

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Urška ŠKORJANC

**KOLOSTRUM KOT VIR MLEČNOKISLINSKIH
BAKTERIJ IN BIFIDOBAKTERIJ ZA
NOVOROJENCA**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja Prehrana

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Urška ŠKORJANC

**KOLOSTRUM KOT VIR MLEČNOKISLINSKIH BAKTERIJ IN
BIFIDOBakterIJ ZA NOVOROJENCA**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja Prehrana

**COLOSTRUM AS A SOURCE OF LACTIC ACID BACTERIA AND
BIFIDOBACTERIA FOR A NEWBORN**

M.Sc THESIS
Master Study Programmes: Field Nutrition

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek univerzitetnega študijskega programa 2. stopnje Prehrana. Praktičen del naloge je bil opravljen na Katedri za mlekarstvo, Oddelka za zootehniko, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrske naloge imenovala prof. dr. Ireno Rogelj, za somentorico asist. dr. Petro Mohar Lorbeg in za recezentko prof. dr. Barbko Jeršek.

Mentorica: prof. dr. Irena Rogelj
Somentorica: asist. dr. Petra Mohar Lorbeg
Recezentka: prof. dr. Barbka Jeršek

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Član:

Datum zagovora:

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

Urška ŠKORJANC

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2
DK UDK 612.664.3:579.24/26:577.2.083(043)=163.6
KG humani kolostrum/ bakterijski izolati/ mikrobiota kolostruma/ mlečnokislinske bakterije/ bifidobakterije/ izolacija/ sekvenciranje
AV ŠKORJANC, Urška, dipl. inž. živ. in preh. (UN)
SA ROGELJ, Irena (mentorica)/ MOHAR LORBEG, Petra (somentorica)/ JERŠEK, Barbka (recezentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI 2015
IN KOLOSTRUM KOT VIR MLEČNOKISLINSKIH BAKTERIJ IN BIFIDOBAKTERIJ ZA NOVOROJENCA
TD Magistrska naloga (Magistrski študij – 2. stopnja Prehrana)
OP IX, 42 str., 5 pregl., 11 sl., 38 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Namen magistrske naloge je bil raziskati in analizirati mikrobno populacijo kolostruma, ki predstavlja pomemben vir hranilnih snovi, protiteles in rastnih faktorjev za novorojenca. Analizirali smo 584 bakterijskih izolatov humanega kolostruma, ki so pripadali 102 darovalkam (Projekt Vloga humanega mleka v razvoju črevesne mikrobiote dojenčka; J4-3606). Najprej smo izolate iz vzorcev kolostruma nacepili na plošče z gojiščem MRS (de Man, Rogosa in Sharpe), sledila je izolacija DNA iz izbranih osamljenih kolonij, ki so izrasle na gojišču MRS. Nato smo z metodo RAPD primerjali DNA izbranih izolatov humanega kolostruma in z vizualno primerjavo izbrali tiste izolate, ki so imeli različne vzorce pomnožkov. Za sekvenciranje smo izbrali 93 vzorcev bakterijskih izolatov. Po prečiščevanju izolatov smo s pomočjo komercialnega kompleta reagentov izolirali njihovo DNA, jo ponovno primerjali z analizo RAPD, s PCR pomnožili 16S rDNA in pomnožke poslali na sekvenciranje. Dobljena zaporedja nukleotidov smo primerjali z bazo podatkov NCBI, ter s programskim orodjem BLAST določili vrste izolatov, nato pa ocenili vrstno sestavo mikrobne populacije, ki je bila prisotna v vzorcih humanega kolostruma. Analize so pokazale, da je večina naših izolatov pripadala rodovom *Staphylococcus* (62 %), *Pediococcus* (13 %) in *Streptococcus* (10 %). V manjši zastopanosti pa tudi rodovom *Lactobacillus* (6 %), *Enterococcus* (3%), *Actinomyces* (3 %), *Corynebacterium* (2 %) in *Bifidobacterium* (1 %). Najpogostejše identificirane vrste so bile: *Staphylococcus epidermidis*, *Pediococcus acidilactici/pentosaceus/lolii* in *Streptococcus parasanguinis*.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2

DC UDK 612.664.3: 579.24/26: 577.2.083 (043)=163.6

CX human colostrum/ bacterial isolates/ microbiota of colostrum/ lactic acid bacteria/ bifidobacteria/ isolation/ sequencing

AU ŠKORJANC, Urška, dipl. inž. živ. in preh. (UN)

AA ROGELJ prof. dr., Irena (supervisor)/ MOHAR LORBEG asist. dr., Petra (co-advisor)/ JERŠEK prof. dr, Barbka (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology

PY 2015

TI COLOSTRUM AS A SOURCE OF LACTIC ACID BACTERIA AND BIFIDOBACTERIA FOR A NEWBORN

DT M. Sc. Thesis (Master study programme: Field of Nutrition)

NO IX, 42 p., 5 tab., 11 fig., 38 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Human colostrum represents the first nourishment for the new-born and it is an important source of nutrients, antibodies and growth factors. Microbial population of human colostrum was analysed, since human colostrum and milk microbiota have a significant influence on development of intestinal microbiota of the new-born. Human colostrum was obtained from 102 women and was inoculated into the MRS media and 584 colonies were selected for the analysis. First screening of the isolates was performed using RAPD-PCR on DNA isolated directly from grown bacterial colonies. Afterwards, DNA of the selected isolates was isolated using commercial DNA purification kit and used in second comparison with RAPD-PCR. Finally, 93 strains possessing unique RAPD pattern were selected for 16S rDNA sequencing. The comparison of obtained sequences with NCBI database revealed, that predominant bacterial population of human colostrum belongs to the genus *Staphylococcus* (62 %), *Pediococcus* (13 %) and *Streptococcus* (10 %). The presence of strains belonging to genus *Lactobacillus* (6%), *Enterococcus* (3 %), *Actinomyces* (3 %), *Corynebacterium* (2 %) and *Bifidobacterium* (1 %) were also confirmed. *Staphylococcus epidermidis*, *Pediococcus acidilactici/pentosaceus/lolii* and *Streptococcus parasanguinis* were the dominant species found in human colostrum.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK.....	VII
KAZALO PREGLEDNIC.....	VIII
KAZALO PRILOG.....	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	X

1 UVOD	1
1.1 NAMEN NALOGE	2
1.2 HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 NARAVNA MIKROBIOTA ČLOVEKA.....	3
2.2 PREDNOSTI DOJENJA	4
2.3 HUMANO MLEKO	5
2.3.1 Faze laktacije.....	5
2.3.2 Sestava humanega mleka	6
2.4 HUMANI KOLOSTRUM.....	6
2.4.1 Mikrobiota humanega kolostruma	7
2.4.1.1 Mlečnokislinske bakterije (MKB).....	8
2.4.1.2 Bifidobakterije	8
2.5 PRENOS BAKTERIJ IZ MATERE NA NOVOROJENCA	8
2.5.1 Razvoj črevesne mikrobiote novorojenca.....	9
2.5.2 Prenos bakterij v mlečno žlezo	10
3 MATERIALI IN METODE	13
3.1 MATERIALI	13
3.1.1 Vzorci.....	13
3.1.2 Gojišča	13
3.1.2.1 Gojišče MRS	13
3.1.2.2 Tekoče gojišče MRS.....	13
3.1.2.3 Tekoče gojišče MRS s 30 % glicerolom	14
3.1.3 Reagenti za izolacijo DNA in izvedbo PCR.....	14
3.1.3.1 Reagenti za izolacijo DNA	14
3.1.3.2 Reagenti za izvedbo PCR	14
3.1.4 Reagenti za izvedbo elektroforeze in čiščenje pomnožkov PCR	15
3.1.5 Laboratorijska oprema	15
3.2 METODE	16
3.2.1 Priprava bakterijskih izolatov iz humanega kolostruma	17
3.2.2 Izolacija DNA iz kolonij.....	17

3.2.3 Analiza RAPD	17
3.2.4 Agarozna gelska elektroforeza	19
3.2.5 Čiščenje izbranih izolatov	20
3.2.6 Izolacija DNA iz kulture izbranih sevov	21
3.2.6.1 Potek izolacije DNA	21
3.2.7 Analiza RAPD-PCR izbranih sevov	21
3.2.8 Pomnoževanje 16 S rDNA izbranih sevov z metodo PCR	22
3.2.9 Čiščenje pomnožkov PCR	22
3.2.10 Sekvenciranje in primerjava nukleotidnih zaporedij z bazo podatkov NCBI	23
4 REZULTATI	24
4.1 GENOTIPIZACIJA IZOLATOV IZ HUMANEGA KOLOSTRUMA Z RAPD	24
4.2 IZBOR SEVOV ZA NADALJNJE ANALIZE	25
4.3 SEKVENCIRANJE 16S rDNA IZBRANIH SEVOV	27
4.3.1 Rezultati identifikacije izbranih sevov	27
5 RAZPRAVA	29
5.1 VRSTNA SESTAVA MIKROBIOTE VZORCEV HUMANEGA KOLOSTRUMA	29
5.2 MOŽEN IZVOR IDENTIFICIRANIH MIKROORGANIZMOV	31
6 SKLEPI	35
7 POVZETEK	36
8 VIRI	38
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO SLIK

Slika 1: Taksonomska porazdelitev mikroorganizmov pri materi in otroku (Reid in sod., 2011).....	3
Slika 2: Poznana mesta v človeškem telesu, kjer se mikrobiota naravno obnavlja (Reid in sod., 2011).	4
Slika 3: Možni načini oblikovanja mikrobiote humanega mleka (Jeurink in sod., 2013)...	12
Slika 4: Shematski prikaz poteka laboratorijskega dela.	16
Slika 5: Priprava vzorcev za PCR	19
Slika 6: Naprava za agarozno gelsko elektroforezo.	20
Slika 7: Pomnožki analize RAPD z začetnim oligonukleotidom M13, ki smo jo opravili na DNA izolirani iz kolonij izolatov 1-28.....	24
Slika 8: Pomnožki analize RAPD z začetnim oligonukleotidom KGT-70GC.....	25
Slika 9: Pomnožki analize RAPD z začetnim oligonukleotidom M13, ki smo jo opravili na DNA izolirani iz kulture izbranih sevov.....	26
Slika 10: Pomnožki PCR z univerzalnima začetnima oligonukleotidoma 27 f in 1495R, ki pomnožujeta <i>16S rDNA</i>	27
Slika 11: Sestava proučevane mikrobne populacije humanega kolostruma.....	28

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Program za analizo RAPD z začetnim oligonukleotidom M13 (Torriani in sod., 1999)	18
Preglednica 2: Program za analizo RAPD z začetnim oligonukleotidom KGT-70GC.....	18
Preglednica 3: Program za pomnoževanje <i>16S rDNA</i> s PCR (Yu in sod., 2011).....	22
Preglednica 4: Vrstna sestava proučevane mikrobne populacije humanega kolostruma	28
Preglednica 5: Identificirane bakterije v humanem mleku (Jeurink in sod., 2013).....	30

KAZALO PRILOG

PRILOGA A: **Rezultati analiz RAPD**

PRILOGA B: **Rezultati identifikacije izbranih sevov na osnovi sekvenciranja 16S
*rDNA***

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AGE	agarozna gelska elektroforeza
B.	<i>Bifidobacterium</i>
BLAST	programsko orodje (angl. <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>)
DGGE	denaturacijska gradientna gelska elektroforeza (angl. <i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i>)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	deoksiribonukleotid trifosfat (mešanica nukleotidov)
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina (angl. <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
GIT	gastrointestinalni trakt
GRAS	splošno priznan varen status (angl. <i>Generally recognized as safe</i>)
Ig	protitelesa/immunoglobulini (angl. <i>Immunoglobulins</i>)
IgA	protitelesa razreda A
IgD	protitelesa razreda D
IgE	protitelesa razreda E
IgG	protitelesa razreda G
IgM	protitelesa razreda M
KE	kolonijska enota
KE/ml	kolonijske enote na mililiter
L.	<i>Lactobacillus</i>
MKB	mlečnokislinske bakterije
MRS	gojišče de Man, Rogosa in Sharpe
NCBI	Nacionalni center za biotehnološke informacije (angl. <i>National Center for Biotechnology Informations</i>)
PCR	verižna reakcija s polimerazo
RAPD	naključno pomnožena polimorfna DNK (angl. <i>randomly amplified polymorphic DNA</i>)
rDNA	ribosomalna DNA (angl. <i>Ribosomal DNA</i>)
sp.	vrsta (angl. <i>Species</i>)
TAE	TRIS acetatni pufer
UV	ultravijoličen

1 UVOD

Humano mleko je kompleksna mešanica hranil, ki predstavlja popolno hrano za novorojenca v prvih mesecih njihovega življenja. Sestava biološke tekočine, ki jo izloča mlečna žleza, se med laktacijo spreminja. Glede na sestavo ločimo tri stadije, to so kolostrum, prehodno mleko in zrelo mleko. Prva hrana, ki jo zaužije novorojenec je kolostrum ali mlezivo, ki ga mlečna žleza izloča prvih pet dni po rojstvu in predstavlja pomemben vir hranil in zaščitnih snovi za novorojenca. Vsebuje visoke koncentracije proteinov s protimikrobnim delovanjem, kot so imunoglobulini, laktoferin, lizocim in laktoperoksidaza. Zaradi svojih lastnosti so relativno odporni proti proteolizi v prebavnem traktu, kar pomeni, da posledično varujejo dojene novorojenca pred patogenimi bakterijami in virusi (Sousa in sod., 2014).

Dolga leta je veljalo prepričanje, da je humano mleko sterilna tekočina, vendar so raziskave v zadnjem desetletju pokazale, da običajno vsebuje od 10^3 do 10^4 KE bakterij/ml. Metode osnovane na gojenju bakterij so pokazale, da v mleku zdravih doječih mater prevladujejo koagulaza negativni stafilokoki in streptokoki, kar so potrdile tudi molekularne metode. Pogosto so prisotne tudi predstavnice propionibakterij, korinebakterij, mlečnokislinskih bakterij, bifidobakterij in enterobakterij (Jeurink in sod., 2013). V primerjavi s humanim mlekom, je o bakterijski sestavi kolostruma malo znanega. Kljub temu, da je količina kolostruma majhna, pa Jiménez in sod. (2008) navajajo, da vsebuje visoke koncentracije hranil in elementov imunskega sistema, kot so imunoglobulini (IgA, IgM, IgG, IgE in IgD) in citokini. Zaradi tega je kolostrum glavni dejavnik, ki ščiti novorojenca pred okužbami in z njimi povezanimi obolenji. Pri proučevanju bakterijske sestave kolostruma so avtorji določili, da sta glavna predstavnika *Staphylococcus epidermidis* in *Enterococcus faecalis*, sledili so *Streptococcus mitis*, *Propionibacterium acnes* in *Staphylococcus lugdunensis* (Jiménez in sod., 2008).

V okviru raziskovalnega projekta Vloga humanega mleka v razvoju črevesne mikrobiote dojenčka (J4-3606; »Moje-mleko«) so prisotnost bakterij v kolostrumu potrdili z nacepljanjem mleka na različna selektivna gojišča. Posamezne kolonije z gojišč so namnožili in shranili za nadaljnje raziskave.

1.1 NAMEN NALOGE

O sestavi mikrobiote humanega kolostruma je malo podatkov, zato smo si v nalogi zastavili cilj, da proučimo shranjene bakterijske izolate iz humanega kolostruma, ki so nam bili na voljo in določimo vrstno sestavo mlečno kislinskih bakterij (MKB) in bifidobakterij, ki so prisotne v vzorcih humanega kolostruma.

Izolate iz vzorcev kolostruma smo očistili, identificirali in medsebojno primerjali seve osamljene z gojišča MRS. Gojišče MRS je namenjeno izolaciji laktobacilov, omogoča pa tudi rast nekaterih vrst drugih bakterijskih rodov, npr. *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium*. Želeli smo ugotoviti, katere vrste bakterij so prisotne v kolostumu in katere od njih so pogostejše.

1.2 HIPOTEZE

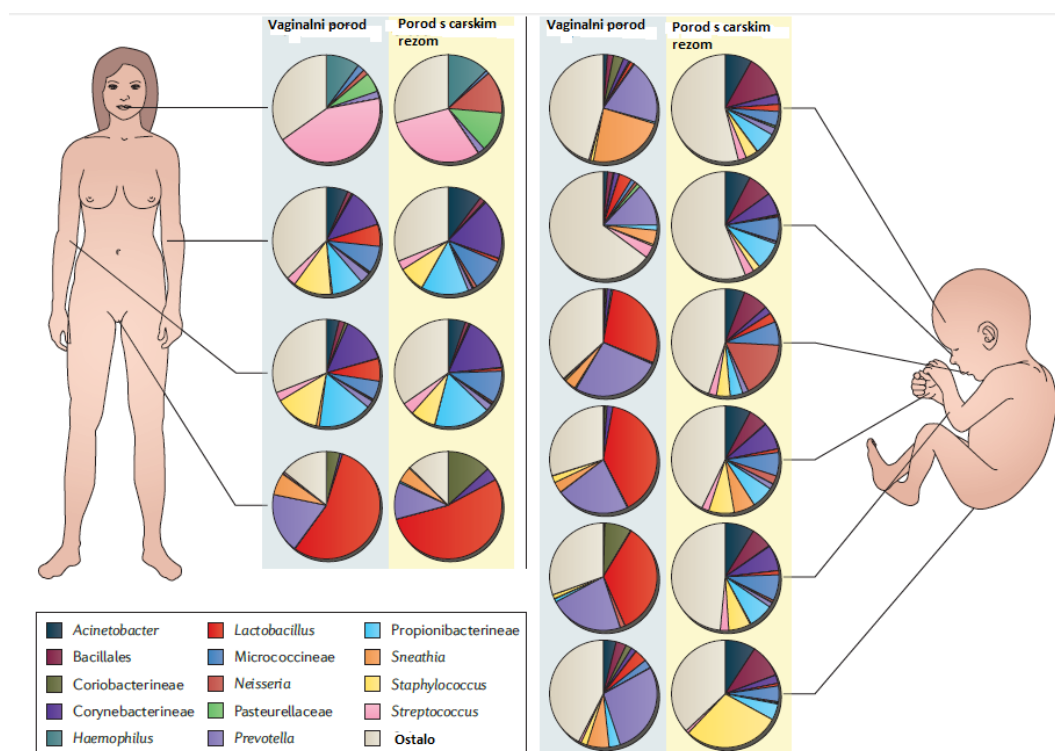
Glede na relativno skromne literaturne podatke o mikrobioti humanega kolostruma, iz katerih je razbrati, da kolostrum ni sterilna tekočina, smo postavili sledeče hipoteze:

- Kolostrum vsebuje mlečnokislinske bakterije in bifidobakterije.
- V kolostrumu bo prisotna vrsta *Lactobacillus gasseri*, saj je vrsta pogosta predstavnica mikrobiote mleka zdravih doječih mater.
- Kolostrum bo poleg MKB vseboval tudi bakterijske vrste, ki so tipične predstavnice mikrobiote kože.

2 PREGLED OBJAV

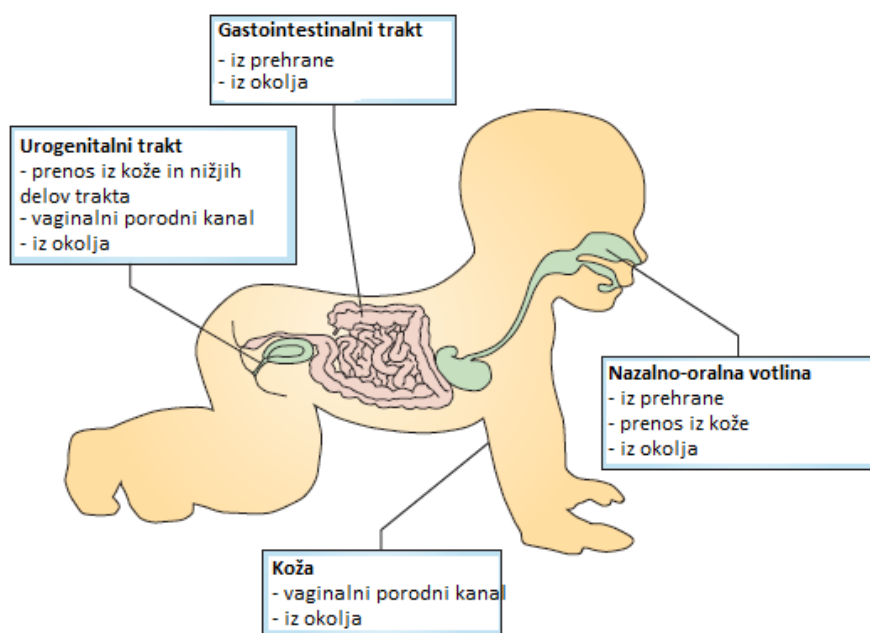
2.1 NARAVNA MIKROBIOTA ČLOVEKA

Pri zdravem gostitelju velja ravnotežje med posameznimi mikroorganizmi, ki sestavljajo njegovo mikrobioto. V primeru okužb in bolezni, je to ravnotežje spremenjeno in se lahko poruši, kar vodi v določene spremembe mikrobiote gostitelja. Telo postane poseljeno s številnimi mikroorganizmi že med porodom. Prva mikrobna populacija, ki poseli novorojenca, je tako v prvi vrsti materinega izvora (porodni kanal). Po porodu pa pride novorojenec v stik z drugimi ljudmi in z zunanjim okoljem. Opazili so tudi razlike v mikrobioti novorojencev, ki so bili rojeni vaginalno in tistimi s carskim rezom. Pri vaginalnem porodu so pri novorojencih prevladovali mikroorganizmi vaginalne sluznice matere, med katerimi so najbolj dominantne vrste rodov *Lactobacillus*, *Prevotella* ali *Sneathia*, medtem ko so za otroke rojene s carskim rezom značilni mikroorganizmi površine kože, predvsem iz rodov *Staphylococcus*, *Corynebacterium* in *Propionibacterium*, kar prikazuje tudi slika 1, na kateri je prikazana taksonomska porazdelitev mikroorganizmov pri materi in otroku (Reid in sod., 2011).



Slika 1: Taksonomska porazdelitev mikroorganizmov pri materi in otroku (Reid in sod., 2011).

V splošnem so Reid in sodelavci (2011) človeško telo razdelil na štiri področja, kjer najdemo značilne predstavnike posameznih rodov. To so koža, ustno-nazalno-žrelna votlina, gastrointestinalni trakt in vaginalni trakt kar je prikazano na sliki 2. Na mikrobioto omenjenih področij vplivajo predvsem okolje, prehrana novorojenca in matere, prenos bakterij preko kože in prenos bakterij iz vaginalnega porodnega kanala (Reid in sod., 2011).



Slika 2: Poznana mesta v človeškem telesu, kjer se mikrobiota naravno obnavlja (Reid in sod., 2011).

2.2 PREDNOSTI DOJENJA

Številne študije so se ukvarjale s proučevanjem dojenja in prednostmi le-tega. Dokazano je, da dojenje krepi imunski sistem, ter da so dojeni otroci bolj odporni proti boleznim in okužbam tako v zgodnjem življenju, kot tudi kasneje v odrasčajoči dobi, saj raziskovalci opazajo povezave med dojenjem in manjšim tveganjem za razvoj različnih kroničnih nenalezljivih bolezni (diabetes, multipla skleroza, bolezni srca, dihal in rakava obolenja). Doječe matere pa so manj podvržene razvoju bolezni kot so osteoporoza in rak na dojki, jajčnikih in maternici. Prav tako se z dojenjem lažje izgubi med nosečnostjo pridobljene kilograme. Dojenje velja tudi za ekonomično prednost, saj je ceneje kot kupovanje mlečnih formul (NRDC, 2010).

2.3 HUMANO MLEKO

Humano mleko predstavlja popolno hrano za novorojenca, saj vsebuje vse potrebne hranilne snovi, ki omogočajo normalo rast in razvoj in številne zaščitne snovi, ki varujejo novorojenca. Zdravniki in nutricionisti priporočajo izključno dojenje prvih šest mesecev življenja, nato z dopolnilno prehrano tudi dalj časa. Sestava humanega mleka se za razliko od mlečnih formul razlikuje po svoji dinamičnosti saj se ves čas spreminja, kar ima pozitivne posledice na novorojenčevo zdravje in preživetje. Vsebuje številne bioaktivne, rastne in protivnetne faktorje, ki so pomembni za nadaljnji razvoj (Ballard in Morrow, 2013).

Hranilne snovi humanega mleka izvirajo iz treh različnih virov. Nekatere preidejo v mlečno žlezo in mleko preko krvnega sistema, lahko so njihov vir zaloge matere ali pa se sintetizirajo v laktocitih mlečne žleze. Zaradi tega je potrebno nameniti pozornost tudi prehrani matere, saj vpliva na sestavo mleka, predvsem glede vitaminov in maščobnokislinske sestave mlečne maščobe (Ballard in Morrow, 2013).

2.3.1 Faze laktacije

Ločimo tri stadije laktacije, v katerih se sestava mleka spreminja glede na otrokove potrebe. V prvem obdobju izloča mlečna žleza kolostrum (1-5 dan po rojstvu), nato prehodno mleko (6-15 dan po rojstvu) in zrelo mleko (po 15 dneh po rojstvu). Prvi izloček mlečne žleze je kolostrum, ki ima najbolj specifične lastnosti. Izloča se v zelo majhnih količinah in je zelo bogat z zaščitnimi snovmi. Prav tako vsebuje relativno nizko koncentracijo laktoze, saj je prvotni namen kolostruma preživetje novorojenca, ne pa sama energijska vrednost. Za razliko od zrelega mleka vsebuje kolostrum višje koncentracije natrija, klora in magnezija, ter nižje koncentracije kalija in kalcija. Za prehodno mleko velja, da ohrani nekatere lastnosti kolostruma, vendar je njegova dodatna naloga zagotavljanje zadostnih količin hranil za ustrezen nadaljnji razvoj in rast novorojenca. Raziskave kažejo, da mlečna žleza začne izločati »polno« zrelo mleko med 4. in 6. tednom po rojstvu (Ballard in Morrow, 2013).

2.3.2 Sestava humanega mleka

Študije o sestavi humanega mleka najdemo vse od leta 1960 naprej, vendar raziskovalci še vedno identificirajo kakšno novo komponento mleka. Če bi želeli natančno oceniti sestavo mleka, bi morali pridobiti povprečen vzorec mleka, ki ga mlečna žleza izloči v 24-urah. Težava te metode je omejeno število sodelujočih prostovoljk in tudi visoki stroški, zato se raziskovalci poslužujejo drugih načinov pridobivanja vzorcev, kot na primer zbiranje mleka v določenem (krajšem) časovnem obdobju (npr. jutranje mleko). Precej študij pa ravno zato uporablja kar nestandardizirane metode zbiranja vzorcev, kar pomeni zbiranje vzorcev mleka v različnih časovnih obdobjih tekom dneva (Ballard in Morrow, 2013).

Sestava makronutrientov v humanem mleku se razlikuje med materami in tekom laktacije, vendar so raziskovalci vseeno določili okvirne mejne vrednosti. Zrelo mleko tako vsebuje med 0,9-1,2 g/100 ml proteinov, 3,2-3,6 g/100 ml maščob in 6,7-7,8 g/100 ml laktoze. Energijska vrednost znaša med 65-70 kcal/100 ml in je v tesni povezavi z vsebnostjo maščob. Ker humano mleko predstavlja standard v prehrani novorojenca je še toliko bolj pomembno, da poznamo njegovo sestavo čim natančneje. Med mikronutrienti tako igrajo pomembno vlogo vitamini A, B1, B2, B6, B12, D in vitamin K ter ostala mikrohranila. Količina le teh pa je odvisna od zalog matere ter njene prehrane. Ko je govor o humanem mleku ne moremo mimo bioaktivnih komponent, ki so v določeni meri prav tako povezane s prehrano matere. Vsebuje tudi številne rastne faktorje, ki imajo vpliv na razvoj GIT, srčno-žilnega sistema, ter živčnega in endokrinega sistema novorojenca. Kot zadnje imajo pomembno vlogo komponente imunskega sistema, ki imajo v prvi vrsti nalogo, da zagotovijo preživetje novorojenca (Ballard in Morrow, 2013).

2.4 HUMANI KOLOSTRUM

Medicinski slovar opredeljuje kolostrum kot prvo mleko, ki ga izloči mlečna žleza, navadno v 72 urah po rojstvu. Zaradi visoke vsebnosti Ig, laktoferina, laktoperoksidaze in ostalih bioaktivnih molekul, zagotavlja pasivno imunost novorojenca. Kolostrum ima tako vlogo »imunskega sistema« novorojenca. Vsebuje tudi številne rastne faktorje, ki vplivajo na rast in razvoj otroka. Kolostrum vsebuje približno 3,7 g/100 ml proteinov, 2,9 g/100 ml

maščob in 5,3 g/100 ml laktoze. Njegova energijska vrednost znaša 58 kcal/100 ml (Godihia in Patel, 2013).

2.4.1 Mikrobiota humanega kolostruma

Za razliko od humanega mleka, je o sestavi mikrobiote humanega kolostruma malo znanega. Jiménez in sod. (2008) so želeli analizirati bakterijsko pestrost humanega kolostruma zdravih mater in na ta način določiti prisotne prevladujoče bakterijske vrste. Prevladujoči bakterijski vrsti mikrobiote kolostruma sta bili *Staphylococcus epidermidis* in *E. faecalis*. Sledile so vrste *Streptococcus mitis*, *Propionibacterium acnes* in *Staphylococcus lugdunensis*. Rezultati analiz, ki so jih opravili Jiménez in sod. (2008) na 36 zdravih posameznikah so pokazale, da se v humanem kolostrumu najpogosteje pojavlja rod *Staphylococcus*, ki je bil prisoten v 33 vzorcih izmed 36, pri čemer je bila najpogosteje določena vrsta *Staphylococcus epidermidis*, prisotna v 30 primerih. V omenjeni raziskavi je nato sledil rod *Enterococcus*, znotraj katerega sta bili prevladujoči vrsti *E. faecalis* in *E. faecium*. Z identifikacijo MKB v humanem kolostrumu sta se ukvarjala tudi Ozgun in Vural (2011), ki sta se posvečala predvsem bakterijam iz rodu *Lactobacillus*. V raziskavi so uporabili 100 vzorcev humanega kolostruma, v katerih so identificirali bakterije *L. acidophilus*, *L. brevis*., *L. casei* in *L. plantarum* (Ozgun in Vural, 2011). Cabrera-Rubio (2012) in sodelavci so v humanem kolostrumu določili, da sta najpogostejša rodova *Weisella* in *Leuconostoc* (oba sta MKB iz družine *Lactobacillales*), sledili so že znani rodovi *Staphylococcus*, *Streptococcus* in *Lactococcus* (Cabrera-Rubio in sod., 2012).

V študiji »Moje-mleko«, so Obermajer in sod. (2015) s pomočjo PCR in DGGE ter kvantitativne PCR (qPCR) ugotavljali sestavo mikrobiote kolostruma 45 zdravih slovenskih mater. Ugotovili so, da obstajajo nekatere podobnosti med mikrobnimi združbami kolostruma, ki se kažejo kot korelacije v številčni zastopanosti nekaterih bakterijskih skupin. Predvidevajo, da je to lahko pokazatelj vloge mikrobiote pri vzdrževanju homeostaze v zdravih dojkah, saj so raziskovalci že poročali, da neravnovesja v mikrobnih združbah lahko vodijo k vnetjem mlečne žleze. Potrdili so, da so stafilokoki in streptokoki najznačilnejši predstavniki mikrobiote kolostruma. Največji delež združbe so zavzeli predstavniki *Bacillus*. Dobro zastopane v različnih vzorcih, vendar v relativno

majhnih koncentracijah, pa so bile tudi predstavnice enterobakterij (100 %), *Clostridia* (95,6 %), skupine *Bacteroides-Prevotella* (62,2 %) in bifidobakterij (53,3 %).

2.4.1.1 Mlečnokislinske bakterije (MKB)

MKB predstavljajo sestavni del naše prehrane in so industrijsko ene od najpomembnejših mikroorganizmov. Znana so številna poročila o njihovem pozitivnem vplivu na zdravje, saj predstavljajo sestavni del koristne črevesne mikrobiote in sodelujejo pri tvorbi pomembnih hranil in biološko aktivnih snovi kot so na primer vitamini. Imajo splošno priznan varen status (»generally recognized as safe« - GRAS). Prav tako so MKB naravno prisotne v človeškem gastrointestinalnem traktu. Zaradi velike pestrosti in njihovih ugodnih lastnosti so med njimi nekatere že dovolj proučene, da jih uvrščajo med probiotike ter so zato zanimive tako za farmacevtsko kot živilsko industrijo (Almeida in sod., 2014).

2.4.1.2 Bifidobakterije

Bifidobakterije je prvič omenil Tissier leta 1899 (Alp in Aslim, 2010). Uvrščamo jih med prevladujoče bakterije, ki jih najdemo v blatu dojenčkov. Nekateri sevi bifidobakterij lahko kolonizirajo GIT, kjer se pojavljajo v koncentracijah 10^9 - 10^{10} KE/g blata in imajo pomembno vlogo pri vzpostavitvi in vzdrževanju normalne črevesne mikrobiote. Kot posledica ugodnih lastnosti so bifidobakterije postale sestavni del številnih mlečnih formul, prehranskih dopolnil oziroma zdravil za otroke (Alp in Aslim, 2010). Eden izmed takšnih izdelkov je Linex Linbi, ki vsebuje bakterijo *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. Izdelek ugodno vpliva na vzpostavljanje in vzdrževanje ravnovesja črevesne mikrobiote, zlasti pri dojenčkih in otrocih (Lek, 2014). Podobne učinke navajajo proizvajalci tudi za nekatera druga prehranska dopolnila in redka zdravila brez recepta.

2.5 PRENOS BAKTERIJ IZ MATERE NA NOVOROJENCA

Humano mleko predstavlja hranila s številnimi zaščitnimi in funkcionalnimi lastnostmi, ki imajo vlogo pri oblikovanju, razvoju in dozorevanju gastrointestinalnega trakta in imunskega sistema novorojenca. Zaščito predstavljajo komponente, ki vsebujejo regulatorne citokine in rastne faktorje. Poleg tega vsebuje humano mleko tudi številne

druge faktorje, ki sodelujejo pri preprečevanju okužb in podpirajo rast zelenih bakterij (lizocim, laktoferin, oligosaharidi). Vsi ti dejavniki so zelo pomembni dokler je materino mleko edini vir hranil za novorojenca, ki še nima izoblikovanega in dozorelega lastnega imunskega sistema in GIT-a. Dokazano je, da je dojenje tudi pomemben dejavnik, ki vpliva na razvoj črevesne mikrobiote novorojenca. Materino mleko zato predstavlja najpomembnejši del pri oblikovanju metabolnih in imunoloških dejavnikov, ki so povezani z zdravjem novorojenca (Cabrera-Rubio in sod., 2012). V preteklih letih so potrdili povezavo med sevi bakterij, ki so jih identificirali v vzorcih materinega mleka in tistimi, ki so jih identificirali v blatu dojenčkov (sevi bifidobakterij, laktobacilov in stafilokokov), saj so rezultati pokazali, da si mati in otrok delita vsaj nekatere enake seve bakterij. S tem so potrdili hipotezo o prenosu bakterij iz matere na novorojenca, ter vpliv dojenja na kolonizacijo črevesa (Martín in sod., 2012).

2.5.1 Razvoj črevesne mikrobiote novorojenca

V GIT človeka je prisotna zelo pestra združba bakterij, ki znaša približno 10^{14} KE in kot taka predstavlja zelo pomembno vlogo v posameznikovem življenju ter je posledično tesno povezana z njegovim zdravstvenim stanjem. Največja mikrobna populacija se nahaja v črevesju, še posebno v širokem črevesu. V zadnjem desetletju se je s pomočjo molekularnih metod poskušalo raziskati, kako poteka razvoj črevesne mikrobiote novorojencev. Ta ima zelo pomembno vlogo tekom celega življenja, saj zagotavlja številne, življenjsko pomembne naloge, kot je tvorba zaščitne pregrade pred patogenimi bakterijami, sodeluje pri poteku metaboličnih reakcij, vpliva na razvoj posameznikove imunske odpornosti idr. Tekom razvoja črevesne mikrobiote prihaja do številnih sprememb v zastopanosti posameznih mikroorganizmov, ter v pestrosti in sestavi mikrobiote. Te spremembe so pogojene s kulturo, prehrano, okoljem, zdravstvenim stanjem posameznika, načinom poroda, prebolelimi boleznimi... Iz tega je razvidno, da je zelo težko določiti univerzalno GIT mikrobioto, saj je sestava le te odvisna od številnih vplivov. Kljub povedanemu pa se raziskovalci strinjajo, da je črevesna mikrobiota zdravih odraslih ljudi zelo prožna in stabilna, z rahlim spreminjanjem (Matamoros in sod., 2013).

Mikrobiota novorojencev se razlikuje od mikrobiote odraslih posameznikov. Podobnosti med njima se začnejo pojavljati po prvem letu starosti. Zaradi velike pestrosti je težko

opredeliti »normalno« črevesno mikrobioto. Osnovni vzorec razvoja mikrobiote prikazuje, da se črevo najprej poseli s fakultativnimi anaerobi kot je *E. coli*. Ko ti mikroorganizmi porabijo kisik (v roku nekaj dni), črevo postane anaerobno okolje in pride do razvoja striktno anaerobnih bakterij iz rodu *Bifidobacterium* in *Clostridium*. Prevladujočo mikrobno populacijo črevesne mikrobiote dojenih otrok predstavljajo vrste iz rodu *Bifidobacterium* (*B. breve*, *B. adolescentis*, *B. pseudocatenulatum*, *B. bifidum* in *B. longum*). Izmed teh sta navadno najbolj zastopani vrsti *B. breve* in *B. longum*. Tako se začetna nizka poselitev in majhna pestrost mikroorganizmov v GIT začne počasi razvijati in zoreti (Matamoros in sod., 2013).

Dejavniki, ki vplivajo na poselitev črevesja so številni, v prvi vrsti je zagotovo močno prisoten vpliv materine mikrobiote, saj pride do intimnega stika že med porodom, nato pa se nadaljuje med negovanjem, hranjenjem itd. Tekom raziskav so Matamoros in sod. (2013) dokazali pomen načina poroda (vaginalno, carski rez) na nadaljnje poseljevanje GIT. Razlike so opazili predvsem v številu bakterij iz rodu *Bifidobacterium*, kjer je bilo število le teh pri porodu s carskim rezom precej nižje, prav tako je bila mikrobna pestrost pri teh novorojencih nižja, kot tistih rojenih vaginalno (Matamoros in sod., 2013). Poleg načina poroda vpliva na mikrobno zastopanost tudi način hranjenja. Dojeni novorojenci imajo večje število bakterij iz rodu *Staphylococcus* in *Streptococcus*, ki vplivajo na poselitev GIT. Prisotno je tudi večje število bakterij iz rodu *Bifidobacterium* in *Lactobacillus*, ter nižja prisotnost bakterij iz rodu *Bacteroides*, *Clostridium* (kokoidna skupina) in *Enterobacteriaceae*, v primerjavi z novorojenci, hranjenimi z mlečnimi formulami (Matamoros in sod., 2013).

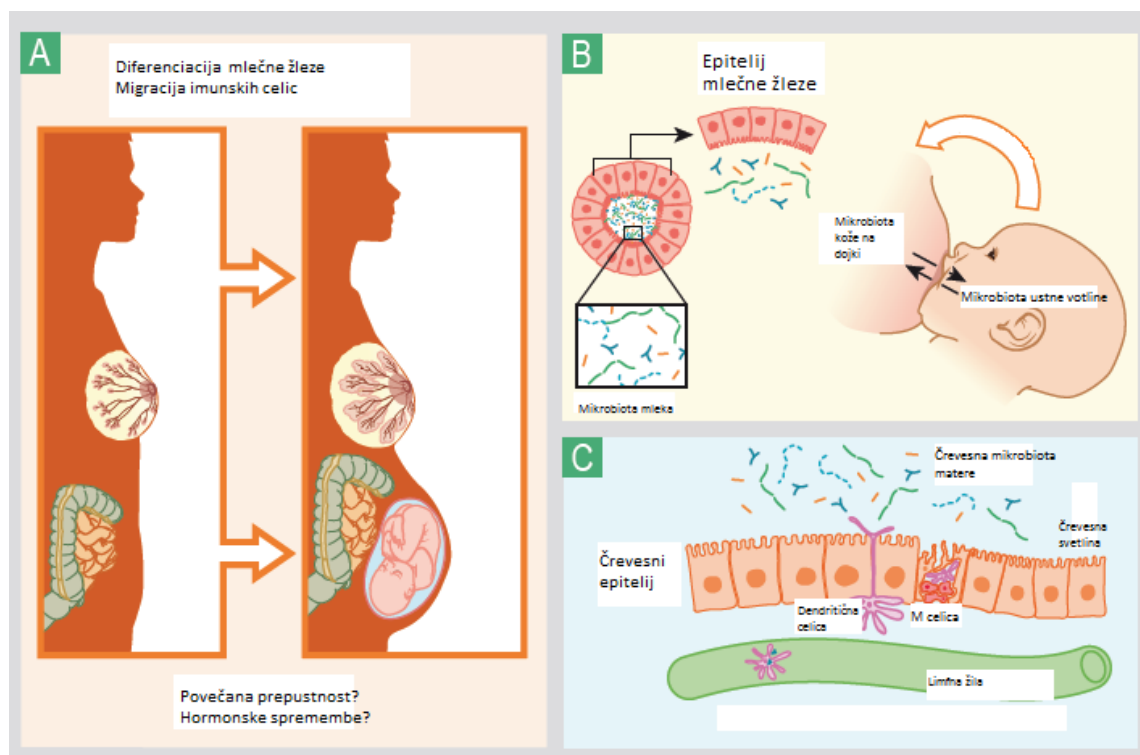
Tako torej v prvem letu življenja črevesna mikrobiota novorojenca nastaja in se razvija, dokler ne doseže homeostaze. Od tega trenutka naprej velja črevesna mikrobiota za dokaj stabilno strukturo, z rahlim spreminjanjem v sestavi (Matamoros in sod., 2013).

2.5.2 Prenos bakterij v mlečno žlezo

V številnih študijah so proučevali in potrdili prenos bakterijskih sevov iz matere na novorojenca. Še zmeraj se pojavlja vprašanje, s katerimi mehanizmi prenosa bakterije dosežejo mlečno žlezo. Najstarejša teorija prenosa je »kontaminacija«, saj naj bi bila

prisotnost bakterij v humanem mleku posledica kontaminacije z bakterijami, ki jih ima mati na koži oziroma je nosilec bakterij otrok, saj se novorojenec med porodom obda z materinimi črevesnimi in vaginalnimi bakterijami. Tekom sesanja mleka jih prenese na dojko, od koder lahko prodrejo tudi v mlečno žlezo. Poleg materine črevesne in vaginalne mikrobiote, naj bi bakterije v materinem mleku izvirale tudi iz novorjenčevih ust in materine kože. V mleku so namreč z različnimi tehnikami potrdili prisotnost tipičnih predstavnikov mikrobiote slin (npr. streptokoki) in kože (npr. stafilokoki) (Jeurink in sod., 2013).

Novejše hipoteze o prenosu bakterij v mlečno žlezo pa namigujejo na mehanizem aktivnega prenosa, pri katerem naj bi nekatere bakterije iz črevesa matere po endogeni poti prispele v mlečno žlezo (Martín in sod., 2003). Ta teorija še ni povsem razjasnjena, saj bi v tem primeru bakterije morale prečkati intestinalni epitelj, se izogniti imunskemu sistemu in nato še doseči mlečno žlezo (Jeurink in sod., 2013). Martín in sod. (2004) ter Perez in sod. (2007) predvidevajo, da pri tem prenosu najverjetneje sodelujejo dendritične celice in makrofagi. Dendritične celice namreč lahko »razprejo« tesne stike med črevesnimi celicami in »vzorčijo« bakterijske celice, kar jim omogoči tudi prenos izbranih bakterij iz črevesne svetline do limfnih vozlov in mlečne žleze. Dendritične celice pri tem vzorčenju bakterij ne porušijo integritete epiteljske pregrade (Rescigno in sod., 2001). Rezultati raziskovalnih skupin, ki proučujejo možne mehanizme prenosa bakterij iz črevesja do mlečne žleze, vse bolj podpirajo hipotezo enteralnega prenosa zato Rodríguez (2014) predvideva, da bo morda v bližnji prihodnosti mogoče vplivati na zdravje novorojenca tudi preko modulacije črevesne mikrobiote matere. Možni mehanizmi vzpostavitve mikrobiote humanega mleka so prikazani na sliki 3.



Slika 3: Možni načini oblikovanja mikrobiote humanega mleka (Jeurink in sod., 2013)

Fiziološke spremembe, do katerih pride med nosečnostjo in po porodu, povzročijo migracijo bakterij v mlečno žlezo. A: hormonske spremembe, značilne za to obdobje, lahko vplivajo na prepustnost črevesne stene, kar lahko omogoči prehod določenih bakterij. B: na oblikovanje mikrobiote humanega mleka lahko vpliva kontakt mikrobiote matrine kože in otrokove ustne votline med dojenjem. C: možen prehod črevesnih bakterij matere s pomočjo različnih imunskih celic do mlečnih žlez.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Vzorci

V našo raziskavo smo vključili 584 bakterijskih izolatov iz vzorcev humanega kolostruma. Izolati so bili pridobljeni iz vzorcev 102 prostovoljk v raziskavi Vloga humanega mleka v razvoju črevesne mikrobiote dojenčka (J4-3606). V raziskavi so sodelovale prostovoljke iz treh slovenskih regij (Ljubljana, Maribor, Nova Gorica/Izola).

Raziskovalci so vzorce kolostruma nacepili na selektivno gojišče MRS in po tridnevni anaerobni inkubaciji pri 37 °C izbrali posamezne kolonije, ki so jih nacepili v tekoče gojišče MRS. Izraslim kulturam so dodali glicerol in jih shranili pri -80 °C. Za potrebe nacepljanja na plošče smo zamrznjene izolate začasno shranili v prenosnem zamrzovalniku pri -20 °C. V prilogi B so prikazani podatki o izbranih sevih: vrsto, ki ji pripada izoliran sev, našo dodeljeno oznako seva in prvotno oznako seva. Prvotna oznaka (npr. LJ 017-MRS3) nam pove iz katere regije je bila prostovoljka (npr. LJ - Ljubljana), številko, ki ji je bila dodeljena v projektu (npr. 017) in iz katerega gojišča je bila bakterija izolirana (npr. MRS3). Izolati, ki smo jih poslali na sekvenciranje (93 izolatov), so bili pridobljeni iz vzorcev 51 prostovoljk.

3.1.2 Gojišča

3.1.2.1 Gojišče MRS

Gojišče MRS smo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija). V stekleničke smo natehtali ustrezno količino gojišča, dodali destilirano vodo, premešali in avtoklavirali (15 min, 118 °C). Po avtoklaviranju smo gojišče v brezprašni komori oziroma ob gorilniku razlili na petrijeve plošče in počakali, da se strdi in posuši.

3.1.2.2 Tekoče gojišče MRS

Po navodilih proizvajalca (Merck, Nemčija) smo pripravili tekoče gojišče MRS, ki smo ga uporabili za gojenje prečiščenih izolatov z unikatno RAPD progo. Ustrezno količino

gojišča smo natehtali v steklenico in dolili destilirano vodo. Tako pripravljeno mešanico smo s pomočjo magnetnega mešala raztopili, razporedili v epruvete in avtoklavirali (15 min, 118 °C).

3.1.2.3 Tekoče gojišče MRS s 30 % glicerolom

Tekoče gojišče MRS smo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck, Nemčija) in mu pred avtoklaviranjem dodali 30 % glicerola, ki je krioprotektant, kar pomeni, da je tako pripravljeno gojišče primerno za zamrzovanje in dolgoročno shranjevanje bakterijskih kultur.

3.1.3 Reagenti za izolacijo DNA in izvedbo PCR

3.1.3.1 Reagenti za izolacijo DNA

- komplet reagentov Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, ZDA),
- 50 mM EDTA (Sigma, ZDA),
- lizocim (Sigma, ZDA),
- raztopina mutanolizina (Sigma, ZDA) (2500 U/ml),
- izopropanol (Carlo Erba Reagenti, Val de Reuil, Francija),
- 70 % etanol (Merck, Darmstadt, Nemčija).

3.1.3.2 Reagenti za izvedbo PCR

- sterilna demineralizirana in mikrofiltrirana voda,
- začetni oligonukleotid M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3') (Integrated DNA technologies, ZDA),
- začetna oligonukleotida 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') in 1495R (5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3') (Sigma, St. Louis, ZDA),
- začetni oligonukleotid KGT 70-GC (5'-AGCGGGCGTA-3') (MWG Biotech AG, Ebersberg, Nemčija),
- 10 mM dNTP (Thermo scientific, Waltham, ZDA),

- komercialni komplet reagentov Go Taq flexi DNA polymerase (Promega, Madison, ZDA), ki vsebuje pufer (Go Taq flexi), magnezijev klorid ($MgCl_2$) in polimerazo (Go Taq DNA polymerase).

3.1.4 Reagenti za izvedbo elektroforeze in čiščenje pomnožkov PCR

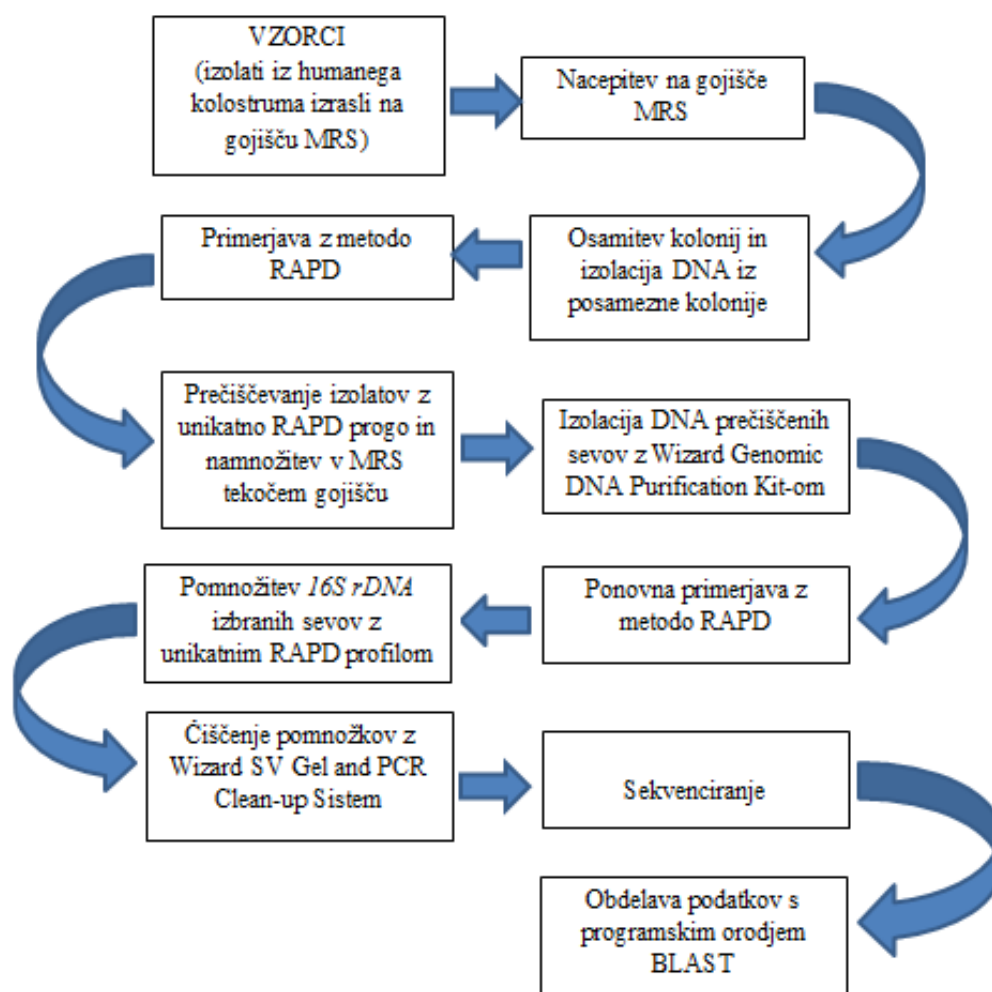
- pufer TAE (tris acetatni pufer, pH 8,0),
- agaroz (Sigma, ZDA),
- barvilo Sybr Safe (Invitrogen, Oregon, ZDA),
- molekularni označevalec velikosti 1kb DNA Ladder (Invitrogen, ZDA),
- komercialni komplet reagentov Wizard[®] SV gel in PCR Clean-Up System (Promega, ZDA) za čiščenje pomnožkov PCR.

3.1.5 Laboratorijska oprema

- naprava za PCR Mastercycler Gradient, Eppendorf,
- naprava za agarozno gelsko elektroforezo Sub-Cell (Bio-Rad),
- UV-transluminator ChemiGenius² (Syngene),
- centrifuga Mikro 22 R (Hettich),
- vodna kopel (Kambič Laboratorijska oprema),
- brezprašna mikrobiološka komora M12 (Iskra PIO),
- inkubator (Binder),
- tehtnice: AT 400 (Mettler Toledo), EB 300M (Tehtnica Železniki),
- avtoklav: A-21 CA (Kambič).

3.2 METODE

V poglavju so predstavljeni postopki in analize, ki smo jih uporabili za izvedbo raziskovalnega dela v laboratoriju. Na sliki 4 je shematsko prikazan potek raziskave.



Slika 4: Shematski prikaz poteka laboratorijskega dela.

3.2.1 Priprava bakterijskih izolatov iz humanega kolostruma

Bakterijski izolati iz humanega kolostruma so bili shranjeni pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Izolate smo iz zbirke prenesli v prenosnem zamrzovalniku pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ter jih s cepilno zanko razmazali na plošče z gojiščem MRS, ki smo jih predhodno ustrezno označili. Po končanem nacepljanju smo plošče tri dni inkubirali pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ v anaerobnih pogojih (GENbox sistem, Biomerieux, Francija).

3.2.2 Izolacija DNA iz kolonij

Po končani inkubaciji smo pregledali plošče, ter na vsaki plošči izbrali in označili najbolj osamljeno kolonijo. Izbrano kolonijo smo s sterilnim zobotrebcem prenesli v mikroeprovete, v katere smo dodali $15\text{ }\mu\text{l}$ pufru GoTaq flexi (Promega, ZDA). Tako pripravljene vzorce smo za kratek čas centrifugirali, nato pa v napravi za PCR segrevali 15 min pri $99\text{ }^{\circ}\text{C}$ in nato ohladili na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.3 Analiza RAPD

Metodo RAPD (naključno pomnožena polimorfna DNA, angl. randomly amplified polymorphic DNA) uvrščamo med najpogostejše uporabljene metode razlikovanja bakterijskih sevov v živilski industriji, saj velja za precej zanesljivo. Temelji na pomnoževanju naključnih predelov DNA z uporabo poljubnih (nespecifičnih) začetnih oligonukleotidov v verižni reakciji s polimerazo (PCR) (Giraffa in Rossetti, 2004). Za analizo smo izbrali univerzalni začetni oligonukleotidi M13. Reakcijsko mešanico za RAPD z začetnim oligonukleotidom M13 smo pripravili po protokolu, ki so ga opisali Torriani in sod. (1999). Izolate, ki jih kljub ponovitvi analize nismo uspeli pomnožiti z začetnim oligonukleotidom M13, smo pomnožili še z začetnim oligonukleotidom KGT-70GC.

Zaradi majhnih volumnov in večje natančnosti smo najprej pripravili reakcijsko mešanico za vse vzorce, ki smo jih nameravali analizirati in jo razporedili v mikroeprovete, v katere smo nato dodali DNA. Mikroeprovete smo prenesli v napravo za PCR in izbrali ustrezen program (preglednici 1 in 2).

Reakcijska mešanica za en vzorec (20 µl) je vsebovala:

- 12,4 µl H₂O,
- 2 µl pufer GoTaq flexi (5X),
- 3,2 µl MgCl₂ (25 mM),
- 0,1 µl začetnega oligonukleotida (100 µM)
- 0,2 µl dNTP (10 mM),
- 0,1 µl GoTaq DNA polimeraza,
- 2 µl DNK (v 5X pufru GoTaq flexi).

Preglednica 1: Program za analizo RAPD z začetnim oligonukleotidom M13 (Torriani in sod., 1999)

Reakcija	Temperatura (°C)	Trajanje (min/sek)	Število ciklov
Začetek	95	3 min	1
Denaturacija	95	1 min	40
Prileganje	45	20 sek	
Podaljševanje	72	2 min	
Zaključek	72	5 min	1

Preglednica 2: Program za analizo RAPD z začetnim oligonukleotidom KGT-70GC

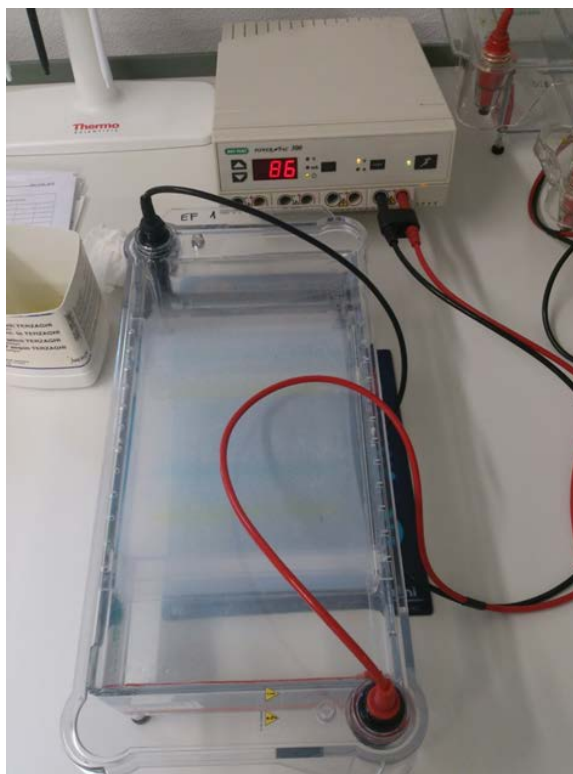
Reakcija	Temperatura (°C)	Trajanje (min/sek)	Število ciklov
Začetek	95	3 min	1
Denaturacija	95	1 min	35
Prileganje	37	2 min	
Podaljševanje	72	2 min	
Zaključek	72	5 min	1



Slika 5: Priprava vzorcev za PCR

3.2.4 Agarozna gelska elektroforeza

Pomnožke, ki smo jih pridobili z RAPD, smo ločili z agarozno gelsko elektroforezo (AGE), ki ločuje fragmente DNA po njihovi velikosti. Za potrebe analize smo uporabil 1,5 % gel, ki smo ga pripravili tako, da smo v stekleničko natehtali agarozo ter dodali pufer TAE. Pripravljeno mešanico smo segrevali do popolne bistrosti, nato smo jo deloma ohladili in nalili v nosilec, v katerega smo predhodno vstavili glavniček. Strjen gel smo prenesli v elektroforezno banjico, napolnjeno s pufrom TAE, odstranili glavniček, v luknjice pa nanесли pomnožke. V prvi, srednji in zadnji žepek smo nanесли molekularni označevalec velikosti 1kb DNA Ladder (Invitrogen, ZDA). Elektroforeza je potekala od 100 do 120 minut pri 90 V (slika 6). Po zaključeni elektroforezi smo gel barvali od 30 do 45 min v raztopini barvila Syber Safe. Nato smo pomnožke vizualizirali s pomočjo UV-transluminatorja ChemieGenius in s programom GeneSnap posneli sliko. Vzorce RAPD smo vizualno primerjali in za nadaljnje analize izbrali izolate z različnimi unikatnimi vzorci pomnožkov RAPD.



Slika 6: Naprava za agarozno gelsko elektroforezo.

3.2.5 Čiščenje izbranih izolatov

Izolate z unikatno progo RAPD (173) smo nato ponovno prečistili tako, da smo kolonijo z ezo razmazali na plošče z gojiščem MRS (inkubacija 3 dni, 37 °C, anaerobno). Čiščenje smo še enkrat ponovili, nato pa izbrano, dobro osamljeno kolonijo prenesli v tekoče gojišče MRS in inkubirali 3 dni pri 37 °C v anaerobnih pogojih. Tako smo pridobili čiste kulture izbranih sevov.

Kulture sevov smo nato pripravili še za shranjevanje v zamrzovalniku po naslednjem postopku:

- kulturo smo prelili v centrifugirke,
- centrifugirali smo 5 min pri 6000 obr/min,
- odlili smo supernatant,
- usedlini smo dodali tekoče gojišče MRS z glicerolom, premešali in prenesli v mikroepruveto,
- seve smo označili in shranili v zamrzovalniku.

3.2.6 Izolacija DNA iz kulture izbranih sevov

Iz kultur (173) izbranih sevov smo izolirali DNA s pomočjo kompleta reagentov Wizard Genomic DNA Purification Kit.

3.2.6.1 Potek izolacije DNA

V mikrocentrifugirko smo prenesli 500 µl kulture, jo centrifugirali (12000 obr/min, 2 min), odlili supernatant in usedlini dodali 300 µl 50 mM EDTA z dodatkom 3 mg lizocima in 3 µl raztopine mutanolizina. Mešanico smo inkubirali 60 min pri 37 °C, nato centrifugirali (12000 obr/min, 2 min), odlili supernatant in dodali 300 µl raztopine za lizo (Nuclei Lysis Solution). Po 5-minutni inkubaciji pri 80 °C smo mešanico ohladili na sobno temperaturo in dodali 1,5 µl RNaze, ter ponovno inkubirali 30 min pri 37 °C. Po inkubaciji smo dodali 100 µl raztopine za obarjanje beljakovin (Protein Precipitation Solution) ter mešali na vrtičniku 20 sekund, nato pa vzorce 20 minut inkubirali na ledu. Po končani inkubaciji je sledilo centrifugiranje (18000 obr/min, 3 min). Nato smo vzeli novo mikrocentrifugirko v katero smo dodali 300 µl izopropanola in supernatant, ki smo ga dobili pri centrifugiranju. Temu je sledilo ponovno centrifugiranje (12000 obr/min, 2 min). Supernatant smo po končanem centrifugiranju zavrgli, usedlini, ki je ostala v mikrocentrifugirki pa smo dodali 300 µl 70 % etanola, čemur je ponovno sledilo centrifugiranje (12000 obr/min, 2 min). Nato smo etanol odlili in pustili, da se mikrocentrifugirke posušijo. Za rehidracijo peleta smo dodali 100 µl raztopine za rehidracijo (Rehydration Solution). Tako pripravljeno mešanico lahko shranjujemo v hladilniku ali zamrzovalniku.

3.2.7 Analiza RAPD izbranih sevov

Seve smo ponovno primerjali z že opisanim postopkom za RAPD, le da smo uporabili DNA, ki smo jo izolirali iz čistih kultur izbranih sevov, s kitom Wizard Genomic DNA Purification Kit. Po ponovni primerjavi z metodo RAPD smo izbrali seve z unikatnimi progami (93 sevov), pomnožili njihovo 16S rDNA in jo poslali na sekvenciranje.

3.2.8 Pomnoževanje 16S rDNA izbranih sevov z metodo PCR

Za pomnoževanje 16S rDNA z metodo PCR smo izbrali univerzalna začetna oligonukleotida 27f in 1495R (Yu in sod., 2011). Uporabili smo DNA izbranih sevov, izolirano s pomočjo kompleta reagentov Wizard Genomic DNA Purification Kit. Pogoji PCR reakcije so povzeti po Yu in sod. (2011) in so opisani v preglednici 3.

Reakcijska mešanica za en vzorec (50 µl) je vsebovala:

- 33,75 µl H₂O,
- 10 µl GoTaq pufra z MgCl₂ (5X),
- 3 µl MgCl₂ (25 mM),
- 0,25 µl začetnega oligonukleotida 27f (100 µM),
- 0,25 µl začetnega oligonukleotida 1495R (100 µM),
- 0,5 µl dNTP (10 mM),
- 0,25 µl GoTaq DNA-polimeraza,
- 2 µl DNA.

Preglednica 3: Program za pomnoževanje 16S rDNA s PCR (Yu in sod., 2011)

Reakcija	Temperatura (°C)	Trajanje (min)	Število ciklov
Začetek	95	3	1
Denaturacija	95	1	30
Prileganje	59	1	
Podaljševanje	72	2	
Zaključek	72	5	1

3.2.9 Čiščenje pomnožkov PCR

Pomnožke DNA, ki smo jih pridobili s PCR, smo prečistili s pomočjo kompleta reagentov »Wizard® SV gel and PCR Clean-Up System« (Promega, ZDA) po navodilih proizvajalca, tako, da smo pomnožke prenesli v kolono, vstavljeno v zbirno mikorepruveto in inkubirali pri sobni temperaturi 1 minuto. Nato je sledilo centrifugiranje (16 000 obr/min, 1 min). Tekočino v zbirni mikorepruveti smo zavrgli, kolono pa sprali s 700 µl raztopine za spiranje membrane (Membrane Wash Solution) in ponovno centrifugirali (16 000 obr/min,

1 min). Spiranje smo ponovili s 500 µl raztopine, nato je sledilo centrifugiranje (16 000 obr/min, 5 min). Kolono smo prenesli v novo mikroepruveto in vanjo dodali vodo brez nukleaz (Nuclease-Free Water), sledila je inkubacija pri sobni temperaturi 1 minuto, nato pa ponovno centrifugiranje (16 000 obr/min, 1 min). Na koncu smo kolono zavrgli, mikroepruvete s prečiščeno DNA pa shranili v hladilniku pri 4 °C ali v zamrzovalniku pri -20 °C.

3.2.10 Sekvenciranje in primerjava nukleotidnih zaporedij z bazo podatkov NCBI

Prečiščene pomnožke *16 S rDNA* (93 vzorcev) smo poslali v laboratorij Microsynth (Dunaj, Avstrija), kjer so naredili analizo nukleotidnega zaporedja. Dobljena zaporedja nukleotidov smo primerjali z bazo podatkov NCBI (National Center for Biotechnology Informations, Rockville Pike, Bethesda, ZDA) ter s pomočjo programskega orodja BLAST (NCBI, 2014) določili, kateri vrsti pripada določen sev.

4 REZULTATI

V nalogi smo proučevali vrstno sestavo mikrobiote humanega kolostruma, izrasle na gojišču MRS, posebno pozornost pa posvetili mlečnokislinskim bakterijam (MKB) in bifidobakterijam. Vzorci humanega kolostruma so bili odvzeti v okviru projekta Vloga humanega mleka v razvoju črevesne mikrobiote dojenčka (J4-3606). Vzorce kolostruma so že med študijo raziskovalci nacepili na selektivno gojišče MRS, naključno izbrane, različne izrasle kolonije pa namnožili in shranili za nadaljnje raziskave.

4.1 GENOTIPIZACIJA IZOLATOV IZ HUMANEGA KOLOSTRUMA Z RAPD

Najprej nas je zanimala genetska pestrost izolatov, zato smo vseh 584 izolatov humanega kolostruma zdravih mater primerjali z metodo RAPD. Da bi prihranili na času in stroških, smo DNA prvič izolirali direktno iz izraslih kolonij na MRS hranljivi podlogi, s pomočjo toplotne obdelave. Na sliki 7 je prikazan primer rezultatov analize RAPD z začetnim oligonukleotidom M13 za 28 izolatov. Rezultati analiz ostalih izolatov so prikazani v prilogi A (A1-A8).

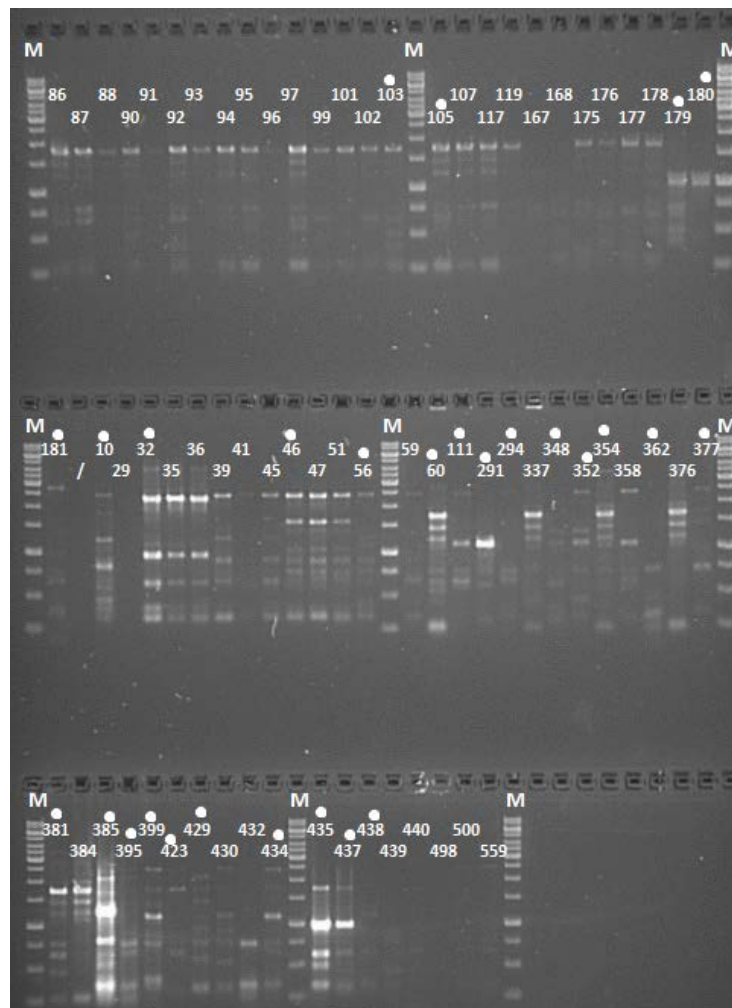


Slika 7: Pomnožki analize RAPD z začetnim oligonukleotidom M13, ki smo jo opravili na DNA izolirani iz kolonij izolatov 1-28.

Proge izolatov, ki smo jih izbrali za nadaljnje analize, so označene s piko nad številko izolata. M: molekularni označevalec velikosti 1kb DNK Ladder (Invitrogen, ZDA).

Iz slik je razvidna precejšnja genetska pestrost izolatov. Po pregledu smo skušali izbrati tiste izolate, ki so se po vizualni oceni razlikovali po vzorcu pomnožkov. Na slikah so označeni s številkami nad progami. Pri 71 izolatih z začetnim oligonukleotidom M13, kljub ponovitvi analize nismo dobili rezultata, zato smo DNA teh izolatov pomnožili še z

začetnim oligonukleotidom KGT-70GC. Rezultat je prikazan na sliki 8, kjer so s piko nad številko označene proge izolatov, ki smo jih izbrali za nadaljnje analize.



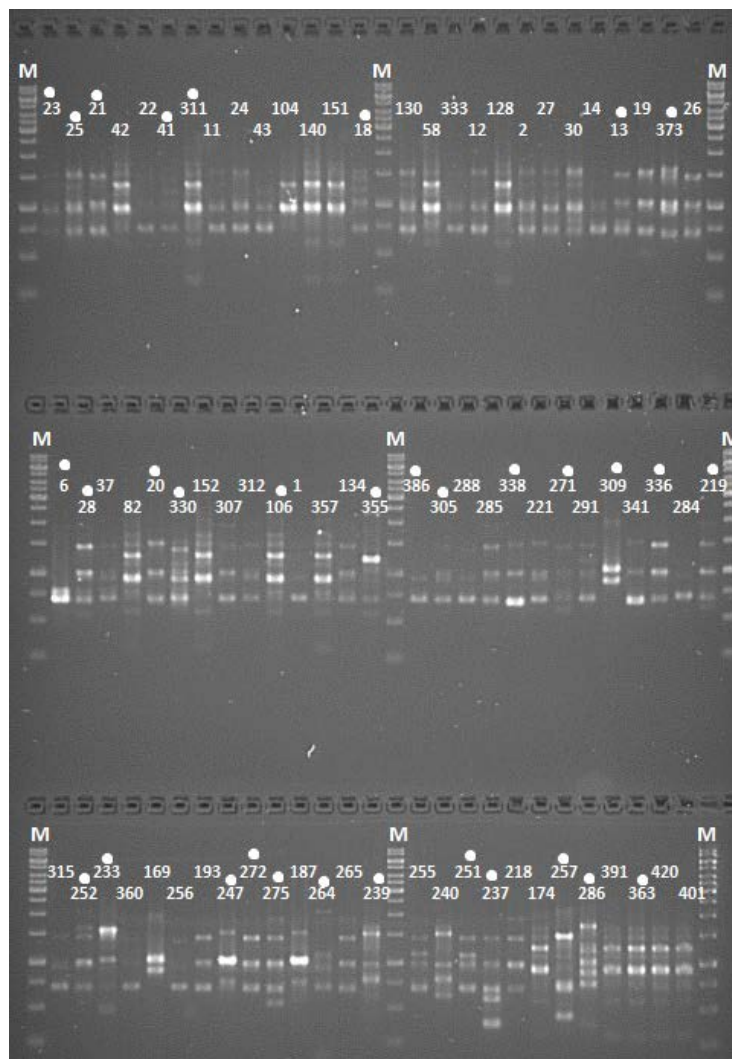
Slika 8: Pomnožki analize RAPD z začetnim oligonukleotidom KGT-70GC

Analizo smo opravili na DNA izolirani iz kolonij, ki jo kljub ponovitvi analize, nismo uspeli pomnožiti z začetnim oligonukleotidom M13. Proge izolatov, ki smo jih izbrali za nadaljnje analize, so označene s piko nad številko. M: molekularni označevalec velikosti 1kb DNK Ladder (Invitrogen, ZDA).

4.2 IZBOR SEVOV ZA NADALJNJE ANALIZE

Z vizualno primerjavo profilov RAPD smo izbrali 173 izolatov, ki so po naši presoji imeli različne vzorce pomnožkov. Te izolate smo prečistili z razmazovanjem na ploščah, jih kultivirali v tekočem gojišču in izolirali njihovo DNA s komercialnim kompletom reagentov. Nato smo jih ponovno primerjali z analizo RAPD z začetnim oligonukleotidom M13. Pri tej analizi smo dobili pomnožke tudi pri sevih, ki jih predhodno s tem začetnim

oligonukleotidom nismo uspeli pomnožiti. Pri ponovni vizualni primerjavi smo opazili, da so bili vzorci prog nekaterih izolatov enaki. Zato smo število izbranih sevov zmanjšali na 93 sevov z unikatnim vzorcem pomnožkov, ki smo jih pripravili za sekvenciranje. Na sliki 9 so izolati, ki smo jih izbrali za sekvenciranje, označeni s piko nad številko. Rezultati analiz ostalih izolatov so prikazani na slikah v prilogi A (A9 in A10).

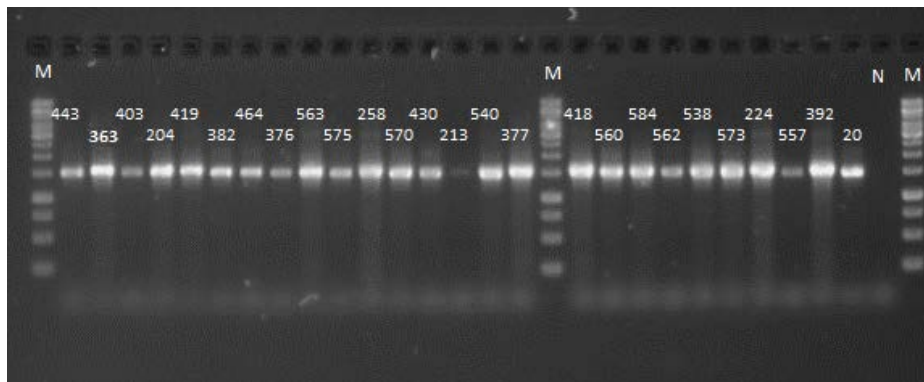


Slika 9: Pomnožki analize RAPD z začetnim oligonukleotidom M13, ki smo jo opravili na DNA izolirani iz kulture izbranih sevov.

Oznake sevov, ki smo jih izbrali za sekvenciranje, so označene s piko nad številko. M: molekularni označevalec velikosti 1kb DNK Ladder (Invitrogen, ZDA).

4.3 SEKVENCIRANJE 16S rDNA IZBRANIH SEVOV

16S rDNA izbranih sevov smo pomnožili s PCR z univerzalnimi začetnimi oligonukleotidi, pomnožke smo preverili z elektroforezo na agaroznem gelu (Slika 10) in poslali v podjetje Microsynth (Avstrija) na sekvenciranje.



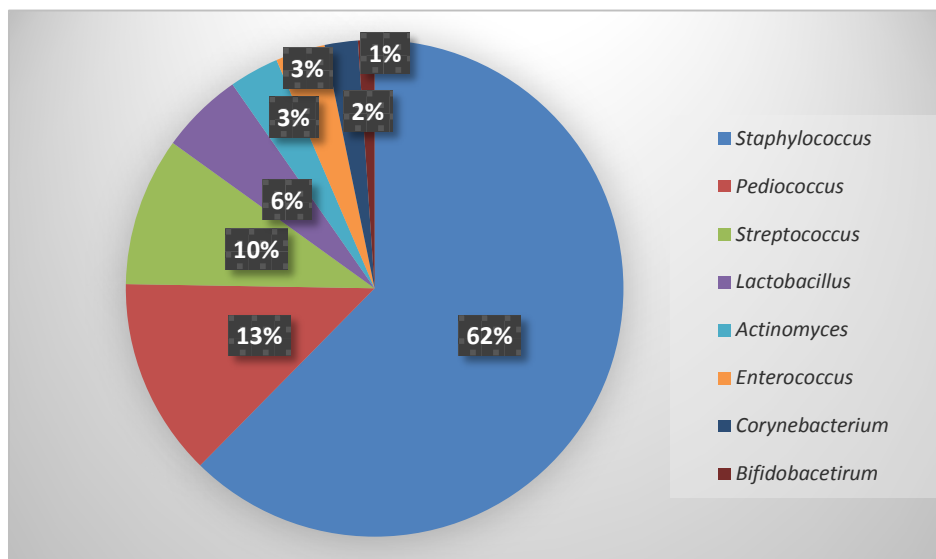
Slika 10: Pomnožki PCR z univerzalnima začetnima oligonukleotidoma 27 f in 1495R, ki pomnožujeta 16S rDNA.

M: molekularni označevalec velikosti 1kb DNK Ladder (Invitrogen, ZDA), N: negativna kontrola.

4.3.1 Rezultati identifikacije izbranih sevov

Rezultati, ki smo jih dobili iz laboratorija Microsynth, so po analizi s programskim orodjem BLAST pokazali, da je večina naših izolatov pripadala rodovom *Staphylococcus* (62 %), *Pediococcus* (13 %) in *Streptococcus* (10 %), v manjši meri pa so bili prisotni tudi sevi iz rodov *Lactobacillus* (6 %), *Enterococcus* (3 %), *Actinomyces* (3 %), *Corynebacterium* (2 %) in *Bifidobacterium* (1 %). Rezultati so prikazani na sliki 11.

Vrstna sestava proučevane mikrobne populacije humanega kolostruma je prikazana v Preglednici 4, osnovni rezultati pa v preglednici 1 v prilogi B. Rod *Staphylococcus* so zastopale vrste *Staphylococcus epidermidis* (52), *Staphylococcus lugdunensis* (5) *Staphylococcus pasteurii* (1). Drugi najštevilčnejši rod je bil rod *Pediococcus*, znotraj katerega je bila vrsta *Pediococcus acidilactici/pentosaceus/lolii* (12). Sledil je rod *Streptococcus*, ki je zajemal vrste *Streptococcus parasanguinis* (7), *Streptococcus salivarius* (1) in *Streptococcus sp.* (1). Izolati laktobacilov so pripadali vrstam *L. gasseri* (2), *L. casei/paracasei* (2) in *L. fermentum* (1), izolirana bifidobakterija pa vrsti *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*.



Slika 11: Sestava proučevane mikrobne populacije humanega kolostruma

Preglednica 4: Vrstna sestava proučevane mikrobne populacije humanega kolostruma

Rod	Število izolatov	Vrsta	Število izolatov
<i>Staphylococcus</i>	58	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	52
		<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	5
		<i>Staphylococcus pasteurii</i>	1
<i>Pediococcus</i>	12	<i>Pediococcus acidilactici/pentosaceus/lolii</i>	12
<i>Streptococcus</i>	9	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	7
		<i>Streptococcus salivarius</i>	1
		<i>Streptococcus sp.</i>	1
<i>Lactobacillus</i>	5	<i>Lactobacillus gasseri</i>	2
		<i>Lactobacillus casei/paracasei</i>	2
		<i>Lactobacillus fermentum</i>	1
<i>Enterococcus</i>	3	<i>Enterococcus faecalis</i>	3
<i>Actinomyces</i>	3	<i>Actinomyces neuii</i>	3
<i>Corynebacterium</i>	2	<i>Corynebacterium kroppenstedtii</i>	2
<i>Bifidobacterium</i>	1	<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i>	1

5 RAZPRAVA

Kolostrum je prvi izloček mlečne žleze in najpogostejše prva hrana novorojenca. Novejše raziskave dokazujejo, da kolostrum ni sterilna tekočina, vendar je sestava mikrobiote še precejšnja neznanka. Namen naše naloge je bil, da preučimo in določimo vrstno sestavo MKB in bifidobakterij, ki so prisotne v vzorcih humanega kolostruma.

Proučevali smo genetsko pestrost in vrstno sestavo mikrobiote iz vzorcev kolostruma 102 mater, ki so bile vključene v študijo Vloga humanega mleka v razvoju črevesne mikrobiote dojenčka (J4-3606). Osredotočili smo se predvsem na MKB in bifidobakterije, zato smo analizirali izolate, pridobljene iz mikrobiote, izrasle po cepljenju vzorcev kolostruma na gojišče MRS. V analizo smo vključili 584 izolatov. Ker nas je zanimala pestrost mikrobiote smo najprej vse vzorce izolatov humanega kolostruma primerjali z metodo RAPD-PCR. Po prvi primerjavi vzorcev med seboj, smo videli, da je pestrost zelo velika (veliko različnih vzorcev pomožkov). Na podlagi vizualnega odločanja smo nato izbrali tiste izolate, ki so se med seboj razlikovali po RAPD vzorcu, ter tako prišli do končne številke 93 izolatov, ki smo jih poslali na sekvenciranje.

5.1 VRSTNA SESTAVA MIKROBIOTE VZORCEV HUMANEGA KOLOSTRUMA

Analiza je pokazala, da je 62 % vzorcev, ki smo jih poslali na sekvenciranje, pripadalo rodu *Staphylococcus*, sledila sta rodova *Pediococcus* s 13 % in *Streptococcus* z 10 %. Ostali rodovi so bili prisotni v manj kot 10 %: rod *Lactobacillus* 6 %, sledila sta rodova *Actinomyces* in *Enterococcus* s 3 %, ter *Corynebacterium* (2 %) in *Bifidobacterium* (1 %). Iz rezultatov lahko razberemo, da je kljub temu, da smo izolate pridobili z gojišča MRS, ki je namenjen izolaciji MKB, predvsem laktobacilom, samo 45 % izolatov pripadalo MKB (rodovi *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*). Prevladujoča vrsta rodu *Staphylococcus* je bila *Staphylococcus epidermidis* (56 %), kar je skladno z literaturnimi podatki o sestavi mikrobiote humanega kolostruma. Tako so na primer Jiménez in sod. (2008) pri proučevanju vrstne sestave mikrobiote humanega kolostruma 36-ih prostovoljk, pri čemer so za vsak vzorec kolostruma naključno izbrali 35 izolatov, ugotovili da je bila prevladujoča vrsta *Staphylococcus epidermidis*, ki je bila prisotna v vzorcih 30 prostovoljk in se je tako pojavila v 83 % vseh izolatov (v 30 primerih od 36). Sledile so vrste rodov

Enterococcus in *Streptococcus*. Prav tako so izolirali vrste iz rodov *Lactobacillus*, *Actinomyces*, *Corynebacterium* in *Bifidobacterium*. Jeurink in sod. (2013) so sicer proučevali sestavo mikrobiote humanega mleka in ne kolostruma, vendar so s kultivacijsko metodo potrdili kar nekaj vrst, ki smo jih v našem raziskovalnem delu izolirali iz humanega kolostruma (podčrtano in odebeljeno, preglednica 5).

Preglednica 5: Identificirane bakterije v humanem mleku (Jeurink in sod., 2013)
 (Označene rumeno smo identificirali tudi v naši raziskavi)

Deblo	Rod	Metoda kultivacije	16S rRNA
		Izolacija	Izolacija
		Vrsta	Vrsta
<i>Actinobacteria</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>B.breve</i> , <i>B.bifidum</i> , <i>B.longum</i> , <i>B.adolescentis</i> , <i>B.pseudocatenulatum</i>	<i>B.breve</i> , <i>B.bifidum</i> , <i>B.longum</i> , <i>B.adolescentis</i> , <u><i>B.animalis</i></u> , <i>B.catenulatum</i>
	<i>Parascovia</i>	<i>P.denticolens</i>	
	<i>Corynebacterium</i>		
	<i>Propionibacterium</i>		
	<i>Rothia</i>	<i>R.mucilaginoso</i>	
	<i>Kocuria</i>	<i>K.rhizophila</i>	
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidetes</i>		
<i>Firmicutes</i>	<i>Staphylococcus</i>	<u><i>S.epidermidis</i></u> , <i>S.aureus</i> , <i>S.capitis</i> , <i>S.hominis</i>	<i>S.aureus</i>
	<i>Streptococcus</i>	<i>S.mitis</i> , <u><i>S.salivarius</i></u> , <i>S.oris</i> , <u><i>S.parasanguinis</i></u> , <i>S.australis</i> , <i>S.gallolyticus</i> , <i>S.vestibularis</i> , <i>S.lactarius</i>	
	<i>Lactobacillus</i>	<u><i>L.gasseri</i></u> , <u><i>L.fermentum</i></u> , <i>L.crispatus</i> , <i>L.rhamnosus</i> , <i>L.salivarius</i> , <i>L.reuteri</i> , <i>L.plantarum</i> , <i>L.gastricus</i> , <i>L.vaginalis</i> , <u><i>L.casei</i></u> , <i>L.animalis</i> , <i>L.brevis</i> , <i>L.helveticus</i> , <i>L.oris</i>	
	<i>Lactococcus</i>	<i>L.lactis</i>	
	<i>Enterococcus</i>	<i>E.faecium</i> , <u><i>E.faecalis</i></u> , <i>E.durans</i> , <i>E.hirae</i> , <i>E.mundtii</i>	
	<i>Leuconostoc</i>	<i>Leuc.mesenteroides</i>	
	<i>Pediococcus</i>	<u><i>P.pentosaceus</i></u>	
	<i>Wissella</i>		
	<i>Clostridia</i>		

V naši raziskavi smo od 93 identificiranih izolatov identificirali le eno bifidobakterijo, in sicer *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, ki značilno poseljuje črevesje večine sesalcev, vključno s človekom, zato jo pogosto izolirajo iz vzorcev blata. Določene seve te podvrste uvrščajo tudi med probiotične bakterije (Kim in sod., 2009). Tudi Jiménez in sod. (2008)

so v raziskavi določili prisotnost ene bifidobakterije, ki je pripadala vrsti *B. breve*. Težavnost določanja bifidobakterij v vzorcih kolostuma dodatno otežuje dejstvo, da so bifidobakterije striktni anaerobi, poleg tega so posameznice pri pridobivanju vzorcev kolostruma imele stik s površino kože, tako da so morebitne vzorce še dodatno »onesnažile« z mikroorganizmi površine kože.

5.2 MOŽEN IZVOR IDENTIFICIRANIH MIKROORGANIZMOV

Tako iz literature kot iz dobljenih rezultatov je razvidno, da so v mikrobioti kolostruma prisotne predstavnice kože, prebavil, vaginalne sluznice... Znano je, da lahko pridejo bakterije v mlečno žlezo iz različnih virov, zato lahko predpostavimo, da so bakterije, ki smo jih določili, prišle v mlečno žlezo po znanih poteh (npr. med dojenjem otrok prenaša bakterije iz ustne votline in bakterije, ki jih je »dobil« med porodom, na materino dojko, prenos bakterij iz kože in zunanjega okolja ipd.).

Sanford in Gallo (2013) kot najpogostejše predstavnice površine kože navajata bakterijske vrste rodov *Staphylococcus*, *Propionibacterium* in *Corynebacterium*. Med našimi izolati bi v to skupino uvrstili vrste *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus pasteurii*. V to skupino uvrščamo tudi *Corynebacterium kroppenstedtii*, ki jo številni avtorji navajajo v povezavi z mastitisom (Flèche-Matéos in sod., 2012). Poleg zgoraj omenjenih vrst in rodov pa Rosenthal in sod. (2011) v to skupino uvrščajo še vrste rodov *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Brevibacterium*, *Acinetobacterium* in *Pseudomonas*.

Med predstavnice, ki jih najdemo na koži, uvrščamo tudi vrsto *Actinomyces neuii*, ki smo jo izolirali v treh primerih (3,2 %). Vrsta je bila prvič opisana šele leta 1994 in velja za izjemo v svojem rodu (aerobna rast, drugačna morfologija, različni simptomi pri okužbah...). Najpogosteje jo povezujejo z okužbami kože, ki se kažejo kot absces ali aterom (Graevenitz, 2011). Omenjene bakterijske vrste so lahko prišle v mlečno žlezo s stikom matere in otrokovih ust med sesanjem dojke. Glede na način in težavnost pridobivanja vzorca pa bi omenjene bakterije lahko prišle v vzorce kolostruma tudi s kože oziroma bradavice dojke matere med samim izsesavanjem kolostruma oz. iz zunanjega okolja.

Med normalno prebivalco ustne votline uvrščamo bakterijsko vrsto *Streptococcus parasanguinis*, ki naseljuje površino zobovja v ustni votlini posameznikov. Bakterija ima pile, ki ji omogočajo učinkovito tvorbo biofilmov (Lee in sod., 2014). V ustni votlini oz. v zgornjem prebavnem traktu je tipična predstavnica tudi bakterijska vrsta *Streptococcus salivarius* (Burton in sod., 2006). Obe omenjeni bakterijski vrsti smo pričakovano, glede na lokacijo in njune lastnosti, identificirali tudi med našimi izolati iz kolostruma. Najverjetneje sta prišli v mlečno žlezo iz ust novorojenčka med sesanjem, preko znanega prenosa bakterij med materjo in otrokom (stik novorjenčevih ust z dojko).

Enterokoki veljajo za ubikvitarne mikroorganizme, ki pogosto naseljujejo človekov GIT in urogenitalni trakt, zato ne preseneča dejstvo, da je bil *Enterococcus faecalis* eden izmed dveh prevladujočih predstavnikov bakterijske populacije kolostruma, ki so jih izolirali v raziskavi Jiménez in sod. (2008). So del normalne črevesne mikrobiote posameznika, hkrati pa sta *E. faecalis* in *E. faecium* z 90 % prevladujoči bakterijski vrsti med vsemi enterokoki, ki jih izolirajo pri bolnikih z infekcijami (Fraser, 2014). Med našimi izolati je bila od enterokokov prisotna samo vrsta *E. faecalis* (3,2 %). Enterokoki sicer niso opredeljeni kot prebivalci ustne votline, vendar se pri posameznikih pojavljajo tudi tam, predvsem vrsta *E. faecalis*. Možna poselitev ustne votline novorojenca je med porodom, s čimer lahko pojasnimo tudi enega od načinov, kako so prišli v vzorce kolostruma. Avtor Maldonado-Barragán in njegovi sodelavci (2009) so pri proučevanju kolostruma enterokoke poimenovali kot ključen del človekove naravne mikrobiote, ki se začne razvijati takoj po rojstvu. *E. faecalis* in *E. faecium* sta najpogostejša predstavnika površine sluznic, vendar avtorji opozarjajo, da sta na drugi strani lahko omenjeni vrsti opurtonistična patogena in povzročitelja infekcij (Maldonado-Barragán in sod., 2009).

Bifidobakterije so striktni anaerobi, zato je zanje bolj kot zunanje okolje, značilna endogena pot prenosa. V človeškem debelem črevesu dosežejo koncentracijo 10^8 - 10^9 celic/g, kar jih uvršča med najpomembnejše organizme črevesne mikrobiote (Adamič in sod., 2003). Med našimi vzorci smo identificirali bifidobakterijo podvrste *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*.

MKB so za zdravje posameznika zelo pomembne, saj tvorijo nekatere protimikrobne komponente, ki imajo sposobnost inhibicije patogenih bakterij. Avtorja Ozgun in Vural (2011) sta proučevala predvsem bakterije iz rodu laktobacilov, kjer so bile v 100 vzorcih kolostruma prisotne bakterije *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. casei* in *L. plantarum*. V isti študiji so preučevali tudi laktobacile, prisotne v blatu novorojenčkov, kjer so bile najpogostejše vrste *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus* in *L. plantarum*. V splošnem prevladujoča vaginalna mikrobiota zdravih posameznic v rodni dobi vsebuje predvsem vrste iz rodu *Lactobacillus*, med katerimi so najpogostejše zastopane vrste *L. crispatus*, *L. jensenii*, *L. gasseri* in *L. iners* (Kurakawa in sod., 2015). Glede na poznane možne poti prenosa med materjo in otrokom je pričakovano, da se otrok tekom poroda obda z materinimi vaginalnimi bakterijami, ter jih nato preko dojenja in stika z materino kožo prenese na dojko, od koder lahko prodrejo tudi v mlečno žlezo. V naših vzorcih smo tako identificirali tri različne vrste laktobacilov: *L. gasseri* (2), *L. casei/paracasei* (2) in *L. fermentum* (1), ki so pričakovani in skladni tudi glede na literaturne podatke.

Rod *Pediococcus* uvrščamo v skupino MKB, družina *Lactobacillaceae*. Zanje je značilno, da imajo zelo različne in unikatne lastnosti (genetika, morfologija, fiziologija idr.) (Raccach, 2014). Avtor Albesharat in sod. (2011) so pri preučevanju MKB v humanem mleku mater in v blatu njihovih dojenčkov identificirali vrsto *P. pentosaceus*. V naši raiskavi je bil rod *Pediococcus* s 13 % drugi najbolj zastopan rod med izolati. Znotraj rodu *Pediococcus* smo določili vrste *Pediococcus acidilactici/pentosaceus/lolii*. Bakterije vrste *P. acidilactici* in *P. pentosaceus* veljajo za industrijsko zelo pomembne MKB, ki jih uporabljajo kot starterske kulture v živilski industriji. Označene so z varnim statusom GRAS. Avtor Fernández je s sodelavci (2013) preučeval sestavo mikrobiote humanega mleka, kjer je prav tako kot ostali raziskovalci identificiral vrsto *P. pentosaceus*, ki velja za tipičnega predstavnika mikrobiote humanega mleka. Za vse tri omenjene vrste je značilno, da imajo zelo podobno nukleotidno zaporedje 16S *rRNA*, kljub temu pa so zelo različne v fenotipskih lastnostih. Sklepamo lahko, da je podobnost v nukleotidnem zaporedju 16S *rRNA* razlog, da so v našem primeru vedno določene vse tri vrste skupaj in ne vsaka posamezno (Doi in sod., 2013). Glede na dosedanje znanje, izkušnje in pretekle objave raziskav pa lahko sklepamo, da je v humanem kolostrumu največkrat prisotna vrsta znotraj rodu *Pediococcus*, vrsta *P. pentosaceus*.

Glede na pridobljeno znanje in rezultate lahko sklepamo, da so izolirane bakterije prišle v proučevane vzorce humanega kolostruma po znanih poteh prenosa v mlečno žlezo. Pri teoriji prenosa pride do »kontaminacije« otroka z bakterijami matere že med porodom, ko se novorojenec obda z materinimi črevesnimi in vaginalnimi bakterijami, nato pa jih s sesanjem prenese na dojko matere, od koder lahko prodrejo tudi v mlečno žlezo (Jeurink in sod., 2013). Poleg omenjene poti se vedno pogosteje pojavljajo hipoteze o endogenem prenosu bakterij iz črevesa matere v mlečno žlezo, pri čemer gre za t.i. mehanizem aktivnega prenosa (Martín in sod., 2003).

6 SKLEPI

- Potrdili smo, da kolostrum ni sterilna tekočina, temveč vsebuje dokaj pestro mikrobno združbo.
- V mikrobni populaciji kolostruma slovenskih mater smo potrdili prisotnost vrst rodov *Staphylococcus*, *Pediococcus* in *Streptococcus*, v manjši meri pa so bile prisotne tudi vrste rodov *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Actinomyces*, *Corynebacterium* in *Bifidobacterium*.
- Med 584 proučevanimi bakterijskimi izolati iz kolostruma je s 56 % prevladovala vrsta *Staphylococcus epidermidis*.
- V kolostumu smo določili prisotnost bakterije *Lactobacillus gasseri*, ki jo literatura navaja kot pogosto predstavnico mikrobiote mleka zdravih doječih mater.
- Med vsemi izolati smo identificirali samo eno bifidobakterijo, ki je pripadala podvrsti *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*
- Med prevladujočimi vrstami smo identificirali tudi tipične predstavnike mikrobiote kože, kot so *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus lugdunensis* in *Staphylococcus pasteurii*, rod *Streptococcus* ter vrsti *Corinebacterium kroppenstedtii* in *Actinomyces neuii*.

7 POVZETEK

V nalogi smo proučevali vrstno sestavo 584 bakterijskih izolatov, ki smo jih osamili iz 102 vzorcev humanega kolostruma prostovoljk, ki so sodelovale v raziskavi Vloga humanega mleka v razvoju črevesne mikrobiote dojenčka (J4-3606). Posebno pozornost smo posvetili mlečnokislinskim bakterijam in bifidobakterijam.

Humano mleko predstavlja popolno hrano za novorojenca, saj vsebuje vse potrebne hranilne snovi, ki omogočajo normalno rast in razvoj in številne zaščitne snovi, ki varujejo novorojenca. Ločimo tri stadije laktacije, v katerih se sestava mleka spreminja glede na otrokove potrebe, pri čemer se kolostrum izloča v prvem obdobju laktacije (1-5 dan po rojstvu) in ima najbolj specifične lastnosti, saj je njegova poglavitna naloga zagotoviti preživetje novorojenca.

Humano mleko vsebuje hranila s številnimi zaščitnimi in funkcionalnimi lastnostmi, ki imajo vlogo pri oblikovanju, razvoju in dozorevanju gastrointestinalnega trakta (GIT) in imunskega sistema novorojenca, za katerega velja, da je ob rojstvu nezrelo. Kolonizacija GIT novorojenca z bakterijami se začne že med porodom, ko pride novorojenec v stik z materinimi črevesnimi in vaginalnimi bakterijami, ter bakterijami površine kože. Na ta način te bakterije z dojenjem dosežejo dojko in posledično prodrejo v mlečno žlezo matere. Raziskovalci so namreč potrdili povezavo med sevi baterij, ki so jih identificirali v vzorcih materinega mleka in tistimi, ki so jih identificirali v blatu novorojencev. Na ta način se začne razvoj in zorenje črevesja novorojenca, pri čemer se mikrobiota spreminja in v prvih dveh letih življenja postaja podobna mikrobioti odraslega človeka.

Rezultati analize so pokazali, da je 62 % izolatov iz humanega kolostruma, ki smo jih poslali na sekvenciranje, pripadalo rodu *Staphylococcus*, sledila sta rodova *Pediococcus* (13 %) in *Streptococcus* (10 %). V nižjih odstotkih smo identificirali tudi rodove *Lactobacillus* (6 %), sledila sta rodova *Actinomyces* in *Enterococcus* s 3 %, ter *Corynebacterium* (2 %) in *Bifidobacterium* (1 %). Najpogostejše identificirane vrste so bile: *Staphylococcus epidermidis*, *Pediococcus acidilactici/pentosaceus/lolii* in *Streptococcus*

parasanguinis. Od laktobacilov so bile prisotne vrste *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus casei/paracasei* in *Lactobacillus fermentum*, med vsemi izolati pa smo identificirali samo eno bifidobakterijo, ki je pripadala podvrsti *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*.

8 VIRI

- Almeida W., Ferrari I., Souza J., Silva C., Costa M., Dias F. 2014. Characterization and evaluation of lactic acid bacteria isolated from goat milk. *Food Control*, 56: 96-103
- Albesharat R., Ehrmann M.A., Korakli M., Yazaji S., Vogel R.F. 2011. Phenotypic and genotypic analyses of lactic acid bacteria in local fermented food, breast milk and faeces of mothers and their babies. *Systematic and Applied Microbiology*, 34, 2: 148-155
- Alp G., Aslim B. 2010. Relationship between the resistance to bile salts and low pH with exopolysaccharide (EPS) production of *Bifidobacterium spp.* isolated from infants feces and breast milk. *Anaerobe*, 16, 2: 101-105
- Ballard O., Morrow A.L. 2013. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatric Clinics of North America*, 60, 1: 49-74
- Adamič J., Smole Možina S., Jeršek B. 2003. Vloga in pomen mikroorganizmov v živilih in taksonomija. V: *Mikrobiologija živil živalskega izvora*. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole-Možina S., Gašperlin L. (eds.) 2003. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 3-45
- Burton J., Wescombe P., Moore C., Chilcott C., Tagg J. 2006. Safety assessment of the oral cavity probiotic *Streptococcus salivarius* K12. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 4: 3050-3053
- Cabrera-Rubio R., Collado C. M., Laitinen K., Salminen S., Isolauri E., Mira A. 2012. The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *American Journal of Clinical Nutrition*, 96: 544-551
- Doi K., Mori K., Tashiro K., Fujino Y., Nagayoshi Y., Hayashi Y., Kuhara S., Ohshima T. 2013. Draft genome sequence of *Pediococcus lolii* NGRI 0510QT isolated from ryegrass silage. *Genome Announcements*, 1: 00156-12, doi: 10.1128/genomeA.00156-12: 2 str.

- Fernández L., Langaa S., Martín V., Maldonado A., Jiménez E., Martín R., Rodríguez J.M. 2013. The human milk microbiota: Origin and potential roles in health and disease. *Pharmacological Research*, 69: 1-10
- Flèche-Matéos A., Berthet N., Lomprez F., Arnoux Y., Guern A.S., Leclercq I., Burguière A.I., Manuguerra J.C. 2012. Recurrent breast abscesses due to *Corynebacterium kroppenstedtii*, a human pathogen uncommon in caucasian women. *Case Reports in Infectious Diseases*, 2012: ID 120968, doi: 10.1155/2012/120968: 5 str.
- Fraser L.S. 2014. Enterococcal infections treatment & management. New York, Medscape WebMD: 7 str.
<http://emedicine.medscape.com/article/216993-treatment>, (21.4.2015).
- Godihia M.L., Patel N. 2013. Colostrum - its composition, benefits as a nutraceutical-a review. *Current Research in Nutrition and Food Science*, 1, 1: 37-47
- Giraffa G., Rossetti L. 2004. Monitoring of the bacterial composition of dairy starter cultures by RAPD-PCR. *FEMS Microbiology Letters*, 237, 1: 133-138
- Graevenitz von A. 2011. *Actinomyces neuui*: review of an unusual infectious agent. *Infection*, 39, 2: 97-100
- Jeurink P.V., Bergenhenegouwen J., Jimenez E., Knippels L.M.J., Fernandez L., Garssen J., Knol J., Rodriguez J.M., Martin R. 2013. Human milk: a source of more life than we imagine. *Beneficial Microbes*, 4, 1: 17-30
- Jiménez E., Delgado S., Fernández L., García N., Albújar M., Gómez A., Rodríguez J.M. 2008. Assessment of the bacterial diversity of human colostrum and screening of *Staphylococcal* and *Enterococcal* populations for potential virulence factors. *Research in Microbiology*, 159, 9–10: 595–601
- Kim F.J., Haeyoung J., Dong S. Y., Sang-Haeng C., Cheol-Goo H., Myeong-Soo P., Sung H. Y., Dae-W. K., Geun E., Hong-Seog P., Tae K. 2009. Genome sequence of

the probiotic bacterium *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* AD011. Journal of Bacteriology, 191, 2: 678-679

Kurakawa T., Ogata K., Tsuji K., Kado Y., Takahashi T., Kida Y., Ito M., Okada N., Nomoto K. 2015. Establishment of a sensitive system for analysis of human vaginal microbiota on the basis of rRNA-targeted reverse transcription-quantitative PCR. Journal of Microbiological Methods, 111: 93-104

Lee W.S., Yu F.L., Hsieh T.C., Ou T.Y., Cheng F.L., Jean S.S., Hsu C.W. 2014. *Streptococcus parasanguinis* coinfection with *Escherichia coli* bacteremia in a patient with complicated urinary tract infection. Journal of Experimental & Clinical Medicine, 6, 6: 230-231

Lek. 2014. Linex Limbi. Ljubljana, Lek d.d: 2 str.

<http://www.lek.si/si/zdravila/brez-recepta/linex-linbi/> (10.11.2014).

Maldonado-Barragán A., Caballero-Guerrero B., Jiménez E., Jiménez-Díaz R., Ruiz Barba J., Juan M. Rodríguez. 2009. Enterocin C, a class IIb bacteriocin produced by *E. faecalis* C901, a strain isolated from human colostrum. International Journal of Food Microbiology, 133: 105-112

Martín R., Langa S., Reviriego C., Jiménez E., Marín L. M., Xaus J., Fernández L., Rodríguez M. J. 2003. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. Journal of Pediatrics, 143, 6: 754-758

Martín R., Langa S., Reviriego C., Jiménez E., Marín L. M., Olivaes M., Boza J., Jimenez J., Fernandez L., Xaus J., Rodriguez J.M. 2004. The commensal microflora of human milk: new perspectives for food bacteriotherapy and probiotics. Trends in Food Science and Technology, 15: 121-127

Martín V., Maldonado-Barragán A., Moles L., Rodriguez-Baños M., Del Campo R., Fernández L., Rodríguez J.M., Jiménez E. 2012. Sharing of bacterial strains between breast milk and infant feces. Journal of Human Lactation, 28, 1: 36-44

- Matamoros S., Gras-Leguen C., Le Vacon F., Potel G., de la Cocchetiere M.F. 2013. Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health. *Human Microbiome* 21, 4: 167-173
- NRDC. 2010. Benefits of breastfeeding. New York, Natural Resources Defense Council: Centres for Disease Control and Prevention, 3 str.
<http://www.nrdc.org/breastmilk/benefits.asp> (3.5.2015)
- Obermajer T., Lipoglavšek, L., Tompa, G., Treven, P., Mohar Lorbeg, P., Bogovič Matijašić, B., Rogelj, I. Colostrum of healthy Slovenian mothers: microbiota composition and bacteriocin gene prevalence. *PloS One*, 10, 4: e0132201, doi: 10.1371/journal.pone.013220: 19 str.
- Ozgun D., Vural H.C., 2011. Identification of *Lactobacillus* strains isolated from faecal specimens of babies and human milk colostrum by API 50 CHL system. *Journal of Medicinal Genetics and Genomics*, 3, 3: 46-49
- Perez P.F., Dore J., Leclerc M., Levenez F., Benyacoub J., Serrant P., Segura-Roggero, I. Schifffrin, E.J., Donnet-Hughes A., 2007. Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? *Pediatrics*, 119: 724-732
- Racah M. 2014. *Pediococcus*. V: Encyclopedia of food microbiology Vol. 3. 2nd ed. Batt A. C., Tortorello M. L. (eds.). Amsterdam, Elsevier/ Academic Press: 1-5.
- Reid G., Younes J.A., Van der Mei H.C., Gloor G.B., Knight R., Busscher H.J. 2011. Microbiota restoration: natural and supplemented recovery of human microbial communities. *Nature Reviews Microbiology*, 9: 27-38
- Rescigno M., Urbano M., Valzasina B., Francolini M., Rotta G., Bonasio R., Granucci, F. Kraehenbuhl J.-P., Ricciardi-Castagnoli P. 2001. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature Immunology*, 2: 361-367

- Rodríguez J. M. 2014. The origin of human milk bacteria: is there a bacterial entero-mammary pathway during late pregnancy and lactation? *Advances in Nutrition*, 5: 779–784
- Rosenthal M., Goldberg D., Aiello A., Larson E., Foxman B. 2011. Skin microbiota: Microbial community structure and its potential association with health and disease. *Infection, Genetics and Evolution*, 11, 5: 839–848
- Sanford A.J., Gallo L.R. 2013. Functions of the skin microbiota in health and disease. *Seminars in Immunology*, 25, 5: 370-377
- Sousa G. S., Delgadillo I., Saraiva A. J. 2014. Effect of thermal pasteurisation and high-pressure processing on immunoglobulin content and lysozyme and lactoperoxidase activity in human colostrum. *Food Chemistry*, 151, 15: 79-85
- Torriani S., Zapparoli G., Dellaglio F. 1999. Use of PCR-based methods for rapid differentiation of *Lactobacillus delbruckii* subsp. *bulgaricus* and *Lactobacillus delbruckii* subsp. *lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 10: 4351-4356
- Yu J., Wang W.H., Menghe B.L.G., Jiri M.T., Wang H.M., Liu W.J., Bao Q.H., Lu Q., Zhang J.C., Wang F., Xu H.Y., Sun T.S., Zhang H.P. 2011. Diversity of lactic acid bacteria associated with traditional fermented dairy products in Mongolia. *Journal of Dairy Science*, 94, 7: 3229-3241

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Ireni Rogelj za vso strokovno pomoč, nasvete, potrpežljivost in vložen trud pri nastajanju magistrskega dela.

Najlepše se zahvaljujem tudi somentorici asist. dr. Petri Mohar Lorbeg za vso pomoč pri izvedbi raziskovalnega dela v laboratoriju na Oddelku za mlekarstvo in probiotike, ter za dostopnost, usmerjanje in nudenje strokovne pomoči skozi celotno nastajanje magistrskega dela.

Recezentki prof. dr. Barbki Jeršek se zahvaljujem za natančen pregled dela in podane komentarje.

Lini Burkan Makivić se zahvaljujem za pregled referenc in končni pregled magistrskega dela.

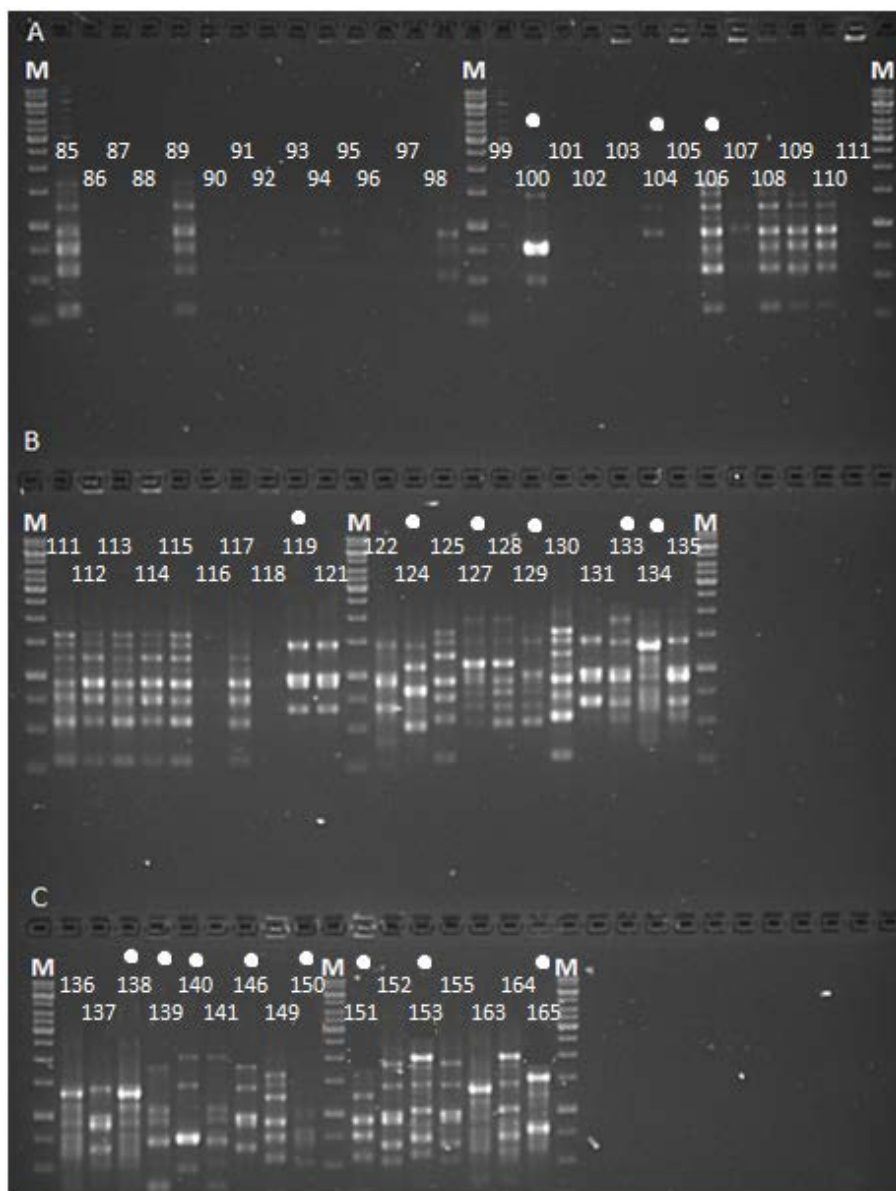
Hvala prijateljem in prijateljicam za nepozabna študentska leta.

Mami, ati, najlepša hvala, da sta mi s finančno in moralno podporo omogočila brezskrben in nepozaben študij. Hvala tudi sestri Špeli in vsem ostalim najožjim sorodnikom, ki ste mi kakorkoli pomagali pri uresničitvi mojih ciljev in želja.

Posebna zahvala gre tebi Miha, za vso moralno in čustveno pomoč, potrpežljivost in za vse vzpodbudne besede, tako tekom študija kot pri nastajanju tega dela.

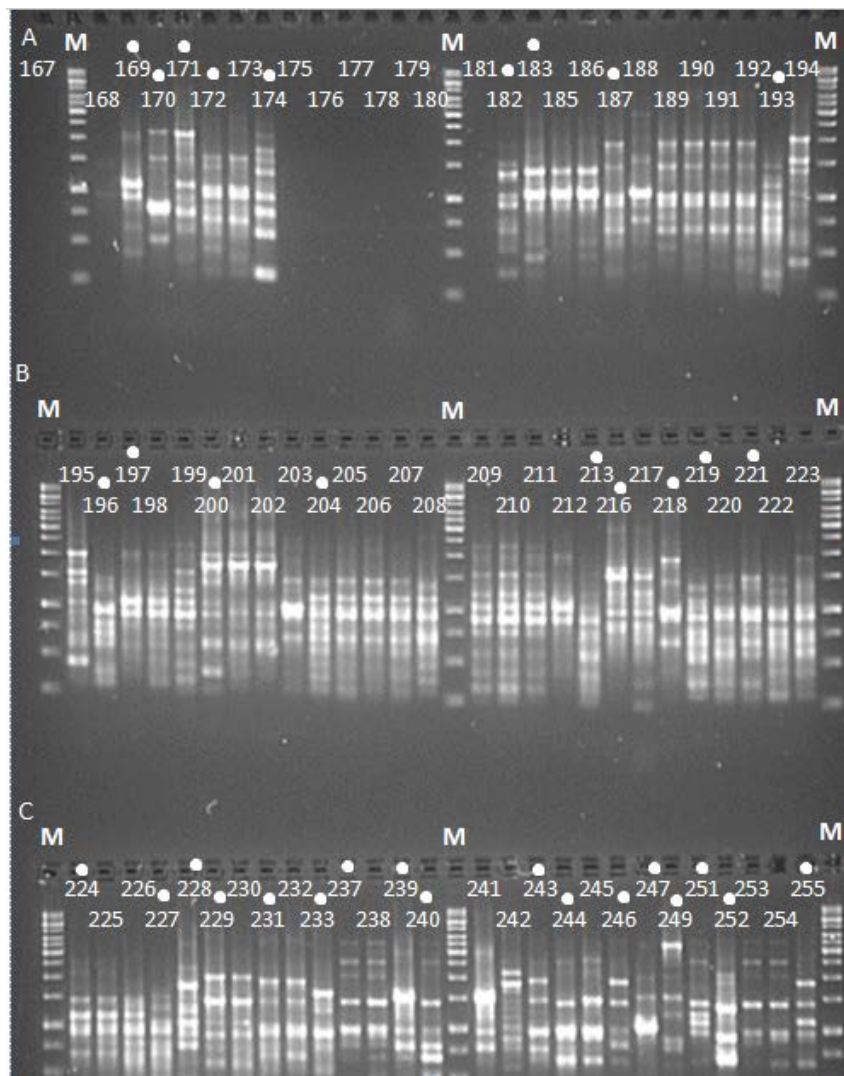
PRILOGE

Priloga A: Rezultati analiz RAPD



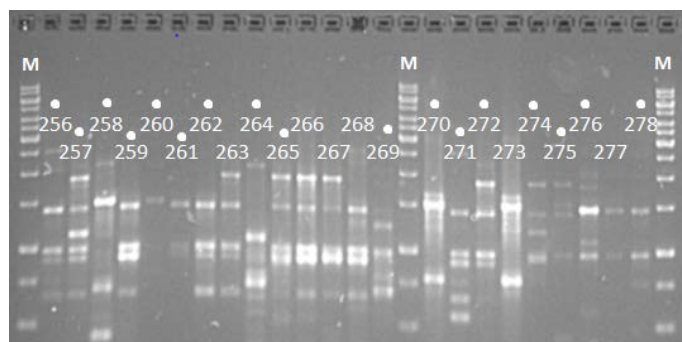
Priloga A1: Pomnožki analize RAPD z začetnim oligonukleotidom M13, ki smo jo opravili na DNA izolirani iz kolonij izolatov 85-165

(A: izolati 85-110, B: izolati 111-155, C: izolati 156-165). Proge izolatov, ki smo jih izbrali za nadaljnje analize so označene s piko nad številko izolata. M: molekularni označevalec velikosti 1kb DNK Ladder (Invitrogen, ZDA).



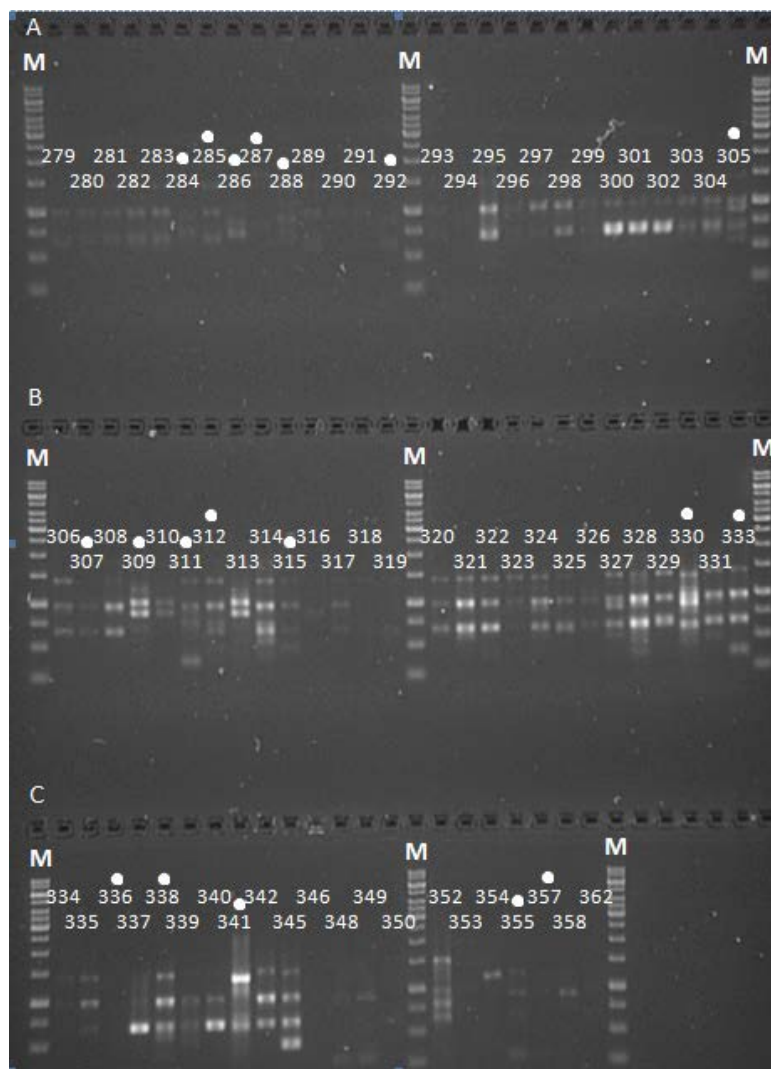
Priloga A2: Pomnožki analize RAPD z začetnim oligonukleotidom M13, ki smo jo opravili na DNA izolirani iz kolonij izolatov 167-255

(A: izolati 167-194, B: izolati 195-223, C: izolati 224-255). Proge izolatov, ki smo jih izbrali za nadaljnje analize so označene s piko nad številko izolata. M: molekularni označevalec velikosti 1kb DNK Ladder (Invitrogen, ZDA).



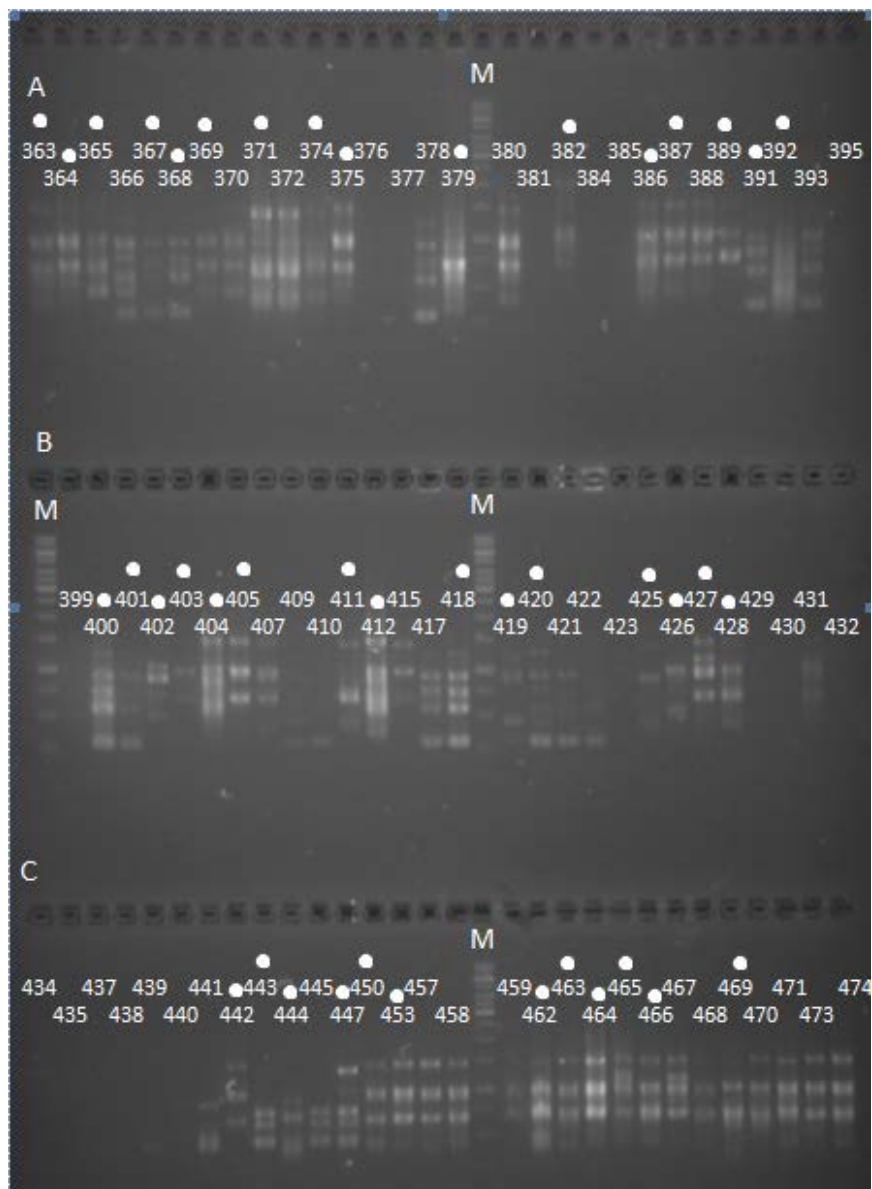
Priloga A3: Pomnožki analize RAPD z začetnim oligonukleotidom M13, ki smo jo opravili na DNA izolirani iz kolonij izolatov 256-278.

Proge izolatov, ki smo jih izbrali za nadaljnje analize so označene s piko nad številko izolata. M: molekularni označevalec velikosti 1kb DNK Ladder (Invitrogen, ZDA).



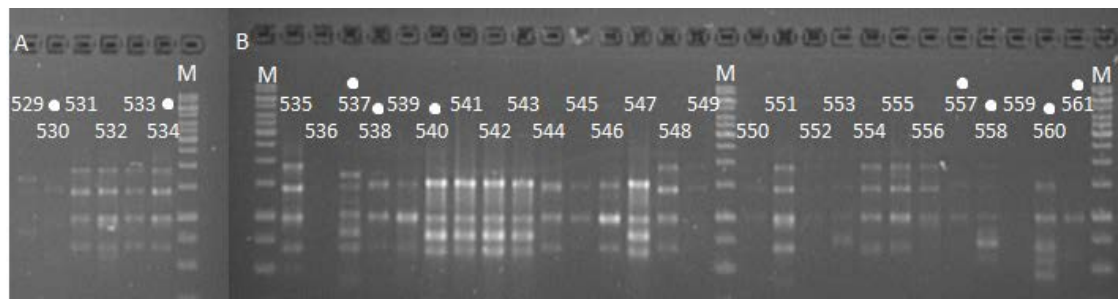
Priloga A4: Pomnožki analize RAPD z začetnim oligonukleotidom M13, ki smo jo opravili na DNA izolirani iz kolonij izolatov 279-362

(A: izolati 279-305, B: izolati 306-333, C: izolati 334-362). Proge izolatov, ki smo jih izbrali za nadaljnje analize so označene s piko nad številko izolata. M: molekularni označevalec velikosti 1kb DNK Ladder (Invitrogen, ZDA).



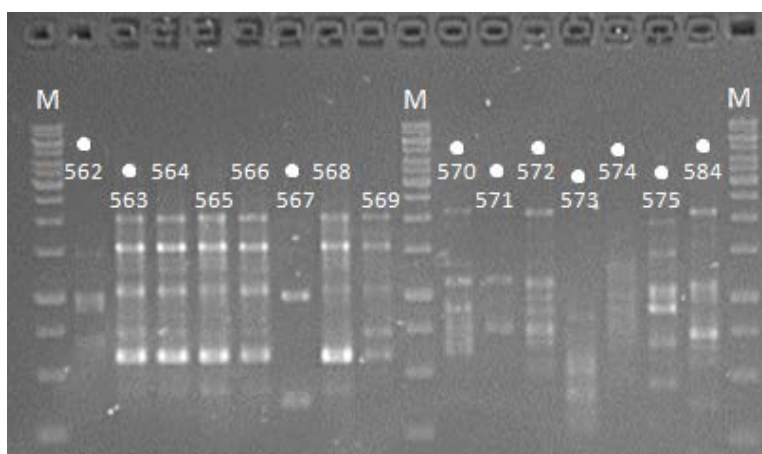
Priloga A5: Pomnožki analize RAPD z začetnim oligonukleotidom M13, ki smo jo opravili na DNA izolirani iz kolonij izolatov 363-474

(A: izolati 363-395, B: izolati 399-432, C: izolati 434-474). Proge izolatov, ki smo jih izbrali za nadaljnje analize so označene s piko nad številko izolata. M: molekularni označevalec velikosti 1kb DNK Ladder (Invitrogen, ZDA).



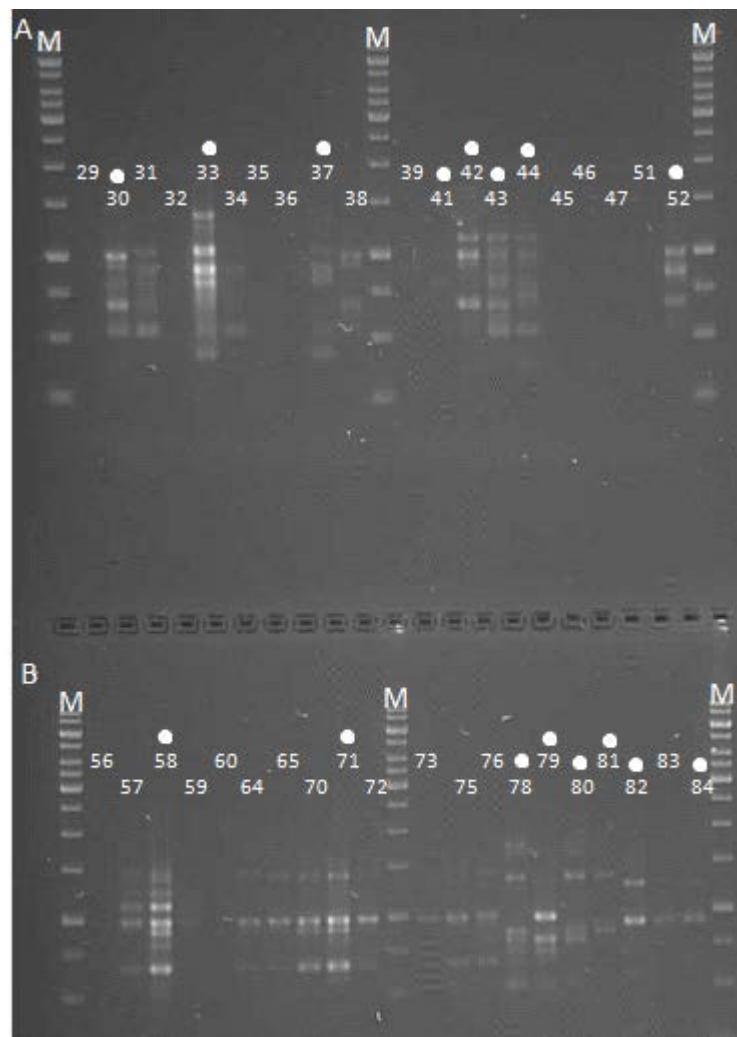
Priloga A6: Pomnožki analize RAPD z začetnim oligonukleotidom M13, ki smo jo opravili na DNA izolirani iz kolonij izolatov 529-561

(A: izolati 529-534, B: izolati 535-561). Proge izolatov, ki smo jih izbrali za nadaljnje analize so označene s piko nad številko izolata. M: molekularni označevalec velikosti 1kb DNK Ladder (Invitrogen, ZDA).



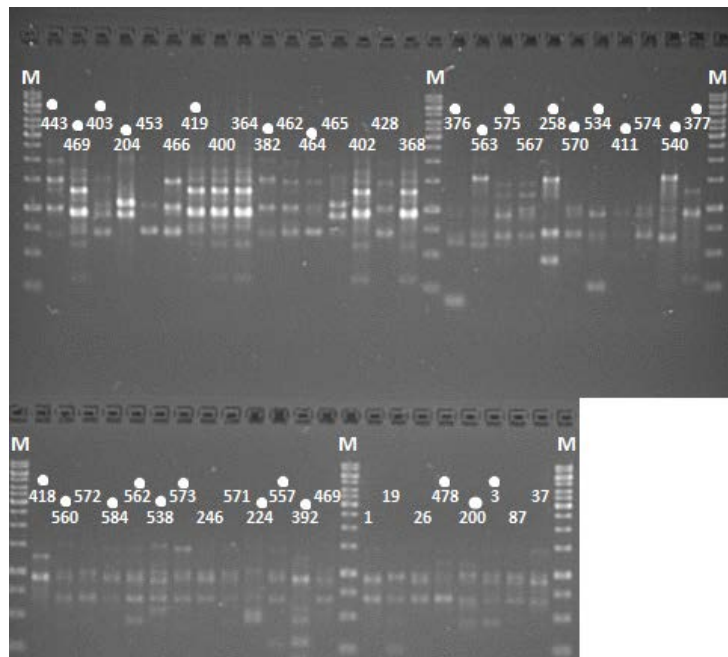
Priloga A7: Pomnožki analize RAPD z začetnim oligonukleotidom M13, ki smo jo opravili na DNA izolirani iz kolonij izolatov 562-584.

Proge izolatov, ki smo jih izbrali za nadaljnje analize so označene s piko nad številko izolata. M: molekularni označevalec velikosti 1kb DNK Ladder (Invitrogen, ZDA).



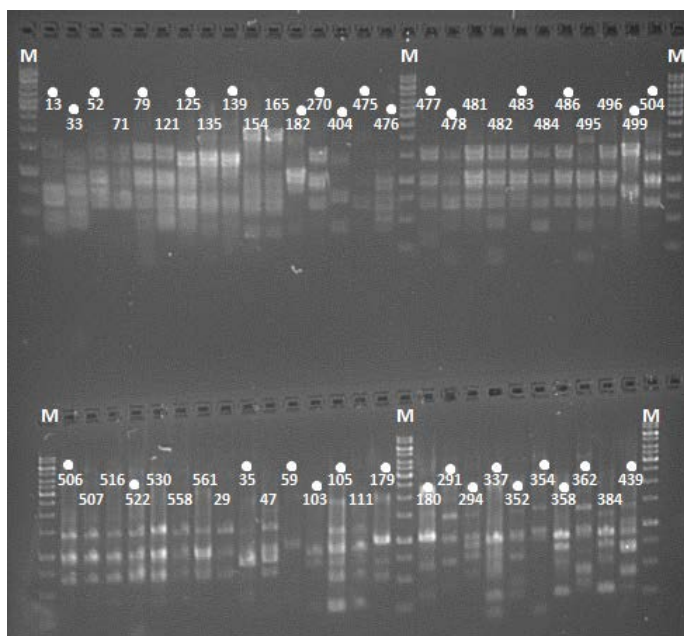
Priloga A8: Pomnožki analize RAPD z začetnim oligonukleotidom M13, ki smo jo opravili na DNA izolirani iz kolonij izolatov 29-84

(A: izolati 29-52, B: izolati 56-84). Proge izolatov, ki smo jih izbrali za nadaljnje analize so označene s piko nad številko izolata. M: molekularni označevalec velikosti 1kb DNK Ladder (Invitrogen, ZDA).



Priloga A9: Pomnožki analize RAPD z začetnim oligonukleotidom M13, ki smo jo opravili na DNA izolirani iz kulture izbranih sevov.

Oznake sevov, ki smo jih izbrali za sekvenciranje so označene s piko (nad številko). M: molekularni označevalec velikosti 1kb DNK Ladder (Invitrogen, ZDA).



Priloga A10: Pomnožki analize RAPD z začetnim oligonukleotidom M13, ki smo jo opravili na DNA izolirani iz kulture izbranih sevov.

Oznake sevov, ki smo jih izbrali za sekvenciranje so označene s piko (nad številko). M: molekularni označevalec velikosti 1kb DNK Ladder (Invitrogen, ZDA).

Priloga B: Rezultati identifikacije izbranih sevov na osnovi sekvenciranja 16S rDNA

Prvotne oznake izolatov	Oznaka seva	Vrsta, ki ji pripada izolirani sev
LJ 017-MRS3	3	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
LJ 017-MRS6	6	<i>Streptococcus salivarius</i>
LJ 010-MRS3	13	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
LJ 010-MRS8	18	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
LJ 010-MRS10	20	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
LJ 016-MRS1	21	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
LJ 016-MRS3	23	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
LJ 016-MRS5	25	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
LJ 016-MRS8	28	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
LJ 051-MRS3	33	<i>Staphylococcus pasteurii</i>
LJ 113-MRS7	41	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
LJ 007-MRS7	52	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
LJ 113-MRS4	59	<i>Pediococcus acidilactici/pentosaceus/lolii</i>
LJ 005-MRS2	79	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
LJ 131-MRS2	103	<i>Pediococcus acidilactici/pentosaceus/lolii</i>
LJ 094-MRS3	105	<i>Pediococcus acidilactici/pentosaceus/lolii</i>
LJ 131-MRS4	106	<i>Pediococcus acidilactici/pentosaceus/lolii</i>
LJ 168-MRS4	125	<i>Corynebacterium kroppenstedtii</i>
LJ 139-MRS5	139	<i>Corynebacterium kroppenstedtii</i>
LJ 059-MRS4	154	<i>Streptococcus parasanguinis</i>
LJ 052-MRS2	179	<i>Streptococcus parasanguinis</i>
LJ 052-MRS1	180	<i>Streptococcus parasanguinis</i>
LJ 052-MRS5	182	<i>Enterococcus faecalis</i>
LJ 148-MRS4	200	<i>Streptococcus parasanguinis</i>
LJ 054-MRS2	204	<i>Enterococcus faecalis</i>
LJ 140-MRS5	213	<i>Streptococcus parasanguinis</i>
LJ 156-MRS1	219	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
LJ 132-MRS1	224	<i>Lactobacillus gasseri</i>
LJ 132-MRS5	228	<i>Lactobacillus fermentum</i>
LJ 137-MRS2	233	<i>Lactobacillus gasseri</i>
LJ 158-MRS1	237	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
LJ 151-MRS2	239	<i>Actinomyces neuui</i>
LJ 144-MRS3	247	<i>Streptococcus parasanguinis</i>
LJ 144-MRS1	251	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
LJ 095-MRS2	252	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
LJ 058-MRS5	257	<i>Lactobacillus casei/paracasei</i>
LJ 060-MRS1	258	<i>Lactobacillus casei/paracasei</i>

Se nadaljuje

Nadaljevanje priloge B

Prvotne oznake izolatov	Oznaka seva	Vrsta, ki ji pripada izolirani sev
LJ 019-MRS2	264	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>
LJ 045-MRS4	270	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
LJ 045-MRS3	271	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
LJ 056-MRS1	272	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
LJ 056-MRS3	275	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
LJ 051-MRS5	286	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>
LJ 004-MRS2	291	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
LJ 038-MRS3	294	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
LJ 068-MRS3	305	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
LJ 004-MRS2	309	<i>Enterococcus faecalis</i>
LJ 004-MRS4	311	<i>Pediococcus acidilactici/pentosaceus/lolii</i>
LJ 083-MRS4	330	<i>Streptococcus parasanguinis</i>
LJ 110-MRS3	336	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
LJ 110-MRS6	337	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
LJ 110-MRS7	338	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
LJ 093-MRS6	352	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
LJ 035-MRS5	354	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
LJ 095-MRS3	355	<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i>
IZ 003-MRS2	358	<i>Pediococcus acidilactici/pentosaceus/lolii</i>
LJ 116-MRS1	362	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
LJ 095-MRS5	363	<i>Pediococcus acidilactici/pentosaceus/lolii</i>
LJ 095-MRS4	369	<i>Pediococcus acidilactici/pentosaceus/lolii</i>
LJ 016-MRS7	373	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
LJ 093-MRS4	376	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
LJ 108-MRS2	377	<i>Pediococcus acidilactici/pentosaceus/lolii</i>
LJ 035-MRS6	382	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
LJ 108-MRS0	392	<i>Pediococcus acidilactici/pentosaceus/lolii</i>
MB 005-MRS10	403	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
LJ 030-MRS2	411	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
LJ 034-MRS5	418	<i>Pediococcus acidilactici/pentosaceus/lolii</i>
IZ 003-MRS1	419	<i>Pediococcus acidilactici/pentosaceus/lolii</i>
LJ 084-MRS6	439	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>
LJ 084-MRS2	443	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
MB 003-MRS9	464	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
MB 002-MRS5	475	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
MB 002-MRS6	476	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
MB 002-MRS4	477	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
LJ 045-MRS6	478	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
MB 002-MRS7	483	<i>Staphylococcus epidermidis</i>

Se nadaljuje

Nadaljevanje priloge B

Prvotne oznake izolatov	Oznaka seva	Vrsta, ki ji pripada izolirani sev
LJ 062-MRS7	486	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
LJ 047-MRS6	496	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
LJ 078-MRS2	499	<i>Actinomyces neuui</i>
LJ 083-MRS4	504	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
LJ 083-MRS3	506	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
LJ 083-MRS1	522	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
LJ 030-MRS4	534	<i>Staphylococcus epidermidis.</i>
LJ 089-MRS10	538	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
LJ 089-MRS8	540	<i>Actinomyces neuui</i>
LJ 106-MRS3	557	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
LJ 106-MRS1	560	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
LJ 049-MRS9	562	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
LJ 049-MRS8	563	<i>Streptococcus sp.</i>
LJ 107-MRS1	570	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>
LJ 107-MRS2	573	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
LJ 078-MRS9	575	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
LJ 107-MRS6	584	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>