

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Polona ZANOŠKAR

**OPIS FIZIOLOŠKIH LASTNOSTI SEVA**  
***Bifidobacterium breve* IM 386**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Polona ZANOŠKAR

**OPIS FIZIOLOŠKIH LASTNOSTI SEVA *Bifidobacterium breve* IM 386**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**PHYSIOLOGICAL PROPERTIES OF *Bifidobacterium breve* IM 386**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2013

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

Za mentorico diplomskega dela je imenovana doc. dr. Andreja Čanžek Majhenič, za somentorico viš. znan. sod. dr. Bojana Bogovič Matijašić, za recenzentko pa izr. prof. dr. Barbara Jeršek.

Mentorica: doc. dr. Andreja Čanžek Majhenič

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

Recenzentka: izr. prof. dr. Barbara Jeršek

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

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

Polona ZANOŠKAR

**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ŠD | Dn                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| DK | UDK 579.22/.24:577.2.083:579.86(043)=163.6                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| KG | probiotične bakterije/ <i>Bifidobacterium</i> sp./ <i>Bifidobacterium breve</i> /probiotična prehranska dopolnila/morfološke lastnosti/RAPD analiza sevov/vrstno specifični PCR/kvasni ekstrakt/simulirani prebavni sokovi/protimikrobna aktivnost/občutljivost za antibiotike                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| AV | ZANOŠKAR, Polona                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| SA | ČANŽEK MAJHENIČ, Andreja (mentorica)/BOGOVIČ MATIJAŠIČ, Bojana (somentorica)/JERŠEK, Barbara (recenzentka)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| KZ | SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| ZA | Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| LI | 2013                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| IN | OPIS FIZIOLOŠKIH LASTNOSTI SEVA <i>Bifidobacterium breve</i> IM 386                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| TD | Diplomsko delo (univerzitetni študij)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| OP | XIV, 85 str., 27 pregl., 40 sl., 55 vir.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| IJ | sl                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| JI | sl/en                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| AI | <i>Bifidobacterium breve</i> IM 386 je sev, ki je bil osamljen iz materinega mleka in iz blata dojenčka iste matere. V naši raziskavi smo proučevali nekatere osnovne fiziološke lastnosti <i>B. breve</i> IM 386 in jih primerjali s fiziološkimi lastnostmi sevov bifidobakterij, ki jih najdemo v komercialnih probiotičnih izdelkih. Pripadnost izolatov rodu <i>Bifidobacterium</i> smo potrdili z analizo PCR, sevno raznolikost bifidobakterij pa z metodo RAPD. Proučevali smo rast sevov v mleku, sposobnost preživetja v simuliranem želodčnem in črevesnem soku, protimikrobno aktivnost in občutljivost za antibiotike. Ugotovili smo, da sev <i>B. breve</i> IM 386 slabo raste v mleku. Dodatek kvasnega ekstrakta ni izboljšal rasti v mleku, je pa upočasnil odmiranje kulture tekom 48 urne inkubacije. Sev <i>B. breve</i> IM 386 je med vsemi bifidobakterijami izkazal najboljšo sposobnost preživetja pri nizkih vrednostih pH kot tudi v prisotnosti žolčnih soli. Sev IM 386 je deloval protimikrobno proti določenim kvarljivcem in potencialno patogenim mikroorganizmom. Zaradi izvora, protimikrobnega delovanja, sposobnosti preživetja v razmerah prebavnega trakta in občutljivosti za vse testirane antibiotike, razen za klindamicin, je <i>B. breve</i> IM 386 je obetaven kandidat za uporabo v živilski in farmacevtski industriji. |

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDC 579.22/.24:577.2.083:579.86(043)=163.6  
CX probiotic bacteria/*Bifidobacterium* sp./*Bifidobacterium breve*/probiotic  
nutritional supplements/morphological properties/RAPD method for  
strains/species specific PCR/yeast extract/simulated gastrointestinal  
juices/antimicrobial activity/antimicrobial susceptibility  
AU ZANOŠKAR, Polona  
AA ČANŽEK MAJHENIČ, Andreja (supervisor)/BOGOVIČ MATIJAŠIČ,  
Bojana (co-supervisor)/JERŠEK, Barbara (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science  
and Technology  
PY 2013  
TI PHYSIOLOGICAL PROPERTIES OF *Bifidobacterium breve* IM 386  
DT Graduation Thesis (University studies)  
NO XIV, 85 p., 27 tab., 40 fig., 55 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB *B. breve* IM 386 is strain isolated from milk of mother and her infant's feces.  
In our study we studied some basic physiological properties of strain *B. breve*  
IM 386 and evaluated them by comparison with the physiological properties  
of strains of bifidobacteria which are found in commercial probiotic products.  
We determined the genus *Bifidobacterium* with PCR and strain diversity of  
bifidobacteria with RAPD. We studied strains growth in milk, their ability to  
survive in simulated gastric and intestinal juice, their antimicrobial activity  
and antibiotic susceptibility. We found out that *B. breve* IM 386 strain grew  
poorly in milk. The addition of yeast extract did not stimulate the growth in  
milk, but reduced dying of culture during the 48 hour incubation. *B. breve* IM  
386 strain showed the best survival among all isolated strains at low pH  
conditions as well as in the presence of bile salts. IM 386 strain showed good  
antimicrobial activity against certain spoilage and potentially pathogenic  
microorganisms. Due to its origin, antimicrobial activity, good survival in  
gastrointestinal conditions and sensitivity to almost all tested antibiotics,  
except to clindamycin, the *B. breve* IM 386 is a promising candidate for  
application in food and pharmaceutical industry.

## KAZALO VSEBINE

|                                                                                     |             |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>                                    | <b>III</b>  |
| <b>KEY WORDS DOKUMENTATION .....</b>                                                | <b>IV</b>   |
| <b>KAZALO VSEBINE .....</b>                                                         | <b>V</b>    |
| <b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>                                                      | <b>VIII</b> |
| <b>KAZALO SLIK .....</b>                                                            | <b>X</b>    |
| <b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>                                                   | <b>XIII</b> |
| <br>                                                                                |             |
| <b>1 UVOD .....</b>                                                                 | <b>2</b>    |
| 1.1 NAMEN DELA .....                                                                | 2           |
| 1.2 DELOVNE HIPOTEZE .....                                                          | 2           |
| <b>2 PREGLED OBJAV .....</b>                                                        | <b>3</b>    |
| 2.1 KRONOLOŠKI PREGLED OPISOVANJA RODU <i>Bifidobacterium</i> .....                 | 3           |
| 2.2 ROD <i>Bifidobacterium</i> .....                                                | 3           |
| 2.2.1 Vrsta <i>Bifidobacterium adolescentis</i> .....                               | 5           |
| 2.2.2 Vrsta <i>Bifidobacterium animalis</i> .....                                   | 5           |
| 2.2.3 Vrsta <i>Bifidobacterium bifidum</i> .....                                    | 6           |
| 2.2.4 Vrsta <i>Bifidobacterium breve</i> .....                                      | 6           |
| 2.2.5 Vrsta <i>Bifidobacterium infantis</i> .....                                   | 6           |
| 2.2.6 Vrsta <i>Bifidobacterium longum</i> .....                                     | 6           |
| 2.3 DEFINICIJE PROBIOTIKOV SKOZI ZGODOVINO .....                                    | 6           |
| 2.4 PROBIOTIČNI MIKROORGANIZMI .....                                                | 7           |
| 2.5 SELEKCIJSKI KRITERIJI ZA IZBIRO PROBIOTIČNIH SEVOV .....                        | 8           |
| 2.5.1 Varnostni vidik .....                                                         | 8           |
| 2.5.2 Funkcionalni vidik .....                                                      | 9           |
| 2.5.3 Tehnološki vidik .....                                                        | 12          |
| 2.6 PROBIOTIČNI IZDELKI .....                                                       | 13          |
| 2.6.1 Oblike probiotikov na tržišču .....                                           | 14          |
| 2.6.1.1 Funkcionalna živila .....                                                   | 14          |
| 2.6.1.2 Prehranska dopolnila .....                                                  | 15          |
| 2.6.1.3 Zdravila brez recepta .....                                                 | 15          |
| 2.6.2 Priporočeno število probiotičnih bakterij .....                               | 15          |
| 2.7 METODE SELEKCIJE IN IDENTIFIKACIJE BAKTERIJ RODU <i>Bifidobacterium</i> ..      | 15          |
| 2.7.1 Klasične metode kultivacije .....                                             | 15          |
| 2.7.2 Metodi PCR in RAPD .....                                                      | 16          |
| 2.7.2.1 Metoda PCR .....                                                            | 16          |
| 2.7.2.2 Metoda RAPD PCR .....                                                       | 17          |
| 2.8 OBČUTLJIVOST BAKTERIJSKIH IZOLATOV ZA ANTIBIOTIKE .....                         | 17          |
| <b>3 MATERIAL IN METODE .....</b>                                                   | <b>19</b>   |
| 3.1 POTEK RAZISKAVE .....                                                           | 19          |
| 3.2 MATERIAL .....                                                                  | 21          |
| 3.2.1 Bakterijski sevi .....                                                        | 21          |
| 3.2.1.1 Probiotični fermentirani mlečni izdelki .....                               | 21          |
| 3.2.1.2 Probiotična prehranska dopolnila in probiotično zdravilo brez recepta ..... | 21          |
| 3.2.1.3 <i>Bifidobacterium breve</i> IM 386 .....                                   | 22          |
| 3.2.1.4 Indikatorske bakterije .....                                                | 22          |
| 3.2.2 Gojišča .....                                                                 | 23          |
| 3.2.2.1 Trdna gojišča .....                                                         | 23          |

|         |                                                                                                         |           |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2.2.2 | Tekoča gojišča.....                                                                                     | 23        |
| 3.2.2.3 | Poltrdna gojišča.....                                                                                   | 24        |
| 3.2.2.4 | Simulirani prebavni sokovi .....                                                                        | 24        |
| 3.2.2.5 | Raztopina za razredčevanje.....                                                                         | 25        |
| 3.2.3   | <b>Reagenti za barvanje po Gramu .....</b>                                                              | <b>25</b> |
| 3.2.4   | <b>Reagenti in encimi za osamitev DNA .....</b>                                                         | <b>25</b> |
| 3.2.5   | <b>Reagenti za RAPD in PCR .....</b>                                                                    | <b>25</b> |
| 3.2.6   | <b>Reagenti za analizo pomnožkov v agaroznem gelu .....</b>                                             | <b>27</b> |
| 3.2.7   | <b>Antibiotiki .....</b>                                                                                | <b>27</b> |
| 3.3     | LABORATORIJSKA OPREMA.....                                                                              | 28        |
| 3.4     | METODE .....                                                                                            | 28        |
| 3.4.1   | <b>Priprava mikroorganizmov .....</b>                                                                   | <b>28</b> |
| 3.4.1.1 | <i>Bifidobacterium breve</i> IM 386 .....                                                               | 28        |
| 3.4.1.2 | Osamitev bifidobakterij iz probiotičnih fermentiranih mlečnih izdelkov.....                             | 28        |
| 3.4.1.3 | Osamitev bifidobakterij iz probiotičnih prehranskih dopolnil in zdravil.....                            | 29        |
| 3.4.2   | <b>Ugotavljanje morfoloških značilnosti osamljenih bifidobakterij .....</b>                             | <b>29</b> |
| 3.4.3   | <b>Osamitev DNA .....</b>                                                                               | <b>30</b> |
| 3.4.4   | <b>Priprava reakcijskih mešanic za RAPD in PCR .....</b>                                                | <b>30</b> |
| 3.4.4.1 | RAPD z začetnim oligonukleotidom KGT-70GC .....                                                         | 30        |
| 3.4.4.2 | RAPD z začetnim oligonukleotidom 1254 .....                                                             | 30        |
| 3.4.4.3 | PCR z začetnima oligonukleotidoma Bif164-f in Bif662-r za potrjevanje rodu <i>Bifidobacterium</i> ..... | 31        |
| 3.4.4.4 | PCR za potrjevanje različnih vrst <i>Bifidobacterium</i> .....                                          | 31        |
| 3.4.5   | <b>RAPD in PCR .....</b>                                                                                | <b>32</b> |
| 3.4.6   | <b>Analiza pomnožkov z gelsko elektroforezo .....</b>                                                   | <b>33</b> |
| 3.4.7   | <b>Ugotavljanje vpliva kvasnega ekstrakta na rast bifidobakterij.....</b>                               | <b>34</b> |
| 3.4.8   | <b>Ugotavljanje preživelosti bifidobakterij v simuliranih razmerah prebavil.....</b>                    | <b>35</b> |
| 3.4.9   | <b>Ugotavljanje protimikrobne aktivnosti.....</b>                                                       | <b>36</b> |
| 3.4.10  | <b>Ugotavljanje občutljivosti bifidobakterij za antibiotike.....</b>                                    | <b>36</b> |
| 4       | <b>REZULTATI .....</b>                                                                                  | <b>38</b> |
| 4.1     | OSAMITEV BIFIDOBAKTERIJ IZ PREHRANSKIH DOPOLNIL ALI ZDRAVIL ..                                          | 38        |
| 4.2     | MORFOLOŠKA ANALIZA.....                                                                                 | 39        |
| 4.2.1   | <b>Makromorfološke lastnosti .....</b>                                                                  | <b>39</b> |
| 4.2.2   | <b>Mikromorfološke lastnosti.....</b>                                                                   | <b>39</b> |
| 4.3     | IDENTIFIKACIJA IN RAZLIKOVANJE IZOLIRANIH BIFIDOBAKTERIJ .....                                          | 40        |
| 4.3.1   | <b>Potrjevanje rodu <i>Bifidobacterium</i>.....</b>                                                     | <b>42</b> |
| 4.3.2   | <b>Razlikovanje med sevi z metodo RAPD .....</b>                                                        | <b>43</b> |
| 4.3.3   | <b>Potrjevanje vrst bifidobakterij .....</b>                                                            | <b>45</b> |
| 4.3.3.1 | Potrjevanje vrste <i>B. bifidum</i> .....                                                               | 45        |
| 4.3.3.2 | Potrjevanje vrste <i>B. longum</i> .....                                                                | 46        |
| 4.3.3.3 | Potrjevanje vrste <i>B. infantis</i> .....                                                              | 46        |
| 4.3.3.4 | Potrjevanje vrste <i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> .....                                           | 47        |
| 4.4     | VPLIV KVASNEGA EKSTRAKTA NA RAST BIFIDOBAKTERIJ V MLEKU.....                                            | 48        |
| 4.5     | PREŽIVETJE BIFIDOBAKTERIJ V SIMULIRANIH RAZMERAH PREBAVIL .....                                         | 53        |
| 4.6     | PROTIMIKROBNA AKTIVNOSTI BIFIDOBAKTERIJ .....                                                           | 61        |
| 4.7     | OBČUTLJIVOST ZA ANTIBIOTIKE .....                                                                       | 64        |
| 5       | <b>RAZPRAVA IN SKLEPI .....</b>                                                                         | <b>69</b> |
| 5.1     | RAZPRAVA .....                                                                                          | 69        |
| 5.1.1   | <b>Metode izolacije in identifikacije bifidobakterij .....</b>                                          | <b>69</b> |

|              |                                                                        |           |
|--------------|------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>5.1.2</b> | <b>Makromorfološke in mikromorfološke lastnosti.....</b>               | <b>69</b> |
| <b>5.1.3</b> | <b>Analize PCR in RAPD .....</b>                                       | <b>69</b> |
| <b>5.1.4</b> | <b>Vpliv kvasnega ekstrakta na rast bifidobakterij v mleku .....</b>   | <b>71</b> |
| <b>5.1.5</b> | <b>Preživelost bifidobakterij v simuliranih razmerah prebavil.....</b> | <b>72</b> |
| <b>5.1.6</b> | <b>Protimikrobna aktivnost bifidobakterij.....</b>                     | <b>75</b> |
| <b>5.1.7</b> | <b>Občutljivost bifidobakterij za antibiotike.....</b>                 | <b>77</b> |
| <b>5.2</b>   | <b>SKLEPI .....</b>                                                    | <b>78</b> |
| <b>6</b>     | <b>POVZETEK .....</b>                                                  | <b>79</b> |
| <b>7</b>     | <b>VIRI.....</b>                                                       | <b>81</b> |



## KAZALO PREGLEDNIC

|                                                                                                                                                    |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Preglednica 1: Vrste bakterij iz rodu <i>Bifidobacterium</i> (Turrone in sod., 2011: 38). .....                                                    | 4  |
| Preglednica 2: Mikroorganizmi, ki jih uporabljamo kot probiotike (Holzapfel in sod., 1998: 90). .....                                              | 8  |
| Preglednica 3: Sevi bifidobakterij in njihovi bakteriocini (Cheikhoussef in sod., 2008: 217). .....                                                | 11 |
| Preglednica 4: Probiotični fermentirani mlečni izdelki, ki smo jih analizirali. ....                                                               | 21 |
| Preglednica 5: Probiotična prehranska dopolnila in probiotično zdravilo, ki smo jih analizirali. ....                                              | 21 |
| Preglednica 6: Nabor izbranih indikatorskih bakterij in razmere kultivacije. ....                                                                  | 22 |
| Preglednica 7: Začetni oligonukleotidi specifični za rod <i>Bifidobacterium</i> . ....                                                             | 26 |
| Preglednica 8: Začetni oligonukleotidi specifični za izbrane vrste rodu <i>Bifidobacterium</i> . ....                                              | 26 |
| Preglednica 9: Začetni oligonukleotidi za RAPD. ....                                                                                               | 26 |
| Preglednica 10: Antibiotiki (BioMérieux) in razpon njihove koncentracije, ki smo jih uporabili pri ugotavljanju občutljivosti bifidobakterij. .... | 28 |
| Preglednica 11: Sestava 20 µl reakcijske mešanice za RAPD z začetnim oligonukleotidom KGT-70GC. ....                                               | 30 |
| Preglednica 12: Sestava 20 µl reakcijske mešanice za RAPD z začetnim oligonukleotidom 1254. ....                                                   | 31 |
| Preglednica 13: Sestava 20 µl reakcijske mešanice za PCR z začetnima oligonukleotidoma Bif164-f in Bif662-r. ....                                  | 31 |
| Preglednica 14: Sestava 20 µl reakcijske mešanice za PCR za dokazovanje različnih vrst. ....                                                       | 31 |
| Preglednica 15: Razmere reakcij PCR oz. RAPD. ....                                                                                                 | 32 |
| Preglednica 16: Rezultati dinamike rasti bifidobakterij v RPM in RPM s kvasnim ekstraktom, izraženo v KE/ml. ....                                  | 49 |
| Preglednica 17: Rezultati merjenja vrednosti pH v gojiščih RPM in RPM+ke, nacepljenih z različnimi izolati bifidobakterij. ....                    | 51 |
| Preglednica 18: Nastanek koaguluma in prisotnost vonja po očetni kislini po 48 urah inkubacije bifidobakterij v RPM in RPM+ke. ....                | 52 |

|                                                                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Preglednica 19: Preživelost <i>B. breve</i> IM 386 v simuliranih razmerah prebavil, izražena v KE/ml. ....                           | 54 |
| Preglednica 20: Preživelost bifidobakterij, osamljenih iz izdelka Waya IT, v simuliranih razmerah prebavil, izražena v KE/ml. ....   | 55 |
| Preglednica 21: Preživelost bifidobakterij, osamljenih iz izdelka Linex, v simuliranih razmerah prebavil, izraženo v KE/ml. ....     | 56 |
| Preglednica 22: Preživelost bifidobakterij, osamljenih iz izdelka Linbi, v simuliranih razmerah prebavil, izražena v KE/ml. ....     | 57 |
| Preglednica 23: Preživelost bifidobakterij, osamljenih iz izdelka Yogermina, v simuliranih razmerah prebavil, izraženo v KE/ml. .... | 58 |
| Preglednica 24: Preživelost bifidobakterij, osamljenih iz Bion3, v simuliranih razmerah prebavil, izražena v KE/ml. ....             | 59 |
| Preglednica 25: Preživelost bifidobakterij, osamljenih iz Lacto Seven, v simuliranih razmerah prebavil, izraženo v KE/ml. ....       | 60 |
| Preglednica 26: Protimikrobna aktivnost testnih sevov bifidobakterij proti izbranim indikatorskim mikroorganizmom. ....              | 62 |
| Preglednica 27: Rezultati ugotavljanja MIK za različne seve bifidobakterij. ....                                                     | 65 |

## KAZALO SLIK

|                                                                                                                                                                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Slika 1: Bifidobakterije barvane po Gramu, 1000-kratna povečava, izdelek Waya IT. ....                                                                                                                                          | 3  |
| Slika 2: Glavni faktorji, ki vplivajo na preživetje probiotičnih bakterij v fermentiranih mlečnih izdelkih (Mohammadi in sod., 2012: 402). ....                                                                                 | 12 |
| Slika 3: Verižna reakcija s polimerazo (Jeršek, 2009: 27) .....                                                                                                                                                                 | 17 |
| Slika 4: Shema poteka dela diplomske naloge. ....                                                                                                                                                                               | 20 |
| Slika 5: Reagenti za PCR in RAPD. ....                                                                                                                                                                                          | 26 |
| Slika 6: Uporabljeni molekularni označevalci velikosti DNA. Molekularni označevalci GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (a) in molekularni označevalci GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (b) (Thermo Scientific, 2012). ....                  | 27 |
| Slika 7: E-test: umerjena lestvica vrednosti koncentracij antibiotikov v µg/ml.....                                                                                                                                             | 27 |
| Slika 8: Mikropruvete z reakcijsko mešanico. ....                                                                                                                                                                               | 32 |
| Slika 9: Ciklični termostat.....                                                                                                                                                                                                | 32 |
| Slika 10: Model za vlivanje gela z že odstranjenimi glavnički (a) in gel prenešen v elektroforetsko banjo s pufo (b). ....                                                                                                      | 34 |
| Slika 11: Elektronski števec za štetje kolonijskih enot. ....                                                                                                                                                                   | 34 |
| Slika 12: pH meter.....                                                                                                                                                                                                         | 35 |
| Slika 13: Značilne cone inhibicije v obliki vretena, ki nastanejo pri metodi z E-testom.....                                                                                                                                    | 37 |
| Slika 14: Rast bifidobakterij iz zaporednih decimalnih razreditev vzorca, nacepljenih na gojišče TOS+mup (Activia). ....                                                                                                        | 38 |
| Slika 15: Izgled bifidobakterij, zrastle na gojišču TOS+mup, osamljenih iz prehranskega dopolnila Waya IT (a) in Linbi (b). ....                                                                                                | 39 |
| Slika 16: Mikroskopski preparati bifidobakterij, obarvani z metodo barvanja po Gramu, pri 1000x povečavi. Waya IT (a), Linex (b), Lacto Seven (c) in IM 386 (d). ....                                                           | 40 |
| Slika 17: Princip poteka agarozne gelske elektroforeze. Levo: nanos pomnožkov reakcije PCR oz. RAPD ter molekularnega označevalca velikosti, sredina: potovanje pomnožkov proti anodi in desno: konec gelske elektroforeze..... | 41 |
| Slika 18: Analiza pomnožkov PCR z začetnimi oligonukleotidi, specifičnimi za rod <i>Bifidobacterium</i> (Bif164-f in Bif662-r).....                                                                                             | 42 |
| Slika 19: Analiza pomnožkov RAPD z začetnim oligonukleotidom KGT-70GC.....                                                                                                                                                      | 43 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Slika 20: Analiza pomnožkov RAPD z začetnim oligonukleotidom 1254.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 44 |
| Slika 21: Analiza pomnožkov PCR z začetnima oligonukleotidoma BiBIF-1 in BiBIF-2, specifičnima za vrsto <i>B. bifidum</i> . ....                                                                                                                                                                                                                                                         | 45 |
| Slika 22: Analiza pomnožkov PCR z začetnima oligonukleotidoma BiLON-1 in BiLON-2, specifičnima za vrsto <i>B. longum</i> . ....                                                                                                                                                                                                                                                          | 46 |
| Slika 23: Analiza pomnožkov PCR z začetnima oligonukleotidoma BiINF-1 in BiINF-2, specifičnima za vrsto <i>B. infantis</i> . ....                                                                                                                                                                                                                                                        | 47 |
| Slika 24: Analiza pomnožkov PCR z začetnima oligonukleotidoma Bflact2 in Bflact5, specifičnima za vrsto <i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> . ....                                                                                                                                                                                                                                     | 48 |
| Slika 25: Primerjava rasti bifidobakterije iz prehranskega dopolnila Waya IT po 48-urah v RPM (zgoraj) in v RPM+ke (spodaj). Analizirane so razredčitve $10^{-6}$ (levi petrijevki), $10^{-7}$ (srednji petrijevki) in $10^{-8}$ (desni petrijevki). ....                                                                                                                                | 50 |
| Slika 26: Grafični prikaz padanja vrednosti pH med 48-urno inkubacijo bifidobakterij, osamljenih iz različnih izdelkov, v RPM ali RMP+ke. ....                                                                                                                                                                                                                                           | 51 |
| Slika 27: Grafični prikaz preživelosti seva IM 386 (log KE/ml) v simuliranih razmerah prebavil. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 54 |
| Slika 28: Spremljanje preživelosti seva <i>B. breve</i> IM 386 v simuliranih razmerah prebavil s cepitvijo na trdno gojišče. pH2 po 360 minutah, razredčitvi $10^{-2}$ in $10^{-3}$ (a), pH3 po 360 minutah, razredčitvi $10^{-3}$ in $10^{-4}$ (b), pH7 po 360 minutah, razredčitvi $10^{-3}$ in $10^{-4}$ (c) in kontrola po 360 minutah, razredčitvi $10^{-3}$ in $10^{-4}$ (d). .... | 55 |
| Slika 29: Grafični prikaz preživelosti bifidobakterij (log KE/ml) osamljenih iz Waya IT, v simuliranih razmerah prebavil. ....                                                                                                                                                                                                                                                           | 56 |
| Slika 30: Grafični prikaz preživelosti (log KE/ml) bifidobakterij, osamljenih iz izdelka Linex, v simuliranih razmerah prebavil. ....                                                                                                                                                                                                                                                    | 57 |
| Slika 31: Spremljanje preživelosti izolata iz prehranskega dopolnila Linbi v simuliranih razmerah želodca (pH 2), s štetjem na trdnem gojišču. Levi plošči: vzorec, nacepljen takoj po dodatku ŽS (razredčitvi $10^{-5}$ in $10^{-6}$ ) in desni plošči: vzorec, nacepljen po 90 minutnem tretiranju v ŽS s pH 2 (nerazredčen vzorec in razredčitev $10^{-1}$ ). ....                    | 57 |
| Slika 32: Grafični prikaz preživelosti bifidobakterije (log KE/ml) osamljene iz Linbi, v simuliranih razmerah prebavil. ....                                                                                                                                                                                                                                                             | 58 |
| Slika 33: Grafični prikaz preživelosti bifidobakterije (log KE/ml) osamljene iz Yogermina, v simuliranih razmerah prebavil. ....                                                                                                                                                                                                                                                         | 59 |
| Slika 34: Grafični prikaz preživelosti bifidobakterije (log KE/ml) osamljene iz Bion3, v simuliranih razmerah prebavil. ....                                                                                                                                                                                                                                                             | 60 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Slika 35: Grafični prikaz preživelosti bifidobakterije (log KE/ml) osamljene iz Lacto Seven, v simuliranih razmerah prebavil.....                                                                                                                                                 | 61 |
| Slika 36: Cona inhibicije proti indikatorskemu organizmu <i>L. monocytogenes</i> okoli lise bifidobakterij, osamljenih iz prehranskega dopolnila Lacto Seven, in odčitavanje velikosti cone inhibicije. ....                                                                      | 61 |
| Slika 37: Ugotavljanje protimikrobne aktivnosti bifidobakterij, osamljenih iz izdelkov Linex (LX), Waya IT (W) in Bion3 (B) proti indikatorskemu organizmu <i>L. innocua</i> (a) in <i>Cl. Perfringens</i> (b). ....                                                              | 63 |
| Slika 38: Ugotavljanje protimikrobne aktivnosti bifidobakterij iz prehranskih dopolnil Yogermina (Y), Linbi (Li) in seva IM 386 (386) proti indikatorskemu organizmu <i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> .....                                                          | 64 |
| Slika 39: Testiranje občutljivosti bifidobakterij za antibiotike. Izolat iz Bion3 za ampicilin (a), izolat iz Linbi za gentamicin (b), sev IM 386 za klindamicin (c) in izolat iz Linbi za klindamicin (d). ....                                                                  | 67 |
| Slika 40: Problem pri odčitavanju rezultatov. Pri izolatu iz izdelka Bion3 so se pojavile posamične kolonije znotraj cone inhibicije pri antibiotiku gentamicin (a) in pri izolatu iz izdelka Linbi se je pojavil moten rob cone inhibicije pri antibiotiku eritromicin (b). .... | 68 |

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

| Okrajšava ali simbol: | Pomen:                                                                  |
|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| B.                    | <i>Bifidobacterium</i>                                                  |
| Bb-12                 | sev <i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i> Bb-12            |
| BHI                   | gojišče Brain heart infusion                                            |
| bp                    | bazni par                                                               |
| Cl.                   | <i>Clostridium</i>                                                      |
| Cys                   | Cistein hidroklorid                                                     |
| ČS                    | simulirani črevesni sok                                                 |
| DNA                   | deoksiribonukleinska kislina                                            |
| dNTP                  | deoksinukleotid trifosfat (mešanica nukleotidov)                        |
| E.                    | <i>Escherichia</i>                                                      |
| EDTA                  | etilendiamin-tetraacetat                                                |
| EFSA                  | European Food Safety Authority                                          |
| Ent.                  | <i>Enterococcus</i>                                                     |
| FAO                   | Food and Agriculture Organization                                       |
| GRAS                  | Generally Regarded As Safe (splošno priznan kot varen)                  |
| kb                    | kilobazni par                                                           |
| KCl                   | kalijev klorid                                                          |
| KE/g                  | kolonijskih enot na gram                                                |
| KE/ml                 | kolonijskih enot na mililiter                                           |
| L.                    | <i>Listeria</i>                                                         |
| Lb.                   | <i>Lactobacillus</i>                                                    |
| M17                   | gojišče za koke                                                         |
| MH                    | gojišče Mueller Hinton                                                  |
| MIK                   | minimalna inhibitorna koncentracija                                     |
| MKB                   | mlečnokislinske bakterije                                               |
| MRS                   | gojišče po de Man, Rogosa, Sharpe                                       |
| mup                   | mupirocin                                                               |
| NaCl                  | natrijev klorid                                                         |
| NaHCO <sub>3</sub>    | natrijev hidrogenkarbonat                                               |
| PCR                   | polymerase chain reaction (verižna reakcija s polimerazo)               |
| RAPD                  | randomly amplified polymorphic DNA (naključno pomnožena polimorfna DNA) |
| RCF                   | relative centrifugal force (relativna centrifugalna sila)               |
| RCM                   | gojišče Reinforced Clostridial medium                                   |
| rDNA                  | gen za ribosomsko deoksiribonukleinsko kislino                          |
| RPM                   | rekonstituirano posneto mleko                                           |
| RPM+ke                | rekonstituirano posneto mleko s kvasnim ekstraktom                      |
| sp.                   | species (vrsta)                                                         |
| ssp.                  | subspecies (podvrsta)                                                   |
| Staph.                | <i>Staphylococcus</i>                                                   |
| Str.                  | <i>Streptococcus</i>                                                    |
| TAE                   | tris acetatni EDTA pufer                                                |
| TOS                   | gojišče za bifidobakterije                                              |
| WHO                   | World Health Organization (svetovna zdravstvena organizacija)           |
| ŽS                    | simulirani želodčni sok                                                 |

## 1 UVOD

Zaradi svoje vloge pri proizvodnji in konzerviranju hrane in krme ter probiotičnih lastnosti, ki jih izkazujejo določeni sevi, so bifidobakterije, poleg laktobacilov, ena najpomembnejših bakterijskih skupin, vključenih v živilsko industrijo in prehrano ljudi (Felis in Dellaglio, 2007).

Bifidobakterije naseljujejo raznolike ekološke niše, kot so prebavni trakt ljudi in živali, ustna votlina, odplake, kri in živila. Prvi jih je osamil Tissier leta 1900 iz dojenčkovega blata (Turroni in sod., 2011).

Določeni sevi bifidobakterij so sposobni vplivati na ravnotežje črevesne mikrobiote in s tem na zdravstveno stanje gostiteljskega organizma, zato jih uvrščamo med probiotične seve. Za te seve je zanimanje čedalje večje tako v humani medicini kot tudi v živilski industriji in industriji živalske krme (Turroni in sod., 2011; Biavati in sod., 2000).

### 1.1 NAMEN DELA

Namen diplomske naloge je bil opisati nekatere fiziološke lastnosti seva *Bifidobacterium breve* IM 386 in jih ovrednotiti s primerjavo s fiziološkimi lastnostmi sevov bifidobakterij, ki jih najdemo v komercialnih probiotičnih pripravkih. Tako smo proučevali rast bifidobakterij v mleku in v mleku ob dodatku kvasnega ekstrakta, sposobnost preživetja v simuliranih razmerah prebavnega trakta, protimikrobno aktivnost in občutljivost za antibiotike. Omenjene fiziološke lastnosti so ene pomembnejših za opredelitev določene bakterije kot probiotičnega mikroorganizma.

### 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

V diplomski nalogi smo izpostavili naslednje hipoteze:

- sev IM 386 dobro raste v mleku; dodatek kvasnega ekstrakta dodatno stimulira rast
- sev IM 386 uspešno preživi v simuliranih razmerah prebavnega trakta
- sev IM 386 izkazuje protimikrobno delovanje proti izbranim indikatorskim bakterijam
- sev IM 386 je občutljiv za antibiotike, ki so običajni za zdravljenje ljudi.

## 2 PREGLED OBJAV

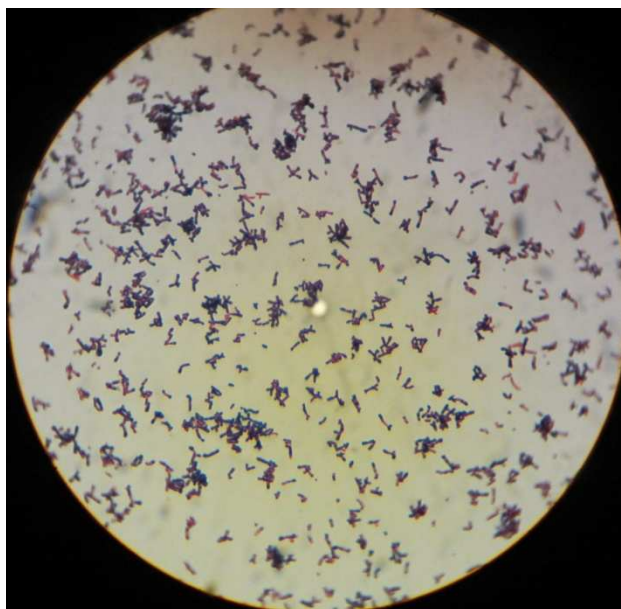
### 2.1 KRONOLOŠKI PREGLED OPISOVANJA RODU *Bifidobacterium*

Od prvega opisa bifidobakterij, ko je med letoma 1899 in 1900 Tissier iz dojenčkovega blata osamil bakterije z nenavadno obliko črke Y in jih poimenoval *Bacillus bifidus*, je preteklo že več kot 110 let. Izkazalo se je, da gre za anaerobne, po Gramu pozitivne bakterije, ki med rastjo ne tvorijo plinov (Gomes in Malcata, 1999; Biavati in sod., 2000).

Med leti 1900 do 1957 je bilo le malo novih spoznanj o teh bakterijah. Oblikovanje družine *Lactobacillaceae* leta 1917 je tri leta kasneje navedlo Hollanda, da je Tissier-jev *Bacillus bifidus* preimenoval v *Lactobacillus bifidus*. Čeprav je leta 1924 Orla-Jensen spoznal, da je rod *Bifidobacterium* samostojen takson, so jih zaradi sorodnosti z laktobacili vse do leta 1974 uvrščali v rod *Lactobacillus*. Poupard in sodelavci so bili prvi, ki so bifidobakterije povezali z aktinomicetami, kar so potrdili z analizo zaporedij 16S rDNA. Leta 1974 se bifidobakterije pojavijo kot samostojen rod znotraj družine *Actinomycetaceae*, opisan v osmi izdaji priročnika Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Biavati in sod., 2000; Felis in Dellaglio, 2007).

### 2.2 ROD *Bifidobacterium*

Bifidobakterije so anaerobne, negibljive, katalaza negativne, nesporogene po Gramu pozitivne bakterije. So različnih oblik, od kratkih ukrivljenih do razvejanih paličic v obliki črke Y (Gomes in Malcata, 1999; Biavati in sod., 2000).



Slika 1: Bifidobakterije barvane po Gramu, 1000-kratna povečava, izdelek Waya IT.

Optimalna temperatura rasti bifidobakterij humanega izvora je 36-38 °C in bifidobakterij animalnega izvora od 41-43 °C, medtem ko pod 20 °C in nad 46 °C večina bifidobakterij ne raste. Za enkrat znani izjemi sta vrsta *B. psychroaerophilum*, za katero poročajo, da raste pri temperaturi 8 °C in *B. thermacidophilum*, ki je zmožna rasti v zmerno termofilnih razmerah, pri 49,5 °C. Bifidobakterij, ki bi rasle pri temperaturah nad 49,5 °C do danes še niso osamili. Veljalo naj bi celo pravilo, da na podlagi sposobnosti rasti pri 45 °C lahko razlikujemo med



bifidobakterijami humanega oz. animalnega izvora (Biavati in sod., 2000; Cronin in sod., 2011).

Bifidobakterije so tolerantne za kislo okolje, optimalna vrednost pH se giblje med 6,5 in 7,0. Pod pH 4,5 in nad 8,5 ni rasti, izjema je vrsta *B. thermacidophilum*, ki raste pri pH 4 (Biavati in sod., 2000).

Bifidobakterije so anaerobni mikroorganizmi. Občutljivost za kisik je vrstno specifična, razlike pa so ugotovili tudi med različnimi sevi iste vrste. Narejenih je bilo veliko študij, kako bakterije zaščititi pred škodljivimi vplivi kisika. Ena izmed možnosti je vključevanje cisteina v medije za rast bifidobakterij in v fermentirane mlečne izdelke. Cistein je močan reducent in zmanjšuje redoks potencial, kar pozitivno vpliva na sposobnost preživetja bifidobakterij med skladiščenjem (Biavati in sod., 2000; Cronin in sod., 2011).

Predstavnike rodu *Bifidobacterium* velikokrat napačno uvrščajo med mlečnokislinske bakterije (MKB), saj so jim zelo podobni tako po morfoloških kot fizioloških lastnostih. Bistvena razlika med MKB in bifidobakterijami je v metabolizmu heksoz, kjer bifidobakterije izkoriščajo heksozo po tako imenovani fruktoza-6-fosfatni poti. Ključni encim pri tej razgradnji je fruktoza-6-fosfat fosfoketolaza, s katerim bifidobakterije razgradijo heksoza-fosfat na eritroza-4-fosfat in acetil fosfat, kar omogoča nastanek končnih produktov, ki sta mlečna in očetna kislina. Bifidobakterije humanega izvora lahko kot vir ogljika poleg glukoze izkoriščajo tudi galaktozo, laktozo in fruktozo. Pri fermentaciji ogljikovih hidratov tvorijo kisline, ne tvorijo pa plinov (Biavati in sod., 2000; Felis in Dellaglio, 2007; Gomes in Malcata, 1999; Turrone in sod., 2011).

Preglednica 1: Vrste bakterij iz rodu *Bifidobacterium* (Turrone in sod., 2011: 38).

|                                         |                                                          |
|-----------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| <i>B. adolescentis</i>                  | <i>B. longum</i> ssp. <i>suis</i>                        |
| <i>B. angulatum</i>                     | <i>B. magnum</i>                                         |
| <i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> | <i>B. merycicum</i>                                      |
| <i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i>   | <i>B. minimum</i>                                        |
| <i>B. asteroides</i>                    | <i>B. mongoliense</i>                                    |
| <i>B. bifidum</i>                       | <i>B. pseudocatenulatum</i>                              |
| <i>B. boum</i>                          | <i>B. pseudolongum</i> ssp. <i>globosum</i>              |
| <i>B. breve</i>                         | <i>B. pseudolongum</i> ssp. <i>pseudolongum</i>          |
| <i>B. catenulatum</i>                   | <i>B. psychraerophilum</i>                               |
| <i>B. choerinum</i>                     | <i>B. pullorum</i>                                       |
| <i>B. coagulans</i>                     | <i>B. ruminantium</i>                                    |
| <i>B. coryneforme</i>                   | <i>B. saeculare</i>                                      |
| <i>B. cuniculi</i>                      | <i>B. scardovii</i>                                      |
| <i>B. dentium</i>                       | <i>B. subtile</i>                                        |
| <i>B. gallicum</i>                      | <i>B. thermacidophilum</i> ssp. <i>porcinum</i>          |
| <i>B. gallinarum</i>                    | <i>B. thermacidophilum</i> ssp. <i>thermoacidophilum</i> |
| <i>B. indicum</i>                       | <i>B. thermophilum</i>                                   |
| <i>B. longum</i> ssp. <i>infantis</i>   | <i>B. tsurumiense</i>                                    |
| <i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i>     |                                                          |

Trenutno je znotraj rodu *Bifidobacterium* opisanih 37 vrst s štirimi taksoni (*B. longum*, *B. pseudolongum*, *B. animalis*, *B. thermacidophilum*), ki se nadalje delijo v podvrste in med

seboj izkazujejo več kot 93 % podobnost zaporedij genov za 16S rDNA. V preglednici 1 so navedene danes poznane vrste rodu *Bifidobacterium* (Turroni in sod., 2011).

Bifidobakterije so ena najpomembnejših skupin mikroorganizmov v prebavnem traktu ljudi, toplokrvnih živali ter čebel (Gomes in Malcata, 1999). V debelem črevesu človeka dosežejo koncentracijo  $10^{10}$ - $10^{11}$  celic na gram, kar jih uvršča med glavne bakterije črevesne mikrobiote (Holzapfel in sod., 1998). Osamili so jih iz blata dojenčka in odraslega človeka, vagine in zobnega kariesa. Opazili so, da so posamezne vrste prilagojene na določeno okolje (Biavati in sod., 2000).

Posamezne bifidobakterije lahko izkazujejo vrsto pozitivnih učinkov na zdravje gostitelja, kot so lajšanje prebavnih težav in zaprtja, zniževanje vsebnosti serumskega holesterola, stimulacija imunskega odziva, lajšanje težav pri laktozni intoleranci, lajšanje alergijskih simptomov in drugo. Čeprav je bila večina zdravju koristnih učinkov potrjena v kliničnih študijah, pa so sami mehanizmi delovanja v večini primerov še nepojasneni. Med bifidobakterijami najdemo tudi take, ki s svojim delovanjem gostitelju ne koristijo. Primer je oportunistično patogena *B. dentium* Bd1, ki je sposobna acidogeneze, kar vodi v demineralizacijo sklenine in razvoj zobne gnilobe. Kljub vsemu pa bifidobakterije uvrščamo med zdravju koristne organizme in so kot take zanimive tako v humani medicini kot živilski industriji (Cronin in sod., 2011).

Uporabnost bifidobakterij pri izdelavi fermentiranih mlečnih izdelkov je omejena, saj jim slabe tehnološke lastnosti onemogočajo ustrezno fermentacijo in oblikovanje končnega izdelka želenih senzoričnih lastnosti. Naravna ekološka niša bifidobakterij je prebavni trakt, zato je njihova rast v mleku slaba in počasna, kar omogoči prekomerno rast neželenih mikroorganizmov. Poleg tega lahko nekateri metabolni produkti bifidobakterij negativno vplivajo na senzorične lastnosti fermentiranih mlečnih izdelkov. Glavna produkta za bifidobakterije značilnega metabolizma heksoz po fruktoza-6-fosfatni poti sta očetna in mlečna kislina, ki nastaneta v razmerju 3:2. Ob nastanku prevelike količine očetne kisline dobi izdelek okus po kislu. Bifidobakterije ne proizvajajo aromatičnih snovi in niso sposobne oblikovati dobrih reoloških lastnosti. Pri oblikovanju organoleptičnih lastnosti ima velik pomen acetaldehid, ki je na primer glavna sestavina arome jogurta, a ga bifidobakterije ne proizvajajo. Zaradi navedenih lastnosti uporabljamo bifidobakterije predvsem kot podporne ali dodatne starterske kulture k vodilni starterski kulturi (Mohammadi in sod., 2012).

Najbolj poznane in raziskane vrste bifidobakterij so *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis* in *B. longum*. Določeni sevi teh vrst izkazujejo probiotične lastnosti (Felis in Dellaglio, 2007).

### 2.2.1 Vrsta *Bifidobacterium adolescentis*

*B. adolescentis* je značilen prebivalec zdravega prebavnega trakta ljudi in živali, osamili pa so jo tudi iz vaginalnega območja (Biavati in sod., 2000). Značilno je, da vrsta postane prevladujoča šele v odraslem obdobju, ko nadomesti vrsti *B. infantis* in *B. breve*, ki sta značilni za prebavni trakt dojenčka (Gomes in Malcata, 1999).

### 2.2.2 Vrsta *Bifidobacterium animalis*

*B. animalis* in *B. lactis* sta bili pred leti filogenetsko ločeni vrsti, danes pa sta združeni v vrsto *B. animalis*, ki ima podvrsti *B. animalis* ssp. *animalis* in *B. animalis* ssp. *lactis*. Vrsta *B. animalis* je živalskega izvora, osamljena iz blata podgan, piščancev, zajcev, telet, morskih

prašičkov, pa tudi iz odplak. Sev *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb-12, ki je zaščiten s strani danskega proizvajalca Chr. Hansen, je eden najbolj razširjenih sevov bifidobakterij v probiotičnih izdelkih za ljudi. Čeprav sev ni humanega izvora, pa mu vsestransko uporabnost omogočajo njegove lastnosti, kot na primer toleranca za kislo okolje in za prisotnost kisika. Sev Bb-12 že od leta 1985 uporabljajo kot probiotični sev v različnih živilih in prehranskih dopolnilih, brez zabeleženih neželenih učinkov (Biavati in sod., 2000; Chr. Hansen, 2012; Felis in Dellaglio, 2007; Mohammadi in sod., 2012).

### **2.2.3 Vrsta *Bifidobacterium bifidum***

Vrsta *B. bifidum* je značilna za ljudi, prisotna je tako v blatu novorojenčkov kot blatu odraslih, osamili pa so jo tudi iz vaginalnega območja (Biavati in sod., 2000). Protimikrobna aktivnost bifidobakterij je bila prvič opisana že leta 1900, ko je Tissier prav pri tej vrsti opazil protimikrobne učinke proti *Escherichia coli*. Vrsta je poznana tudi po proizvodnji bakteriocina bifidin (Cheikhoussef in sod., 2008).

### **2.2.4 Vrsta *Bifidobacterium breve***

Vrsta *B. breve* je humanega izvora. Predstavnike te vrste pogosto osamijo iz materinega mleka in blata dojenčka, predvsem pri dojenih otrocih se je izkazala za prevladujočo vrsto. *B. breve* je tipična predstavnica dojenčkovega prebavnega trakta in čeprav njena številčnost z leti upada, je prisotna tudi v blatu odraslih. Predstavnike te vrste so osamili tudi iz vaginalnega območja (Bivati in sod., 2000; Gomes in Malcata, 1999).

### **2.2.5 Vrsta *Bifidobacterium infantis***

*B. infantis* je poleg *B. breve* prevladujoča vrsta v prebavnem traktu dojenčkov. Med prvimi naseli prebavni trakt novorojenčkov in je značilna predvsem za dojene otroke (Matsuki in sod., 1999).

### **2.2.6 Vrsta *Bifidobacterium longum***

*B. longum* predstavlja eno najbolj zastopanih vrst bifidobakterij v prebavnem traktu človeka. Če je za nekatere bifidobakterije značilno, da naseljujejo prebavni trakt le v določenem obdobju življenja, to prav gotovo ne velja za *B. longum*. Slednja je prisotna v črevesju skozi vse življenje. Osamljena je bila tako iz dojenčkovega blata kot iz blata odraslega človeka, pa tudi iz vaginalnega območja in iz zob prizadetih od kariesa (Matsuki in sod., 1999; Gomes in Malcata, 1999; Biavati in sod., 2000).

## **2.3 DEFINICIJE PROBIOTIKOV SKOZI ZGODOVINO**

Beseda probiotik izhaja iz grškega izraza »pro bios«, kar v dobesednem prevodu pomeni »za življenje« (Vasiljevic in Shah, 2008).

Zgodovina probiotikov sega daleč v preteklost, saj so že pred tisočletji fermentiranemu mleku pripisovali ugodne učinke na zdravje. Prav iz fermentiranega mleka izhaja največ MKB, ki jih danes poznamo po probiotičnem delovanju oziroma po koristnih učinkih na zdravje gostitelja (Rogelj in Bogovič Matijašić, 2004).

Sodobni koncept probiotikov sega v zgodnja leta 20. stoletja, ko je Nobelov nagrajenec Metchnikoff opisoval, da je med bolgarskimi pastirji visoka povprečna starost, s precejšnjim deležem stoletnikov. Dolgo življenjsko dobo je pripisoval njihovem načinu prehranjevanja, ki je vključevalo velike količine fermentiranega mleka oziroma specifičnih vrst laktobacilov,

ki so v njem. Predpostavil je, da se z uživanjem ustreznih količin tovrstnih izdelkov v prebavila vnesejo MKB, ki se tam razmnožijo in preprečijo rast škodljivim mikroorganizmom. V tem obdobju je mikrobiolog Tissier ugotovil, da se v blatu dojenih dojenčkov nahaja več bakterij, ki jih je poimenoval *Bacillus bifidus*, kot v blatu nedojenih dojenčkov. Poleg tega je opazil, da dojeni otroci redkeje obolevajo za različnimi črevesnimi okužbami. Tako je že leta 1906 govoril o ugodnih kliničnih učinkih moduliranja mikrobiote pri otrocih s črevesnimi infekcijami in trdil, da lahko bifidobakterije izrinejo patogene bakterije (Rogelj in Perko, 2003; Vasiljevic in Shah, 2008).

Leta 1965 sta Lilly in Stillwell izraz probiotik uporabila za opis snovi, ki jih proizvaja en mikroorganizem in stimulirajo rast drugih mikroorganizmov. V naslednjih letih so Sperti ter Fujii in Cook probiotike opisali kot snovi, ki spodbujajo rast mikroorganizmov ali izboljšajo imunski odziv gostitelja, medtem ko je leta 1974 Parker probiotike označil kot organizme in snovi, ki prispevajo k mikrobnemu ravnotežju v prebavnem traktu (Vasiljevic in Shah, 2008).

Osnovno definicijo probiotikov je leta 1992 vpeljal Fuller. Probiotike je opisal kot žive mikrobne dodatke krmi, ki ugodno vplivajo na žival gostiteljico z izboljšanjem njenega intestinalnega mikrobnega ravnotežja. Ker je bila definicija probiotikov omejena samo na uporabo v živalski prehrani, je bilo predlagano, da se definicija razširi tudi na uporabo v humani prehrani. Tako sta leta 1992 Huis in Haavenaar probiotik definirala kot mono ali mešano kulturo živih mikroorganizmov, ki koristno učinkujejo na človeka ali žival z izboljšanjem lastnosti obstoječe oz. lastne mikrobiote (WHO/FAO, 2001).

Od leta 2002 veljavna definicija, ki sta jo povzeli tudi organizaciji FAO in WHO, se glasi, da je probiotik živ mikroorganizem, ki ima koristne učinke na zdravje gostitelja, kadar ga zaužije v zadostnem številu (Vasiljevic in Shah, 2008).

## 2.4 PROBIOTIČNI MIKROORGANIZMI

Največ dobro raziskanih probiotičnih mikroorganizmov pripada rodovoma *Bifidobacterium* in *Lactobacillus*, kar je delno posledica njihove tradicionalne povezave z zdravjem, naravne prisotnosti v prebavnem traktu in fermentirani hrani, pa tudi tako imenovanega statusa GRAS (Generally Regarded as Safe), ki jim daje sloves "varnih" mikroorganizmov, saj jih ljudje v fermentirani hrani uživajo že tisočletja (Rogelj in Perko, 2003). Seveda pa to ne pomeni, da so kar vse MKB oz. vsi laktobacili ter bifidobakterije probiotiki. Da neko bakterijo uporabimo kot probiotik, mora najprej zadostiti določenim varnostnim, funkcionalnim in tehnološkim kriterijem.

V preglednici 2 so zbrane najpomembnejše vrste bakterij, ki se uporabljajo v probiotičnih izdelkih. Med njimi prednjačijo predstavniki rodu *Lactobacillus* sp., sledijo jim bifidobakterije, enterokoki, laktokoki in nekaj drugih mikroorganizmov, ki ne pripadajo MKB. Slednji se redko uporabljajo v mlečnih izdelkih in drugih živilih, pogosteje jih najdemo v liofilizirani ali enkapsulirani obliki v farmacevtskih preparatih (Holzapfel in sod., 1998).

Preglednica 2: Mikroorganizmi, ki jih uporabljamo kot probiotike (Holzapfel in sod., 1998: 90).

| Rod <i>Lactobacillus</i>                      | Rod <i>Bifidobacterium</i> | Rod <i>Enterococcus</i> | Ostali                                         |
|-----------------------------------------------|----------------------------|-------------------------|------------------------------------------------|
| <i>Lb. acidophilus</i>                        | <i>B. bifidum</i>          | <i>Ent. faecium</i>     | <i>Saccharomyces boulardii</i>                 |
| <i>Lb. plantarum</i>                          | <i>B. infantis</i>         | <i>Ent. faecalis</i>    | <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>   |
| <i>Lb. casei</i>                              | <i>B. adolescentis</i>     |                         | <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> |
| <i>Lb. rhamnosus</i>                          | <i>B. longum</i>           |                         | <i>Leuconostoc mesenteroides</i>               |
| <i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> | <i>B. breve</i>            |                         | <i>Propionibacterium freudenreichii</i>        |
| <i>Lb. fermentum</i>                          | <i>B. lactis</i>           |                         | <i>Pediococcus acidilactici</i>                |
| <i>Lb. johnsonii</i>                          |                            |                         | <i>Streptococcus thermophilus</i>              |
| <i>Lb. gasseri</i>                            |                            |                         | <i>Escherichia coli</i>                        |
| <i>Lb. salivarius</i>                         |                            |                         |                                                |
| <i>Lb. reuteri</i>                            |                            |                         |                                                |

## 2.5 SELEKCIJSKI KRITERIJI ZA IZBIRO PROBIOTIČNIH SEVOV

Selekcijski kriteriji za izbiro probiotičnih sevov vključujejo varnostni, funkcionalni in tehnološki vidik. Ne glede na to, ali se uporabljajo probiotiki kot funkcionalno živilo, prehransko dopolnilo ali kot zdravilo, morajo izpolnjevati osnovne selekcijske kriterije (Rogelj in Bogovič Matijašič, 2004).

### 2.5.1 Varnostni vidik

Z varnostnega vidika mora sev zadostiti naslednjim zahtevam:

- biti mora vrstno specifičen (želeno je, da je za humano uporabo sev humanega izvora),
- ne sme biti patogen,
- ne sme biti toksičen,
- mora imeti status GRAS,
- izključiti moramo tveganje za sistemske infekcije ter prebavne težave,
- ne sme izločati encimov s škodljivim delovanjem (razgradnja glikopeptidov črevesne sluzi ali dekonjugacija žolčnih soli),
- ne sme vsebovati prenosljivih genov za odpornost proti antibiotikom (Rogelj, 2001; Rogelj in Bogovič Matijašič, 2004; Saarela in sod., 2000).

Pri ovrednotenju varnosti seva je možnih več pristopov, ki vključujejo proučevanje karakteristik seva, proučevanje farmakokinetike seva ter odkrivanje interakcij med probiotičnim sevom in gostiteljem.

Pri proučevanju farmakokinetike probiotičnega seva nas predvsem zanima njegovo preživetje in aktivnost v prebavnem traktu. Zato je poznavanje procesov preživetja v prebavnem traktu, translokacije in sposobnosti naselitve ter narave in aktivnosti metabolitov probiotičnega seva zelo pomembno, saj nam pomagajo pri ugotavljanju pozitivnih kot tudi morebitnih negativnih učinkov (Saarela in sod., 2000).

Večino probiotičnih bakterij uvrščamo med varne mikroorganizme, kljub temu pa se moramo zavedati, da gre za žive mikroorganizme in da imajo nekatere lastnosti, ki so lahko škodljive za ljudi in za živali. Določene probiotične bakterije nosijo genske zapise za odpornost proti antibiotikom. Prisotnost genskega zapisa pa še ne pomeni tudi izražanja odpornosti, zato je potrebno večjo pozornost nameniti bakterijam, ki nosijo prenosljive genske elemente, s katerimi lahko pride do prenosa rezistence. Slednje predstavljajo potencialno nevarnost za

širjenje odpornosti med patogenimi mikroorganizmi ljudi in živali (Saarela in sod., 2000; Berce in sod., 2004).

Glede na izvor delimo bakterijsko odpornost na naravno (angl. intrinsic) in na pridobljeno (angl. acquired). Naravna odpornost bakterij proti antibiotikom je lahko značilna za posamezni bakterijski rod ali pa za bakterijsko vrsto, pogojujejo pa jo genetske, strukturne in fiziološke značilnosti mikroorganizmov. Zato naravno odpornost nekaterih bakterij lahko že vnaprej predvidimo. Posamezne bakterijske vrste ali rodovi so naravno odporni proti nekaterim antibiotikom, kadar nimajo tarčnih mest, na katera delujejo antibiotiki, ali pa imajo značilno sestavo celične stene, ki preprečuje vdor antibiotika do mesta njegovega delovanja (Berce in sod., 2004).

Posamezni izolati neke bakterijske vrste ali rodu pa lahko odpornost proti antibiotikom tudi pridobijo. Taka vrsta odpornosti je nepredvidljiva. Za razliko od naravne odpornosti je pridobljena odpornost proti antibiotikom prisotna le pri posameznih sevih določene bakterijske vrste ali rodu. Je rezultat spremenjene celične fiziologije in strukture, ki je nastala zaradi genetskih sprememb mikroorganizma. Lahko je posledica mutacije kromosomskega ali plazmidnega gena posamezne bakterijske celice ali pridobitve nove genetske informacije s prenosom genskega materiala (Berce in sod., 2004).

Možnost prenosa genov za odpornost proti antibiotikom med probiotičnimi in patogenimi bakterijami je majhna, vendar ji je kljub temu potrebno nameniti posebno pozornost. Varnostni vidik uporabe zahteva, da probiotični sevi, namenjeni za prehrano, ne vsebujejo prenosljivih genov za odpornost proti antibiotikom. Zato morajo biti opravljene natančne analize prisotnosti genov za odpornost proti antibiotikom in o njihovi možnosti prenosa rezistence z prenosljivimi elementi (plazmidi in transpozoni) za vsak probiotični sev, preden pride na tržišče (Saarela in sod., 2000; Berce in sod., 2004).

## 2.5.2 Funkcionalni vidik

S funkcionalnega vidika mora potencialno probiotičen sev izkazovati vsaj nekatere od naslednjih lastnosti:

- odpornost proti kislini in želodčnemu soku,
- odpornost proti žolčnim solem,
- sposobnost vezave na črevesne epitelne celice in vsaj začasna poselitev,
- spodbujanje oz. krepitev imunskega odziva,
- antagonistično delovanje proti patogenim bakterijam kot so *Helicobacter pylori*, *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes*, *Clostridium difficile* ali druge
- protimutageno in protikarcinogeno delovanje (Saarela in sod., 2000).

Med pomembnejše lastnosti probiotičnega seva gotovo sodi sposobnost preživetja prehoda skozi prebavni trakt, saj kislo okolje želodca in prisotnost žolčnih soli v črevesju predstavljata neugodne razmere številnim mikroorganizmom. Zato so le sevi, ki uspešno premostijo dane razmere črevesja, primerni kandidati za uporabo v obliki prehranskih dopolnil ali fermentiranih mlečnih izdelkov (Saarela in sod., 2000).

Sposobnost vezave na črevesne epitelne celice je zaželena lastnost probiotikov, saj je to predpogoj, da vsaj začasno poselijo površino črevesa. Zaradi vezave in poselitve se probiotičen sev določen čas zadrži v prebavnem traktu, pri čemer izkazuje pozitivne učinke na

zdravje gostitelja, na primer s spodbujanjem imunskega odziva. Vezava zagotavlja tudi tekmovalnost in odstranjevanje/izločanje patogenih bakterij (Saarela in sod., 2000).

Probiotične bakterije vplivajo na fiziologijo gostitelja z vzpostavljanjem ugodnega mikrobnega ravnovesja v prebavnem traktu in/ali preko spodbujanja njegovega imunskega odziva s sintezo sekrecijskega imunoglobulina A (IgA) v celicah črevesne sluznice in z vplivanjem na citokinske odgovore. Hkrati pa lahko vplivajo tudi na povečanje deleža limfocitov T, makrofagov in naravnih celic ubijalk. Do nedavnega je veljalo, da samo adhezivne probiotične bakterije učinkovito sprožijo imunski odziv in stabilizirajo črevesno zaščito. Zadnje čase pa znanstveniki ugotavljajo, da stimulacija imunskega odziva ni omejena zgolj na žive celice, ampak naj bi imeli pozitiven vpliv na imunski sistem tudi celični kompleksi probiotikov (delci celic ali mrtve celice), ki jih označujejo s terminom probiotična aktivna snov (Holzapfel in Schillinger, 2002; Bogovič Matijašić, 2001).

Probiotične bakterije izkazujejo tudi antagonistično delovanje, ko s patogenimi mikroorganizmi tekmujejo za hranila in receptorska mesta na epitelnih celicah črevesa in tako vplivajo na spreminjanje sestave črevesne mikrobiote v prid nepatogenih bakterij. Z mehanizmom kompetitivnega izločanja so bifidobakterije sposobne zasedi mesto na črevesni sluznici, kamor bi se sicer lahko vezale patogene bakterije in sprožile okužbo (Cheikhoussef in sod., 2008).

Na vezavo patogenih mikroorganizmov pa vplivajo bifidobakterije tudi s svojimi metabolnimi produkti, s katerimi ustvarijo neugodne razmere. Protimikrobno delovanje je posledica delovanja različnih protimikrobnih snovi, med katere prištevamo organske kisline, etanol, vodikov peroksid, kratkoverižne maščobne kisline, bakteriocine ter bakteriocinom podobne protimikrobne snovi (Cheikhoussef in sod., 2008; Saarela in sod., 2000).

Že leta 1984 so prvič poročali o domnevnem bakteriocinu bifidobakterij. To je bil bakteriocin bifidin, ki ga proizvaja *B. bifidum* NCDC 1452. Nekaj let pozneje je Kang s sodelavci odkril, da *B. longum* proizvaja protimikrobno spojino, imenovano bifilong, ki inhibira rast nekaterih po Gramu negativnih in po Gramu pozitivnih bakterij in je stabilen v območju pH med 2,5 in 5,0. Leta 1990 so Meghrous in sodelavci opisali toplotno stabilne proteinske spojine, ki jih proizvaja *B. bifidum* in inhibirajo rast *Streptococcus*, *Lactococcus* in *Clostridium* spp.. Leta kasneje so v različnih študijah poročali o različnih protimikrobnih spojinah bifidobakterij, ki zavirajo rast *Salmonella typhimurium* in *Listeria monocytogenes*. Saleh in El-Sayed pa sta leta 2004 naredila bolj podrobno poročilo o produkciji bakteriocina bifilact Bb-12 in bifilong Bb-46, ki ju proizvaja *B. lactis* Bb-12 in *B. longum* Bb-46. Oba bakteriocina izkazujeta močno protimikrobno delovanje proti *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *B. cereus* in *E. coli* (Martinez in sod., 2013).

Gre za snovi, ki večinoma še niso popolnoma raziskane, vendar pa je bilo ugotovljeno, da imajo močno protimikrobno aktivnost proti sorodnim bakterijskim vrstam in nekaterim patogenim mikroorganizmom (Cheikhoussef in sod., 2008).

Čeprav bi bakteriocine lahko opisali kot naravne antibiotike, pa jih, razen po protimikrobnem delovanju, z antibiotiki ne moremo enačiti. Bakteriocini so ribosomsko sintetizirani proteini oz. peptidi, katerih spekter protimikrobnega delovanja je navadno ozko usmerjen proti sorodnim bakterijskim vrstam. Produkcija bakteriocinov najpogosteje poteka v pozni eksponentni ali zgodnji stacionarni fazi. Medtem ko so antibiotiki sekundarni metaboliti,

navadno s širokim spektrom protimikrobnega delovanja (Cleveland in sod., 2001; Martinez in sod., 2013).

Bakteriocini se med seboj razlikujejo po mestu nahajanja genskega zapisa, molekularni masi, biokemijskih lastnostih, strukturi, spektru aktivnosti in načinu delovanja. Bakteriocini bifidobakterij so še dokaj neraziskani, je pa veliko več raziskav opravljenih na bakteriocinih MKB. Bakteriocine MKB uvrščamo v tri glavne skupine. Največ raziskanih bakteriocinov MKB je predstavnikov II. skupine, ki so v naravi najmočnejše zastopani. Gre za majhne, toplotno stabilne in membransko aktivne peptide, ki ne vsebujejo lantionina in so podvrženi le manjšim posttranslacijskim spremembam (Čanžek Majhenič in sod., 2009).

Zaradi tehnoloških lastnosti kot so toplotna stabilnost, odpornost proti nizkim vrednostim pH in šibkim organskim topilom ter toleranca za nizke temperature in prisotnost soli, pa zanimanje za uporabo bakteriocinov oz. bakteriocinogenih MKB v živilski industriji, močno narašča. Bakteriocini se zaradi svoje možne uporabe kot varnih, naravnih bioaditivov in konzervansov vedno več uporabljajo v živilski industriji. Probiotične bakteriocinogene MKB pa najdemo tudi v terapevtskih pripravkih, kjer naj bi s svojim delovanjem prispevale k preprečevanju in zdravljenju obolenj prebavnega trakta. Pri vsakem bakteriocinogenem sevu, ki je namenjen kakršnokoli komercialni uporabi, morajo opraviti številne tehnološke in klinične teste. Sev mora biti varen za uporabo, poleg tega pa moramo poznati njegove tehnološke in fiziološke učinke (Cleveland in sod., 2001; Cheikhyoussef in sod., 2008; Saarela in sod., 2000).

Bakteriocini v živilski industriji igrajo vedno bolj pomembno vlogo. Predstavljajo pomembne bioaditive, so lahko ena izmed možnih zamenjav za kemijske konzervanse, njihov dodatek pa lahko omogoča tudi manj agresivne toplotne in fizikalno-kemijske postopke. V živinoreji pa bakteriocini lahko omogočajo delno nadomestitev antibiotikov (Cleveland in sod., 2001). Zaradi teh številnih pozitivnih lastnosti, pa je vedno večje zanimanje tudi za bakteriocine bifidobakterij, saj uporaba probiotičnih bifidobakterij v prehrani močno narašča.

V preglednici 3 so prikazani različni sevi oz. vrste rodu *Bifidobacterium* in njihovi do sedaj znani bakteriocini.

Preglednica 3: Sevi bifidobakterij in njihovi bakteriocini (Cheikhyoussef in sod., 2008: 217).

| Sev                                         | Bakteriocin        |
|---------------------------------------------|--------------------|
| <i>B. bifidum</i>                           | Bifidin            |
| <i>B. longum</i>                            | Bifilong           |
| <i>B. bifidum</i> NCFB 1454                 | Bifidocin B        |
| <i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> Bb-12 | Bifilact Bb-12     |
| <i>B. longum</i> Bb-46                      | Bifilong Bb-46     |
| <i>B. thermophilum</i> RBL67                | Thermophilicin B67 |
| <i>B. infantis</i> BCRC 14602               | Bifidin I          |

Čeprav sta protimutageno in protikarcinogeno delovanje probiotičnih bakterij predmet številnih raziskav že vrsto let, pa sami mehanizmi delovanja še vedno niso pojasnjeni. Protikarcinogeni učinek pripisujejo predvsem sposobnosti nekaterih probiotičnih sevov, da vežejo in razgrajujejo karcinogene in prokarcinogene snovi, da modulirajo prokarcinogene encime v prebavnem traktu in zatirajo tumorje z mehanizmi imunskega odziva (Saarela in sod., 2000).



Protimutageno delovanje bi lahko opisali kot preprečevanje mutacijskih procesov, kar se kaže v zmanjšanju stopnje spontanah in induciranih mutacij. Rezultati nekaterih raziskav so pokazali, da je uživanje probiotikov povezano z zmanjšano pojavnostjo raka na debelem črevesu. Po drugi strani pa naj bi bili nekateri sevi bifidobakterij in laktobacilov sposobni zmanjšati genotoksični učinek določenih kemičnih spojin ter tako izkazovati protimutageno aktivnost (Vasiljevic in Shah, 2008).

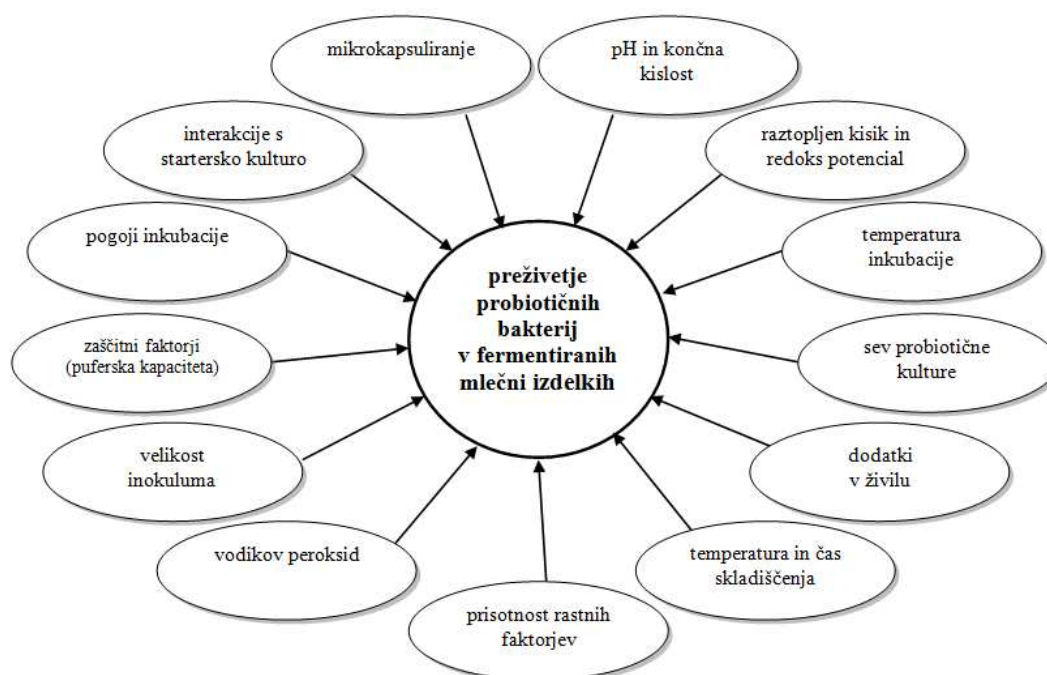
### 2.5.3 Tehnološki vidik

Saarela in sod. (2000) poudarjajo, da mora probiotičen sev, ki ga želimo uporabiti za prehranske namene, poleg izpolnjevanja varnostnih in funkcionalnih zahtev, zadostiti tudi tehnološkemu parametru proizvodnje živil, med katere prištevamo:

- primernost seva za gojenje in obstojnost med tehnološkimi postopki,
- obstojnost seva med skladiščenjem in distribucijo živila,
- primerne senzorične lastnosti probiotičnega seva,
- genetska stabilnost seva,
- odpornost proti fagom.

Probiotični sev, ki ga želimo uporabiti v živilih, mora biti sposoben preživeti različne tehnološke postopke priprave in predelave živil ter ohraniti vitalnost tudi po daljšem času skladiščenja in distribucije. Prav tako mora sev lastnosti ohraniti med postopki manipulacije, kot so priprava, gojenje in shranjevanje kulture. Probiotični sevi morajo prispevati k dobrim senzoričnim lastnostim izdelka ali pa vsaj ne smejo imeti negativnih učinkov. Poleg tega pa mora biti sev genetsko stabilen in odporen proti fagom (Saarela in sod., 2000; Rogelj, 2001).

Na sliki 2 so prikazani glavni faktorji, ki vplivajo na preživetje probiotičnih bakterij v fermentiranih mlečnih izdelkih.



Slika 2: Glavni faktorji, ki vplivajo na preživetje probiotičnih bakterij v fermentiranih mlečnih izdelkih (Mohammadi in sod., 2012: 402).

Na preživetje probiotičnih bakterij v fermentiranih mlečnih izdelkih pa poleg lastnosti samega seva vplivajo tudi medsebojni vplivi z ostalimi sevi, fiziološko stanje kulture ter nastali metabolni produkti. Preživetje je odvisno tudi od dostopnosti hranil, prisotnosti rastnih faktorjev oz. inhibitorjev, koncentracije sladkorjev (osmotski tlak), raztopljenega kisika in prepustnosti kisika preko embalaže, temperature inkubacije, časa fermentacije in temperature ter časa skladiščenja (Shah, 2000).

Ker je za večino probiotičnih bakterij značilno, da se po tehnoloških lastnostih ne morejo kosati s komercialnimi starterskimi kulturami, probiotične bakterije v tehnoloških postopkih priprave živil navadno uporabljamo kot podporne kulture starterskim. Za uspešno simbiozo pa je potrebno predhodno preveriti medsebojne odnose sevov starterske in probiotične kulture. Tako lahko starterska kultura s proizvodnjo nekaterih metabolnih produktov stimulira rast probiotičnega seva, istočasno pa lahko s proizvodnjo določenega metabolita negativno vpliva na preživelost probiotične bakterije. Zato je glavno vodilo pri oblikovanju mešanice starterskih in probiotičnih kultur uporabiti take, ki se po lastnostih med seboj ne izključujejo (Mohammadi in sod., 2012).

Aditivi, ki se uporabljajo v mlekarški industriji, lahko pomembno vplivajo na rast in sposobnost preživetja tako starterskih kultur kot probiotičnih bakterij. Za nekatere aditive, kot so soli, sladkorji, sladila, arome, barvila,...naj bi bile probiotične bakterije bolj tolerantne kot mlečnokislinske starterske kulture. Prisotnost NaCl v koncentraciji do 1 % lahko izkazuje stimulativni učinek na rast in aktivnost probiotikov v fermentiranih mlečnih izdelkih. Po drugi strani pa eterična olja, ki se lahko dodajo fermentiranim mlečnim izdelkom, negativno vplivajo na preživetje probiotičnih bakterij (Mohammadi in sod., 2012).

Bifidobakterijam pripisujejo slabšo rast v mleku zaradi pomanjkanja dušika (prostih aminokislin in krajših peptidov) in nekaterih vitaminov kakor tudi zaradi slabše izražene  $\beta$ -galaktozidazne in proteolitične aktivnosti. Za uspešnejšo rast in preživelost bifidobakterij se v mleko lahko dodajajo različni rastni faktorji, ki jih bifidobakterije izkoriščajo kot hranila, in pospeševalci rasti, ki vplivajo na preživetje bifidobakterij. Med najpogostejše dodatke prištevamo kazein, sirotkine beljakovine, hidrolizate L-cisteina, kvasni ekstrakt, glukozo, vitamine, minerale in antioksidante (Mohammadi in sod., 2012).

Temperatura in čas fermentacije sta pomembna dejavnika, ki vplivata na preživetje probiotičnih bakterij. Optimalna temperatura za rast bifidobakterij je med 37-41 °C, medtem ko je tehnološka temperatura značilne jogurtove starterske kulture okoli 42-43 °C. Kadar dodajamo istočasno startersko in probiotični kulturo, je zato izbira prave temperature fermentacija zelo pomembna. Če fermentacijo vodimo pri tehnološki temperaturi jogurtove starterske kulture, privedemo do optimalne rasti starterske kulture in slabše rasti probiotične kulture. Lahko pa se izognemo tem problemom tako, da kulturo probiotičnih bakterij nacepimo naknadno.

## 2.6 PROBIOTIČNI IZDELKI

Vse več ljudi posega po novih izdelkih, za katere proizvajalci in tržišče oglašujejo zdravju pozitivne učinke, čeprav za to navadno ni zadostnih znanstvenih dokazov. Predvsem širitev znanja o prehrani in novih tehnologijah predelave hrane, kakor tudi zanimanje potrošnikov za živila, ki poleg zagotavljanja zadostne količine hranil ohranjajo ali celo izboljšajo zdravje so privedli do prave poplave novih živil na tržišču. Veliko teh izdelkov lahko uvrstimo v

kategorijo funkcionalnih živil, za katera velja, da izkazujejo enega ali več ugodnih učinkov na telo, bodisi z izboljšanjem zdravstvenega stanja ali pa z zmanjšanjem tveganja za nastanek bolezni. Poleg tega mora funkcionalno živilo ohraniti lastnosti živila in biti učinkovito v količini, ki jo zaužijemo v normalnem dnevnem obroku. Ta živila morajo biti varna in v skladu z vsemi standardi za običajno zdravo in varno hrano. Probiotični izdelki, sami ali v kombinaciji s prebiotiki, so eden najbolj razširjenih primerov funkcionalnih živil, saj predstavljajo okrog 60 do 70 % celotnega trga funkcionalne hrane (Bogovič Matijašič, 2001; Raspor in Rogelj, 2001; Mohammadi in sod., 2012).

Tudi na slovenskem trgu se je ponudba probiotičnih izdelkov v zadnjih nekaj letih zelo povečala. Kljub temu pa v teh izdelkih le redko najdemo probiotične seve, ki dejansko izkazujejo zdravju koristne učinke, potrjene v kliničnih študijah. Proizvajalci bi morali, s preverjanjem izpolnjevanja selekcijskih kriterijev za izbiro probiotičnih bakterij, zagotavljati pravilno deklariran, funkcionalen in varen izdelek, a se jih večina zanaša zgolj na uveljavljen status GRAS laktobacilov in bifidobakterij kot varnih bakterij. K nedoslednemu izvajanju kontrole deklariranih bakterij v probiotičnih izdelkih zagotovo prispevajo tudi nedorečene smernice v EU zakonodaji, poleg tega pa proizvajalci, dobavitelji ali uvozniki prehranskih dopolnil niso dolžni preverjati sestave izdelkov pred prodajo. Zato mikrobiološke analize probiotičnih izdelkov in pripravkov velikokrat razkrijejo neujemanje med številom in vrsto dejansko osamljenih sevov iz izdelka ter informacijo na deklaraciji (Rogelj in Bogovič Matijašič, 2004; Teskač in sod., 2008; Bogovič Matijašič in sod., 2010).

## **2.6.1 Oblike probiotikov na tržišču**

Na tržišču najdemo probiotike v obliki funkcionalnih živil, prehranskih dopolnil in zdravil brez recepta. Večino funkcionalnih živil s probiotičnimi mikroorganizmi predstavljajo fermentirani mlečni izdelki, predvsem probiotični jogurti, mlečni napitki, siri in mlečni namazi, v zadnjem času pa vidimo porast tudi med živilami rastlinskega izvora. Zdravila in prehranska dopolnila v obliki kapsul, tablet, pastil, peroralnih kapljic in praškov za pripravo suspenzij pa vsebujejo liofilizirane probiotične mikroorganizme, ki so skoncentrirani do te mere, da s priporočenim odmerkom pripravka zaužijemo približno enako število probiotičnih bakterij kot z običajnim obrokom probiotičnega živila. Ker pa so regulatorne zahteve za prehranska dopolnila bistveno milejše od tistih za zdravila, na trgu močno prednjačijo prehranska dopolnila pred zdravili (Bogovič Matijašič in sod., 2010).

Ne glede na to, v kakšni obliki se probiotiki uporabljajo, morajo izpolnjevati osnovne selekcijske kriterije in zadostiti merilom, ki veljajo za vsa živila.

### **2.6.1.1 Funkcionalna živila**

Probiotiki, sami ali v kombinaciji s prebiotiki, so gotovo ena najbolj obetavnih skupin funkcionalne hrane. Ob zaužitju nam taki izdelki nudijo nekaj več od osnovne hrane, saj izkazujejo zdravju pozitivne učinke, s čimer zabrišejo mejo med hrano in zdravili. Probiotiki, kot funkcionalna hrana učinkujejo predvsem na sestavo in aktivnost mikrobiote prebavnega trakta. Pri večini probiotičnih izdelkov na tržišču ne navajajo specifičnih funkcionalnih učinkov oziroma zdravilnih lastnosti, zato se lahko prodajajo v prosti prodaji. Priporočljivo je upoštevati rok uporabe živila, saj se v času do njegovega izteka količina koristnih bakterij zmanjšuje in lahko pade na vrednost, pri kateri ne doseže več probiotičnega učinka (Bogovič Matijašič, 2001; Teskač in sod., 2008).

### 2.6.1.2 Prehranska dopolnila

Prehranska dopolnila so definirana kot izdelki, katerih namen je dopolnjevati običajno prehrano. Predstavljajo koncentrirani vir posameznih ali več hranil ali drugih snovi s hranilnim ali fiziološkim učinkom, ki so na voljo v obliki kapsul, pastil, tablet, vrečk s praškom, ampul s tekočino, kapalnih stekleničk slamic in v drugih oblikah s tekočino in praškom, ki so oblikovane tako, da se jih lahko uživa v odmerjenih majhnih količinskih enotah (Uradni list RS, št. 82/03).

### 2.6.1.3 Zdravila brez recepta

Na slovenskem tržišču so kot zdravilo brez recepta registrirane kapsule Linex® ter izdelka Linex Forte® in Linex Linbi®. Po definiciji je zdravilo namenjeno preprečevanju bolezni ali bolezenskih stanj, ki mora imeti preverjeno kakovost, varnost in učinkovitost, za kar poskrbijo proizvajalci, nadzorujejo pa pristojni državni organi (Teskač in sod., 2008). Posebnost probiotikov kot zdravil brez recepta je možnost navajanja neposrednih učinkov na bolezenska stanja, v primeru da so ti dokazani, medtem ko pri živilih oz. prehranskih dopolnilih to ni dovoljeno oziroma so trditve o učinkovanju lahko samo splošne (Bogovič Matijašič in sod., 2010).

## 2.6.2 Priporočeno število probiotičnih bakterij

Da probiotične bakterije izrazijo svoje funkcionalne lastnosti, morajo v prebavni trakt priti v aktivni obliki. V zadnjem času pa je vse več podatkov, da naj bi imele tudi odmrle celice ali deli celic določene pozitivne funkcionalne lastnosti, kot je stimulacija imunskega odziva (Vasiljevic in Shah, 2008).

Probiotične bakterije niso sposobne trajno poseliti črevesja, zato je priporočeno, da jih, za vzdrževanje mikrobnega ravnotežja v prebavilih, s hrano zaužijemo redno in v zadostnih količinah. O priporočenem številu probiotičnih bakterij v izdelku, da bo le ta imel pozitiven učinek na zdravje, najdemo različne podatke. Tako naj bi bilo najnižje predlagano število živih celic ob času zaužitja vsaj  $10^6$  KE/g oz. ml izdelka. Ob upoštevanju dejstva, da je za izkazovanje zdravju pozitivnih učinkov dnevno potrebno vnesti v telo  $10^8$ - $10^9$  živih celic, so potrebe po minimalnem dnevnem terapevtskem odmerku pokrite z zaužitjem 100 g oz. ml izdelka, ki vsebuje  $10^6$ - $10^7$  KE/g oz. ml (Gomes in Malcata, 1999; Shah, 2000; Mohammadi in sod., 2012).

## 2.7 METODE SELEKCIJE IN IDENTIFIKACIJE BAKTERIJ RODU *Bifidobacterium*

Poznamo različne kultivacijske, molekularne in kemijske metode, ki nam omogočajo selektivno ločevanje in identifikacijo bakterij. Izbira metode je odvisna od vrste mikroorganizma in izdelka, ki ga analiziramo. Po navadi se uporablja kombinacija več metod.

### 2.7.1 Klasične metode kultivacije

Klasične metode selekcije in identifikacije bakterij vključujejo osamitev in gojenje bakterij na ustreznih selektivnih gojiščih ter njihovo končno identifikacijo, ki temelji na ugotavljanju biokemijskih oziroma fenotipskih lastnosti bakterij.

Razlikovanje med bifidobakterijami in laktobacili, ki jih kot probiotike najpogosteje najdemo v probiotičnih izdelkih, je pogosto težko, saj imajo predstavniki obeh rodov podobne kultivabilne in biokemijske lastnosti. Za ločevanje bifidobakterij od laktobacilov, kakor tudi ostalih MKB, so bila razvita različna gojišča, ki vsebujejo različne selektivne dejavnike. Tako na primer selektivno rast predstavnikov rodu *Bifidobacterium* na gojišču najpogosteje dosežemo z dodatkom antibiotikov ali rahlim znižanjem vrednosti pH oz. kombinacijo obeh (Thitaram in sod., 2005).

Odpornosti bifidobakterij proti antibiotiku mupirocinu je mogoče s pridom uporabiti za razlikovanje predstavnikov rodu *Bifidobacterium* od predstavnikov rodu *Lactobacillus*. Mupirocin je antibiotik, ki zavira rast mnogih laktobacilov, enterokokov in streptokokov. Znano je, da koncentracije, ki zadostujejo za zaviranje rasti omenjenih bakterij, ne zavirajo rasti bifidobakterij (Thitaram in sod., 2005; Simpson in sod., 2004).

## 2.7.2 Metodi PCR in RAPD

Ker so klasične metode kultivacije za identifikacijo mikroorganizmov velikokrat zamudne in zahtevne, se vedno pogosteje poslužujemo hitrejših in natančnejših metod. Ena takih je molekularno-biološka metoda verižne reakcije s polimerazo (PCR), ki temelji na preiskavi DNA in se uporablja tudi za ugotavljanje prisotnosti mikroorganizmov v živilih in drugih vzorcih (Jeršek, 2009).

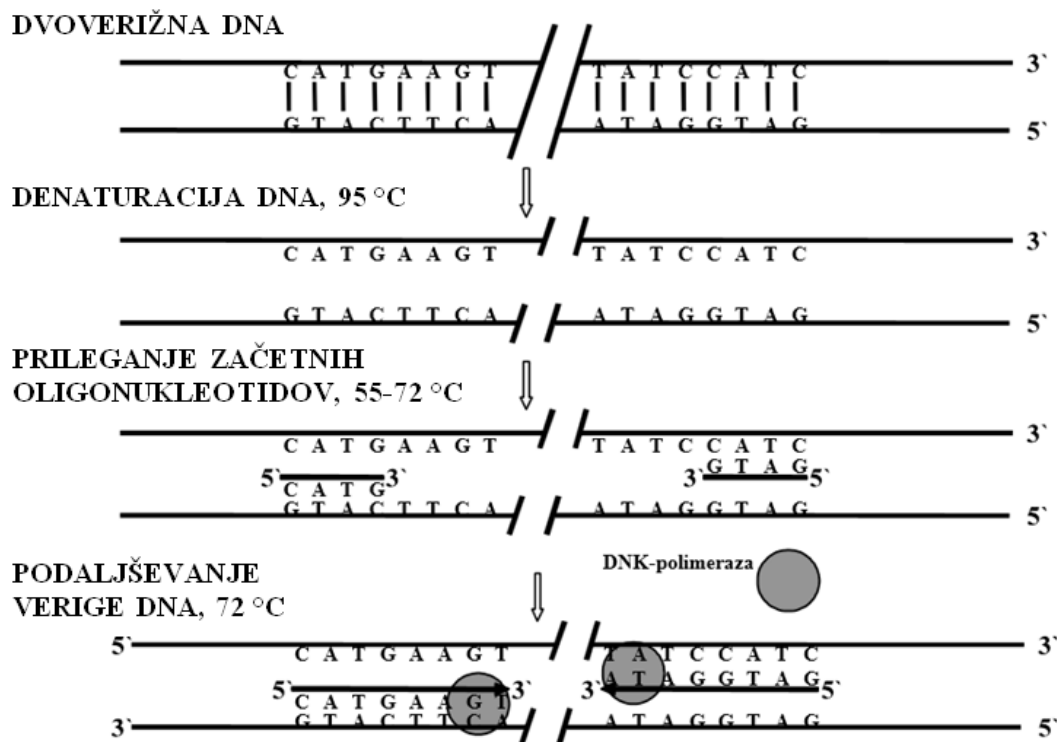
### 2.7.2.1 Metoda PCR

Princip reakcije PCR je *in vitro* pomnoževanje dela tarčne DNA s termostabilno DNA-polimerazo v cikličnem termostatu. Stopnje, ki so vključene v preiskavo vzorca s PCR, so priprava DNA, priprava in izvedba PCR ter analiza pomnožkov (Jeršek, 2009).

PCR izvajamo v ciklih, vsak cikel pa sestavljajo tri stopnje. Poseben ciklični termostat (angl. PCR cycler) pa zagotavlja zvezno spreminjanje temperature.

1. prva stopnja je denaturacija, pri kateri dvoverižno DNA razklenemo v dve enoverižni verigi s povišanjem temperature na 95 °C,
2. sledi prileganje specifičnih 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,
3. temu sledi podaljševanje molekule DNA s pomočjo termostabilnega encima DNA-polimeraza, osamljenega iz termofilnih bakterij vrste *Thermus aquaticus*. Encim sintetizira novo verigo, tako nastane dvoverižna DNA. Optimalna temperatura delovanja encima je 72 °C, vendar pa svojo aktivnost ohrani tudi pri višjih temperaturah, ki so potrebne za denaturacijo dvoverižne DNA (Jeršek, 2009; Boyer, 2005).

Vsaka na novo sintetizirana veriga DNA lahko služi kot matrica, tako da koncentracija tarčne DNA narašča eksponentno. V postopku z 20 cikli se fragment DNA pomnoži okrog milijonkrat (Boyer, 2005).



Slika 3: Verižna reakcija s polimerazo (Jeršek, 2009: 27)

#### 2.7.2.2 Metoda RAPD PCR

Tehnika naključno pomnožene polimorfne DNA (randomly amplified polymorphic DNA), ki je bila razvita leta 1990, se je izkazala za zelo učinkovito pri ugotavljanju genetske raznolikosti med zelo sorodnimi taksoni (Vincent in sod., 1998).

Osnova tehnike RAPD je verižna reakcija s polimerazo, v katero sta vključena genomska DNA, ki služi kot matrica in začetni oligonukleotid z naključnim nukleotidnim zaporedjem, ki pomnožuje večje število različno dolgih odsekov tarčne DNA. Dolžina začetnih oligonukleotidov, ki se uporabljajo v analizi RAPD, je najpogostejše 10 nukleotidov. Za uspešno izvedbo reakcije RAPD je zaželeno, da so komplementarna mesta DNA, na katera se veže začetni oligonukleotid, dovolj blizu, saj se le v tem primeru odsek DNA med obema mestoma prileganja začetnega oligonukleotida podvoji. Pomnožene dele genoma analiziramo z gelsko elektroforezo, kjer s primerjanjem števila in velikosti pomnožkov ovrednotimo sorodnost izolatov. Glavna prednost metode je možnost razlikovanja sevov iste vrste, med pomanjkljivostmi pa prednjačita slaba ponovljivost in težja interpretacija rezultatov (Vincent in sod., 1998).

### 2.8 OBČUTLJIVOST BAKTERIJSKIH IZOLATOV ZA ANTIBIOTIKE

Naraščanje števila bakterijskih izolatov, odpornih proti antibiotikom, je problem svetovne razsežnosti, k čemur so prispevali predvsem nekontrolirana in prevelika uporaba široko spektralnih antibiotikov, neupoštevanje predpisanega odmerka in časa jemanja, pomanjkljivo spremljanje gibanja odpornosti med bakterijami, pomanjkljiva bolnišnična higiena, naraščanje števila bolnikov z oslabljenim imunskim odzivom in starostnikov, neupoštevanje principov sistema HACCP pri proizvodnji živil živalskega izvora ter uporaba antibiotikov pri živalih v

preventivne namene in kot biostimulatorjev za pospeševanje rasti (EFSA, 2008; Berce in sod., 2004).

V ZDA in nekaterih drugih razvitih državah sveta je uporaba antibiotikov kot dodatkov krmi za pospeševanje rasti pri prireji živali zelo razširjena, zato predstavlja enega glavnih razlogov za povečano število odpornih bakterij. Uporaba antibiotikov pri živalih, ki vstopajo v prehransko verigo, je privedla do selekcije odpornih sevov pri bakterijah, ki povzročajo zoonoze. V Evropski uniji so zaradi strahu pred akumulacijo antibiotikov v mleku in mesu ter morebitnega prenosa antibiotičnih rezistenc na človeka s 1. januarjem 2006 prepovedali uporabo antibiotikov kot pospeševalcev rasti v živinoreji. V večini držav izven EU podobne zakonodaje še niso sprejeli (Evropska komisija, 2011; Berce in sod., 2004).

Občutljivost bifidobakterij za antibiotike najpogosteje ugotavljamo z metodo mikrodilucije ali z metodo difuzije z uporabo E-testov oz. diskov, ovrednotimo pa jo s podajanjem minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) antibiotika oziroma, v primeru uporabe diskov, z merjenjem premera območja inhibicije. MIK je najmanjša koncentracija posameznega antibiotika, ki ima baktericiden učinek na preiskovano bakterijo in jo podajamo v  $\mu\text{g/ml}$ . Manjša kot je vrednost MIK, bolj občutljiva je bakterija za testirani antibiotik (Jorgensen in Ferraro, 2009).

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 POTEK RAZISKAVE

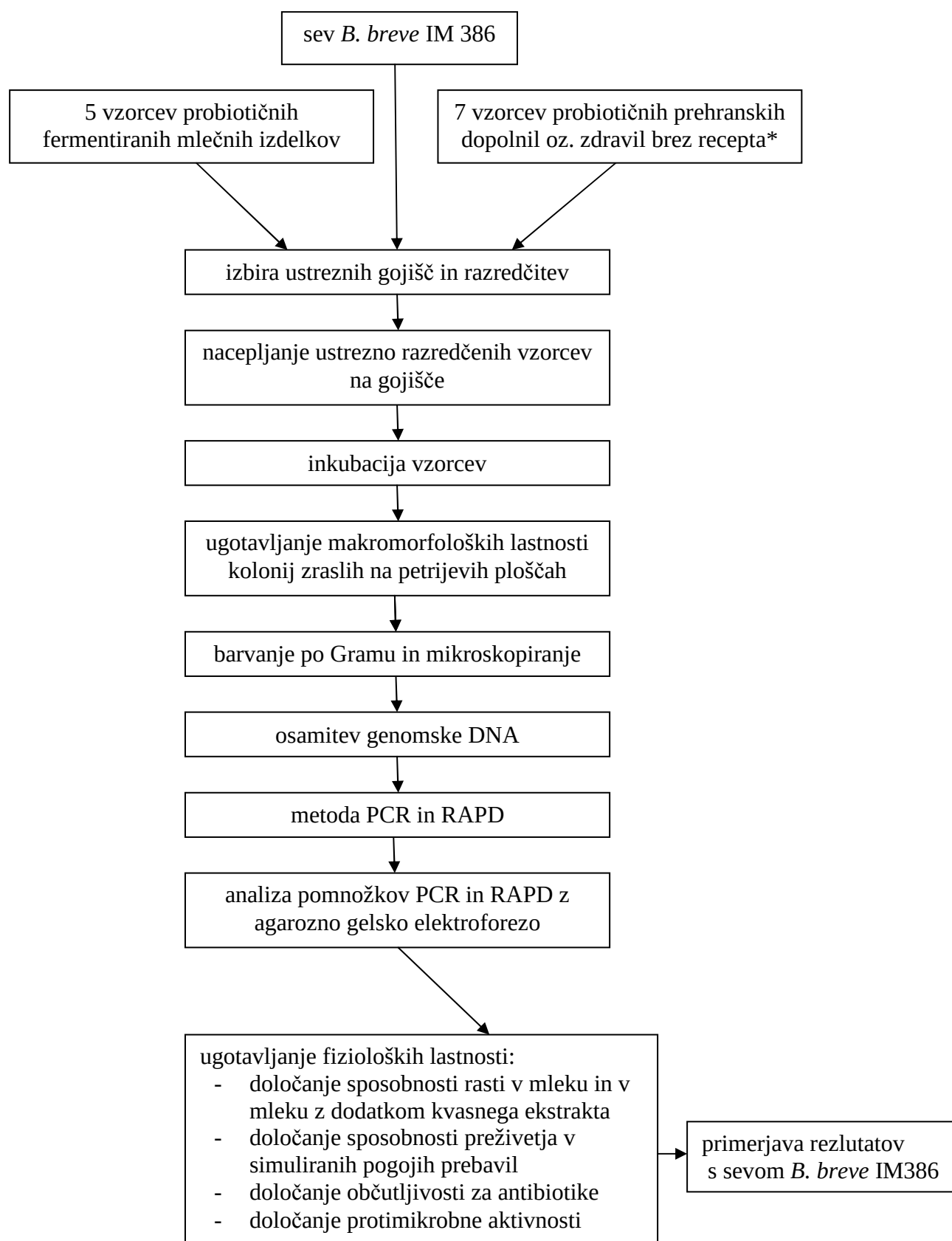
V diplomski nalogi smo opisali nekatere fiziološke lastnosti seva *Bifidobacterium breve* IM 386 in jih ovrednotili s primerjavo s fiziološkimi lastnostmi sevov bifidobakterij, ki jih najdemo v komercialnih probiotičnih pripravkih. Preverjali smo lastnosti, kot so rast v mleku in v mleku ob dodatku kvasnega ekstrakta, sposobnost preživetja v simuliranih razmerah prebavnega trakta, protimikrobna aktivnost in občutljivost za antibiotike.

Prvotno smo v nalogi želeli primerjati fiziološke lastnosti seva *B. breve* IM 386 z lastnostmi sevov bifidobakterij, osamljenih iz fermentiranih probiotičnih mlečnih izdelkov. Zato smo izbrali pet različnih fermentiranih probiotičnih mlečnih izdelkov, katerih deklaracije so obljubljale vsebnost različnih vrst iz rodu *Bifidobacterium*. Po osamitvi in identifikaciji se je izkazalo, da je, kljub različnemu poimenovanju vrst na deklaraciji, v vseh izdelkih prisotna ista vrsta bifidobakterij. V izogib morebitnim nepravilnostim smo poskus ponovili, vendar smo tudi v drugo prišli do enakih rezultatov. Rezultati so nakazali nepopolno in nepravilno poimenovanje probiotičnih bakterij, pogosto je bil naveden le bakterijski rod, ne pa tudi vrsta, ali pa zgolj tržno/komercialno ime bakterije. Ker pa smo želeli fiziološke lastnosti seva *B. breve* IM 386 primerjati s fiziološkimi lastnostmi različnih vrst bifidobakterij, smo vključili v izbor tudi probiotična prehranska dopolnila in zdravila z deklariranimi različnimi vrstami bifidobakterij.

V ta namen smo izbrali šest različnih komercialnih probiotičnih prehranskih dopolnil in eno probiotično zdravilo, ki so vsebovala različne vrste iz rodu *Bifidobacterium*. S pomočjo selektivnih gojišč smo osamili bifidobakterije, z nadaljnjim precepljanjem prečistili osamljene kolonije in potrdili njihovo vrstno pripadnost z PCR.

Pri sevih, osamljenih iz probiotičnih izdelkov, ter pri sevu *B. breve* IM 386 smo ugotavljali nekatere fiziološke lastnosti, ki smo jih ovrednotili z medsebojno primerjavo. Poskus smo izvedli v času od februarja do septembra 2011.





Slika 4: Shema poteka dela diplomske naloge.

\*vključno z izdelkom Linex®, ki je v Sloveniji registriran kot probiotično zdravilo brez recepta.

## 3.2 MATERIAL

### 3.2.1 Bakterijski sevi

#### 3.2.1.1 Probiotični fermentirani mlečni izdelki

Probiotične fermentirane mlečne izdelke smo kupili v različnih živilskih trgovinah v okolici Domžal in jih do analize hranili pri temperaturah hladilnika. Analize so bile izvedene pred iztekom roka uporabnosti.

Preglednica 4: Probiotični fermentirani mlečni izdelki, ki smo jih analizirali.

| Izdelek  | Deklarirane probiotične kulture                                                                                                              | Proizvajalec         | Rok uporabe      |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|------------------|
| Ego      | <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5<br><i>Bifidobacterium</i> Bb-12                                                                        | Ljubljanske mlekarne | 03. marec 2011   |
| ProNutri | Nu-trish™:<br><i>Lactobacillus acidophilus</i><br><i>Bifidobacterium bifidum</i>                                                             | Pomurske mlekarne    | 07. marec 2011   |
| SenSia   | <i>Bifidus naturalis</i>                                                                                                                     | Dukat                | 28. februar 2011 |
| Milfina  | <i>Lactobacillus casei</i><br><i>Bifidobacterium longum</i>                                                                                  | ni naveden           | 16. marec 2011   |
| Activia  | Actiregularis:<br><i>Lactobacillus bulgaricus</i><br><i>Streptococcus thermophilus</i><br><i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i> | Danone               | 04. marec 2011   |

#### 3.2.1.2 Probiotična prehranska dopolnila in probiotično zdravilo brez recepta

Probiotična prehranska dopolnila in zdravilo smo kupili v lekarnah v okolici Domžal ter jih do začetka analize hranili pri sobni temperaturi. Analize so bile izvedene pred iztekom roka uporabnosti.

Preglednica 5: Probiotična prehranska dopolnila in probiotično zdravilo, ki smo jih analizirali.

| Izdelek     | Oblika  | Deklarirane probiotične bifidobakterije                                                          | Proizvajalec     | Rok uporabe    |
|-------------|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|----------------|
| Waya IT     | prašek  | <i>Bifidobacterium bifidum</i><br><i>Bifidobacterium lactis</i><br><i>Bifidobacterium longum</i> | Medis            | januar 2012    |
| Linex®*     | kapsule | <i>Bifidobacterium infantis</i>                                                                  | Lek              | januar 2012    |
| Linbi       | prašek  | <i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i> Bb-12                                         | Lek              | september 2012 |
| Yogermina   | napitek | <i>Bifidobacterium lactis</i>                                                                    | Dietetics Pharma | november 2011  |
| Yogermina   | kapsule | <i>Bifidobacterium lactis</i>                                                                    | Dietetics Pharma | april 2012     |
| Bion3       | tablete | <i>Bifidobacterium bifidum</i><br><i>Bifidobacterium longum</i>                                  | Merck            | januar 2012    |
| Lacto Seven | tablete | <i>Bifidobacterium longum</i>                                                                    | Vitobolous       | februar 2012   |
| Probiolex   | kapsule | <i>Bifidobacterium bifidum</i>                                                                   | Galex            | maj 2011       |
| Probiolex   | kapsule | <i>Bifidobacterium bifidum</i>                                                                   | Galex            | marec 2012     |

\* Linex® je v Sloveniji registriran kot probiotično zdravilo brez recepta.

### 3.2.1.3 *Bifidobacterium breve* IM 386

V diplomski nalogi smo ugotavljali in primerjali fiziološke lastnosti seva *B. breve* IM 386 iz zbirke Inštituta za mlekarstvo in probiotike s fiziološkimi lastnostmi sevov bifidobakterij, osamljenih iz prehranskih dopolnil ali zdravil. *B. breve* IM 386 je bil shranjen v zmrznjeni obliki pri -80 °C. Sev je zanimiv predvsem zato, ker je humani izolat, osamljen tako iz materinega mleka kot iz blata dojenčka. Katarina Krajnik v svojem diplomskem delu opisuje, da je prevladujoči sev bifidobakterij tako v vzorcih humanega mleka in blata dojenčkov pripadal vrsti *B. breve* (Krajnik, 2009). Navaja tudi, da je večina izolatov bifidobakterij iz mleka doječe matere in iz blata dojenčka imelo enak profil RAPD, kar kaže na to, da gre za isti sev, ki ga je dojenček pridobil od matere preko dojenja. Iz teh lastnosti lahko sklepamo, da gre za varen sev, ki ima dobre sposobnosti preživetja prehoda skozi prebavni trakt in kot tak predstavlja velik potencial za uporabo v probiotičnih izdelkih.

### 3.2.1.4 Indikatorske bakterije

Pri ugotavljanju protimikrobne aktivnosti bifidobakterij smo izbrane indikatorske mikroorganizme, hranjene pri -20 °C, najprej revitalizirali s precepljanjem v ustrezna tekoča gojišča in jih inkubirali pri ustreznih razmerah. Izbrane indikatorske bakterije in njihovi pogoji kultivacije so prikazani v preglednici 6.

Preglednica 6: Nabor izbranih indikatorskih bakterij in razmere kultivacije.

| Indikatorske bakterije                             | Gojišče | T inkubacije / °C | Odnos do kisika |
|----------------------------------------------------|---------|-------------------|-----------------|
| <i>Cl. perfringens</i> 1b 1106 IM 73               | RCM     | 37                | anaeroben       |
| <i>Cl. tyrobutyricum</i> DSM 2637                  | RCM     | 37                | anaeroben       |
| <i>Lb. sakei</i> NCDO 2714                         | MRS     | 30                | aeroben         |
| <i>Lb. johnsonii</i> Lj. 1, NCC 533                | MRS     | 42                | aeroben         |
| <i>Lb. bulgaricus</i> (LDSB) LMG 6901 <sup>T</sup> | MRS     | 42                | aeroben         |
| <i>Lb. paracasei</i> DSM 5622                      | MRS     | 37                | aeroben         |
| <i>Lb. plantarum</i> IM 212                        | MRS     | 37                | aeroben         |
| <i>Lb. fermentum</i> IM 351                        | MRS     | 37                | aeroben         |
| <i>Lb. delbrueckii</i> (LDSL) IM 350               | MRS     | 42                | aeroben         |
| <i>Lb. helveticus</i> IM 30                        | MRS     | 42                | aeroben         |
| <i>Lb. rhamnosus</i> IM 239                        | MRS     | 37                | aeroben         |
| <i>B. cereus</i> IM 250                            | BHI     | 30                | aeroben         |
| <i>E. coli</i> IM 120                              | BHI     | 37                | aeroben         |
| <i>Ent. faecalis</i> LMG 7937                      | M17     | 37                | aeroben         |
| <i>Ent. faecalis</i> CCM 4647                      | M17     | 37                | aeroben         |
| <i>Ent. durans</i> CCM 5612                        | M17     | 37                | aeroben         |
| <i>Ent. faecium</i> IM 273                         | M17     | 37                | aeroben         |
| <i>L. monocytogenes</i> IM 372                     | BHI     | 37                | aeroben         |
| <i>L. innocua</i> IM 373                           | BHI     | 37                | aeroben         |
| <i>Staph. aureus</i> IM 388                        | BHI     | 37                | aeroben         |
| <i>Staph. aureus</i> IM 389                        | BHI     | 37                | aeroben         |
| <i>Staph. aureus</i> IM 390                        | BHI     | 37                | aeroben         |

Legenda: IM - zbirka mikroorganizmov Inštituta za mlekarstvo in probiotike, Biotehniška Fakulteta, Domžale, Slovenija; DSM – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany; NCDO (NCFO) – National Collection of Dairy Organisms, Reading, England; NCC – Nestlé Culture Collection,

Lausanne, Switzerland; LMG – Universiteit Gent, Laboratorium voor Mikrobiologie, Gent, Belgium; CCM - Czech Collection of Microorganisms, Masaryk University, Brno, Czech Republic

### 3.2.2 Gojišča

#### 3.2.2.1 Trdna gojišča

##### **TOS z mupirocinom (TOS+mup)**

Pripravili smo ga po navodilih proizvajalca (Yakult, Tokio, Japonska) tako, da smo zatehtali 62,5 g dehidriranega gojišča TOS v 1 l demineralizirane vode. Gojišče smo avtoklavirali pri 115 °C, 15 minut. Pred uporabo smo v 200 ml raztopljenega in primerno temperiranega gojišča (45 °C ± 2 °C) dodali 1 ml založne raztopine mupirocina, tako da je bila končna koncentracija antibiotika v gojišču 0,05 mg/ml. Tako pripravljeno gojišče smo uporabili za selektivno rast bifidobakterij.

Založno raztopino mupirocina (10 mg/ml) smo pripravili tako, da smo 50,0 mg mupirocina (AppliChem, Darmstadt, Nemčija) dodali 2,0 ml 96 % etanola, dobro premešali in dodali še 3,0 ml sterilne destilirane vode. Tako pripravljeno založno raztopino antibiotika smo takoj uporabili ali pa do uporabe hranili pri -20 °C.

##### **MRS s cisteinom (MRS+cys)**

Za pripravo trdnega gojišča MRS s cisteinom smo zatehtali 68,2 g dehidriranega gojišča MRS (Merck, Darmstadt, Nemčija), dodali 1 l demineralizirane vode ter dodali cistein (Merck) do delovne koncentracije 0,05 %. Gojišče smo avtoklavirali pri 118 °C, 15 minut. Uporabili smo ga za namnoževanje bifidobakterij.

##### **Sestavljeno gojišče iz gojišč MH (90 %, Mueller Hinton) in MRS (10 %)**

Za pripravo tega gojišča smo zatehtali 5,2 g dehidriranega gojišča MRS (Merck) in 18,9 g MH (Merck) v 1 l demineralizirane vode. Pred avtoklaviranjem smo gojišču uravnali vrednosti pH na 6,7 in dodali še 13 g agar-agarja (Merck). Gojišče smo uporabili kot nosilno gojišče pri ugotavljanju občutljivosti bifidobakterij za antibiotike.

#### 3.2.2.2 Tekoča gojišča

##### **BHI (Brain heart Infusion)**

Za pripravo tekočega gojišča BHI smo zatehtali 37 g dehidriranega gojišča BHI (Merck) v 1 l demineralizirane vode. Gojišče smo razdelili po 10 ml v epruvete in avtoklavirali pri 121 °C, 15 minut.

##### **M17**

Za pripravo tekočega gojišča M17 smo po navodilih proizvajalca zatehtali 42,5 g dehidriranega gojišča M17 (Merck) v 1 l demineralizirane vode. Gojišče smo razdelili po 10 ml v epruvete in dali avtoklavirat pri 121 °C, 15 minut.

##### **RCM (Reinforced Clostridial medium)**

Za pripravo tekočega gojišča RCM smo po navodilih proizvajalca zatehtali 38 g dehidriranega gojišča RCM (Merck) v 1 l demineralizirane vode. Gojišče smo razdelili po 10 ml v epruvete in avtoklavirali pri 121 °C, 15 minut.

**MRS s cisteinom (MRS+cys)**

Za pripravo tekočega gojišča MRS s cisteinom smo zatehtali 52,2 g dehidriranega gojišča MRS (Merck) v 1 l demineralizirane vode in dodali cistein (Merck) v koncentraciji 0,05 %. Gojišče smo razdelili po 10 ml v epruvete in avtoklavirali pri 118 °C, 15 minut.

Tekoča gojišča smo uporabili za gojenje indikatorskih mikroorganizmov.

**Rekonstituirano posneto mleko (RPM)**

Pripravili smo 10 % (w/v) rekonstituirano posneto mleko, ki smo ga dobili tako, da smo raztopili 100 g posnetega mleka v prahu (Merck) v 1 l demineralizirane vode. Rekonstituirano posneto mleko smo avtoklavirali 15 minut pri 110 °C.

**Rekonstituirano posneto mleko s kvasnim ekstraktom (RPM+ke)**

Pripravili smo 10 % (w/v) rekonstituirano posneto mleko, ki smo ga dobili tako, da smo raztopili 100 g posnetega mleka v prahu (Merck) v 1 l demineralizirane vode ter dodali 0,1 % kvasni ekstrakt (Biolife, Milano, Italija). Rekonstituirano posneto mleko s kvasnim ekstraktom smo avtoklavirali 15 minut pri 110 °C.

**3.2.2.3 Poltrdna gojišča****MRS**

Poltrdno gojišče MRS smo pripravili tako, da smo 1 l pripravljenega tekočega gojišča MRS (Merck) dodali 7,5 g agar-agarja (Merck) in avtoklavirali 15 minut pri 118 °C.

**BHI (Brain Heart Infusion)**

Poltrdno gojišče BHI smo pripravili tako, da smo 1 l pripravljenega tekočega gojišča BHI (Merck) dodali 7,5 g agar-agarja (Merck) in avtoklavirali 15 minut pri 121 °C.

**M17**

Poltrdno gojišče M17 smo pripravili tako, da smo 1 l pripravljenega tekočega gojišča M17 (Merck) dodali 7,5 g agar-agarja (Merck) in avtoklavirali 15 minut pri 121 °C.

**RCM (Reinforced Clostridial medium)**

Poltrdno gojišče RCM smo pripravili tako, da smo 1 l pripravljenega tekočega gojišča RCM (Merck) dodali 7,5 g agar-agarja (Merck) in avtoklavirali 15 minut pri 121 °C.

Ustrezna poltrdna gojišča smo cepili z indikatorskimi bakterijami pri ugotavljanju protimikrobne aktivnosti bifidobakterij.

**3.2.2.4 Simulirani prebavni sokovi**

Za ugotavljanje preživelosti bifidobakterij v simuliranih razmerah prebavnega trakta smo pripravili simulirane prebavne sokove, kot so opisali Fernández in sod. (2003).

**Simuliran želodčni sok (ŽS)**

V demineralizirani vodi smo raztopili 7,3 g/l NaCl (Merck), 0,5 g/l KCl (Merck) in 3,8 g/l NaHCO<sub>3</sub> (Kemika, Zagreb, Hrvaška). Raztopino smo porazdelili v tri stekleničke in jim naravnali vrednosti pH na 2, 3 oz. 7. Stekleničke smo nato avtoklavirali 15 minut pri 121 °C. Tik pred začetkom analize smo dodali še 3 g/l pepsina (SigmaChemical, St. Loius, ZDA).

**Simuliran črevesni sok (ČS)**

Demineralizirani vodi smo najprej umerili vrednost pH na 8 in avtoklavirali 15 minut pri 121 °C. Tik pred začetkom analize smo dodali še 0,1 % pankreatina in 0,3 % žolčnih soli No. 3 (Biolife).

**3.2.2.5 Raztopina za razredčevanje****Peptonska voda**

Za pripravo peptonske vode smo v 1 l demineralizirane vode dodali 2 Ringerjevi tableti (Merck), 0,1 % peptona (Biolife) in 0,05 % cisteina (Merck). Raztopino smo razdelili po 9 ml v epruvete in avtoklavirali pri 121 °C, 15 minut. Raztopino smo uporabljali za razredčevanje po Koch-u.

**3.2.3 Reagenti za barvanje po Gramu**

Bakterijske preparate smo barvali po Gramu s pomočjo kompleta Color Gram 2 po navodilih proizvajalca (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija). Set vsebuje barvilo kristal violet, barvilo lugol, mešanico acetona in etanola (1:1) ter barvilo safranin. Pred mikroskopiranjem smo preparatu na objektnem stekelcu dodali imerzijsko olje.

**3.2.4 Reagenti in encimi za osamitev DNA**

DNA smo osamili s pomočjo komercialnega kompleta DNA Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, ZDA), ki vsebuje naslednje reagente:

- raztopina za lizo celic (Cell Lysis Solution),
- raztopina za lizo celičnega jedra (Nuclei Lysis Solution),
- raztopina za obarjanje proteinov (Protein Precipitation Solution),
- rehidracijska raztopina (DNA Rehydration Solution),
- raztopina RNA-aze (RNase Solution).

Material, ki je potreben za osamitev DNA:

- 1,5 ml mikrocentrifugirke,
- vodna kopel, umerjena na 80 °C,
- vodna kopel, umerjena na 37 °C,
- 50 mM EDTA, pH=8,0 (Sigma Chemical),
- 10 mg/ml lizocim (Sigma Chemical),
- 10 mg/ml mutanolizin (Sigma Chemical),
- 70 % etanol, sobna temperatura (Merck),
- izopropanol, sobna temperatura (Merck).

**3.2.5 Reagenti za RAPD in PCR**

Reakcijsko mešanico smo pripravili s pomočjo kompleta PCR GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega), pri čemer smo uporabili naslednje kemikalije:

- mešanica dNTP, vsak v koncentraciji 10 mM (Fermentas, Vilna, Litva),
- GoTaq® Flexi pufer za polimerazo brez MgCl<sub>2</sub>,
- GoTaq® Flexi pufer za polimerazo z MgCl<sub>2</sub> (5x),
- 25 mM MgCl<sub>2</sub>,

- GoTaq® Flexi DNA polimeraza,
- začetni oligonukleotidi (Invitrogen, Molecular probes, Oregon, ZDA),
- deionizirana, mikrofiltrirana in sterilizirana voda.



Slika 5: Reagenti za PCR in RAPD.

V preglednicah 7, 8 in 9 so prikazani začetni oligonukleotidi, ki smo jih uporabili v reakcijah PCR oz. RAPD.

Preglednica 7: Začetni oligonukleotidi specifični za rod *Bifidobacterium*.

| Tarčni rod             | Oznaka začetnega oligonukleotida | Nukleotidno zaporedje (5-3') | Velikost pomnožka (bp) | Vir                     |
|------------------------|----------------------------------|------------------------------|------------------------|-------------------------|
| <i>Bifidobacterium</i> | Bif164-f                         | GGGTGGTAATGCCGGATG           | 520                    | Satokari in sod. (2001) |
|                        | Bif662-r                         | CCACCGTTACACCGGGAA           |                        |                         |

Preglednica 8: Začetni oligonukleotidi specifični za izbrane vrste rodu *Bifidobacterium*.

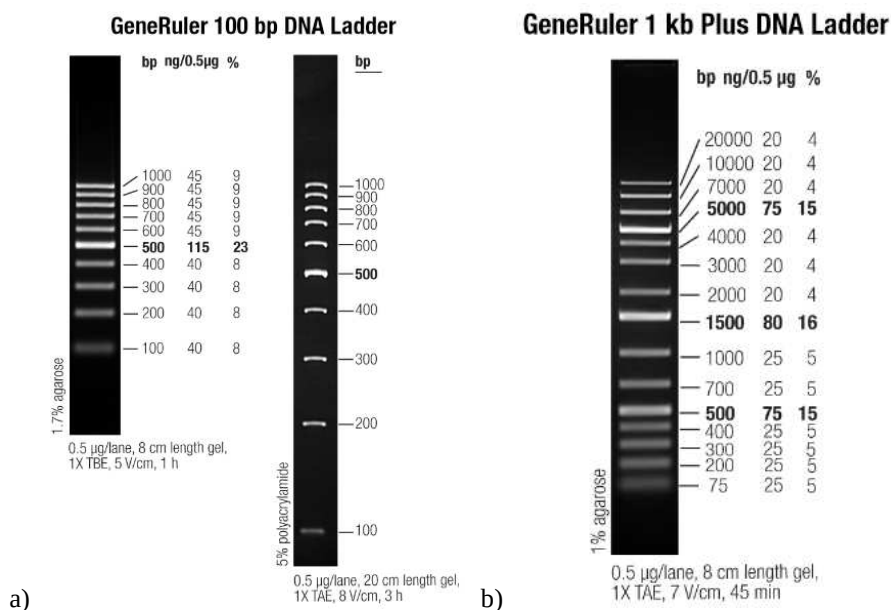
| Tarčna vrsta bakterij                 | Oznaka začetnega oligonukleotida | Nukleotidno zaporedje (5-3') | Velikost pomnožka (bp) | Vir                    |
|---------------------------------------|----------------------------------|------------------------------|------------------------|------------------------|
| <i>Bifidobacterium bifidum</i>        | BiBIF-1                          | CCACATGATCGCATGTGATTG        | 278                    | Matsuki in sod. (1999) |
|                                       | BiBIF-2                          | CCGAAGGCTTGCTCCCAA           |                        |                        |
| <i>Bifidobacterium infantis</i>       | BiINF-1                          | TTCCAGTTGATCGCATGGTC         | 828                    | Matsuki in sod. (1999) |
|                                       | BiINF-2                          | GGAAACCCCATCTCTGGGAT         |                        |                        |
| <i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> | Bflact2                          | GTGGAGACACGTTTCCC            | 680                    | Ventura in sod. (2001) |
|                                       | Bflact5                          | CACACCACACAATCCAATAC         |                        |                        |
| <i>Bifidobacterium longum</i>         | BiLON-1                          | TTCCAGTTGATCGCATGGTC         | 831                    | Matsuki in sod. (1999) |
|                                       | BiLON-2                          | GGGAAGCCGTATCTCTACGA         |                        |                        |

Preglednica 9: Začetni oligonukleotidi za RAPD.

| Oznaka začetnega oligonukleotida | Nukleotidno zaporedje (5-3') | Vir                                  |
|----------------------------------|------------------------------|--------------------------------------|
| KGT-70GC                         | AGCGGGCGTA                   | Inštitut za mlekarstvo in probiotike |
| 1254                             | CCGCAGCCAA                   | Torriani in sod. (1999)              |

### 3.2.6 Reagenti za analizo pomnožkov v agaroznem gelu

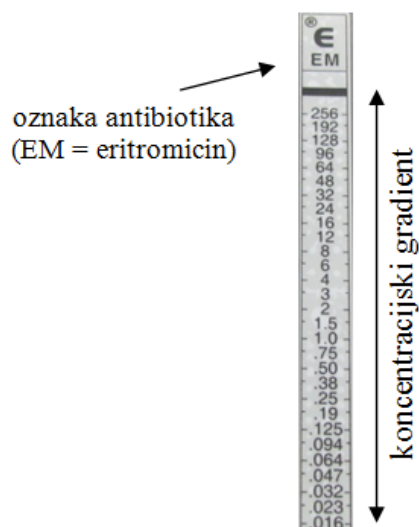
- Agarosa: SeaKem® LE Agarose (Lonza, Rockland, ZDA),
- 0,5-kratni pufer TAE (tris acetatni pufer), pH=8,0,
- molekulska označevalca velikosti: GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder in 1 kb DNA Ladder (Fermentas),
- DNA barvilo: SYBR Safe™ DNA Gel Stain (Invitrogen).



Slika 6: Uporabljeni molekulska označevalca velikosti DNA. Molekulski označevalec GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (a) in molekulska označevalec GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (b) (Thermo Scientific, 2012).

### 3.2.7 Antibiotiki

Občutljivost bifidobakterij za antibiotike smo ugotavljali s pomočjo E-test-ov (BioMérieux), ki so predstavljeni v preglednici 10. E-test-i so trakovi, ki so gradientno prepojeni s posameznim antibiotikom (Slika 7).



Slika 7: E-test: umerjena lestvica vrednosti koncentracij antibiotika v µg/ml.



Preglednica 10: Antibiotiki (BioMérieux) in razpon njihove koncentracije, ki smo jih uporabili pri ugotavljanju občutljivosti bifidobakterij.

| Antibiotik        | Razpon koncentracij (µg/ml) |
|-------------------|-----------------------------|
| ampicilin (AM)    | 0,016–256                   |
| eritromicin (EM)  | 0,016–256                   |
| gentamicin (GM)   | 0,64–1024                   |
| klindomicin (CM)  | 0,016–256                   |
| streptomicin (SM) | 0,64–1024                   |
| tetraciklin (TC)  | 0,016–256                   |
| vankomicin (VA)   | 0,016–256                   |

### 3.3 LABORATORIJSKA OPREMA

- Laboratorijski pribor: halja, rokavice, petrijeve plošče, steklovina, cepilne zanke, hokejke, avtomatske pipete, pincete, stojala, plinski gorilnik, nastavki, mikrocentrifugirke, anaerobne škatle, generatorji anaerobnih razmer...,
- tehnica,
- avtoklav (A-21 CA, Kambič, Slovenija),
- inkubator (BT150, Krotker Marjan, Slovenija),
- brezprašna komora - laminarij (Iskra PIO, Slovenija),
- vrtnični mešalnik (Vibromix Železniki, Slovenija),
- elektronski števec (EŠKO 7L, LABO, Ljubljana, Slovenija),
- mikrovalovna pečica (Bosch, Nemčija),
- vodna kopel (WB-30, Kambič, Semič, Slovenija),
- komora za pripravo mešanic PCR (UV Sterilizing cabinets and workstation UVP),
- centrifuga (Hettich mikro 22R, Nemčija),
- svetlobni mikroskop (Reichert, Avstrija),
- ciklični termostat (Mastercycler gradient, Eppendorf, Nemčija),
- pH meter (Toledo MP220, Mettler, Nemčija),
- transiluminator Chemi Genius<sup>2</sup> (Bio imaging system),
- hladilna in zmrzovalna omara.

### 3.4 METODE

#### 3.4.1 Priprava mikroorganizmov

##### 3.4.1.1 *Bifidobacterium breve* IM 386

Sev *B. breve* IM 386 smo oživili iz zamrznjene kulture (-80 °C), hranjene v mikrobnih zbirkah Inštituta za mlekarstvo in probiotike Biotehniške fakultete v Domžalah, s precepljanjem v tekoče gojišče MRS+cys.

##### 3.4.1.2 Osamitev bifidobakterij iz probiotičnih fermentiranih mlečnih izdelkov

Vzorci fermentiranih mlečnih izdelkov s probiotičnimi kulturami smo premešali in v aseptičnih razmerah prenesli 1 ml vzorca v 9 ml peptonske vode ter nadaljevali z razredčevanjem po Koch-u do ustrezne razredčitve. Za osamitev bifidobakterij smo po 0,1 ml izbranih razredčitev s tehniko razmaza cepili na predhodno pripravljeno in osušeno trdno

gojišče TOS+mup. Tako pripravljene plošče smo inkubirali v anaerobnih razmerah pri 37 °C 48 ur, ki smo jih zagotovili z uporabo sistema GenBox in generatorjev anaerobnih razmer (BioMérieux).

#### 3.4.1.3 Osamitev bifidobakterij iz probiotičnih prehranskih dopolnil in zdravil

Za osamitev bifidobakterij smo uporabili po 1 ml oziroma po 0,5-1 g probiotičnega prehranskega dopolnila oz. zdravila. Izdelke v obliki suspenzije smo dobro premešali ter odpipetirali potrebno količino. Pri izdelkih v obliki praška oz. kapsule smo vrečke oz. kapsule s praškom ob ognju sterilno odprli in zatehtali potrebno količino. Pri izdelkih v obliki tablet smo tablete najprej strli s pomočjo terilnice in odtehtali potrebno količino. Odpipetirane oz. zatehtane količine vzorcev smo resuspendirali v taki količini peptonske vode, da smo dobili razredčitev  $10^{-1}$ . Dobljene raztopine smo dobro premešali in nadaljevali z razredčevanjem po Koch-u. Pripravo vzorcev smo izvajali v aseptičnih pogojih z uporabo sterilne opreme.

Za osamitev bifidobakterij smo uporabili selektivno gojišče TOS+mup. Po 0,1 ml ustreznih razredčitev smo s tehniko razmaza nanесли na predhodno pripravljeno in osušeno gojišče. Cepljene plošče smo inkubirali 48 ur pri 37 °C v anaerobnih razmerah, ki smo jih zagotovili z uporabo sistema GenBox in generatorjev anaerobnih razmer (BioMérieux).

Kolonije, osamljene z gojišča TOS+mup, smo prečistili s precepljanjem na gojišče MRS+cys.

#### 3.4.2 Ugotavljanje morfoloških značilnosti osamljenih bifidobakterij

Morfološke značilnosti bifidobakterij smo opisali z opazovanjem makromorfoloških in mikromorfoloških lastnosti.

Znotraj makromorfoloških lastnosti smo opazovali barvo, izgled površine, velikost in obliko robu kolonij, zraslih po prečiščevanju na gojišču MRS+cys.

Za opazovanje mikromorfoloških značilnosti smo iz izbranih kolonij pripravili preparate, kjer smo s pomočjo svetlobnega mikroskopa pri 1000-kratni povečavi opazovali obliko, velikost, formacijo in obarvanje po Gramu.

Preparat smo pripravili tako, da smo ob gorilniku na objektno stekelce v kapljico peptonske vode vmešali kolonijo, ki smo jo s trdnega gojišča prenesli s cepilno zanko. Razmaz smo posušili na zraku in ga fiksirali tako, da smo ga trikrat potegnili čez plamen gorilnika. Sledilo je barvanje po Gramu.

Princip barvanja:

1. barvanje s kristal violet, pustimo 1 minuto in speremo z vodo
2. nanos barvila lugol, pustimo 1 minuto in speremo z vodo
3. preparat razbarvamo z raztopino aceton-etanol
4. speremo z vodo
5. nanos barvila safranin, pustimo 1 minuto in speremo z vodo
6. preparat osušimo s papirnato brisačko.

### 3.4.3 Osamitev DNA

Za osamitev DNA smo uporabili naključno izbrane kolonije, ki so zrasle po nacepljanju izdelkov na gojišče TOS+mup. Kolonije smo prečistili s precepljanjem na trdno gojišče MRS+cys. Prečiščene kolonije smo po morfološkem pregledu cepili v tekoče gojišče MRS+cys ter inkubirali pri 37 °C 48 ur. Po inkubaciji smo po 1 ml namnoženih bakterijskih kultur prenesli v mikrocentrifugirke in uporabili za osamitev DNA, ki smo jo izvedli s pomočjo komercialnega kompleta Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega). Osamljeno DNA smo uporabili kot tarčno DNA v reakcijah RAPD in PCR, do uporabe pa smo jo hranili pri -20 °C.

Pri izdelkih Linex in Linbi smo DNA osamili iz petih naključno izbranih kolonij, saj so bile kolonije na gojišču zelo podobne. Pri izdelkih Yogermina, Bion3 ter Lacto Seven smo DNA osamili iz desetih kolonij, saj so se kolonije razlikovale po velikosti. Pri vseh treh izdelkih smo naključno izbrali po pet manjših in pet večjih kolonij. Pri izdelku Waya IT pa smo DNA osamili iz 17 kolonij, pri čemer smo naključno izbrali sedem majhnih, pet srednje velikih ter pet velikih kolonij.

### 3.4.4 Priprava reakcijskih mešanic za RAPD in PCR

Reakcijske mešanice za reakcije RAPD in PCR smo pripravili s pomočjo kompleta GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega). Reakcijsko mešanico smo pripravljali v za to namenjeni komori PCR, poleg tega smo pri delu uporabljali rokavice, da smo preprečili kontaminacijo z drugo DNA ali z nukleazami. Reagente za pripravo reakcijskih mešanic smo ves čas hranili na ledu.

#### 3.4.4.1 RAPD z začetnim oligonukleotidom KGT-70GC

Preglednica 11 prikazuje pripravo reakcijske mešanice za RAPD z začetnim oligonukleotidom KGT-70GC, ki je sestavljen iz desetih nukleotidov.

Preglednica 11: Sestava 20 µl reakcijske mešanice za RAPD z začetnim oligonukleotidom KGT-70GC.

| Količina | Sestavina                                |
|----------|------------------------------------------|
| 1,0 µl   | DNA vzorca                               |
| 11,2 µl  | mikrofiltrirana in avtoklavirana voda    |
| 4,0 µl   | zeleno obarvan GoTaq® flexi pufer (5x)   |
| 3,2 µl   | MgCl <sub>2</sub> (25 mM)                |
| 0,2 µl   | začetni oligonukleotid KGT-70GC (100 µM) |
| 0,3 µl   | dNTP (10 mM)                             |
| 0,1 µl   | GoTaq® DNA polimeraza (5 U/µl)           |

Pri proučevanju genetske raznovrstnosti bifidobakterij z metodo RAPD smo v reakcije PCR vključili tudi negativno kontrolo, ki smo jo pripravili tako, da smo v reakcijsko mešanico namesto DNA dodali mikrofiltrirano in avtoklavirano vodo.

#### 3.4.4.2 RAPD z začetnim oligonukleotidom 1254

Preglednica 12 predstavlja pripravo reakcijske mešanice za RAPD z začetnim oligonukleotidom 1254, ki je prav tako sestavljen iz desetih nukleotidov.

Preglednica 12: Sestava 20 µl reakcijske mešanice za RAPD z začetnim oligonukleotidom 1254.

| Količina | Sestavina                                          |
|----------|----------------------------------------------------|
| 1,0 µl   | DNA vzorca                                         |
| 11,94 µl | mikrofiltrirana in avtoklavirana voda              |
| 4,0 µl   | zeleno obarvan GoTaq <sup>®</sup> flexi pufer (5x) |
| 2,4 µl   | MgCl <sub>2</sub> (25 mM)                          |
| 0,16 µl  | začetni oligonukleotid 1254 (100 µM)               |
| 0,4 µl   | dNTP (10 mM)                                       |
| 0,1 µl   | GoTaq <sup>®</sup> DNA polimeraza (5 U/µl)         |

#### 3.4.4.3 PCR z začetnima oligonukleotidoma Bif164-f in Bif662-r za potrjevanje rodu *Bifidobacterium*

Preglednica 13 prikazuje sestavo reakcijske mešanice za analizo PCR z izbranimi začetnima oligonukleotidoma Bif164-f in Bif662-r.

Preglednica 13: Sestava 20 µl reakcijske mešanice za PCR z začetnima oligonukleotidoma Bif164-f in Bif662-r.

| Količina | Sestavina                                                        |
|----------|------------------------------------------------------------------|
| 1,0 µl   | DNA vzorca                                                       |
| 14,5 µl  | mikrofiltrirana in avtoklavirana voda                            |
| 4,0 µl   | zeleno obarvan GoTaq <sup>®</sup> pufer z MgCl <sub>2</sub> (5x) |
| 0,1 µl   | začetni oligonukleotid Bif164-f (100 µM)                         |
| 0,1 µl   | začetni oligonukleotid Bif662-r (100 µM)                         |
| 0,2 µl   | dNTP (10 mM)                                                     |
| 0,1 µl   | GoTaq <sup>®</sup> DNA polimeraza (5 U/µl)                       |

#### 3.4.4.4 PCR za potrjevanje različnih vrst *Bifidobacterium*

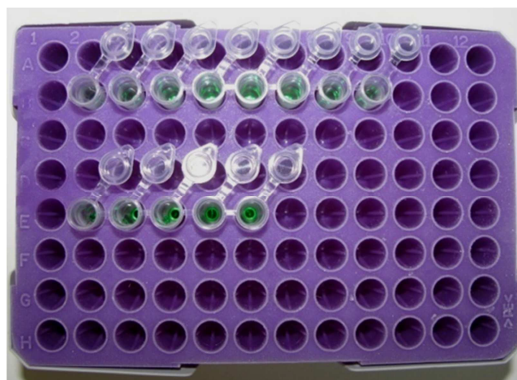
Preglednica 14 predstavlja sestavo reakcijskih mešanic za PCR za dokazovanje različnih vrst bifidobakterij. Za dokazovanje vrste smo vzeli ustrezne vrstno specifične oligonukleotidne začetnike kot je prikazano v preglednici 8, drugače pa je bila reakcijska mešanica za določanje analiziranih vrst enaka.

Preglednica 14: Sestava 20 µl reakcijske mešanice za PCR za dokazovanje različnih vrst.

| Količina | Sestavina                                                        |
|----------|------------------------------------------------------------------|
| 1,0 µl   | DNA vzorca                                                       |
| 12,7 µl  | mikrofiltrirana in avtoklavirana voda                            |
| 4,0 µl   | zeleno obarvan GoTaq <sup>®</sup> pufer z MgCl <sub>2</sub> (5x) |
| 0,1 µl   | začetni oligonukleotid 1 (5 µM)                                  |
| 0,1 µl   | začetni oligonukleotid 2 (5 µM)                                  |
| 0,2 µl   | dNTP (10 mM)                                                     |
| 0,1 µl   | GoTaq <sup>®</sup> DNA polimeraza (5 U/µl)                       |

Za potrjevanje posameznih vrst bifidobakterij smo, poleg za vrste specifičnih začetnih oligonukleotidov (Preglednica 8), v reakcije PCR vključili tudi pozitivne in negativne kontrole. Pri določanju vrste *B. bifidum* nam je kot pozitivna kontrola služila DNA osamljena iz seva *B. bifidum* IM 419, pri ugotavljanju vrste *B. infantis* DNA seva *B. infantis* IM 343, pri ugotavljanju vrste *B. animalis* ssp. *lactis* DNA sevov *B. animalis* ssp. *lactis* IM 414 in IM 417

ter pri ugotavljanju vrste *B. longum* DNA seva *B. longum* IM 275. Za negativno kontrolo pa smo v reakcijsko mešanico namesto DNA dodali mikrofiltrirano in avtoklavirano vodo.



Slika 8: Mikropruvete z reakcijsko mešanico.

Mikropruvete s pripravljeno reakcijsko mešanico smo prenesli v ciklični termostat in izbrali ustrezen program.



Slika 9: Ciklični termostat.

### 3.4.5 RAPD in PCR

Za ugotavljanje pripadnosti rodu oz. vrsti, smo DNA, osamljeno iz kolonij, ki so zrasle po nacepljanju probiotičnih izdelkov na selektivnih gojiščih, uporabili v reakciji PCR in jo pomnoževali z za rod *Bifidobacterium* oziroma posamezno vrsto specifičnimi začetnimi oligonukleotidi. S tehniko naključnega pomnoževanja polimorfne DNA pa smo v reakciji RAPD proučevali genetsko raznovrstnost (istovetnost) kolonij osamljenih bifidobakterij. V preglednici 15 so prikazane razmere posamezne reakcije PCR oz. RAPD.

Preglednica 15: Razmere reakcij PCR oz. RAPD.

| Vrsta reakcije                    | Faza                                 | Razmere      | Število ponovitev | Vir                     |
|-----------------------------------|--------------------------------------|--------------|-------------------|-------------------------|
| PCR za rod <i>Bifidobacterium</i> | začetna denaturacija DNA             | 95 °C, 3 min | 1                 | Satokari in sod. (2001) |
|                                   | denaturacija DNA                     | 95 °C, 30 s  | 30                |                         |
|                                   | prileganje začetnih oligonukleotidov | 62 °C, 30 s  |                   |                         |
|                                   | podaljševanje verige DNA             | 72 °C, 40 s  |                   |                         |
|                                   | zaključno podaljševanje verige DNA   | 72 °C, 5 min | 1                 |                         |

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 15: Razmere reakcij PCR oz. RAPD.

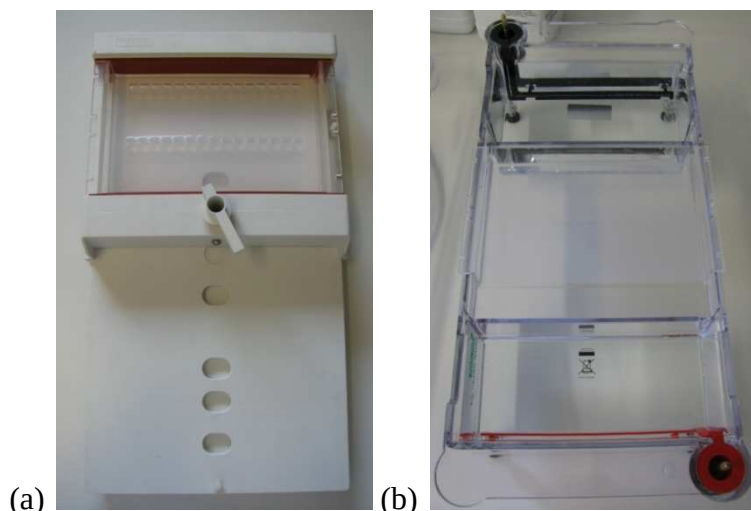
| Vrsta reakcije                                     | Faza                                 | Razmere       | Število ponovitev | Vir                                  |
|----------------------------------------------------|--------------------------------------|---------------|-------------------|--------------------------------------|
| RAPD s KGT-70GC                                    | začetna denaturacija DNA             | 95 °C, 3 min  | 1                 | Inštitut za mlekarstvo in probiotike |
|                                                    | denaturacija DNA                     | 95 °C, 1 min  | 35                |                                      |
|                                                    | prileganje začetnih oligonukleotidov | 37 °C, 2 min  |                   |                                      |
|                                                    | podaljševanje verige DNA             | 72 °C, 2 min  |                   |                                      |
|                                                    | zaključno podaljševanje verige DNA   | 72 °C, 5 min  | 1                 |                                      |
| RAPD z 1254                                        | začetna denaturacija DNA             | 95 °C, 5 min  | 4                 | Torriani in sod. (1999)              |
|                                                    | prileganje začetnih oligonukleotidov | 36 °C, 5 min  |                   |                                      |
|                                                    | podaljševanje verige DNA             | 72 °C, 5 min  |                   |                                      |
|                                                    | denaturacija DNA                     | 95 °C, 1 min  | 30                |                                      |
|                                                    | prileganje začetnih oligonukleotidov | 36 °C, 1 min  |                   |                                      |
|                                                    | podaljševanje verige DNA             | 72 °C, 2 min  |                   |                                      |
|                                                    | zaključno podaljševanje verige DNA   | 72 °C, 10 min | 1                 |                                      |
| PCR za vrsto <i>B. bifidum</i>                     | začetna denaturacija DNA             | 95 °C, 3 min  | 1                 | Matsuki in sod. (1998)               |
|                                                    | denaturacija DNA                     | 95 °C, 30 s   | 30                |                                      |
|                                                    | prileganje začetnih oligonukleotidov | 55 °C, 30 s   |                   |                                      |
|                                                    | podaljševanje verige DNA             | 72 °C, 30 s   |                   |                                      |
|                                                    | zaključno podaljševanje verige DNA   | 72 °C, 5 min  | 1                 |                                      |
| PCR za vrsto <i>B. infantis</i>                    | začetna denaturacija DNA             | 95 °C, 3 min  | 1                 | Matsuki in sod. (1999)               |
|                                                    | denaturacija DNA                     | 95 °C, 20 s   | 35                |                                      |
|                                                    | prileganje začetnih oligonukleotidov | 55 °C, 20 s   |                   |                                      |
|                                                    | podaljševanje verige DNA             | 72 °C, 30 s   |                   |                                      |
|                                                    | zaključno podaljševanje verige DNA   | 72 °C, 5 min  | 1                 |                                      |
| PCR za vrsto <i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> | začetna denaturacija DNA             | 95 °C, 3 min  | 1                 | Ventura in sod. (2001)               |
|                                                    | denaturacija DNA                     | 95 °C, 30 s   | 30                |                                      |
|                                                    | prileganje začetnih oligonukleotidov | 58 °C, 30 s   |                   |                                      |
|                                                    | podaljševanje verige DNA             | 72 °C, 1min   |                   |                                      |
|                                                    | zaključno podaljševanje verige DNA   | 72 °C, 5 min  | 1                 |                                      |
| PCR za vrsto <i>B. longum</i>                      | začetna denaturacija DNA             | 95 °C, 3 min  | 1                 | Matsuki in sod. (1999)               |
|                                                    | denaturacija DNA                     | 95 °C, 30 s   | 30                |                                      |
|                                                    | prileganje začetnih oligonukleotidov | 55 °C, 30 s   |                   |                                      |
|                                                    | podaljševanje verige DNA             | 72 °C, 30 s   |                   |                                      |
|                                                    | zaključno podaljševanje verige DNA   | 72 °C, 5 min  | 1                 |                                      |

### 3.4.6 Analiza pomnožkov z gelsko elektroforezo

Pomnožke reakcij PCR in RAPD smo analizirali s pomočjo gelske elektroforeze, njihovo velikost oz. vzorec (prstni odtis) pa smo ovrednotili s pomočjo molekulskih označevalcev velikosti odeskov DNA.

Agarozni gel smo pripravili iz agaroze in 0,5-kratnega pufra TAE. Mešanico smo segreli do popolne bistrosti, jo ohladili na približno 50 °C in vlili v ustrezen model z glavnički. Iz strjenega gela smo previdno odstranili glavničke in ga prenesli v elektroforezno banjico z 0,5-kratnim pufrom TAE. Glede na pričakovano velikost pomnožkov smo pripravili različno zamrežene gele in sicer za analizo pomnožkov reakcije PCR 1,2 % gel, za analizo pomnožkov

reakcij RAPD pa 1,5–1,6 % gele. V žepke na gelu smo nanесли od 15–20  $\mu$ l pomnožkov, dobljenih s PCR ali RAPD z DNA testnih vzorcev ter pozitivnih in negativnih kontrol. Za ovrednotenje pomnožkov, smo na gel vedno nanесли tudi po 2,5  $\mu$ l molekulskega označevalca velikosti DNA 100 bp ali 1 kb. Elektroforeza je potekala pri 90 V približno eno uro, odvisno od velikosti gela in produktov. Po končani elektroforezi smo gel obarvali z barvilom Sybr Safe<sup>TM</sup>, ki se je vezalo na odseke pomnožene DNA in pri analizi gela pod UV-svetlobo fluoresciralo, kar nam je omogočilo, da smo gel dokumentirali in analizirali.



Slika 10: Model za vliivanje gela z že odstranjenimi glavnički (a) in gel prenešen v elektroforetsko banjico s pufrom (b).

### 3.4.7 Ugotavljanje vpliva kvasnega ekstrakta na rast bifidobakterij

Vpliv kvasnega ekstrakta na rast smo ugotavljali z nacepljanjem bifidobakterij v rekonstituirano posneto mleko (RPM) in v rekonstituirano posneto mleko z dodatkom kvasnega ekstrakta (RPM+ke), dinamiko rasti pa smo spremljali z nacepljanjem na trdno gojišče MRS+cys. RPM in RPM+ke smo nacepili z 1 % vcepkom 48-urnih kultur bifidobakterij, zraslih v tekočem gojišču MRS+cys. Da bi ugotovili začetne velikosti populacij bifidobakterij, smo pripravili zaporedne decimalne razredčitve po Koch-u cepljenega RPM in RPM+ke ter 48-urnih kultur bifidobakterij. Ustrezne razredčitve smo nacepili na petrijeve plošče, dodali raztopljeno in primerno ohlajeno (45 °C) trdno gojišče MRS+cys in tako pripravljene plošče inkubirali 48 ur pri 37 °C. RPM in RPM+ke smo vzorčili še po 6, 12, 24 in 48 urah. Po inkubaciji smo izrasle kolonije prešteli s pomočjo elektronskega števca kolonijskih enot.



Slika 11: Elektronski števec za štetje kolonijskih enot.

Število kolonijskih enot (KE) bifidobakterij v mililitru RPM, RPM+ke ali tekočega MRS+cys smo izračunali po naslednji formuli (ISO 7218, 2007):

$$KE = \frac{\Sigma c}{((n_1 + 0,1 \cdot n_2) \cdot d)} \quad \dots (1)$$

Legenda:

$\Sigma c$  ...vsota kolonij, izraslih na števnihi ploščah (15-300 kolonij)

$n_1$  ... število števnihi plošč prve razredčitve

$n_2$  ... število števnihi plošč druge razredčitve

$d$  ... recipročni razredčitveni faktor prve razredčitve

Ob istih časih, ob cepljenju RPM in RPM+ke, ter 6, 12, 24 in 48 ur po cepljenju smo spremljali tudi spremembo vrednosti pH, ki smo jo merili s pH-metrom. Izmerili smo tudi vrednost pH sterilnih gojišč RMP in RMP+ke.



Slika 12: pH meter.

### 3.4.8 Ugotavljanje preživelosti bifidobakterij v simuliranih razmerah prebavil

Sposobnost preživetja bifidobakterij v simuliranih razmerah prebavil smo ovrednotili z izpostavitvijo bifidobakterij simuliranemu želodčnemu (ŽS) in črevesnemu soku (ČS) v času in pri temperaturi, ki najbolj ponazarjajo razmere v prebavnem traktu (Fernández in sod., 2003).

Za določitev začetnega števila bifidobakterij v čisti kulturi, smo 48-urne kulture bifidobakterij razredčili po Koch-u, nacepili primerne razredčitve na petrijeve plošče in prelili z raztopljenim in primerno ohlajenim trdnim gojiščem MRS+cys.

ŽS z vrednostmi pH 2, 3 oz. 7 smo nato cepili s čistimi kulturami bifidobakterij (1 % vcepek). Kot kontrolo smo v analizo vključili peptonsko vodo, ki smo jo prav tako cepili (1 %) s čistimi kulturami bifidobakterij. Cepljen ŽS in peptonsko vodo smo inkubirali 3 ure pri 37 °C,



dinamiko preživelosti pa smo ugotavljali z vzorčenjem ŽS in peptonske vode takoj po cepljenju ter po 90-ih in 180-ih minutah inkubacije.

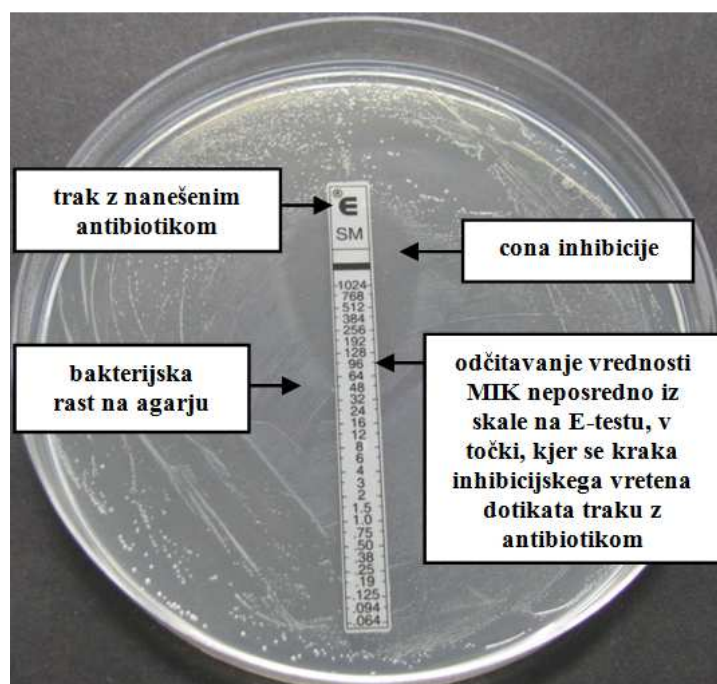
Po treh urah inkubacije smo ŽS s kulturo centrifugirali (10 minut pri 3500 RCF), zavrgli supernatant, sprali celice s peptonsko vodo, jih resuspendirali v ČS in nadaljevali z inkubacijo pri 37 °C 3 ure. Vzorčenje je sledilo takoj po dodatku ČS ter po 270-ih in 360-ih minutah inkubacije. Vzoredno smo inkubirali in vzorčili tudi nacepljeno peptonsko vodo. Število kolonijskih enot v mililitru smo ugotavljali z metodo nacepljanja na trdno gojišče MRS+cys.

### **3.4.9 Ugotavljanje protimikrobne aktivnosti**

Protimikrobno aktivnost bifidobakterij smo ugotavljali z metodo lise na trdnem gojišču (Bogovič Matijašić in sod., 1998). V petrijeve plošče smo nalili po 10 ml trdnega gojišča MRS+cys. Na strjeno in dobro osušeno gojišče smo nanесли po 5 µl 48-urnih kultur testnih bifidobakterij in tako cepljene plošče pri 37 °C v anaerobnih razmerah inkubirali dva dni. Po inkubaciji smo plošče prelili s po 4 ml ustreznih poltrdnih gojišč MRS, BHI, M17 ali RCM, v katera smo predhodno cepili po 50 µl 48-urnih kultur primerne indikatorske seva (Preglednica 5). Sledila je inkubacija pri razmerah, ustreznih za posamezno indikatorsko bakterijo (Preglednica 5). Po inkubaciji smo opisali (oster ali zabrisan rob) in izmerili cone inhibicije okoli nanosa testnih bifidobakterij.

### **3.4.10 Ugotavljanje občutljivosti bifidobakterij za antibiotike**

Pri izolatih bifidobakterij, osamljenih iz prehranskih dopolnil oziroma zdravil, smo s pomočjo E-testa ugotavljali občutljivost za antibiotike. Najprej smo pripravili suspenzije bakterijskih celic, in sicer tako, da smo celice iz 48-urnih kultur sprali in resuspendirali v tolikšni količini peptonske vode, da je motnost ustrezala Mc Farlandovi lestvici 1, kar ustreza koncentraciji  $10^6$  KE/ml. Kot nosilno gojišče smo uporabili trdno gojišče, sestavljeno iz 90 % MH in 10 % MRS ter vrednostjo pH, naravnano na 6,7 (Klare in sod., 2005). V petrijevke smo razlili po 25 ml gojišča, ga osušili v laminariju in po površini razmazali po 100 µl predhodno pripravljenih suspenzij celic. Nato smo na površino vpote suspenzije celic položili trakove z nanešenimi antibiotiki (E-test) in plošče v anaerobnih razmerah pri 37 °C inkubirali 48 ur. Po inkubaciji smo vrednosti MIK po navodilih proizvajalca odčitali neposredno s skale E-testa. MIK predstavlja mesto popolne inhibicije rasti preiskovane bakterije, to je stičišče, kjer se kraka inhibicijskega vretena dotikata traku z antibiotikom.

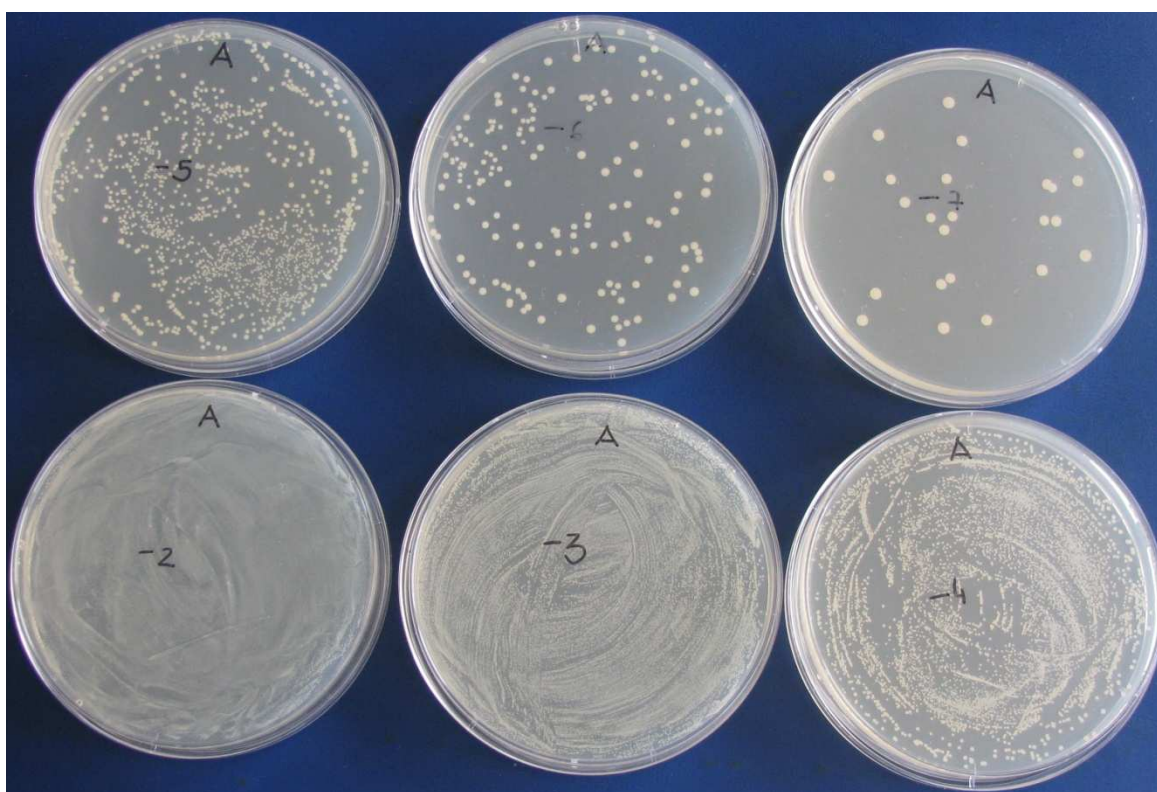


Slika 13: Značilne cone inhibicije v obliki vretena, ki nastanejo pri metodi z E-testom.

## 4 REZULTATI

### 4.1 OSAMITEV BIFIDOBAKTERIJ IZ PREHRANSKIH DOPOLNIL ALI ZDRAVILA

Za osamitev bifidobakterij iz fermentiranih mlečnih izdelkov oz. prehranskih dopolnil ali zdravil smo uporabili gojišče TOS+mup. Ker se je pri identifikaciji bifidobakterij, osamljenih iz fermentiranih mlečnih izdelkov, izkazalo, da gre pri vseh izdelkih za isti sev, *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb-12, za primerjavo fizioloških lastnosti pa smo potrebovali več različnih vrst in sevov bifidobakterij, smo delo nadaljevali z osamitvijo bifidobakterij iz prehranskih dopolnil ali zdravil. Zato smo na podlagi deklaracij na izdelkih izbrali 6 prehranskih dopolnil in eno probiotično zdravilo brez recepta, da bi dobili čim več različnih vrst bifidobakterij.



Slika 14: Rast bifidobakterij iz zaporednih decimalnih razredčitev vzorca, nacepljenih na gojišče TOS+mup (Activia).

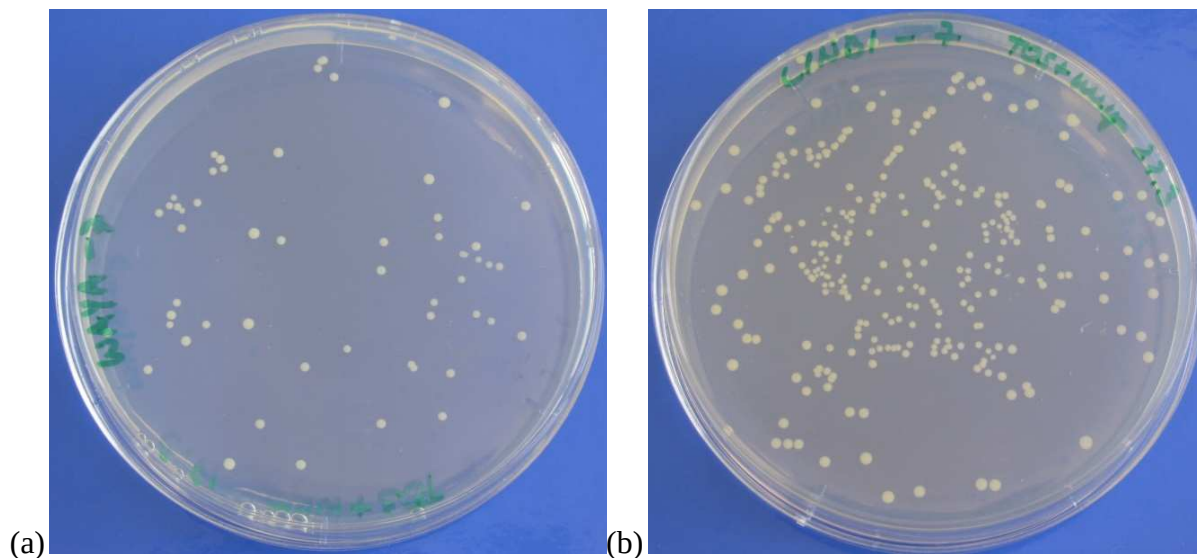
Pri osamitvi bifidobakterij iz fermentiranih mlečnih izdelkov smo rast zasledili pri razredčitvah  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  in  $10^{-7}$ , zato smo iste razredčitve uporabili tudi pri osamitvi bifidobakterij iz prehranskih dopolnil ali zdravil. Izkazalo se je, da izdelki vsebujejo manjše število bifidobakterij od deklariranega, saj smo pri uporabljenih razredčitvah opazili rast bifidobakterij le iz izdelkov Waya IT ter Linbi. Zato smo izdelke Bion3, Lacto Seven, Linex, Yogermina ter Probiolex ponovno nacepili pri nižjih razredčitvah ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  in  $10^{-4}$ ), pri katerih smo izrast bifidobakterij potrdili pri dopolnilih Bion3, Lacto Seven in pri zdravilu Linex, ne pa tudi pri Yogermina in Probiolex.

Omeniti je potrebno, da rok uporabe pri slednjih dveh izdelkih še ni bil prekoračen, prav tako sta bila izdelka ustrezno shranjena. Čeprav je bilo pri izdelku Probiolex do izteka roka uporabe še dva meseca, smo kupili novo enoto izdelka z daljšim rokom uporabnosti, medtem

ko smo izdelek Yogermina v obliki napitka zamenjali z izdelkom Yogermina v obliki kapsul. Iz izdelka Probiolex, kljub nakupu izdelka z daljšim rokom uporabe, nismo uspeli osamiti bifidobakterij, zato smo ga izključili iz raziskave. Zamenjava izdelka Yogermina napitek z Yogermina kapsule, pa se je izkazala za uspešno, saj smo potrdili rast bifidobakterij pri izbranih razredčitvah.

## 4.2 MORFOLOŠKA ANALIZA

### 4.2.1 Makromorfološke lastnosti



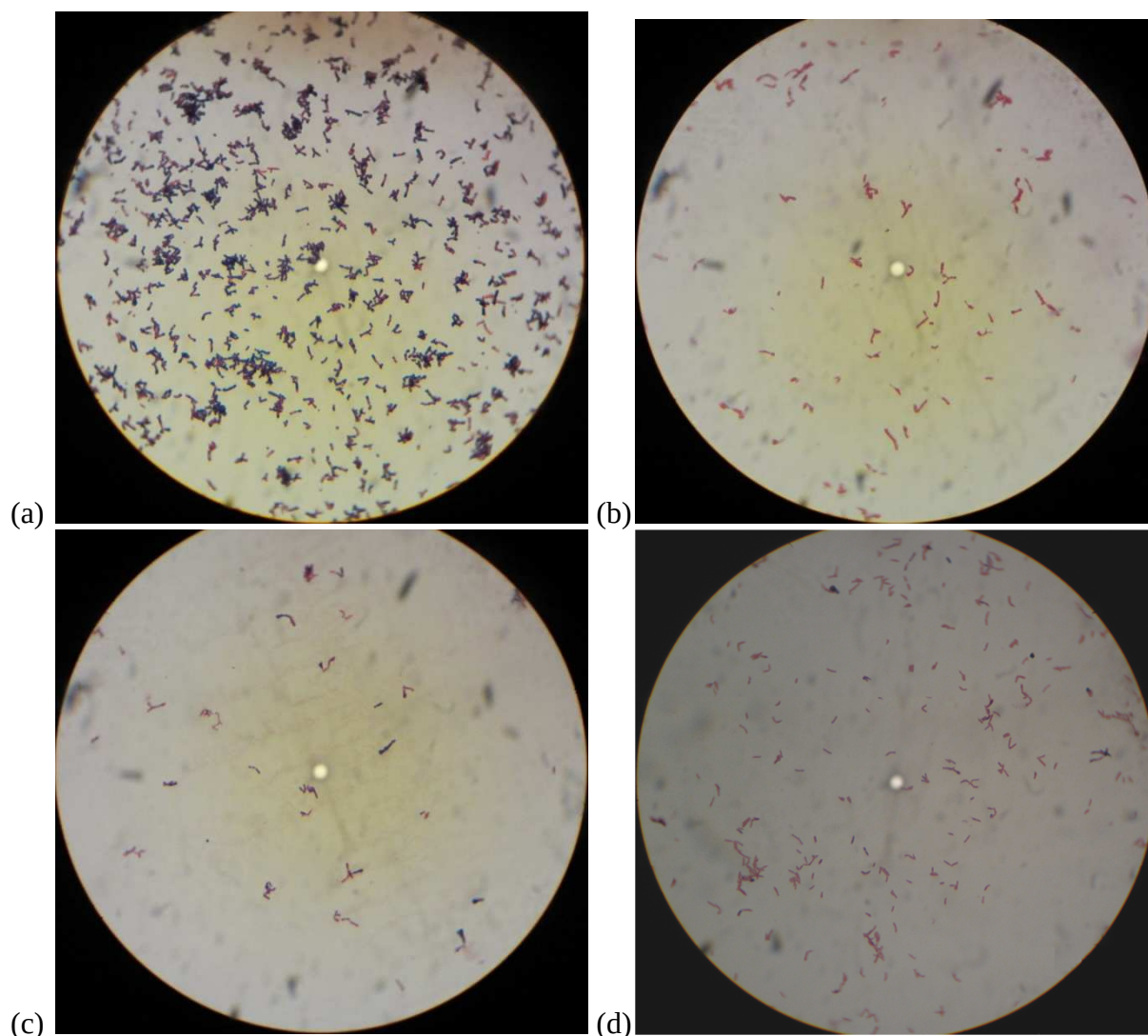
Slika 15: Izgled bifidobakterij, zraslih na gojišču TOS+mup, osamljenih iz prehranskega dopolnila Waya IT (a) in Linbi (b).

Pri makromorfološkem pregledu kolonij smo opazovali obliko, površino, barvo in velikost, saj nam lahko te lastnosti omogočijo razlikovanje kolonij. Kolonije, zrasle na gojišču TOS+mup, so imele pri vseh izdelkih zelo podoben izgled. Kolonije so bile bele do krem barve, pravilne okrogle oblike z gladkim robom. Površina kolonij je bila gladka in svetleča, prerez pa je bil rahlo dvignjen. Največje razlike smo opazili v velikosti kolonij, saj so te v premeru merile od 1 pa do 4 mm.

### 4.2.2 Mikromorfološke lastnosti

Z gojišča TOS+mup smo za vsako prehransko dopolnilo oziroma zdravilo naključno izbrali nekaj kolonij bifidobakterij, jih pobarvali po Gramu in morfologijo celic opazovali pod svetlobnim mikroskopom pri 1000-kratni povečavi.

Ker so se vse celice obarvale modro-vijolično, smo potrdili, da gre za po Gramu pozitivne bakterije. Bakterije so imele najpogostejše obliko ukrivljenih palčk z rahlo odebeljenimi konci. Pri nekaterih preparatih so se lepo videle tudi oblike Y, ki so značilne za bifidobakterije.



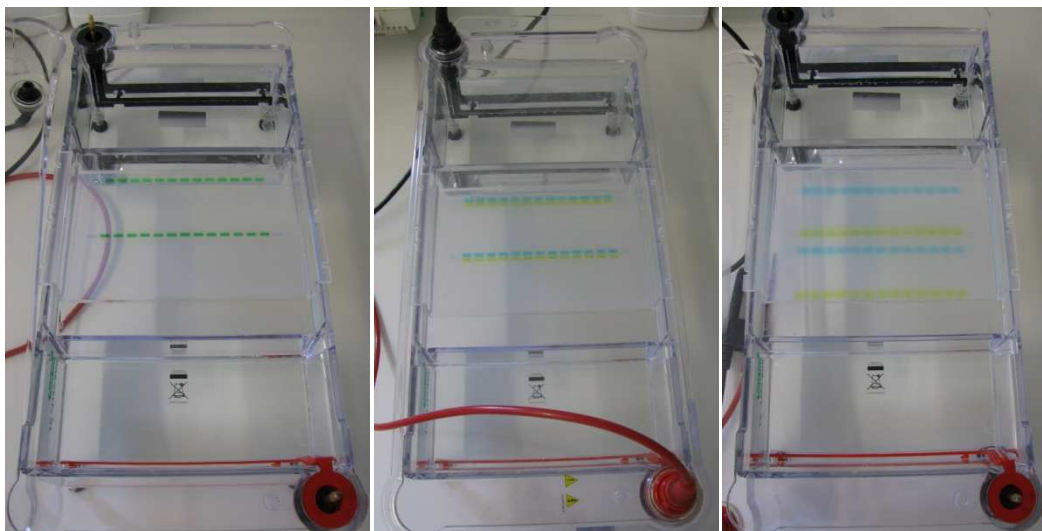
Slika 16: Mikroskopski preparati bifidobakterij, obarvani z metodo barvanja po Gramu, pri 1000x povečavi. Waya IT (a), Linex (b), Lacto Seven (c) in IM 386 (d).

#### 4.3 IDENTIFIKACIJA IN RAZLIKOVANJE IZOLIRANIH BIFIDOBAKTERIJ

DNA smo s pomočjo komercialnega kompleta Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification Kit (Promega) osamili iz naključno izbranih kolonij bifidobakterij, ki smo jih predhodno osamili iz prehranskih dopolnil ali zdravila na gojišču TOS+mup in prečistili s precepljanjem na trdno gojišče MRS+cys. Osamljeno DNA smo kot tarčno DNA uporabili v reakcijah RAPD in PCR.

Analizo pomnožkov reakcij PCR in RAPD smo izvedli z elektroforezo na agaroznem gelu, kjer smo na podlagi pričakovane velikosti pomnožkov pripravili različno zamrežene gele, od 1,2 % do 1,6 %. V žepke agaroznega gela smo nanесли po 15  $\mu$ l ali 20  $\mu$ l pomnožkov, v vsaki vrstici pa smo v prvi žepki nanесли po 2,5  $\mu$ l molekulskega označevalca velikosti 100 bp.

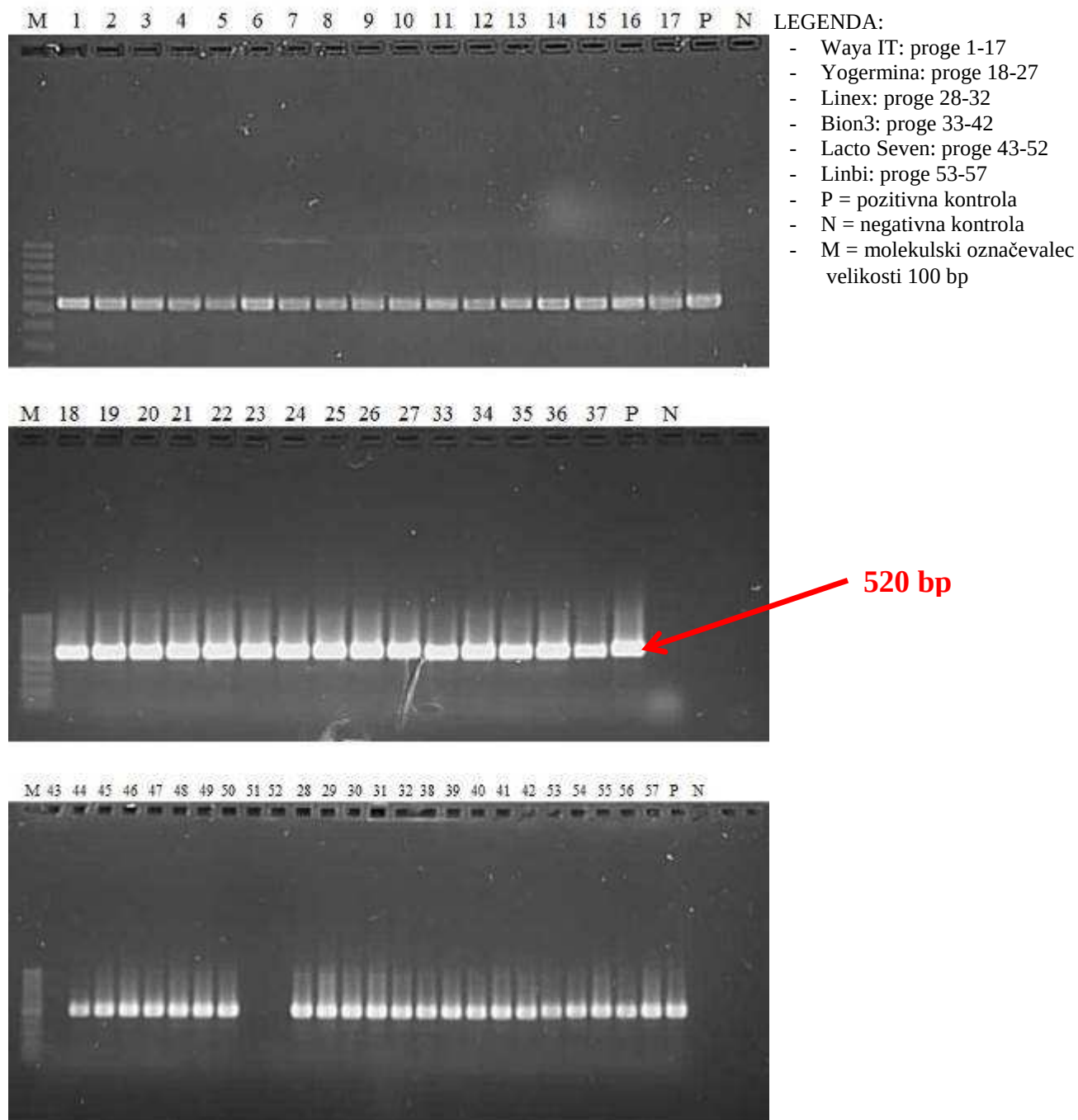




Slika 17: Princip poteka agarozne gelske elektroforeze. Levo: nanos pomnožkov reakcije PCR oz. RAPD ter molekulskega označevalca velikosti, sredina: potovanje pomnožkov proti anodi in desno: konec gelske elektroforeze.

### 4.3.1 Potrjevanje rodu *Bifidobacterium*

Z začetnima oligonukleotidoma Bif164-f in Bif662-r smo pri bifidobakterijah, osamljenih iz prehranskih dopolnil ali zdravila, preverjali pripadnost rodu *Bifidobacterium*.



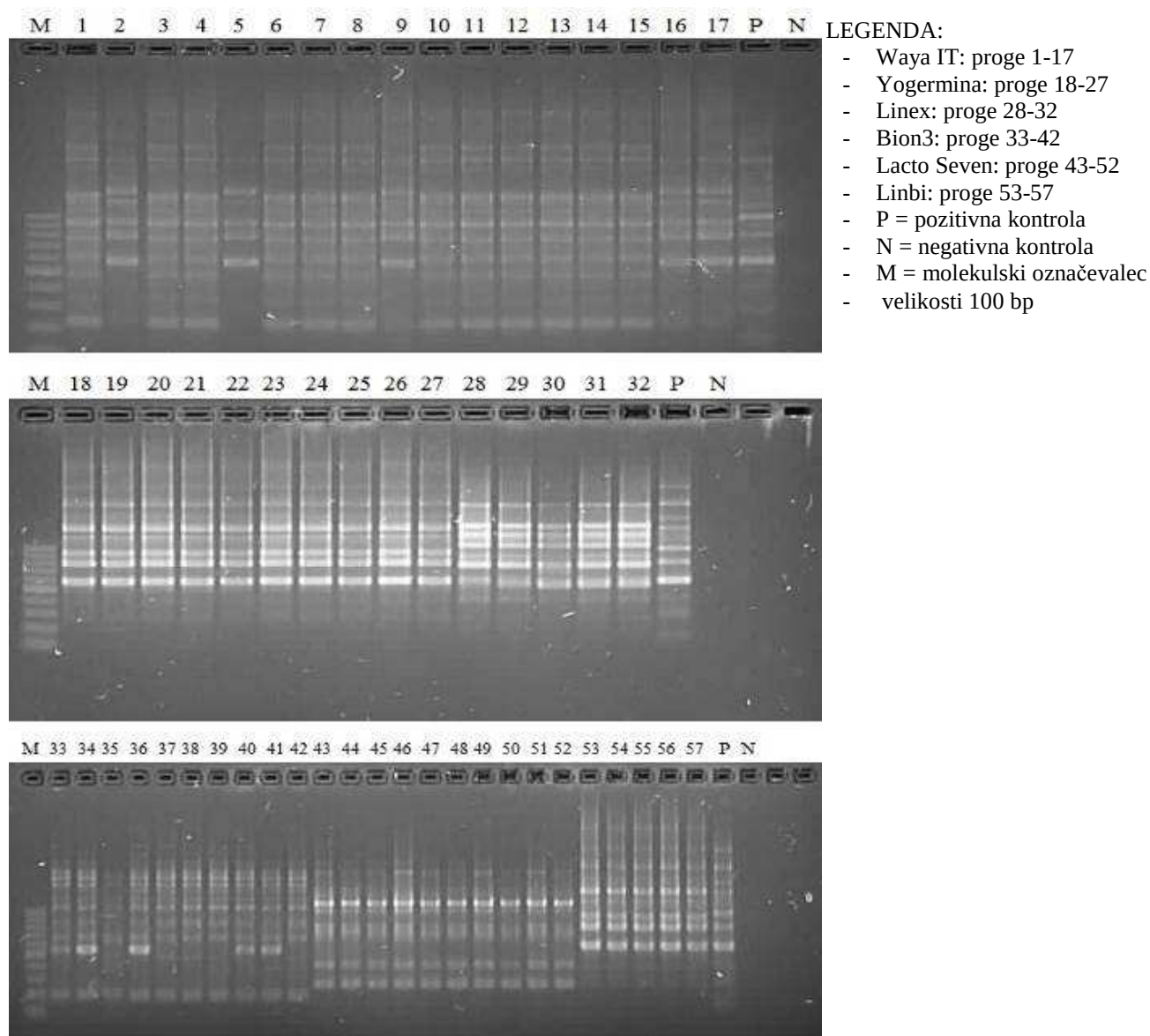
Slika 18: Analiza pomnožkov PCR z začetnimi oligonukleotidi, specifičnimi za rod *Bifidobacterium* (Bif164-f in Bif662-r).

Slika 18 prikazuje rezultate analize pomnožkov reakcije PCR z začetnimi oligonukleotidi, specifičnimi za rod *Bifidobacterium*. Pri vseh preiskovanih vzorcih, razen pri Lacto Seven, smo dobili pozitivne rezultate identične rezultatu kontrolnega vzorca *B. breve* IM 386. Pri analizi bifidobakterij iz prehranskega dopolnila Lacto Seven pa pri treh vzorcih (proge 43, 51 in 52) nismo potrdili pomnožka PCR, kar je lahko posledica premajhne količine DNA v

vzorcu reakcijske mešanice PCR, kontaminacije, inhibicije encimske reakcije ali pa, da analiziran vzorec ne pripada rodu *Bifidobacterium*. Za ostale vzorce lahko zaključimo, da vsi pripadajo rodu *Bifidobacterium*, saj so dali pomnožke pričakovane velikosti 520 bp.

#### 4.3.2 Razlikovanje med sevi z metodo RAPD

Reakcija RAPD omogoča ugotavljanje genetske variabilnosti sevov, običajno tudi znotraj iste vrste. S primerjavo profilov RAPD na gelu smo ovrednotili podobnost izolatov bifidobakterij, osamljenih iz posameznega prehranskega dopolnila ali zdravila. Rezultati reakcij RAPD z začetnima oligonukleotidoma KGT-70GC oz. 1254 so prikazani na sliki 19 in 20.

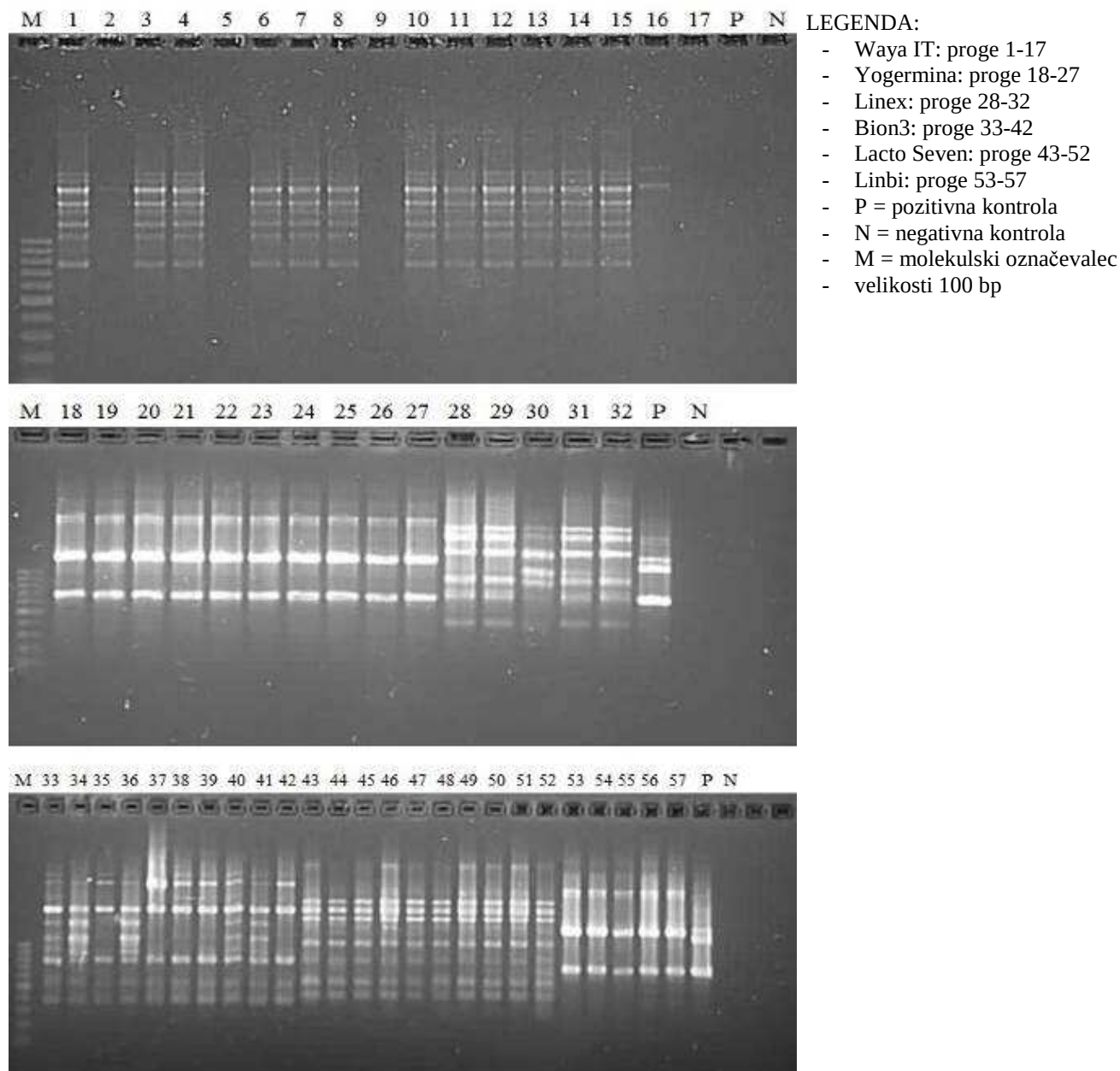


Slika 19: Analiza pomnožkov RAPD z začetnim oligonukleotidom KGT-70GC.

Iz analize profilov RAPD z začetnim oligonukleotidom KGT-70GC (Slika 19) lahko rečemo, da smo pri izdelku Waya IT (proge 1-17) in Bion3 (proge 33-42) uspeli osamiti dva različna seva bifidobakterij, medtem ko analiza profilov RAPD pri izdelkih Yogermina (proge 18-27), Linex (proge 28-32), Lacto Seven (proge 43-52) in Linbi (proge 53-57) nakazuje, da smo



uspeli izolirati po en sev bifidobakterij. Ker za RAPD velja slaba ponovljivost in ker je pogosto interpretacija rezultatov težja, smo za lažjo interpretacijo izvedli še analizo RAPD analizo z začetnim oligonukleotidom 1254.



Slika 20: Analiza pomnožkov RAPD z začetnim oligonukleotidom 1254.

Tudi pri analizi profilov RAPD z začetnim oligonukleotidom 1254 (Slika 20) smo opazili, da sta se pri izdelku Waya IT ponovno pojavila dva vzorca, kjer so pri enem vzorcu profili pomnožkov jasno vidni, pri drugem pa komaj da opazni. Zanimivo je, da vzorec profilov s komaj opaznimi pomnožki sovпада z enim od vzorcev profilov pri analizi RAPD začetnim oligonukleotidom KGT-70GC (Sliki 19 in 20, proge 2, 5, 9, 16 in 17). Sklepamo, da smo iz izdelka Waya IT uspešno osamili dva različna seva bifidobakterij. Prav tako sta se pri izdelku Bion3 pojavila dva različna profila RAPD, kar se ujema z rezultati reakcije RAPD z začetnim oligonukleotidom KGT-70GC. Pri izdelkih Yogermina, Linex, Lacto Seven in Linbi smo z

začetnim oligonukleotidom 1254 prav tako dobili enotne profile RAPD, kar nakazuje, da smo iz izdelka večkrat osamili isti sev.

### 4.3.3 Potrjevanje vrst bifidobakterij

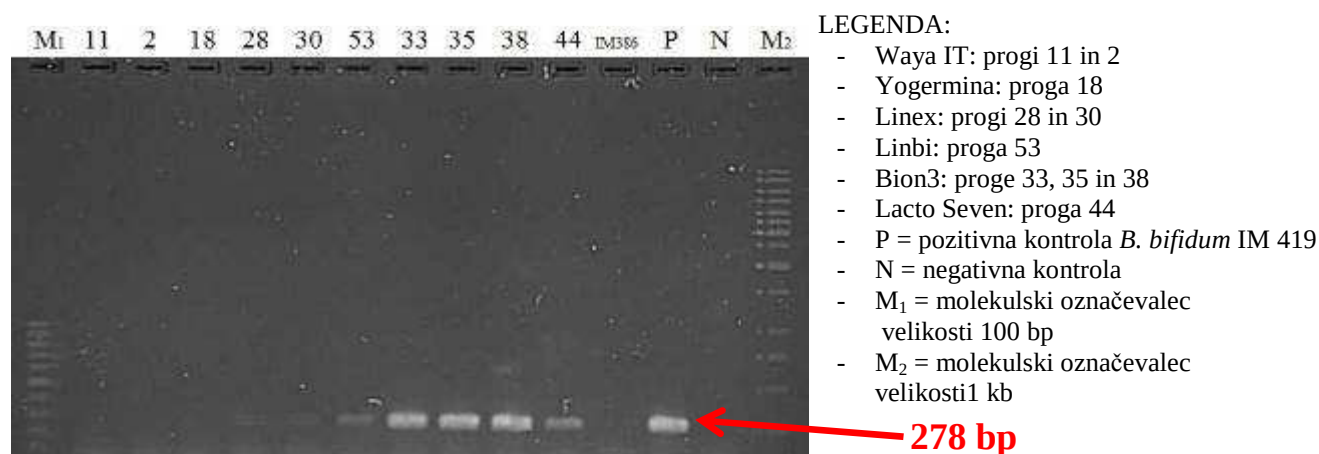
Potrjevanje vrst bifidobakterij, osamljenih iz prehranskih dopolnil ali zdravil, smo izvedli z reakcijami PCR, v katerih smo uporabili za posamezno vrsto specifične začetne oligonukleotide (Preglednica 8). Kot tarčno DNA smo izbrali DNA bifidobakterij, ki so pri posameznem izdelku v reakciji RAPD (Sliki 19 in 20) dale različne profile, in sicer pri izdelku Waya IT smo uporabili DNA bifidobakterij s prog 2 in 11, pri Yogermina s proge 18, pri Linex s prog 28 in 30, saj je proga 30 pri reakciji RAPD z začetnim oligonukleotidom 1254 dala slabše izrazit profil lis, pri Lacto Seven s proge 44, pri izdelku Linbi s proge 53, pri izdelku Bion3 pa s prog 33, 35 in 38. Pri Bion3 smo v nadaljnjo analizo vzeli tri vzorce DNA, saj je proga 35 pri reakciji RAPD z začetnim oligonukleotidom KGT-70GC dala slabo viden profil.

V vseh reakcijah PCR smo uporabili tudi DNA seva *B. breve* IM 386, specifičnost reakcij pa smo zagotavljali z uporabo pozitivnih in negativnih kontrol.

Dobljene pomnožke PCR smo analizirali z elektroforezo v agaroznem gelu (1,2 %). V žepke smo nanesti po 20 µl pomnožkov, v prvi oz. zadnji žepki vsake vrstice pa smo nanesti po 2,5 µl molekulskega označevalca DNA GeneRuller Ladder 100 bp ( $M_1$ ) oz. po 2,5 µl molekulskega označevalca DNA GeneRuller Ladder 1 kb ( $M_2$ ).

#### 4.3.3.1 Potrjevanje vrste *B. bifidum*

Za potrjevanje vrste *B. bifidum* smo uporabili začetna oligonukleotida BiBIF-1 in BiBIF-2, kot pozitivna kontrola pa nam je služila DNA, osamljena iz *B. bifidum* IM 419.



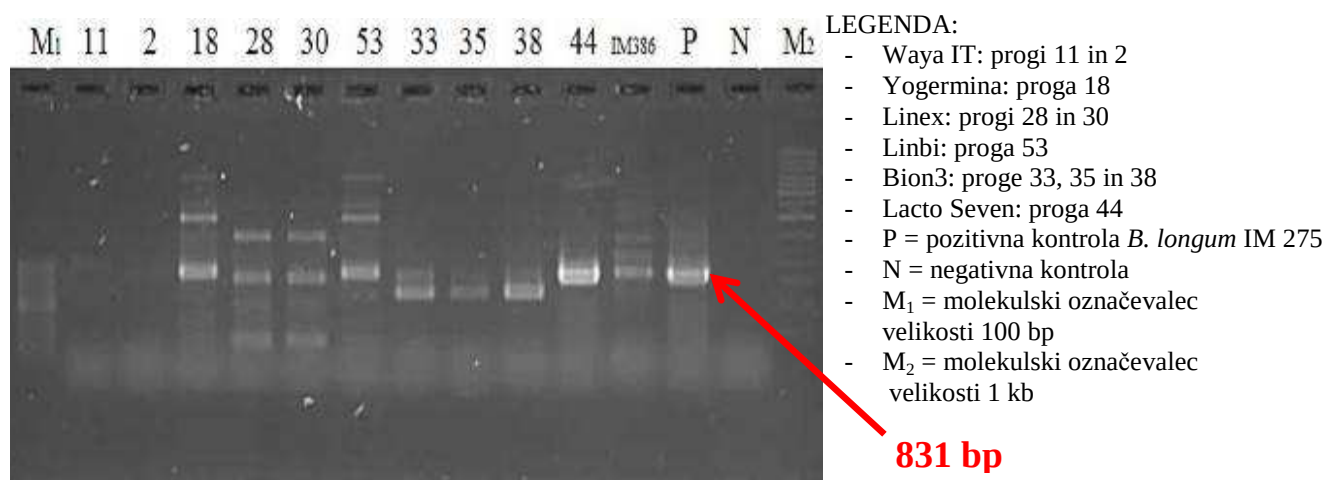
Slika 21: Analiza pomnožkov PCR z začetnima oligonukleotidoma BiBIF-1 in BiBIF-2, specifičnima za vrsto *B. bifidum*.

Slika 21 prikazuje rezultate pomnoževanja DNA izbranih bifidobakterij iz posameznih prehranskih dopolnil ali zdravil z nukleotidi, specifičnimi za vrsto *B. bifidum*. Pričakovana velikost specifičnega pomnožka PCR je 278 bp, kar smo prikazali s pomnoževanjem DNA kontrolnega seva *B. bifidum* IM 419 (proga P). Pomnožke enake velikosti smo dobili na progah 33, 35 in 38, kjer smo pomnoževali DNA bifidobakterij iz prehranskega dopolnila Bion3. Ker deklaracija omenjenega izdelka poleg vrste *B. bifidum* navaja še vsebnost vrste *B.*

*longum* in ker rezultati analize RAPD nakazujejo dva različna profila nismo pričakovali specifičnega pomnožka pri vseh treh analiziranih DNA. Iz rezultata lahko predvidevamo, da smo bili neuspešni pri naključnem izbiranju različnih kolonij z gojišča. Vrsta *B. bifidum* naj bi bila zastopana tudi v prehranskem dopolnilu Waya IT (progi 11 in 2), kar pa nismo uspeli potrditi z reakcijo PCR z oligonukleotidi, specifičnimi za vrsto *B. bifidum*. Odsotnost specifičnih pomnožkov še ne pomeni, da prehransko dopolnilo ne vsebuje bakterij te vrste, ampak da nam jih z naključnim izbiranjem kolonij verjetno ni uspelo osamiti.

#### 4.3.3.2 Potrjevanje vrste *B. longum*

Za potrjevanje vrste *B. longum* smo uporabili začetna oligonukleotida BiLON-1 in BiLON-2 ter kot pozitivno kontrolo DNA, osamljeno iz seva *B. longum* IM 275.



Slika 22: Analiza pomnožkov PCR z začetnima oligonukleotidoma BiLON-1 in BiLON-2, specifičnima za vrsto *B. longum*.

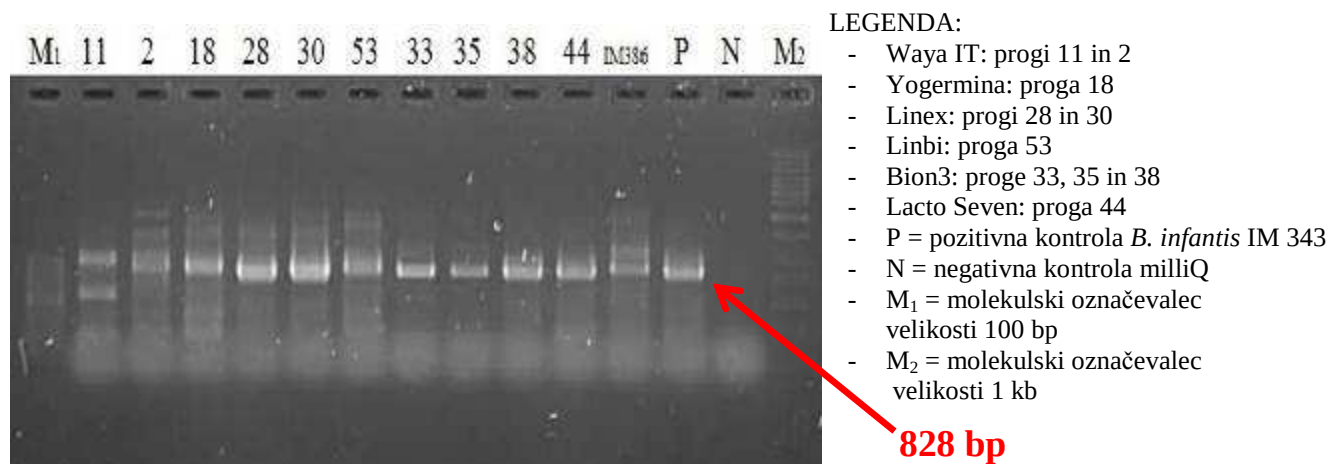
Slika 22 prikazuje rezultate pomnoževanja DNA izbranih bifidobakterij iz posameznih prehranskih dopolnil z začetnimi oligonukleotidi, specifičnimi za vrsto *B. longum*. Pričakovana velikost specifičnega pomnožka PCR je 831 bp, kar smo prikazali s pomnoževanjem DNA kontrolnega seva *B. longum* IM 275 (proga P). Pomnožek iste velikosti (proga 44) smo dobili s tarčno DNA bifidobakterije, osamljene iz prehranskega dopolnila Lacto Seven, kar se ujema z deklaracijo. Vrsta *B. longum* naj bi bila zastopana tudi v prehranskih dopolnilih Bion3 (proge 33, 35 in 38) in Waya IT (progi 11 in 2), česar pa z reakcijo PCR nismo potrdili. Odsotnost specifičnih pomnožkov pri omenjenih izdelkih Waya IT in Bion3 še ne pomeni, da prehranski dopolnili ne vsebuje bakterij te vrste, bolj verjetno je, da nismo osamili kolonij omenjene vrste. S slike 22 pa je lepo vidno, da je z vrstno specifičnima začetnima oligonukleotidoma BiLON-1 in BiLON-2 pri večini analiziranih izolatov prišlo do nastanka nespecifičnih pomnožkov, ki se odražajo kot različni vzorci lis.

Pri potrjevanju vrst *B. infantis* in *B. animalis* ssp. *lactis* smo imeli težave. Kljub večkratnim ponovitvam reakciji PCR in spreminjanju posameznih parametrov rezultati niso bili zanesljivi.

#### 4.3.3.3 Potrjevanje vrste *B. infantis*

Pri potrjevanju vrste *B. infantis* smo kot začetna oligonukleotida izbrali BiINF-1 in BiINF-2, kot pozitivna kontrola pa je služila DNA seva *B. infantis* IM 343. PCR za potrjevanje vrste *B.*

*infantis* smo ponovili štirikrat. V enem primeru je bilo pomnoževanje neuspešno, v treh primerih pa je analiza pomnožkov z agarozno gelsko elektroforezo pri vseh vzorcih pokazala profile nespecifičnih pomnožkov.

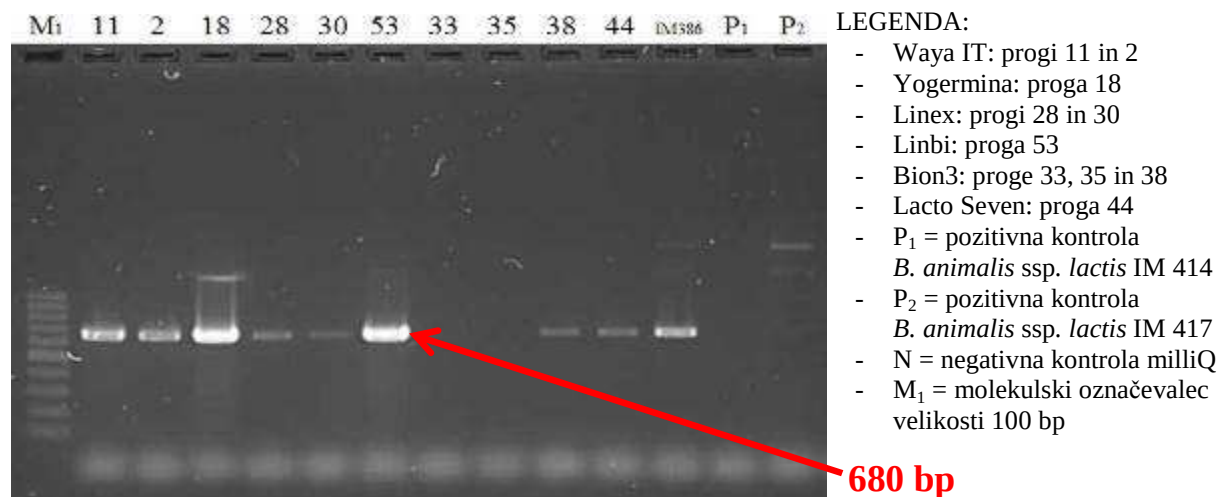


Slika 23: Analiza pomnožkov PCR z začetnima oligonukleotidoma BiINF-1 in BiINF-2, specifičnima za vrsto *B. infantis*.

Slika 23 prikazuje enega izmed gelov z rezultati pomnoževanja DNA izbranih bifidobakterij z nukleotidi, specifičnimi za vrsto *B. infantis*. Pričakovana velikost specifičnega pomnožka PCR je 828 bp, kar smo prikazali s pomnoževanjem DNA kontrolnega seva *B. infantis* IM 343 (proga P). Čeprav iz rezultatov vidimo, da je pri vseh vzorcih nastal približno enako velik pomnožek kot pri pozitivni kontroli pa vseeno ocenjujemo, da se le pri štirih vzorcih velikost dejansko ujema z velikostjo pomnožka pozitivne kontrole. Pomnožke enake velikosti smo dobili s tarčno DNA bifidobakteriji, osamljenih iz izdelkov Linex (progi 28 in 30), Bion3 (proga 38) in Lacto Seven (proga 44). Glede na deklaracije naj bi le Linex vseboval bakterije vrste *B. infantis*, zato smo predpostavili, da nam je iz izdelka Linex uspelo osamiti vrsto *B. infantis*. Na sliki 23 je lepo vidno, da je z vrstno specifičnima začetnima oligonukleotidoma BiINF-1 in BiINF-2 pri večini analiziranih izolatov prišlo do nastanka nespecifičnih pomnožkov, ki se odražajo kot različni vzorci lis.

#### 4.3.3.4 Potrjevanje vrste *B. animalis* ssp. *lactis*

Pri potrjevanju vrste *B. animalis* ssp. *lactis* smo kot začetna oligonukleotida izbrali Bflact2 in Bflact5, kot pozitivni kontroli pa smo uporabili DNA sevov *B. animalis* ssp. *lactis* IM 414 in IM 417. PCR za potrjevanje vrste *B. animalis* ssp. *lactis* smo ponovili dvakrat. Pri nobenem od poskusov nismo dobili specifičnih pomnožkov s pozitivnima kontrolama, smo pa dobili pomnožke pričakovane velikosti 680 bp pri nekaterih analiziranih vzorcih. Obe analizi sta dali enake rezultate.



Slika 24: Analiza pomnožkov PCR z začetnima oligonukleotidoma Bflact2 in Bflact5, specifičnima za vrsto *B. animalis* ssp. *lactis*.

Slika 24 prikazuje rezultate pomnoževanja DNA izbranih bifidobakterij iz posameznih prehranskih dopolnil in zdravila z začetnimi oligonukleotidi, specifičnimi za vrsto *B. animalis* ssp. *lactis*. Pri večini analiziranih izolatov je prišlo do nastanka nespecifičnih pomnožkov, ki se odražajo kot različni vzorci lis. Pomnožke pričakovane velikosti smo dobili s tarčno DNA bifidobakterij, osamljenih iz prehranskih dopolnil Waya IT (progi 11 in 2), Yogermine (proga 18) in Linbi (proga 53), kar se ujema tudi z njihovimi deklaracijami. Waya IT naj bi, glede na deklaracijo, vseboval kar tri vrste bifidobakterij, poleg vrste *B. animalis* ssp. *lactis* tudi vrsti *B. bifidum* in *B. longum*. Vendar se je, glede na rezultate z vrstno specifičnimi oligonukleotidi izkazalo, da nam je uspelo osamiti le vrsto *B. animalis* ssp. *lactis*. Pri ostalih dveh izdelkih pa lahko zaključimo, da smo uspešno osamili in potrdili prisotnost deklarirane vrste.

S potrjevanjem vrst bifidobakterij smo ugotovili, da nam je iz vsakega izdelka uspelo osamiti po eno vrsto. Zato smo za nadaljnje analize, s katerimi smo proučevali osnovne fiziološke lastnosti bifidobakterij, kot so rast v mleku in v mleku ob dodatku kvasnega ekstrakta, sposobnost preživetja v simuliranih razmerah prebavnega trakta, protimikrobna aktivnost in občutljivost za antibiotike, vzeli en vzorec iz vsakega izdelka. V analize smo vključili bifidobakterije s proge 11 (Waya IT), 18 (Yogermine), 28 (Linex), 53 (Linbi), 33 (Bion3) in 44 (Lacto Seven).

#### 4.4 VPLIV KVASNEGA EKSTRAKTA NA RAST BIFIDOBAKTERIJ V MLEKU

Primerna rast in obstojnost bifidobakterij v mleku, predvsem če jih želimo uporabiti kot probiotike v fermentiranih mečnih izdelkih, je zaželjena. Ker pa je naravna ekološka niša bifidobakterij prebavni trakt človeka ali živali, je njihova rast v mleku navadno slabša. Da izboljšamo rast bifidobakterij, lahko mleku dodajamo določene snovi, na primer kvasni ekstrakt.

V nalogi smo opazovali vpliv dodatka kvasnega ekstrakta (0,1 %) na rast bifidobakterij. Pri vsakem vzorčenju smo merili vrednost pH in opazovali morebiten nastanek koaguluma, vzorce pa smo tudi nacepili na gojišče za bifidobakterije za štetje na ploščah. Rezultati so zbrani v preglednicah 16 in 17.

Preglednica 16: Rezultati dinamike rasti bifidobakterij v RPM in RPM s kvasnim ekstraktom, izraženo v KE/ml.

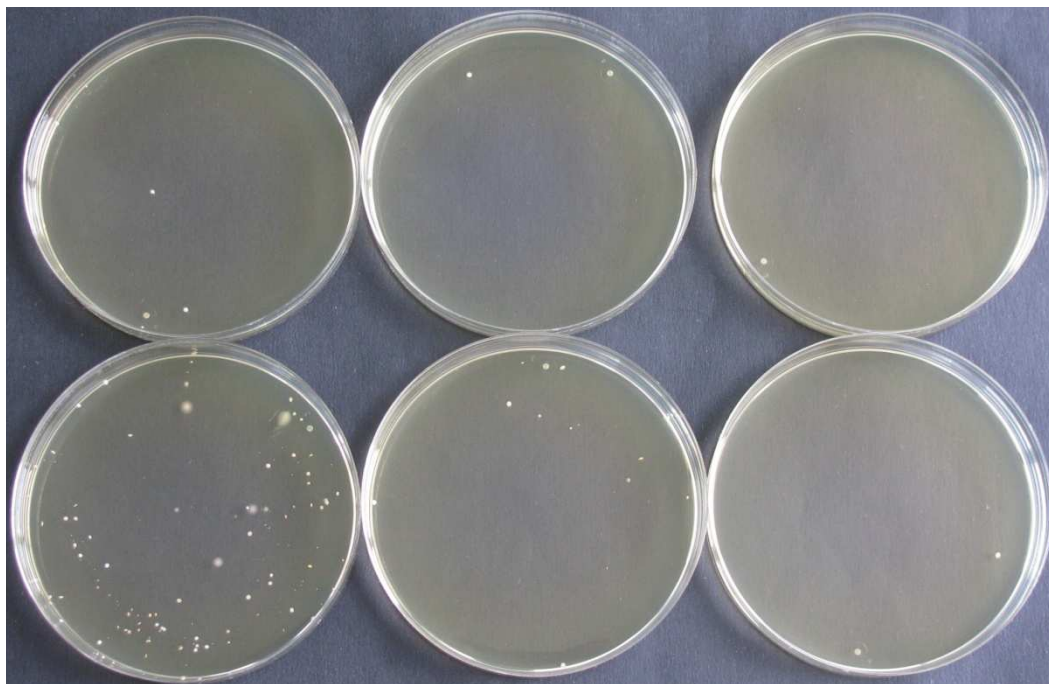
| Izolat      | Čista kultura     | Gojišče | Število bifidobakterij (KE/ml) |                   |                   |                   |                   |
|-------------|-------------------|---------|--------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|             |                   |         | 0 ur                           | 6 ur              | 12 ur             | 24 ur             | 48 ur             |
| IM 386      | $9,09 \cdot 10^7$ | RPM     | $5,0 \cdot 10^5$               | $3,82 \cdot 10^6$ | $6,45 \cdot 10^6$ | $2,91 \cdot 10^6$ | $< 10^7$          |
|             |                   | RPM+ke  | $1,0 \cdot 10^6$               | $7,91 \cdot 10^6$ | $1,65 \cdot 10^7$ | $8,27 \cdot 10^6$ | $1,0 \cdot 10^6$  |
| Waya IT     | $3,82 \cdot 10^8$ | RPM     | $2,59 \cdot 10^6$              | $2,9 \cdot 10^6$  | $1,03 \cdot 10^7$ | $1,82 \cdot 10^7$ | $5,0 \cdot 10^7$  |
|             |                   | RPM+ke  | $2,16 \cdot 10^6$              | $4,27 \cdot 10^6$ | $1,56 \cdot 10^7$ | $3,82 \cdot 10^7$ | $1,32 \cdot 10^9$ |
| Linex       | $8,0 \cdot 10^8$  | RPM     | $8,0 \cdot 10^6$               | $8,18 \cdot 10^5$ | $< 10^6$          | $< 10^7$          | $< 10^8$          |
|             |                   | RPM+ke  | $5,18 \cdot 10^6$              | $8,55 \cdot 10^5$ | $2,0 \cdot 10^5$  | $< 10^7$          | $< 10^8$          |
| Linbi       | $8,45 \cdot 10^8$ | RPM     | $3,09 \cdot 10^6$              | $1,96 \cdot 10^7$ | $1,28 \cdot 10^8$ | $1,94 \cdot 10^8$ | $1,0 \cdot 10^8$  |
|             |                   | RPM+ke  | $5,09 \cdot 10^6$              | $3,05 \cdot 10^7$ | $2,36 \cdot 10^8$ | $1,96 \cdot 10^8$ | $5,82 \cdot 10^7$ |
| Yogermine   | $3,64 \cdot 10^9$ | RPM     | $2,36 \cdot 10^6$              | $3,09 \cdot 10^6$ | $5,82 \cdot 10^6$ | $3,27 \cdot 10^6$ | $3,0 \cdot 10^6$  |
|             |                   | RPM+ke  | $1,9 \cdot 10^6$               | $4,0 \cdot 10^6$  | $5,45 \cdot 10^6$ | $1,83 \cdot 10^8$ | $5,7 \cdot 10^8$  |
| Bion3       | $1,01 \cdot 10^9$ | RPM     | $5,72 \cdot 10^6$              | $6,0 \cdot 10^6$  | $5,36 \cdot 10^6$ | $1,0 \cdot 10^6$  | $< 10^7$          |
|             |                   | RPM+ke  | $5,64 \cdot 10^6$              | $6,91 \cdot 10^6$ | $4,64 \cdot 10^6$ | $1,0 \cdot 10^6$  | $< 10^7$          |
| Lacto Seven | $4,27 \cdot 10^8$ | RPM     | $3,64 \cdot 10^6$              | $3,61 \cdot 10^6$ | $6,27 \cdot 10^6$ | $8,36 \cdot 10^7$ | $4,0 \cdot 10^8$  |
|             |                   | RPM+ke  | $4,72 \cdot 10^6$              | $6,09 \cdot 10^6$ | $1,78 \cdot 10^7$ | $2,1 \cdot 10^7$  | $1,0 \cdot 10^7$  |

Iz preglednice 16 je razvidno, da dodatek 0,1 % kvasnega ekstrakta različno vpliva na rast osamljenih bifidobakterij. Glede na rezultate vrstno specifičnih reakcij PCR smo predpostavili, da smo iz izdelkov Waya IT, Yogermine in Linbi uspeli osamiti vrsto *B. animalis* ssp. *lactis*, iz izdelka Linex vrsto *B. infantis*, iz prehranskega dopolnila Bion3 vrsto *B. bifidum* in iz izdelka Lacto Seven vrsto *B. longum*.

Največji vpliv dodatka kvasnega ekstrakta na rast smo opazili pri bifidobakterijah, osamljenih iz izdelkov Waya IT in Yogermine. Pri obeh vidimo, da dodatek kvasnega ekstrakta očitno stimulira rast, saj je rast v gojišču z dodatkom kvasnega ekstrakta mnogo boljša. Za oba seva bifidobakterij smo potrdili, da pripadata vrsti *B. animalis* ssp. *lactis*. Iz preglednice 16 je razvidno, da je bila velikost izhodne populacije bifidobakterij iz Waya IT, podobna tako v RPM kot tudi v RPM+ke ( $2,59 \cdot 10^6$  KE/ml oz.  $2,16 \cdot 10^6$  KE/ml). Po 48-ih urah pa je bila koncentracija opazno boljša v RPM+ke. V RPM po 48-urah je velikost populacije bifidobakterij dosegla  $5,0 \cdot 10^7$  KE/ml, kar je manj v primerjavi z RPM+ke, kjer le bila kar  $1,32 \cdot 10^9$  KE/ml. Na sliki 25, ki prikazuje rast osamljenega seva iz prehranskega dopolnila Waya IT v RPM in RPM+ke, je lepo razvidno, da je rast seva bistveno boljša na gojiščih z dodatkom kvasnega ekstrakta. Podobne rezultate smo dobili tudi pri sevu bifidobakterij iz izdelka Yogermine, saj je bila rast prvih 24 ur boljša ob dodatku kvasnega ekstrakta. Med 24. in 48. uro sev v mleku ni več rasel, v mleku s kvasnim ekstraktom pa še.

Tudi sev, osamljen iz izdelka Linbi se je izkazal za predstavnika vrste *B. animalis* ssp. *lactis*, vendar pa iz rezultatov iz preglednice 16 ne moremo zaključiti, da dodatek kvasnega ekstrakta stimulira rast tega seva. Rast je bila prvih 24 ur primerljiva v obeh medijih. Zatem se je začelo odmiranje, ki je bilo hitrejše v RPM+ke kot v RPM.





Slika 25: Primerjava rasti bifidobakterije iz prehranskega dopolnila Waya IT po 48-urah v RPM (zgoraj) in v RPM+ke (spodaj). Analizirane so razredčitve  $10^{-6}$  (levi petrijevki),  $10^{-7}$  (srednji petrijevki) in  $10^{-8}$  (desni petrijevki).

Iz preglednice 16 vidimo, da kvasni ekstrakt ne stimulira rasti seva bifidobakterij IM 386. Pri bakterijah seva IM 386, ki so bile potrjene kot predstavnice vrste *B. breve* (Krajnik, 2009), lahko opazimo, da je v RPM+ke velikost populacije bifidobakterij po 48-ih urah enaka velikosti populacije ob nacepiti,  $1 \cdot 10^6$  KE/ml. Za razliko pa v RPM po 48-ih urah nismo potrdili kultivabilnih celic seva. V mediju RPM+ke smo po 12-ih urah zabeležili celo manjše povečanje števila KE na  $1,65 \cdot 10^7$  KE/ml. Iz rezultatov lahko zaključimo, da dodatek kvasnega ekstrakta ne vpliva na boljšo rast, upočasnjuje pa odmiranje seva.

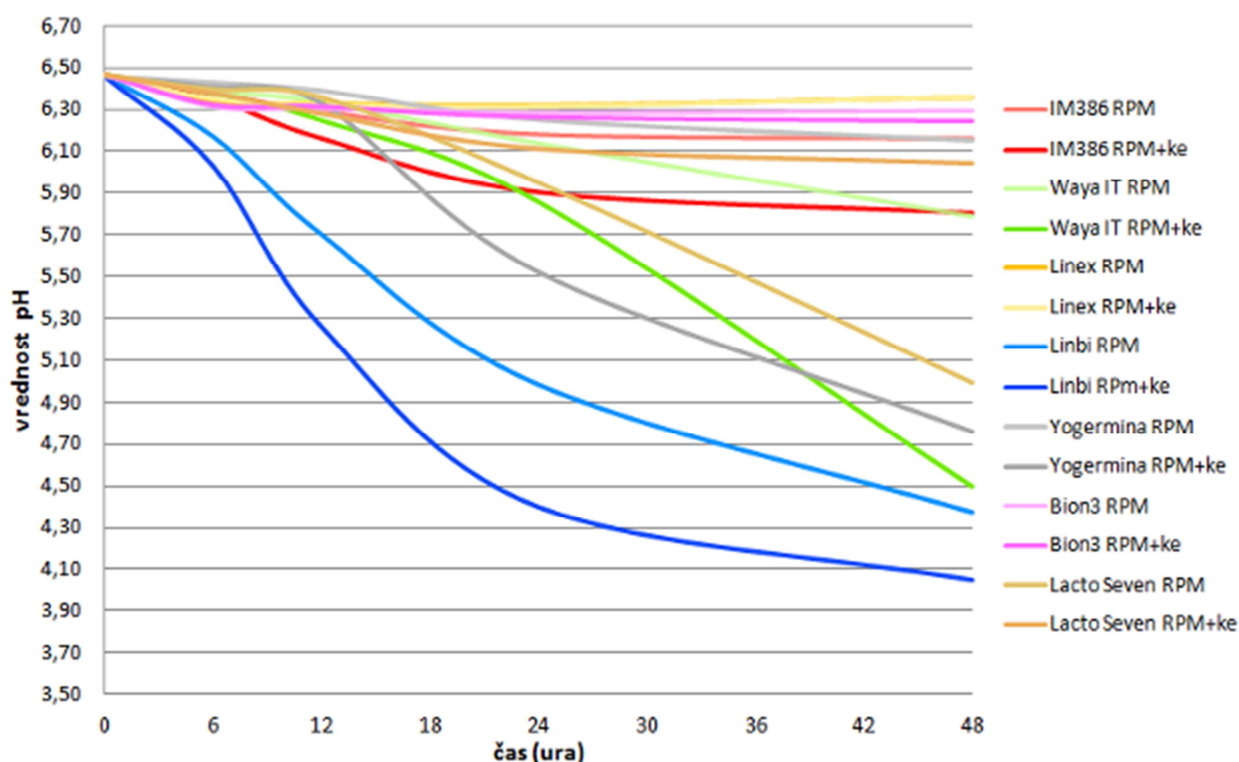
Bifidobakterije iz izdelka Linex v nobenem od gojišč niso rasle, pač pa so začele odmirati že pred drugim vzorčenjem, po šestih urah. Slabo rast smo zabeležili tudi pri izolatih bifidobakterij iz izdelka Bion3 v prvih šestih urah inkubacije, zatem pa so v obeh gojiščih začele hitro odmirati. Pri bifidobakterijah iz izdelka Bion3 so bili rezultati štetja na ploščah za vzorca, odvzeta po 48-ih urah iz RPM ali iz RPM+ke, pod mejo detekcije, iz česar lahko sklepamo, da smo nacepili previsoke razredčitve ali pa da kultura ni preživel. Za ta dva seva lahko zaključimo, da ne raste v mleku, prav tako dodatek kvasnega ekstrakta ne izboljša rasti.

Bifidobakterije iz izdelka Lacto Seven, za katere smo potrdili da pripadajo vrsti *B. longum*, so prvih 12 ur pokazale boljšo rast v RPM, nadaljnjih 12 ur se je rast upočasnila, med vzorčenjem po 24 urah je koncentracija celo upadla. V RPM pa je bila rast počasnejša, ampak se je število povečevalo tudi med 24. in 48. uro vzorčenja, koncentracija pa je presegla tisto v RPM+ke. Zaključimo lahko, da dodajanje kvasnega ekstrakta pozitivno vpliva le prve ure inkubacije, zatem pa jo celo upočasnjuje.

Preglednica 17: Rezultati merjenja vrednosti pH v gojiščih RPM in RPM+ke, nacepljenih z različnimi izolati bifidobakterij.

| Izolat      | Pred nacepitvijo | Gojišče | Vrednost pH |       |       |       |
|-------------|------------------|---------|-------------|-------|-------|-------|
|             |                  |         | 6 ur        | 12 ur | 24 ur | 48 ur |
| IM 386      | 6,46             | RPM     | 6,38        | 6,29  | 6,18  | 6,16  |
|             | 6,46             | RPM+ke  | 6,35        | 6,16  | 5,90  | 5,80  |
| Waya IT     | 6,47             | RPM     | 6,39        | 6,34  | 6,14  | 5,79  |
|             | 6,47             | RPM+ke  | 6,38        | 6,25  | 5,86  | 4,50  |
| Linex       | 6,47             | RPM     | 6,34        | 6,33  | 6,32  | 6,36  |
|             | 6,47             | RPM+ke  | 6,35        | 6,32  | 6,31  | 6,36  |
| Linbi       | 6,46             | RPM     | 6,17        | 5,70  | 4,98  | 4,37  |
|             | 6,46             | RPM+ke  | 6,03        | 5,26  | 4,40  | 4,05  |
| Yogermana   | 6,46             | RPM     | 6,43        | 6,39  | 6,25  | 6,15  |
|             | 6,46             | RPM+ke  | 6,41        | 6,33  | 5,52  | 4,76  |
| Bion3       | 6,47             | RPM     | 6,31        | 6,30  | 6,28  | 6,29  |
|             | 6,47             | RPM+ke  | 6,32        | 6,31  | 6,26  | 6,24  |
| Lacto Seven | 6,47             | RPM     | 6,40        | 6,36  | 5,95  | 4,99  |
|             | 6,47             | RPM+ke  | 6,38        | 6,28  | 6,11  | 6,04  |

Bifidobakterije fermentirajo laktozo, pri čemer nastajata mlečna in očetna kislina, zato je bilo pričakovati, da se bo med rastjo bifidobakterij vrednost pH gojišč znižala. To se ni zgodilo pri vzorcih, nacepljenih z bifidobakterijami iz izdelkov Linex in Bion3 (Preglednica 17 in Slika 26). Pri obeh izdelkih je vrednost pH med 48-urno inkubacijo ostala visoka, kar se sklada z rezultati ugotavljanja KE/ml. Rezultati kažejo na slabo rast obeh sevov v mleku ali mleku s kvasnim ekstraktom.



Slika 26: Grafični prikaz padanja vrednosti pH med 48-urno inkubacijo bifidobakterij, osamljenih iz različnih izdelkov, v RPM ali RPM+ke.



Pri bifidobakterijah IM 386 in izolatih iz Waya IT, Linbi, Yogermana in Lacto Seven pa je lepo opazen padec vrednosti pH, ki je posledica rasti. Pri IM 386, Waya IT, Linbi in Yogermana je padec pH vrednosti večji v mediju RPM+ke, pri Lacto Seven pa v mediju RPM. To je v skladu z rezultati štetja bifidobakterij na ploščah. Pri bifidobakterijah seva IM 386, ki so predstavnice vrste *B. breve*, smo zabeležili razmeroma majhno znižanje vrednosti pH po 48-ih urah, in sicer iz 6,46 na 6,16 v RPM in na 5,80 v RPM+ke. Veliko večji padec vrednosti pH pa smo zabeležili pri bifidobakterijah, osamljenih iz izdelkov Waya IT, Yogermana in Linbi, pri katerih smo potrdili pripadnost vrsti *B. animalis* ssp. *lactis*. Pri izdelku Waya IT smo v RPM+ke zabeležili velik padec vrednosti pH, in sicer je ta po 48-ih urah padel iz začetne vrednosti 6,47 na 4,50. V RPM pa je bil padec bistveno manjši, saj je z enake začetne vrednosti po 48-ih urah padel na vrednost 5,79. Pri vrsti *B. animalis* ssp. *lactis* iz izdelka Yogermana je vrednost pH z začetne vrednosti 6,46 po 48-ih urah padla v RPM na vrednost 6,15 in v RPM+ke na 4,76. Na sliki 26 je lepo razvidno, da je pri vzorcu Waya IT in Yogermana največja razlika v vrednosti pH v obeh medijih. Prav tako lahko rezultate primerjamo s preglednico 16, kjer vidimo, da je padec vrednosti pH pri izdelku Waya IT in Yogermana sorazmeren s povišanjem števila KE. Pri sevu iz izdelka Linbi, pa smo po 48-ih urah zabeležili padec z začetne vrednosti 6,46 v mediju RPM na vrednost 4,37 in v RPM+ke na 4,05. Iz rezultatov lahko sklepamo, da sevi vrste *B. breve* in *B. animalis* ssp. *lactis* bolje izkoriščajo kvasni ekstrakt kot vir hrane. Pri sevu Lacto Seven, ki pripada vrsti *B. longum*, pa je bil padec vrednosti pH občutno večji v RPM. Skladno s povečanjem števila KE v RPM, je bilo opaziti tudi večji padec vrednosti pH. Iz začetne vrednosti 6,47 je le-ta padla po 48-ih urah na 4,99 v RPM, medtem ko je bil v RPM+ke padec vrednosti zelo majhen.

Preglednica 18: Nastanek koaguluma in prisotnost vonja po očetni kislini po 48 urah inkubacije bifidobakterij v RPM in RPM+ke.

| Izvor sevov bifidobakterij | medij  | nastanek koaguluma | vonj po očetni kislini |
|----------------------------|--------|--------------------|------------------------|
| IM 386                     | RPM    | ne                 | ne                     |
|                            | RPM+ke | ne                 | ne                     |
| Waya IT                    | RPM    | ne                 | ne                     |
|                            | RPM+ke | da                 | izrazit močan vonj     |
| Linex                      | RPM    | ne                 | ne                     |
|                            | RPM+ke | ne                 | ne                     |
| Linbi                      | RPM    | da                 | ne                     |
|                            | RPM+ke | da                 | rahel                  |
| Yogermana                  | RPM    | ne                 | ne                     |
|                            | RPM+ke | da                 | izrazit močan vonj     |
| Bion3                      | RPM    | ne                 | ne                     |
|                            | RPM+ke | ne                 | ne                     |
| Lacto Seven                | RPM    | da                 | rahel                  |
|                            | RPM+ke | ne                 | rahel                  |

Mleko med fermentacijo koagulira zaradi zniževanja vrednosti pH, ki je posledica nastajanja kislin. Začetek kislinske koagulacije se prične pri vrednosti pH 5,2-5,3, ko pride do destabilizacije kazeinskih micel, in se konča, ko dosežemo izoelektrično točko, to je pri vrednosti pH 4,6-4,7. V tem območju so beljakovinske molekule električno nevtralne in posledično najmanj topne, kar pa vodi do koagulacije kazeina. Iz preglednice 18 je razvidno, da je do nastanka koaguluma prišlo v vzorcih, kjer je bila končna vrednost pH nižja od 4,99 oz. da se koagulum ni tvoril pri vzorcih, kjer je bila končna vrednost pH višja od 5,79. Pri

bifidobakterijah iz izdelka Waya IT smo poleg močno znižanega pH na 4,50 v RPM+ke opazili tudi nastanek koaguluma, česar v RPM, kjer je pH znašal 5,79 nismo zaznali. Podobno je bilo tudi pri izolatu iz Yogermina, kjer je v gojišču RPM+ke vrednost pH padla na 4,76 in smo zabeležili nastanek koaguluma, v RPM pa je vrednost pH ostala visoka in posledično ni prišlo do nastanka koaguluma. Pri bifidobakteriji osamljeni iz Linbi pa smo opazili nastanek koaguluma v obeh medijih, saj smo po 48-ih urah zabeležili visok padec vrednosti pH v mediju RPM na vrednost 4,37 in v RPM+ke na 4,05. Pričakovano je koagulum nastal tudi med inkubacijo bifidobakterij iz izdelka Lacto Seven v gojišču RPM, v katerem smo po 48 urah izmerili pH 4,99. Nasprotno, v RPM+ke do tega ni prišlo, ker je vrednost pH ostala previsoka (okrog 6, po 48 urah inkubacije). Pri bifidobakterijah *B. breve* IM 386, sevu *B. infantis* iz izdelka Linex in sevu *B. bifidum* iz izdelka Bion3 je vrednost pH med inkubacijo ves čas ostala visoka (nad 5,79) in posledično v nobenem od gojišč nismo zaznali nastanka koaguluma. Lepo se vidi povezava med vrednostjo pH in tvorbo koaguluma. Pri slabem razvoju kisline med fermentacijo in posledično nizki kislosti vzorca se koagulum ni tvoril oz. se je tvoril počasneje.

Bifidobakterije spadajo med heterofermentativne bakterije, kar pomeni, da sta končna produkta fermentacije laktoze očetna in mlečna kislina. Da bi preverili, če se je med fermentacijo tvorila tudi očetna kislina, smo po končani analizi preverili vonj. Pri večini vzorcev, z nižjo vrednostjo pH, kjer je prišlo tudi do nastanka koaguluma, je bilo zaznati prisotnost vonja po očetni kislini, ki je bil različno močno izražen. Izjema je pri vzorcu Linbi, kjer je v obeh medijih vrednost pH močno padla in je prišlo do nastanka koaguluma, prisotnost rahlega vonja po očetni kislini pa smo zaznali le v mediju RPM+ke. Pri izdelku Waya IT in Yogermina smo v medijih RPM+ke, kjer smo zabeležili visok padec vrednosti pH, zaznali tudi intenziven vonj po očetni kislini. Rahel vonj po očetni kislini smo zabeležili tudi v obeh gojiščih po gojenju bifidobakterij iz izdelka Lacto Seven, čeprav je v gojišču RPM+ke vrednost pH ostala visoka in koagulum ni nastal. Pri IM 386 in izdelkih Linex ter Bion3 nismo zaznali vonja po očetni kislini, kar je posledica slabe tvorbe kislin, saj vrednost pH v nobenem od vzorcev ni bila nižja od 5,80. Iz naših rezultatov se lepo vidi povezava med nižjo vrednostjo pH, ki je posledica večjega nastanka kislin in intenzivnostjo vonja po očetni kislini.

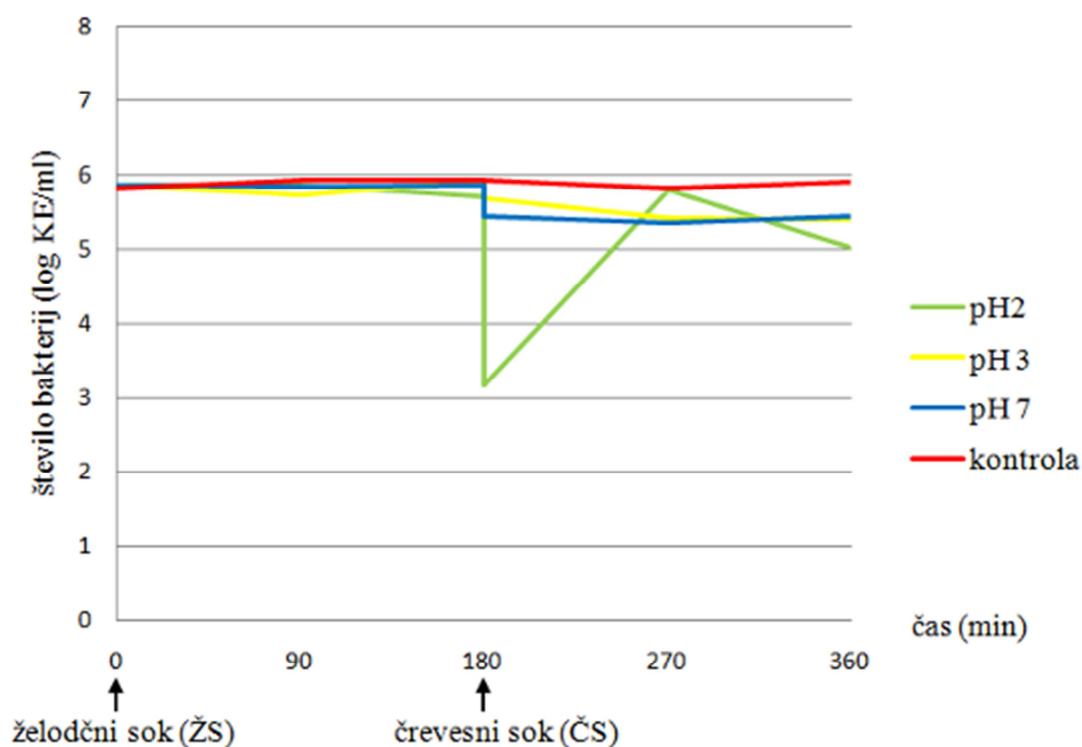
#### 4.5 PREŽIVETJE BIFIDOBAKTERIJ V SIMULIRANIH RAZMERAH PREBAVIL

Ker je prehod skozi želodec in tanko črevo za probiotične mikroorganizme ključnega pomena, smo želeli ugotoviti, kako na različne bifidobakterije vplivajo posamezni dejavniki v prebavilih. Celice 48-urnih kultur testnih izolatov smo izpostavili simuliranemu okolju, kakršno vlada v prebavnem traktu. Najprej smo bifidobakterije izpostavili za 180 minut ŽS z različnimi vrednostmi pH (2, 3 ali 7) in nato še za 180 minut ČS. Vzorčili smo pri času 0, 90, 180, 270 in 360 minutah in število preživelih mikroorganizmov ugotavljali z metodo štetja na ploščah. Za primerjavo smo v analizo vključili kontrolo. Kontrolo je predstavljala peptonska voda z 1 % vcepkom čiste kulture posamezne bifidobakterije.

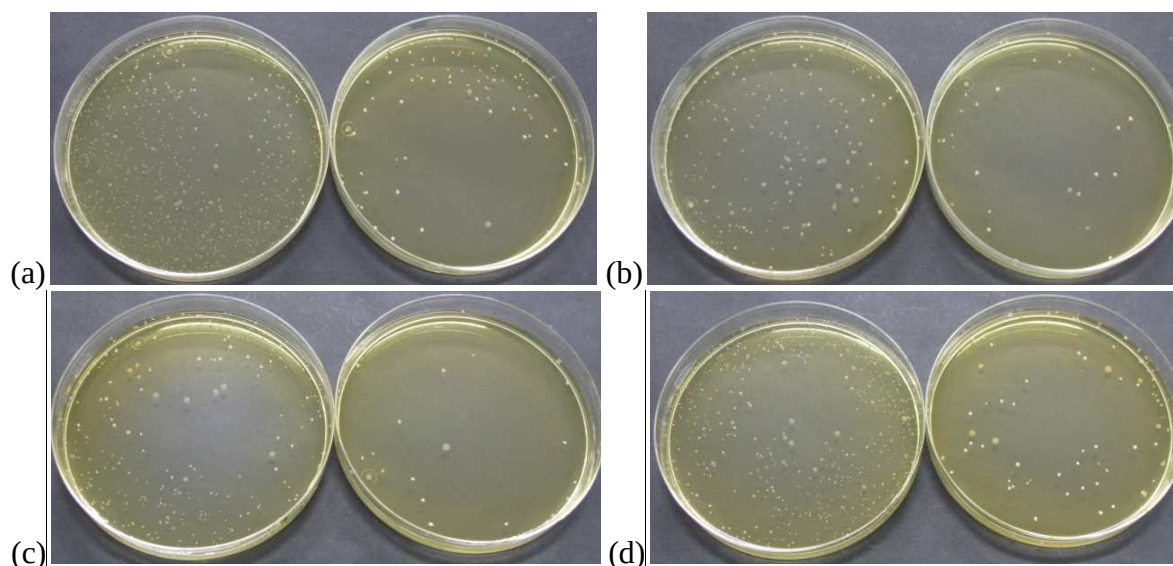
Preglednica 19: Preživelost *B. breve* IM 386 v simuliranih razmerah prebavil, izražena v KE/ml.

| Število KE/ml seva <i>B. breve</i> IM 386 |                   |                   |                   |                   |
|-------------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                                           | pH 2              | pH 3              | pH 7              | kontrola          |
| Želodčni sok                              |                   |                   |                   |                   |
| 0 min                                     | $7,40 \cdot 10^5$ | $7,64 \cdot 10^5$ | $7,45 \cdot 10^5$ | $6,64 \cdot 10^5$ |
| 90 min                                    | $7,40 \cdot 10^5$ | $5,36 \cdot 10^5$ | $6,91 \cdot 10^5$ | $8,73 \cdot 10^5$ |
| 180 min                                   | $5,31 \cdot 10^5$ | $8,50 \cdot 10^5$ | $7,40 \cdot 10^5$ | $8,55 \cdot 10^5$ |
| Črevesni sok                              |                   |                   |                   |                   |
| 180 min                                   | $1,50 \cdot 10^3$ | $4,90 \cdot 10^5$ | $2,86 \cdot 10^5$ | $8,55 \cdot 10^5$ |
| 270 min                                   | $6,40 \cdot 10^5$ | $2,62 \cdot 10^5$ | $2,34 \cdot 10^5$ | $6,80 \cdot 10^5$ |
| 360 min                                   | $1,07 \cdot 10^5$ | $2,55 \cdot 10^5$ | $2,80 \cdot 10^5$ | $8,30 \cdot 10^5$ |

Iz preglednice 19 ter slik 27 in 28 vidimo, da se število preživelih bifidobakterij *B. breve* IM 386 med trajanjem preskusa ni bistveno spreminjalo. Sev IM 386 je odporen tako proti ŽS kot tudi ČS, saj smo po 360 minutah še vedno ugotovili število KE/ml, ki je bilo podobno izhodiščnemu. Po dodatku črevesnega soka (vzorčenje po 180-ih minutah) smo padec števila KE/ml zabeležili le pri seriji, ki je bila prej tretirana z ŽS z vrednostjo pH 2, med nadaljnjim inkubiranjem, do 270. minute, pa je število KE bakterij zopet naraslo. Sklepamo, da je dodatek ČS najverjetneje pomenil šok za kulturo, kar nakazujejo tudi rezultati vzorčenja takoj po dodatku ČS, ko je število KE padlo za 2,54 logaritemske enote. Iz teh rezultatov lahko predvidevamo, da je sev *B. breve* IM 386 odporen tako proti ŽS kot tudi proti ČS.



Slika 27: Grafični prikaz preživelosti seva IM 386 (log KE/ml) v simuliranih razmerah prebavil.

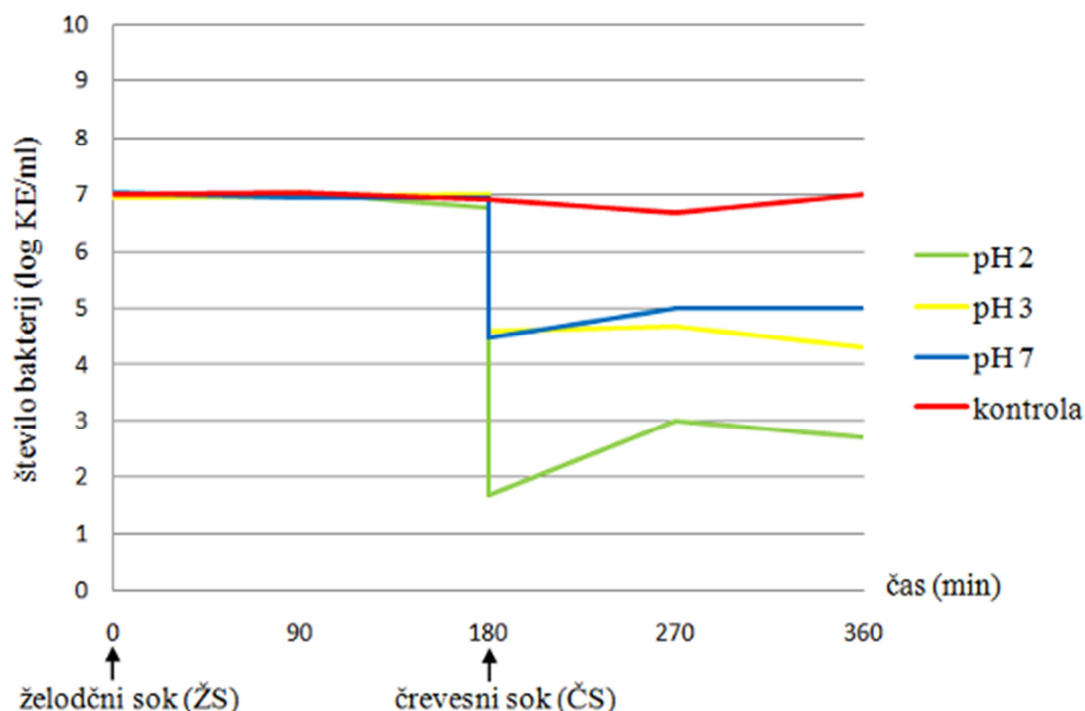


Slika 28: Spremljanje preživelosti seva *B. breve* IM 386 v simuliranih razmerah prebavil s cepljenjem na trdno gojišče. pH2 po 360 minutah, razredčitvi  $10^{-2}$  in  $10^{-3}$  (a), pH3 po 360 minutah, razredčitvi  $10^{-3}$  in  $10^{-4}$  (b), pH7 po 360 minutah, razredčitvi  $10^{-3}$  in  $10^{-4}$  (c) in kontrola po 360 minutah, razredčitvi  $10^{-3}$  in  $10^{-4}$  (d).

Preglednica 20: Preživelost bifidobakterij, osamljenih iz izdelka Waya IT, v simuliranih razmerah prebavil, izražena v KE/ml.

| Število KE/ml seva <i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> iz Waya IT |                   |                   |                   |                   |
|---------------------------------------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                                                                     | pH 2              | pH 3              | pH 7              | kontrola          |
| Želodčni sok                                                        |                   |                   |                   |                   |
| 0 min                                                               | $9,09 \cdot 10^6$ | $9,0 \cdot 10^6$  | $1,08 \cdot 10^7$ | $1,0 \cdot 10^7$  |
| 90 min                                                              | $1,13 \cdot 10^7$ | $9,36 \cdot 10^6$ | $9,0 \cdot 10^6$  | $1,08 \cdot 10^7$ |
| 180 min                                                             | $6,20 \cdot 10^6$ | $1,05 \cdot 10^7$ | $9,0 \cdot 10^6$  | $8,45 \cdot 10^6$ |
| Črevesni sok                                                        |                   |                   |                   |                   |
| 180 min                                                             | $5,0 \cdot 10^1$  | $1,0 \cdot 10^4$  | $3,0 \cdot 10^4$  | $8,45 \cdot 10^6$ |
| 270 min                                                             | $1,0 \cdot 10^3$  | $5,0 \cdot 10^4$  | $3,0 \cdot 10^5$  | $9,91 \cdot 10^6$ |
| 360 min                                                             | $5,0 \cdot 10^2$  | $2,0 \cdot 10^4$  | $1,0 \cdot 10^5$  | $1,03 \cdot 10^7$ |

Iz preglednice 20 in slike 29 vidimo, da ŽS ne vpliva negativno na preživelost bifidobakterij iz prehranskega dopolnila Waya IT. Opazili pa smo drastičen upad števila KE takoj, ko so le te prišle v stik s ČS. Največji upad števila smo opazili pri seriji, kjer so bile celice tretirane z ŽS vrednosti pH 2, saj se je takoj po izpostavitvi ČS število KE zmanjšalo za 5,09 logaritmskih enot. Zanimivo je, da se pri preživelem delu populacije število KE ni več zmanjšalo med nadaljnjo inkubacijo v ČS. Upad števila KE pri serijah, tretiranih z ŽS vrednosti pH 3 oz. pH 7, je bil manjši, za 3,02 oz. 2,47 logaritmskih enot. Zaključimo lahko, da je sev vrste *B. animalis* ssp. *lactis* iz izdelka Waya IT dobro odporen proti nizkem pH in encimu pepsinu, vendar pa zelo občutljiv na žolčne soli in encime trebušne slinavke. Bakterije, ki so bile v prvih 180 minutah izpostavljene zelo kislemu okolju (pH=2), so slabše prenesle vpliv črevesnega soka.

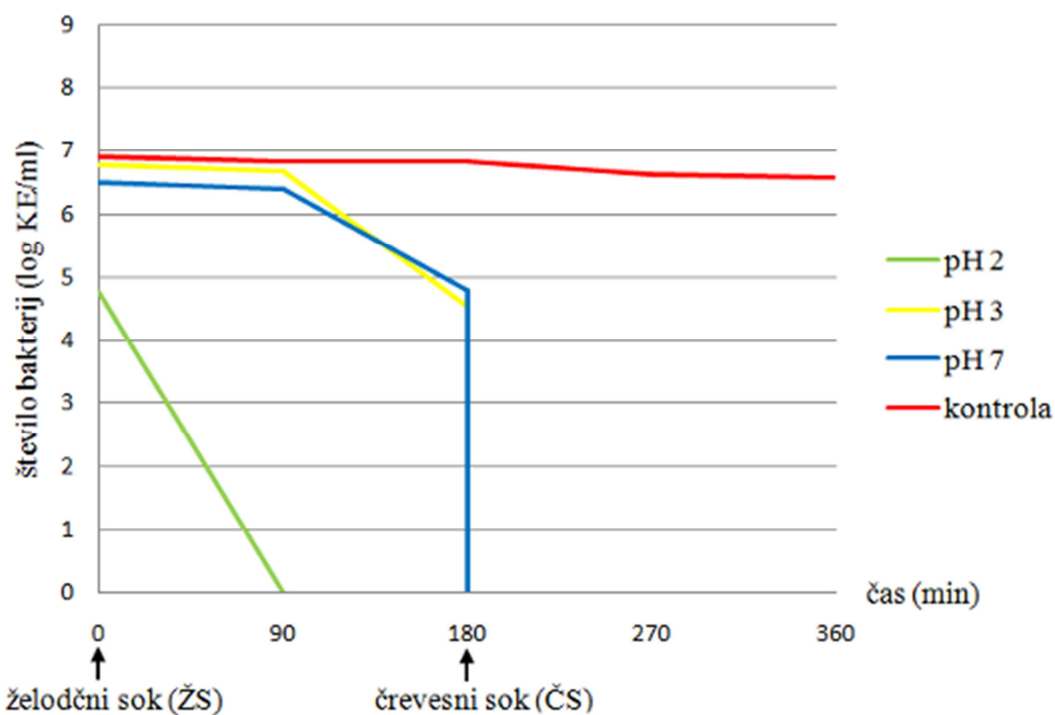


Slika 29: Grafični prikaz preživelosti bifidobakterij (log KE/ml) osamljenih iz Waya IT, v simuliranih razmerah prebavil.

Preglednica 21: Preživelost bifidobakterij, osamljenih iz izdelka Linex, v simuliranih razmerah prebavil, izraženo v KE/ml.

| Število KE/ml seva <i>B. infantis</i> iz Linex |                  |                  |                  |                   |
|------------------------------------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|
|                                                | pH 2             | pH 3             | pH 7             | kontrola          |
| Želodčni sok                                   |                  |                  |                  |                   |
| 0 min                                          | $5,9 \cdot 10^4$ | $6,0 \cdot 10^6$ | $3,1 \cdot 10^6$ | $8,0 \cdot 10^6$  |
| 90 min                                         | ni rasti         | $4,8 \cdot 10^6$ | $2,6 \cdot 10^6$ | $6,7 \cdot 10^6$  |
| 180 min                                        | ni rasti         | $3,5 \cdot 10^4$ | $6,3 \cdot 10^4$ | $6,6 \cdot 10^6$  |
| Črevesni sok                                   |                  |                  |                  |                   |
| 180 min                                        | ni rasti         | ni rasti         | ni rasti         | $6,6 \cdot 10^6$  |
| 270 min                                        | ni rasti         | ni rasti         | ni rasti         | $4,18 \cdot 10^6$ |
| 360 min                                        | ni rasti         | ni rasti         | ni rasti         | $4,54 \cdot 10^6$ |

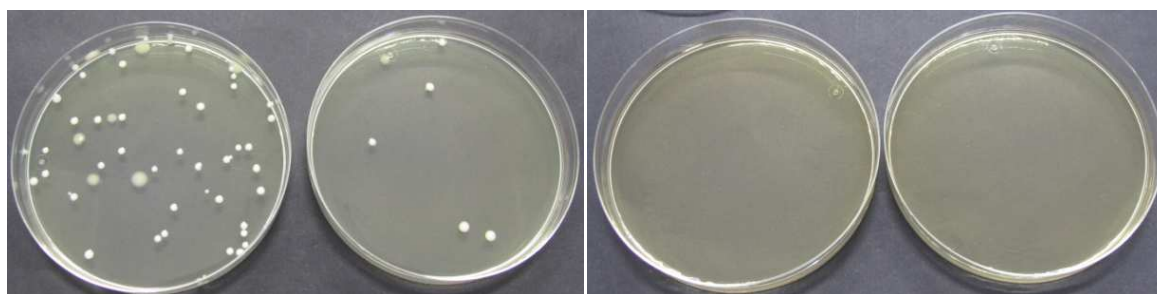
Iz preglednice 21 in slike 30 vidimo dinamiko preživelosti bifidobakterij, osamljenih iz izdelka Linex, v simuliranih razmerah prebavil. Rezultati kažejo, da je sev precej občutljiv, saj se je takoj po izpostavitvi ŽS z vrednostjo pH 2 število zmanjšalo za približno dve logaritemski enoti, kar lahko vidimo iz primerjave s kontrolnim vzorcem. Po 90 minutah v tem vzorcu nismo ugotovili kultivabilnih bakterij. Število KE se je v 180 minutah zmanjšalo za približno dve logaritemski enoti tudi v ŽS s pH 3 ali 7. Po dodatku ČS pa tudi pri teh dveh serijah nismo več zaznali KE/ml. Na podlagi rezultatov lahko sklepamo, da je *B. infantis*, osamljen iz izdelka Linex izredno občutljiv, tako za nizke vrednosti pH, kot tudi za žolčne soli.



Slika 30: Grafični prikaz preživelosti (log KE/ml) bifidobakterij, osamljenih iz izdelka Linex, v simuliranih razmerah prebavil.

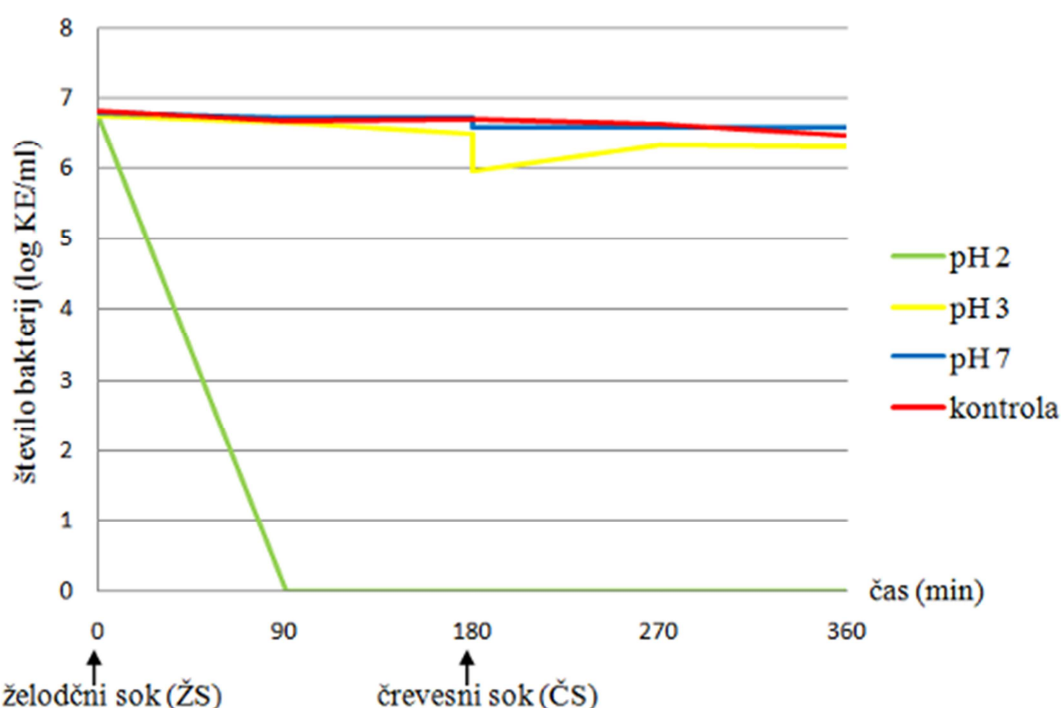
Preglednica 22: Preživelost bifidobakterij, osamljenih iz izdelka Linbi, v simuliranih razmerah prebavil, izražena v KE/ml.

| Število KE/ml seva <i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> iz Linbi |                   |                   |                   |                   |
|-------------------------------------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                                                                   | pH 2              | pH 3              | pH 7              | kontrola          |
| Želodčni sok                                                      |                   |                   |                   |                   |
| 0 min                                                             | $5,64 \cdot 10^6$ | $5,82 \cdot 10^6$ | $6,18 \cdot 10^6$ | $6,73 \cdot 10^6$ |
| 90 min                                                            | ni rasti          | $4,45 \cdot 10^6$ | $5,55 \cdot 10^6$ | $4,91 \cdot 10^6$ |
| 180 min                                                           | ni rasti          | $3,22 \cdot 10^6$ | $5,3 \cdot 10^6$  | $5,18 \cdot 10^6$ |
| Črevesni sok                                                      |                   |                   |                   |                   |
| 180 min                                                           | ni rasti          | $9,2 \cdot 10^5$  | $3,8 \cdot 10^6$  | $5,18 \cdot 10^6$ |
| 270 min                                                           | ni rasti          | $2,19 \cdot 10^6$ | $3,8 \cdot 10^6$  | $4,27 \cdot 10^6$ |
| 360 min                                                           | ni rasti          | $2,04 \cdot 10^6$ | $4,02 \cdot 10^6$ | $3,0 \cdot 10^6$  |



Slika 31: Spremljanje preživelosti izolata iz prehranskega dopolnila Linbi v simuliranih razmerah želodca (pH 2), s štetjem na trdnem gojišču. Levi plošči: vzorec, nacepljen takoj po dodatku ŽS (razredčitvi  $10^{-5}$  in  $10^{-6}$ ) in desni plošči: vzorec, nacepljen po 90 minutnem tretiranju v ŽS s pH 2 (nerazredčen vzorec in razredčitev  $10^{-1}$ ).

Preglednica 22 in slika 32 prikazujeta dinamiko preživelosti bifidobakterij, osamljenih iz prehranskega dopolnila Linbi, v simuliranih razmerah prebavil. Za ta izolat predvidevamo, da pripada vrsti *B. animalis* ssp. *lactis*. Kot je razvidno s slike 31, sev ne preživi 90 minutne izpostavljenosti ŽS z vrednostjo pH 2, precej boljšo preživelost pa izkazuje pri obdelavi z ŽS pri višjih vrednostih pH (pH 3 in 7). Pri teh dveh serijah je število KE ves čas ostalo zelo podobno številu KE pri kontrolnem vzorcu. Pri pH 3 vidimo rahel upad števila KE po dodatku ČS, vendar se je med nadaljnjo inkubacijo število KE zopet zelo približalo številu pri kontrolnem vzorcu. Za ta izolat lahko rečemo, da izkazuje slabo preživelost le v zelo kislem okolju, dobro pa prenese žolčne soli in encime trebušne slinavke.



Slika 32: Grafični prikaz preživelosti bifidobakterije (log KE/ml) osamljene iz Linbi, v simuliranih razmerah prebavil.

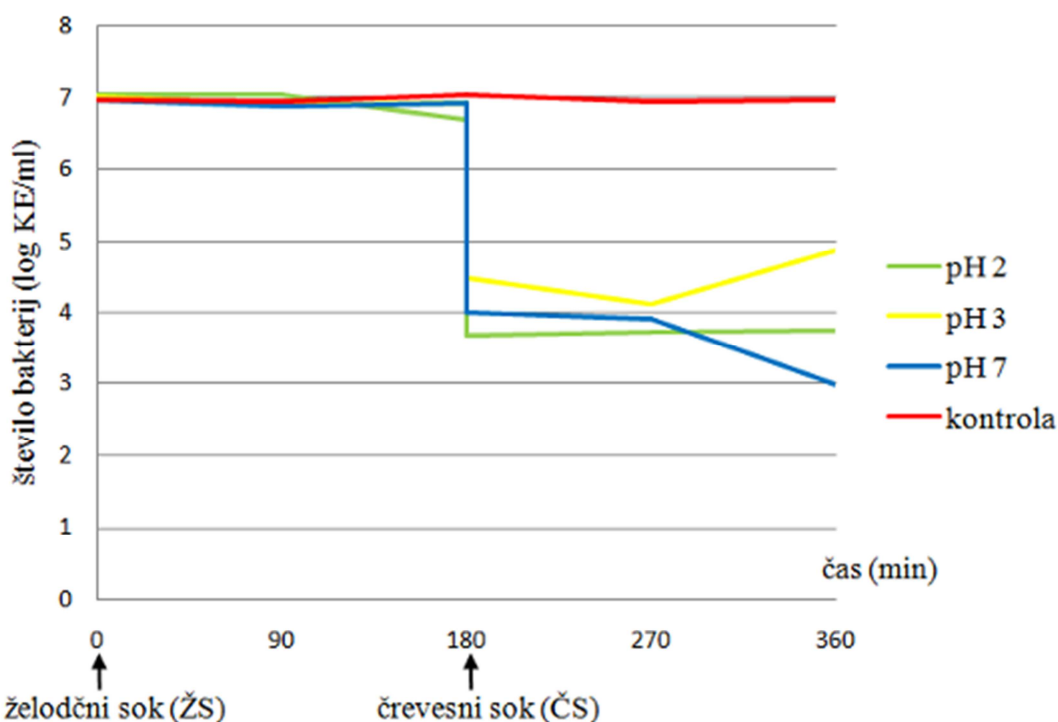
Preglednica 23: Preživelost bifidobakterij, osamljenih iz izdelka Yogermina, v simuliranih razmerah prebavil, izraženo v KE/ml.

| Število KE/ml seva <i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> iz Yogermina |                   |                   |                   |                   |
|-----------------------------------------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                                                                       | pH 2              | pH 3              | pH 7              | kontrola          |
| Želodčni sok                                                          |                   |                   |                   |                   |
| 0 min                                                                 | $1,08 \cdot 10^7$ | $1,05 \cdot 10^7$ | $9,27 \cdot 10^6$ | $9,27 \cdot 10^6$ |
| 90 min                                                                | $1,06 \cdot 10^7$ | $8,18 \cdot 10^6$ | $7,55 \cdot 10^6$ | $8,64 \cdot 10^6$ |
| 180 min                                                               | $5,0 \cdot 10^6$  | $8,5 \cdot 10^6$  | $8,4 \cdot 10^6$  | $1,07 \cdot 10^7$ |
| Črevesni sok                                                          |                   |                   |                   |                   |
| 180 min                                                               | $1,8 \cdot 10^3$  | $3,0 \cdot 10^4$  | $1,0 \cdot 10^4$  | $1,07 \cdot 10^7$ |
| 270 min                                                               | $5,2 \cdot 10^3$  | $1,3 \cdot 10^4$  | $8,0 \cdot 10^3$  | $8,7 \cdot 10^6$  |
| 360 min                                                               | $5,5 \cdot 10^3$  | $7,55 \cdot 10^4$ | $1,0 \cdot 10^3$  | $9,3 \cdot 10^6$  |

Iz preglednice 23 in slike 33 vidimo, da izpostavitve bifidobakterij, osamljenih iz prehranskega dopolnila Yogermina, ŽS različnih vrednosti nima za posledico izgube kultivabilnosti. S slike 33 pa se lepo vidi veliko zmanjšanje števila KE takoj, ko so le te prišle v stik s ČS. Pri vseh treh vrednostih pH je padec števila celic podoben in znaša med 2,4 in 3,4



logaritemskih enot. Preživeli del populacije pa tekom nadaljnjega inkubiranja v ČS ni več izgubljal kultivabilnosti. Iz rezultatov lahko povzamemo, da je sev *B. animalis* ssp. *lactis* iz izdelka Yogermina občutljiv na žolčne soli in encime trebušne slinavke, vendar odporen proti nizkemu pH in encimu pepsinu.



Slika 33: Grafični prikaz preživelosti bifidobakterije (log KE/ml) osamljene iz Yogermina, v simuliranih razmerah prebavil.

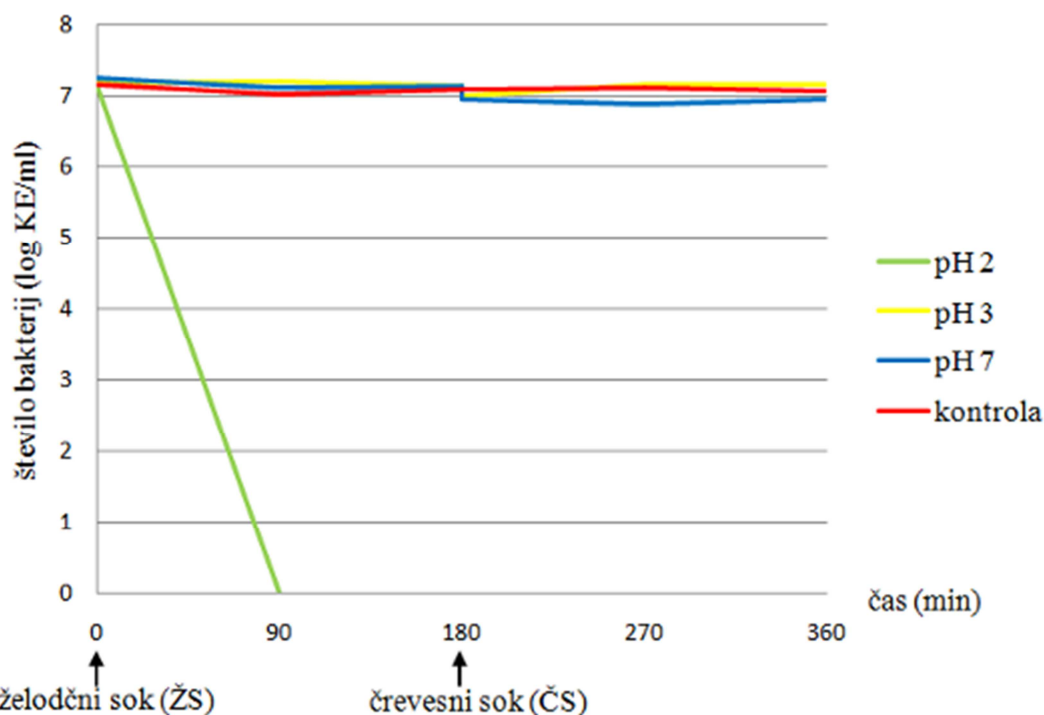
Preglednica 24: Preživelost bifidobakterij, osamljenih iz Bion3, v simuliranih razmerah prebavil, izražena v KE/ml.

| Število KE/ml seva <i>B. bifidum</i> iz Bion3 |                   |                   |                   |                      |
|-----------------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|----------------------|
|                                               | pH 2              | pH 3              | pH 7              | kontrola             |
| Želodčni sok                                  |                   |                   |                   |                      |
| 0 min                                         | $1,38 \cdot 10^7$ | $1,55 \cdot 10^7$ | $1,75 \cdot 10^7$ | $1,47 \cdot 10^7$    |
| 90 min                                        | ni rasti          | $1,58 \cdot 10^7$ | $1,28 \cdot 10^7$ | $1,09 \cdot 10^7$    |
| 180 min                                       | ni rasti          | $1,35 \cdot 10^7$ | $1,37 \cdot 10^7$ | $1,26 \cdot 10^{7*}$ |
| Črevesni sok                                  |                   |                   |                   |                      |
| 180 min                                       | ni rasti          | $1,03 \cdot 10^7$ | $8,9 \cdot 10^6$  | $1,26 \cdot 10^7$    |
| 270 min                                       | ni rasti          | $1,43 \cdot 10^7$ | $7,6 \cdot 10^6$  | $1,32 \cdot 10^7$    |
| 360 min                                       | ni rasti          | $1,43 \cdot 10^7$ | $9,1 \cdot 10^6$  | $1,17 \cdot 10^7$    |

Iz preglednice 24 in slike 34 vidimo dinamiko preživetja bifidobakterij, osamljenih iz prehranskega dopolnila Bion3. Predvidevamo, da izolat pripada vrsti *B. bifidum*. Iz rezultatov vidimo, da je sev občutljiv za nizke vrednosti pH, saj ne preživi 90 minutne izpostavljenosti ŽS z vrednostjo pH 2. Precej boljša pa je preživelost seva pri izpostavljenosti ŽS z višjimi vrednostmi pH, saj je pri pH 3 in pH 7 število KE podobno številu KE pri kontrolnem vzorcu. Tudi po tretiranju s ČS nismo zaznali upada števila KE. Za ta sev lahko rečemo, da slabo preživi pri vrednosti pH 2, medtem ko vrednosti pH, višje od 3, praktično ne vplivajo na



njegovo preživelost. Prav tako je izolat dobro odporen na žolčne soli in encime trebušne slinavke.

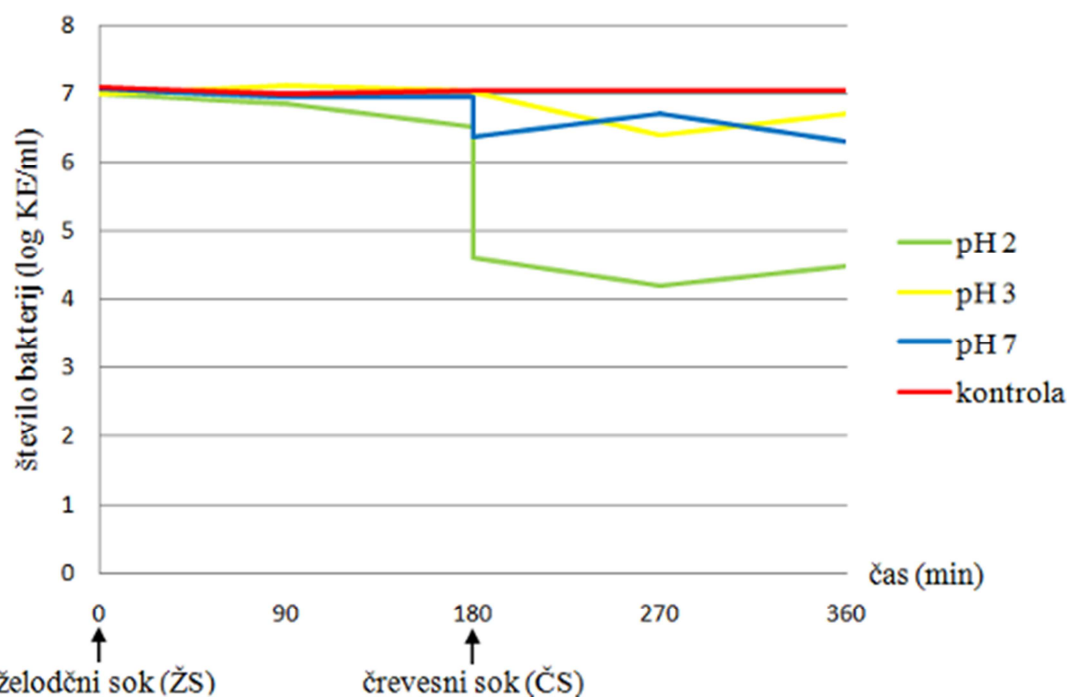


Slika 34: Grafični prikaz preživelosti bifidobakterij (log KE/ml) osamljene iz Bion3, v simuliranih razmerah prebavil.

Preglednica 25: Preživelost bifidobakterij, osamljenih iz Lacto Seven, v simuliranih razmerah prebavil, izraženo v KE/ml.

| Število KE/ml seva <i>B. longum</i> iz Lacto Seven |                   |                   |                   |                   |
|----------------------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                                                    | pH 2              | pH 3              | pH 7              | kontrola          |
| želodčni sok                                       |                   |                   |                   |                   |
| 0 min                                              | $9,91 \cdot 10^6$ | $1,02 \cdot 10^7$ | $1,17 \cdot 10^7$ | $1,25 \cdot 10^7$ |
| 90 min                                             | $7,2 \cdot 10^6$  | $1,31 \cdot 10^7$ | $9,0 \cdot 10^6$  | $9,73 \cdot 10^6$ |
| 180 min                                            | $3,31 \cdot 10^6$ | $1,1 \cdot 10^7$  | $9,09 \cdot 10^6$ | $1,09 \cdot 10^7$ |
| črevesni sok                                       |                   |                   |                   |                   |
| 180 min                                            | $4,0 \cdot 10^4$  | $1,05 \cdot 10^7$ | $2,4 \cdot 10^6$  | $1,09 \cdot 10^7$ |
| 270 min                                            | $1,5 \cdot 10^4$  | $2,57 \cdot 10^6$ | $5,3 \cdot 10^6$  | $1,15 \cdot 10^7$ |
| 360 min                                            | $3,0 \cdot 10^4$  | $5,2 \cdot 10^6$  | $1,99 \cdot 10^6$ | $1,13 \cdot 10^7$ |

Iz preglednice 25 in slike 35 vidimo, kako simulirane razmere prebavil vplivajo na preživelost seva, osamljenega iz prehranskega dopolnila Lacto Seven, za katerega na podlagi reakcije PCR sklepamo, da pripada vrsti *B. longum*. Ugotovili smo, da izpostavljenost seva ŽS, ne glede na vrednost pH, ne vpliva na njegovo preživelost. Se pa s slike 35 lepo vidi upad števila KE tistega vzorca, ki je bil predhodno izpostavljen ŽS s pH 2. Sev *B. longum* iz izdelka Lacto Seven je pokazal dobro odpornost proti nizkem pH in encimu pepsinu ter proti žolčnim solem in encimom trebušne slinavke. Zabeležili pa smo večjo občutljivost bakterij, ki so bile najprej izpostavljene vrednosti pH 2, na ČS.



Slika 35: Grafični prikaz preživelosti bifidobakterije (log KE/ml) osamljene iz Lacto Seven, v simuliranih razmerah prebavil.

#### 4.6 PROTIMIKROBNA AKTIVNOSTI BIFIDOBAKTERIJ

Ugotavljali smo protimikrobno delovanje testnih bifidobakterij proti naboru indikatorskih bakterij, med katere smo uvrstili nekaj tehnološko koristnih mikroorganizmov ter nekaj kvarljivcev in potencialno patogenih bakterij. Protimikrobno aktivnost smo ugotavljali z metodo lise na trdnem gojišču.

Po inkubaciji smo izmerili cone inhibicije okoli lis testnih bifidobakterij. Zabeležili smo tudi izgled roba cone (zabrisan ali ostro izražen rob). Cono inhibicije smo merili od roba lise testne bifidobakterije do roba cone inhibicije, izrazili pa smo jo v milimetrih (Slika 36).



Slika 36: Cona inhibicije proti indikatorskemu organizmu *L. monocytogenes* okoli lise bifidobakterij, osamljenih iz prehranskega dopolnila Lacto Seven, in odčitavanje velikosti cone inhibicije.

V preglednici 25 je prikazana protimikrobna aktivnost sedmih izolatov rodu *Bifidobacterium* proti različnim mikroorganizmom.

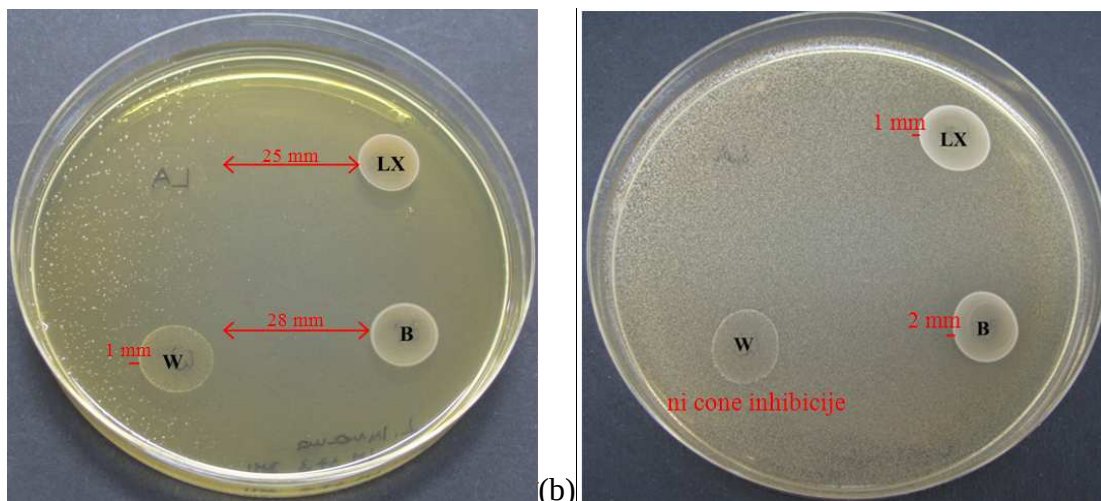
Preglednica 26: Protimikrobna aktivnost testnih sevov bifidobakterij proti izbranim indikatorskim mikroorganizmom.

| INDIKATORSKE<br>BAKTERIJE             | IM 386 | Izolat iz<br>Waya IT | Izolat iz<br>Linex | Izolat iz<br>Linbi | Izolat iz<br>Yogermine | Izolat iz<br>Bion3 | Izolat iz<br>Lacto<br>Seven |
|---------------------------------------|--------|----------------------|--------------------|--------------------|------------------------|--------------------|-----------------------------|
| <i>Cl. perfringens</i> IM 73          | 2 mm   | /                    | 1 mm               | 1 mm               | /                      | 2 mm               | /                           |
| <i>Cl. tyrobutyricum</i> DSM 2637     | /      | /                    | 1 mm               | /                  | /                      | 2 mm               | /                           |
| <i>Lb. sakei</i> NCDO 2714            | 3 mm   | /                    | 3 mm               | 4 mm               | 2 mm                   | 3 mm               | /                           |
| <i>Lb. johnsonii</i> NCC 533          | 2 mm   | /                    | /                  | 2 mm               | 2 mm                   | 1 mm               | 5 mm                        |
| <i>Lb. bulgaricus</i> (LDSB) LMG 6901 | 5 mm   | /                    | 10 mm              | 10 mm              | 5 mm                   | 10 mm              | 1 mm                        |
| <i>Lb. paracasei</i> DSM 5622         | 1 mm   | /                    | 5 mm               | 1 mm               | 1 mm                   | 4 mm               | /                           |
| <i>Lb. plantarum</i> IM 212           | /      | /                    | 1 mm               | /                  | /                      | 2 mm               | /                           |
| <i>Lb. fermentum</i> IM 351           | /      | /                    | 1 mm               | /                  | /                      | 4 mm               | /                           |
| <i>Lb. delbrueckii</i> (LDSL) IM 350  | /      | /                    | /                  | /                  | /                      | /                  | /                           |
| <i>Lb. helveticus</i> IM 30           | /      | /                    | /                  | /                  | /                      | 1 mm               | /                           |
| <i>Lb. rhamnosus</i> IM 239           | /      | /                    | /                  | /                  | /                      | /                  | /                           |
| <i>B. cereus</i> IM 250               | *      | *                    | *                  | *                  | *                      | *                  | *                           |
| <i>E. coli</i> IM 120                 | /      | /                    | 11 mm              | /                  | /                      | 14 mm              | 3 mm                        |
| <i>Ent. faecalis</i> LMG 7937         | 2 mm   | 2 mm                 | 17 mm              | 1 mm               | 3 mm                   | 14 mm              | 3 mm                        |
| <i>Ent. faecalis</i> CCM 4647         | 2 mm   | 5 mm                 | 15 mm              | 5 mm               | 10 mm                  | 20 mm              | 5 mm                        |
| <i>Ent. durans</i> CCM 5612           | 1 mm   | 2 mm                 | 15 mm              | /                  | 2 mm                   | 20 mm              | 3 mm                        |
| <i>Ent. faecium</i> IM 273            | 1 mm   | 1 mm                 | 5 mm               | /                  | 1 mm                   | 20 mm              | 5 mm                        |
| <i>L. monocytogenes</i> IM 372        | 20 mm  | 10 mm                | 30 mm              | 10 mm              | 20 mm                  | 22 mm              | 12 mm                       |
| <i>L. innocua</i> IM 373              | 10 mm  | 1 mm                 | 25 mm              | 20 mm              | 30 mm                  | 28 mm              | 13 mm                       |
| <i>Staph. aureus</i> IM 388           | *      | *                    | *                  | *                  | *                      | *                  | *                           |
| <i>Staph. aureus</i> IM 389           | 5 mm   | /                    | 2 mm               | 6 mm               | 9 mm                   | /                  | 1 mm                        |
| <i>Staph. aureus</i> IM 390           | *      | *                    | *                  | *                  | *                      | *                  | *                           |

\* = indikatorske bakterije so dobro rasle na ploščah, kjer nismo prej nacepili naših testnih organizmov. Na ploščah kjer smo točkovno (lisa) nacepili testne bifidobakterije nismo opazili rasti indikatorskega organizma;  
/ = ni cone inhibicije.

Sev *B. bifidum* iz Bion3 in sev *B. infantis* iz Linex sta bila protimikrobno najučinkovitejša, saj sta delovala kar proti 19-im oz. 18-im indikatorskim bakterijah. Posebno učinkovita sta bila seva proti enterokokom in listerijam, saj so bile cone inhibicije ponekod večje od 20 mm.

Kot vidimo iz rezultatov, testne bifidobakterije izkazujejo različno protimikrobno aktivnost proti naboru indikatorskih bakterij. Vse testirane bifidobakterije so inhibitorno delovale proti *Ent. faecalis*, *L. monocytogenes* in *L. innocua*. Protimikroben učinek bifidobakterij proti listerijam se je pokazal s tvorbo velikih con inhibicije, saj so bile le-te večje od 10 mm, (izjema bifidobakterija osamljena iz Waya IT proti *L. innocua*). Slabši protimikrobni učinek bifidobakterij smo opazili proti *Cl. tyrobutyricum* in *E. coli*, saj so ju zavirale le bifidobakterije, osamljene iz Linex in Bion3, proti *E. coli* pa so učinkovale še bifidobakterije, osamljene iz Lacto Seven. Cone inhibicije so bile različno velike. Protimikrobno delovanje je zanimivo iz vidika varnosti, saj gre za kvarljivce oz. potencialno patogene bakterije.



Slika 37: Ugotavljanje protimikrobne aktivnosti bifidobakterij, osamljenih iz izdelkov Linex (LX), Waya IT (W) in Bion3 (B) proti indikatorskemu organizmu *L. innocua* (a) in *Cl. Perfringens* (b).

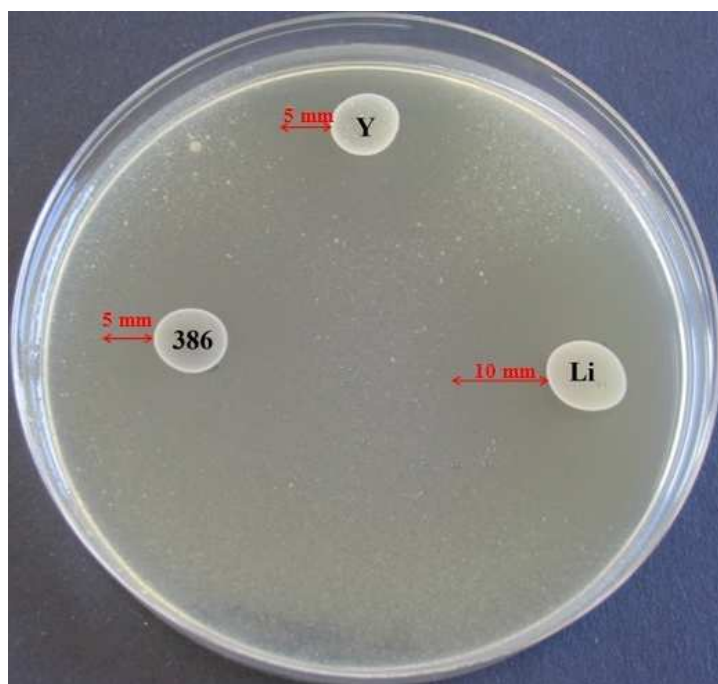
Pri ugotavljanju protimikrobne aktivnosti bifidobakterij proti indikatorskim bakterijam *B. cereus*, *Staph. aureus* IM 388 in *Staph. aureus* IM 390 smo opazili, da indikatorske bakterije, cepljene v poltrdno gojišče, niso izrasle. Predvidevali smo, da nosilno gojišče negativno vpliva na izrast indikatorskih bakterij ali pa da je zaviralni učinek lis cepljenih testnih bifidobakterij na indikatorje tako velik. Zato smo test ponovili tako, da smo poltrdno gojišče, cepljeno s posameznim indikatorjem, prelili neposredno na nosilno gojišče in na nosilno gojišče, kamor smo predhodno cepili lise testnih bifidobakterij. Po inkubaciji smo uspešno rast indikatorskih bakterij zasledili na ploščah, kamor nismo cepili lis testnih bifidobakterij, medtem ko na ploščah, kjer so bile cepljene bifidobakterije, rasti indikatorjev ponovno nismo zasledili. Iz rezultatov smo zaključili, da je odsotnost rasti indikatorjev najverjetneje posledica zaviralnega učinka bifidobakterij. Zato lahko zaključimo, da so vse osamljene bifidobakterije inhibitorno delovale tudi proti tem trem indikatorskim bakterijam, kar je pomembno, saj gre za potencialno patogene bakterije.

Izolat iz izdelka Waya IT, za katerega smo predpostavili, da pripada vrsti *B. animalis* ssp. *lactis*, je proti izbranim indikatorskim bakterijam izkazal najšibkejšo protimikrobno aktivnost. Deloval je le proti 9-im indikatorskim bakterijah. Protimikrobno delovanje je sev kazal proti enterokokom, listerijam in stafilokokom. Cone inhibicije so bili večinoma majhne, razen pri sevu *L. monocytogenes*, kjer je bila cona velika 10 mm. Sev ni kazal nobenega zaviralnega učinka proti sevom iz rodu *Clostridium* in *Lactobacillus*.

Noben od sevov bifidobakterij ni kazal protimikrobnega delovanja proti *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* in *Lb. rhamnosus*, proti *Lb. helveticus* pa so učinkovale le bifidobakterije iz prehranskega dopolnila Bion3, za katere smo predpostavili, da pripadajo vrsti *B. bifidum*. Omenjene vrste laktobacilov se pogosto uporabljajo kot starterske kulture, zato je pomembno, da jih bifidobakterije ne inhibirajo, kadar so sestavni del mešane starterske kulture ali pa probiotičnega pripravka.

Upoštevanje morebitnega inhibitornega delovanja proti *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* je pomembno pri izbiri starterske kulture. *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* je tipičen predstavnik jogurtove kulture. Iz preglednice 26 je lepo razvidno, da vse testirane bifidobakterije, razen sev *B. animalis* ssp. *lactis* iz izdelka Waya IT, delujejo protimikrobno proti tem bakterijam.

Zato moramo pred uporabo teh sevov v mešanih starterskih kulturah za fermentirane mlečne izdelke, preveriti medsebojno protimikrobno učinkovanje.



Slika 38: Ugotavljanje protimikrobne aktivnosti bifidobakterij iz prehranskih dopolnil Yogermana (Y), Linbi (Li) in seva IM 386 (386) proti indikatorskemu organizmu *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*.

Pri opazovanju robov con inhibicije smo ugotovili, da so bili vsi robovi zabrisani, saj nikjer nismo opazili nastanka ostrega robu, kakršen je pogosto značilen, ko je zaviralni učinek posledica delovanja bakteriocinov. Zato predvidevamo, da v našem primeru rast indikatorskih bakterij najverjetneje zavirajo nastale kisline, očetna in mlečna, in ne bakteriocini.

#### 4.7 OBČUTLJIVOST ZA ANTIBIOTIKE

Ker za bakterijske vrste iz rodu *Bifidobacterium* še ni standardov za izvedbo in interpretacijo testov določanja občutljivosti za antibiotike, smo si pomagali z literaturnimi podatki. Pri izvedbi testa smo se opirali predvsem na raziskavo Klare in sod. (2005), medtem ko smo pri interpretaciji rezultatov upoštevali vrednosti MIK, ki jih je v svojem poročilu zapisala EFSA (2008). Žal pa so za enkrat na voljo le vrednosti MIK za rod *Bifidobacterium*, ne pa tudi za posamezne vrste. Za analizo smo izbrali klinično pomembne antibiotike. Rezultati paralelnega ugotavljanja občutljivosti preiskovanih bifidobakterij za antibiotike pa so predstavljeni v preglednici 27.

Pri ugotavljanju občutljivosti za antibiotike za bifidobakterije iz Lacto Seven in Waya IT nismo dobili rezultatov, ker se je gojišče, sestavljeno iz 10 % MRS in 90 % MH, izkazalo kot neustrezno za njuno rast.

Kot kaže preglednica 27, so vsi testirani sevi bifidobakterij občutljivi za antibiotika ampicilin in vankomicin, saj so bile MIK obeh antibiotikov nižje od mejne vrednosti 2 µg/ml, ki jo navaja Evropske agencije za varnost hrane (EFSA, 2008).

Preglednica 27: Rezultati ugotavljanja MIK za različne seve bifidobakterij.

| Izdelek/<br>sev                                | Antibiotik (razpon<br>koncentracij v<br>µg/ml) | Mejne MIK za<br>rezistenco(µg/ml)<br>(EFSA, 2008) | MIK (µg/ml)     |                 |
|------------------------------------------------|------------------------------------------------|---------------------------------------------------|-----------------|-----------------|
|                                                |                                                |                                                   | 1.<br>paralelka | 2.<br>paralelka |
| <i>B. breve</i> IM 386                         | ampicilin (AM)<br>0,016 – 256 µg/ml            | 2                                                 | 0,38            | 0,50            |
|                                                | eritromicin (EM)<br>0,016 – 256 µg/ml          | 0,5                                               | 0,064           | 0,032           |
|                                                | gentamicin (GM)<br>0,64 – 1024 µg/ml           | 64                                                | 16              | 32              |
|                                                | klindamicin (CM)<br>0,016 – 256 µg/ml          | 0,25                                              | 1               | 1,5             |
|                                                | streptomycin (SM)<br>0,64 – 1024 µg/ml         | 128                                               | 16              | 12              |
|                                                | tetraciklin (TC)<br>0,016 – 256 µg/ml          | 8                                                 | 0,25            | 0,38            |
|                                                | vankomicin (VA)<br>0,016 – 256 µg/ml           | 2                                                 | 0,064           | 0,047           |
| Linex*<br><i>B. infantis</i>                   | ampicilin (AM)<br>0,016 – 256 µg/ml            | 2                                                 | 0,125           | 0,094           |
|                                                | eritromicin (EM)<br>0,016 – 256 µg/ml          | 0,5                                               | ≤0,016          | ≤0,016          |
|                                                | gentamicin (GM)<br>0,64 – 1024 µg/ml           | 64                                                | 8               | 12              |
|                                                | klindamicin (CM)<br>0,016 – 256 µg/ml          | 0,25                                              | 0,023           | ≤0,016          |
|                                                | streptomycin (SM)<br>0,64 – 1024 µg/ml         | 128                                               | >1024           | >1024           |
|                                                | tetraciklin (TC)<br>0,016 – 256 µg/ml          | 8                                                 | 0,032           | 0,047           |
|                                                | vankomicin (VA)<br>0,016 – 256 µg/ml           | 2                                                 | 0,064           | 0,125           |
| Linbi<br><i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> | ampicilin (AM)<br>0,016 – 256 µg/ml            | 2                                                 | 0,047           | 0,064           |
|                                                | eritromicin (EM)<br>0,016 – 256 µg/ml          | 0,5                                               | 1               | 0,38            |
|                                                | gentamicin (GM)<br>0,64 – 1024 µg/ml           | 64                                                | 4               | 4               |
|                                                | klindamicin (CM)<br>0,016 – 256 µg/ml          | 0,25                                              | 0,50            | 0,75            |
|                                                | streptomycin (SM)<br>0,64 – 1024 µg/ml         | 128                                               | 32              | 24              |
|                                                | tetraciklin (TC)<br>0,016 – 256 µg/ml          | 8                                                 | 6               | 8               |
|                                                | vankomicin (VA)<br>0,016 – 256 µg/ml           | 2                                                 | 0,38            | 0,25            |

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 27. Rezultati ugotavljanja MIK za bifidobakterije, osamljene iz prehranskih dopolnil.

| Izdelek/<br>sev                                    | Antibiotik (razpon<br>koncentracij v<br>µg/ml) | Mejne MIK za<br>rezistenco(µg/ml)<br>(EFSA, 2008) | MIK (µg/ml)     |                 |
|----------------------------------------------------|------------------------------------------------|---------------------------------------------------|-----------------|-----------------|
|                                                    |                                                |                                                   | 1.<br>paralelka | 2.<br>paralelka |
| Yogermina<br><i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> | ampicilin (AM)<br>0,016 – 256 µg/ml            | 2                                                 | ≤0,016          | 0,023           |
|                                                    | eritromicin (EM)<br>0,016 – 256 µg/ml          | 0,5                                               | ≤0,016          | 0,016           |
|                                                    | gentamicin (GM)<br>0,64 – 1024 µg/ml           | 64                                                | 24              | 32              |
|                                                    | klindamicin (CM)<br>0,016 – 256 µg/ml          | 0,25                                              | ≤0,016          | ≤0,016          |
|                                                    | streptomycin (SM)<br>0,64 – 1024 µg/ml         | 128                                               | 16              | 32              |
|                                                    | tetraciklin (TC)<br>0,016 – 256 µg/ml          | 8                                                 | 1,5             | 8               |
|                                                    | vankomicin (VA)<br>0,016 – 256 µg/ml           | 2                                                 | 0,125           | 0,19            |
| Bion3<br><i>B. bifidum</i>                         | ampicilin (AM)<br>0,016 – 256 µg/ml            | 2                                                 | 0,50            | 0,75            |
|                                                    | eritromicin (EM)<br>0,016 – 256 µg/ml          | 0,5                                               | 0,50            | 0,75            |
|                                                    | gentamicin (GM)<br>0,64 – 1024 µg/ml           | 64                                                | 128             | 64              |
|                                                    | klindamicin (CM)<br>0,016 – 256 µg/ml          | 0,25                                              | 0,064           | 0,064           |
|                                                    | streptomycin (SM)<br>0,64 – 1024 µg/ml         | 128                                               | 96              | 128             |
|                                                    | tetraciklin (TC)<br>0,016 – 256 µg/ml          | 8                                                 | 8               | 6               |
|                                                    | vankomicin (VA)<br>0,016 – 256 µg/ml           | 2                                                 | 0,50            | 0,25            |

\* Linex je v Sloveniji registriran kot probiotično zdravilo brez recepta.

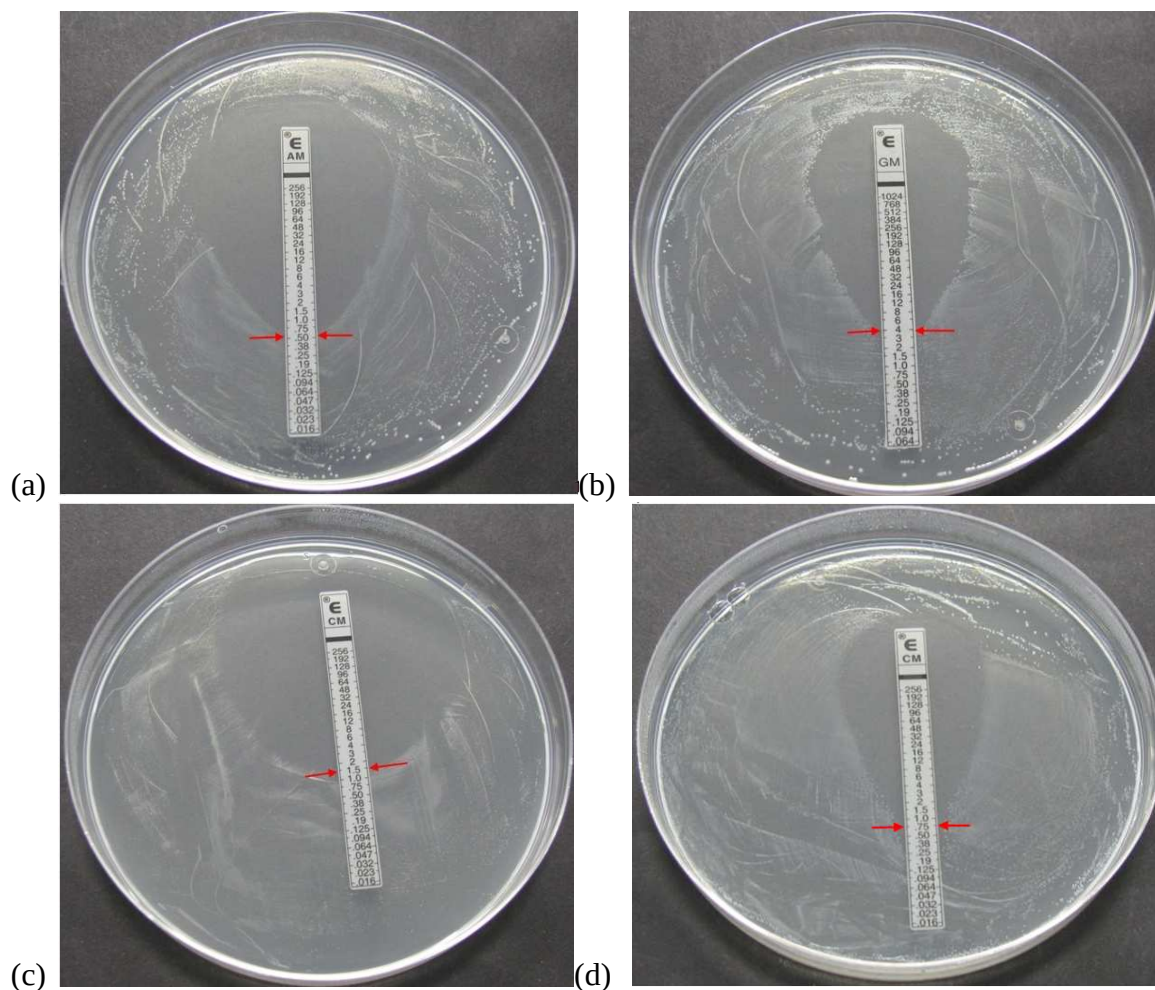
Bifidobakterije iz izdelkov Linex in Yogermina ter IM 386 so občutljive za eritromicin, saj so bile pri izolatih vse vrednosti MIK nižje od mejne vrednosti 0,5 µg/ml. Pri sevu *B. bifidum* iz izdelka Bion3 smo ugotovili mejno MIK 0,5 oz. pri drugi paralelki, malo nad mejo. Pri izolatu iz izdelka Linbi smo le pri eni od paralelk odčitali vrednosti MIK, višjo od mejne vrednosti MIK 0,5 µg/ml, pri drugi pa ne. Ashraf in Shah (2011) navajata, da *B. lactis* navadno ni odporen proti eritromicinu, in da je le okoli 2 % sevov iz rodu *Bifidobacterium* odpornih proti eritromicinu.

Mejno odpornost proti gentamicinu smo izmerili le pri sevu vrste *B. bifidum*, osamljenem iz prehranskega dopolnila Bion3. Mejna vrednost MIK za odpornost znaša 64 µg/ml, mi pa smo dobili rezultata 64 oz. 128 µg/ml. Veliko raziskav poroča o pogosti odpornosti bifidobakterij proti gentamicinu, v naši raziskavi smo jo potrdili pri enem od petih preiskovanih sevov.

Bifidobakterije iz Linex, Yogermina in Bion3 so občutljive za klindamicin, sev IM 386 in sev iz izdelka Linbi, pa sta odporna proti koncentracijam, ki presegajo mejno vrednost 0,25 µg/ml (EFSA, 2008). Kiwaki in Sato (2009) sta preiskovala občutljivost za klindamicin 26 sevov vrste *B. breve* različnih izvorov in pri večini dobila vrednosti MIK višje od mejne vrednosti. Vidimo, da je veliko sevov vrste *B. breve* odpornih proti temu antibiotiku. Tudi za naš



testirani sev *B. breve* IM 386, lahko na podlagi rezultatov trdimo, da je odporen proti klindamicinu. Za *B. animalis* ssp. *lactis* pa nismo zasledili podatkov o odpornosti proti klindamicinu.



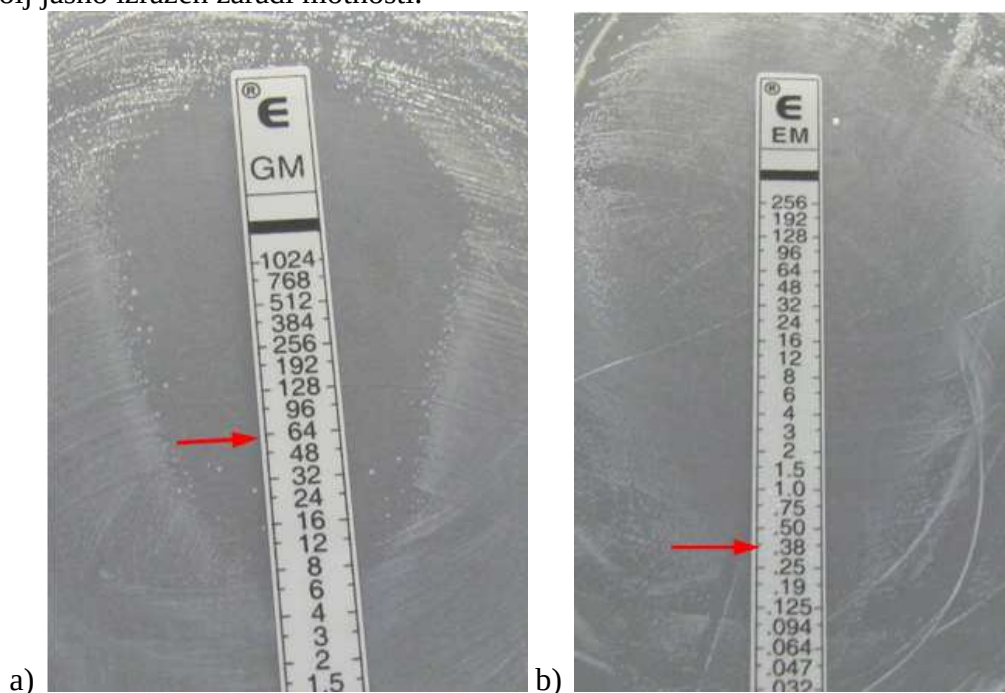
Slika 39: Testiranje občutljivosti bifidobakterij za antibiotike. Izolat iz Bion3 za ampicilin (a), izolat iz Linbi za gentamicin (b), sev IM 386 za klindamicin (c) in izolat iz Linbi za klindamicin (d).

Sev *B. breve* IM 386 ter izolata iz izdelkov Linbi ter Yogermina so občutljivi za streptomycin. Pri isolatu *B. bifidum* iz Bion3 smo zabeležili MIK 96 oz. 128  $\mu\text{g/ml}$ , torej sta vrednosti nižja oz. enaka mejni vrednosti za odpornost. Pri *B. infantis* iz Linex nismo opazili cone inhibicije, zato lahko trdimo, da je sev odporen proti streptomycinu. O odpornosti predstavnic *Bifidobacterium* proti streptomycinu pogosto poročajo.

Za sev IM 386 in za izolat *B. infantis* iz izdelka Linex lahko trdimo, da sta oba občutljiva za antibiotik tetraciklin. Pri bifidobakterijah iz ostalih izdelkov, pa smo pri vsakem od njih zasledili pri eni od paralelk vrednost nižjo pri drugi paralelki pa vrednost enako mejni vrednosti MIK za tetraciklin. Zaključili smo, da sevi niso odporni proti tetraciklinu. V literaturi navajajo, da odpornost vrst *B. animalis* ssp. *lactis* kot tudi *B. bifidum* proti tetraciklinu ni redka.



Odčitavanje rezultatov je bilo pri določenih vzorcih težje, saj so bile prisotne posamezne kolonije znotraj cone inhibicije. Srečali pa smo se tudi s problemom, ko nastali rob vretena ni bil dovolj jasno izražen zaradi motnosti.



Slika 40: Problem pri odčitavanju rezultatov. Pri izolatu iz izdelka Bion3 so se pojavile posamične kolonije znotraj cone inhibicije pri antibiotiku gentamicin (a) in pri izolatu iz izdelka Linbi se je pojavil moten rob cone inhibicije pri antibiotiku eritromicin (b).

## **5 RAZPRAVA IN SKLEPI**

### **5.1 RAZPRAVA**

#### **5.1.1 Metode izolacije in identifikacije bifidobakterij**

Konvencionalne metode osamitve in identifikacije bifidobakterij temeljijo predvsem na selektivnem gojenju ter identifikaciji izolatov na podlagi morfoloških lastnosti ter biokemijskih in seroloških testov. Za osamitev bifidobakterij smo uporabili gojišče TOS z dodatkom mupirocina, saj so za razliko od mnogih drugih bakterij, bifidobakterije odporne proti mupirocinu. Omenjene metode so delovno in materialno zahtevne, večinoma dolgotrajne in manj primerne za proučevanje velikega števila vzorcev. Poleg tega pa so te metode pokazale netočnost in slabšo ponovljivost rezultatov, zaradi razmeroma dolge inkubacijske dobe in zahtevnih pogojev gojenja (Matsuki in sod., 2003; Youn in sod., 2008).

Molekularne metode se čedalje bolj uveljavljajo zaradi številnih slabosti tradicionalnih metod. Ena danes najbolj razširjenih molekularnih metod pri identifikaciji bakterij je PCR, ki se je po mnenju številnih avtorjev izkazala za uspešno in primerno tudi za identifikacijo bifidobakterij. PCR je občutljiva, specifična in hitra metoda za ugotavljanje različnih vrst, ki ima dobro ponovljivost. Pri izbiri začetnih oligonukleotidov in parametrov posamezne reakcije PCR smo si pomagali z literaturnimi podatki (Matsuki in sod., 2003; Youn in sod., 2008; Ventura in sod. 2001).

#### **5.1.2 Makromorfološke in mikromorfološke lastnosti**

Glede na makromorfološke lastnosti kolonij, zraslih na gojišču, so si bile izrasle kolonije bifidobakterij med seboj zelo podobne. Bile so bele do krem barve, pravilne okrogle oblike z gladkim robom. Med seboj so se razlikovale zgolj v velikosti, vendar smo z nadaljnjimi analizami potrdili, da različna velikost kolonij ni specifična lastnost za posamezen sev.

Pri mikromorfoloških značilnostih bakterijskih celic, ki smo jih opazovali pod mikroskopom, smo opazili značilne oblike od ravnih do ukrivljenih paličic, z rahlo odebeljenimi konci. Oblika celic je za sev specifična lastnost, lahko pa tudi posledica različne faze rasti bifidobakterij.

Rezultati fenotipskih testov niso dovolj zanesljivi. Na podlagi le teh ne moremo potrditi pripadnosti preiskovanih bakterij določeni vrsti oz. rodu, zato smo uporabili tudi molekularne metode, ki temeljijo na ugotavljanju genotipskih lastnosti.

#### **5.1.3 Analize PCR in RAPD**

Iz značilnih kolonij, ki so izrasle na selektivnih gojiščih, smo izolirali DNA, ter opravili analize PCR in RAPD. Z reakcijo PCR smo želeli potrditi rod *Bifidobacterium* in pripadnost različnim vrstam bifidobakterij. Da bi ugotovili, koliko različnih sevov bifidobakterij smo osamili, smo uporabili še metodo RAPD.

Za potrjevanje pripadnosti rodu *Bifidobacterium* smo upoštevali 520 bp velik pomnožek v reakciji PCR. Oligonukleotidne začetnike za potrjevanje rodu smo povzeli po Satokari in sod. (2001). Analizirali smo 57 naključnih izraslih kolonij, pri čemer smo rod potrdili pri vseh,

razen pri treh vzorcih iz izdelka Lacto Seven (Slika 18, proge 43, 51 in 52), kjer nismo dobili pomnožkov.

Reakcija RAPD omogoča proučevanje genetske variabilnosti sevov znotraj iste vrste. Gre za eno najbolj razširjenih metod, predvsem zaradi enostavne in hitre izvedbe, vendar pa se je potrebno zavedati ne vedno zadostne razlikovalne moči in slabše ponovljivosti (Matsuki in sod., 2003; Youn in sod., 2008). Zaradi zgoraj omenjenih slabosti, smo za analizo RAPD uporabili dva različna začetna oligonukleotida in sicer KGT-70GC in 1254. Bifidobakterije, ki so dale enake vzorce pomnožkov RAPD, smo smatrali za pripadnice istega seva. V večini primerov analiziranih DNA bifidobakterij smo dobili enake profile RAPD tako z začetnim oligonukleotidom KGT-70GC kot tudi z 1254.

Za potrjevanje pripadnosti posameznim vrstam, so bili v številnih študijah na zaporedjih rDNA rodu *Bifidobacterium*, preskušeni vrstno specifični začetni oligonukleotidi. Po Matsuki in sod. (1998) smo povzeli vrstno specifične začetne oligonukleotide za bakterijsko vrsto *B. bifidum*, po Matsuki in sod. (1999) za vrsti *B. longum* in *B. infantis*, po Ventura in sod. (2001) pa za vrsto *B. animalis* ssp. *lactis*.

Iz 5-ih naključno izbranih kolonij, ki smo jih predhodno osamili z gojišča TOS+mup, na katerega smo nacepili izdelek Linex, smo osamili DNA. V analizi RAPD smo z začetnim oligonukleotidom KGT-70GC (Slika 19) ali 1254 (Slika 20) dobili enake profile RAPD za pet kolonij (proge 28-32). Proga 30 je bila slabše izražena, zato smo jo poleg DNA s proge 28 vključili v PCR z vrstno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi. Specifične produkte PCR smo dobili v reakciji z oligonukleotidom, specifičnimi za vrsto *B. infantis* (Slika 23), kar se ujema z deklaracijo.

Za pet izolatov bifidobakterij iz izdelka Bion3 (proge 33-42) smo tako z začetnim oligonukleotidom KGT-70GC (Slika 19) kot tudi z začetnim oligonukleotidom 1254 (Slika 20) dobili enake rezultate. S slik je lepo razvidno, da smo dobili dva različna profila RAPD. Proge 33, 34, 36, 40 in 41 imajo drugačen vzorec pomnožkov kot preostale proge tega izdelka. Ker smo dobili dva različna profila RAPD, smo predvidevali, da nam je uspelo osamiti obe deklarirani vrsti. V reakcijah PCR z vrstno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi smo kot tarčo uporabili DNA s prog 33, 35 in 38, saj je proga 35, pri analizi z začetnim oligonukleotidom KGT70-GC imela slabše viden vzorec lis. Kljub temu, da smo pri analizi RAPD dobili dva različna profila pomnožkov, pa smo dobili specifične produkte PCR le v reakciji z oligonukleotidi, specifičnimi za vrsto *B. bifidum*, je pa ta vrsta morda prisotna z dvema sevoma. Izdelek Bion3 naj bi poleg vrste *B. bifidum* vseboval še vrsto *B. longum*. Kljub temu, da smo potrdili le vrsto *B. bifidum*, še ne pomeni, da vrste *B. longum* izdelek ne vsebuje, saj je bilo izbiranje kolonij za nadaljnjo analizo naključno.

V analizi RAPD 17-ih bifidobakterij iz Waya IT smo z začetnim oligonukleotidom KGT-70GC (Slika 19) in 1254 (Slika 20) dobili primerljive rezultate (proge 1-17), saj sta se v obeh primerih pokazala dva različna profila RAPD. Proge 2, 5, 9, 16, 17 so imele drugačen vzorec pomnožkov kot preostale proge z DNA sevov iz tega izdelka. Ker smo dobili dva različna profila RAPD, smo domnevali, da nam je uspelo osamiti dve vrsti od treh deklariranih. Deklaracija izdelka Waya IT navaja vsebnost vrst *B. bifidum*, *B. lactis* in *B. longum*. V reakcijah PCR z vrstno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi smo kot tarčo uporabili DNA s prog 2 in 11, a se je izkazalo, da ne glede na različna profila RAPD, dobimo specifične produkte PCR le v reakciji z oligonukleotidi, specifičnimi za vrsto *B. animalis* ssp. *lactis*.

Zaključimo lahko, da smo iz Waya IT uspešno osamili le predstavnike ene vrste, a je vrsta morda prisotna z dvema sevoma. Kljub temu, da v naši raziskavi v izdelku Waya IT nismo potrdili prisotnosti vrst *B. bifidum* in *B. longum*, to ne pomeni, da ju izdelek ne vsebuje, saj je bilo izbiranje kolonij naključno, možna pa je tudi njuna slabša preživelost.

V analizi RAPD 5-ih izolatov bifidobakterij iz Linbi smo z začetnim oligonukleotidom KGT-70GC (Slika 19) in 1254 (Slika 20) dobili primerljive rezultate (proge 53-57), ki so se pokazali z enakim vzorcem pomnožkov. V reakcijah PCR z vrstno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi smo kot tarčo uporabili DNA s proge 53. specifične produkte PCR smo dobili v reakciji z oligonukleotidi, specifičnimi za vrsto *B. animalis* ssp. *lactis* (Slika 24), kar se ujema z deklaracijo.

Za bifidobakterije, osamljene iz izdelka Yogermina (proge 18-27), so z začetnima oligonukleotidom KGT-70GC (Slika 19) in 1254 (Slika 20) dale rezultate, ki so se pokazali z enakim profilom RAPD za vse izolate. V reakcijah PCR z vrstno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi smo kot tarčo uporabili DNA s proge 18. specifične produkte PCR smo dobili v reakciji z oligonukleotidi, specifičnimi za vrsto *B. animalis* ssp. *lactis* (Slika 24), kar se ujema z deklaracijo na prehranskem dopolnilu.

Iz izdelka Lacto Seven smo analizirali DNA iz 10-ih naključno izbranih kolonij. V analizi RAPD smo z začetnim oligonukleotidom KGT-70GC (Slika 19) in 1254 (Slika 20) dobili primerljive rezultate (proge 43-52), ki so se pokazali enakim pomnožkom RAPD pri vseh desetih izolatih. V reakcijah PCR z vrstno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi smo kot tarčo uporabili DNA s proge 44. specifične produkte PCR smo dobili v reakciji z oligonukleotidom, specifičnimi za vrsto *B. longum* (Slika 22), kar se ujema z deklaracijo na izdelku.

#### **5.1.4 Vpliv kvasnega ekstrakta na rast bifidobakterij v mleku**

Naravna ekološka niša probiotičnih bakterij je prebavni trakt. Ker so prilagojene za bivanje v razmerah prebavil, običajno slabše rastejo ali pa sploh ne rastejo v mleku. Prav zaradi slabše izraženih tehnoloških lastnosti, bifidobakterij navadno ne uporabljamo kot starterskih kultur, pogosteje pa jih uporabljamo kot podporne kulture. Probiotične bakterije, vključno z bifidobakterijami, v mleku rastejo počasi in ne dajo zelenih organoleptičnih lastnosti. Bifidobakterije ne proizvajajo aromatičnih snovi in niso sposobne oblikovati dobrih reoloških lastnosti (Mattila-Sandholm in sod., 2002).

Za izboljšanje rasti bifidobakterij v mleku se lahko dodajajo različne snovi, kot so energetski viri (glukoza), rastni faktorji (kvasni ekstrakt, beljakovinski hidrolizati) ali vitamini ter minerali. Ti dodatki navadno pripomorejo k izboljšanju delovanja probiotičnih kultur. Običajno pa bifidobakterije kombinirajo z drugimi kulturami, navadno takimi iz skupine MKB (Mattila-Sandholm in sod., 2002).

En najobičajnejših dodatkov za izboljšanje rasti bifidobakterij v mleku je kvasni ekstrakt, v koncentracijah med 0,1-0,5 % (Gomes in Malcata, 1999). V naši raziskavi smo ugotavljali vpliv kvasnega ekstrakta na rast bifidobakterij, ki smo ga v RPM dodali v koncentraciji 0,1 %. Največji vpliv dodatka kvasnega ekstrakta na rast smo opazili pri bifidobakterijah iz izdelkov Waya IT in Yogermina, za kateri smo ugotovili, da pripadata vrsti *B. animalis* ssp. *lactis*.

Skladno s porastom števila KE smo opazili padec vrednosti pH, nastanek koaguluma in prisotnost intenzivnega vonja po očetni kislini.

Naši rezultati z bifidobakterijama iz Waya IT in Yogermina so primerljivi z rezultati raziskave Lazea Barascu in Banu (2003), v kateri sta proučevala vpliv kvasnega ekstrakta na rast *B. animalis* ssp. *lactis*. Ugotovila sta, da dodatek kvasnega ekstrakta močno stimulira rast te vrste. Najboljšo rast sta zabeležila pri 0,3 % dodatku, malo slabšo pri 0,1 % in 0,2 % dodatku, še slabšo pri 0,4 % in najslabšo pri vzorcu brez dodatka kvasnega ekstrakta.

Čeprav smo tudi bifidobakterije iz izdelka Linbi potrdili za predstavnice vrste *B. animalis* ssp. *lactis*, pa smo pri njih ugotovili, da kvasni ekstrakt ni izboljšal rasti. Tudi padec vrednosti pH je bil v obeh gojiščih primerljiv, kakor tudi nastanek koaguluma. Le pri RPM+ke smo zaznali tudi vonj po očetni kislini.

Za bifidobakterije IM 386, ki je predstavnica vrste *B. breve* (Krajnik, 2009) lahko rečemo, da jih kvasni ekstrakt ne stimulira pri rasti, vendar pa upočasni odmiranje kulture med podaljšano inkubacijo. Rast v RPM in RPM z dodanim kvasnim ekstraktom je bila na splošno slaba, tudi vrednost pH je bila po 48-ih urah v RPM še vedno zelo visoka (6,16 oziroma 5,80). Prav tako ni prišlo do nastanka koaguluma, niti nismo zaznali vonja po očetni kislini.

Slabo rast tako v RPM kot RPM+ke smo opazili tudi pri bifidobakterijah iz izdelkov Linex (sev vrste *B. infantis*) in iz Bion3 (sev vrste *B. bifidum*). Slaba rast se je odražala tudi v odsotnosti koaguluma in vonja po očetni kislini.

Zelo zanimive rezultate pa smo dobili pri bifidobakterijah, osamljenih iz izdelka Lacto Seven, ki smo jo potrdili za pripadnice vrste *B. longum*. Sev je izkazal zelo dobro rast v RPM, medtem ko je bila rast v RPM+ke bistveno slabša. Zaradi dobre rasti v RPM je tudi vrednost pH temu primerno padla (4,99), prišlo je tudi do nastanka koaguluma in zaznali smo rahel vonj po očetni kislini. V RPM+ke je vrednost pH ostala visoka (6,04), koagulum ni nastal, zaznali pa smo rahel vonj po očetni kislini.

### 5.1.5 Preživelost bifidobakterij v simuliranih razmerah prebavil

Debelo črevo je mesto delovanja večine probiotičnih bakterij. Da imajo probiotične bakterije koristen učinek na gostitelja, morajo v prebavni trakt priti v aktivni obliki in v zadostnem številu. Torej morajo biti odporne na razmere v prebavnem traktu, saj le tako ohranijo svojo presnovno aktivnost in sposobnost za delovanje na ciljnim mestu v črevesju. Zato smo preverili sposobnost preživetja izolatov bifidobakterij v simuliranih razmerah prebavil (Mainville in sod., 2005). Metodo za testiranje preživetja osamljenih sevov bifidobakterij v želodčnem in črevesnem soku smo povzeli po Fernandez in sod. (2003).

Število probiotičnih bakterij se skozi prebavni trakt zmanjšuje zaradi različnih dejavnikov. Glavne ovire v prebavnem traktu so nizka vrednost pH v želodcu in proteolitični encim pepsin ter žolčne soli in encimi trebušne slinavke (lipaze, proteaze in amilaze) v tankem črevesu. (Mainville in sod., 2005). Zaužitje hrane vodi v postopno zviševanje vrednosti pH v želodcu. pH teščega želodca znaša okoli 1,0-2,0, po obroku pa se vrednost pH želodčnega soka dvigne tudi do pH 7,0. Zaradi zelo variabilne vrednosti pH želodčnega soka, smo preživetje probiotičnih sevov testirali pri treh različnih vrednostih pH (2,0; 3,0 in 7,0). Fiziološka

koncentracija žolčnih soli v prebavnem traktu človeka se ocenjuje na 0,3 % do 0,4 % w/v. Mi smo v naši raziskavi spremljali preživetje pri dodatku 0,3 % žolčnih soli.

Ugotovitev preteklih raziskav, da je preživetje bifidobakterij skozi prebavni trakt za sev specifično, potrjujejo tudi rezultati naše študije. Testni sevi bifidobakterij so imeli zelo različno dinamiko preživelosti v simuliranih razmerah prebavil, tudi če so bili predstavniki iste vrste.

Vsi testni sevi bifidobakterij, z izjemo seva *B. infantis* iz izdelka Linex pri vseh testiranih vrednostih pH ŽS ter bifidobakterij iz izdelkov Bion3 in Linbi v primeru izpostavitve ŽS s pH 2, so do neke mere preživel v simuliranih razmerah prebavil, saj smo jih po 6 urah v simuliranem ŽS in ČS lahko prešteli na ploščah.

Najboljšo sposobnost preživetja je kazal sev *B. breve* IM 386, saj se število KE zmanjšalo v okvirih 0,5 (pri pH ŽS 3 ali 7) do 1 logaritemske enote (pri pH ŽS 2). Za sev *B. breve* IM 386 lahko trdimo, da je odporen tako proti kislemu okolju želodca in encimu pepsin kot tudi proti žolčnim solem in encimom trebušne slinavke.

Zelo dobro preživelost je pokazal tudi sev *B. longum* iz izdelka Lacto Seven. Število bifidobakterij se pri tem sevu med 3-urno inkubacijo v ŽS pri nobeni od testiranih vrednostih pH ni zmanjšalo. Po dodatku ČS soka pa smo pri seriji, ki je bila prej tretirana z ŽS z vrednostjo pH 2, zabeležili pri delu populacije izgubo kultivabilnosti po prenosu v ČS, pri ostalih dveh serijah pa je bilo preživetje dobro. Za izolat vrste *B. longum* lahko trdimo, da je odporen tako proti nizkim vrednostim pH in encim pepsin kot tudi proti žolčnim solem in encimom trebušne slinavke. Opazili pa smo, da je izpostavljenost nizki vrednosti pH (ŽS z vrednostjo pH=2) vplivala na slabše preživetje v ČS.

Razmeroma dobro preživetje sta kazala tudi seva, osamljena iz izdelka Waya IT in Yogermina, za katera smo potrdili, da pripadata vrsti *B. animalis* ssp. *lactis*. Seva kažeta zelo dobro odpornost proti ŽS, saj se število KE med 3-urno inkubacijo ni zmanjšalo. Smo pa zabeležili padec števila bakterij takoj ob dodatku ČS. Število KE je med nadaljnjo 3-urno inkubacijo v ČS, ostalo nespremenjeno. Za ta dva seva lahko trdimo, da sta odporna proti nizkem pH in encimu pepsinu ter občutljiva na žolčne soli in encime trebušne slinavke.

Pri sevu *B. animalis* ssp. *lactis* iz izdelka Linbi in sevu *B. bifidum* iz izdelka Bion3 se število KE med 3-urno inkubacijo v ŽS z vrednostjo pH 3 in pH 7 ter med nadaljnjo 3-urno inkubacijo v ČS ni zmanjšalo. V ŽS z vrednostjo pH 2, pa omenjena seva nista preživel. Za ta dva seva lahko trdimo, da sta občutljiva za vrednost pH 2, medtem ko je preživelost pri višjih vrednostih pH zelo dobra. Prav tako sta seva dobro odporna proti žolčnim solem in encimom trebušne slinavke.

Najslabšo sposobnost preživetja smo ugotovili pri sevu *B. infantis* iz Linex, saj je število bakterij ob izpostavitvi ŽS z vrednostjo pH 2 močno padlo, poleg tega pri vzorčenju po 90 minutah nismo več opazili kolonij na ploščah za štetje. Nekoliko manjši je bil padec števila KE ob izpostavitvi ŽS z vrednostjo pH 3 in pH 7, vendar pa je po dodatku ČS tudi pri teh serijah število KE padlo pod mejo detekcije. Za izolat vrste *B. infantis* lahko trdimo, da je zelo občutljiv tako za ŽS kot tudi za ČS.

Charteris in sodelavci so opravili študijo preživetja različnih sevov bifidobakterij v simuliranem želodčnem soku, umerjenem na pH 2 z dodatkom 3 g/l pepsina in v črevesnem soku umerjenem na pH 8 z dodatkom 1 g/l pankretina. Študijo so opravili z 8 različnimi sevi bifidobakterij, ki so pripadali 5 vrstam in sicer *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve* in *B. infantis*. Rezultati študije so pokazali, da so skoraj vsi sevi popolnoma izgubili sposobnost preživetja v simuliranem želodčnem soku. Skoraj vsi sevi, pa so ohranili dobro preživelost v simuliranih pogojih črevesnega soka. Samo sev vrste *B. adolescentis* je pokazal postopno zmanjšanje stopnje preživelosti in so ga kot takega v študiji označili za najbolj občutljivega. Tudi pri sevu *B. breve* je bilo opazno zmanjšanje števila celic, ampak se je po 4 urah inkubacije v črevesnem soku število celic ponovno povečalo (Charteris in sod., 1998).

Mainville in sodelavci so raziskovali preživetje sevov *B. longum*, *B. infantis* in *B. animalis* v dinamičnem modelu, ki je simuliral prebavni trakt. Dva seva *B. animalis* sta pokazala dobro preživetje pri pH 2 po 90 minutnem tretiranju. Sev *B. animalis*, osamljen iz podgane, je pokazal boljše preživetje kot sev, osamljen iz fermentiranega mlečnega izdelka. Pokazali so, da je odpornost seva *B. animalis* proti kislini višja od tistih, ki sta pripadala vrstama *B. infantis* in *B. longum*. *B. infantis* je pokazal občutljivost za dodatek 0,3 % žolčnih soli v gojišče. Ostali sevi so pokazali dokaj dobro odpornost proti takšni koncentraciji žolčnih soli, ki pa se je kazala z zapoznelo rastjo ali z zmanjšano sposobnostjo preživetja v primerjavi z rastjo v kontrolnem gojišču. Sev *B. longum* in sev *B. infantis*, oba humana izolata, sta pokazala občutljivost za nizke vrednosti pH, saj je zgolj 15-minutno tretiranje v pH 2 zmanjšalo število celic pri obeh sevih za 2 log/ml. Zato tak sev ne izpolnjuje kriterija o sposobnosti preživetja probiotičnih bakterij (Mainville in sod., 2005).

Jia in sodelavci so raziskavo o preživelosti bifidobakterij opravili pri različnih pH vrednostih (3,0; 3,5; 4,0; 4,5) in pri različnih koncentracijah žolčnih soli (0,15 %, 0,30 %, 0,45 % in 0,60 %). V raziskavo so vključili seve *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. infantis* in *B. longum*. V raziskavi ugotovili, da so sevi vrst *B. bifidum*, *B. infantis* in *B. longum* kazali dobro sposobnost preživetja pri 5 urni izpostavitvi vrednosti pH 3. Sev *B. adolescentis* pa se je izkazal kot najbolj občutljiv na kisle razmere. *B. bifidum*, *B. infantis* in *B. longum* so pokazali tudi dobro preživelost proti žolčnim solem. Vsi trije sevi so dobro preživeli tudi po 10-urnem tretiranju v gojišču z dodatkom 0,45 % žolčnih soli. Sev *B. adolescentis* pa je ponovno pokazal najslabšo preživelost. Čeprav v raziskavi niso uporabili kombinacije nizkih vrednosti pH in žolčnih soli, pa so predpostavili, da bi bilo ob prisotnosti obeh dejavnikov, zaradi sinergističnega učinkovanja preživetje bifidobakterij še slabše (Jia in sod., 2010).

Leta 2013 so Andriantsonrina in sod., raziskovali toleranco bifidobakterij na stresne pogoje, kot so kislo okolje (pH 2,7 in 0,3 % dodatek pepsina), prisotnost žolčnih soli (0,3 %) in prisotnost kisika. Raziskavo so opravili s šestimi različnimi sevi bifidobakterij. Za razliko od rezultatov študije Jia in sod., so v tej raziskavi sev *B. adolescentis* ocenili, kot najbolj toleranten na prisotnost žolčnih soli. Sledila pa sta mu seva *B. breve* in *B. longum*. Najboljšo preživelost v kislih razmerah, pa so pokazali sevi *B. longum*, *B. breve* in *B. dentium*. Sev *B. breve* in *B. longum* pa sta pokazala najboljšo toleranco na vse tri stresne dejavnike hkrati (Andriantsonrina in sod., 2013).

Zelo pomemben dejavnik preživetja je tudi izvor, ekološka niša, iz katere osamimo bifidobakterijo (Jia in sod., 2010). Večja občutljivost humanih izolatov bifidobakterij v primerjavi z bifidobakterijami živalskega izvora je en od glavnih dejavnikov, ki omejuje uporabo humanih izolatov v probiotičnih izdelkih. Zato v zadnjem času poteka veliko

raziskav o preživetju bifidobakterij, osamljenih iz človeškega prebavnega trakta. Zanimivo je odkritje, da so bile bifidobakterije bolj občutljive za vrednost pH 2, če je bilo gojišče zakisano izključno s HCl kot pa v kombinaciji HCl s pepsinom, ki bolje ponazarja sestavo želodčnega soka. Podobno so nedavne študije pokazale, naj bi pepsin z zmanjšanjem hiperpolarizacije celic, nudil zaščito celicam bifidobakterij v času izpostavljenosti nizkim vrednostim pH. Hiperpolarizacija je sprememba membranskega potenciala proti bolj negativni vrednosti. Izolati bifidobakterij iz blata dojenčkov so se izkazali kot bolj prilagojeni na razmere prebavnega trakta kot izolati iz odraslih (Jia in sod., 2010).

Probiotični pripravki največkrat vsebujejo mešanico različnih probiotičnih bakterij. Za nekatere kombinacije je dokazano, da interakcija med probiotičnimi sevi, kakor tudi prisotnost določenih sestavin v probiotičnih prehranskih dopolnilih, kot so proteini, laktoza in oligosaharidi, lahko povečajo preživetje med prehodom skozi prebavila in biološki učinek. Prisotnost mlečnih beljakovin ali mucina dokazano povečata preživetje probiotičnih bakterij v zgornjemu delu črevesja. Za bifidobakterije je dokazano izboljšanje preživetja v sinbiotičnih izdelkih (Mainville in sod., 2005). Tudi naši sevi bifidobakterij so bili osamljeni iz različnih oblik prehranskih dopolnil in zdravil (praški, tablete in kapsule), kjer so različne sestavine, kot so laktoza, dekstrin, maltodekstrin, inulin, arabinogalaktooligosaharidi in druge, dodane z namenom zaščite probiotičnih bakterij pred neugodnimi vplivi prebavnega trakta.

Čeprav smo iz treh izdelkov uspeli osamiti seve iste vrste, *B. animalis* ssp. *lactis*, smo dobili različne rezultate preživetja v razmerah prebavil, kar kaže na to, da je ta lastnost za sev specifična. Seva *B. animalis* ssp. *lactis* iz izdelka Waya IT in Yogermina sta imela podobno sposobnost preživetja, medtem ko se je dinamika preživetja *B. animalis* ssp. *lactis* iz izdelka Linbi močno razlikovala. Iz naših rezultatov kot tudi iz rezultatov številnih študij lahko trdimo, da imajo različne vrste in sevi različne sposobnosti preživetja razmer prebavnega trakta.

### 5.1.6 Protimikrobna aktivnost bifidobakterij

Tvorba protimikrobnih snovi je lastnost probiotičnih mikroorganizmov, pomembna tako z vidika tehnoloških lastnosti, kot tudi z vidika preživetja seva v prebavilih gostitelja, kolonizacije in sposobnosti tekmovanja s patogenimi mikroorganizmi. Tudi predstavniki rodu *Bifidobacterium* tvorijo različne protimikrobne snovi, med katerimi najdemo tudi bakteriocine in bakteriocinom podobne snovi. Pomembno vlogo pri protimikrobnem delovanju bifidobakterij imajo organske kisline, predvsem očetna in mlečna, ki sta končna produkta katabolizma ogljikovih hidratov. Obe kislini vplivata na znižanje pH okolja, kar zaviralno deluje na potencialno patogene bakterije. Nedisociirane kisline vstopajo v mikrobne celice in v citoplazmi disociirajo, kar vodi v smrt celice. Tudi drugi metabolni produkti, ki se sicer tvorijo v manjših količinah, pomembno vplivajo k celotnemu protimikrobnemu delovanju. Take snovi so ogljikov dioksid, mravljična kislina, bakteriocini in druge snovi (Cheikhoussef in sod. 2008).

Protimikrobno aktivnost bifidobakterij je prvi opazil Tissier leta 1900. Opisal je različne oblike antagonističnih učinkov *B. bifidum* proti *Escherichia coli* (Cheikhoussef in sod., 2008).

V naši študiji smo protimikrobni potencial izbranih bifidobakterij proti naboru 22-ih indikatorskih mikroorganizmov, med katere smo uvrstili tako tehnološke bakterije, kvarljivce



kot tudi patogene bakterije, ugotavljali z metodo lise na trdnem gojišču. Prisotnost protimikrobnih snovi v okolici lise z izraslimi kolonijami testnega seva smo po inkubaciji opazili v obliki cone inhibicije rasti indikatorskih sevov.

Protimikrobno najučinkovitejša sta bila seva *B. bifidum* iz izdelkov Bion3 in *B. infantis* iz Linex. Najslabšo protimikrobno aktivnost proti izbranim indikatorskim bakterijam je izkazal sev *B. animalis* ssp. *lactis* iz Waya IT.

Bifidobakterije so bile najučinkovitejše proti *Ent. faecalis*, *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *B. cereus*, *Staph. aureus* ter nekoliko manj učinkovite proti *Cl. tyrobutyricum* in *E. coli*. Tak protimikroben spekter je zanimiv z vidika varnosti in kakovosti, saj gre za kvarljivce oz. potencialno patogene bakterije.

Nobena od testiranih bifidobakterij ni izkazala protimikrobnega učinka proti *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* ali *Lb. rhamnosus*, proti *Lb. helveticus* pa je deloval le sev *B. bifidum* iz Bion3. Dobljeni rezultati so obetavni, saj se omenjene tri vrste *Lactobacillus* pogosto uporabljajo kot starterske kulture ali v probiotičnih izdelkih v kombinaciji z bifidobakterijami. Ugotovili smo tudi, da je večina bifidobakterij protimikrobno učinkovala proti *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, ki pa je tipičen predstavnik jogurtove kulture. Ker preiskovani sevi bifidobakterij, z izjemo izolata iz Waya IT, delujejo zaviralno proti predstavniku značilne jogurtove kulture, je potrebno pred uporabo kombinacij teh sevov za mešane starterske kulture za fermentirane mlečne izdelke preveriti medsebojno protimikrobno učinkovanje.

Čeprav je protimikrobno delovanje bifidobakterij pogosto posledica delovanja kisline, pa je vedno več znanega tudi o proizvodnji bakteriocinov pri bifidobakterijah. Številne študije opisujejo različne bakteriocine bifidobakterij, kot so bakteriocin bifidin, ki ga proizvaja *B. bifidum*, bakteriocin bifilong pri *B. longum*, bakteriocin Bifilact Bb-12, ki ga proizvaja *B. lactis* Bb-12 in bakteriocin Bifilong Bb-46 seva *B. longum* Bb-4. So pa ti bakteriocini še dokaj neraziskani. Za Bifilact Bb-1212 in Bifilong Bb-46, je dokazano protimikrobno delovanje proti *Staph. aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus* in *E. coli*. Kljub velikim študijam o bakteriocinih bifidobakterij, pa so bolj podrobno raziskani in imajo vsaj delno pojasnjeno aminokislinsko zaporedje le bakteriocini bifidocin B, ki ga proizvaja *B. bifidum* NCFB 1454, bakteriocin bifidin I, ki ga proizvaja *B. infantis* BCRC 14602 in lantibiotik bisin iz *B. longum* DJO10A. Bifidocin B dokazano inhibitorno deluje proti sevom iz rodov *Listeria*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* in *Pediococcus*. Bifidin I pa zaviralno deluje proti določenim sevom iz vrst *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. longum* in tudi proti nekaterim po Gram-u pozitivnim bakterijam, kot so *Lb. plantarum*, *Lb. fermentum*, *Lb. helveticus*, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Staph. aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *L. monocytogenes*, *Cl. butyricum* in proti določenim po Gram-u negativnim bakterijam, kot na primer *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enterica* ssp. *enterica*, *E. coli* in *Shigella dysenteriae* (Martinez in sod., 2013; Cheikhyoussef in sod., 2008).

Na podlagi naših rezultatov sklepamo, da je protimikrobni učinek bifidobakterij posledica delovanja nastale kisline/kislin in ne bakteriocinov. Čeprav so cone inhibicije ponekod zelo velike, pa pri nobeni nismo opazili ostro izraženegega robu, ki je pogosto značilen za delovanje bakteriocinov. Seveda pa bi za potrditev naše domneve morali preveriti morebitno proteinsko naravo protimikrobnih snovi.

### 5.1.7 Občutljivost bifidobakterij za antibiotike

Izbor antibiotikov je za zdravljenje bakterijskih okužb ključnega pomena, njihova uporaba pa razen tega usmerja evolucijo medicinsko pomembnih bakterij v razvoj odpornih vrst, kar se kaže z vse pogostejšimi neuspehi zdravljenja z antibiotiki. Zato je ugotavljanje razširjenosti izolatov, odpornih proti pogosto izbranim antibiotikom, ključnega pomena, saj je v primeru porasta deleža odpornih izolatov proti posameznemu antibiotiku smiselno njegovo uporabo omejiti. Zato smo tudi v naši raziskavi ugotavljali občutljivost bifidobakterij za nekatere najpogostejše uporabljane klinične antibiotike, in sicer ampicilin, eritromicin, gentamicin, klindamicin, streptomycin, tetraciklin in vankomicin.

Interpretacija rezultatov testiranja občutljivost bifidobakterij za antibiotike otežuje okoliščina, da za bifidobakterije še ni na voljo standardov za izvedbo in interpretacijo. Zato smo si pomagali z literaturnimi podatki. Čeprav je bilo opravljenih že precej raziskav o občutljivosti bifidobakterij za antibiotike, so rezultati različnih raziskav nasprotujoči, kar kaže na to, da je odpornost proti antibiotikom sevno specifična lastnost.

Vsi naši testirani sevi bifidobakterij so bili občutljivi za antibiotika ampicilin in vankomicin, kar navaja tudi večina raziskav. Občutljivost za vankomicin je pomembna, saj predstavlja vankomicin zadnje orožje pri hudih infekcijah, kjer penicilinski antibiotiki odpovejo. V večini raziskav je tudi zapisano, da so bifidobakterije pogosto odporne proti gentamicinu ter streptomycinu, kar pa iz naših rezultatov ne moremo trditi. Za eritromicin, klindamicin in tetraciklin v večini raziskav navajajo, da je odpornost odvisna od vrste (Ashraf in Shah, 2011).

Sev vrste *B. animalis* ssp. *lactis*, osamljen iz pripravka Linbi ter sev *B. bifidum*, osamljen iz Bion3, sta se izkazala kot najbolj odporna. Ostali sevi so kazali odpornost le proti enemu od antibiotikov. Če je sev občutljiv za antibiotike oz. je odporen proti antibiotikom, pa odpornost ni prenosljiva, potem uporaba takega seva v humane namene z vidika občutljivosti za antibiotike navadno ni vprašljiva. Če pa obstaja možnost prenosa odpornosti proti antibiotikom, ki ni intrinzična ali pridobljena z mutacijo, sev ni primeren za aplikacijo (Rogelj in Bogovič Matijašić, 2004).

Kiwaki in Sato (2009) sta analizirala občutljivost 26 sevov *B. breve* za 17 različnih antibiotikov. Vse vrednosti MIK za antibiotike gentamicin, eritromicin in vankomicin so bile nižje od mejnih vrednosti MIK za odpornost za rod *Bifidobacterium* ki jih navaja EFSA (2008). Lahko rečemo, da so testirani sevi *B. breve* občutljivi za te antibiotike. Tudi naš sev *B. breve* IM 386 se je izkazal kot občutljiv na omenjene antibiotike. Vrednosti MIK za antibiotika klindamicin in ampicilin so bile pri določenih sevih *B. breve* višje, pri določenih pa nižje od mejne vrednosti MIK, ki jo navaja EFSA (2008). V primeru našega seva *B. breve* IM 386 so bile odčitane vrednosti za antibiotik ampicilin nižje od mejne vrednosti MIK, za antibiotik klindamicin pa sta bili obe vrednosti višji od mejne vrednosti MIK. Občutljivost za ta dva antibiotika je za sev specifična, naš sev pa je pokazal občutljivost za ampicilin in odpornost proti klindamicinu. Kiwaki in Sato (2009) so testirali odpornost proti streptomycinu. Večina sevov *B. breve* je dala vrednosti MIK med 8 in 64 µg/ml, kar je nižje od mejne vrednosti MIK, ki jo navaja EFSA (2008) za rod *Bifidobacterium* (128 µg/ml). Pri sedmih sevih pa so odčitane vrednosti MIK znašale več kot 256 µg/ml, kar zopet kaže na to, da je ta lastnost za sev specifična. Za sev *B. breve* IM 386 so bile odčitane vrednosti med 12 in 16 µg/ml, kar je podobno kot pri večini sevov, testiranih v raziskavi Kiwaki in Sato (2009).

Ker so odčitane vrednosti nižje od mejne vrednosti, lahko trdimo, da sev ni odporen proti streptomycinu. Za občutljivost za tetraciklin, EFSA (2008) kot mejno vrednost za rod *Bifidobacterium* navaja vrednost 8 µg/ml. Kiwaki in Sato (2009) so pri 12-ih testiranih sevih *B. breve* pokazali odpornost proti tetraciklinu, medtem ko so bile odčitane vrednosti MIK ostalih sevov pod mejno vrednostjo. Pri našem sevu *B. breve* IM 386 smo odčitali veliko nižje vrednosti MIK od mejnih, in sicer med 0,25 in 0,38 µg/ml.

Eden pomembnejših dejavnikov, ki vpliva na izvedbo testa občutljivosti za antibiotike, je izbira primerne gojišča. V našem primeru se izbira gojišča MH+MRS (90 % + 10 %) izkazala neustrezna za sev *B. longum* osamljen iz izdelka Lacto Seven in sev *B. animalis* ssp. *lactis* osamljen iz izdelka Waya IT. Poleg tega pa na rezultate vpliva tudi koncentracija testnih bakterij ter pogoji inkubacije. Da bi bili rezultati čim bolj primerljivi, smo pripravili bakterijske suspenzije bifidobakterij, ki so ustrezale koncentraciji približno 10<sup>6</sup> KE/ml ter vse teste izvedli v istih pogojih.

## 5.2 SKLEPI

Iz rezultatov naše študije lahko podamo naslednje sklepe:

- Gojišče TOS+mup, ki smo ga uporabili za osamitev bifidobakterij iz prehranskih dopolnil, se je izkazalo kot primerno.
- Z uporabo za rod *Bifidobacterium* specifičnih začetnih oligonukleotidov smo v reakciji PCR potrdili, da so izolati, pridobljeni iz izdelkov, predstavniki rodu *Bifidobacterium*.
- Pri potrjevanju vrst z vrstno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi smo v večini primerov uspešno potrdili določeno vrsto, v dveh primerih pa smo opazili tudi nespecifično pomnoževanje (*B. infantis*, *B. longum*).
- Na podlagi naših rezultatov lahko trdimo, da je sposobnost rasti v mleku ali v mleku s kvasnih ekstraktom, preživetje bifidobakterij v simuliranih razmerah prebavil, protimikrobna aktivnost in občutljivost bifidobakterij za antibiotike sevno specifična lastnost.
- Dodatek 0,1 % kvasnega ekstrakta ne vpliva na rast seva *B. breve* IM 386, zmanjša pa odmiranje po končani fazi rasti.
- Sev *B. breve* IM 386 je izkazal najboljšo sposobnost preživetja v simuliranih razmerah prebavil.
- Sev *B. breve* IM 386 je protimikrobno deloval proti 15-im od skupno 22 indikatorskih mikroorganizmov, med drugim tudi proti nekaterim potencialno patogenim bakterijam, kar je prednost pri uporabi takega seva v živilski industriji ali humani medicini.
- Sev *B. breve* IM 386 je izkazal občutljivost za vse antibiotike, razen za klindamicin. Pomembno je predvsem dejstvo, da je IM 386 občutljiv za vankomicin.

## 6 POVZETEK

V raziskavi smo analizirali in primerjali različne seve bifidobakterij, pridobljene iz probiotičnih izdelkov, zdravil oziroma sev *B. breve* IM 386 iz materinega mleka, lasten izolat Inštituta za mlekarstvo in probiotike. Ta vrsta se še ne uporablja množično v komercialnih probiotičnih izdelkih, zato so nas zanimale prednosti in slabosti v primerjavi z ostalimi vrstami bifidobakterij, bolj razširjenimi v izdelkih.

Rod *Bifidobacterium* predstavlja pomemben delež med probiotičnimi kulturami, ki se uporabljajo v živilski industriji. Najpogostejši sevi, ki jih uporabljajo v industriji, pripadajo vrstam *B. animalis*, *B. longum*, *B. bifidum* in *B. infantis*. Predstavniki teh vrst so znani tudi po svoji pomembni vlogi v črevesu. Tudi sevi vrste *B. breve* se že uporabljajo v živilski in farmacevtski industriji, najpogosteje v obliki prehranskih dopolnil. Na slovenskem tržišču je veliko probiotičnih prehranskih dopolnil, ki imajo na deklaraciji navedeno to vrsto (Lepicol Baby, Probio Junior, Probio 4Ever, Ultrabiotique, Maxi Flore, Nutrilab ProBIO...). V živilski industriji pa se ta vrsta ne pojavlja tako pogosto. Na slovenskem tržišču nismo našli fermentiranega mlečnega izdelka, ki bi vseboval vrsto *B. breve*. Eden najbolj znanih izdelkov, ki vsebuje sev omenjene vrste, je napitek na bazi sirotke, ki ga proizvaja podjetje Yakult na Japonskem.

Dodatek kvasnega ekstrakta ni vplival na rast *B. breve* IM 386, je pa zaščitil bakterije pred prehitrim odmiranjem po končani fazi rasti. Iz rezultatov smo zaključili, da sev IM 386 na splošno slabo raste v mleku in v mleku s kvasnim ekstraktom. Tudi do nastanka koagulumu ni prišlo, prav tako nismo zaznali vonja po očetni kislini.

Sev *B. breve* IM 386 je med analiziranimi bifidobakterij izkazal najboljšo preživelost v simuliranih razmerah prebavil. Tako nizke vrednosti pH in encim pepsin kot tudi žolčne soli in encimi trebušne slinavke niso bistveno vplivali na preživetje tega seva. To lahko povežemo z dejstvom, da je tipičen habitat bifidobakterij človeški prebavni trakt ter prebavni trakt toplokrvnih živali. Člani rodu *Bifidobacterium* so med najpogostejšimi mikroorganizmi v človeškem črevesu, ki predstavljajo do 3 % celotne fekalne mikrobiote odraslih. Sev *B. breve* IM 386 pa je humani izolat, osamljen iz mleka doječe matere in iz blata njenega otroka, zato smo predvidevali, da bo izkazal dobro preživelost.

Sev *B. breve* IM 386 je kazal zelo dobro protimikrobno delovanje proti *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *B. cereus* in *Staph. aureus*, kar je pri uporabi za živilske proizvode pomembno, saj gre za potencialno patogene mikroorganizme. Slabše se je odrezal proti *Cl. perfringens*, *Ent. faecalis*, *Ent. durans* in *Ent. faecium*, kjer so bile cone inhibicije zelo majhne, ni pa izkazal protimikrobnega učinka proti *Cl. tyrobutyricum* in *E. coli*. Slaba stran seva IM 386 je zaviralno delovanje proti *Lb. bulgaricus*, *Lb. sakei*, *Lb. johnsonii* in *Lb. paracasei*, ki so industrijski mikroorganizmi. Predvsem delovanje proti *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* je problematično, saj gre za predstavnika tipične jogurtove kulture. Je pa inhibitorno delovanje proti tem bakterijam slabše, saj cone inhibicije niso bile večje od 5 mm. Dobro pa je, da ne deluje zaviralno proti sevom vrst *Lb. plantarum*, *Lb. fermentum*, *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis*, *Lb. helveticus* in *Lb. rhamnosus*, ki se prav tako uporabljajo kot industrijski mikroorganizmi.

Na podlagi opazovanja nastalih con inhibicije (majhne cone, zabrisan rob) smo zaključili, da je protimikrobno učinkovanje seva *B. breve* IM 386 najverjetneje posledica tvorbe in delovanja kislin, ne pa bakteriocinov.

Za probiotične bakterije je zelo pomembno, da ne vsebujejo rezistence proti nekaterim glikopeptidnim antibiotikom (vankomicin), ki so zadnje orožje pri hudih infekcijah, kjer penicilinski antibiotiki odpovejo (Rogelj in Bogovič Matijašić, 2004). V naši raziskavi smo ugotovili, da so vse analizirane vrste bifidobakterij občutljive za vankomicin, kar je pomemben podatek.

Pri sevih, za katere smo ugotovili rezistenco proti antibiotiku, bi bilo potrebno raziskati, ali lahko pride do prenosa rezistence na druge bakterije. Sev *B. breve* IM 386 je po naših rezultatih izkazal kot občutljiv za vse testirane antibiotike, razen za klindamicin. Zato bi bilo v primeru antibiotika klindamicin, pred industrijsko uporabo zaželeno izključiti možnost, da je rezistenca v tem primeru prenosljiva.

Iz rezultatov naše študije lahko zaključimo, da je sev *B. breve* IM 386 obetaven kandidat za uporabo v živilski in/ali farmacevtski industriji. Njegova dobra sposobnost preživetja skozi prebavni trakt nakazuje, da bi bakterije lahko v zadostnem številu prišle do ciljnega mesta, kjer bi lahko ugodno učinkovale na zdravje gostitelja. Mleko, samo ali obogateno s kvasnim ekstraktom, ne bi bilo primerno za gojenje tega seva. V prid morebitnemu probiotičnemu delovanju govori tudi odkrito zaviralno delovanje proti nekaterim potencialno patogenim bakterijam in kvarljivkam, kot na primer proti *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *Cl. perfringens*, *Ent. faecalis*, *Ent. durans*, *Ent. faecium*, *Staph. aureus*, *L. innocua*... Pri morebitni uporabi v mešanih starterskih kulturah pa je potrebno upoštevati, da je sev inhibitorno deloval tudi proti nekaterim vrstam laktobacilov.

## 7 VIRI

- Andriantsoanirina V., Allano S., Butel M.J., Aires J. 2013. Tolerance of *Bifidobacterium* human isolates to bile, acid and oxygen. *Anaerobe*, 21: 39–42
- Ashraf R., Shah N.P. 2011. Antibiotic resistance of probiotic organisms and safety of probiotic dairy products. *International Food Research Journal*, 18, 3: 837–853
- 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
- Biavati B., Vescovo M., Torriani S., Bottazzi V. 2000. Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Annals of Microbiology*, 50: 117–131
- 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: 153–161
- Bogovič Matijašić B., Rogelj I., Nes I.F., Holo H. 1998. Isolation and characterization of two bacteriocins of *Lactobacillus acidophilus* LF221. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49: 606–612
- Bogovič Matijašić B., Zorč Peternel M., Rogelj I. 2010. Ugotavljanje deklariranih bakterij v probiotičnih prehranskih dopolnilih in zdravilih na slovenskem trgu. *Farmacevtski vestnik*, 61: 263–269
- Boyer R. 2005. Temelji biokemije. Ljubljana, Študentska založba: 349–351
- Charteris W.P., Kelly P.M., Morelli L., Collins J.K. 1998. Development and application of an *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, 84: 759–768
- Cheikhyyoussef A., Pogori N., Chen W., Zhang H. 2008. Antimicrobial proteinaceous compounds obtained from bifidobacteria: From production to their application. *International Journal of Food Microbiology*, 125: 215–222
- Chr. Hansen. 2012. Improving food&health. Products: Product area: Probiotics for dietary supplements. Strains. BB-12®. Hørsholm, Chr. Hansen: 2 str.  
<http://www.chr-hansen.com/products/product-areas/probiotics-for-dietary-supplements/strains/bb-12r.html> (januar 2013)
- Cleveland J., Montville T.J., Nes I.F., Chikindas M.L. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71: 1–20

- Cronin M., Ventura M., Fitzgerald G. F., van Sinderen D. 2011. Progress in genomics, metabolism and biotechnology of bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 149: 4–18
- Čanžek A., Bogovič Matijašić B., Zorič Peternel M., Rogelj I. 2009. Lastnosti in delovanje bakteriocinov mlečnokislinskih bakterij v različnih okoljih. V: Pomen mikrobiologije in biotehnologije za prihodnost. Protimikrobne snovi. Ljubljana, 29. in 30. januar 2009. Raspor P., Petković H. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 119–130
- EFSA. 2008. Technical guidance prepared by the panel on additives and products or substances used in animal feed (FEEDAP) on the update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. *The EFSA Journal*, 6, 7: 732, doi: 10.2903/j.efsa.2008.732: 15 str.
- Evropska komisija. 2011. Sporočilo komisije evropskemu parlamentu in svetu, Akcijski načrt proti naraščajoči nevarnosti protimikrobne odpornosti. Bruselj, Evropska komisija: 16 str. [http://ec.europa.eu/dgs/health\\_consumer/docs/communication\\_amr\\_2011\\_748\\_sl.pdf](http://ec.europa.eu/dgs/health_consumer/docs/communication_amr_2011_748_sl.pdf) (oktober 2012)
- Felis G.E., Dellaglio F. 2007. Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 8, 2: 44–61
- Fernández M.F., Boris S., Barbés C. 2003. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, 94: 449–455
- Gomes A. M. P., Malcata X. F. 1999. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science & Technology*, 10: 139–157
- Holzapfel W. H., Haberer P., Snel J., Schillinger U., Huis in't Veld J. H. J. 1998. Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 41: 85–101
- Holzapfel W.H., Schillinger U. 2002. Introduction to pre- and probiotics. *Food Research International*, 35: 109–116
- ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs-General requirements and guidance for microbiological examinations. 3<sup>rd</sup> ed. 2007: 66 str.
- Jeršek B. 2009. Higiena živil: Laboratorijske vaje za študente živilstva in prehrane. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 26–28
- Jia L., Shigwedha N., Mwandemele O.D. 2010. Use of  $D_{acid^-}$ ,  $D_{bile^-}$ ,  $z_{acid^-}$ , and  $z_{bile^-}$  values in evaluating bifidobacteria with regard to stomach pH and bile salt sensitivity. *Journal of Food Science*, 75, 1: M14–M18
- Jorgensen J.H., Ferraro M.J. 2009. Antimicrobial susceptibility testing: A review of general principles and contemporary practices. *Clinical Infectious Diseases*, 49, 11: 1749–1755

- Kiwaki M., Sato T. 2009. Antimicrobial susceptibility of *Bifidobacterium breve* strains and genetic analysis of streptomycin resistance of probiotic *B. breve* strain Yakult. *International Journal of Food Microbiology*, 134: 211–215
- Klare I., Konstabel C., Müller-Bertling S., Reissbrodt R., Huys G., Vancanneyt M., Swings J., Goossens H., Witte W. 2005. Evaluation of new broth media for microdilution antibiotic susceptibility testing of lactobacilli, pediococci, lactococci, and bifidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 12: 8982–8986
- Krajnik K. 2009. Proučevanje populacij bifidobakterij in laktobacilov v materinem mleku in blatu dojenčka. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 1–56
- Lazea Barascu E., Banu C. 2003. Influence of yeast extract and wheat embryos on growth of bifidobacteria in milk. *Annals of University Dunarea de Jos of Galati, Fascicle VI – Food Technology*: 10–13
- Mainville I., Arcand Y., Farnworth E. R. 2005. A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 99: 287–296
- Martinez F.A.C, Balciunas E.M., Converti A., Cotter P.D., de Souza Oliveira R.P. 2013. Bacteriocin production by *Bifidobacterium* spp. *Biotechnology Advance*, 31: 483–488
- Matsuki T., Watanabe K., Tanaka R., Fukuda M., Oyaizu H. 1998. Rapid identification of human intestinal bifidobacteria by 16S rRNA-targeted species- and group- specific primers. *FEMS Microbiology Letters*, 167: 113–121
- Matsuki T., Watanabe K., Tanaka R., Fukuda M., Oyaizu H. 1999. Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 10: 4506–4512
- Matsuki T., Watanabe K., Tanaka R. 2003. Genus- and species- specific PCR primers for the detection and identification of bifidobacteria. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 4: 61–69
- Mattila-Sandholm T., Myllärinen P., Crittenden R., Mogensen G., Fondén R., Saarela M. 2002. Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal*, 12: 173–182
- Mohammadi R., Sohrabvandi S., Mohammad Mortazavian A., 2012. The starter culture characteristics of probiotic microorganisms in fermented milks. *Engineering in Life Sciences*, 12, 4: 399–409
- Pravilnik o prehranskih dopolnilih. 2003. Uradni list Republike Slovenije, 13, 82: 12227–12231



- Raspor P., Rogelj I. 2001. Funkcionalna hrana–definicije. V: Funkcionalna hrana. 21. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 8-9 nov. 2001. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 25–36
- Rogelj I. 2001. Probiotiki, prebiotiki in sinbiotiki. V: Probiotiki in možnost njihove uporabe: zbornik predavanj, Ljubljana 8. marec 2001. Pavčič M., Vitezić N. (ur.). Ljubljana, Zbornica nutricionistov in dietetikov: 6–16
- Rogelj I., Bogovič Matijašić B. 2004. Probiotiki in varnost. V: Varnost živil. 22. Bitenčevi živilski dnevi, Radenci, 18. in 19. marec 2004. Gašperlin L., Žlender B. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 181–189
- Rogelj I., Perko B. 2003. Mlečni izdelki. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 541–577
- 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
- Satokari R.M., Vaughan E.E., Akkermans A. D. L., Saarela M., De Vos W.M. 2001. Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus- specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 504–513
- Shah N.P. 2000. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Science*, 83: 894–907
- Simpson P.J., Fitzgerald G.F., Stanton C., Ross R.P. 2004. The evaluation of a mupirocin-based selective medium for the enumeration of bifidobacteria from probiotic animal feed. *Journal of Microbiological Methods*, 57: 9–16
- Teskač K., Hudournik N., Marinšek Logar R., Kristl J. 2008. Pomen probiotikov kot prehranskih dopolnil in zdravil. *Farmacevtski vestnik*, 58, 6: 287–292
- Thermo Scientific. 2012. Product information: GeneRuler 100 bp DNA Ladder in GeneRuler 1kb DNA Ladder 250 to 10,000 bp. Waltham, Thermo Scientific: 2 str.  
[http://www.thermoscientificbio.com/uploadedFiles/Resources/SM024\\_TS\\_6.pdf](http://www.thermoscientificbio.com/uploadedFiles/Resources/SM024_TS_6.pdf)  
<http://www.thermoscientificbio.com/uploadedFiles/Resources/sm0312-product-information.pdf> (januar 2013)
- Thitaram S.N., Siragusa G.R., Hinton Jr A. 2005. *Bifidobacterium*-selective isolation and enumeration from chicken caeca by a modified oligosaccharide antibiotic-selective agar medium. *Letters in Applied Microbiology*, 41: 355–360
- Torriani S., Zapparoli G., Dellaglio F. 1999. Use of PCR-based methods for rapid differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* subsp. *lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 10: 4351–4356
- Turroni F., van Sinderen D., Ventura M. 2011. Genomics and ecological overview of the genus *Bifidobacterium*. *International Journal of Food Microbiology*, 149, 1: 37–44

- Vasiljevic T., Shah N.P. 2008. Probiotics – from Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*, 18: 714–728
- Ventura M., Reniero R., Zink R. 2001. Specific identification and targeted characterization of *Bifidobacterium lactis* from different environmental isolates by a combined multiplex-PCR approach. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 6: 504–513
- Vincent D., Royb D., Mondoua F., Déry C. 1998. Characterization of bifidobacteria by random DNA amplification. *International Journal of Food Microbiology*, 43: 185–193
- WHO/FAO. 2001. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria: report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, Argentina, Food and Agriculture Organization of the United Nations: 34 str.  
[http://www.who.int/foodsafety/publications/fs\\_management/en/probiotics.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf) (september 2012)
- Youn S.Y., Seo1 J.M., Ji G.E. 2008. Evaluation of the PCR method for identification of *Bifidobacterium* species. *Letters in Applied Microbiology*, 46: 7–13