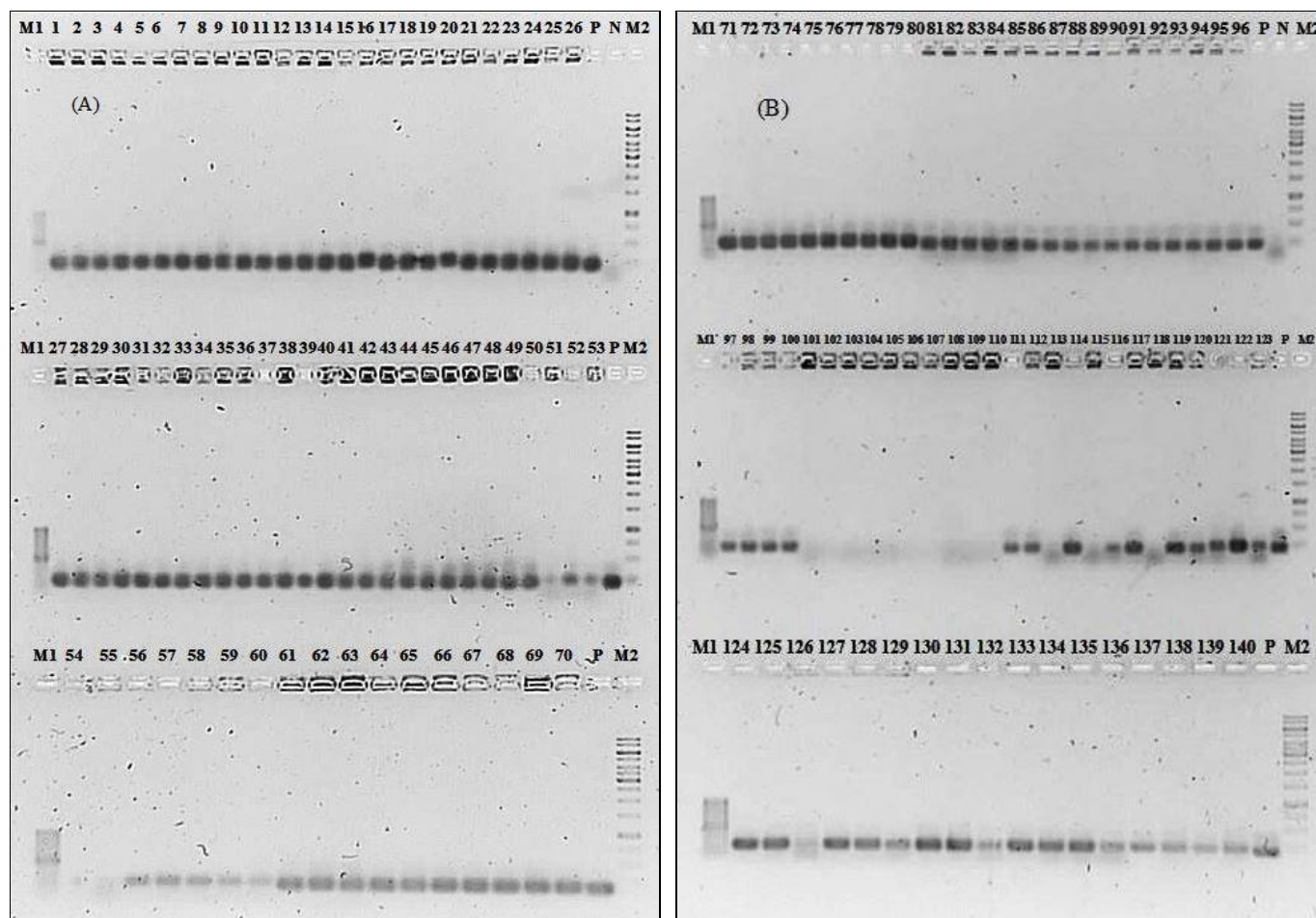
Rast mikroorganizmov iz napitka LCA je bila uspešna na vseh uporabljenih gojiščih, in sicer v koncentracijah 10^6 - 10^8 KE/g (preglednica 20).

Z metodo PCR smo 133 od 140 preiskovanih kolonij potrdili za predstavnike rodu *Lactobacillus* (preglednica 20). Sedem kolonij, ki so zrasle na gojišču LAC, je ostalo neidentificiranih.

Izdelek poleg jogurtove starterske kulture (*Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* in *Str. thermophilus*) ter sevov *Lb. acidophilus* La-5 in *Lb. casei*, vsebuje še sev *Bifidobacterium* Bb-12, a prisotnosti predstavnikov tega rodu z uporabljenim metodo nismo uspeli potrditi (preglednica 20). Na dobljeni rezultat so nas napeljali že rezultati rasti čiste kulture *B. animalis* ssp. *lactis* Bb-12 IM 414 in *B. animalis* ssp. *lactis* Bb-12 IM 418, ki je na gojišču LAC zrasla v koncentraciji manj kot 10^6 KE/ml (preglednica 12).

Po drugi strani pa je tudi čista kultura *Str. thermophilus* IM 377 na omenjenem gojišču zrasla manj kot 10^6 KE/ml ter *Str. thermophilus* IM 410 na gojišču LAC zrasla v nižji

koncentraciji kot 10^2 KE/ml (preglednica 13), česar pa spet ne moremo trditi za sev *Streptococcus thermophilus* iz napitka. Obstaja torej možnost, da je sedem neidentificiranih kolonij z gojišča LAC pripadnikov rodu *Streptococcus*, kar bi lahko potrdili z ustrežno metodo PCR.



Slika 16: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov bakterij, osamljenih iz napitka LCA, pomnoženih z začetnima oligonukleotidoma, specifičnima za rod *Lactobacillus*, (A): gel 1, (B): gel 2.

Legenda: P=pozitivna kontrola, N=negativna kontrola, M1=molekulski označevalec velikosti DNA 100 bp, M2=molekulski označevalec velikosti DNA 1 kb, proge 1-20: pomnožki bakterij z gojišča MRS anaerobno, proge 21-40: pomnožki bakterij z gojišča MRS aerobno, proge 41-60: pomnožki bakterij z gojišča Rogosa anaerobno, proge 61-80: pomnožki bakterij z gojišča Rogosa aerobno, proga 81: pomnožki bakterij z gojišča LAMVAB-ZKV, proge 82-100: pomnožki bakterij z gojišča LAMVAB-ZKV, proge 101-120: pomnožki bakterij z gojišča LAMVAB, proge 121-140: pomnožki bakterij z gojišča LAC

4.2.2.4 Skuta Spar Vital

Skuta Spar Vital vsebuje bakterijski vrsti *Lactobacillus acidophilus* in *Bifidobacterium* (nutrishTM). Na barvnem preparatu naključno izbrane, za laktobacile značilne, kolonije (priloga B(4)) so vidne po Gramu pozitivne palčke, ki so mikromorfološke lastnosti laktobacilov.

Rezultati rasti bakterij na različnih gojiščih in metod PCR so prikazani v preglednici 21. Z agarozno gelsko elektroforezo smo izvedli analizo pomnožkov z za rod *Lactobacillus*, z za vrsto *Lactobacillus acidophilus* ter za rod *Bifidobacterium* specifičnima začetnima oligonukleotidoma (slika 17).

Preglednica 21: Kvantifikacija bakterij, osamljenih iz skute Spar Vital in identifikacija izbranih kolonij z metodo PCR.

Gojišče	MRS		Rogosa		LAMVAB-ZKV	LAMVAB	LAC
Razmere inkubacije	anaerobno	aerobno	anaerobno	aerobno	anaerobno	anaerobno	anaerobno
Preiskava	Število bakterij (KE/g) na gojišču						
Kvantifikacija na trdnih gojiščih	$3,25 \times 10^7$	$1,05 \times 10^7$	$3,14 \times 10^7$	$8,00 \times 10^6$	$1,50 \times 10^6$	$3,45 \times 10^7$	$7,10 \times 10^6$
	Število pozitivnih kolonij/število analiziranih kolonij						
Identifikacija laktobacilov z metodo PCR	15/20	14/20	14/20	6/20	11/20	9/20	20/20
Identifikacija bifidobakterij z metodo PCR	2/5	0/6	2/6	3/14	0/9	0/11	/
Identifikacija enterokokov z metodo PCR	0/3	0/6	0/4	1/11	0/9	0/11	/

Legenda: /=metode PCR nismo izvedli, MRS=gojišče po De Man, Rogosa in Sharpe, Rogosa=selektivno gojišče za laktobacile, LAMVAB=MRS z dodanim vankomicinom in bromkrezol zelenim, LAMVAB-ZKV=LAMVAB z znižano koncentracijo vankomicina, LAC=MRS s ciprofloksacinom in klindamicinom

Mikrobna populacija izdelka skuta Spar Vital je zrasla na vseh uporabljenih gojiščih v koncentraciji 10^6 - 10^7 KE/g (preglednica 21). Z gojišč smo analizirali 140 naključno izbranih kolonij. Z metodo PCR smo uspeli identificirati predstavnike laktobacilov, bifidobakterij in enterokokov.

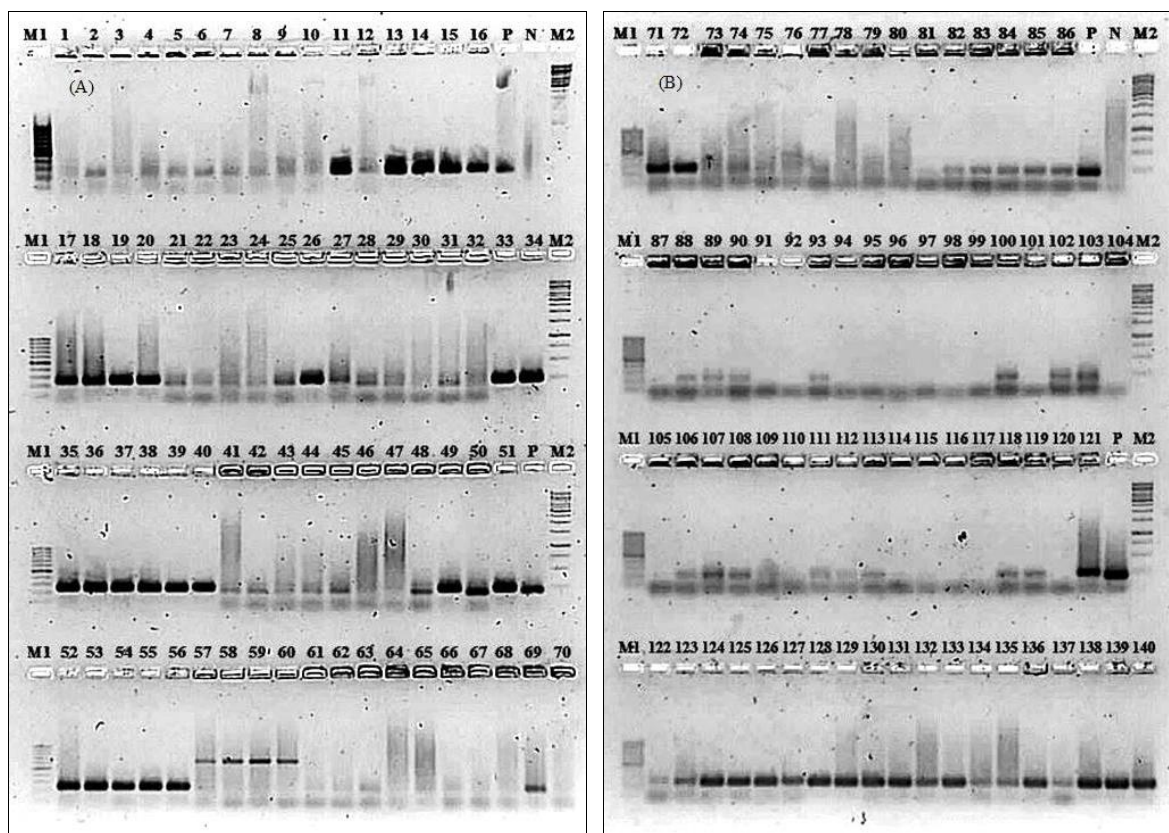
Z metodo PCR z rod *Lactobacillus* specifičnima začetnima oligonukleotidoma smo 89 od 140 analiziranih kolonij, osamljenih z vseh gojišč, potrdili za predstavnike rodu *Lactobacillus* (preglednica 21, slika 17, gel (A), gel (B)).

Dodatno smo z metodo PCR s specifičnima začetnima oligonukleotidoma za rod *Bifidobacterium* potrdili še sedem kolonij, osamljenih z gojišč MRS anaerobno, Rogosa anaerobno in Rogosa aerobno za predstavnike rodu *Bifidobacterium* (preglednica 21, rezultati 2/5, 2/6, 3/14). Tudi čisti kulturi *B. animalis* ssp. *lactis* IM 414 in *B. animalis* ssp.

lactis IM 418 sta zrasli na gojiščih MRS anaerobno in Rogosa anaerobno, ne pa tudi na gojišču Rogosa aerobno (preglednica 12).

Glede na tehnološki postopek izdelave skute, smo se odločili preveriti še morebitno prisotnost enterokokov. Z metodo PCR smo potrdili še eno kolonijo, osamljeno z gojišča Rogosa aerobno, za predstavnico rodu *Enterococcus* (preglednica 21, rezultat 1/11). Čista kultura *E. faecium* IM 312 je na gojišču Rogosa aerobno zrasla v koncentraciji 10^6 KE/ml, čista kultura *E. faecium* IM 273 pa $<10^6$ KE/ml (preglednica 13).

Preostalih 43 kolonij, osamljenih z gojišč MRS anaerobno, MRS aerobno, Rogosa anaerobno, Rogosa aerobno, LAMVAB-ZKV in LAMVAB, z uporabljenjo metodo nismo uspeli identificirati (preglednica 21).



Slika 17: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov bakterij, osamljenih iz skute Spar Vital, pomnoženih z začetnima oligonukleotidoma, specifičnima za rod *Lactobacillus*, (A): gel 1, (B): gel 2.

Legenda: P=pozitivna kontrola, N=negativna kontrola, M1=molekulski označevalec velikosti DNA 100 bp, M2=molekulski označevalec velikosti DNA 1 kb, proge 1-20: pomnožki bakterij z gojišča MRS anaerobno, proge 21-40: pomnožki bakterij z gojišča MRS aerobno, proge 41-60: pomnožki bakterij z gojišča Rogosa anaerobno, proge 61-80: pomnožki bakterij z gojišča Rogosa aerobno, proga 81: pomnožki bakterij z gojišča LAMVAB-ZKV, proge 82-100: pomnožki bakterij z gojišča LAMVAB-ZKV, proge 101-120: pomnožki bakterij z gojišča LAMVAB, proge 121-140: pomnožki bakterij z gojišča LAC

4.2.2.5 Sir LCA

Sir LCA vsebuje probiotično kulturo *Lactobacillus casei*. Na barvnem preparatu naključno izbrane, za laktobacile značilne, kolonije (priloga B(5)) so vidne po Gramu pozitivne

palčke, ki so mikromorfološke lastnosti laktobacilov. Opazimo pa tudi ukrivljene in/ali razvejane palčke, najverjetneje gre za bifidobakterije.

Rezultati rasti bakterij na različnih gojiščih in metode PCR so prikazani v preglednici 22. Z agarozno gelsko elektroforezo smo izvedli analizo pomnožkov z za rod *Lactobacillus*, z za vrsto *Lactobacillus acidophilus* ter za rod *Bifidobacterium* specifičnima začetnima oligonukleotidoma (slika 18).

Preglednica 22: Kvantifikacija bakterij, osamljenih iz sira LCA in identifikacija izbranih kolonij z metodo PCR po inkubaciji pri 30 °C in 37 °C.

Gojišče	MRS		Rogosa		LAMVAB-ZKV	LAMVAB	LAC
Razmere inkubacije	anaerobno	aerobno	anaerobno	aerobno	anaerobno	anaerobno	anaerobno
Preiskava	Število bakterij (KE/g) na gojišču						
Kvantifikacija na trdnih gojiščih, 30 °C	5,30×10 ⁸	7,50×10 ⁸	4,40×10 ⁸	4,10×10 ⁸	<10 ⁵	<10 ⁵	<10 ⁵
Kvantifikacija na trdnih gojiščih, 37 °C	7,10×10 ⁸	7,70×10 ⁸	6,20×10 ⁸	5,60×10 ⁸	1,99×10 ⁸	1,60×10 ⁸	<10 ⁵
Število pozitivnih kolonij/število analiziranih kolonij							
Identifikacija laktobacilov z metodo PCR, 30 °C	10/10	10/10	10/10	10/10	/	/	/
Identifikacija laktobacilov z metodo PCR, 37 °C	10/10	10/10	10/10	10/10	20/20	20/20	/

Legenda: /=metode PCR nismo izvedli, MRS=gojišče po De Man, Rogosa in Sharpe, Rogosa=selektivno gojišče za laktobacile, LAMVAB=MRS z dodanim vankomicinom in bromkrezol zelenim, LAMVAB-ZKV=LAMVAB z znižano koncentracijo vankomicina, LAC=MRS s ciprofloksacinom in klindamicinom

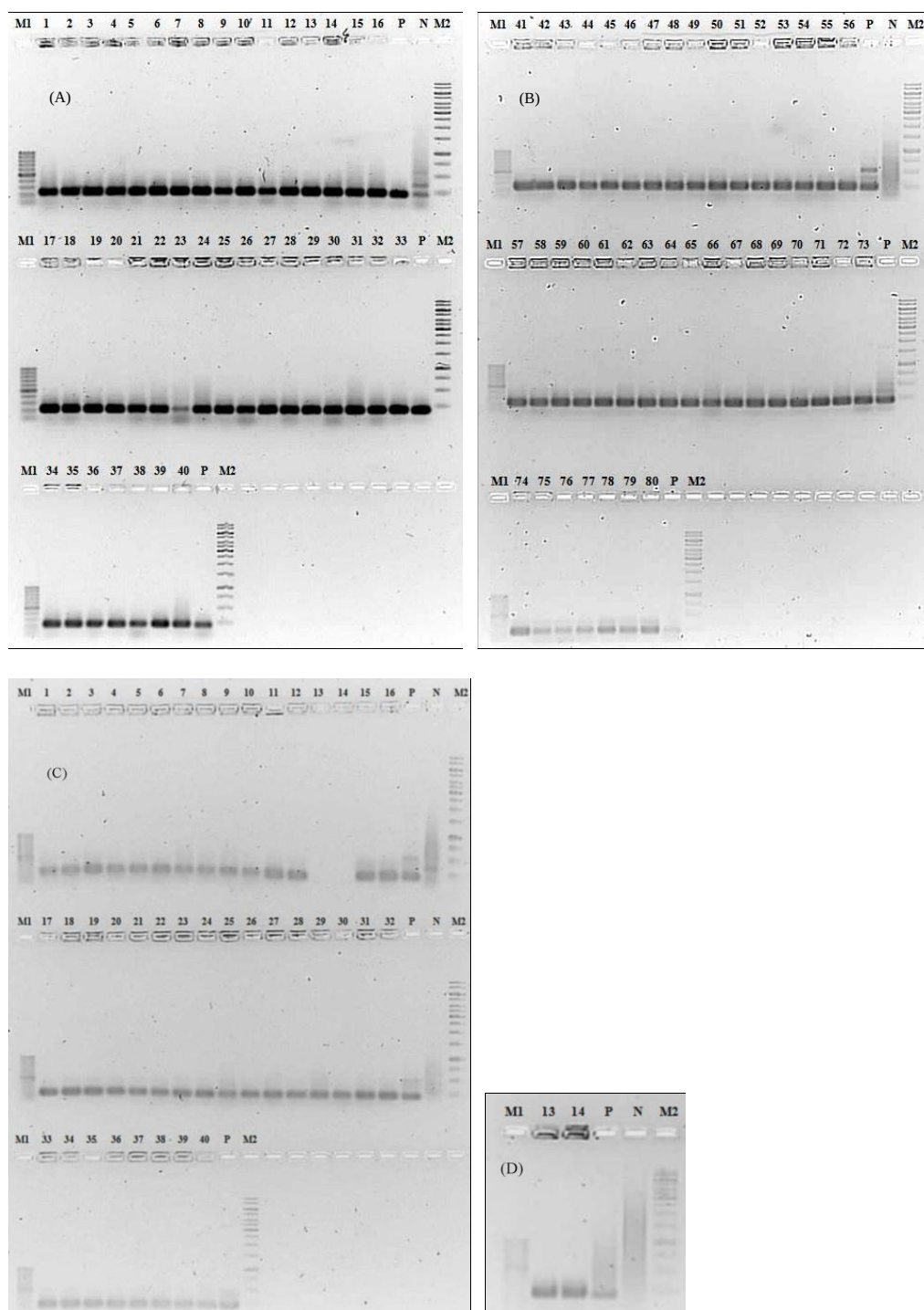
Z metodo PCR smo analizirali kolonije, zrasle iz vzorca sira LCA, kjer smo petrijeve plošče z gojiščem in cepljenim z izdelkom inkubirali ločeno, in sicer pri 30 °C in pri 37 °C.

V poskusu, kjer smo inkubacijo izvedli pri 30 °C je mikroba populacija sira LCA izkazala rast na gojiščih MRS anaerobno, MRS aerobno, Rogosa anaerobno in Rogosa aerobno zrasla v koncentracijah 10⁸ KE/g. Skupno smo analizirali 40 kolonij in vse potrdili za predstavnike rodu *Lactobacillus* (preglednica 22, slika 18, gel (C), gel (D)). Z gojišč LAMVAB-ZKV, LAMVAB in LAC metode PCR nismo izvedli, ker pri uporabljenih razredčitvah ni bilo mikrobne rasti. Inkubacijo pri 30 °C smo izvedli zaradi optimizacije razmer za rast vrste *Lb. casei* (preglednica 22).

Pri inkubaciji pri 37 °C je bila rast uspešna na gojiščih MRS anaerobno, MRS aerobno, Rogosa anaerobno, Rogosa aerobno, LAMVAB-ZKV in LAMVAB v koncentracijah 10⁸ KE/g, kjer pa smo vseh 80 osamljenih in analiziranih kolonij potrdili za pripadnike

rodu *Lactobacillus* (preglednica 22, slika 18, gel (A), gel (B)). Z gojišča LAC metode PCR nismo izvedli, ker pri uporabljenih razredčitvah ni bilo rasti mikroorganizmov (preglednica 22).

Dobljen rezultat nas ni presenetil, saj sir LCA vsebuje le eno dodano probiotično bakterijo, in sicer *Lactobacillus casei* ter sirarske starterske kulture. Informacije z deklaracije izdelka nam niso postregli s točnimi podatki o sirarski kulturi, sklepamo pa, da so bili to laktobacili, saj smo vse preiskovane kolonije določili za predstavnike rodu *Lactobacillus*, glede na to, da smo jih izbrali naključno, sklepamo, da smo v analizi zaobjeli tako sirarsko kot tudi probiotično kulturo.



Slika 18: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov bakterij, osamljenih iz sira LCA, pomnoženih z začetnima oligonukleotidoma, specifičnima za rod *Lactobacillus*, (A): gel 1 po inkubaciji gojišč pri 37 °C, (B): gel 2 po inkubaciji gojišč pri 37 °C, (C): gel 1 po inkubaciji gojišč pri 30 °C, (D): gel 2 po inkubaciji gojišč pri 30 °C.

Legenda: P=pozitivna kontrola, N=negativna kontrola, M1=molekulski označevalec velikosti DNA 100 bp, M2=molekulski označevalec velikosti DNA 1 kb, proge 1-10: pomnožki bakterij z gojišča MRS anaerobno, proge 11-20: pomnožki bakterij z gojišča MRS aerobno, proge 21-30: pomnožki bakterij z gojišča Rogosa anaerobno, proge 31-40: pomnožki bakterij z gojišča Rogosa aerobno, proge 41-60: pomnožki bakterij z gojišča LAMVAB-ZKV, proge 61-80: pomnožki bakterij z gojišča LAMVAB

4.2.3 Ocena selektivnosti gojišč in razmer pri njihovi inkubaciji

Izdelki, ki smo jih pri analizi uporabili so vsebovali eno ali več probiotičnih kultur, med katerimi so bili laktobacili, bifidobakterije, enterokoki, laktokoki ter starterske kulture, ki so prisotne v mlečnih izdelkih.

Na gojišču MRS smo določili laktobacile (preglednice 14-22) in dokazali prisotnost bifidobakterij. Prepoznali smo tri bifidobakterije na gojišču MRS anaerobno (preglednici 18 in 21) ter eno bifidobakterijo na gojišču MRS aerobno (preglednica 15). Dodatno smo identificirali še en enterokok, ki je zrasel na gojišču MRS aerobno (preglednica 16). Glede na rezultate analiz izdelkov gojišče MRS omogoča rast laktobacilom, bifidobakterijam in enterokokom.

Na gojišču Rogosa smo poleg laktobacilov (preglednice 14-22) določili še predstavnike bifidobakterij in enterokokov. Prepoznali smo tri bifidobakterije na gojišču Rogosa anaerobno (preglednici 15 in 21), pet bifidobakterij na gojišču Rogosa aerobno (preglednici 16 in 21) ter en enterokok na gojišču Rogosa aerobno (preglednica 21). Ocenimo lahko, da gojišče Rogosa omogoča rast laktobacilom, bifidobakterijam in enterokokom.

Na gojišču LAMVAB-ZKV smo določili le laktobacile (preglednice 14-22). Na gojišču LAMVAB smo prepoznali laktobacile (preglednice 14-22) ter tri bifidobakterije (preglednica 16). Gojišče je selektivno za laktobacile, a glede na rezultate analiz izdelkov v manjši meri omogoča rast tudi bifidobakterijam. Znotraj laktobacilov smo opazili, da sestavine gojišč LAMVAB-ZKV in LAMVAB najbolje izkoriščajo predstavniki skupine *Lb. casei* in vrste *Lb. salivarius* (preglednice 14-17, 19, 20 in 22).

Na gojišču LAC smo določili le laktobacile (preglednice 14-22). V primeru, da je izdelek (jogurt LGG, sir LCA) vseboval le bakterijsko vrsto, ki spada v skupino *Lb. casei* (*Lb. rhamnosus*, *Lb. casei*) rasti na gojišču LAC nismo opazili, kar nakazuje na to, da gojišče LAC selektivno deluje tudi znotraj rodu *Lactobacillus*. Podobno smo ugotovili še pri izdelku BioGaia®, kjer vsebovana kultura *Lb. reuteri* tudi ni uspevala na gojišču LAC. Do nasprotne ugotovitve so nas pripeljali rezultati pri izdelkih Yogermina®, Waya AB®, Waya AD®, fermentirano mleko Ego, napitek LCA, skuta Spar Vital, kjer je dodana kultura *Lb. acidophilus* na gojišču LAC uspevala zelo dobro. Povzamemo lahko, da je gojišče LAC za skupino *Lb. acidophilus* zelo selektivno, hkrati pa ne ustreza predstavnikom skupine *Lb. casei*.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Da bi pridobili orientacijske vrednosti sposobnosti rasti predstavnikov različnih rodov MKB in bifidobakterij na različnih gojitvenih in selektivnih gojiščih, smo rast čistih bakterijskih kultur ugotavljali s cepljenjem na gojišča MRS (anaerobno, aerobno), M-MRS (anaerobno, aerobno), MRS-ŽS, Rogosa (anaerobno, aerobno), LAMVAB-ZKV, LAMVAB, LAC in M-17. Na podlagi rezultatov rasti čistih bakterijskih kultur na izbranih gojiščih smo se odločili, da gojišč M-MRS (anaerobno, aerobno) in MRS-ŽS v nadaljnji analizi ne bomo uporabili, saj nista izkazali potencialne selektivnosti za rast laktobacilov. Tudi gojišča M-17 v drugem delu poskusa nismo uporabili, saj smo v začetnem delu preko njega pridobili le orientacijsko vrednost rasti kokov (enterokoki, laktokoki, streptokoki).

V nadaljevanju smo preverjali selektivno rast laktobacilov iz prehranskih dopolnil in mlečnih izdelkov na različnih gojiščih, in sicer MRS (anaerobno, aerobno), Rogosa (anaerobno, aerobno), LAMVAB-ZKV, LAMVAB in LAC.

Da bi preverili selektivnost posameznega gojišča smo naključno izbrane kolonije po nacepljanju izdelkov identificirali z metodo PCR, pri čemer smo želeli zajeti čim bolj reprezentativen vzorec. Iz zapisov na deklaracijah, smo najprej vse vzorce kolonij preverili z metodo PCR, v kateri smo uporabili začetne oligonukleotide, specifične za rod *Lactobacillus*. Pri vzorcih kolonij, kjer smo dobili negativne rezultate, smo v nadaljnji analizi uporabili metodo PCR še s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi za bifidobakterije, enterokoke oz. laktokoke, ustrezno glede na podatke z deklaracij.

5.1.1 Primerjava selektivnosti gojišč za čiste kulture in laktobacile iz probiotičnih izdelkov

V selektivnih gojiščih uporabljamo dodatke, ki selektivno zavirajo rast čim večjega števila prisotnih mikroorganizmov, ne motijo pa rasti tarčnega mikroorganizma. Največkrat so to antibiotiki, barvila, dodatki ali ostale sestavine gojišč, selektivnost pa lahko še dodatno povečamo z ustrezno vrednostjo pH in a_w -gojišča ter razmerami inkubacije, na primer s temperaturo ali sestavo atmosfere. Identifikacijo si olajšamo z uporabo diferencialnih snovi v selektivnem gojišču, ki omogočajo razlikovanje sorodnih mikroorganizmov. Izbira gojišča za selektivno rast zelenih mikroorganizmov je odvisna od vrste preiskovanega izdelka, tarčne skupine mikroorganizmov in taksonomske raznolikosti bakterijske mikrobiote izdelka (Holbrook, 2000; Smole Možina, 2003).

Naši rezultati so pokazali, da bolj kot naj bi bilo gojišče selektivno, uspešnejša je bila selektivna rast tarčnega mikroorganizma ter zavirala rast preostale prisotne mikrobiote, kar smo potrdili tudi z metodo PCR, kjer smo uporabili rodovno oz. vrstno specifične začetne oligonukleotide za laktobacile, bifidobakterije, enterokoke.

Starterski jogurtovi kulturi *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* in *Streptococcus thermophilus* v izdelkih sta živi, v prebavnem traktu pa ne preživita in tako ne izkazuje

terapevtskih učinkov. Sicer pa je uporaba tehnoloških mikroorganizmov ključna za pravilen in uspešen potek fermentacije (Tharmaraj in Shah, 2003).

5.1.1.1 MRS

Gojišče MRS je v primerjavi z gojiščem LAMVAB slabo selektivno za laktobacile, medtem ko je gojišče LAMVAB izkazalo visoko selektivnost za rast predstavnikov rodu *Lactobacillus* (Hartemink in sod., 1997). Ugotovili so, da so vsi preiskovani laktobacili, razen dveh, osamljenih iz ustne votline, rasli na gojišču LAMVAB, niso pa opazili rasti pri nobenem od preiskovanih predstavnikov rodu bifidobakterij, enterokokov, laktokokov in streptokokov. Prav nasprotno pa se je izkazalo pri gojišču MRS, saj so, poleg laktobacilov, na gojišču MRS dobro rasli vsi preiskovani sevi zgoraj naštetih rodov.

Do podobnih ugotovitev kot Hartemink in sod. (1997) smo prišli tudi v našem poskusu, ko smo dokazali zadovoljivo selektivno rast laktobacilov na gojišču LAMVAB oz. že na gojišču LAMVAB-ZKV, saj je poleg laktobacilov rast izkazalo le še pet ne-laktobacilov, in sicer *B. infantis* IM 344, *E. faecium* IM 273, *E. faecium* IM 312 ter *Lc. lactis* ssp. *cremoris* IM 241 kot čiste kulture na gojišču LAMVAB-ZKV (preglednica 13) ter *B. bifidum* iz izdelka Waya AB[®] na gojišču LAMVAB (preglednica 16). Med rezultati našega poskusa in poskusa Hartemink in sod. (1997) so jasne vzporednice, saj gojišče MRS v obeh primerih omogoča neselektivno rast raznoliki mikrobioti, medtem ko gojišče LAMVAB dovolj selektivno omogoča rast laktobacilom, saj je v obeh poskusih večina zrasle populacije na gojišču LAMVAB pripadala rodu *Lactobacillus*.

Zaključimo lahko, da gojišče MRS ne izkazuje selektivnosti za rast laktobacilov, saj omogoča rast vsem MKB in tudi bifidobakterijam. Potrdili smo hipotezo Van de Castele in sod. (2006), da je gojišče MRS bolj kultivacijsko kot selektivno in zato primernejše za približno oceno velikosti populacije MKB in bifidobakterij kot pa za selektivno rast laktobacilov.

Tudi aerobne oz. anaerobne razmere inkubacije so do določene mere vplivale na rast kultur, saj je v anaerobnih razmerah dobro uspevala večina preiskovanih bakterij, medtem ko v aerobnih razmerah nismo ugotovili rasti bifidobakterij in streptokokov pri obravnavanih razredčitvah.

5.1.1.2 M-MRS

Na gojišču M-MRS anaerobno so bifidobakterije v našem primeru primerljivo dobro uspevale kot na gojišču MRS anaerobno, podobno pa je ugotovil že Shah (2000).

Podobno kot Hull in Roberts (1984) smo tudi mi ugotovili, da gojišče M-MRS ne ustreza predstavnikom vrste *Str. thermophilus*.

Na gojišču M-MRS anaerobno in aerobno smo določili rast predstavnikov rodov *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* in *Lactococcus* v približno enakih koncentracijah 10^8 - 10^9 KE/ml (preglednice 10, 12 in 13). Streptokoki na gojišču M-MRS

pri obravnavanih razredčitvah niso uspevali (preglednica 13). Iz rezultatov sklepamo, da gojišče M-MRS ne izkazuje zadostne selektivnosti za rast laktobacilov.

5.1.1.3 MRS-ŽS

Na gojišču MRS-ŽS v anaerobnih razmerah so sicer najbolj uspevali laktobacili, čeprav smo zaznali rast tudi ostalih predstavnikov MKB (preglednice 10, 12 in 13). Iz rezultatov naše analize lahko rečemo, da je gojišče premalo selektivno za rast predstavnikov rodu *Lactobacillus*.

Čeprav v svoji študiji Vinderola in Reinheimer (1999) predlagata gojišče MRS-ŽS za selektivno rast vrste *Lb. acidophilus* iz mešanih mikrobnih združb, pa to težko rečemo za našo raziskavo, saj se gojišče MRS-ŽS za vrsto *Lb. acidophilus* ni izkazalo kot primerno in je bila rast $<10^4$ KE/ml (preglednica 10).

Raziskovalca Dave in Shah (1996) sta v svoji raziskavi ugotovila, da vrsta *Lb. acidophilus* na gojišču MRS-ŽS raste za približno 2 logaritamski enoti slabše kot na gojiščih MRS in M-MRS. V naši analizi smo zaznali rast predstavnika *Lb. acidophilus* na gojiščih MRS in M-MRS v aerobnih in anaerobnih razmerah inkubacije v koncentracijah 10^8 KE/ml, medtem ko je bila rast na gojišču MRS-ŽS $<10^4$ KE/ml (preglednica 10).

Tudi Talwalkar in Kailasapathy (2004) sta označila gojišče MRS-ŽS za neselektivno pri končni identifikaciji bakterij *Lb. acidophilus*, *Lb. casei* ter bifidobakterij v jogurtih.

Pri analizi vzorcev čistih bakterijskih sevov bifidobakterij smo določili le rast seva *B. infantis* 344 na gojišču MRS-ŽS v anaerobnih razmerah, ne pa tudi ostalih šestih preiskovanih bifidobakterij (preglednica 12). Tudi Shah (2000) je v svoji analizi ugotovil, da je sev *B. infantis* zmožen rasti na tem gojišču.

Vinderola in Reinheimer (1999) navajata, da gojišče MRS-ŽS ni ustrezno za rast jogurtove kulture *Str. thermophilus* in *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, a smo v naši analizi opazili rast obeh predstavnikov vrste *Str. thermophilus* na omenjenem gojišču (preglednica 13).

Hartemink in sod. (1997) so označili gojišči MRS in Rogosa kot neselektivni za rast laktobacilov, saj omogočata rast tudi ostalim, na nižano vrednost pH odpornim bakterijam, zlasti bifidobakterijam, enterokokom in streptokokom. Rast ostalih črevesnih bakterij pa je omejena, a ne zanemarljiva. Potreben je torej visoko selektiven medij, ki omogoča osamitev laktobacilov iz mešanih kultur, tudi takih, kjer je velikost populacije laktobacilov v primerjavi z velikostjo populacij drugih prisotnih bakterij, na primer bifidobakterij, enterokokov in streptokokov, manjša.

Že De Carvalho Lima in sod. (2009) so v študiji uporabili probiotične bakterije *Lb. acidophilus* La-5, *Lb. casei* Lc-1 in *B. animalis* Bb-12 ter tehnološki bakteriji za izdelavo jogurta *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* in *Str. thermophilus* in ugotovili selektiven učinek dodatka žolčnih soli v gojišče, ki omogočajo selektivno rast probiotičnim bakterijam in zavirajo rast ostalih bakterij. V naši analizi sta od omenjenih kultur zrasla le dva

predstavnika, in sicer *Lb. casei* IM 305 ter *Str. thermophilus* IM 377 (preglednici 10 in 13). Sklepamo, da gojišče MRS-ŽS ni izkazalo dovolj visoke selektivnosti za rast laktobacilov.

5.1.1.4 Rogosa

Rezultati naše analize so pokazali, da sta gojišči MRS in Rogosa, ki sta sicer glede na literaturne podatke zelo pogosto uporabljeni tudi kot selektivni medij za rast laktobacilov, pravzaprav visoko neselektivni za selektivno rast laktobacilov. Vseeno pa je bilo zaznati malo večjo selektivnost za rast laktobacilov pri gojišču Rogosa, v primerjavi z gojiščem MRS.

Jackson in sod. (2002) navajajo, da visoka vsebnost očetne kisline pripomore k selektivni rasti sevov rodu *Lactobacillus*, vendar smo pri naši analizi spoznali, da so tudi ostale MKB in bifidobakterije, tako čiste kulture kot kulture prisotne v mešani populaciji (Waya AB[®] in fermentirano mleko Ego, skuta Spar Vital), zmožne rasti na gojišču Rogosa (preglednice 12, 13, 16, 18 in 21) in smo ga tako opredelili kot ne najboljšo izbiro za selektivno rast laktobacilov. Vpliv prisotnega kisika (Rogosa aerobno) je selektivnost malenkostno povečal, a še vedno ne bistveno.

Čeprav literaturni podatki (Darukaradhya in sod., 2006; Microbiology manual, 2005) pogosto omenjajo gojišče Rogosa kot selektivno gojišče za laktobacile, se je v našem primeru izkazalo, da gojišče le ni tako zelo selektivno za laktobacile in ga lahko morda bolj upravičeno uvrstimo kar med osnovna gojišča. Poleg laktobacilov so na omenjenem gojišču zelo dobro rasli tudi enterokoki in bifidobakterije.

5.1.1.5 LAMVAB in LAMVAB-ZKV

Uspeli smo določiti, da je gojišče LAMVAB-ZKV za skupino *Lb. casei* (*Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. rhamnosus*) ustrezno (velikost populacije 10^8 - 10^9 KE/ml, preglednica 10).

Hartemink in Rombouts (1999) opisujeta, da se občutljivost bakterij za vankomicin znotraj skupine *Lb. acidophilus* (*Lb. acidophilus*, *Lb. amylovorus*, *Lb. crispatus*, *Lb. gallinarum*, *Lb. gasseri* in *Lb. johnsonii*) lahko močno razlikuje, kar se je izkazalo tudi v našem primeru. Na gojišču LAMVAB-ZKV je bila rast uspešna pri vrsti *Lb. acidophilus* in enem od dveh sevov *Lb. gasseri*, pri vrsti *Lb. johnsonii* pa pri uporabljeni razredčitvi 10^{-6} ne. Te tri seve, ki na gojišču LAMVAB-ZKV niso bili uspešni, smo preiskusili še na gojišču LAMVAB, rasti pri uporabljeni razredčitvi 10^{-6} ni bilo opaziti (preglednica 10).

Kot navajajo literaturni podatki (Hamilton-Miller in Shah, 1998; Swenson in sod., 1990) naj bi bili laktobacili v glavnem odporni proti vankomicinu, razen skupine *Lb. acidophilus* in vrste *Lb. delbrueckii* (Hamilton-Miller in Shah, 1998), kar omogoča selektivno rast laktobacilov iz mešanih kultur ob dodatku vankomicina v gojišče. Ker pa so kot probiotične kulture v izdelkih pogosto prisotni prav mikroorganizmi iz skupine *Lb. acidophilus*, smo se pri analizi selektivnosti gojišča z dodatkom vankomicina osredotočili na gojišče LAMVAB-ZKV, saj smo želeli preveriti, če že nižja koncentracija vankomicina deluje selektivno na rast laktobacilov v primerjavi z rastjo ostalih MKB in bifidobakterij, a hkrati vseeno že omogoči rast tudi bakterij iz skupine *Lb. acidophilus*. Dodana količina

vankomicina v gojišče LAMVAB-ZKV je bila 10x manjša kot v študijah drugih raziskovalcev (Hartemink in sod., 1997).

Kot so zapisali že Hartemink in sod. (1997), vrsta *Lb. bulgaricus* na gojišču LAMVAB ne kaže rasti, saj je občutljiva za vankomicin, mi pa smo dodatno ugotovili, da že tudi gojišče LAMVAB z znižano koncentracijo vankomicina (LAMVAB-ZKV) deluje na vrsto zaviralno (preglednica 10).

Gojišče LAMVAB lahko ocenimo kot selektivno za rast laktobacilov skupine *Lb. casei* ter vrst *Lb. plantarum*, *Lb. reuteri* in *Lb. salivarius* (velikost populacije 10^8 - 10^9 KE/ml, preglednica 10).

Bifidobakterije na gojišču LAMVAB niso izkazale rasti, razen enega seva (preglednica 12). Enterokoka sta na gojišču LAMVAB-ZKV zrasla v koncentraciji 10^9 KE/ml, enega smo preiskusili še na gojišču LAMVAB, rasti ni bilo zaznati ($<10^6$ KE/ml). Pri laktokokih se je rast izkazala pri enem sevu na gojišču LAMVAB-ZKV, na gojišču LAMVAB pa ne. Medtem ko je bil drug sev laktokokov neuspešen v rasti tako na gojišču LAMVAB-ZKV kot na gojišču LAMVAB. Za predstavnika streptokokov gojišči LAMVAB-ZKV in LAMVAB nista bili ugodni za rast (preglednica 13). Ugotovili smo, da višja koncentracija vankomicina (gojišče LAMVAB) deluje zaviralno na zgornje rodove. Analizirali smo sicer le nekaj predstavnikov teh rodov na gojišče LAMVAB, a rasti ni bilo zaznati pri nobenem, medtem ko je bila rast nekaterih izmed njih opažena pri gojišču LAMVAB-ZKV.

Kot so pojasnili že Hartemink in sod. (1997), bifidobakterije in enterokoki v prisotnosti vankomicina ne rastejo najbolje, zato jim gojišče LAMVAB naj ne bi ustrezalo. V zadnjem času je bilo še ugotovljeno, da so lahko tudi nekateri enterokoki odporni proti vankomicinu (Berce in sod., 2004).

Na gojišču LAMVAB smo z metodo PCR uspeli določiti tri kolonije kot bifidobakterije iz izdelka Waya AB[®], tako smo ugotovili, da lahko na gojišču LAMVAB v manjši meri uspevajo tudi bifidobakterije (preglednica 16).

Že pri uporabi nižje koncentracije vankomicina (gojišče LAMVAB-ZKV) se je izkazalo, da bifidobakterije, enterokoki, laktokoki in streptokoki gojišča LAMVAB ne preferirajo (preglednici 12 in 13), medtem ko je bila rast laktobacilov na gojišču LAMVAB-ZKV v primerjavi z gojiščem MRS v večini primerov v enakem koncentracijskem območju (preglednica 10).

Kot navajajo Hartemink in sod. (1999) je gojišče LAMVAB primerno za osamitev laktobacilov iz blata in iz izdelkov, ki vsebujejo probiotične kulture. Omenjeni izdelki poleg laktobacilov vsebujejo tudi bifidobakterije, enterokoke, laktokoke in streptokoke. Bakterije iz rodov *Bifidobacterium* in *Streptococcus* ne rastejo na gojišču LAMVAB (preglednici 12 in 13), le majhen odstotek bakterij iz rodu *Enterococcus* je odpornih proti antibiotiku vankomicin in tako je rast teh bakterij na gojišču LAMVAB precej omejena, kar se je potrdilo tudi v našem primeru.

V izdelkih, kjer je prisotna mešana populacija probiotičnih MKB ter bifidobakterij, je uspešna selektivna osamitev laktobacilov odvisna od prisotnih vrst mikroorganizmov in velikosti njihove populacije. Glede na raziskave je bilo ugotovljeno, da gojišče LAMVAB v največjih primerih omogoča selektivno kultivacijo laktobacilov (Hartemink in sod., 1997; Leuschner in sod., 2002).

5.1.1.6 LAC

Antibiotika klindamicin in ciprofloksacin sta inhibitorja rasti mnogih mikroorganizmov, ki jih uporabljamo v fermentiranih in ne-fermentiranih mlečnih izdelkih, kot so *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis*, *Str. thermophilus*, bifidobakterije, laktokoki, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* ssp. *paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, in vrste znotraj rodu *Leuconostoc* (ISO 20128:2006).

Gojišče LAC je v standardu ISO 20128 (2006) opisano kot selektivno gojišče za rast bakterij iz skupine *Lb. acidophilus*, kamor spadajo *Lb. acidophilus*, *Lb. amylovorus*, *Lb. crispatus*, *Lb. gallinarum*, *Lb. johnsonii* in *Lb. gasseri*, ko jih želimo selektivno osamiti iz fermentiranega ali nefermentiranega mleka, mleka v prahu in otroških formul in so poleg *Lb. acidophilus* prisotne tudi druge MKB in bifidobakterije. Standard hkrati navaja, da metoda ni uporabna, kadar je pričakovano število bakterij iz skupine *Lb. acidophilus* manjše kot 10^4 KE/ml ter število *Lb. rhamnosus*, *Lb. reuteri* ali *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* večje kot 10^6 KE/ml.

Gojišče LAC je v primeru anaerobne inkubacije najbolj selektivno za rast laktobacilov, kar se je pokazalo tako pri analizi čistih kultur kot tudi pri analizi vzorcev iz mlečnih izdelkov in prehranskih izdelkov (preglednice 10-22). Ugotovili smo, da je gojišče najbolj primerno za vrste *Lb. acidophilus*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. gasseri*, *Lb. plantarum*, *Lb. reuteri* (preglednica 10).

Tudi z metodo PCR smo z gojišča LAC določili le laktobacile, kar pomeni, da ostale MKB in bifidobakterije iz izdelkov, niso bile zmožne rasti na gojišču LAC (preglednice 10-22).

5.1.1.7 M-17

Gojišče M-17 smo uporabili za določitev velikosti populacije streptokokov in laktokokov pri analizi čistih bakterijskih sevov (preglednica 13). Rasti laktobacilov na tem gojišču namreč nismo analizirali, saj je že iz literature znano, da ga ne moremo uporabiti niti kot potencialno selektivno gojišče za rast laktobacilov.

5.1.2 Vsebnost probiotičnih kultur v izdelkih

Velikost populacije posamezne probiotične bakterije ali celotne mikrobne populacije v probiotičnem izdelku lahko odstopa od navedene vsebnosti na deklaraciji in je navadno manjša.

Mikroorganizmi so živi organizmi, torej obstaja možnost, da se velikost njihove populacije, tudi še znotraj roka uporabe, spremeni. Klub temu pa mora biti zagotovljena vsaj tolikšna vsebnost mikroorganizmov kot je njena deklarirana vrednost, tako med samo distribucijo izdelka kot tudi ob koncu roka uporabe.

Večinoma smo potrdili prisotnost dodanih probiotičnih kultur v izdelkih, razen pri dveh, in sicer pri izdelku Waya AD[®] nismo določili deklariranih bifidobakterij in laktokokov (preglednica 17) ter pri napitku LCA z našo analizo nismo identificirali dodane kulture *Bifidobacterium* Bb-12 (preglednica 20).

Ob tem je seveda potrebno poudariti, da smo pri našem delu uporabili gojišča, ki so potencialno selektivna za laktobacile. Iz tega razloga smo dokazali največ predstavnikov iz rodu *Lactobacillus*, kar je bil tudi osnovni namen - poiskati najbolj optimalno gojišče za selektivno rast laktobacilov.

Da pri prehranskem dopolnilu Waya AD[®] ter mlečnem napitku LCA omenjenih dodanih probiotičnih kultur nismo uspeli identificirati, lahko morda pripišemo veliki selektivnosti uporabljenih gojišč za laktobacile. Obstaja tudi možnost, da je bila vsebnost probiotikov manjša od pričakovane, kar je lahko posledica premajhne dodane količine probiotikov ob proizvodnji izdelka ali slabše preživelosti bakterije med tehnološkim postopkom in/ali med skladiščenjem. Možno je tudi, da je bila koncentracija tarčne DNA, uporabljene v metodi PCR, nezadostna, ali pa je bila uporabljena DNA premalo čista, saj smo jo osamili direktno iz kolonij, poleg tega smo naključne kolonije z gojišč popikali s sterilnimi zobotrebeci, a smo bili pri prenosu kolonije v mikrocentrifugirko lahko slabše uspešni. Nenazadnje pa je tudi možno, da je bila populacija živa, a ne kultivabilna (VBNC), ali pa je bila deklaracija izdelka neustrezna.

5.2 PRIPOROČILA ZA IZBIRO NAJPRIMERNEJŠEGA SELEKTIVNEGA GOJIŠČA ZA OSAMITEV LAKTOBACILOV IZ RAZLIČNIH PROBIOTIČNIH IZDELKOV IN OCENA UPORABNOSTI KLASIČNIH MIKROBIOLOŠKIH METOD

Kljub pogostim literaturnim navedbam o selektivnosti gojišč MRS in Rogosa za laktobacile lahko iz naših rezultatov rečemo (preglednice 10-22), da ju lahko štejemo k osnovnim gojiščem, saj sta zelo primerni za rast in gojitev večine MKB in ne samo laktobacilov, vsekakor pa ne omogočata selektivne rasti želenih laktobacilov.

Gojišči MRS in Rogosa smo izpostavili tako anaerobnim kot aerobnim razmeram inkubacije. Ugotovili smo, da odnos do kisika ni bistveno doprinesel k selektivnosti posameznega gojišča.

Tudi gojišči M-MRS in MRS-ŽS nista izkazali zadostne občutljivosti za selektivno rast laktobacilov, kar smo ugotovili pri analizi čistih bakterijskih sevov.

Iz rezultatov analiz čistih kultur MKB in bifidobakterij ter mikrobnih populacij probiotičnih izdelkov lahko zaključimo, da sta od uporabljenih gojišč najprimernejšo selektivnost za laktobacile izkazali gojišči LAC in LAMVAB-ZKV.

Vse kolonije, ki so zrasle na gojišču LAC smo z metodo PCR potrdili za predstavnike rodu *Lactobacillus*, kar pomeni, da je omenjeno gojišče omogočalo rast le laktobacilom. Tako pri analizi čistih kultur kot tudi mikrobnih populacij probiotičnih izdelkov na gojišču LAC nismo opazili rasti nobene druge bakterije kot laktobacilov. Gojišče LAC imenujemo kot selektivno gojišče za ugotavljanje števila laktobacilov iz skupine *Lb. acidophilus* v probiotičnih izdelkih, glede na analizirano skupino gojišč in rezultate opravljenega raziskovalnega dela.

Gojišče LAMVAB-ZKV se je prav tako izkazalo kot selektivno za rast laktobacilov, predvsem vrste *Lb. salivarius* in vrst iz skupine *Lb. casei*. Smo pa z metodo PCR potrdili tudi rast bifidobakterij na gojišču LAMVAB, kjer je bil vzorec probiotični izdelek z mešano populacijo laktobacilov (Waya AB®). Pri analizi čistih bakterijskih sevov pa smo v manjši meri opazili še rast enterokokov, laktokokov in bifidobakterije na gojišču LAMVAB-ZKV. S tako pridobljenih informacij bi lahko sklepali, da je njegova selektivnost za rast laktobacilov manj izražena od prej omenjenega gojišča LAC.

Pri ugotavljanju populacije bakterij v probiotičnih izdelkih bi dodatno predlagali še vzporedno analizo z uporabo gojišč MRS in Rogosa, ki bi služili predvsem kot referenčni gojišči.

Kot so v svoji raziskavi dognali že Bogovič Matijašič in sod. (2010), smo tudi v našem primeru prisotnost deklariranih sevov večinoma potrdili, z izjemo dveh izdelkov, ki vsebujeta veliko število različnih bakterij (Waya AD® ter napitek LCA). Pri njima prav vseh navedenih vrst nismo našli.

Pri raziskovalnem delu smo uporabili klasično mikrobiološko metodo nacepljanja mikroorganizmov na gojišča. Največji pomanjkljivosti te metode sta dolgotrajnost in velika poraba materiala, k čemur dodatno doprinese dejstvo, da mora vse delo, od priprave vzorcev do priprave materiala, potekati v aseptičnih razmerah.

Metoda štetja na petrijevih ploščah je manj primerna tudi z vidika, da je selektivnost razpoložljivih gojišč nezadostna, kar lahko vodi v precenjeno število posameznih probiotičnih bakterij. Znano je tudi, da sposobnosti razmnoževanja oz. kultivabilnosti probiotičnih bakterij v laboratorijskih razmerah ne moremo enačiti z njihovo živostjo in aktivnostjo v izdelkih (Bogovič Matijašič in sod., 2010).

S klasično tehniko vedno določimo prisotnost oz. število kultivabilnih mikroorganizmov. Problem so na primer različno poškodovane celice, ki so zaradi različnih postopkov procesiranja živil oz. priprave izdelkov pogosto prisotne v izdelkih in izkazujejo živost, ne pa tudi sposobnosti razmnoževanja in rasti oz. kultivabilnosti.

Seveda bi bilo potrebno za dokončno potrditev o dejanski selektivnosti posameznega gojišča opraviti obsežnejše analize, zlasti na večjem številu različnih preiskovanih vrst MKB in bifidobakterij, tako čistih kultur kot kultur iz izdelkov.

Molekularne metode v primerjavi s klasično mikrobiološko tehniko sicer odpravljajo potrebo po kultivaciji mikroorganizmov in lahko zato dajejo točnejšo sliko mikrobne raznolikosti kompleksnih ekosistemov (Smole Možina in Jeršek, 2001), žal pa ne razlikujejo med DNA kultivabilnih in živih, tudi poškodovanih, bakterij.

Analizo bi lahko še nadgradili s potrjevanjem vrste na podlagi ugotavljanja nukleotidnega zaporedja gena za bakterijsko 16S rRNA in 23S rRNA ter primerjavo zaporedij z že poznanimi sekvencami (Bogovič Matijašič in sod., 2010). Uporabimo lahko tudi analizo konformacijskih polimorfizmov enoverižnih DNA, z angleško kratico SSCP (angl. Single-Strand Conformation Polymorphism) (Jackson in sod., 2002).

Potrditev določene probiotične bakterije na identifikacijskem gojišču zahteva še vrsto biokemijskih, seroloških, genotipskih testov in je lahko ekonomsko neizvedljiva za proizvajalca izdelkov z dodanimi probiotičnimi kulturami. Za industrijske namene je pomembno, da je gojitvena tehnika z izbranim selektivnim gojiščem ponovljiva, priročna in ekonomsko upravičena (Talwalkar in Kailasapathy, 2004).

Kot so predpostavili že Van de Castele in sod. (2006), tudi rezultati našega raziskovalnega dela kažejo, da je izbira gojišča za selektivno kultivacijo in gojitvenih razmer komercialnih probiotičnih sevov v kombinaciji s tehnološkimi bakterijami, močno odvisna od sestave izdelka, tarčne skupine bakterij in taksonomskih razlik bakterijske mikrobiote v preiskovanem vzorcu.

Z nalogo smo potrdili hipoteze, da bo uporaba različnih dodatkov v gojišča vplivala na rast laktobacilov, ostalih MKB in bifidobakterij. Ugotovili smo, da dodatki, kot so: maltoza, žolčne soli, očetna kislina ne pripomorejo k povečanju selektivne rasti laktobacilov. Medtem ko antibiotiki (vankomicin, ciprofloksacin in klindamicin) povečajo selektivno rast laktobacilov iz probiotičnih izdelkov.

5.3 SKLEPI

Glede na rezultate naše analize lahko podamo naslednje sklepe:

- Uporaba različnih dodatkov (vankomicin, ciprofloksacin in klindamicin) v gojišča omogoča selektivno rast laktobacilov, s čimer je omogočeno njihovo ločevanje od ostalih bakterij, prisotnih v izdelkih, ki vsebujejo probiotične kulture.
- Gojišča MRS, MRS z maltozo (M-MRS) in Rogosa z ocetno kislino, inkubirana aerobno in anaerobno, ter gojišče MRS z žolčnimi solmi (MRS-ŽS), inkubirano v anaerobnih razmerah, niso selektivni za rast laktobacilov.
- Gojišče LAMVAB z znižano koncentracijo vankomicina (LAMVAB-ZKV), inkubirano anaerobno, je selektivno za laktobacile, a v manjši meri kot gojišče LAC.
- Gojišče MRS s ciprofloksacinom in klindamicinom (LAC) v anaerobnih razmerah inkubacije, je selektivno gojišče za laktobacile, predvsem za rast skupine *Lb. acidophilus*.

6 POVZETEK

Laktobacili so po Gramu pozitivne MKB, ki lahko izražajo probiotične lastnosti. V diplomskem delu smo želeli poiskati najbolj selektivno gojišče za kultivacijo in ugotavljanje velikosti mikrobne populacije laktobacilov v probiotičnih izdelkih. V ta namen smo analizirali nekaj najpogostejše uporabljenih in predlaganih gojitvenih in selektivnih gojišč za laktobacile.

Literatura ponuja najrazličnejše interpretacije glede primernosti in uporabnosti gojišč za selektivno kultivacijo bakterij. Izolacija laktobacilov iz mlečnih izdelkov in prehranskih dopolnil kot tudi iz drugih podobnih vzorcev je pogosto težavna, saj so poleg njih v izdelkih navadno prisotne tudi druge MKB in/ali bifidobakterije, ki so si v marsikateri lastnosti podobne in medsebojno tekmovalne. Zato je bil namen diplomske naloge preveriti selektivnost gojišč, ki jih literatura najpogostejše navaja kot ustrezna in selektivna za laktobacile ter iz rezultatov dejansko odbrati tistega, ki najučinkoviteje zadosti zahtevi selektivnosti za laktobacile iz probiotičnih izdelkov.

Poskus smo razdelili na dva dela. V prvem delu smo uporabili gojišča MRS (anaerobno, aerobno), M-MRS (anaerobno, aerobno), MRS-ŽS, Rogosa (anaerobno, aerobno), LAMVAB-ZKV, LAMVAB, LAC in M-17. Njihovo potencialno selektivnost za rast laktobacilov smo preverjali z nacepljanjem čistih bakterijskih sevov laktobacilov in drugih MKB in bifidobakterij, ki se najpogostejše uporabljajo v probiotičnih izdelkih. Iz rezultatov rasti čistih kultur (preglednice 10-13) smo izbrali nabor gojišč, ki so pokazala največjo mero selektivnosti in smo jih uporabili za nadaljnjo kultivacijo in selekcijo laktobacilov iz probiotičnih izdelkov. Tako smo v drugem delu naloge uporabili gojišča MRS (anaerobno, aerobno), Rogosa (anaerobno, aerobno), LAMVAB-ZKV, LAMVAB in LAC.

Na omenjena gojišča smo nacepili vzorce štirih prehranskih dopolnil (BioGaia®, Yogermina®, Waya AB® ter Waya AD®) in petih mlečnih izdelkov (fermentirano mleko Ego, jogurt LGG, napitek LCA, skuta Spar Vital ter sir LCA), jih inkubirali v za posamezno gojišče specifičnih razmerah, ter identiteto naključno izbranih kolonij preverjali z metodo PCR.

Na podlagi rezultatov (preglednice 14-22) smo ugotovili, da uporaba različnih dodatkov v gojišča omogoča različno selektivno rast laktobacilov, zagotovo pa velja, da sta za selektivno rast laktobacilov, bodisi iz probiotičnih mlečnih izdelkov ali prehranskih dopolnil, najprimernejši gojišči LAC in LAMVAB-ZKV, in sicer glede na spremljajoče mikroorganizme v analiziranem izdelku.

Gojišče LAC (gojišče MRS s ciprofloksacinom in klindamicinom) v anaerobnih razmerah inkubacije priporočamo, ko želimo selektivno gojiti laktobacile in še posebej bakterije iz skupine *Lb. acidophilus*, saj se je gojišče izkazalo kot najbolj ustrezno glede zagotavljanja stopnje selektivnosti za rast omenjene skupine probiotičnih mikroorganizmov.

Če pa probiotični izdelek vsebuje vrsto *Lb. plantarum* ali probiotike iz skupine *Lb. casei*, prednostno priporočamo uporabo gojišča LAMVAB-ZKV (gojišče LAMVAB z znižano koncentracijo vankomicina), saj sta gojišči LAMVAB oz. LAMVAB-ZKV v anaerobnih

razmerah inkubacije izkazali večjo selektivnost za rast omenjenih laktobacilov kot preostala analizirana gojišča. Pri primerjavi gojišč LAMVAB-ZKV in LAMVAB se je celo izkazalo, da že nižja koncentracija vankomicina zagotavlja primerno selektivnost gojišča LAMVAB, iz česar lahko zaključimo, da, razen v določenih primerih, dodatek večje količine antibiotika vankomicina (gojišče LAMVAB) v gojišče ni potreben in selektivne razmere zagotovimo že z uporabo manjše količine dodatka (gojišče LAMVAB-ZKV).

Glede na rezultate poskusa lahko zaključimo, da gojišči M-MRS (gojišče MRS z maltozo) in MRS-ŽS (gojišče MRS z žolčnimi solmi) nista ustrezni za selektivno gojitev laktobacilov, saj so poleg laktobacilov na njih v večji meri zrasle tudi ostale prisotne bakterije.

Gojišči MRS (anaerobno, aerobno) in Rogosa (anaerobno, aerobno) še vedno priporočamo kot referenčni gojišči, saj z njuno pomočjo lahko pridobimo orientacijsko vrednost rasti laktobacilov kot tudi ostalih MKB in bifidobakterij.

7 VIRI

- Abram V., Cigić B., Poklar Ulrih N., Skrt M. 2006. Eksperimentalna biokemija: za študente biotehnologije in živilske tehnologije. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 111 str.
- Adamič J., Smole Možina S., Jeršek B. 2003. Vloga in pomen mikroorganizmov v živilih in taksonomija. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 1-45
- Ashraf R., Shah N.P. 2011. Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* spp. in yoghurt - a review. International Journal of Food Microbiology, 149: 194-208
- Berce I., Sarjanović L., Smole Možina S. 2004. Naraščajoča odpornost proti antibiotikom pri mikroorganizmih v prehranski verigi. V: Mikrobiologija in biotehnologija v proizvodnji varnih živil. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 111-129
- Bergamini C.V., Hynes E.R., Quiberoni A., Suarez V.B., Zalazar C.A. 2005. Probiotic bacteria as adjunct starters: influence of the addition methodology on their survival in a semi-hard Argentinean cheese. Food Research International, 38: 597-604
- Bernardeau M., Vernoux J.P., Henri-Dubernet S., Guéguen M. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactobacillus* genus. International Journal of Food Microbiology, 126: 278-285
- Bogovič Matijašić B. 2001. Ugotavljanje varnosti in učinkovitosti funkcionalne hrane. V: Funkcionalna hrana. 21. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož 8. in 9. november 2001. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 153-165
- Bogovič Matijašić, B., Rogelj, I., Zorič Peternel, M. 2010. Ugotavljanje deklariranih bakterij v probiotičnih prehranskih dopolnilih in zdravilih na slovenskem trgu. Farmacevtski vestnik, 61, 5/6: 263-269
- Boyer R. 2005. Temelji biokemije. Ljubljana, Študentska založba: 349-351
- Colombo M., Zimmermann de Oliveira A.E., Fernandes de Carvalho A., Nero L.A. 2014. Development of an alternative culture medium for the selective enumeration of *Lactobacillus casei* in fermented milk. Food Microbiology, 39: 89-95
- Coeuret V., Gueguen M., Vernoux J.P. 2004. Numbers and strains of lactobacilli in some probiotic product. International Journal of Food Microbiology, 97: 147-156

- Cvitković-Špiš V., Furlan M., Ružić Sabljčić E., Cerar T., Steyer A., Strašek K., Šoba B. 2010. Praktikum iz mikrobiologije za študente farmacije, univerzitetni program. Ljubljana, Inštitut za mikrobiologijo, Medicinska fakulteta: 31-32
- Danielsen M., Wind A. 2003. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *International Journal of Food Microbiology*, 82: 1-11
- Darukaradhy J., Phillips M., Kailasapathy K. 2006. Selective enumeration of *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp., starter lactic acid bacteria and non-starter lactic acid bacteria from Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 16: 439-445
- Dave R.I., Shah N.P. 1996. Evaluation of media for selective enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, and *Bifidobacteria*. *Journal of Dairy Science*, 79: 1529-1536
- Deasy B.M., Rea M.C., Fitzgerald G.F., Cogan T.M., Beresford T.P. 2000. A Rapid PCR Based Method to Distinguish between *Lactococcus* and *Enterococcus*. *Systematic and Applied Microbiology*, 23: 510-522
- Desai A.R., Shah N.P., Powell I.B. 2006. Discrimination of dairy industry isolates of the *Lactobacillus casei* group. *Journal of Dairy Science*, 89, 9: 3345-3351
- De Angelis M., Gobbetti M. 2011. *Lactobacillus* spp.: general characteristics. V: *Encyclopedia of dairy sciences*. Vol. 3. 2nd ed. Roginski H., Fuquay J.W., Fox P.F. (eds.). Amsterdam, Elsevier, Academic Press: 78-131
- De Carvalho Lima K.G., Kruger M.F., Behrens J., Destro M.T., Landgraf M., Gombossy de Melo Franco B.D. 2009. Evaluation of culture media for enumeration of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium animalis* in the presence of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *LWF - Food Science and Technology*, 42: 491-495
- De Man J.C., Rogosa M., Sharpe M.E. 1960. A medium for cultivation of Lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23: 130-135
- Dubernet S., Desmasures N., Gueguen M. 2002. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiology Letters*, 214: 271-275
- EFSA. 2015. Guidance on the scientific requirements for health claims related to the gastro-intestinal tract, the immune system, and defence against pathogenic microorganisms. *EFSA Journal*, doi:10.2903/j.efsa.20YY.NNNN: 25 str. (osnutek) <http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/assets/150209.pdf> (december, 2015)
- FAO/WHO. 2002. Guidelines for the evaluation in probiotics in food: Report of a Joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in

- Food London, Ontario, Canada. Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations & World Health Organization: 11 str.
<http://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf> (april, 2015)
- Fasoli S., Marzotto M., Rizzotti L., Rossi F., Dellaglio F., Torriani S. 2003. Bacterial composition of commercial probiotic products as evaluated by PCR-DGGE analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 82: 1: 59-70
- Field A. 2013. *Discovering statistics using IBM SPSS statistics*. London, SAGE Publication Ltd: 213-227, 357-368
- Fuller R. 1989. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66: 365-378
- Garcia de Fernando G. 2011. *Enterococcus* in milk and dairy products. V: *Encyclopedia of dairy sciences*. Vol. 2. 2nd ed. Roginski H., Fuquay J.W., Fox P.F. (eds.). Amsterdam, Elsevier, Academic Press: 153-159
- Guarner F., Schaafsma G.J. 1998. Probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 39: 237-238
- Hamilton-Miller J.M.T., Shah S. 1998. Vancomycin susceptibility as an aid to the identification of lactobacilli. *Letters in Applied Microbiology*, 26: 153-154
- Hamilton-Miller J.M.T., Shah S., Winkler J.T. 1999. Public health issues arising from microbiological and labelling quality of foods and supplements containing probiotic microorganisms. *Public Health Nutrition*, 2, 2: 223-229
- Harnett J., Davey G., Patrick A., Caddick C., Pearce L. 2011. *Streptococcus thermophilus*. V: *Encyclopedia of dairy sciences*. Vol. 4. 2nd ed. Roginski H., Fuquay J.W., Fox P.F. (eds.). Amsterdam, Elsevier, Academic Press: 143-148
- Hartemink R., Domenech V.R., Rombouts F.M. 1997. LAMVAB - A new selective medium for the isolation of lactobacilli from faeces. *Journal of Microbiological Methods*, 29: 77-84
- Hartemink R., Rombouts F.M. 1999. Comparison of media for the detection of *Bifidobacteria*, *Lactobacilli* and total anaerobes from faecal samples. *Journal of Microbiological Methods*, 36: 181-192
- Havenaar R., Huis in't Veld J.H.J. 1992. Probiotics. A general view. V: *The lactic acid bacteria*. Vol. 1. Wood B.J.B. (ed.). New York, Chapman&Hall: 209-224
- Holbrook R. 2000. *Detection of microorganisms in food - principles of culture methods*. V: *The microbiological safety and quality of food*. Lund B., Baird-Parker T.C., Gould T.C. (eds.). Gaithersburg, Aspen Publishers Inc.: 1761-1790

- Hull R.R., Roberts A.V. 1984. Differential enumeration of *Lactobacillus acidophilus* in yogurt. Australian Journal of Dairy Technology, 39: 160-163
- IDF. 1995. Fermented and non-fermented milk products: detection and enumeration of *Lactobacillus acidophilus*. Bulletin of the IDF, 306: 11 str. (loč. pag.)
- ISO 20128:2006./IDF 192:2006. Milk products - enumeration of presumptive *Lactobacillus acidophilus* on a selective medium - Colony count technique at 37 °C. 2006: 6 str.
- ISO 6887-5:2010. Microbiology of food and animal feeding stuffs-Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination. Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products. 1st ed. 2010: 4 str.
- ISO 7218:2007. Microbiology of food and animal feeding stuffs-General requirements and guidance for microbiological examinations. 3rd ed. 2007: 64 str.
- ISO 29981:2010. Milk products - Enumeration of presumptive Bifidobacteria – Colony count technique at 37 °C. 2010: 17 str.
- Jackson M.S., Bird A.R., McOrist A.L. 2002. Comparison of two selective media for the detection and enumeration of *Lactobacilli* in human faeces. Journal of Microbiological Methods, 51: 313-321
- Jeršek B. 2008. Osnovni principi identifikacije plesni, kvasovk in bakterij v živilih. Skripta in delovni zvezek za laboratorijske vaje pri predmetu živilska mikrobiologija. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 45-46, 54-54
- Jeršek B. 2009. Higiena živil: Laboratorijske vaje za študente živilstva in prehrane. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 26-28
- Jeršek B. 2013. Mikrobiološka analiza, navodila in delovni zvezek za laboratorijske vaje. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 22-24
- Karimi R., Mortazavian A.M., Amiri-Rigi A. 2012. Selective enumeration of probiotic microorganisms in cheese. Food Microbiology, 29: 1-9
- Lankaputhra W.E.V, Shah N.P. 1996. A simple method for selective enumeration of *Lactobacillus acidophilus* in yoghurt supplemented with *Lb. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. Milchwissenschaft, 51: 446-451
- Lilly D.M., Stillwell R.H. 1965. Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms. Science, 147: 747-748
- Leuschner R. G.K., Bew J., Coeuret V., Vernoux J., Gueguen M. 2002. A collaborative study of a method for the enumeration of probiotic lactobacilli in animal feed. Food microbiology, 20: 57-66

Microbiology manual. 2005. 12th ed. Darmstadt, Merck: 354-354, 416-416

Mičetić-Turk D., Šikić-Pogačar M. 2011. Klinična uporaba probiotikov v pediatriji. Zdravniški Vestnik, 80: 933-943

Mills S., Ross R.P. 2011. *Lactococcus lactis*. V: Encyclopedia of dairy sciences. Vol. 3. 2nd ed. Roginski H., Fuquay J.W., Fox P.F. (eds.). Amsterdam, Elsevier, Academic Press: 132-137

Naidu A.S., Bidlack W.R., Clemens R.A. 1999. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 39: 13-126

Parte A.C. 2014. LPSN-list of prokaryotic names with standing in nomenclature: genus *Lactobacillus*. Nucleic Acids Research, 42, Dat. iss: D613-D616
<http://www.bacterio.net/lactobacillus.html> (december 2015)

Pravilnik o prehranskih dopolnilih. 2013. Uradni list Republike Slovenije, 23, 66: 7938-7940

Ravnikar M. 1996. Rastlinske tkivne kulture. V: Biotehnologija-osnovna znanja. Raspor P. (ur.). Ljubljana, BIA, d.o.o.: 149-164

Ravula R.R., Shah N.P. 1998. Selective enumeration of *Lactobacillus casei* from yoghurts and fermented milk drinks. Biotechnology Techniques, 12: 819-822

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

Rogelj I., Perko B. 2003. Mlečni izdelki. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 564-568

Rogosa M., Mitchell J.A., Wiseman R.T. 1951. A selective medium for the isolation and enumeration of oral and fecal lactobacilli. Journal of Bacteriology, 62: 132-133

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

Sato H., Torimura M., Kitahara M., Ohkuma M., Hotta Y., Tamura H. 2012. Characterization of the *Lactobacillus casei* group based on the profiling of ribosomal proteins coded in *S10-spc-alpha* operons as observed by MALDI-TOF MS. Systematic and Applied Microbiology, 35: 447-454

- Satokari R.M., Vaughan E.E., Akkermans A.D.L., Saarela M., De Vos W.M. 2000. Bifidobacterial diversity in human faeces detected by genus - specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 504-513
- Seme K. 2002. Nadzor bakterijskih okužb: Mehanizmi bakterijske odpornosti proti antibiotikom. V: *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 439-446
- Shah N.P. 2000. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Science*, 83: 894-907
- Shah N.P. 2011. *Bifidobacterium* spp.: morphology and physiology. V: *Encyclopedia of dairy sciences*. Vol. 1. 2nd ed. Roginski H., Fuquay J.W., Fox P.F. (eds.). Amsterdam, Elsevier, Academic Press: 381-394
- Smole Možina S. 2003. Metode mikrobiološke preiskave živil. V: *Mikrobiologija živil živalskega izvora*. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 87-113
- Smole Možina S., Jeršek B. 2001. Mikrobiološke in molekularne metode karakterizacije probiotičnih dodatkov funkcionalnim živilom. V: *Funkcionalna hrana*. 21. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 8. in 9. november 2001. Gašperlin L., Žlender B. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 207-218
- Stiles M.E., Holzapfel W.H. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36: 1-29
- Swenson J.M., Facklam R.R., Thornsberry C. 1990. Antimicrobial susceptibility of vancomycin-resistant *Leuconostoc*, *Pediococcus*, and *Lactobacillus* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34: 543-549
- Talwalkar A., Kailasapathy K. 2004. Comparison of selective and differential media for the accurate enumeration of strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus casei* complex from commercial yoghurts. *International Dairy Journal*, 14: 143-149
- Terzaghi B.E., Sandine W.E. 1975. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Applied Microbiology*, 29: 807-813
- Tharmaraj N., Shah N.P. 2003. Selective enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, bifidobacteria, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and propionibacteria. *Journal of Dairy Science*, 86: 2288-2296
- Van de Castele S., Vanheuverzwijn T., Ruysen T., Van Assche P., Swings J., Huys G. 2006. Evaluation of culture media for selective enumeration of probiotic strains of

lactobacilli and bifidobacteria in combination with yogurth or cheese starters. International Dairy Journal, 16: 1470-1476

Vinderola C.G., Reinheimer J.A. 1999. Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yoghurt bacteria. International Dairy Journal, 9: 497-505

Vinderola C.G., Reinheimer J.A. 2000. Enumeraton of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. International Dairy Journal, 10: 271-275

Ward L.J.H., Timminis M.J. 1999. Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. Systematic and Applied Microbiology, 29: 90-92

ZAHVALA

Mentorici, doc. dr. Andreji Čanžek Majhenič za vso strokovno pomoč, prijazne besede in čas, ki mi ga je namenila.

Dr. Petri Mohar Lorbeg za usmerjanje pri izvedbi raziskovalnega dela diplomske naloge.

Somentorici, izr. prof. dr. Barbari Jeršek za strokovno pomoč, pregled ter koristne nasvete za izboljšavo diplomske naloge.

Recenzentki, doc. dr. Poloni Jamnik za natančen, hiter in strokoven pregled diplomske naloge.

Lini Burkan Makivić, univ. dipl. inž. za pregled referenc in oblike celotnega diplomskega dela.

Posebno se zahvaljujem moji mami Andreji, ki mi je omogočila študij. Hvala za vzpodbudo, razumevanje in vso pomoč. Hvala zvezdici, ki sije z neba in pazi name.

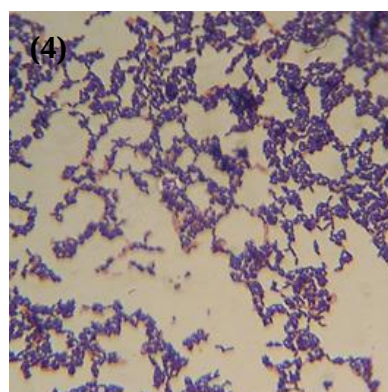
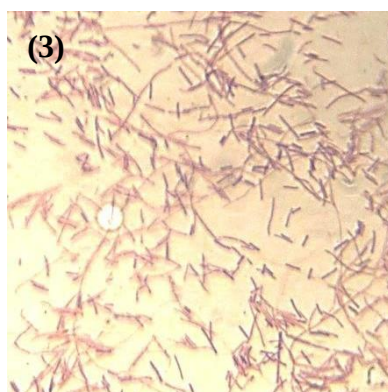
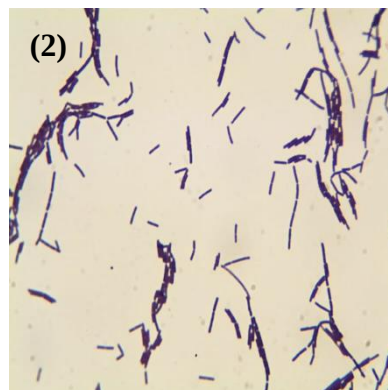
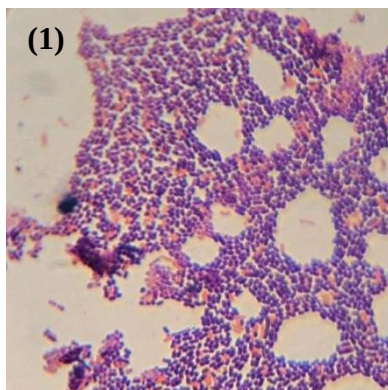
Celotni družini, ki mi je ves čas stala ob strani.

Silvu, za vso motivacijo in podporo.

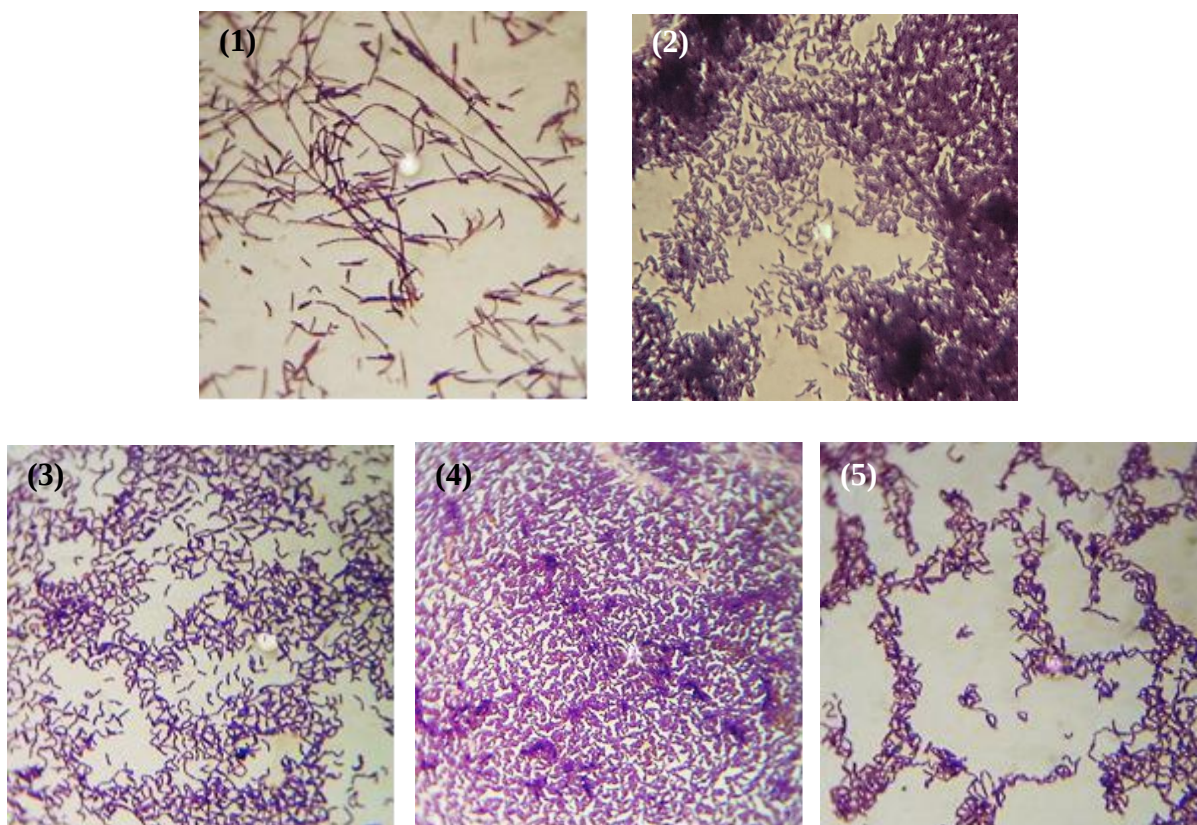
Prijateljem, za vse prijetne trenutke v času študija.

Najlepša hvala!

PRILOGE



Priloga A: Barvni preparati bakterij, osamljenih iz prehranskih dopolnil BioGaia® (1), Yogermina® (2), Waya AB® (3) in Waya AD® (4), pri 1000x povečavi.



Priloga B: Barvni preparati bakterij, osamljenih iz mlečnega izdelka fermentirano mleko Ego (1), jogurta LGG (2), napitka LCA (3), skute Spar Vital (4) in sira LCA (5), pri 1000x povečavi.