

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Tamara SRDAREV

**PROTIMIKROBNA AKTIVNOST  
MLEČNOKISLINSKIH BAKTERIJ IN  
BIFIDOBAKTERIJ IZ HUMANEGA KOLOSTRUMA  
IN MLEKA PROTI POVZROČITELJEM MASTITISA**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Prehrana

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Tamara SRDAREV

**PROTIMIKROBNA AKTIVNOST MLEČNOKISLINSKIH BAKTERIJ  
IN BIFIDOBAKTERIJ IZ HUMANEGA KOLOSTRUMA IN MLEKA  
PROTI POVZROČITELJEM MASTITISA**

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij – 2. stopnja Prehrana

**ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF LACTIC ACID BACTERIA AND  
BIFIDOBACTERIA FROM HUMAN COLOSTRUM AND MILK  
AGAINST MASTITIS-CAUSING BACTERIA**

M. SC. THESIS  
Master Study Programmes: Field Nutrition

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Prehrana. Delo je bilo opravljeno na Katedri za mlekarstvo Oddelka za zootehniko na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala viš. znan. sod. dr. Bojano Bogovič Matjašič, za somentorico asist. dr. Petro Mohar Lorbeg in za recenzentko prof. dr. Polono Jamnik.

Mentorica: viš. znan. sod. dr. Bojana Bogovič Matijašič

Somentorica: asist. dr. Petra Mohar Lorbeg

Recenzentka: prof. dr. Polona Jamnik

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno 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.

Tamara Srdarev

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

|           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>ŠD</b> | Du2                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| <b>DK</b> | UDK 612.664:618.19-002:579.24/.26(043)=163.6                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| <b>KG</b> | humano mleko/humani kolostrum/mlečnokislinske bakterije/bifidobakterije/<br>mastitis/povzročitelji mastitisa/antibiotiki/mikrobiota mlečne<br>žleze/probiotiki/imunski sistem/črevesno-mlečna pot/RAPD/PCR/protimikrobna<br>aktivnost                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| <b>AV</b> | SRDAREV, Tamara, dipl. inž. živ. in preh. (UN)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| <b>SA</b> | BOGOVIČ MATIJAŠIĆ, Bojana (mentorica)/MOHAR LORBEG, Petra<br>(somentorica)/JAMNIK, Polona (recenzentka)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| <b>KZ</b> | SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| <b>ZA</b> | Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| <b>LI</b> | 2016                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| <b>IN</b> | PROTIMIKROBNA AKTIVNOST MLEČNOKISLINSKIH BAKTERIJ IN<br>BIFIDOBakterij IZ HUMANEGA KOLOSTRUMA IN MLEKA PROTI<br>POVZROČITELJEM MASTITISA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| <b>TD</b> | Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Prehrana)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| <b>OP</b> | XIII, 54 str., 17 pregl., 13 sl., 1 pril., 73 vir.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| <b>IJ</b> | sl                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| <b>JI</b> | sl/en                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| <b>AI</b> | V raziskavi smo proučili bakterijske izolate iz skupine mlečnokislinskih bakterij in bifidobakterij, pridobljene iz humanega kolostruma in mleka, z vidika protimikrobnega delovanja proti povzročiteljem mastitisa. Zanimalo nas je, katerim vrstam pripadajo in katere protimikrobne snovi proizvajajo sevi, ki izkazujejo protimikrobno delovanje. Isolate iz vzorcev humanega kolostruma in mleka izrasle na selektivnih gojiščih za rast laktobacilov ( <i>Rogosa</i> ) in bifidobakterij ( <i>TOS</i> z mupirocinom) smo z metodo RAPD združili v skupine. Predstavnik posameznih skupin smo identificirali do vrste s pomočjo ugotavljanja zaporedja gena za <i>16S rDNA</i> in primerjali s podatki v genski banki NCBI. Za ugotavljanje protimikrobne aktivnosti smo izbrali bakterijske seve, ki so pripadali rodovom <i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i> in <i>Bifidobacterium</i> . Poleg teh sevov smo v analize vključili še izolate iz zbirke mikroorganizmov shranjene na Inštitutu za mlekarstvo in probiotike. Skupaj smo za ugotavljanje protimikrobne aktivnosti izbrali 25 bakterijskih sevov iz rodu <i>Lactobacillus</i> , 18 sevov iz rodu <i>Pediococcus</i> in 4 seve iz rodu <i>Bifidobacterium</i> . Kot najbolj protimikrobno aktivni so se pokazali sevi iz vrst <i>L. gasseri</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. casei</i> ali <i>L. paracasei</i> in <i>B. breve</i> . Glavni dejavnik protimikrobne aktivnosti je bila tvorba organskih kislin. Pri nekaterih bakterijah smo ugotovili tudi izločanje drugih protimikrobnih snovi, najverjetneje bakteriocinov ali vodikovega peroksida. Največjo protimikrobno aktivnost so bakterije pokazale proti indikatorskim sevom vrst <i>Staph. epidermidis</i> in <i>Staph. aureus</i> , ki so najpogostejši povzročitelji laktacijskega mastitisa. Preučeni bakterijski izolati bi zaradi njihove protimikrobne aktivnosti, humanega izvora in prilagojenosti na okolje mleka in mlečne sluznice, lahko predstavljali dobro alternativo zdravljenju laktacijskega mastitisa z antibiotiki. |

## KEY WORDS DOCUMENTATION

**ND** Du2  
**DC** UDC 612.664:618.19-002:579.24/.26(043)=163.6  
**CX** human milk/human colostrum/lactic acid bacteria/bifidobacteria/mastitis/mastitis-causing bacteria/antibiotics/mammary gland microbiota/probiotics/immune system/entero-mammary pathway/RAPD/PCR/antimicrobial activity  
**AU** SRDAREV, Tamara  
**AA** BOGOVIČ MATIJAŠIĆ, Bojana (supervisor)/MOHAR LORBEG, Petra (co-advisor)/JAMNIK, Polona (reviewer)  
**PP** SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
**PB** University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology  
**PY** 2016  
**TY** ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF LACTIC ACID BACTERIA AND BIFIDOBACTERIA FROM HUMAN COLOSTRUM AND MILK AGAINST MASTITIS-CAUSING BACTERIA  
**DT** M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Nutrition)  
**NO** XIII, 54 p., 17 tab., 13 fig., 1 ann., 73 ref.  
**LA** sl  
**AI** sl/en  
**AB** In our study we examined the bacterial isolates from the group of lactic acid bacteria and bifidobacteria obtained from human colostrum and milk in terms of antimicrobial activity against mastitis causing bacteria. We wanted to know to which species they belong to and what antimicrobial substances the strains that exhibit antimicrobial activity produce. The isolates from human colostrum and milk grown on selective medium for lactobacilli (Rogosa) and bifidobacteria (TOS with mupirocin). Using RAPD method we grouped them according to similarities. The representatives of various group were identified to species level by determining the sequence of the gene for the *16S rDNA*. and comparing the obtained nucleotide sequences with the data in the gene bank NCBI. For the analysis of antimicrobial activity we selected isolates belonging to the genus *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Bifidobacterium*. In addition, some the isolates from the collection of microorganisms stored at the Institute of dairy science and probiotics were included. All together we examined the antimicrobial activity of 25 bacterial strains of the genus *Lactobacillus*, 18 bacterial strains of the genus *Pediococcus* and 4 bacterial strains of the genus *Bifidobacterium*. Good antimicrobial activity against indicator bacteria showed representatives of the species *L. gasseri*, *L. salivarius*, *L. casei* or *L. paracasei* and *B. breve*. The main antimicrobial activity factor was the formation of organic acids. In some bacteria we also found the excretion of other antimicrobials, probably bacteriocins or hydrogen peroxide. The highest antimicrobial activity was shown against indicator strains *Staph. epidermidis* and *S. aureus* which are the most common cause of lactational mastitis. The tested bacterial isolates could represent a good alternative for antibiotic treatment of lactational mastitis due to their antimicrobial activity, human origin and adaptation to mucosal and dairy substrates.

## KAZALO VSEBINE

|                                                                                   |             |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>                                  | <b>III</b>  |
| <b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</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>KAZALO PRILOG .....</b>                                                        | <b>XI</b>   |
| <b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>                                                 | <b>XII</b>  |
| <br>                                                                              |             |
| <b>1 UVOD .....</b>                                                               | <b>1</b>    |
| 1.1 OPREDELITEV PROBLEMA .....                                                    | 1           |
| 1.2 CILJI RAZISKOVANJA .....                                                      | 1           |
| 1.3 DELOVNE HIPOTEZE .....                                                        | 1           |
| <b>2 PREGLED OBJAV .....</b>                                                      | <b>2</b>    |
| 2.1 MLEČNA ŽLEZA .....                                                            | 2           |
| 2.1.1 Struktura mlečne žleze .....                                                | 2           |
| 2.1.2 Razvoj mlečne žleze .....                                                   | 3           |
| 2.1.3 Laktogeneza .....                                                           | 3           |
| 2.2 MATERINO MLEKO .....                                                          | 4           |
| 2.3 BAKTERIJE V HUMANEM MLEKU .....                                               | 4           |
| 2.3.1 Rod <i>Staphylococcus</i> .....                                             | 4           |
| 2.3.2 Mlečnokislinske bakterije.....                                              | 5           |
| 2.3.3 Rod <i>Bifidobacterium</i> .....                                            | 5           |
| 2.3.4 Rod <i>Propionibacterium</i> .....                                          | 6           |
| 2.4 PROTIMIKROBNA AKTIVNOST BAKTERIJ HUMANEGA MLEKA .....                         | 6           |
| 2.4.1 Organske kisline.....                                                       | 6           |
| 2.4.2 Vodikov peroksid .....                                                      | 6           |
| 2.4.3 Bakteriocini.....                                                           | 6           |
| 2.5 BAKTERIJSKA KOLONIZACIJA DOJENČKOVEGA ČREVESJA.....                           | 7           |
| 2.5.1 Vpliv bakterij iz humanega mleka na črevesje dojenčka .....                 | 7           |
| 2.6 BAKTERIJSKA KOLONIZACIJA MLEČNE ŽLEZE .....                                   | 8           |
| 2.6.1 Prehod bakterij v mlečno žlezo po endogeni poti (črevesno-mlečna pot) ..... | 9           |
| 2.7 MASTITIS .....                                                                | 11          |
| 2.7.1 Vzroki za pojav mastitisa .....                                             | 12          |
| 2.7.2 Kategorizacija mastitisa .....                                              | 12          |
| 2.7.3 Zdravljenje mastitisa .....                                                 | 13          |
| <b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>                                                | <b>15</b>   |
| 3.1 NAČRT POSKUSA .....                                                           | 15          |
| 3.2 MATERIALI.....                                                                | 17          |
| 3.2.1 Laboratorijska oprema.....                                                  | 17          |
| 3.2.2 Reagenti.....                                                               | 17          |
| 3.2.2.1 Ringerjeva raztopina .....                                                | 17          |
| 3.2.2.2 Reagenti za RAPD in PCR.....                                              | 17          |
| 3.2.2.3 Reagenti in encimi za osamitev DNA.....                                   | 18          |
| 3.2.2.4 Reagenti za izvedbo elektroforeze v agaroznem gelu.....                   | 18          |
| 3.2.2.5 Reagenti za prečiščevanje PCR pomnožkov.....                              | 18          |

|               |                                                                                                           |           |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2.2.6       | Encimi .....                                                                                              | 19        |
| <b>3.2.3</b>  | <b>Gojišča.....</b>                                                                                       | <b>19</b> |
| 3.2.3.1       | Gojišče Rogosa .....                                                                                      | 19        |
| 3.2.3.2       | Gojišče TOS z mupirocinom.....                                                                            | 19        |
| 3.2.3.3       | Gojišče DE MAN-ROGOSA-SHARPE (MRS) .....                                                                  | 20        |
| 3.2.3.4       | Modificirano gojišče MRS.....                                                                             | 20        |
| 3.2.3.5       | Gojišče M17 .....                                                                                         | 20        |
| 3.2.3.6       | Poltrdno gojišče M17 .....                                                                                | 20        |
| 3.2.3.7       | Tekoče gojišče MRS .....                                                                                  | 20        |
| 3.2.3.8       | Tekoče gojišče M17 .....                                                                                  | 20        |
| <b>3.2.4</b>  | <b>Vzorci za analizo .....</b>                                                                            | <b>21</b> |
| <b>3.2.5</b>  | <b>Bakterijski sevi .....</b>                                                                             | <b>21</b> |
| 3.2.5.1       | Indikatorski sevi .....                                                                                   | 21        |
| 3.2.5.2       | Izolati iz zbirke mikroorganizmov .....                                                                   | 22        |
| 3.3           | METODE .....                                                                                              | 23        |
| <b>3.3.1</b>  | <b>Oživitve zamrznjenih izolatov mlečnokislinskih bakterij in bifidobakterij ..</b>                       | <b>23</b> |
| <b>3.3.2</b>  | <b>Morfološki pregled kolonij pod mikroskopom.....</b>                                                    | <b>23</b> |
| <b>3.3.3</b>  | <b>Osamitev DNA iz kolonij s toplotno obdelavo.....</b>                                                   | <b>23</b> |
| <b>3.3.4</b>  | <b>Metoda RAPD .....</b>                                                                                  | <b>23</b> |
| 3.3.4.1       | Izvedba RAPD .....                                                                                        | 24        |
| <b>3.3.5</b>  | <b>Agarozna gelska elektroforeza.....</b>                                                                 | <b>25</b> |
| <b>3.3.6</b>  | <b>Prečiščevanje izolatov in priprava čistih kultur sevov .....</b>                                       | <b>26</b> |
| <b>3.3.7</b>  | <b>Osamitev DNA iz čiste kulture.....</b>                                                                 | <b>26</b> |
| <b>3.3.8</b>  | <b>Identifikacija izbranih izolatov z ugotavljanjem zaporedja nukleotidov .....</b>                       | <b>26</b> |
| 3.3.8.1       | Izvedba PCR .....                                                                                         | 27        |
| 3.3.8.2       | Čiščenje pomnožkov PCR .....                                                                              | 27        |
| 3.3.8.3       | Sekvenciranje 16S rDNA in ugotavljanje vrste sevov .....                                                  | 28        |
| <b>3.3.9</b>  | <b>Ugotavljanje protimikrobne aktivnosti izbranih bakterijskih kultur (spot-test) .....</b>               | <b>28</b> |
| <b>3.3.10</b> | <b>Ugotavljanje protimikrobne aktivnosti brezceličnih supernatantov izbranih bakterijskih kultur.....</b> | <b>28</b> |
| <b>3.3.11</b> | <b>Ugotavljanje narave protimikrobne snovi.....</b>                                                       | <b>29</b> |
| <b>4</b>      | <b>REZULTATI.....</b>                                                                                     | <b>30</b> |
| 4.1           | IZOLACIJA IN IZBOR IZOLATOV .....                                                                         | 30        |
| 4.2           | PRIMERJAVA IZOLATOV Z RAPD .....                                                                          | 30        |
| 4.3           | IDENTIFIKACIJA IZBRANIH SEVOV NA OSNOVI NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA .....                                     | 32        |
| 4.4           | PROTIMIKROBNA AKTIVNOST IZBRANIH SEVOV .....                                                              | 35        |
| <b>4.4.1</b>  | <b>Protimikrobna aktivnost nevtraliziranih brezceličnih supernatantov testnih izolatov .....</b>          | <b>38</b> |
| <b>4.4.2</b>  | <b>Narava protimikrobne snovi.....</b>                                                                    | <b>40</b> |
| <b>5</b>      | <b>RAZPRAVA.....</b>                                                                                      | <b>42</b> |
| 5.1           | GOJITVENE METODE .....                                                                                    | 42        |
| 5.2           | IDENTIFIKACIJA BAKTERIJ .....                                                                             | 42        |
| 5.3           | PROTIMIKROBNA AKTIVNOST .....                                                                             | 43        |
| 5.4           | PROTIMIKROBNA UČINKOVINA .....                                                                            | 44        |
| <b>6</b>      | <b>SKLEPI.....</b>                                                                                        | <b>46</b> |

|          |                      |           |
|----------|----------------------|-----------|
| <b>7</b> | <b>POVZETEK.....</b> | <b>47</b> |
| <b>8</b> | <b>VIRI .....</b>    | <b>48</b> |
| ZAHVALA  |                      |           |
| PRILOGE  |                      |           |



## KAZALO PREGLEDNIC

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Preglednica 1: Klasifikacija zamašenega mlečnega voda, neinfekcijskega mastitisa in infekcijskega mastitisa glede na število levkocitov in bakterij v humanem mleku (WHO, 2000: 6) .....                                                                                                                              | 13 |
| Preglednica 2: Uporabljena laboratorijska oprema .....                                                                                                                                                                                                                                                                | 17 |
| Preglednica 3: Nukleotidno zaporedje uporabljenih začetnih oligonukleotidov .....                                                                                                                                                                                                                                     | 18 |
| Preglednica 4: Uporabljeni encimi za ugotavljanje proteinske narave protimikrobne učinkovine .....                                                                                                                                                                                                                    | 19 |
| Preglednica 5: Indikatorski sevi .....                                                                                                                                                                                                                                                                                | 22 |
| Preglednica 6: Izolati iz mikrobne zbirke Inštituta za mlekarstvo in probiotike, ki smo jih uporabili za ugotavljanje protimikrobne aktivnosti .....                                                                                                                                                                  | 22 |
| Preglednica 7: Sestava reakcijske mešanice za RAPD z začetnim oligonukleotidom M13 (DNA izolirana iz kolonij s toplotno obdelavo).....                                                                                                                                                                                | 24 |
| Preglednica 8: Sestava 20 µl reakcijske mešanice za RAPD z začetnim oligonukleotidom KGT 70-GC (DNA izolirana iz kolonij s toplotno obdelavo).....                                                                                                                                                                    | 24 |
| Preglednica 9: Sestava 20 µl reakcijske mešanice za RAPD z začetnim oligonukleotidom M13 (DNA osamljena z uporabo kompleta Wizard® Genomic DNA Purification Kit).....                                                                                                                                                 | 24 |
| Preglednica 10: Program za analizo RAPD z začetnim oligonukleotidom M13 .....                                                                                                                                                                                                                                         | 25 |
| Preglednica 11: Program za analizo RAPD z začetnim oligonukleotidom KGT 70-GC....                                                                                                                                                                                                                                     | 25 |
| Preglednica 12: Sestava 50 µl reakcijske mešanice za PCR z z. o. 27f in 1495R.....                                                                                                                                                                                                                                    | 27 |
| Preglednica 13: PCR program za pomnoževanje <i>16S rDNA</i> .....                                                                                                                                                                                                                                                     | 27 |
| Preglednica 14: Rezultati identifikacije izbranih sevov na osnovi sekvenciranja <i>16S rDNA</i> .....                                                                                                                                                                                                                 | 34 |
| Preglednica 15: Protimikrobna aktivnost izbranih bakterijskih izolatov iz kolostruma ali mleka proti indikatorskim sevom iz vrst <i>Staph. epidermidis</i> , <i>Staph. aureus</i> in <i>Staph. lugdunensis</i> .....                                                                                                  | 36 |
| Preglednica 16: Protimikrobna aktivnost izbranih bakterijskih izolatov iz kolostruma ali mleka proti indikatorskim sevom iz vrst <i>Staph. lugdunensis</i> , <i>S. mitis</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. parasanguinis</i> , <i>C. amycolatum</i> , <i>C. pseudodiphthericum</i> in <i>C. kroppenstedtii</i> ..... | 37 |

|                                                                                                                                                                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Preglednica 17: Protimikrobna aktivnost nevtraliziranih supernatantov testnih izolatov proti indikatorskim sevom <i>Staph. epidermidis</i> M36-01, <i>Staph. epidermidis</i> M53-01 in <i>S. salivarius</i> M84-01 ..... | 39 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

## KAZALO SLIK

|                                                                                                                                                                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Slika 1: Slika grozdasto oblikovanega žleznega režnja ali lobula, obdanega s pregradami opornega tkiva ali strome (McManaman in Neville, 2003: 3) .....                                                                                                         | 2  |
| Slika 2: Protivnetni mehanizmi probiotičnih bakterij v črevesju (Lara-Villoslada in sod., 2007: 98) .....                                                                                                                                                       | 7  |
| Slika 3: Potencialni viri bakterij, prisotnih v humanem kolostrumu in mleku (Fernández in sod., 2013: 4).....                                                                                                                                                   | 10 |
| Slika 4: Specifična interakcija med celicami <i>L. gasseri</i> , osamljenimi iz humanega mleka in dendritskimi celicami. Posneto s transmissijskim elektronskim mikroskopom (Fernández in sod., 2013: 5).....                                                   | 10 |
| Slika 5: Shematski prikaz poteka dela.....                                                                                                                                                                                                                      | 16 |
| Slika 6: Vzorci RAPD z. o. M13 in KGT 70-GC .....                                                                                                                                                                                                               | 31 |
| Slika 7: Vzorci RAPD z z. o. M13.....                                                                                                                                                                                                                           | 32 |
| Slika 8: Pomnožki PCR s tarčno regijo <i>16S rDNA</i> .....                                                                                                                                                                                                     | 33 |
| Slika 9: Cona inhibicije pri delovanju bakterijskega izolata <i>L. gasseri</i> T11 proti indikatorskemu sevu <i>Staph. epidermidis</i> M58-01 .....                                                                                                             | 38 |
| Slika 10: Cona inhibicije pri delovanju bakterijskega izolata <i>B. breve</i> T453 proti indikatorskemu sevu <i>Staph. aureus</i> M44-08.....                                                                                                                   | 38 |
| Slika 11: Cone inhibicij nevtraliziranih supernatantov bakterijskih izolatov <i>L. casei/L. paracasei</i> U258, <i>L. gasseri</i> T11, <i>L. gasseri</i> T12, <i>L. gasseri</i> T139 proti indikatorskemu sevu <i>S. salivarius</i> M84-01 (I8) .....           | 39 |
| Slika 12: Cona inhibicije nevtraliziranega supernatanta testnega izolata <i>B. breve</i> T453 proti indikatorskemu sevu <i>Staph. epidermidis</i> M36-01 (I2).....                                                                                              | 40 |
| Slika 13: Cona inhibicije pri ugotavljanju protimikrobne aktivnosti supernatantov izolata <i>B. breve</i> T453 predhodno tretiranih z encimi pronaza K, pepsin, tripsin, pronaza E in katalaza proti indikatorskemu sevu <i>S. salivarius</i> M84-01 (I8) ..... | 41 |

## KAZALO PRILOG

Priloga A: Rezultati analiz RAPD

Priloga A1: Vzorci RAPD z z. o. M13 in KGT 70-GC

Priloga A2: Vzorci RAPD z z. o. M13

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

| Okrajšava ali simbol | Pomen                                                                                                 |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 16S                  | mala ribosomska podenota                                                                              |
| <i>A.</i>            | <i>Actinomyces</i>                                                                                    |
| <i>B.</i>            | <i>Bifidobacterium</i>                                                                                |
| BLAST                | programsko orodje (angl. Basic Local Alignment Search Tool)                                           |
| bp                   | bazni par                                                                                             |
| <i>C.</i>            | <i>Corynebacterium</i>                                                                                |
| DC                   | dendritske celice                                                                                     |
| DNA                  | deoksiribonukleinska kislina                                                                          |
| dNTP                 | deoksinukleotid trifosfat (mešanica nukleotidov)                                                      |
| <i>E.</i>            | <i>Enterococcus</i>                                                                                   |
| EDTA                 | etilendiamintetraocetna kislina                                                                       |
| EFSA                 | Evropska agencija za varnost hrane (angl. European Food Safety Authority)                             |
| GALT                 | črevesno limfoidno tkivo (angl. gut-associated lymphoid tissue)                                       |
| GRAS                 | splošno priznan kot varen (angl. Generally Recognized As Safe)                                        |
| kb                   | kilobazni par                                                                                         |
| KE                   | kolonijska enota (angl. colony forming unit)                                                          |
| KE/ml                | kolonijske enote v mililitru                                                                          |
| <i>L.</i>            | <i>Lactobacillus</i>                                                                                  |
| MilliQ               | deionizirana, mikrofiltrirana in avtoklavirana voda                                                   |
| MRS                  | gojišče »de Man, Rogosa, Sharpe«                                                                      |
| NCBI                 | Nacionalni center za biotehnološke informacije (angl. National Center for Biotechnology Informations) |
| obr./min             | število obratov v eni minuti                                                                          |
| <i>Ped.</i>          | <i>Pediococcus</i>                                                                                    |

|               |                                                                               |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| PBMC          | mononuklearne celice periferne krvi (angl. peripheral blood mononuclear cell) |
| PBS           | fosfatni pufer z NaCl (angl. phosphate buffered saline)                       |
| PC            | plazmatka                                                                     |
| PCR           | verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)               |
| QPS           | kvalificirana domneva o varnosti (angl. Qualified Presumption of Safety)      |
| RAPD          | naključno pomnožena polimorfna DNA (angl. randomly amplified polymorphic DNA) |
| rDNA          | ribosomska deoksiribonukleinska kislina                                       |
| <i>S.</i>     | <i>Streptococcus</i>                                                          |
| <i>Staph.</i> | <i>Staphylococcus</i>                                                         |
| TAE           | TRIS acetatni pufer                                                           |
| TOS z mup     | TOS z mupirocinom                                                             |
| U             | enota (angl. unit)                                                            |
| UV            | ultravijolična svetloba                                                       |
| WHO           | Svetovna zdravstvena organizacija (angl. World Health Organization)           |
| z.o.          | začetni oligonukleotid                                                        |

## 1 UVOD

### 1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Materino mleko predstavlja enega izmed najpomembnejših virov bakterij za razvoj črevesja dojenčka. Črevesne bakterije omogočajo razvoj imunskega sistema in s tem učinkovito obrambo pred patogenimi mikroorganizmi. Mikrobiota humanega mleka pa ni pomembna le za zdravje otroka, ampak ščiti tudi matere pred mastitisom. Mastitis je vnetje mlečne žleze, ki je posledica porušenia mikrobiote v mlečni žlezi. Uporaba probiotikov predstavlja alternativo zdravljenju mastitisa z antibiotiki, ki še dodatno posegajo v normalno mikrobioto mlečne žleze. Probiotike, ki delujejo proti povzročiteljem mastitisa, je najbolje iskati v mleku zdravih mater, saj so te bakterije že prilagojene na okolje, v katerem bodo delovale. Pretekle raziskave so pokazale, da posamezni izolati mlečnokislinskih bakterij, predvsem iz rodu laktobacilov, kažejo protimikrobno aktivnost proti povzročiteljem mastitisa. Za dva seva laktobacilov, osamljena iz humanega mleka (*Lactobacillus fermentum* CECT 5716 in *Lactobacillus salivarius* CECT 5713), so dokazali učinkovitost za zdravljenje infekcijskega mastitisa med dojenjem tudi v klinični študiji, v kateri so matere uživale bakterije v liofilizirani obliki. Smiselno je iskati nove izolate iz humanega mleka, ki bi bili uporabni za prehranska dopolnila ali zdravila, namenjena doječim materam, pri preventivi ali pri zdravljenju mastitičnega obolenja.

### 1.2 CILJI RAZISKOVANJA

Namen magistrskega dela je bil poiskati seve s protimikrobnim delovanjem proti najpogostejšim povzročiteljem mastitisa, kot so bakterije iz rodov *Staphylococcus*, *Streptococcus* in *Corynebacterium* med izolati mlečnokislinskih bakterij in bifidobakterij iz humanega kolostruma in mleka.

### 1.3 DELOVNE HIPOTEZE

V magistrskem delu smo zastavili naslednje hipoteze:

- V vzorcih humanega kolostruma in mleka so prisotne mlečnokislinske bakterije in bifidobakterije.
- Nekatere mlečnokislinske bakterije in bifidobakterije iz mleka in kolostruma so protimikrobno aktivne proti posameznim povzročiteljem mastitisa.
- Poglavitni dejavniki protimikrobne aktivnosti mlečnokislinskih bakterij in bifidobakterij iz humanega mleka proti povzročiteljem mastitisa (*Staphylococcus*, *Streptococcus* in *Corynebacterium*) so organske kisline in nizka vrednost pH.
- Bakteriocini mlečnokislinskih bakterij in bifidobakterij, osamljenih iz humanega mleka, prispevajo k njihovi protimikrobni aktivnosti proti povzročiteljem mastitisa.

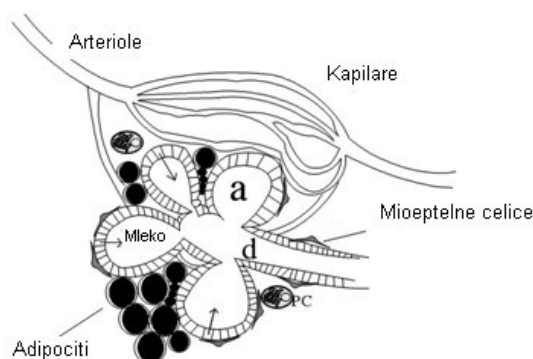
## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 MLEČNA ŽLEZA

Mlečna žleza naj bi se razvila pred 300 milijoni let, najverjetneje iz apokrine žleze znojnice (Ofstedal, 2002). Mlečna žleza je parna žleza, ki se skupaj s kožo imenuje dojka in je značilna za razred sesalcev (Mušič in sod., 2004). Je kompleksno, visoko specializirano tkivo, ki se je razvilo zaradi zagotovitve hranil svojemu potomcu. Mleko se po sestavi razlikuje med vrstami in je vedno prilagojeno potrebam potomca (Russo J. in Russo I., 2004). Posebnost mlečne žleze je v njenem razvoju. Za razliko od večine organov, ki se razvijajo do razmeroma zrele oblike že v fazi razvoja zarodka, se mlečna žleza do svoje popolne oblike razvije šele v času nosečnosti in laktacije (Riordan, 2005). V tej fazi se 25 % dnevnega energijskega vnosa matere porabi za sintezo mleka (Hartmann, 2007). Materino mleko ima popolno sestavo, ki nudi dojenčku optimalno hranilno, zaščitno in razvojno podporo. Svetovna zdravstvena organizacija (WHO) zato priporoča izključno dojenje vsaj do šestega meseca starosti (WHO, 2000).

#### 2.1.1 Struktura mlečne žleze

Dojka je parni organ, ki leži na veliki prsni mišici oziroma na njeni vezivni ovojnici (Takač, 1996). Ženska dojka je žleza z zunanjim izločanjem, v kateri se po porodu tvori mleko. Žlezni sistem je sestavljen iz žleznih režnjev ali lobulov. Posamezen žlezni režanj je sestavljen iz žleznih mešičkov ali alveol. Žlezni mešiček je osnovna funkcionalna enota mlečne žleze, v kateri nastaja mleko. Notranjo plast mešička (lumen) gradi enojni sloj epitelnih celic, ki predstavljajo sekretorno tkivo. Zunanjo plast (bazalni del) pa gradijo mioepitelne celice, ki s krčenjem omogočajo izločanje mleka (Riordan, 2005). Iz žleznih režnjev do prsne bradavice vodijo mlečni vodi ali duktusi, ki se pred vstopom v bradavico razširijo v sinuse (Mušič in sod., 2004). Žlezno tkivo je obdano s pregradami opornega tkiva ali strome, ki ga sestavljata vezivo in maščevje in je bistvenega pomena za zunanjo obliko dojke. V stromi potekajo tudi žile, živci in sistem limfnih žil, ki vodijo do bezgavk, ki se nahajajo v bližini prsi. Bezgavke prestrezajo škodljive snovi, ki bi lahko bile prisotne v limfnem sistemu (Riordan, 2005). Nekatere novejšje raziskave pa dokazujejo, da naj bi v omejenem obsegu tudi koristne bakterije iz lumna črevesja prehajale po limfi do mlečne žleze in tako soustvarjale mikrobioto mlečne žleze (Rescigno in sod., 2001; Schirbel in sod., 2013).



Slika 1: Slika grozdasto oblikovanega žleznega režnja ali lobula, obdanega s pregradami opornega tkiva ali strome, a) žlezni mešiček ali alveola d) mlečni vod ali duktus, plazmatka (PC) (McManaman in Neville, 2003: 3)



### 2.1.2 Razvoj mlečne žleze

Mlečna žleza prehaja preko več razvojnih stopenj in sprememb. Razvoj dojke se začne že z razvojem zarodka v času oblikovanja prsnega koša. Temu sledi le minimalen razvoj v otroški fazi in nato pri ženskah hiter razvoj v času spolne zrelosti. V puberteti se začne rast in razvoj sistema izvodil dojke, ki se podaljšajo in razvejajo. Hkrati se bradavica zadebeli in v dojkah se začne kopičiti maščevje. V času laktacije pa mlečna žleza ne doseže samo vrhunca v svojem razvoju, ampak se tudi preoblikuje in se tako razvije v delujoč organ. Popoln razvoj mlečne žleze je ključnega pomena za zagotovitev primerne količine in sestave mleka za rast, zaščito in razvoj otroka. Razvoj in spreminjanje mlečne žleze uravnavajo hormoni (Russo J. in Russo I., 2004).

Razvoj mlečne žleze je direktno odvisen od hormona estrogena, progesterona in prolaktina (Riordan, 2005). Zaradi povišane vrednosti hormona estrogena in progesterona, manjše spremembe mlečne žleze nastopijo pri vsakem menstrualnem ciklu, vendar je nosečnost in predlaktacijski cikel ključen za popolno spremembo mlečne žleze. Progesteron je, tako kot estrogen, v maščobi topen hormon, ki ga proizvajajo jajčniki (Macias in Hinck, 2013). Estrogen vpliva na rast in širjenje sistema mlečnih vodov, v drugem trimesečju pa pod vplivom hormona progesterona prevlada rast žlezničnih režnjev, ki omogočijo podaljšanje in razvejanje mlečnih vodov (Riordan, 2005). Prolaktin deluje skupaj s progesteronom na razvoj mlečne žleze v času laktacije in uravnava sintezo mleka. Prolaktin deluje posredno preko regulacije sinteze progesterona v jajčnikih in neposredno na epitelne celice mlečne žleze. Prolaktin je majhen polipeptidni hormon, ki se sintetizira v hipofizi, kot tudi v epitelnem delu mlečne žleze.

### 2.1.3 Laktogeneza

Laktogeneza zajema prehod iz nosečnosti v laktacijo. V začetni fazi laktogeneze se velikost dojk poveča zaradi diferenciacije epitelnih celic v sekretorne celice. V kasnejši fazi laktogeneze koncentracija progesterona in estrogena pade. Začetek laktacije sproži hiter padec izločanja progesterona in zvišanje prolaktina ter zaradi izsesavanja mleka iz dojke izločanje oksitocina (Riordan, 2005). Oksitocin, ki povzroči kontrakcijo mioepitelnih celic, se iz nevrohipofize izloča kot odziv na sesanje. Mioepitelne celice obdajajo vsako alveolo in so nujne za izločanje mleka iz dojke. Oksitocin se iz nevrohipofize izloča v krvni obtok v pulzirajočih valovih. V mlečni žlezi deluje na receptorje mioepitelnih celic, kar povzroči kontrakcijo in izločanje mleka iz alveole v mlečne vode, kjer mleko postane prek bradavične odprtine dostopno dojenčku. (Riordan, 2005).

Stopnja tvorbe mleka naj bi bila po vsakem dojenju med 17 ml/uro in 33/ml na uro (Arthur in sod., 1989). Sinteza mleka je odvisna od količine mleka v mlečni žlezi. Sekretorne celice izkoristijo vodo, aminokislino, maščobo, vitamine, minerale in mnoge druge sestavine iz materinega krvnega obtoka za tvorbo mleka. Po prvem refleksu sproščanja in odtekanja mleka, raven hormona prolaktina upade, zaloge mleka v dojki pa postanejo odvisne od odstranitve in ponovne sinteze mleka (Prentice in sod., 1988).

Znanje o anatomiji dojke in fiziologiji laktacije je nujno za razumevanje pomena dojenja, kot tudi težav in zapletov, ki so lahko posledica nepravilnega dojenja.

## 2.2 MATERINO MLEKO

Materino mleko je kompleksna biološka tekočina, ki je prilagojena vsakemu potomcu glede na njegove potrebe (Morrow in Rangel, 2004). Je najboljši vir hranilnih snovi za hitro rastoč organizem, poučuje otrokov imunski sistem in ga varuje pred patogenimi mikroorganizmi. Vzrok teh učinkov je sinergistično delovanje mnogih bioaktivnih molekul prisotnih v kolostrumu in mleku. Med njimi so imunokompetentne celice, imunoglobulini, maščobne kisline, oligosaharidi, lizocim, laktoferin in drugi glikoproteini ter protimikrobni peptidi, ki delujejo na patogene bakterije individualno, aditivno ali sinergistično (Newburg, 2005).

Včasih so verjeli, da je materino mleko sterilno. Danes vemo, da mleko predstavlja enega izmed najpomembnejših virov bakterij za razvoj črevesja dojenčka. Kolostrum in mleko sta konstanten vir komezalnih in potencialno probiotičnih bakterij, ki kolonizirajo prebavni trakt dojenčka (Heikkila in Saris, 2003). Ocenjujejo, da otrok s povprečno 800 ml popitega mleka na dan zaužije med  $10^5$  do  $10^7$  komezalnih bakterij (Martin in sod., 2003). Bakterije iz materinega mleka so našli tudi v dojenčkovem blatu, kar pomeni, da mikroba populacija dojenčkovega blata do neke mere odraža mikroba populacijo materinega mleka (Heikkila in Saris, 2003). Oligosaharidi so prav tako pomemben dejavnik pri razvoju dojenčkove mikrobiote. Oligosaharidi v zgodnji fazi laktacije predstavljajo tretjo količinsko najmočnejše zastopano komponento mleka. Človek večine oligosaharidov z lastnimi encimi ne more razgraditi, kar dokazuje, da so se razvili kot naravni prebiotiki, ki definirajo dojenčkovo mikrobioto s tem, da selektivno hranijo določene vrste mikroorganizmov (Han in sod., 2012).

## 2.3 BAKTERIJE V HUMANEM MLEKU

Znanje o mikrobiološki sestavi humanega mleka izvira tudi iz proučevanja patogenih bakterij, ki povzročajo vnetje dojke in vnetja pri otrocih. Prevladujoče bakterije v mleku so predstavniki stafilokokov, streptokokov, mlečnokislinskih bakterij, bifidobakterij, propionskih bakterij in njim sorodnih po Gramu pozitivnih bakterij (Fernández in sod., 2013). Dejstvo, da so tako različne bakterije prisotne v mleku žensk po vsem svetu, dokazuje, da je populacija bakterij v mleku do neke mere stalna (Heikkila in Saris, 2003).

### 2.3.1 Rod *Staphylococcus*

Bakterije rodu *Staphylococcus* so po Gramu pozitivni, negibljivi in nesporogeni aerobi ali fakultativni anaerobni koki, ki so urejeni v grozde. Stafilokoki za človeka ponavadi niso nevarni in so del normalne bakterijske flore kože in sluznice. *Staph. epidermidis* pretežno naseljuje človeško kožo, *Staph. aureus* pa predvsem nosno sluznico, kožo in žrelo. Nekatere vrste stafilokokov pa lahko povzročijo resne bolezni. S toksini, ki jih izločajo, poškodujejo prebavni trakt, kar lahko privede do bruhanja in driske. *Staphylococcus aureus* je najpogostejši vzrok stafilokoknih okužb. Rezistenca na antibiotik je med stafilokoki pogosta (Madigan in sod., 2015).

### 2.3.2 Mlečnokislinske bakterije

Mlečnokislinske bakterije so skupina raznolikih in uporabnih bakterij, ki jih ne združuje striktna taksonomska uvrstitev, ampak skupne lastnosti. Bistvena skupna značilnost je proizvodnja mlečne kisline in s tem fermentacija živil, kar uvršča mlečnokislinske bakterije v skupino GRAS (angl. Generally Recognized as Safe). Mlečnokislinske bakterije uvrščamo v skupino po Gramu pozitivnih, mikroaerofilnih in anaerobnih bakterij, pri čemer večina ni striktno občutljiva na kisik (Collins in sod., 2010).

Bakterije rodu *Lactobacillus* so najpomembnejša in največja skupina mlečnokislinskih bakterij, v katero uvrščamo po Gramu pozitivne bakterije, ki so po obliki dolge ali kratke, negibljive in nesporogene palčke. Laktobacili naseljujejo prebavni trakt in urogenitalni trakt človeka in živali (Yuan in Salminen, 2009). Naseljujejo pa tudi hranilno bogata okolja, kot so mleko in mlečni izdelki (Barrangou in sod., 2011). Število mikroorganizmov je v želodcu in zgornjem delu tankega črevesja, zaradi nizkega pH in žolčnih soli ter hitrega pretoka prebave, relativno majhno. Število se povečuje vzdolž prebavnega trakta, od  $10^3$  mikroorganizmov na mililiter vsebine v dvanajstniku,  $10^8$  mikroorganizmov na gram vsebine vitega črevesja in do  $10^{12}$  mikroorganizmov na gram vsebine v debelem črevesju (O'Hara in Shanahan, 2006). Optimalna temperatura rasti laktobacilov je med 30 in 40 °C, nekateri sevi pa rastejo tudi pod 5 °C in nad 53 °C. Optimalna vrednost pH je med 3,0 in 7,0 (Barrangou in sod., 2011).

Bakterije rodu *Streptococcus* so po Gramu pozitivni koki, ki tvorijo dolge verižice. Streptokoki se nahajajo v nosno-žrelnem prostoru ljudi, v blatu sesalcev, naselijo pa se tudi na kožne rane in opekline. Uvrščamo jih v skupino mlečnokislinskih bakterij. So manj odporni na kisline kot laktobacili, zato večina ne preživi postopka fermentacije. Skupina streptokokov je skupina zelo raznolikih vrst bakterij. Nekatere vrste streptokokov so za človeka nevarne in povzročajo bolezni. Te so verjetno najpogostejši povzročitelji bakterijskih okužb (Madigan in sod., 2015).

### 2.3.3 Rod *Bifidobacterium*

Bifidobakterije so skupina po Gramu pozitivnih bakterij, ki sobivajo v prebavnem traktu ljudi in živali s številnimi drugimi mikroorganizmi, ki so pretežno striktni anaerobi (Schell in sod., 2002). Bifidobakterije je prvič osamil Henry Tissier leta 1900 iz dojenčkovega blata in jih poimenoval *Bacillus bifidus*. *B. breve* in *B. infantis* sta specifična za blato dojenčkov, medtem ko so *B. bifidum*, *B. catenulatum*, *B. longum* in *B. pseudocatenulatum* osamili tako iz blata dojenčkov kot odraslih, *B. adolescentis* pa izključno iz blata odraslih. Optimalna temperatura rasti bifidobakterij je med 37 do 41 °C, tistih, ki naseljujejo človeka, pa med 36 in 38 °C. Optimalna vrednost pH za rast je med 6,5 in 7,0. Bifidobakterije so dobro odporne proti kislinam. Večino bifidobakterij uvrščamo v skupino obligatornih anaerobov, sicer pa je občutljivost za kisik vrstno specifična (Biavati in sod., 2000).

### 2.3.4 Rod *Propionibacterium*

Propionske bakterije so skupina po Gramu pozitivnih bakterij, ki fermentirajo ogljikove hidrate do propionske kisline. Po obliki so propionske bakterije palčke in so večinoma anaerobne bakterije. Glede na nahajališče ločimo dve skupini - mlečne propionske bakterije in kožne propionske bakterije. Kožne propionske bakterije so na koži in v črevesju človeka. Za večino ljudi propionske bakterije ne predstavljajo večjih težav (Madigan in sod., 2015).

## 2.4 PROTIMIKROBNA AKTIVNOST BAKTERIJ HUMANEGA MLEKA

Komenzalne bakterije tvorijo različne sestavine, s katerimi varujejo človeka pred virusnimi in bakterijskimi vnetji. Študije *in vitro* dokazujejo, da mnogi sevi tvorijo protimikrobne snovi, kot so organske kisline, vodikov peroksid in bakteriocini. Proizvodnja organskih kislin, kakor je mlečna kislina, zniža vrednost pH v črevesju in s tem zavira rast patogenih bakterij. Vodikov peroksid pa učinkuje na bakterijsko celično steno in s tem uniči bakterijo. Posamezen sev lahko deluje na več različnih patogenih bakterij z različnimi mehanizmi delovanja (Rolfe, 2000).

### 2.4.1 Organske kisline

Najbolj pogosta in najbolj preučena protimikrobna aktivnost komenzalnih bakterij je tvorba mlečne in očetne kisline. Nedisociirane organske kisline lahko preidejo preko celične membrane patogenih bakterij. Zaradi višje pH vrednosti v citoplazmi, organske kisline disociirajo in sprostijo protone. pH vrednost citoplazme se posledično zniža, kar povzroči moteno delovanje membranskega potenciala in s tem oslajeno delovanje osnovnih metabolnih funkcij patogenih bakterij (Šušković in sod., 2010).

### 2.4.2 Vodikov peroksid

Nekatere komenzalne bakterije tvorijo vodikov peroksid. Njegovo delovanje temelji predvsem na močnem oksidativnem učinku na bakterijsko celično steno in celične proteine. Iz vodikovega peroksida se lahko v mleku tvorijo različni oksidirani produkti, ki so toksični za različne patogene bakterije (Šušković in sod., 2010).

### 2.4.3 Bakteriocini

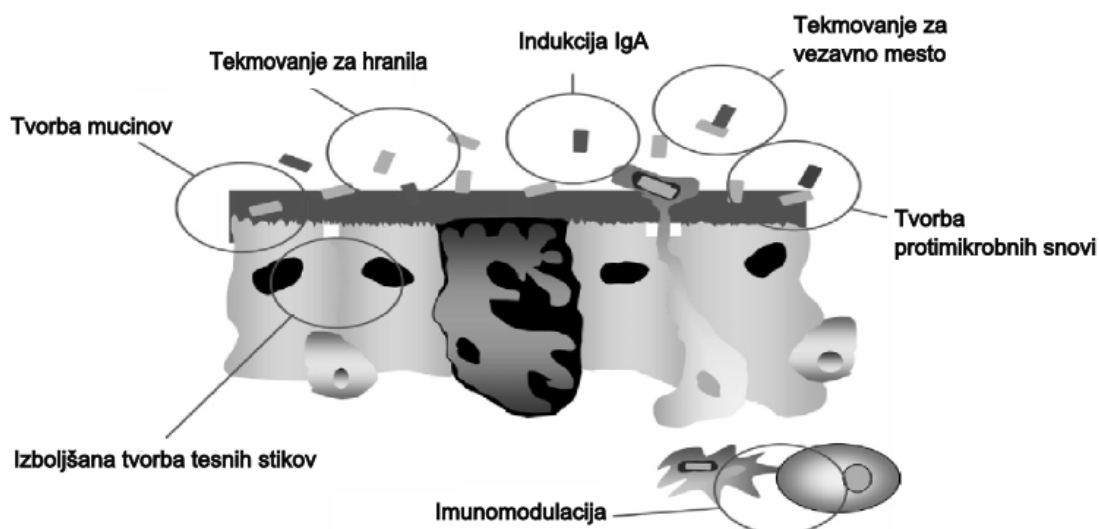
Baktericini so na ribosomih sintetizirani protimikrobni peptidi, ki delujejo proti drugim bakterijam. Delovanje bakteriocinov je pogosto usmerjeno proti sorodnim bakterijam, ker se na ta način bakterije borijo za ista hranila v določenem okolju. Mlečnokislinske bakterije tvorijo bakteriocine proti drugim po Gramu pozitivnim bakterijam (Collins in sod., 2010). Mnogi bakteriocini imajo ozek spekter delovanja, veliko moč in hitrost uničevanja bakterij, zato predstavljajo morebitno alternativo zdravljenju z antibiotiki (Hassan in sod., 2012). To velja tudi za mastitis, kjer je zaželeno, da se izognemo uporabi antibiotikov, saj ti zmanjšajo tudi število koristnih bakterij v mleku.

## 2.5 BAKTERIJSKA KOLONIZACIJA DOJENČKOVEGA ČREVESJA

Naselitev črevesja je kompleksen proces, ki se začne že pred porodom in poteka več let pod vplivom različnih zunanjih in notranjih dejavnikov. Črevesje zarodka je praktično sterilno, večinoma ga obliva le amniotska tekočina (Galdeano in sod., 2010). Nekaj komenzalnih bakterij pa vendarle lahko preide preko placente in tako začne prvotno kolonizacijo črevesja že pred porodom. Poskus na brejih miših, ki so jim peroralno dali označen sev *Enterococcus faecium*, je pokazal prenos majhnega števila celic seva do zarodkovnega črevesja, v večji meri pa do mlečne žleze. Kljub temu da je število bakterij v placenti, amniotski tekočini, popkovnici in mekoniju majhno, je to dokaz, da naselitev bakterij poteka že pred rojstvom (Martin in sod., 2003). Glavna kolonizacija dojenčkovega črevesja pa vendarle nastopi med in po porodu. Že nekaj ur po porodu je možno ugotoviti bakterije v blatu (Galdeano in sod., 2010). Vir kolonizacije dojenčkovega črevesja z bakterijami so predvsem materina vaginalna in črevesna mikrobiota, način hranjenja in okolje. Vzorec in nivo izpostavljenosti dojenčka tem dejavnikom pomembno vpliva na sestavo otrokove črevesne mikrobiote (Guaraldi in Salvatori, 2012).

### 2.5.1 Vpliv bakterij iz humanega mleka na črevesje dojenčka

Komenzalne bakterije iz humanega mleka imajo lahko na dojenčkovo črevesje različne pozitivne učinke. Predvsem lahko zmanjšajo pogostost in resnost infekcij, kar poteka preko različnih mehanizmov, kot so kompetitivna izključitev, izločanje protimikrobnih snovi in/ali izboljšanje črevesne funkcije s povečano produkcijo mucinov in zmanjšanjem črevesne permeabilnosti. Zelo pomemben mehanizem protimikrobnega delovanja je tudi tekmovanje za hranila in za vezavna mesta (Martin in sod., 2005). Zmožnost vezave podaljša čas zadrževanja zaužitih bakterij v prebavnem traktu in s tem prepreči vezavo patogenih bakterij, hkrati pa tudi omogoča stik s celicami imunskega sistema (Slika 2) (Huys in sod., 2013).



Slika 2: Protivnetni mehanizmi probiotičnih bakterij v črevesju (Lara-Villoslada in sod., 2007: 98)

Pred kratkim so dokazali, da uživanje mlečne formule, obogatene z bakterijami vrste *L. fermentum*, zmanjša resnost infekcij prebavnega trakta in zgornjih dihal. V študiji so Maldonado in sod. (2012) dokazali, da uživanje bakterijskega seva *L. fermentum* CECT5716 v času šestih mesecev vpliva na 46 % zmanjšanje pogostosti gastrointestinalnih infekcij, 27 % zmanjšanje respiratornih infekcij in 30 % zmanjšanje vseh infekcij. *L. fermentum* CECT5716 je naravno prisoten v humanem mleku, je dokazano varen sev, ne povzroča vnetij in ima imunomodulatorne lastnosti. Prav tako so dokazali, da je lahko uživanje seva *L. fermentum* CECT5716 v obliki kapsul povezano z njegovo kolonizacijo mlečne žleze (Olivares in sod., 2006). Več študij omenja tudi povezavo med pozitivnim učinkom uživanja bakterij, osamljenih iz humanega mleka, in zmanjšanjem pogostosti alergij. Prisotnost bakterijskega seva *Lactobacillus rhamnosus* GG naj bi tako zmanjšala pojavnost in resnost atopijskega dermatitisa pri otrocih, bakterijski sev *L. gasseri* CECT5714 pa naj bi zmanjšal pogostost respiratornih alergij pri odraslih (Lara-Villoslada in sod., 2007). *L. rhamnosus* GG je en izmed najbolj proučenih probiotičnih sevov, ki deluje na več različnih bolezenskih stanj. Vendt in sod. (2006) so v klinični študiji opisali povezavo med uporabo mlečnih formul z dodanimi bakterijami *L. rhamnosus* GG in višjim prirastom dojenčkov. Izključno dojenje v prvih mesecih dojenčkovega življenja je povezano z zmanjšano stopnjo incidence astme in atopijskega dermatitisa v otroški dobi tudi pri otrocih, ki imajo atopijske bolezni v družini. To trditev podpira dejstvo, da so bakterije v kolostrumu in mleku matere eden izmed prvih in najpomembnejših dejavnikov pri zorenju črevesnega limfoidnega tkiva (angl. gut-associated lymphoid tissue, GALT) otroka in da vzdržujejo ravnotežje med nastajanjem vnetnih in protivnetnih dejavnikov (Gdalevich in sod., 2001).

Znano je, da imajo dojeni otroci drugačno črevesno mikrobioto kot tisti, ki so hranjeni z mlečnimi formulami. Materino mleko je bogato s prebiotičnimi oligosaharidi in komezalnimi mikroorganizmi, ki jih mlečne formule nimajo, razen če so obogatene s prebiotiki in probiotiki. Kljub temu, da še vedno ni dovolj klinično potrjenih dokazov glede koristnega učinka probiotikov na zdravje dojenčka, je njihovo dodajanje mlečnim formulam dovoljeno, ker so naravno prisotni v materinem mleku in ker je tveganje za stranske učinke zelo majhno (Vandenplas in sod., 2013). Bakterije, ki prevladujejo pri otrocih, ki so vaginalno rojeni in izključno dojeni, so iz skupine koristnih črevesnih bakterij, med katerimi prevladuje rod bifidobakterij. Pri teh otrocih so opazili tudi manjšo kolonizacijo črevesja s patogenimi vrstami *Clostridium difficile* in *Escherichia coli* (Penders in sod., 2006).

## 2.6 BAKTERIJSKA KOLONIZACIJA MLEČNE ŽLEZE

Bakterijska kolonizacija mlečne žleze je naraven proces naselitve različnih mikroorganizmov v ženskih mlečnih vodih (Heikkila in Saris, 2003). Vzpostavljena mikrobiota komezalnih bakterij inhibira rast patogenih bakterij (WHO, 2000).

V nedavni raziskavi so Fernández in sod. (2013) proučevali delovanje seva *L. gasseri* CECT5714 in *L. salivarius* CECT5713, osamljena iz humanega mleka. Seva dobro preživita pri prehodu skozi prebavni trakt, vplivata na dendritske celice, sposobna sta kolonizirati mlečno žlezo in imata uspešne mehanizme kompetitivnega izključevanja. Tako uspešno delujeta proti povzročiteljem mastitisa. Po tridesetih dneh so ugotovili, da je

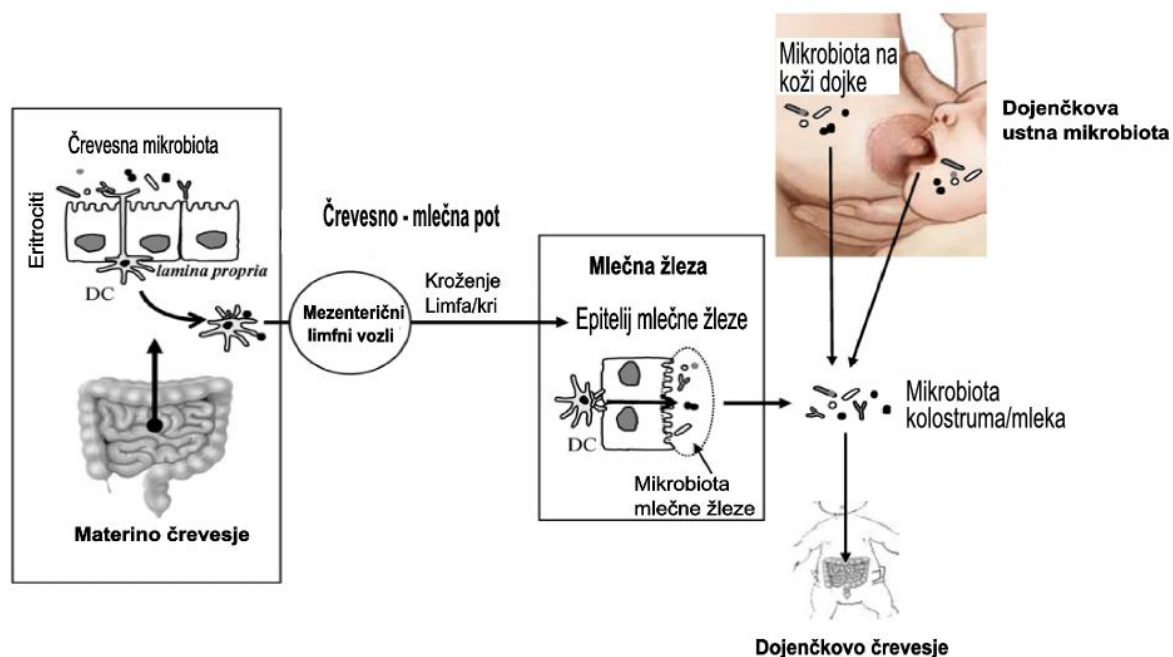
skupina žensk, ki je uživala probiotika, imela zmanjšano povprečno koncentracijo stafilokokov v mleku (približno  $10^2$  KE/ml) v primerjavi s skupino, ki ni uživala probiotika (skupina placebo).

### **2.6.1 Prehod bakterij v mlečno žlezo po endogeni poti (črevesno-mlečna pot)**

Včasih so verjeli, da so bakterije v mleku posledica izključno kontaminacije z bakterijami z materine kože in dojenčkove ustne votline. Danes je znano, da je tudi samo mleko vir bakterij. Študije so pokazale, da mnogih bakterij iz rodov laktobacilov in bifidobakterij, ki so jih osamili iz mleka, ni mogoče osamili iz kože na dojki. Izolati iz rodov laktobacilov in enterokokov, prisotni v materinem mleku, se genetsko razlikujejo od rodov, osamljenih iz kože pri isti osebi. Za bifidobakterije velja, da so striktni anaerobi in zato ne morejo preživeti na koži. Tovrstne ugotovitve nakazujejo, da so vsaj nekatere bakterije, prisotne v materinem mleku, endogenega izvora (Costello in sod., 2009). Nekaj bakterij pa zaradi dojenčkovega sesanja preide tudi nazaj v mlečne vode mlečne žleze in tako vzpostavi povratno izmenjavo bakterij med dojenčkovo ustno mikrobioto in mikrobioto mlečne žleze (Ramsay in sod., 2004).

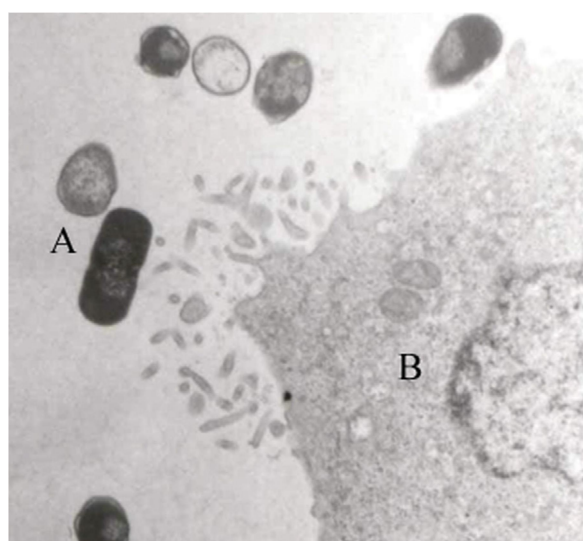
Velik vpliv na sestavo mikrobiote mlečne žleze in dojenčkov prebavni trakt ima delovanje dendritskih celic. Dokazali so, da lahko dendritske celice preidejo epitelni sloj v črevesju in tako zajemajo nepatogene bakterije direktno iz lumna črevesja. Dendritske celice lahko odprejo tesne vezi med črevesnimi epitelnimi celicami, pošljejo dendrite v lumen črevesja in direktno vežejo bakterije, medtem ko ohranjajo integriteto črevesne bariere z izražanjem proteinov, ki tvorijo tesne stike. Možnost endogenega prenosa probiotičnih bakterij iz črevesja v mlečno žlezo so proučevali s sistemom *in vitro* za hkratno gojenje tkivnih kultur, ki omogoča dobro simulacijo črevesnega epitelijskega sloja. Z njim so pokazali, da nezrele dendritske celice prenašajo komenzalne bakterije preko sloja epitelne celice. Model so približali fiziološkemu stanju v zadnjem trimesečju nosečnosti (Rescigno in sod., 2001). Intestinalne dendritske celice lahko zadržijo določeno število komenzalnih bakterij tudi nekaj dni v mezenteričnih limfnih vozlih (bezgavkah) (Macpherson, 2004).

Mehanizem pa ni omejen samo na delovanje dendritskih celic, ampak tudi makrofagov (Vazquez-Torres in sod., 1999). Črevesne bakterije se lahko, ko jih enkrat zajamejo dendritske celice ali makrofagi, razširijo po celem telesu preko kroženja limfocitov v z mukozo povezanem limfoidnem sistemu. Na ta način potujejo preko črevesne sluznice do odmaknjenih mukoznih površin, kot so respiratorni in genitourinarni trakt, žleza slinavka, solzne žleze in mlečne žleze v času laktacije. Takrat je namreč kolonizacija mlečne žleze s celicami imunskega sistema selektiven proces reguliran prek hormonskega delovanja. Ta proces je posledica velikega števila celic imunskega sistema in posledično tudi črevesnih bakterij v materinem mleku. Prenos bakterij iz črevesja matere do črevesja dojenčka prek materinega mleka je ponazorjen na sliki 3 (Fernández in sod., 2013).



Slika 3: Potencialni viri bakterij, prisotnih v humanem kolostrumu in mleku, DC: dendritske celice (Fernández in sod., 2013: 4)

Dva bakterijska seva, osamljena iz humanega mleka, so izpostavili nezrelim mišjim dendritskim celicam, kar je vodilo v močno stimulacijo dveh aktivacijskih površinskih markerjev dendritskih celic. Indukcija zorenja dendritskih celic je aktiven proces. Zorenja ne povzročijo odmrle bakterije ali neaktivni delci, tudi če so samo delno fagocitirani (Rescigno in sod., 1998). *L. gasseri* CECT 5715, prav tako osamljena iz humanega mleka, kaže na visoko afiniteto vezave na dendritske celice in zmožnost prenosa prek Caco-2 plasti celičnih linij s pomočjo z dendritskimi celicami povezanega mehanizma prenosa (Slika 4).



Slika 4: Specifična interakcija med celicami *L. gasseri*, osamljenimi iz humanega mleka (A) in dendritskimi celicami (B). Posneto s transmissijskim elektronskim mikroskopom (Fernández in sod., 2013: 5).



Celična linija Caco-2 izhaja iz celic heterogenega človeškega epitelnega kolorektalnega adenokarcinoma, uporabna pa je tudi za proučevanje prenosa snovi preko črevesne bariere (Fernández in sod., 2013). Druge študije so dokazale, da se bakterijska translokacija iz črevesja do mezenteričnih limfnih vozlov (bezgavk) in mlečne žleze pri miših dogodi v času pozne nosečnosti in v času laktacije. Dokazali so tudi, da humano mleko sestavlja veliko število živih bakterij, ki so jih prav tako našli v materinih mononuklearnih celicah periferne krvi (angl. peripheral blood mononuclear cell, PBMC). Rezultati tako dokazujejo, da se črevesne bakterije in delci bakterij prenesejo do mlečne žleze z mononuklearnimi celicami (to so limfociti, monociti in plazmatke). Predvideva se, da se lahko na ta način programira dojenčkov imunski sistem in sicer tako, da zazna in prepozna specifične bakterijske molekularne vzorce in tako nauči imunski sistem pravilnega odziva na patogene ali komenzalne bakterije (Perez in sod., 2007).

V raziskavi, ki so jo izvedli Cabrera-Rubio in sod. (2012), pa so ugotovili, da tudi način poroda vpliva na mikrobioto mlečne žleze, in sicer obstaja razlika v mikrobioti mlečne žleze med ženskami, ki so rodile s carskim rezom, in tistimi z vaginalnim porodom. Ena od možnih razlag za to je, da ob klasičnem porodu pride do hormonskih sprememb. Stres, ki se zgodi pri porodu, naj bi vplival na povečano permeabilnost črevesja in s tem olajšal prehod koristnih bakterij do mlečne žleze. Razlike so opazne že v bakterijski sestavi kolostruma in kasneje mleka. Prav tako so dokazali, da ima tudi povečanje teže v času nosečnosti vpliv na mikrobioto mleka.

## 2.7 MASTITIS

Mastitis je bakterijska okužba v dojki. Lahko se pojavi tudi pri nedoječih materah, nosečnicah in celo pri majhnih otrocih, vendar je okužba z bakterijami, ki povzročajo mastitis najpogostejša pri doječih ženskah. Dostikrat se zato uporablja izraz laktacijski ali poporodni mastitis. Do bakterijske okužbe lahko pride prek razpokanih in ranjenih bradavic, ampak tudi pri ženskah, ki nimajo ranjenih bradavic, lahko nastopi mastitis. Mati in novorojenček sta izpostavljena virulentnim mikroorganizmom najpogosteje v bolnišnicah, kjer tudi pogosto prihaja do razvoja proti antibiotikom rezistentnih sevov. Med leti 1930 in 1960 je bil pojav mastitisa najpogostejši, verjetno zato, ker so v tem obdobju postali porodi v bolnišnici bolj pogosti, širila se je uporaba antibiotikov in dojenje ni bilo promovirano (WHO, 2000).

Pojav mastitisa je najpogostejši v drugem in tretjem tednu po rojstvu. Glede na statistične podatke se od 74 % do 95 % vseh laktacijskih mastitisov pojavi v prvih dvanajstih tednih po porodu. Absces v dojki je prav tako pogostejši na začetku dojenja, in sicer v prvih šestih tednih po porodu. Pogostost mastitisa pri doječih ženskah ocenjujejo na 10 % do 33 % (WHO, 2000). Študija, izvedena v Novi Zelandiji, je sledila 1075 doječim ženskam v dobi šestih mesecev in pokazala pojav mastitisa pri 20 % udeleženk (Kinlay in sod., 2001). Študija, izvedena v Michiganu in Nabraski, pa je pokazala pojav mastitisa pri 9,5 % od skupno 946 žensk, ki so jih spremljali do konca dojenja (Foxman in sod., 2002).

### 2.7.1 Vzroki za pojav mastitisa

Vzrok za pojav mastitisa so lahko zamašeni mlečni vodi ali vnetje. Zamašen mlečni vod je najpogostejši primarni vzrok, ki lahko napreduje v vnetje. Po treh do šestih dneh po porodu se mlečna žleza napolni z mlekom, kar spodbudi sesanje in praznjenje dojke (WHO, 2000). Do zamašenih mlečnih vodov najpogostejše pride zaradi nepravilnega sesanja dojenčka in s tem poškodbe dojke. Drobne razpoke na dojki povzročajo bolečine v okolici bradavice. Zaradi bolečin se mati začne izogibati dojenju na prizadeti dojki, kar privede do nepopolnega praznjenja dojke in posledično zastoja mleka. Nepravilno ali nepopolno odstranjevanje mleka lahko povzroči nabrekanje dojke. Mlečni vod, ki nima dobrega pretoka, se tako vname in pritisk za vodom povzroči vnetje tkiva (Planinc in Pusovnik, 2012).

Potek vnetja je lahko akuten, subakuten ali kroničen. Vnetja, omejena na bradavico, se imenujejo telitis, vnetje celotnega žleznega tkiva pa mastitis. Ta se, kadar ni pravočasno zdravljen, lahko razvije v absces. Bakterije, ki povzročajo vnetje, največkrat stafilokoki in streptokoki, se s kože dojke razširijo skozi mlečne kanalčke (Takač, 1996). Glavni povzročitelji subakutnega in kliničnega mastitisa so bakterije vrst *Staph. aureus* in *Staph. epidermidis*, za katere je značilno, da tvorijo biofilm in so pogosto tudi odporne proti različnim antibiotikom (Delgado in sod., 2009).

V materinem mleku so prisotni tudi citokini, tako vnetni kot protivnetni. Glavna vloga protivnetnih citokinov v mleku je zaščita novorojenca, medtem ko vnetni citokini predvsem zagotavljajo zaščito mlečne žleze pred vnetjem (Filteau, 1999). V vneti mlečni žlezi je raven vnetnih citokinov povišana. Posledica vnetnega odziva je razširitev tesnih stikov med sekretornimi celicami mlečne žleze, kar olajša prehod protiteles v mleko. Hkrati lahko ta proces, zaradi povečanega pritiska, usmeri snovi iz mleka v okoliška tkiva. Citokini iz mleka lahko na ta način inducirajo vnetje v okoliškem tkivu. Vnetje prepoznamo po simptomih, tipičnih za mastitis (WHO, 2000). Prizadeta dojka je na otip bolj trda in toplejša, koža je pordela, prisotna je tudi bolečina v dojki. Običajno je prizadeta ena dojka. Mastitis za razliko od zamašenega mlečnega voda, spremljata še vročina in zelo hude bolečine v dojki. Zamašen mlečni vod ne potrebuje zdravljenja z antibiotiki, medtem ko so za zdravljenje mastitisa antibiotiki pogosto potrebni. Mastitis se zdravi z antibiotiki, ki delujejo proti stafilokokom in streptokokom (Planinc in Pusovnik, 2012). Najpogostejše predpišejo penicilin ali pa cefalosporin. Strong (2011) je v svoji raziskavi sledil 117 doječim materam. Ugotovil je, da je 23 % udeleženk ob dojenju v prvem letu občutilo bolečino. Najpogostejši razlog za pojav bolečine je bil mastitis (67,5 %). Za zdravljenje mastitisa naj bi v 96 % predpisali antibiotik. Najpogostejše predpisani antibiotiki so bili cefaleksin (54,6 %), ampicilin (17,3 %), amoksicilin (14,6 %), dikloksacilin (9,3 %) in azitromicin (4 %). Z uporabo kateregakoli od teh zdravil je z dojenjem možno nadaljevati.

### 2.7.2 Kategorizacija mastitisa

Že Gunther (1958) je na osnovi kliničnega opazovanja predpostavil, da je mastitis posledica zastajanja mleka v dojki ter razvoja bakterij, za katere je mleko bogato gojišče. Kasneje so še podkrepili to znanje s štetjem levkocitov in bakterij v mleku žensk z znaki

mastitisa in določili definicije za zamašen mlečni vod, neinfekcijski mastitis in infekcijski mastitis, ki so v veljavi še danes (WHO 2000)

Preglednica 1: Klasifikacija zamašenega mlečnega voda, neinfekcijskega mastitisa in infekcijskega mastitisa glede na število levkocitov in bakterij v humanem mleku (WHO, 2000: 6)

|                                      | Levkocitov < 10 <sup>6</sup> /ml mleka | Levkocitov > 10 <sup>6</sup> /ml mleka |
|--------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|
| Bakterij < 10 <sup>3</sup> /ml mleka | Zamašeni mlečni vodi                   | Neinfekcijski mastitis                 |
| Bakterij > 10 <sup>3</sup> /ml mleka |                                        | Infekcijski mastitis                   |

O infekcijskem mastitisu govorimo takrat, ko je v mleku prisotna povišana koncentracija patogenih bakterij. Bakterije lahko v dojko vstopajo skozi manjše praske in razjede na koži ali pa iz otrokovih ust med dojenjem. Stanje, ki vodi v zamašitev mlečnih vodov, se lahko izboljša že z nadaljevanjem dojenja, neinfekcijski mastitis s povečanim izločanjem mleka in hranjenja dojenčka. Ob pojavu infekcijskega mastitisa se za zdravljenje pogosto predpišejo antibiotiki. Vsekakor se vedno priporoča nadaljevanje dojenja. V primeru nepravilnega praznjenja mleka iz dojke lahko pride do razvoja neinfekcijskega mastitisa v infekcijski mastitis, iz infekcijskega mastitisa pa do tvorbe abscesa. Absces je redek zaplet mastitisa, kjer se v rani nakopiči še skupek gnoja. V primeru abscesa je dojenje zelo problematično. Nenehno nastajanje mleka lahko vodi v pojav fistule mlečnega voda, kar je mogoče trajno oskrbeti šele po prenehanju dojenja in nastajanja mleka (Livingstone, 1996).

### 2.7.3 Zdravljenje mastitisa

Nadaljevanje dojenja pripomore k hitrejšemu okrevanju mastitisa. Mastitis ne predstavlja nobene nevarnosti za otroka. V preteklosti so materam z mastitisom svetovali, da naj prenehajo z dojenjem. Novejše raziskave pa so pokazale, da dojenje med mastitisom otroku ne škoduje, kajti protitelesa v materinem mleku otroka ščitijo (WHO, 2000).

Arroyo in sod. (2010) so proučevali 352 žensk s simptomi mastitisa. Vse udeleženske so izpolnjevale enake pogoje: vnetje dojke, boleče dojenje, koncentracija bakterij > 10<sup>4</sup> KE/ml in koncentracija levkocitov > 10<sup>6</sup> celic/ml mleka. Večina žensk je imela razpoke na bradavici. Nobena od udeleženk ni uživala drugih prehranskih dopolnil ali probiotičnih izdelkov. Udeleženske so bile naključno izbrane v tri skupine. V dveh skupinah so udeleženske uživale dva različna seva probiotikov (skupina A in B) in ena skupina, kjer so udeleženske uživale antibiotike (skupina C). Raziskava je bila dvojno slepa in je trajala enaindvajset dni. V tem času sta skupini A in B uživali dnevno kapsulo z 10<sup>9</sup> KE *L. fermentum* CECT5716 (skupina A) ali *L. salivarius* CECT5713 (skupina B). Vzorce mleka so vzeli na začetku raziskave (dan 0) in na koncu raziskave (dan 21). Udeleženske so prosili, da ocenijo nivo bolečine v dojki od 0 (zelo boleče) do 10 (neboleče). Seva, ki so ju uporabili v raziskavi, izvirata iz humanega mleka in sta tako tudi zaradi svojega izvora zelo dobra alternativa pri zdravljenju mastitisa. Prevladujoče povzročiteljice mastitisa, osamljene iz mleka, so bile bakterije iz vrst *Staph. epidermidis*, *Staph. aureus* in *S. mitis*. Po 21 dneh uživanja probiotikov je bila povprečna koncentracija vseh bakterij občutno nižja od tiste, ki so jo ugotovili pri skupini žensk, ki je uživala antibiotike. Koncentracija bakterij iz vrst *Staph. epidermidis*, *Staph. aureus* in *S. mitis* se je po 21 dneh značilno zmanjšala pri vseh treh skupinah in bila vedno nižja v dveh skupinah žensk, ki so uživale probiotike, kot pa v skupini žensk, ki so uživale antibiotike. Najobčutnejše znižanje je bilo

pri udeleženkah v skupini B, ki so uživale bakterije iz vrste *L. salivarius*. Antibiotiki, ki so jih predpisali skupini C, so bili amoksisicilin-klavulanska kislina, amoksisicilin, kotrimoksazol, kloksacilin in eritromicin. Učinkovitost antibiotikov se je močno razlikovala. Za najbolj učinkovit antibiotik se je izkazal kotrimoksazol.

Raziskava je bila zanimiva tudi z vidika ocene nivoja bolečine, ki so jo udeleženske občutile v dojki, kot posledica mastitisa. Avtorji opisujejo statistično pomembno nižjo oceno bolečine v dojki po 21 dneh v skupini žensk, ki so uživale probiotike, kot pa v skupini, ki so uživale antibiotike. Po 14 dneh ni bilo več kliničnih znakov mastitisa pri ženskah, ki so uživale probiotike, medtem ko so ti ostali pri skupini žensk, ki je uživala antibiotike. Prav tako so vse ženske, ki so zaradi mastitisa nehale dojit, pripadale skupini, ki je uživala antibiotike. Pri nekaterih, ki so uživale antibiotike, je prišlo tudi do razvoja vaginalnega vnetja, ki ga povzroča rod kvasovk *Candida*. Pojav vaginalnega vnetja so povezali z uživanjem amoksisicilina, kloksacilina in amoksisicilin-klavulanske kisline. Raziskovalci so dokazali, da so vsi izolati *L. fermentum* in *L. salivarius* iz mleka, pripadali sevoma *L. fermentum* CECT5716 in *L. salivarius* CECT5713 (Arroyo in sod., 2010).

Zdravljenje s probiotiki je zanimivo tudi z vidika naraščanja odpornosti bakterij proti antibiotikom. Pogosta uporaba antibiotikov vpliva na molekulske spremembe pri bakterijah, ki zaradi tega lahko še dodatno povečajo sposobnost povzročanja vnetja, sposobnost tvorbe biofilma in drugih neželenih posledic, kot so z antibiotiki povezana diareja in vaginalno vnetje (Pirotta in Garland, 2006).

### 3 MATERIALI IN METODE

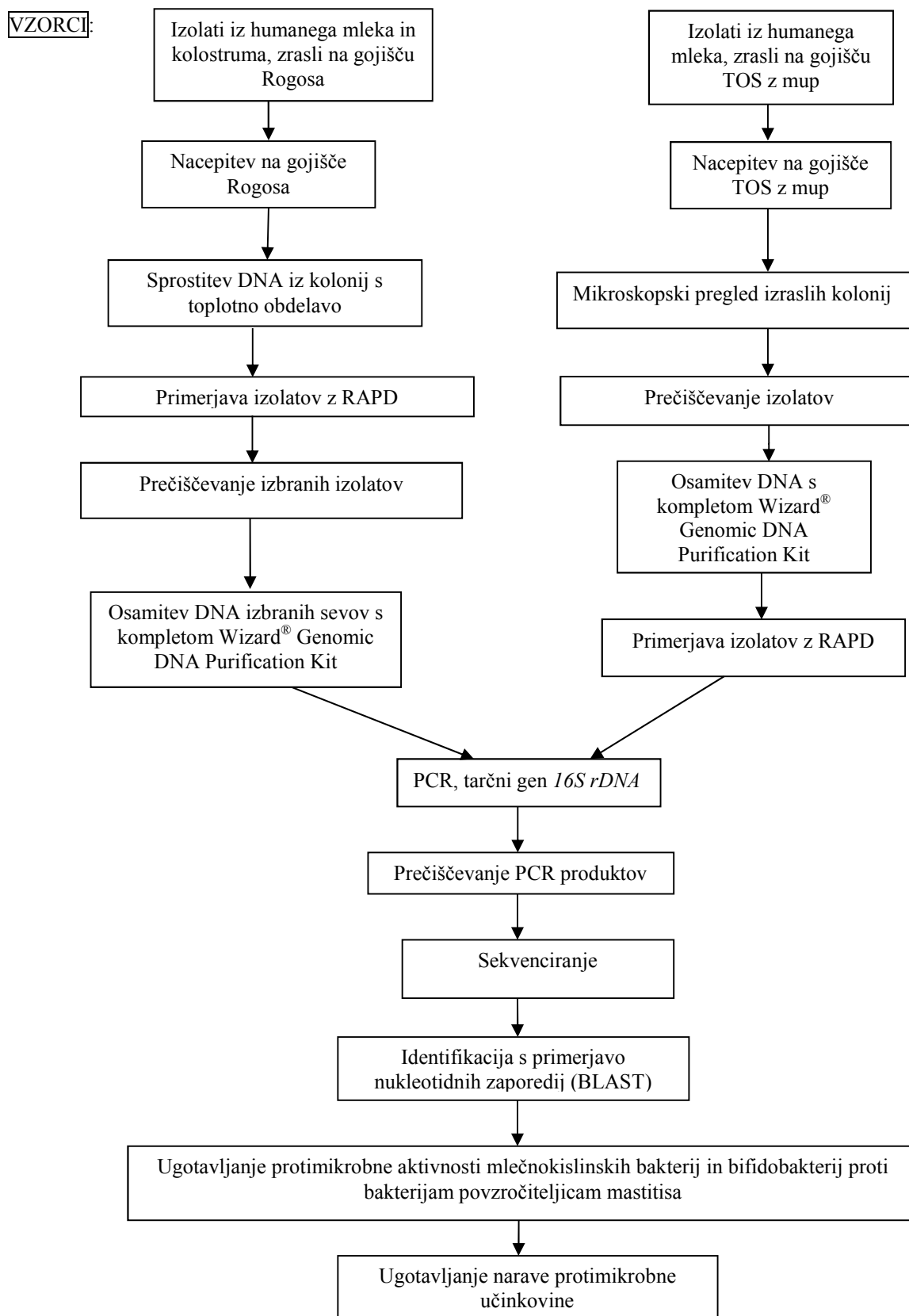
#### 3.1 NAČRT POSKUSA

Glavni cilj magistrske naloge je bil raziskati protimikrobno aktivnost mlečnokislinskih bakterij in bifidobakterij iz kolostruma in mleka slovenskih žensk, proti povzročiteljem mastitisa (bakterije iz rodov *Staphylococcus*, *Streptococcus* in *Corynebacterium*).

V nalogi smo iz predhodno zbranih izolatov iz materinega mleka in kolostruma izbrali unikatne seve, ki smo jih identificirali do nivoja vrste. Ugotavljali smo, kakšna je protimikrobna aktivnost izbranih izolatov mlečnokislinskih bakterij in bifidobakterij proti bakterijskim sevom, ki so bili izolirani iz mleka mater obolelih za mastitisom.

Načrt poskusa je prikazan na sliki 5.

Vključili smo 701 bakterijski izolat. 240 bakterijskih izolatov je bilo pridobljenih iz vzorcev zrelega mleka, nacepljenih na gojišče Rogosa (Rogosa 30), 231 bakterijskih izolatov iz vzorcev kolostruma, nacepljenih na gojišče Rogosa (Rogosa 0) in 230 bakterijskih izolatov iz vzorcev mleka, nacepljenih na gojišče TOS z mupirocinom (TOS 30).



Slika 5: Shematski prikaz poteka dela

## 3.2 MATERIALI

### 3.2.1 Laboratorijska oprema

Uporabljena laboratorijska oprema je navedena v preglednici 2.

Preglednica 2: Uporabljena laboratorijska oprema

| Laboratorijska oprema            | Model opreme, proizvajalec in država porekla               |
|----------------------------------|------------------------------------------------------------|
| avtoklav                         | A-21 CA, Kambič, Slovenija                                 |
| inkubator                        | Binder 400 BF, ZDA                                         |
| mikrobiološka komora (laminarij) | Iskra, PIO, Slovenija                                      |
| vrtični mešalnik                 | Vibromix Železniki, Slovenija                              |
| mikrocentrifuga                  | C1301B, Labnet International, Koreja                       |
| mikrovalovna pečica              | Bosch, Nemčija                                             |
| čistilec vode                    | Milli RO 10 plus in Milli Q plus, Merck Millipore, Nemčija |
| vodna kopel                      | WB-30, Kambič, Slovenija                                   |
| svetlobni mikroskop              | Reichert, Avstrija                                         |
| tehtnice                         | PBS/PBJ, Kern, Nemčija;<br>AT 400, Mettler Toledo, Švica   |
| magnetni mešalnik                | MM-541, Tehnica, Slovenija                                 |
| PCR komora                       | UV2, UVP, ZDA                                              |
| UV Transiluminator               | UVISave, Uvitec, Anglija                                   |
| centrifuga                       | Mikro 22R, Hettich, Nemčija                                |
| PCR ciklični termostat           | Mastercycler gradient, Eppendorf, Nemčija                  |
| naprava za elektroforezo         | PowerPac 300, Bio-Rad Laboratories, ZDA                    |
| elektroforezne banjice           | Sub-Cell® GT Basic, Bio-Rad Laboratories, ZDA              |
| pH meter                         | MP220, Mettler Toledo, Švica                               |

### 3.2.2 Reagenti

#### 3.2.2.1 Ringerjeva raztopina

Ringerjevo raztopino smo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija) tako da smo 1 Ringerjevo tableto raztopili v 0,5 l destilirane vode, odpipetirali po 9 ml v epruvete in avtoklavirali 15 min pri 121 °C. Ringerjevo raztopino smo uporabili za razredčevanje bakterij pri prečiščevanju kolonij.

#### 3.2.2.2 Reagenti za RAPD in PCR

Reakcijsko mešanico za RAPD in za PCR s tarčnim genom za *16S rDNA* smo pripravili z uporabo kompleta GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega, Madison, ZDA), ki vsebuje naslednje reagente:

- 5X brezbarvni GoTaq® Flexi pufer,
- 5X zelen GoTaq® Flexi pufer,
- GoTaq® DNA polimeraza (5 U/μl),
- MgCl<sub>2</sub> (25 mM).

Poleg tega smo uporabili še mešanico dNTP (vsak v koncentraciji 10 mM, Fermentas, Vilna, Litva) in začetne oligonukleotide, ki so navedeni v preglednici 3.

Preglednica 3: Nukleotidno zaporedje uporabljenih začetnih oligonukleotidov

| Oznaka začetnega nukleotida | Nukleotidno zaporedje      | Vir                                  |
|-----------------------------|----------------------------|--------------------------------------|
| M13                         | 5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3'      | (Torriani in sod., 1999)             |
| KGT 70-GC                   | 5'-AGCGGGCGTA-3'           | Inštitut za mlekarstvo in probiotike |
| 27f                         | 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' | (Yu in sod., 2011)                   |
| 1495R                       | 5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3'  |                                      |

### 3.2.2.3 Reagenti in encimi za osamitev DNA

DNA smo osamili z uporabo kompleta Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega), ki vsebuje naslednje reagente:

- raztopino za lizo celičnega jedra (Nuclei Lysis Solution)
- raztopino za obarjanje proteinov (Protein Precipitation Solution)
- raztopino RNaze (RNase Solution)
- rehidracijsko raztopino (Rehydration Solution)

Preostali reagenti, ki so potrebni za osamitev DNA:

- 50 mM EDTA (Sigma-Aldrich, Avstrija)
- 10 mg/ml lizocim (Sigma-Aldrich)
- 2500 U/ml mutanolizin (Sigma-Aldrich)
- 70 % etanol (Merck)
- izopropanol (Merck)

### 3.2.2.4 Reagenti za izvedbo elektroforeze v agaroznem gelu

Za izvedbo elektroforeze in analize pomnožkov v agaroznem gelu smo potrebovali naslednje reagente:

- agaroz: SeaKem® LE Agarose (Lonza, Rockland, ZDA)
- pufer TAE (TRIS-acetatni pufer)
- raztopina SYBR Safe™ (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, ZDA)
- molekulski označevalec velikosti 1kb (GeneRuler™ 1kb DNA Ladder, Fermentas, Litva)

Pufer TAE smo pripravili tako, da smo pripravljeno založno 50-kratno raztopino TAE (242 g/L Tris-HCl + 57,1 ml/L led očetne kisline + 100 ml/L 0,5 M EDTA, pH 8,0) pred uporabo redčili z vodo (MilliQ) v razmerju 1:50.

### 3.2.2.5 Reagenti za prečiščevanje PCR pomnožkov

Čiščenje PCR pomnožkov smo izvedli s pomočjo kompleta Wizard® SV Gel in PCR Clean-Up System (Promega), ki vsebuje naslednje reagente:

- raztopino za vezavo na membrano (Membrane Binding Solution)



- raztopino za spiranje kolon (Column Wash Solution)
- vodo brez nukleaz (Nuclease free Water)

### 3.2.2.6 Encimi

Encimi, ki smo jih uporabili za ugotavljanje proteinske narave protimikrobne učinkovine so navedeni v preglednici 4. Založne raztopine encimov smo sterilizirali z mikrofiltracijo skozi filter Minisart (Sigma-Aldrich) s premerom por 0,22  $\mu\text{m}$  ter shranili v zamrzovalniku.

Preglednica 4: Uporabljeni encimi za ugotavljanje proteinske narave protimikrobne učinkovine

| Encim                                                  | Ime proizvajalca | Založna koncentracija      |
|--------------------------------------------------------|------------------|----------------------------|
| <b>Pronaza E</b><br>(iz <i>Streptomyces griseus</i> )  | Merck            | 100 mg/ml H <sub>2</sub> O |
| <b>Proteinaza K</b><br>(iz <i>Tritirachium album</i> ) | Sigma-Aldrich    | 25 mg/ml PBS               |
| <b>Pepsin A</b><br>(iz prašičje želodčne sluznice)     | Sigma-Aldrich    | 25 mg/ml 10 mM HCl         |
| <b>Trypsin</b><br>(iz prašičje trebušne slinavke)      | Sigma-Aldrich    | 25 mg/ml H <sub>2</sub> O  |
| <b>Katalaza</b>                                        | Sigma-Aldrich    | 25 mg/ml PBS               |

### 3.2.3 Gojišča

#### 3.2.3.1 Gojišče Rogosa

Gojišče Rogosa je specifično prilagojeno gojenju bakterij rodu *Lactobacillus* (pH uravnan na 5,5). Gojišče smo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck) tako, da smo zatehtali 14,9 g dehidriranega gojišča Rogosa/200 ml vode (MilliQ). Gojišče smo nato do bistrega raztopili v mikrovalovni pečici in ohladili v vodni kopeli. Ko se je gojišče ohladilo na 45 °C  $\pm$  2 °C, smo v laminariju dodali 260  $\mu\text{l}$  očetne kisline, premešali in razlili v sterilne petrijeve plošče. Počakali smo, dokler se gojišče ni strdilo in ga do uporabe shranili v hladilniku (6 – 8 °C).

#### 3.2.3.2 Gojišče TOS z mupirocinom

Gojišče TOS z mupirocinom (TOS z mup) je specifično prilagojeno selektivnemu gojenju bakterij rodu *Bifidobacterium*. Gojišče smo pripravili po navodilih proizvajalca (Yakult Honsha Co., Ltd, Tokio, Japonska) tako, da smo zatehtali 12,5 g dehidriranega gojišča TOS/200 ml deionizirane vode. Sterilizirali smo v avtoklavu 15 minut pri 115 °C. Ko se je gojišče ohladilo na 45 °C  $\pm$  2 °C, smo v laminariju dodali 1 ml založne raztopine mupirocina, tako da je bila končna koncentracija antibiotika v gojišču 0,05 mg/ml. Gojišče smo premešali in razlili v sterilne petrijeve plošče, počakali, da se je gojišče ohladilo in do nadaljnje uporabe hranili v hladilniku (6 – 8 °C).

Založno raztopino mupirocina (10 mg/ml) smo pripravili tako, da smo 50 mg mupirocina (AppliedChem, Darmstadt, Nemčija) dodali 2 ml 96 % etanola in 3 ml vode (MilliQ).

### 3.2.3.3 Gojišče DE MAN-ROGOSA-SHARPE (MRS)

Gojišče MRS smo uporabili v namen prečiščevanja izolatov bifidobakterij. Pripravili smo ga po navodilih proizvajalca (Merck) tako, da smo zatehtali 68,2 g dehidriranega gojišča MRS/l deionizirane vode. Sterilizirali smo v avtoklavu 15 minut pri 118 °C. Gojišče smo ohladili na 45 °C ± 2 °C in v laminariju razlili v sterilne petrijeve plošče, ter do nadaljnje uporabe hranili v hladilniku (6 – 8 °C).

### 3.2.3.4 Modificirano gojišče MRS

Modificirano gojišče MRS z zmanjšano koncentracijo glukoze smo uporabili za preskus protimikrobne aktivnosti s spot-testom na agarju. Pripravili smo ga iz posameznih sestavin (pepton iz kazeina 10 g/l, mesni ekstrakt 10 g/l, kvasni ekstrakt 4 g/l, D(+)-glukoza 2 g/l, dikalijev hidrogen fosfat 2 g/l, Tween<sup>®</sup> 80 1 g/l, diamonijev hidrogen citrat 2 g/l, natrijev acetat 5 g/l, magnezijev sulfat 0,2 g/l, manganov sulfat 0,04 g/l, agar-agar 14 g/l) proizvajalca Merck, kakor je opisano v publikaciji (Jacobsen in sod., 1999). Vse sestavine gojišča smo prenesli v erlenmajerico, dodali smo vodo (MilliQ), dobro premešali, umerili pH na 6,3 in mešanico prelili v stekleničke. Sterilizirali smo v avtoklavu 15 min pri 121 °C. Gojišče smo razlili v sterilne petrijeve plošče. Počakali smo, dokler se gojišče ni strdilo in ga do uporabe shranili v hladilniku (6 – 8 °C).

### 3.2.3.5 Gojišče M17

Gojišče M17 smo uporabili za podlago pri ugotavljanju protimikrobne aktivnosti brezceličnih pripravkov. Pripravili smo ga po navodilih proizvajalca (Merck) tako, da smo zatehtali 55 g dehidriranega gojišča M17/l deionizirane vode. Sterilizirali smo v avtoklavu 15 minut pri 121 °C.

### 3.2.3.6 Poltrdno gojišče M17

Poltrdno gojišče M17 smo uporabili za rast indikatorskih bakterij pri ugotavljanju protimikrobne aktivnosti izolatov. Pripravili smo ga po navodilih proizvajalca (Merck) tako, da smo zatehtali 55 g dehidriranega tekočega gojišča M17, dodali še 7,5 g agar-agarja in raztopili v 1 litru deionizirane vode. Sterilizirali smo v avtoklavu 15 minut pri 121 °C.

### 3.2.3.7 Tekoče gojišče MRS

Tekoče gojišče MRS smo uporabili za gojenje prečiščenih bakterijskih sevov. Gojišče smo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck) tako, da smo zatehtali 52,2 g dehidriranega tekočega gojišča MRS/l deionizirane vode. Gojišče smo dobro premešali z magnetnim mešalom in po 10 ml gojišča odpipetirali v epruvete. Gojišče smo sterilizirali v avtoklavu 15 minut pri 118 °C. Gojišče smo do uporabe hranili v hladilniku (6 – 8 °C).

### 3.2.3.8 Tekoče gojišče M17

Tekoče gojišče M17 smo uporabili za gojenje indikatorskih bakterij. Pripravili smo ga po navodilih proizvajalca (Merck) tako, da smo zatehtali 42,5 g dehidriranega tekočega

gojišča M17/1 deionizirane vode. Gojišče smo dobro premešali z magnetnim mešalom in po 10 ml gojišča odpipetirali v epruvete. Gojišče smo sterilizirali v avtoklavu 15 minut pri 121 °C. Gojišče smo do uporabe hranili v hladilniku (6 – 8 °C).

### **3.2.4 Vzorci za analizo**

Vzorci kolostruma (odvzeti najkasneje tretji dan po porodu) in zrelega mleka (odvzeti približno 30 dni po porodu) so bili predhodno pridobljeni v sklopu raziskave Vloga humanega mleka v razvoju črevesne mikrobiote dojenčka ali krajše Moje-mleko ([www.moje-mleko.si/](http://www.moje-mleko.si/); ARRS J4 3606). Vzorci mleka so bili odvzeti ločeno iz desne (D) in leve dojke (L), vzorci kolostruma pa so vsebovali mleko iz obeh dojk. Vsi vzorci so bili zbrani v sterilne posodice in do analize shranjeni pri -80 °C.

Vzorci kolostruma in mleka so predhodno nacepili na različna gojišča, med katerimi je bilo tudi gojišče Rogosa za laktobacile in TOS-propionatni agar z dodatkom mupirocina za bifidobakterije. Kolonije, zrasle na omenjenih dveh gojiščih so namnožili v tekočem gojišču MRS in po dodatku glicerola shranili pri -80 °C. Te izolate smo uporabili v naši raziskavi.

V preglednici 6 in 14 so prikazani podatki o prvotnih oznakah izolatov. Prvotna oznaka (npr. LJ-030 Rog2) nam pove iz katere regije je bila prostovoljka (LJ-Ljubljana, IZ-Izola), oznaki regije pa sledi številka, ki je bila prostovoljki dodeljena v projektu Moje-mleko (npr. 030), iz katerega gojišča je bila izolirana bakterija (Rog - gojišče Rogosa, TOS - gojišče TOS z mupirocinom) ter zaporedna številka izolata.

V preglednici 14 so prikazani tudi podatki o izvoru vzorca (npr. LD0), ki prikazuje čas odvzema vzorca (oznaka 0 predstavlja kolostrum, oznaka 30 pa je zrelo mleko, odvzeto približno 30 dni po porodu) in da vsebuje mleko iz leve (L), desne (D) ali obeh dojk (LD).

### **3.2.5 Bakterijski sevi**

#### **3.2.5.1 Indikatorski sevi**

Indikatorski sevi, ki smo jih uporabili za ugotavljanje protimikrobne aktivnosti, so bili pridobljeni v Španiji (J.M. Rodríguez, Univerza Complutense, Madrid, Španija) iz mleka žensk z mastitisom (preglednica 5).

Preglednica 5: Indikatorski sevi

| Oznaka indikatorske bakterije | Indikatorska bakterija                    | Sev      |
|-------------------------------|-------------------------------------------|----------|
| I1                            | <i>Staphylococcus epidermidis</i>         | M32-01   |
| I2                            | <i>Staphylococcus epidermidis</i>         | M36-01   |
| I3                            | <i>Staphylococcus epidermidis</i>         | M53-01   |
| I4                            | <i>Staphylococcus epidermidis</i>         | M58-01   |
| I5                            | <i>Staphylococcus epidermidis</i>         | M78-01   |
| I6                            | <i>Staphylococcus aureus</i>              | M41-02   |
| I7                            | <i>Staphylococcus aureus</i>              | M44-08   |
| I8                            | <i>Staphylococcus aureus</i>              | M59-01   |
| I9                            | <i>Staphylococcus aureus</i>              | M95-01   |
| I10                           | <i>Staphylococcus lugdunensis</i>         | M33-01   |
| I11                           | <i>Staphylococcus lugdunensis</i>         | M78-02   |
| I12                           | <i>Streptococcus mitis</i>                | M22-01   |
| I13                           | <i>Streptococcus mitis</i>                | M57-01   |
| I14                           | <i>Streptococcus salivarius</i>           | M15-01   |
| I15                           | <i>Streptococcus salivarius</i>           | M5-01    |
| I16                           | <i>Streptococcus salivarius</i>           | M27-01   |
| I17                           | <i>Streptococcus salivarius</i>           | M51-01   |
| I18                           | <i>Streptococcus salivarius</i>           | M84-01   |
| I19                           | <i>Streptococcus salivarius</i>           | M58-02   |
| I20                           | <i>Streptococcus parasanguinis</i>        | TS2      |
| I21                           | <i>Corynebacterium amycolatum</i>         | M61-04   |
| I22                           | <i>Corynebacterium amycolatum</i>         | M69-04   |
| I23                           | <i>Corynebacterium pseudodiphthericum</i> | M1105-01 |
| I24                           | <i>Corynebacterium kroppenstedtii</i>     | M116-01  |

### 3.2.5.2 Izolati iz zbirke mikroorganizmov

V analize ugotavljanja protimikrobne aktivnosti smo vključili tudi nekaj izolatov iz kolostruma, ki so bili predhodno pridobljeni (Škorjanc, 2015) in shranjeni v zbirki mikroorganizmov na Inštitutu za mlekarstvo in probiotike.

Preglednica 6: Izolati iz mikrobne zbirke Inštituta za mlekarstvo in probiotike, ki smo jih uporabili za ugotavljanje protimikrobne aktivnosti

| Prvotna oznaka izolata | Oznaka seva | Vrsta, ki ji pripada izolirani sev         |
|------------------------|-------------|--------------------------------------------|
| LJ-132 MRS1            | U224        | <i>L. gasseri</i>                          |
| LJ-132 MRS5            | U228        | <i>L. fermentum</i>                        |
| LJ-137 MRS2            | U233        | <i>L. gasseri</i>                          |
| LJ-058 MRS5            | U257        | <i>L. casei/paracasei</i>                  |
| LJ-060 MRS1            | U258        | <i>L. casei/paracasei</i>                  |
| LJ-131 MRS2            | U103        | <i>Ped. acidilactici/pentosaceus/lolii</i> |
| LJ-094 MRS3            | U105        | <i>Ped. acidilactici/pentosaceus/lolii</i> |
| LJ-131 MRS4            | U106        | <i>Ped. acidilactici/pentosaceus/lolii</i> |
| LJ-004 MRS4            | U311        | <i>Ped. acidilactici/pentosaceus/lolii</i> |
| IZ-003 MRS2            | U358        | <i>Ped. acidilactici/pentosaceus/lolii</i> |
| LJ-095 MRS5            | U363        | <i>Ped. acidilactici/pentosaceus/lolii</i> |
| LJ-108 MRS2            | U377        | <i>Ped. acidilactici/pentosaceus/lolii</i> |
| LJ-108 MRS0            | U392        | <i>Ped. acidilactici/pentosaceus/lolii</i> |
| LJ-034 MRS5            | U418        | <i>Ped. acidilactici/Pentosaceus/lolii</i> |
| IZ-003 MRS1            | U419        | <i>Ped. acidilactici/pentosaceus/lolii</i> |
| LJ-095 MRS3            | U355        | <i>B. animalis subsp. lactis</i>           |

### 3.3 METODE

V raziskavo smo vključili bakterijske izolate, ki so bili pridobljeni iz vzorcev kolostruma, nacepljenih na gojišče Rogosa (231 izolatov) in iz vzorcev zrelega mleka, odvzetega 30 dni po porodu in nacepljenega na gojišče Rogosa (240 izolatov) in TOS z mupirocinom (230 izolatov).

#### 3.3.1 Oživitev zamrznjenih izolatov mlečnokislinskih bakterij in bifidobakterij

Zamrznjene vzorce smo oživili na istih gojiščih, iz katerih so bili predhodno osamljeni. To smo storili tako, da smo suspenzije bakterijskih izolatov razmazali na površine trdnih gojišč in inkubirali anaerobno pri 37 °C 72 ur.

#### 3.3.2 Morfološki pregled kolonij pod mikroskopom

Iz izraslih kolonij na gojišču TOS z mup smo pripravili preparate z barvanjem s kristal violet barvilom, ki je del kompleta za barvanje po Gramu Color Gram 2 (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija). Kapljico fiziološke raztopine smo kanili na objektno steklo, nato pa smo v njej s cepilno zanko razmazali izraslo kolonijo. Razmaz smo posušili na zraku ter ga fiksirali tako, da smo ga petkrat potegnili čez plamen gorilnika. S kristal violet barvilom smo barvali 1 minuto in spirali z MilliQ. Pred mikroskopiranjem smo preparatu na objektu stekelcu dodali imerzijsko olje. S pregledom pod mikroskopom smo opazovali obliko bakterijskih celic in konformacijo (veržice, pari ali posamične). Isole, katerih celice so bile okrogle (kokoidne) oblike smo izločili iz nadaljnje analize.

#### 3.3.3 Osamitev DNA iz kolonij s toplotno obdelavo

Za primerjavo izolatov z gojišča Rogosa z RAPD smo uporabili DNA, ki smo jo osamili iz izraslih kolonij s pomočjo toplotne obdelave. Na vsaki plošči smo izbrali najbolj osamljeno kolonijo in jo označili. Kolonijo smo aseptično prenesli v mikroeprevete, v katere smo predhodno odpipetirali 15 µl pufru 5 x Colorless GoTaq Flexi, ki je del kompleta za PCR. Pripravljeno mešanico smo prenesli v ciklični termostat, kjer smo izvedli termično obdelavo bakterijske suspenzije (15 minut pri 99 °C), z namenom liziranja celic.

#### 3.3.4 Metoda RAPD

Metodo naključno pomnožene polimorfne DNA (angl. Random amplified polymorphic DNA, RAPD) smo uporabili za razlikovanje med izolati na nivoju seva. Naključno pomnožena polimorfna DNA je metoda, ki temelji na uporabi kratkih in nespecifičnih začetnih oligonukleotidov (z.o.) dolžne 8 do 12 nukleotidov, ki pomnožujejo večje število različno dolgih odsekov tarčne DNA. Pri metodi RAPD so segmenti DNA naključno pomnoženi. Za uspešno izvedbo reakcije RAPD je potrebno, da so 3' konci začetnega oligonukleotida usmerjeni eden proti drugemu in da so komplementarna mesta DNA, na katera se veže z.o., dovolj blizu (približno 2000 bp). Samo v tem primeru se odsek DNA med obema mestoma prileganja začetnega oligonukleotida podvoji. Pomnožene dele DNA analiziramo z gelsko elektroforezo, kjer s primerjanjem števila in položaja pomnožkov na gelu ovrednotimo sorodnost izolatov. Prednost metode je analiza velikega števila vzorcev,

kjer ni potrebno predhodno poznavanje nukleotidnih zaporedij DNA tarčnega mikroorganizma (Parakhia in sod., 2010). Tehnika je bila razvita leta 1990 in se je izkazala za zelo učinkovito metodo pri ugotavljanju genetske raznolikosti med zelo sorodnimi organizmi (Vincent in sod., 1998).

#### 3.3.4.1 Izvedba RAPD

Za analizo izolatov z gojišča Rogosa smo uporabili DNA osamljeno iz kolonij s toplotno obdelavo, za analizo izolatov z gojišča TOS z mup pa DNA osamljeno s pomočjo kompleta reagentov Wizard® Genomic DNA Purification Kit.

Izolate iz vzorcev mleka, ki so zrasli na gojiščih Rogosa, smo primerjali z dvema z. o. (M13 in KGT 70-GC), za primerjavo ostalih izolatov pa smo uporabili le z.o. M13.

RAPD smo izvedli v 20 µl reakcijski mešanici. Sestava mešanice je opisana v preglednicah 7 - 9.

Preglednica 7: Sestava reakcijske mešanice za RAPD z začetnim oligonukleotidom M13 (DNA izolirana iz kolonij s toplotno obdelavo)

| Sestavina                      | Količina |
|--------------------------------|----------|
| DNA osamljena s segrevanjem    | 2 µl     |
| voda (MilliQ)                  | 12,4 µl  |
| 5X zelen GoTaq® Flexi pufer    | 2 µl     |
| MgCl <sub>2</sub> (25 mM)      | 3,2 µl   |
| začetni oligonukleotid M13     | 0,1 µl   |
| dNTP (10 mM)                   | 0,2 µl   |
| GoTaq® DNA polimeraza (5 U/µl) | 0,1 µl   |

Preglednica 8: Sestava 20 µl reakcijske mešanice za RAPD z začetnim oligonukleotidom KGT 70-GC (DNA izolirana iz kolonij s toplotno obdelavo)

| Sestavina                                | Količina |
|------------------------------------------|----------|
| DNA osamljena s segrevanjem              | 2 µl     |
| voda (MilliQ)                            | 12,2 µl  |
| 5X zelen GoTaq® Flexi pufer              | 2 µl     |
| MgCl <sub>2</sub> (25 mM)                | 3,2 µl   |
| začetni oligonukleotid KGT 70-GC(100 µM) | 0,1 µl   |
| dNTP (10 mM)                             | 0,4 µl   |
| GoTaq® DNA polimeraza (5 U/µl)           | 0,1 µl   |

Preglednica 9: Sestava 20 µl reakcijske mešanice za RAPD z začetnim oligonukleotidom M13 (DNA osamljena z uporabo kompleta Wizard® Genomic DNA Purification Kit)

| Sestavina                                                                   | Količina |
|-----------------------------------------------------------------------------|----------|
| DNA (DNA osamljena z uporabo kompleta Wizard® Genomic DNA Purification Kit) | 2 µl     |
| voda (MilliQ)                                                               | 10,4 µl  |
| 5 X zelen GoTaq® Flexi pufer                                                | 4 µl     |
| MgCl <sub>2</sub> (25 mM)                                                   | 3,2 µl   |
| začetni oligonukleotid M13                                                  | 0,1 µl   |
| dNTP (10 mM)                                                                | 0,2 µl   |
| GoTaq® DNA polimeraza (5 U/µl)                                              | 0,1 µl   |

Pri izvedbi RAPD smo vključili tudi negativno kontrolo, ki smo jo pripravili tako, da smo v reakcijsko mešanico namesto DNA dodali enak volumen (2 µl) vode (MilliQ).

Po pripravi reakcijske mešanice v PCR komori, smo mikroeprovete z reakcijskimi mešanicami prenesli v mikrocentrifugo za nekaj minut, nato pa v ciklični termostaat, kjer smo za izvedbo RAPD izbrali ustrezen program (preglednici 10 in 11).

Preglednica 10: Program za analizo RAPD z začetnim oligonukleotidom M13

| Stopnja                 | Temperatura | Čas   | Št. ponovitev |
|-------------------------|-------------|-------|---------------|
| Začetna denaturacija    | 95 °C       | 3 min | 1             |
| Denaturacija            | 95 °C       | 1 min | 40            |
| Prileganje              | 45 °C       | 20 s  |               |
| Podaljševanje           | 72 °C       | 2 min |               |
| Zaključno podaljševanje | 72 °C       | 5 min | 1             |

Preglednica 11: Program za analizo RAPD z začetnim oligonukleotidom KGT 70-GC

| Stopnja                 | Temperatura | Čas   | Št. ponovitev |
|-------------------------|-------------|-------|---------------|
| Začetna denaturacija    | 95 °C       | 3 min | 1             |
| Denaturacija            | 95 °C       | 1 min | 35            |
| Prileganje              | 37 °C       | 2 min |               |
| Podaljševanje           | 72 °C       | 2 min |               |
| Zaključno podaljševanje | 72 °C       | 5 min | 1             |

### 3.3.5 Agarozna gelska elektroforeza

Pomnoške reakcije RAPD smo primerjali s pomočjo agarozne gelske elektroforeze. To je metoda, ki se uporablja za ločevanje molekul DNA glede na njihovo velikost (dolžino nukleotidnega zaporedja). Velikost pomnožkov reakcije RAPD smo ovrednotili s pomočjo molekulskih označevalcev velikosti.

Pripravili smo 1,5 % agarozni gel (3,15 g agaroze + 210 ml pufra TAE). Mešanico smo segrevali do popolne bistrosti v mikrovalovni pečici in vmes občasno premešali. V vodni kopeli smo nato mešanico ohladili na približno 50 °C in še toplo vlili v ustrezen model za elektroforezo z vstavljenimi glavniki. Ko se je gel strdil, smo ga prenesli v očiščeno elektroforetsko banjico, v katero smo predhodno že vlili pufer TAE. V nastale žepke na gelu smo nanесли po 10 µl pomnožkov reakcije RAPD oz. 3,5 µl molekulskega označevalca velikosti pomnožkov DNA. Elektroforezno banjico smo priključili na električno napetost (90 V) in pustili teči 90 minut. Električna napetost povzroči gibanje nabitih molekul DNA po nosilcu proti nasprotno nabiti elektrodi. Po končani elektroforezi smo gel 30 minut barvali z barvilom SYBR Safe. V tem času se je barvilo vezalo na odseke pomnožene DNA in pri analizi gela pod UV svetlobo fluoresciralo. Gele smo vizualizirali s pomočjo UV transiluminatorja.

Iz vizualne primerjave vzorcev pomnožkov RAPD, smo za nadaljnje analize izbrali izolate z unikatnim vzorcem.

### 3.3.6 Prečiščevanje izolatov in priprava čistih kultur sevov

Izbrane izolate smo prečistili s tehniko razmazovanja na trdnem gojišču (Rogosa ali MRS). To smo storili tako, da smo kolonijo s plastično ezo prenesli v Ringerjevo raztopino, premešali in nato z ezo razmazali na gojišče. Plošče smo anaerobno inkubirali 48 ur pri 37 °C. Lepo ločene kolonije smo s cepilno zanko nacepili v tekoče gojišče MRS in anaerobno inkubirali 48 ur pri 37 °C.

Del kulture smo uporabili za osamitev DNA (točka 3.3.7) preostanek pa smo prelili v centrifugirke in 5 minut centrifugirali pri 6000 obr./min. Supernatant smo odlili in oborino resuspendirali v 500 µl tekočega gojišča MRS z dodatkom glicerola (30 %), ki preprečuje nastajanje kristalov v celici in na ta način izboljša preživetje bakterijskih sevov med zamrzovanjem. Vsebinsko smo nato odpipetirali v mikroepruvetke in shranili v zmrzovalniku pri -20 °C.

### 3.3.7 Osamitev DNA iz čiste kulture

Osamitev DNA smo iz 48-urnih čistih kultur v tekočem gojišču MRS izvedli s kompletom za osamitev DNA Wizard® Genomic DNA Purification Kit po navodilu proizvajalca.

- 1 ml kulture smo centrifugirali pri 12 000 obr./min 2 minuti in odlili supernatant.
- Usedlino smo resuspendirali z 600 µl raztopine 50Mm EDTA, 6 mg lizocima in 6 µl raztopine mutanolizina (2500 U/ml).
- Po enourni inkubaciji pri 37 °C smo ponovno centrifugirali 2 minuti pri 12 000 obr./min in odlili supernatant.
- Usedlino smo resuspendirali v 600 µl raztopine za lizo celičnega jedra.
- Inkubirali smo 5 minut pri 80 °C, in nato ohladili na sobno temperaturo.
- Dodali smo 3 µl raztopine RNaze in inkubirali 30 minut pri 37 °C.
- Dodali smo 200 µl raztopine za obarjanje proteinov in dobro premešali na namiznem vrtilniku (vorteks).
- Vzorce smo 20 minut inkubirali na ledu in nato centrifugirali 3 minute pri 18 000 obr./min
- Supernatant smo nato prelili v nove mikroepruvete, v katere smo predhodno odpipetirali 600 µl isopropanola ter premešali z obračanjem.
- Ponovno smo centrifugirali 3 minute pri 12 000 obr./min in odstranili supernatant.
- Dodali smo 600 µl 70 % etanola, mešali z obračanjem mikroepruvet in centrifugirali 3 minute pri 12 000 obr./min
- Etanol smo odlili, mikroepruvete pa pustili odprte, da se posušijo na zraku.
- Dodali smo 100 µl rehidracijske raztopine in shranili v hladilniku pri 4 °C.

### 3.3.8 Identifikacija izbranih izolatov z ugotavljanjem zaporedja nukleotidov

RAPD metodo smo uporabili za ugotavljanje raznolikosti izolatov, identifikacijo izbranih sevov pa smo izvedli s sekvenciranjem PCR pomnožkov *16S rDNA* in primerjavo z bazo nukleotidov.



### 3.3.8.1 Izvedba PCR

Osamljeno DNA smo uporabili kot matrico v PCR, z univerzalnima z.o. 27f in 1495R, ki pomnožujeta celotno *16S rDNA*. Sestava reakcijske mešanice je opisana v Preglednica 12, program za PCR pa v preglednici 13.

Preglednica 12: Sestava 50 µl reakcijske mešanice za PCR z z. o. 27f in 1495R

| Sestavina                                  | Količina |
|--------------------------------------------|----------|
| DNA                                        | 2 µl     |
| mikrofiltrirana in avtoklavirana voda      | 33,75 µl |
| zelen GoTaq <sup>®</sup> Flexi pufer       | 10 µl    |
| MgCl <sub>2</sub> (25 mM)                  | 3 µl     |
| začetni oligonukleotid 27f                 | 0,25 µl  |
| začetni oligonukleotid 1495R               | 0,25 µl  |
| dNTP (10 mM)                               | 0,5 µl   |
| GoTaq <sup>®</sup> DNA polimeraza (5 U/µl) | 0,25 µl  |

Preglednica 13: PCR program za pomnoževanje *16S rDNA*

| Stopnja PCR   | Temperatura | Čas   | Št. ponovitev |
|---------------|-------------|-------|---------------|
| Začetek       | 95 °C       | 3 min | 1             |
| Denaturacija  | 95 °C       | 1 min | 35            |
| Prileganje    | 59 °C       | 1 min |               |
| Podaljševanje | 72 °C       | 2 min |               |
| Zaključek     | 72 °C       | 5 min | 1             |

Uspešnost PCR smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo, kakor je opisano v poglavju 3.3.5. I.e., da smo uporabili 1,3 % agarozni gel in v nastale žepke nanesli po 5 µl pomnožkov PCR oz. 3,5 µl molekulskega označevalca velikosti DNA 1 kb.

### 3.3.8.2 Čiščenje pomnožkov PCR

Po PCR je bilo potrebno iz reakcijske zmesi odstraniti odvečne nukleotide in začetne oligonukleotide. Pomnožke reakcije PCR smo očistili s kompletom reagentov Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System po navodilih proizvajalca (Promega).

- PCR pomnožku smo dodali enak volumen raztopine za vezavo na membrano (50 µl), premešali in prenesli v priloženo mikrokolono.
- Centrifugirali smo pri 16 000 obr./min 1 minuto in prefiltrirano tekočino odlili.
- V mikrokolono smo dodali 700 µl raztopine za spiranje kolon.
- Ponovno smo centrifugirali pri 16 000 obr./min 1 minuto in prefiltrirano tekočino odstranili.
- Ponovili smo spiranje mikrokolone s 500 µl raztopine za spiranje kolon in najprej centrifugirali pri 16 000 obr./min 5 minut, odlili tekočino in nato centrifugirali še 1 minuto.
- Mikrokolono smo prenesli v 1,5 ml mikrocentrifugirko, vanjo dodali 50 µl vode brez nukleaz in inkubirali na sobni temperaturi 1 minuto.
- Ponovno smo centrifugirali pri 16 000 obr./min 1 minuto in mikrokolono odstranili.

### 3.3.8.3 Sekvenciranje *16S rDNA* in ugotavljanje vrste sevov

Prečiščene pomnožke *16S rDNA* smo poslali podjetju Microsynth (Dunaj, Avstrija), kjer so določili njihovo nukleotidno zaporedje.

Dobljena zaporedja smo primerjali s tistimi v genski banki NCBI (angl. National Center for Biotechnology Information) s pomočjo programa BLAST (angl. The Basic Local Alignment Search Tool) in tako identificirali izbrane seve iz kolostruma in mleka do nivoja vrste.

### 3.3.9 Ugotavljanje protimikrobne aktivnosti izbranih bakterijskih kultur (spot-test)

Za ugotavljanje protimikrobne aktivnosti izbranih izolatov (preglednici 6 in 14) smo uporabili postopek po Bogovič-Matijašič in sod. (1998), ki smo ga nekoliko priredili.

Izbrane izolate smo najprej nacepili v tekoče gojišče MRS in anaerobno inkubirali pri 37 °C 48 ur. Po 10 µl zrasle kulture smo nanesti točkovno (spot) na modificirano gojišče MRS in anaerobno inkubirali pri 37 °C 48 ur.

Indikatorske seve (preglednica 5) smo nacepili v tekoče gojišče M17 in aerobno inkubirali 48 ur pri 37 °C. Po inkubaciji smo kulture dobro premešali, odpipetirali 500 µl kulture v sterilne posodice ter dodali 50 ml predhodno raztaljenega poltrdnega gojišča M17. Posodice smo premešali z obračanjem, ter po približno 5 ml prelili po gojišču MRS z že zraslimi testnimi sevi. Plošče smo inkubirali aerobno pri 37 °C 48 ur.

Protimikrobno aktivnost smo ocenili z merjenjem širine inhibicijske cone od roba kolonije testnega seva do zunanjega roba cone (v milimetrih). Opazovali smo tudi rob cone (oster ali neoster) in čistost cone (bistra ali motna cona).

### 3.3.10 Ugotavljanje protimikrobne aktivnosti brezceličnih supernatantov izbranih bakterijskih kultur

Vse bakterije, ki so pokazale protimikrobno aktivnost s spot testom, smo precepili v sveže tekoče gojišče MRS in anaerobno inkubirali pri 37 °C 48 ur. Kulture smo centrifugirali pri 6000 obr./min 5 minut. Supernatante smo nevtralizirali z NaOH do pH 7,0 in nato sterilizirali s filtracijo skozi mikrofilter s premerom por 0,22 µm.

V 5 ml raztaljenega in ohlajenega poltrdnega gojišča M17 smo dodali 50 µl 48-urne kulture indikatorskega seva, premešali in razlili čez trdno gojišče M17 v petrijevih ploščah. Na plošče smo v laminariju nanesti po 15 µl supernatanta (3 krat po 5 µl, po vsakem nanosu smo počakali, da je supernatant difundiral v gojišče). Plošče smo inkubirali aerobno pri 37 °C 48 ur ter po inkubaciji pregledali, ali so na mestih nanosa supernatantov območja brez rasti indikatorskih sevov (cone inhibicije).

### **3.3.11 Ugotavljanje narave protimikrobne snovi**

Pri vseh testnih izolatih, pri katerih smo odkrili protimikrobno aktivnost tudi v nevtraliziranih supernatantih, smo preverili, ali so v supernatantih protimikrobne snovi proteinske narave (bakteriocini) ali vodikov peroksid. To smo storili tako, da smo supernatantom dodali encime pronazo E, proteinazo K, pepsin A in tripsin, ki cepijo peptidne vezi ter encim katalazo, ki cepi vodikov peroksid (preglednica 4).

Supernatantom smo dodali encime v koncentraciji 1 mg/ml (v 1 ml supernatanta smo dodali po 40 µl pripravljene raztopine encima, razen pronaze E, ki smo je dodali 10 µl). Tako obdelane supernatante smo preskusili, kakor je opisano v točki 3.3.10. V primeru, da bi supernatant obdelan s proteolitičnim encimom izgubil protimikrobno aktivnost proti indikatorskim bakterijam, bi lahko sklepali, da je protimikrobna snov v supernatantu proteinske narave. Podobno izguba aktivnosti zaradi obdelave s katalazo kaže, da je protimikrobna snov vodikov peroksid.

Preverili smo še kako katalaza vpliva na rast indikatorskih bakterij. Na plošče z indikatorsko bakterijo (pripravljene kot v točki 3.3.10) smo nanesti po 15 µl raztopine katalaze v koncentraciji 1 mg/ml. Po inkubaciji (aerobno, 37 °C, 24 ur) smo opazovali rast na mestu, kjer smo nanesti katalazo.

## 4 REZULTATI

V skladu z zastavljenimi hipotezami smo pri izvedbi raziskave sledili trem poglavitnim točkam. V prvem delu smo iz vzorcev kolostruma in mleka slovenskih žensk najprej pridobili bakterijske izolate, jih primerjali med seboj, med njimi izbrali unikatne seve in jih do nivoja vrste identificirali na osnovi nukleotidnega zaporedja. V drugem delu raziskave smo preverili protimikrobno aktivnost izbranih izolatov proti bakterijskim sevom, ki so najpogostejši povzročitelji mastitisa. V tretjem delu pa smo se osredotočili še na določitev narave protimikrobne snovi.

### 4.1 IZOLACIJA IN IZBOR IZOLATOV

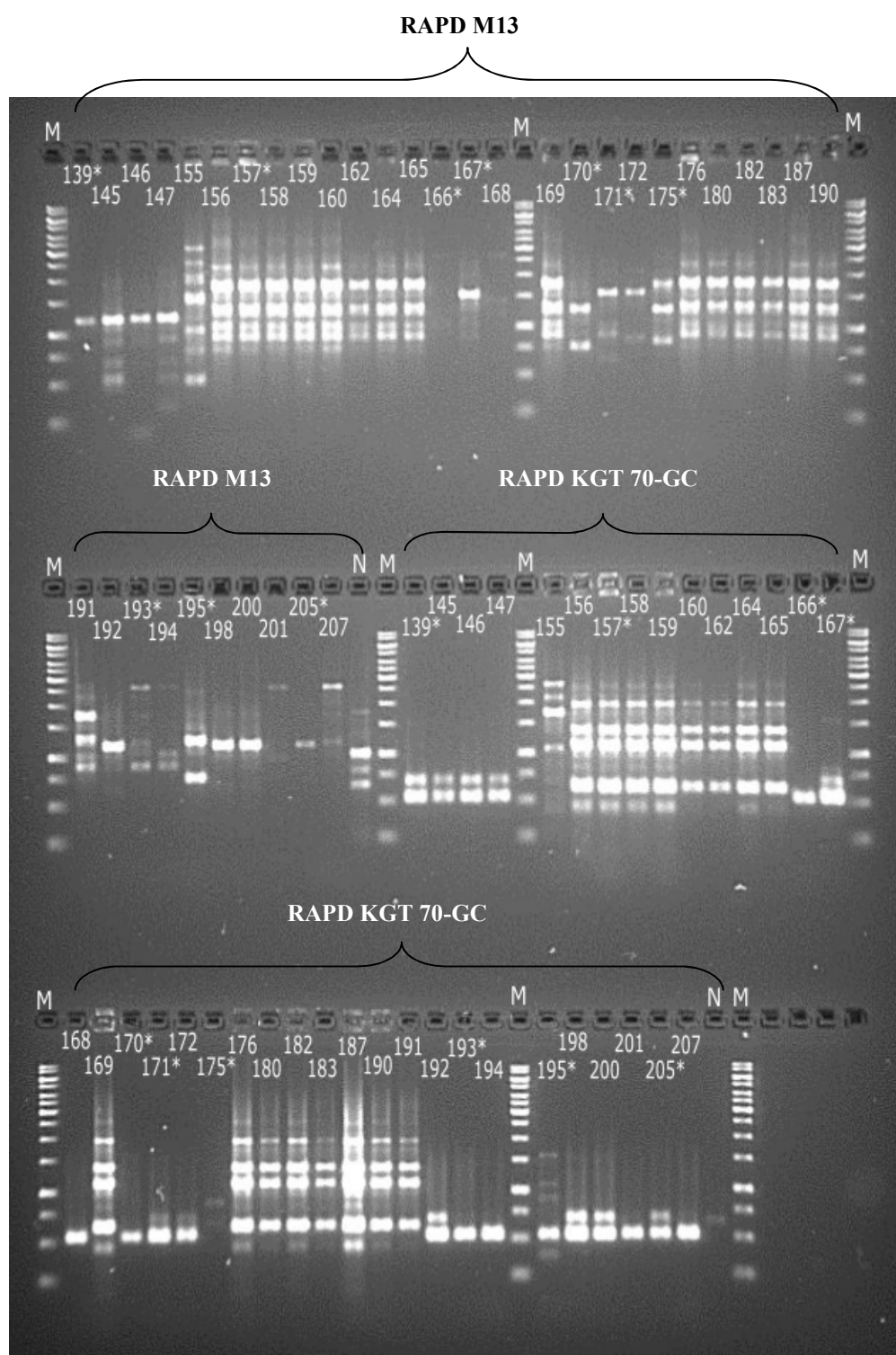
Od skupno 701 bakterijskih izolatov je po nacepiti na trdno gojišče zrastle 324 izolati: 107 izolatov iz kolostruma in 140 izolatov iz mleka, nacepljenih na gojišče Rogosa, ter 77 izolatov iz vzorcev mleka, nacepljenih na gojišče TOS z mup.

Po mikroskopskem pregledu kolonij, izraslih na gojišču TOS z mup, smo iz nadaljnje analize izločili bakterijske izolate (51), ki so imeli obliko kokov.

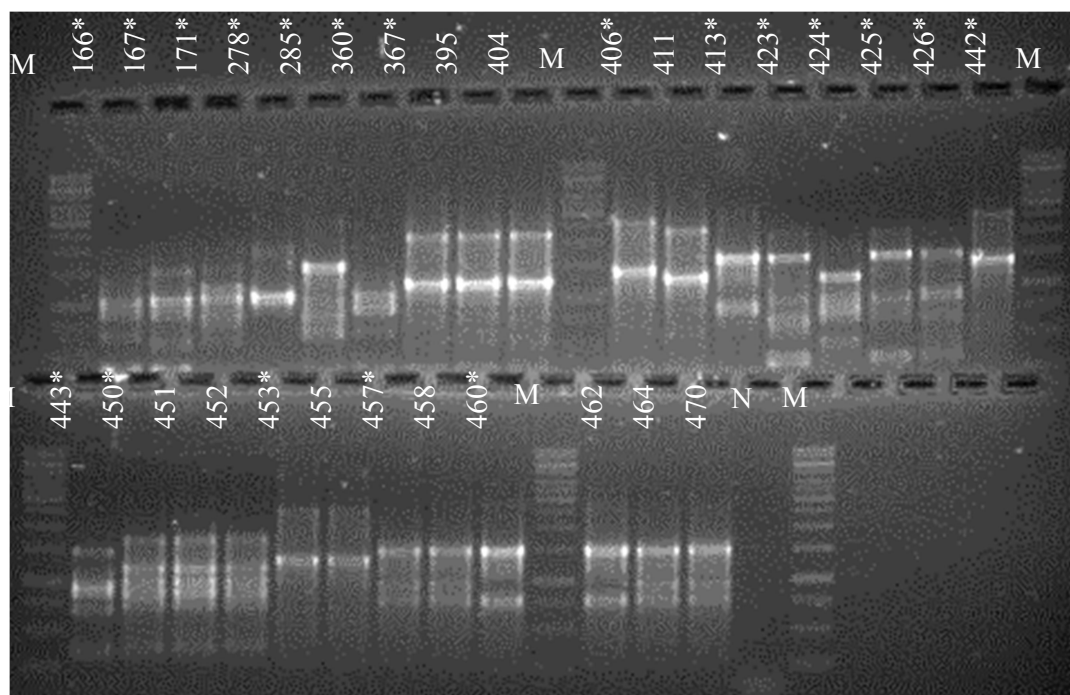
### 4.2 PRIMERJAVA IZOLATOV Z RAPD

Z metodo RAPD smo primerjali 273 bakterijskih izolatov iz vzorcev kolostruma in zrelega mleka. S pomočjo elektroforeze smo pridobili vzorce pomnožkov iz reakcij RAPD. Izolate iz vzorcev mleka, necepljenih na gojišče Rogosa, smo primerjali z uporabo dveh z.o., M13 in KGT 70-GC. Ker smo z obema z.o. dobili primerljive rezultate (slika 6), smo za primerjavo ostalih sevov uporabili le RAPD z z.o. M13. Za primerjavo izolatov z gojišča Rogosa smo uporabili DNA izolirano s toplotno obdelavo (slika 6 in priloga A), za primerjavo izolatov z gojišča TOS z mup pa smo uporabili DNA, izolirano iz prečiščene bakterijske kulture s pomočjo komercialnega kompleta reagentov (slika 7). Vzorci DNA, pri katerih smo dobili enak vzorec, zelo verjetno pripadajo istemu sevu, zato smo za nadaljnje analize izbrali le predstavnike z različnimi vzorci RAPD.

Na podlagi rezultatov RAPD smo za nadaljnje analize izbrali 59 izolatov, od katerih jih je bilo 16 iz vzorcev mleka, z gojišča Rogosa in 16 z gojišča TOS z mup, 27 pa iz kolostruma z gojišča Rogosa. Sedem izbranih bakterijskih izolatov iz vzorcev kolostruma, zraslih na gojišču Rogosa, nam ni uspelo ponovno namnožiti v tekočem gojišču MRS, zato jih nismo mogli podrobneje analizirati. Za nadaljnje analize smo tako izbrali 52 izolatov.



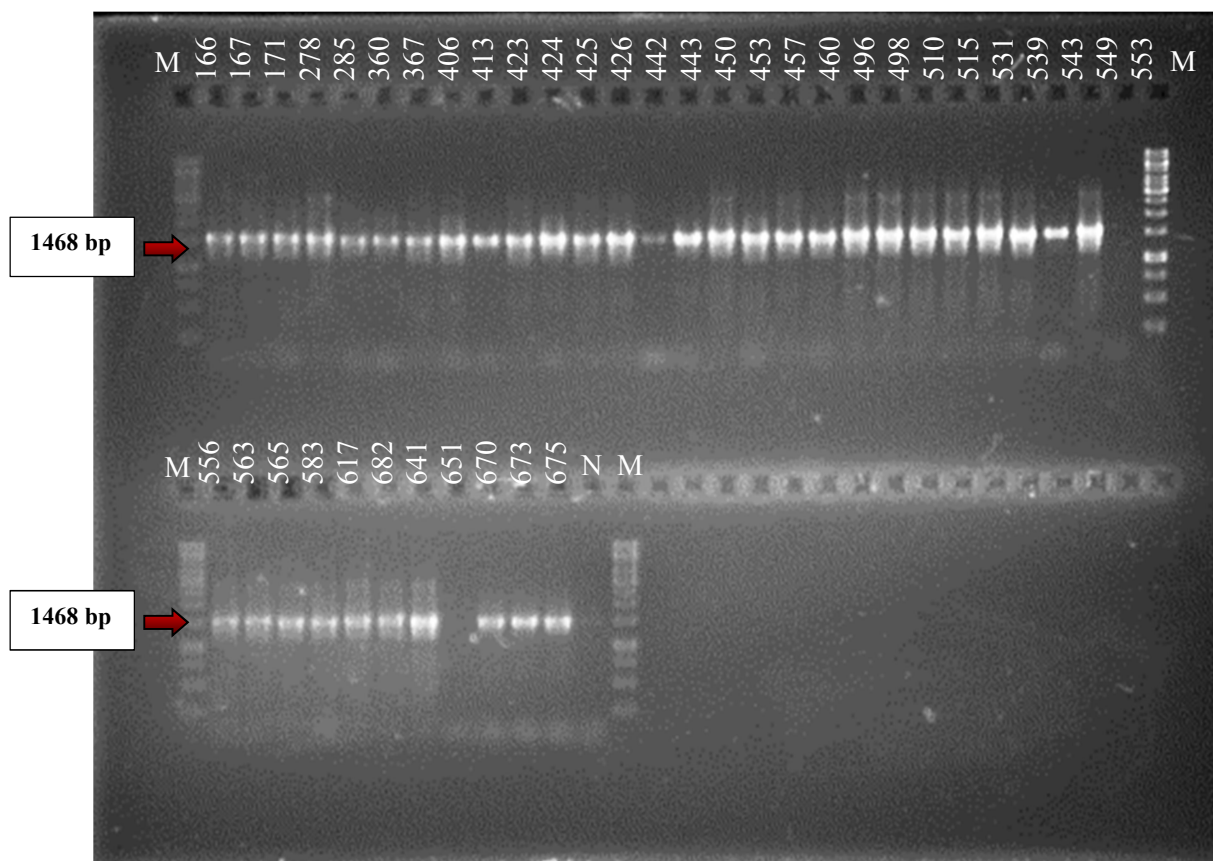
Slika 6: Vzorci RAPD z. o. M13 in KGT 70-GC, Stolpec M: Molekulski označevalec velikosti DNA (1 kb), Stolpec N: negativna kontrola. Vsi izolati so iz vzorcev zrelega mleka, zraslih na gojiščih Rogosa, izolati, ki smo jih izbrali za nadaljnje analize so označeni z \*



Slika 7: Vzorci RAPD z z. o. M13, Stolpec M: Molekulski označevalec velikosti DNA (1 kb), Stolpec N: negativna kontrola, Stolpec 166 do 171: izolati iz vzorcev mleka, zraslih na gojišču Rogosa, Stolpec 278 do 470: izolati iz vzorcev mleka, zraslih na gojišču TOS z mup, izolati, ki smo jih izbrali za nadaljnje analize, so označeni z \*

#### 4.3 IDENTIFIKACIJA IZBRANIH SEVOV NA OSNOVI NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA

Izbrane izolate iz mleka in kolostruma smo želeli identificirati do vrste s pomočjo sekvenciranja *16S rDNA*. Pred analizo smo vse seve prečistili z razmazovanjem na trdnem gojišču, pripravili kulture v tekočem gojišču in izolirali DNA s pomočjo komercialnega kompleta reagentov. DNA smo pomnožili z z. o., ki pomnožujeta celotno *16S rDNA*, in uspešnost pomnoževanja preverili z gelsko elektroforezo (slika 8). Za potrjevanje uspešnosti pomnoževanja smo upoštevali prisotnost 1468 bp velikega pomnožka. S slike 8 je razvidno, da pri treh izolatih (izolati s številko 442, 553 in 651) nismo dobili pomnožkov, zato smo poslali sekvencirati skupno 49 izolatov.



Slika 8: Pomnožki PCR s tarčno regijo *16S rDNA*. Stolpec M: Molekulski označevalec velikosti DNA (1 kb), stolpec N: Negativna kontrola

S pomočjo programa BLAST smo pridobljena zaporedja primerjali z zaporedji v genski banki NCBI in na podlagi tega osamljene bakterijske seve identificirali do nivoja vrste.

Rezultati identifikacije do vrste so prikazani v preglednici 14.

Preglednica 14: Rezultati identifikacije izbranih sevov na osnovi sekvenciranja *16S rDNA*

| Prvotna oznaka izolata <sup>a</sup>     | Izvor izolata <sup>a</sup> | Oznaka seva | Vrsta, ki ji pripada izolirani sev           |
|-----------------------------------------|----------------------------|-------------|----------------------------------------------|
| LJ-030 Rog 2                            | D30                        | T11         | <i>L. gasseri</i> *                          |
| LJ-030 Rog 3                            | D30                        | T12         | <i>L. gasseri</i> *                          |
| LJ-131 Rog <sup>3</sup> / <sub>4</sub>  | D30                        | T24         | <i>L. fermentum</i> *                        |
| LJ-117 Rog <sup>2</sup> / <sub>4</sub>  | D30                        | T55         | <i>L. fermentum</i> *                        |
| LJ-160 Rog 5                            | D30                        | T75         | <i>L. gasseri</i> *                          |
| LJ-005 Rog <sup>6</sup> / <sub>7</sub>  | D30                        | T113        | <i>L. salivarius</i> *                       |
| LJ-039 Rog 1                            | D30                        | T139        | <i>L. gasseri</i> *                          |
| LJ-085 Rog 2                            | D30                        | T157        | <i>L. fermentum</i> *                        |
| LJ-091 Rog <sup>3</sup> / <sub>5</sub>  | D30                        | T170        | <i>L. reuteri</i> *                          |
| LJ-001 Rog <sup>8</sup> / <sub>8</sub>  | D30                        | T175        | <i>L. salivarius</i> *                       |
| LJ-160 Rog 3                            | D30                        | T193        | <i>L. gasseri</i> *                          |
| LJ-091 Rog <sup>5</sup> / <sub>5</sub>  | D30                        | T195        | <i>L. reuteri</i> *                          |
| LJ-039 Rog 8                            | D30                        | T205        | <i>L. reuteri</i> *                          |
| LJ-160 Rog 7                            | D30                        | T166        | <i>L. gasseri</i> *                          |
| LJ-091 Rog <sup>1</sup> / <sub>5</sub>  | D30                        | T167        | <i>L. gasseri</i> *                          |
| LJ-091 Rog <sup>2</sup> / <sub>5</sub>  | D30                        | T171        | <i>L. gasseri</i> *                          |
| LJ-121 TOS 4                            | D30                        | T450        | <i>L. fermentum</i> *                        |
| LJ-132 Rog 7                            | LD0                        | T556        | <i>L. fermentum</i> *                        |
| LJ-166 Rog 1                            | LD0                        | T617        | <i>L. fermentum</i> *                        |
| LJ-038 Rog 5                            | LD0                        | T641        | <i>L. crispatus</i> *                        |
| LJ-020 Rog 8                            | LD0                        | T496        | <i>Ped. acidilactici</i> *                   |
| LJ-080 Rog 1                            | LD0                        | T498        | <i>Ped. acidilactici/pentosaceus/lolii</i> * |
| LJ-053 Rog 2                            | LD0                        | T510        | <i>Ped. acidilactici</i> *                   |
| LJ-131 Rog 7                            | LD0                        | T515        | <i>Ped. acidilactici/lolii</i> *             |
| LJ-115 Rog 3                            | LD0                        | T531        | <i>Ped. acidilactici/lolii</i> *             |
| LJ-170 Rog <sup>5</sup> / <sub>6</sub>  | LD0                        | T549        | <i>Ped. acidilactici/lolii</i> *             |
| LJ-116 Rog 1                            | LD0                        | T563        | <i>Ped. acidilactici/pentosaceus/loli</i> *  |
| LJ-140 Rog 8                            | LD0                        | T682        | <i>Ped. acidilactici/lolii</i> *             |
| LJ-160 TOS 1                            | L30                        | T367        | <i>B. animalis subsp. lactis</i> *           |
| LJ-121 TOS 6                            | L30                        | T406        | <i>B. breve</i> *                            |
| LJ-037 TOS 1                            | L30                        | T453        | <i>B. breve</i> *                            |
| LJ-137 TOS 7                            | L30                        | T278        | <i>E. faecalis</i>                           |
| LJ-066 TOS 1                            | L30                        | T285        | <i>A. neuui</i>                              |
| LJ-014 TOS 7                            | L30                        | T360        | <i>Staph. epidermidis</i>                    |
| LJ-037 TOS 5                            | D30                        | T413        | <i>A. neuui</i>                              |
| LJ-056 TOS 5                            | L30                        | T423        | <i>A. haliotis</i>                           |
| LJ-056 TOS 2                            | L30                        | T424        | <i>A. haliotis</i>                           |
| LJ-056 TOS 3                            | L30                        | T425        | <i>A. haliotis</i>                           |
| LJ-056 TOS 1                            | L30                        | T426        | <i>A. haliotis</i>                           |
| LJ-056 TOS 4                            | L30                        | T443        | <i>A. neuui</i>                              |
| LJ-073 TOS 4                            | L30                        | T457        | <i>A. neuui</i>                              |
| LJ-037 TOS 4                            | D30                        | T460        | <i>A. neuui</i>                              |
| LJ-136 Rog <sup>6</sup> / <sub>7</sub>  | LD0                        | T539        | <i>C. kroppenstedtii</i>                     |
| LJ-059 Rog <sup>1</sup> / <sub>11</sub> | LD0                        | T543        | <i>E. dispar</i>                             |
| LJ-107 Rog 4                            | LD0                        | T565        | <i>A. neuui</i>                              |
| LJ-126 Rog 1                            | LD0                        | T583        | <i>A. neuui</i>                              |
| LJ-008 Rog 1                            | LD0                        | T670        | <i>Staph. epidermidis</i>                    |
| LJ-008 Rog 5                            | LD0                        | T673        | <i>Staph. epidermidis</i>                    |
| LJ-008 Rog 7                            | LD0                        | T675        | <i>Staph. epidermidis</i>                    |

\* izolati, ki smo jih uporabili za ugotavljanje protimikrobne aktivnosti

<sup>a</sup> Razlaga okrajšav prvotne oznake izolata in izvora izolata je opisana v poglavju 3.2.4



#### 4.4 PROTIMIKROBNA AKTIVNOST IZBRANIH SEVOV

Za ugotavljanje protimikrobne aktivnosti izbranih sevov proti povzročiteljem mastitisa smo izbrali bakterijske seve, ki so pripadali rodovom *Lactobacillus* (20 sevov), *Pediococcus* (8 sevov) in *Bifidobacterium* (3) (sevi so v preglednici 14 označeni z \*). Poleg teh sevov smo v analize ugotavljanja protimikrobne aktivnosti vključili tudi nekaj izolatov iz kolostruma, ki so bili predhodno pridobljeni in shranjeni v zbirki mikroorganizmov na Inštitutu za mlekarstvo in probiotike (preglednica 6). Tako smo skupno izbrali 25 bakterijskih sevov iz rodu *Lactobacillus*, 18 sevov iz rodu *Pediococcus* in 4 seve iz rodu *Bifidobacterium*.

Protimikrobno aktivnost smo ocenili z merjenjem cone inhibicije, rezultati analize so prikazani v preglednici 15. Zaradi boljše preglednosti so v preglednicah izbrani samo bakterijski izolati, ki so pokazali protimikrobno aktivnost proti vsaj enemu indikatorskemu sevu.

Kot najbolj protimikrobno aktivni so se pokazali sevi iz vrste *L. gasseri*, saj je vseh deset sevov izkazalo protimikrobno aktivnost. Najbolj protimikrobno aktiven je bil sev *L. gasseri* T193, ki je inhibiral rast večine indikatorskih bakterij (18/24). Tudi oba seva iz vrste *L. salivarius* sta se izkazala kot protimikrobno aktivna, saj sta inhibirala rast osmih od 24-ih indikatorskih bakterij. Protimikrobno aktivnost je izkazal tudi *L. casei/L. paracasei* U257, ki je inhibiral štiri bakterijske seve. Ostali sevi laktobacilov so bili manj protimikrobno aktivni.

Protimikrobno aktivnost so izkazali tudi trije od štirih sevov bifidobakterij, medtem ko so bili izolati rodu *Pediococcus* le redko protimikrobno aktivni. Od 18 sevov pediokokov so le trije zavirali rast vsaj enega indikatorskega seva.

Iz rezultatov lahko povzamemo, da so izolati iz mleka ali kolostruma najbolj učinkovito zavirali indikatorske seve vrst *Staph. epidermidis* in *Staph. aureus*, medtem ko noben bakterijski izolat ni pokazal protimikrobne aktivnosti proti indikatorskim sevom vrste *S. mitis* in enega od dveh sevov vrste *C. amycolatum*.

Cone inhibicije so bile v večini primerov motne, rob cone pa ni bil oster (slika 9). Kombinacije testnih sevov in indikatorskih bakterij, pri katerih je bil rob cone oster in cona bistra (slika 10), pa so v preglednicah 15 in 16 označene z zvezdico. Predpostavili smo, da je v tem primeru lahko ta protimikrobna učinkovina bakteriocin.

Srdarev T. Protimikrobna aktivnost mlečnokislinskih bakterij...proti povzročiteljem mastitisa.

Mag. delo (Du2). Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, 2016

Preglednica 15: Protimikrobna aktivnost izbranih bakterijskih izolatov iz kolostruma ali mleka proti indikatorskim sevom iz vrst *Staph. epidermidis*, *Staph. aureus* in *Staph. lugdunensis*

| Izbrani izolati |                                              | Protimikrobna aktivnost proti izbranim indikatorskim sevom <sup>a</sup> |     |     |      |     |      |      |     |      |     |     |
|-----------------|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-----|-----|------|-----|------|------|-----|------|-----|-----|
| Oznaka izolata  | Vrsta izolata                                | I1                                                                      | I2  | I3  | I4   | I5  | I6   | I7   | I8  | I9   | I10 | I11 |
| U224            | <i>L. gasseri</i>                            | -                                                                       | -   | -   | -    | -   | -    | -    | -   | ++   | -   | -   |
| U228            | <i>L. fermentum</i>                          | -                                                                       | -   | -   | -    | -   | -    | -    | -   | +    | -   | -   |
| U233            | <i>L. gasseri</i>                            | -                                                                       | -   | -   | -    | -   | -    | -    | -   | ++   | -   | -   |
| U257            | <i>L. casei/paracasei</i>                    | -                                                                       | -   | -   | -    | -   | -    | -    | -   | ++   | +   | ++  |
| U258            | <i>L. casei/paracasei</i>                    | -                                                                       | +   | -   | -    | -   | -    | -    | +   | ++   | -   | -   |
| T11             | <i>L. gasseri</i>                            | +++                                                                     | +++ | +++ | +++* | +++ | +++* | +++* | +++ | ++   | -   | -   |
| T12             | <i>L. gasseri</i>                            | -                                                                       | +++ | +++ | +++  | +++ | +++  | +++  | +++ | ++   | -   | -   |
| T53             | <i>L. fermentum</i>                          | -                                                                       | -   | -   | -    | -   | -    | -    | -   | ++   | ++  | -   |
| T73             | <i>L. gasseri</i>                            | -                                                                       | -   | -   | -    | -   | -    | -    | -   | ++   | +++ | -   |
| T113            | <i>L. salivarius</i>                         | +                                                                       | -   | ++  | +++  | -   | +    | +    | -   | ++   | ++  | +   |
| T139            | <i>L. gasseri</i>                            | +                                                                       | +++ | +++ | +++  | +++ | +++  | +++  | +++ | ++   | +   | +   |
| T175            | <i>L. salivarius</i>                         | ++                                                                      | +++ | +++ | ++   | ++  | ++   | +++  | ++  | -    | -   | -   |
| T193            | <i>L. gasseri</i>                            | +++                                                                     | +++ | +++ | +++  | +++ | +++  | ++   | +++ | +++* | ++  | -   |
| T195            | <i>L. reuteri</i>                            | -                                                                       | -   | -   | -    | -   | -    | -    | -   | ++   | -   | +++ |
| T166            | <i>L. gasseri</i>                            | +++                                                                     | +++ | +++ | +++  | +++ | +++  | -    | +++ | -    | -   | -   |
| T167            | <i>L. gasseri</i>                            | +++                                                                     | +++ | +++ | +    | ++  | -    | +++  | +++ | -    | -   | -   |
| T171            | <i>L. gasseri</i>                            | +++                                                                     | +++ | +++ | -    | ++  | +    | ++   | ++  | +++* | ++  | -   |
| T450            | <i>L. fermentum</i>                          | -                                                                       | -   | -   | -    | -   | -    | ++   | -   | -    | -   | -   |
| U311            | <i>Ped. acidilactici/pentosaceus</i>         | -                                                                       | -   | -   | -    | -   | -    | -    | -   | ++   | -   | -   |
| T563            | <i>Ped. acidilactici/pentosaceus/lolii</i> * | -                                                                       | -   | -   | -    | -   | -    | -    | -   | -    | +++ | +   |
| T367            | <i>B. animalis subsp. lactis</i>             | -                                                                       | -   | -   | -    | -   | -    | +++  | ++  | ++   | -   | -   |
| T406            | <i>B. breve</i>                              | -                                                                       | -   | -   | -    | -   | -    | ++   | -   | ++   | +++ | -   |
| T453            | <i>B. breve</i>                              | +                                                                       | +   | ++  | +    | +   | +    | ++*  | +++ | -    | -   | -   |

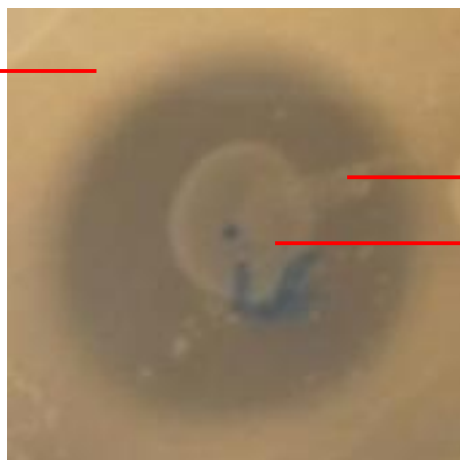
<sup>a</sup> +: cona inhibicije je manjša od 2 mm, ++: cona inhibicije je velika med 2-4 mm, +++: cona inhibicije je večja od 4 mm, -: ni inhibicije, \* bistra cona inhibicije in oster rob cone inhibicije, I1-I5: *Staph. epidermidis*, I6-I9: *Staph. aureus*, I10-I11: *Staph. lugdunensis*

Preglednica 16: Protimikrobna aktivnost izbranih bakterijskih izolatov iz kolostruma ali mleka proti indikatorskim sevom iz vrst *Staph. lugdunensis*, *S. mitis*, *S. salivarius*, *S. parasanguinis*, *C. amycolatum*, *C. pseudodiphthericum* in *C. kroppenstedtii*

| Izbrani izolati |                              | Protimikrobna aktivnost proti izbranim indikatorskim sevom <sup>a</sup> |     |     |      |      |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----------------|------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-----|-----|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Oznaka izolata  | Vrsta                        | I12                                                                     | I13 | I14 | I15  | I16  | I17 | I18 | I19 | I20 | I21 | I22 | I23 | I24 |
| U233            | <i>L. gasseri</i>            | -                                                                       | -   | -   | -    | -    | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   |
| U257            | <i>L. casei/L. paracasei</i> | -                                                                       | -   | -   | -    | -    | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   |
| T11             | <i>L. gasseri</i>            | -                                                                       | -   | -   | -    | -    | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| T139            | <i>L. gasseri</i>            | -                                                                       | -   | +   | -    | -    | +   | +   | ++  | +   | -   | -   | +   | +   |
| T193            | <i>L. gasseri</i>            | -                                                                       | -   | -   | +++* | +++* | ++  | ++  | +++ | ++  | +   | -   | +   | -   |
| T166            | <i>L. gasseri</i>            | -                                                                       | -   | -   | -    | -    | -   | -   | -   | -   | +++ | -   | -   | -   |

<sup>a</sup> +: cona inhibicije je manjša od 2 mm, ++: cona inhibicije je velika med 2-4 mm, +++: cona inhibicije je večja od 4 mm, -: ni inhibicije, \* bistra cona inhibicije in oster rob cone inhibicije, I12-I13: *S. mitis*, I14-I19: *S. salivarius*, I20: *S. parasanguinis*, I21 in I22: *C. amycolatum*, I23: *C. pseudodiphthericum*, I24: *C. kroppenstedtii*

Gojišče z izraslim  
indikatorskim sevom  
*Staph. epidermidis*  
M58-01

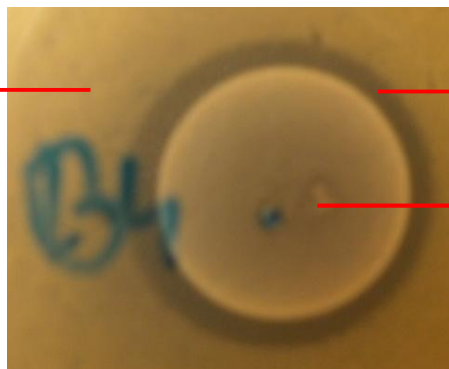


Cona inhibicije

*L. gasseri* T11

Slika 9: Cona inhibicije pri delovanju bakterijskega izolata *L. gasseri* T11 (na sliki označen z L6) proti indikatorskemu sevu *Staph. epidermidis* M58-01

Gojišče z izraslim  
indikatorskim sevom  
*Staph. aureus* M44-08



Cona inhibicije

*B. breve* T453

Slika 10: Cona inhibicije pri delovanju bakterijskega izolata *B. breve* T453 (na sliki označen z B4) proti indikatorskemu sevu *Staph. aureus* M44-08

#### 4.4.1 Protimikrobna aktivnost nevtraliziranih brezceličnih supernatantov testnih izolatov

Želeli smo preveriti, ali je protimikrobna snov, ki zavira rast indikatorskih bakterij kislina, ki jo proizvajajo testni sevi, zato smo preverili, ali so protimikrobno aktivni tudi supernatanti testnih sevov, ki smo jih predhodno nevtralizirali.

Preglednica 17 prikazuje protimikrobno aktivnost nevtraliziranih supernatantov testnih izolatov, ki so pokazali protimikrobno aktivnost proti vsaj enemu indikatorskemu sevu.

Pri večini supernatantov smo znotraj con inhibicije opazili rast posameznih kolonij (slika 11). Izjema je bil supernatant testnega izolata *B. breve* T453 (slika 12), ki je proti indikatorskemu sevu *S. epidermidis* M36-01 (I2) pokazal bistro cono inhibicije.

Testirali smo vseh 23 sevov, ki so pokazali protimikrobno aktivnost proti vsaj enemu indikatorskemu sevu. Iz preglednice 17 je razvidno, da je 12 testnih izolatov pokazalo

protimikrobno aktivnost tudi po nevtralizaciji supernatanta, in sicer proti trem indikatorskim sevom, enemu iz vrste *S. salivarius* in dvema iz vrste *Staph. epidermidis*.

Preglednica 17: Protimikrobna aktivnost nevtraliziranih supernatantov testnih izolatov proti indikatorskim sevom *Staph. epidermidis* M36-01, *Staph. epidermidis* M53-01 in *S. salivarius* M84-01

| Nevtralizirani<br>supernatanti testnih izolatov |                                  | Indikatorski sevi*                  |                                     |                                |
|-------------------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|
|                                                 |                                  | I2                                  | I3                                  | I8                             |
| Oznaka                                          | Vrsta                            | <i>Staph. epidermidis</i><br>M36-01 | <i>Staph. epidermidis</i><br>M53-01 | <i>S. salivarius</i><br>M84-01 |
| U258                                            | <i>L. casei/L. paracasei</i>     | -                                   | -                                   | +                              |
| T11                                             | <i>L. gasseri</i>                | -                                   | +                                   | +                              |
| T12                                             | <i>L. gasseri</i>                | -                                   | +                                   | +                              |
| T113                                            | <i>L. salivarius</i>             | -                                   | +                                   | -                              |
| T139                                            | <i>L. gasseri</i>                | -                                   | +                                   | +                              |
| T175                                            | <i>L. salivarius</i>             | -                                   | +                                   | +                              |
| T193                                            | <i>L. gasseri</i>                | -                                   | +                                   | +                              |
| T166                                            | <i>L. gasseri</i>                | -                                   | +                                   | +                              |
| T167                                            | <i>L. gasseri</i>                | +                                   | -                                   | +                              |
| T171                                            | <i>L. gasseri</i>                | +                                   | -                                   | +                              |
| T367                                            | <i>B. animalis subsp. lactis</i> | -                                   | -                                   | +                              |
| T453                                            | <i>B. breve</i>                  | +                                   | -                                   | +                              |

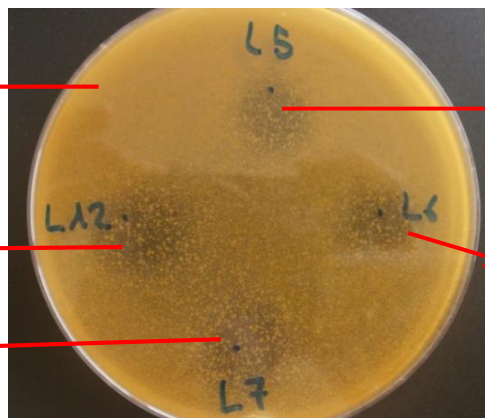
\* +: protimikrobna aktivnost je prisotna

-: protimikrobna aktivnost ni prisotna

Gojišče z izraslim  
indikatorskim sevom  
*S. salivarius* M84-01

Nevtraliziran  
supernatant  
*L. gasseri* T139

Nevtraliziran  
supernatant  
*L. gasseri* T12

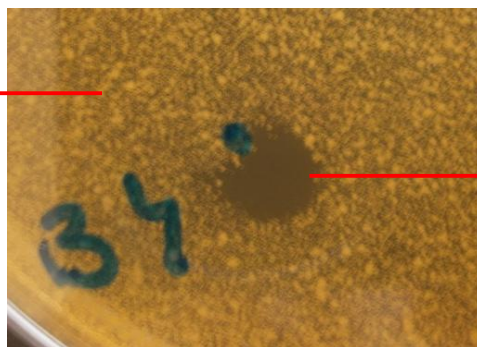


Nevtraliziran supernatant  
*L. casei/L. paracasei* U258

Nevtraliziran supernatant  
*L. gasseri* T11

Slika 11: Cone inhibicij nevtraliziranih supernatantov bakterijskih izolatov *L. casei/L. paracasei* U258 (na sliki označen z L5), *L. gasseri* T11 (na sliki označen z L6), *L. gasseri* T12 (na sliki označen z L7), *L. gasseri* T139 (na sliki označen z L12) proti indikatorskemu sevu *S. salivarius* M84-01 (I8)

Gojišče z izraslim  
indikatorskim sevom  
*Staph. epidermidis*  
M36-01



Cona inhibicije

Slika 12: Cona inhibicije nevtraliziranega supernatanta testnega izolata *B. breve* T453 (na sliki označen z B4) proti indikatorskemu sevu *Staph. epidermidis* M36-01 (I2)

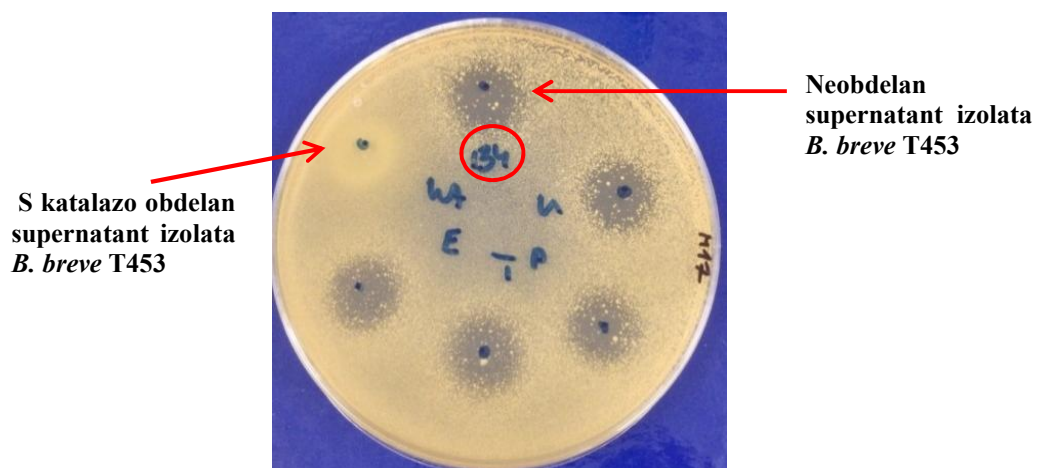
#### 4.4.2 Narava protimikrobne snovi

Nevtralizirane supernatante smo obdelali z različnimi proteolitičnimi encimi ali katalazo, da bi ugotovili, ali je snov, ki je protimikrobno aktivna, proteinske narave ali morda vodikov peroksid. V analizo smo vključili vse supernatante testnih izolatov, ki so po nevtralizaciji pokazali protimikrobno aktivnost.

Tako kot pri ugotavljanju protimikrobne aktivnosti supernatantov, smo tudi tu znotraj con inhibicij opazili rast posameznih kolonij.

Pri nobenem od sevov nismo opazili razlik v izgledu con inhibicije, povzročenih z nevtraliziranimi supernatanti in nevtraliziranimi supernatanti, obdelanimi z različnimi proteolitičnimi encimi (Slika 13). Iz tega je mogoče sklepati, da uporabljeni proteolitični encimi niso vplivali na protimikrobno aktivnost ter da za protimikrobno aktivnost niso odgovorni proteini, ki bi jih uporabljeni encimi razgradili.

Katalaza je encim, ki katalizira razgradnjo vodikovega peroksida (Tao in sod., 2009). Ker smo želeli preveriti, ali je protimikrobna snov vodikov peroksid, smo supernatantom dodali katalazo. V primeru, da indikatorski sev na mestu nanosa supernatanta z dodano katalazo zraste bolje kot na mestu nanosa neobdelanega supernatanta, bi lahko sklepali, da rast indikatorskega seva zavira vodikov peroksid, prisoten v supernatantu. Pri analizi pa smo opazili, da je bila ob dodatku katalaze celo izboljšana rast indikatorskih bakterij, zato smo preverili ali morda katalaza pomaga pri boljši rasti indikatorja. To smo preverili tako, da smo na agar z indikatorskimi sevi nanесли katalazo v isti koncentraciji, kot je bila v supernatantu. Po inkubaciji smo pri vseh treh indikatorskih sevih opazili boljšo rast na mestu, kjer smo nanесли katalazo in na ta način pokazali, da ta test ni primeren za ugotavljanje, ali je za aktivnost supernatantov odgovoren vodikov peroksid.



Slika 13: Cona inhibicije pri ugotavljanju protimikrobne aktivnosti supernatantov izolata *B. breve* T453 (na sliki označen z B4) predhodno tretiranih z encimi K: pronaza K, P: pepsin, T: tripsin, E: pronaza E in KA: katalaza proti indikatorskemu sevu *S. salivarius* M84-01 (18)

## 5 RAZPRAVA

V skladu s cilji magistrskega dela smo iz vzorcev kolostruma in mleka slovenskih žensk izolirali 324 izolatov, od katerih smo izbrali 59 unikatnih sevov. Do nivoja vrste smo identificirali 49 izolatov. V nadaljevanju smo preverili še protimikrobno aktivnost izbranih izolatov proti bakterijskim sevom, ki so najpogostejši povzročitelji mastitisa in v analize vključili tudi nekaj izolatov iz kolostruma, ki so bili predhodno pridobljeni in shranjeni v zbirki mikroorganizmov na Inštitutu za mlekarstvo in probiotike. Protimikrobno aktivnost so proti bakterijskim sevom, ki so bili izolirani iz mleka mater obolelih za mastitisom, pokazali bakterijski izolati iz rodov *Lactobacillus*, *Pediococcus* in *Bifidobacterium*. V zadnjem delu naloge smo se osredotočili še na določitev narave protimikrobne snovi. Potrdili smo, da je glavni dejavnik protimikrobne aktivnosti tvorba organske kisline in nizek pH. Predpostavili smo, da nekateri sevi lahko poleg kisline tvorijo še druge protimikrobne snovi, ki pa jih nismo mogli z gotovostjo določiti.

### 5.1 GOJITVENE METODE

V naši raziskavi nam je uspelo namnožiti 324 (46 % od vseh zamrznjenih) bakterijskih izolatov iz vzorcev humanega mleka ali kolostruma. Od tega je bilo 107 (46 % od vseh zamrznjenih) izolatov iz kolostruma, nacepljenih na gojišče Rogosa, 140 (58 % od vseh zamrznjenih) je bilo izolatov iz mleka, nacepljenih na gojišče Rogosa in 77 (34 % od vseh zamrznjenih) izolatov iz vzorcev zrelega mleka, nacepljenih na gojišče TOS z mup.

Oživitev je bila najmanj uspešna v primeru izolatov iz zrelega mleka, ki so bili prvotno pridobljeni z gojišča TOS z mup, namenjenega za selektivno gojenje bifidobakterij. Kaže, da so bifidobakterije bolj občutljive za zamrzovanje kot laktobacili. Po mikroskopskem pregledu kolonij, izraslih na gojišču TOS z mup, smo iz nadaljnje analize še dodatno izločili bakterijske izolate, ki so imeli obliko kokov.

### 5.2 IDENTIFIKACIJA BAKTERIJ

Z metodo RAPD smo pridobili vzorce pomnožkov DNA 273-ih bakterijskih izolatov in jih po podobnosti združili v skupine. Z obema z.o. smo dobili primerljive rezultate. Metoda RAPD se je izkazala za uspešno tudi v preteklih raziskavah. V raziskavi, ki so jo izvedli Tušar in sod. (2014), so primerjali vzorce pomnožkov DNA 86 domnevnih laktobacilov, izoliranih iz gojišča Rogosa. S primerjavo vzorcev pomnožkov DNA so določili 11 skupin, ki so se med seboj razlikovale. RAPD se je pokazala za uspešno metodo tudi za primerjavo bakterijskih izolatov iz rodu *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* in vrst *S. epidermidis* iz vzorcev humanega mleka in vzorcev blata dojenčkov, odvzetih v različnem času (Solís in sod., 2010).

Iz kolonij 52 izolatov smo osamili DNA, s PCR pomnožili odsek tarčnega gena za *16S rDNA* ter pridobili nukleotidna zaporedja. Za potrjevanje uspešnosti pomnoževanja s PCR smo pregledali, ali je velikost pomnožkov enaka pričakovani (1468 bp). Analizirali smo 52 izolatov, pri čemer so vsi pokazali pričakovano velikost, z izjemo dveh izolatov iz kolostruma in enega iz mleka, kjer nismo dobili pomnožkov. Nukleotidna zaporedja izbranih 49 izolatov smo primerjali s podatki v genski banki NCBI s pomočjo programa



BLAST (Preglednica 14). Od skupaj 49 vzorcev, ki smo jih poslali na sekvenciranje, smo izbrali 20 bakterijskih izolatov iz rodu *Lactobacillus*, 3 bakterijske izolate iz rodu *Bifidobacterium* in 8 bakterijskih izolatov iz rodu *Pediococcus*.

Po pričakovanjih je večina bakterijskih izolatov iz rodu *Lactobacillus* zrasla na gojišču Rogosa. Od skupaj 20 izolatov, ki smo jih uvrstili v skupino laktobacilov, je na gojišču Rogosa zraslo 19 izolatov in eden na gojišču TOS z mup. Vsi trije bakterijski izolati, ki smo jih uvrstili v skupino bifidobakterij, so zrasli na gojiščih TOS z mup. Bakterije, ki niso spadale v skupino laktobacilov ali bifidobakterij, so zrasle ali na gojišču TOS (11 izolatov) ali na gojišču Rogosa (15 izolatov) (glej preglednico 14). Te smo, razen pediokokov (8 izolatov), izključili iz nadaljnje analize.

Rogosa je gojišče, ki podpira rast laktobacilov, ni pa popolnoma selektivno, saj na njem lahko zrastejo tudi posamezni predstavniki drugih rodov, predvsem *Pediococcus* in *Enterococcus*. Slabo selektivnost gojišča Rogosa so opisali tudi Jost in sod. (2013). Možna razlaga je ta, da je *Ped. acidilactici* manj občutljiv na sobno temperaturo in ima zato boljše stopnjo preživetja na gojišču Rogosa (Attri in sod., 2015). *Ped. acililactici* smo izbrali za nadaljnje analize protimikrobnega delovanja, čeprav smo predpostavili, da bodo proti indikatorskim sevom bolje delovali izolati iz rodu *Lactobacillus* in *Bifidobacterium*.

Izolati laktobacilov so bili identificirani kot *L. gasseri*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. salivarius* in *L. crispatus*. Prevladujoča vrsta je bila *L. gasseri* (10 izolatov) in *L. fermentum* (6 izolatov). Od predstavnikov *Bifidobacterium* smo potrdili izolate iz vrst *B. breve* in *B. animalis subsp. lactis*. Rezulati so skladni z literaturnimi podatki (Martin in sod., 2003, Heikkilä in Saris, 2003).

Pri nekaterih sevih nismo uspeli zanesljivo potrditi vrste. Tak primer je *Ped. acidilactici*, *Ped. pentosaceus* ali *Ped. lolii*. Omenjene vrste so si zelo podobne po nukleotidnem zaporedju *16S rDNA*, zato sevov omenjenih vrst včasih ne moremo razločiti samo na podlagi delnega zaporedja *16S rDNA*. Če bi želeli vedeti, katera vrsta je, bi lahko bodisi sekvencirali celotno *16S rDNA*, drug del DNA ali pa naredili vrstno specifičen PCR (Bushell in Burns, 2012).

V nadaljnje analize ugotavljanja protimikrobne aktivnosti smo vključili tudi izolate iz kolostruma, ki so bili predhodno izolirani na gojišču MRS in shranjeni v zbirki mikroorganizmov na Inštitutu za mlekarstvo in probiotike. Za ugotavljanje protimikrobne aktivnosti proti indikatorskim sevom smo tako izbrali 25 bakterijskih izolatov iz rodu *Lactobacillus*, 18 iz rodu *Pediococcus* in 4 iz rodu *Bifidobacterium*.

### 5.3 PROTIMIKROBNA AKTIVNOST

Indikatorski sevi, ki smo jih uporabili v raziskavi, so bili predstavniki vrst, ki so najbolj pogoste povzročiteljice mastitisa pri ženskah (*Staphylococcus*, *Streptococcus* in *Corynebacterium*). Med njimi so stafilokoki glavni povzročitelji infekcijskega mastitisa. Dolgo časa je veljalo, da so bakterije *Staphylococcus aureus* najpogostejše povzročiteljice mastitisa, zadnje čase pa se uveljavlja prepričanje, da so bakterije *Staph. epidermidis* pri

mastitičnem obolenju pogosto prisotne v še višjih koncentracijah kot *Staph. aureus* (Jiménez in sod., 2008; Heikkilä in Saris, 2003).

Kot najbolj protimikrobno aktivni proti indikatorskim sevom, ki sodijo v vrste, povezane z mastitisom, so se pokazali sevi iz vrst *L. gasseri*, saj so vsi sevi pokazali protimikrobno aktivnost. Tudi oba seva iz vrste *L. salivarius* in sev iz vrste *L. casei* ali *L. paracasei* so izkazali močno protimikrobno aktivnost. Protimikrobno aktivnost so izkazali tudi trije od štirih sevov bifidobakterij. Ostali laktobacili in pediokoki so le redko pokazali protimikrobno aktivnost.

Inhibicijo, ki je glede na izgled cone značilna za bakteriocine, smo opazili pri bakterijskih izolatih *L. gasseri* T11 proti indikatorskim bakterijam *Staph. epidermidis* in *Staph. aureus*, izolata *L. gasseri* T193 proti *Staph. lugdunensis* in *S. salivarius*, izolata *L. gasseri* T171 proti *Staph. aureus* in izolata *B. breve* T453 proti *Staph. aureus*. Da bistra cona inhibicije indikatorskih sevov in oster rob cone inhibicije kažejo na delovanje bakteriocinov, so poročali raziskovalci v predhodnih raziskavah (Rodríguez in sod., 2012). Morebitno prisotnost bakteriocinov smo ugotavljali s preskušanjem supernatantov testnih kultur, ki smo jih obdelali s proteolitičnimi encimi.

Protimikrobno aktivnost v supernatantih izolatov, ki smo jih nevtralizirali, da bi izključili vpliv organskih kislin in pH, so pokazali izolati iz vrst *L. casei/L. paracasei*, *L. gasseri*, *L. salivarius*, *B. animalis subsp. lactis* in *B. breve*. Iz tega lahko sklepamo, da je dobra polovica (52 %) izolatov izkazala protimikrobno aktivnost, ki ni izključno vezana na tvorbo organskih kislin. Olivares in sod. (2006) so v svoji raziskavi opazili protimikrobno delovanje supernatantov, pridobljenih po lizi in centrifugiranju iz različnih laktobacilov iz humanega mleka (*L. gasseri* CECT5714, *L. gasseri* CECT5715, *L. fermentum* CECT5716, *L. salivarius* CECT5713, in *L. coryniformis* CECT5711), proti večini patogenih mikroorganizmov (*Salmonella choleraesuis* CECT4155, CECT409 in CECT443, *Escherichia coli* CECT439, O157:H7 in CECT4076, *Staph. aureus* CECT4013 in CECT976, *Listeria monocytogenes* Scott A in *Clostridium tyrobutyricum* CECT4011). Takšna protimikrobna aktivnost se po nevtralizaciji supernatantov na pH 7 ni več pokazala, zato so jo pripisali v prvi vrsti delovanju organskih kislin in pH.

Vsi bakterijski izolati, pri katerih je bilo v preizkusu s kulturami (spot-test) in v preizkusu z netretiranimi supernatanti opaziti bistro cono in oster rob inhibicije, so po nevtralizaciji še vedno pokazali protimikrobno aktivnost.

#### 5.4 PROTIMIKROBNA UČINKOVINA

Za ugotavljanje narave protimikrobne učinkovine smo nevtralizirane supernatante obdelali z različnimi proteolitičnimi encimi in katalazo, da bi ugotovili, ali smo z obdelavo vplivali na protimikrobno aktivnost.

Inhibicijske cone so ostale nespremenjene. Tudi razlik med conami neobdelanih supernatantov in conami obdelanih supernatantov s proteolitičnimi encimi nismo opazili. Opazili pa smo, da je pri ugotavljanju protimikrobne aktivnosti, kot tudi pri ugotavljanju narave protimikrobne snovi, znotraj con inhibicij vidna rast posameznih kolonij. Kolonije

so zrasle znotraj cone inhibicije bodisi zato, ker so nekatere kolonije indikatorskega seva razvile odpornost proti snovi, ki ostale kolonije inhibira, ali pa zato, ker so indikatorske kulture mešanica dveh različnih sevov, od katerih je en bolj odporen, drugi pa bolj občutljiv za protimikrobne snovi. Prav tako smo opazili, da je bila ob dodatku katalaze ali s katalazo obdelanih supernatantov izboljšana rast nekaterih indikatorskih bakterij. Ker je že sama katalaza (brez supernatanta) vplivala na izboljšano rast indikatorskih bakterij, izid testa ne potrjuje, da je v supernatantih res prisoten vodikov peroksid. Martin in sod. (2005) so sicer v svoji raziskavi opazili, da izolati iz humanega mleka *L. fermentum* CECT5716, *L. gasseri* CECT5714 in *L. gasseri* CECT5715, gojeni na agarju MRS, izločajo velike količine mlečne kisline in vodikovega peroksida, ne pa bakteriocinov ali reuterina.

Lahko sklepamo, da nekateri izolati, ki so izkazali inhibicijo pri preizkusu supernatantov, obdelanih s proteolitičnimi encimi ali katalazo, poleg kisline tvorijo še protimikrobne snovi, ki jih izbrani proteolitični encimi ali katalaza niso razgradili. Lahko, da gre za bakteriocine, ki jih z izbranimi proteolitičnimi encimi nismo uspeli razgraditi, ali za kake druge snovi.

Vse bakterijske vrste iz rodov *Lactobacillus* in *Bifidobacterium*, ki jih najdemo v humanem mleku, veljajo za varne, oziroma imajo status QPS (angl. Qualified Presumption of Safety), določen s strani Evropske agencije za varno hrano (angl. European Food Safety Authority (EFSA, 2015)). Tipične predstavnice so *L. gasseri*, *L. salivarius*, *L. reuteri*, *L. fermentum* in *B. breve*. Te bakterije imajo sposobnost preživetja v našem prebavnem traktu in sobivanja z gostiteljem v simbiotskem odnosu vse od rojstva. Poleg tega imajo nekateri sevi protimikrobno, protivnetno, imunomodulatorno in/ali metabolno vlogo. Arroyo in sod. (2010) so pokazali, da posamezni izolati mlečnokislinskih bakterij, predvsem iz rodu laktobacilov, kažejo protimikrobno aktivnost proti povzročiteljem mastitisa. Za dva seva laktobacilov, osamljena iz humanega mleka (*L. fermentum* CECT 5716 in *L. salivarius* CECT 5713), so dokazali učinkovitost za zdravljenje infekcijskega mastitisa med dojenjem tudi v klinični študiji, v kateri so matere uživale bakterije v liofilizirani obliki.

Glede na pridobljene rezultate lahko zaključimo, da so v humanem kolostrumu in mleku prisotne kultivabilne mlečnokislinske bakterije in bifidobakterije, ki izkazujejo protimikrobno aktivnost proti najpogostejšim povzročiteljem laktacijskega mastitisa. Nadaljnje raziskave v tej smeri so zato ključnega pomena.

Na podlagi rezultatov magistrskega dela smo potrdili prve tri zastavljene hipoteze. V humanem kolostrumu in mleku smo določili prisotnost mlečnokislinskih bakterij in bifidobakterij, ki so pokazale protimikrobno aktivnost proti posameznim povzročiteljem mastitisa. Prav tako je večina izkazala protimikrobno aktivnost s tvorbo organske kisline in nizke vrednosti pH. Z gotovostjo pa nismo mogli potrditi zadnje hipoteze, saj nam ni uspelo dokazati prisotnosti bakteriocinov.

## 6 SKLEPI

- Kolostrum in mleko sta bogata vira mlečnokislinskih bakterij in bifidobakterij.
- V mleku in kolostrumu prevladujoči sevi, ki so izkazali zelo dobre protimikrobne lastnosti, pripadajo vrsti *L. gasseri*. Kot najbolj protimikrobno aktiven se je pokazal sev *L. gasseri* T193.
- Seva bifidobakterij iz mleka, ki sta pokazala zelo dobre protimikrobne lastnosti, pripadata vrsti *B. breve*. Najbolj protimikrobno aktiven je bil sev *B. breve* T453.
- Poglavitni dejavniki protimikrobne aktivnosti izbranih bakterijskih izolatov so organske kisline in nizka vrednost pH.
- Najbolj učinkovito protimikrobno aktivnost so bakterijski izolati iz kolostruma in mleka pokazali proti indikatorskim bakterijam iz vrst *Staph. epidermidis* in *Staph. aureus*, ki sta najpogostejši povzročiteljici mastitisa pri ženskah.
- Protimikrobno aktivnost, ki ni izključno vezana na tvorbo organskih kislin, so izkazali bakterijski izolati iz vrst *L. gasseri*, *L. salivarius*, *L. casei* ali *L. paracasei*, *B. animalis subsp. lactis* in *B. breve*. Predpostavimo lahko, da slednji tvorijo protimikrobne snovi, ki jih izbrani proteolitični encimi ali katalaza niso razgradili.

## 7 POVZETEK

Mlečna žleza v fazi laktacije preide preko mnogih sprememb. Povečan dotok limfe in krvi do mlečne žleze in sproščanje oksitocina vpliva na kontrakcijo mioepitelnih celic in s tem tudi na prisotnost endogenih bakterij v mleku. Sprememba mlečne žleze pozitivno vpliva na formacijo biofilma v mlečnih vodih in mlečni areoli, kar vodi v razvoj specifične mikrobiote mlečne žleze. Klinične študije so dokazale, da ima kontroliran vnos specifičnih bakterijskih sevov ključen pomen pri preprečevanju bolezni ali izboljšanju zdravstvenega stanja tudi izven gastrointestinalnega trakta. Vir bakterij mlečne žleze je tudi materina koža in dojenčkova ustna mikrobiota. Nekatere študije nakazujejo, da lahko določene bakterije iz materinega črevesja uporabijo mononuklearne celice imunskega sistema za prenos do mlečne žleze in kasneje, prek mleka, tudi do dojenčkovega črevesja.

V nalogi smo proučili 273 izolatov, predhodno pridobljenih iz vzorcev kolostruma in mleka. Z metodo RAPD smo pridobili vzorce pomnožkov DNA in jih po podobnosti združili v skupine. Od 273 oživiljenih bakterijskih izolatov, smo jih s sekvenciranjem identificirali do vrste 49. Rezultati analiz so pokazali, da 20 bakterijskih izolatov sodi v rod *Lactobacillus*, trije v rod *Bifidobacterium*, 8 v rod *Pediococcus*, dva v rod *Enterococcus*, štiri v rod *Staphylococcus*, eden v rod *Corynebacterium* in 11 v rod *Actinomyces*. Obravnavali smo samo bakterije iz rodu *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* in *Pediococcus*. V nadaljnje analize, ki so vključevale ugotavljanje protimikrobne aktivnosti, smo vključili tudi izolate, ki so bili predhodno pridobljeni iz mleka in kolostruma ter shranjeni v zbirki mikroorganizmov Inštituta za mlekarstvo in probiotike. Za ugotavljanje protimikrobne aktivnosti proti indikatorskim bakterijam smo tako izbrali 25 bakterijskih izolatov iz rodu *Lactobacillus*, 18 iz rodu *Pediococcus* in 4 iz rodu *Bifidobacterium*. Močno protimikrobno aktivnost proti indikatorskim bakterijam so pokazale predvsem predstavnice vrst *L. gasseri*, *L. salivarius*, *L. casei* ali *L. paracasei* in *B. breve*. Glavni dejavniki protimikrobne aktivnosti so bile tvorba organske kisline in nizek pH. Najbolj učinkovito protimikrobno aktivnost so bakterijski izolati pokazali proti indikatorskima bakterijama *Staph. epidermidis* in *Staph. aureus*, ki sta najpogostejši povzročiteljici mastitisa pri ženskah.

Predpostavili smo, da je pri nekaterih izolatih iz vrst *L. gasseri*, *L. salivarius*, *L. casei* ali *L. paracasei*, *B. animalis subsp. lactis* in *B. breve*, poleg kisline prisotna še protimikrobna snov, ki je najverjetneje bakteriocin, ki ga z izbranimi proteolitičnimi encimi nismo uspeli inaktivirati. Ne moremo tudi izključiti možnosti, da nekateri bakterijski izolati tvorijo vodikov peroksid.

Zaključili smo, da so potrebne nadaljnje raziskave v smeri proučevanja možnih protimikrobnih snovi, ki jih tvorijo bakterije, osamljene iz kolostruma in mleka. V naši raziskavi nam je uspelo dokazati, da so v humanem mleku in kolostrumu prisotne bakterije, ki imajo dobre protimikrobne lastnosti proti bakterijam, ki so najpogostejše povzročiteljice laktacijskega mastitisa in bi zato lahko predstavljale dobro alternativo zdravljenju mastitisa z antibiotiki.

## 8 VIRI

- Arroyo R., Martín V., Maldonado A., Jiménez E., Fernández L., Rodríguez J. M. 2010. Treatment of infectious mastitis during lactation: antibiotics versus oral administration of lactobacilli isolated from breast milk. *Clinical Infectious Diseases*, 50, 12: 1551–1558
- Arthur P. G., Jones T. J., Spruce J., Hartmann P. E. 1989. Measuring short-term rates of milk synthesis in breast-feeding mothers. *Quarterly Journal of Experimental Physiology*, 74, 4: 419–428
- Attri P., Jodha D., Gandhi D., Chanalía P., Dhanda S. 2015. *In vitro* evaluation of *Pediococcus acidilactici* NCDC 252 for its probiotic attributes. *International Journal of Dairy Technology*, 68: 533–542
- Barrangou R., Lahtinen S. J., Ibrahim F., Ouwehand A. C. 2011. Genus *Lactobacillus*. V: *Lactic acid bacteria - microbiological and functional aspects*. Lahtinen S., Ouwehand A. C., Salminen S., Wright A. (eds.). New Yourk, CRC Press: 77–91
- Biavati B., Vescovo M., Torriani S., Bottazzi V. 2000. Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Annals of Microbiology*, 131, 50: 117–131
- Bogovič-Matijasić B., Rogelj I., Nes I. F., Holo H. 1998. Isolation and characterization of two bacteriocins of *Lactobacillus acidophilus* LF221. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49, 5: 606–612
- Bushell C., Burns M. 2012. Feasibility study into the use of DNA sequencing for the identification of probiotic bacteria. *Journal of the Association of Public Analysts*, 40: 28–38
- Cabrera-Rubio R., Collado M. C., 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
- Collins B., Cotter P. D., Hill C., Ross R. P. 2010. Applications of lactic acid bacteria - produced bacteriocins. V: *Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications*. Mozzi F., Raya R., Vignolo G. (eds.). Iowa, Wiley - Blackwell Publishing: 89–110
- Costello E. K., Lauber C. L., Hamady M., Fierer N., Gordon J. I., Knight R. 2009. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science*, 326, 5960: 1694–1697
- Delgado S., Arroyo R., Jiménez E., Marín M. L., del Campo R., Fernández L., Rodríguez J. M. 2009. *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from breast milk of women suffering infectious mastitis: potential virulence traits and resistance to antibiotics. *BMC Microbiology*, 9: 82, doi:10.1186/1471-2180-9-82: 11 str.

- EFSA. 2015. Statement on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA. 2: Suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2015. EFSA Journal, 13, 6: 4138, doi:10.2903/j.efsa.2015.4138: 29 str.
- Fernández L., Langa 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: 1–10
- Filteau S. M., Lietz G., Mulokozi G., Bilotta S., Henry C. J. K., Tomkins A. M. 1999. Milk cytokines and subclinical breast inflammation in Tanzanian women: effects of dietary red palm oil or sunflower oil supplementation. Immunology, 97: 595–600
- Foxman B., D'Arcy H., Gillespie B., Bobo J. K., Schwartz K. 2002. Lactation mastitis: occurrence and medical management among 946 breastfeeding women in the United States. American Journal of Epidemiology, 155, 2: 103–114
- Galdeano C. M., de LeBlanc A., Dogi C., Perdigon G. 2010. Lactic acid bacteria as immunomodulators of the gut - associated immune system. V: Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications. Mozzi F., Raya R., Vignolo G. (eds.). Iowa, Wiley - Blackwell Publishing: 125–140
- Gdalevich M., Mimouni D., David M., Mimouni M. 2001. Breast-feeding and the onset of atopic dermatitis in childhood: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. Journal of the American Academy of Dermatology, 45, 4: 520–527
- Guaraldi F., Salvatori G. 2012. Effect of breast and formula feeding on gut microbiota shaping in newborns. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2: 94, doi: 10.3389/fcimb.2012.00094: 4 str.
- Gunther M. 1958. Discussion on the breast in pregnancy and lactation. Proceedings of the Royal Society of Medicine, 51: 305–309
- Han N. S., Kim T. J., Park Y. C., Kim J., Seo J. H. 2012. Biotechnological production of human milk oligosaccharides. Biotechnology Advances, 30, 6: 1268–1278
- Hartmann P. E. 2007. The lactating breast: an overview from down under. Breastfeeding Medicine, 2, 1: 3–9
- Hassan M., Kjos M., Nes I. F., Diep D. B., Lotfipour F. 2012. Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. Journal of Applied Microbiology, 113, 4: 723–736
- Heikkilä M. P., Saris, P. E. J. 2003. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. Journal of Applied Microbiology, 95, 3: 471–478

- Huys G., Botteldoorn N., Delvigne F., De Vuyst L., Heyndrickx M., Pot B., Daube G. 2013. Microbial characterization of probiotics advisory report of the working group "8651 Probiotics" of the Belgian Superior Health Council (SHC). *Molecular Nutrition and Food Research*, 57, 8: 1479–1504
- Jacobsen C. N., Rosenfeldt Nielsen V., Hayford A. E., Møller P. L., Michaelsen K. F., Pærregaard A., Sandström B., Tvede M., Jakobsen M. 1999. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus spp.* by *in vitro* techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 4949–4956
- Jiménez E., Fernández L., Maldonado A., Martín R., Olivares M., Xaus J., Rodríguez J. M. 2008. Oral administration of *Lactobacillus Strains* isolated from breast milk as an alternative for the treatment of infectious mastitis during lactation. *Applied and Environmental Microbiology*, 74; 15: 4650–4655
- Jost T., Lacroix C., Braegger C., Chassard C. 2013. Assessment of bacterial diversity in breast milk using culture-dependent and culture-independent approaches. *British Journal of Nutrition*, 110: 1253–1262
- Kinlay J. R., O' Connell D. L., Kinlay S. 2001. Risk factors for mastitis in breastfeeding women: results of a prospective cohort study. *Australian and New Zealand Journal of Public Health*, 25, 2: 115–120
- Lara-Villoslada F., Olivares M., Sierra S., Miguel Rodríguez J., Boza J., Xaus J. 2007. Beneficial effects of probiotic bacteria isolated from breast milk. *British Journal of Nutrition*, 98, 1: 96–100
- Livingstone V. 1996. Too much of a good thing. Maternal and infant hyperlactation syndromes. *Canadian Family Physician*, 42: 89–99
- Macias H., Hinck L. 2013. Mammary gland development. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 1, 4: 533–557
- Macpherson A. J. 2004. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science*, 303, 5664: 1662–1665
- Madigan M., Martinko J., Bender K., Buckley D., Stahl A. 2015. *Brock biology of microorganisms*. Boston, Pearson: 1030 str.
- Maldonado J., Cañabate F., Sempere L., Vela F., Sánchez A. R., Narbona E., Lara-Villoslada F. 2012. Human milk probiotic *Lactobacillus fermentum* CECT5716 reduces the incidence of gastrointestinal and upper respiratory tract infections in infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 54, 1: 55–61



- Martin R., Olivares M., Marín M. L., Fernández L., Xaus J., Rodríguez J. M. 2005. Probiotic potential of 3 lactobacilli strains isolated from breast milk. *Journal of Human Lactation*, 21, 1: 8–17
- Martin R., Langa S., Reviriego C., Jimenez E., Marin M., Olivares M., Boza J., Jimenez J., Fernández L., Xaus J., Rodríguez J. 2003. The commensal microflora of human milk: new perspectives for food bacteriotherapy and probiotics. *Trends in Food Science & Technology*, 15: 121–127
- McManaman J. L., Neville M. C. 2003. Mammary physiology and milk secretion. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55: 629–641
- Morrow A. L., Rangel J. M. 2004. Human milk protection against infectious diarrhea: implications for prevention and clinical care. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, 15, 4: 221–228
- Mušič M. M., Hertl K., Kadivec M., Podkrajšek M., Jereb S. 2004. Rentgenska in ultrazvočna anatomija dojke. *Radiology and Oncology*, 38, 1: 51–57
- Newburg D. S. 2005. Innate immunity and human milk. *Journal of Nutrition*, 135, 5: 1308–1312
- Oftedal O. T. 2002. The mammary gland and its origin during synapsid evolution. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 7, 3: 225–252
- O'Hara A. M., Shanahan, F. 2006. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Reports*, 7, 7: 688–693
- Olivares M., Diaz-Ropero M. P., Martin R., Rodríguez J. M., Xaus J. 2006. Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 1: 72–79
- Parakhia M. V., Tomar S. R., Patel S., Golakiya B. A. 2010. Molecular biology and biotechnology: microbial methods. New Delhi, New India Publishing Agency: 521 str.
- Penders J., Thijs C., Vink C., Stelma F. F., Snijders B., Kummeling I., Stobberingh E. E. 2006. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics*, 118, 2: 511–521
- Perez P. F., Dore J., Leclerc M., Levenez F., Benyacoub J., Serrant P., Donnet-Hughes A. 2007. Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? *Pediatrics*, 119, 3: 724–732
- Pirotta M. V., Garland S. M. 2006. Genital candida species detected in samples from women in Melbourne, Australia, before and after treatment with antibiotics. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 9: 3213–3217

- Planinc A., Pusovnik A. 2012. Mastitis. V: Izzivi družinske medicine. Učno gradivo - zbornik seminarjev. Cvetić G., Žviželj A., Planinc A. (ur.). Maribor, Zavod za razvoj družinske medicine: 198–204
- Prentice A., Addeyt C. V. P., Wildet C. J. 1988. Evidence for local feedback control of human milk secretion. *Biochemical Society Transactions*, 17: 489–492
- Ramsay D. T., Kent J. C., Owens R. A., Hartmann P. E. 2004. Ultrasound imaging of milk ejection in the breast of lactating women. *Pediatrics*, 113, 2: 361–367
- Rescigno M., Urbano M., Valzasina B., Francolini M., Rotta G., Bonasio R., Ricciardi-Castagnoli P. 2001. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature Immunology*, 2, 4: 361–367
- Rescigno M., Citterio S., Thery C., Rittig M., Medaglini D., Pozzi G., Amigorena S., Ricciardi-Castagnoli P. 1998. Bacteria-induced neo-biosynthesis, stabilization, and surface expression of functional class I molecules in mouse dendritic cells. *Immunology*, 95, 9: 5229–5234
- Riordan J. 2005. Anatomy and physiology of lactation. V: Breastfeeding and human lactation. 3<sup>rd</sup> ed. Riordan J. (ed.). Sudbury, Jones and Bartlett Publishers: 66-95
- Rodríguez E., Arqués L., Rodríguez R., Peiroten A., Landete J., Medina M. 2012. Antimicrobial properties of probiotic strains isolated from breast-fed infants. *Journal of Functional Foods*, 4: 542-551
- Rolfe R. D. 2000. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *Journal of Nutrition*, 130, 2: 396S–402S
- Russo J., Russo I. H. 2004. Development of the human breast. *Maturitas*, 49, 1: 2–15
- Schell M. A., Karmirantzou M., Snel B., Vilanova D., Berger B., Pessi G., Arigoni F. 2002. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proceeding of the National Academy of Science U.S.A.*, 99: 14422–14427
- Schirbel A., Kessler S., Rieder F., West G., Rebert N., Asosingh K., Fiocchi C. 2013. Pro-angiogenic activity of TLRs and NLRs: a novel link between gut microbiota and intestinal angiogenesis. *Gastroenterology*, 144, 3: 613–623
- Solís G., de los Reyes-Gavilan C. G., Fernández N., Margolles A., Gueimonde M. 2010. Establishment and development of lactic acid bacteria and bifidobacteria microbiota in breast-milk and the infant gut. *Anaerobe*, 16: 307 -310
- Strong G. D. 2011. Provider management and support for breastfeeding pain. *Journal of Obstetric, Gynecologic and Neonatal Nursing*, 40, 6: 753–764

- Škorjanc U. 2015. Kolostrum kot vir mlečnokislinskih bakterij in bifidobakterij za novorojenca. Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 64 str.
- Šušković J., Kos B., Beganović J., Leboš Pavunc A., Habjanič K., Matošić S. 2010. Antimicrobial activity: the most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. *Food Technology and Biotechnology*, 48, 3: 296-307
- Takač I. 1996. Osnove anatomije, fiziologije in patologije dojke. *Obzornik Zdravstvene Nege*, 30: 193–196
- Tao Z., Raffel R., Souid A., Goodisman J. 2009. Kinetic studies on enzyme-catalyzed reactions: oxidation of glucose, decomposition of hydrogen peroxide and their combination. *Biophysical Journal*, 96: 2977-2988
- 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
- Tušar T., Žerdoner K., Bogovič Matijašić B., Paveljšek D., Benedik E., Bratanič B., Fidler Mis N., Rogelj I. 2014. Cultivable bacteria from milk from Slovenian breastfeeding mothers. *Food Technology and Biotechnology*, 52: 242-247
- Vandenplas Y., Ghanma A., Franckx J., Peeters S., Pletincx M., Hauser B. 2013. Probiotics and prebiotics in infant formula. *Zdravniški Vestnik*, 82, 1: 70–76
- Vazquez-Torres A., Jones-Carson J., Baumler A. J., Falkow S., Valdivia R., Brown W., Fang F. C. 1999. Extraintestinal dissemination CD18-expressing phagocytes. *Nature*, 401: 623–626
- Vendt N., Grünberg H., Tuure T., Malminiemi O., Wuolijoki E., Tillmann V., Korpela R. 2006. Growth during the first 6 months of life in infants using formula enriched with *Lactobacillus rhamnosus* GG: double-blind, randomized trial. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 19, 1: 51–58
- Vincent D., Roy D., Mondou F., Déry C. 1998. Characterization of bifidobacteria by random DNA amplification. *International Journal of Food Microbiology*, 43, 3: 185–193
- WHO. 2000. Mastitis: causes and management. Geneva, World Health Organization: 45 str.  
[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/66230/1/WHO\\_FCH\\_CAH\\_00.13\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/66230/1/WHO_FCH_CAH_00.13_eng.pdf)  
(december 2015)
- Yu J., Wang W. H., Menghe B. L. G., Jiri M. T., Wang H. M., Liu W. J., 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

Srdarev T. Protimikrobna aktivnost mlečnokislinskih bakterij...proti povzročiteljem mastitisa.  
Mag. delo (Du2). Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, 2016

---

Yuan K. L., Salminen S. 2009. Handbook of probiotics and prebiotics. 2<sup>nd</sup> ed. Hoboken, New Jersey, John Wiley & Sons, Inc: 596 str.

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se mentorici viš. znan. sod. dr. Bojani Bogovič Matijašić za vso strokovno pomoč, nasvete, potrpežljivost in vložen trud pri nastajanju magistrskega dela.

Najlepša hvala tudi somentorici asist. dr. Petri Mohar Lorbeg, ki me je potrpežljivo uvedla v laboratorijsko delo na Oddelku za mlekarstvo in probiotike. Poleg tega je bila vedno odprta za razpravo o delu, me usmerjala in mi nudila strokovno pomoč skozi celotno nastajanje magistrskega dela.

Recenzentki prof. dr. Poloni Jamnik se zahvaljujem za zelo natančen pregled magistrskega dela, strokovne nasvete in komentarje.

Zahvaljujem se vsem zaposlenim na Inštitutu za mlekarstvo in probiotike za izredno prijaznost in prijetno delovno okolje.

Lini Burkan Makivić se zahvaljujem za natančen pregled končnega dela.

Hvala tudi vsem prijateljem in prijateljicam za vsa nepozabna študijska leta.

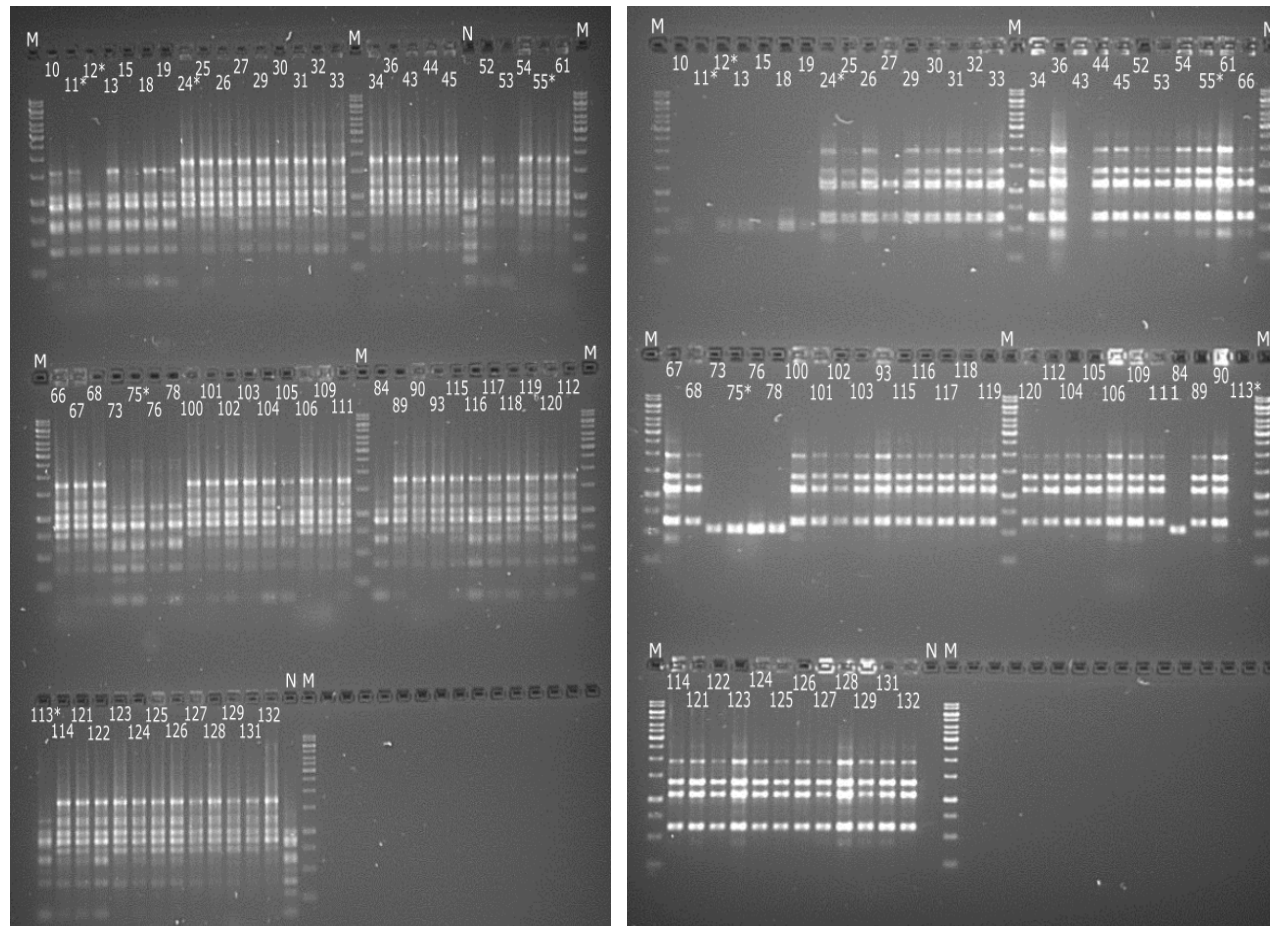
Na posebnem mestu se zahvaljujem tudi staršema, bratu in vsem najožjim sorodnikom za vso spodbudo, ljubezen in omogočanje zaključka brezskrbnega in nepozabnega študija.

Posebna zahvala gre fantu Luki za vso pomoč, podporo, potrpežljivost in vzpodbudne besede, tako tekom študija kot pri nastajanju tega dela.

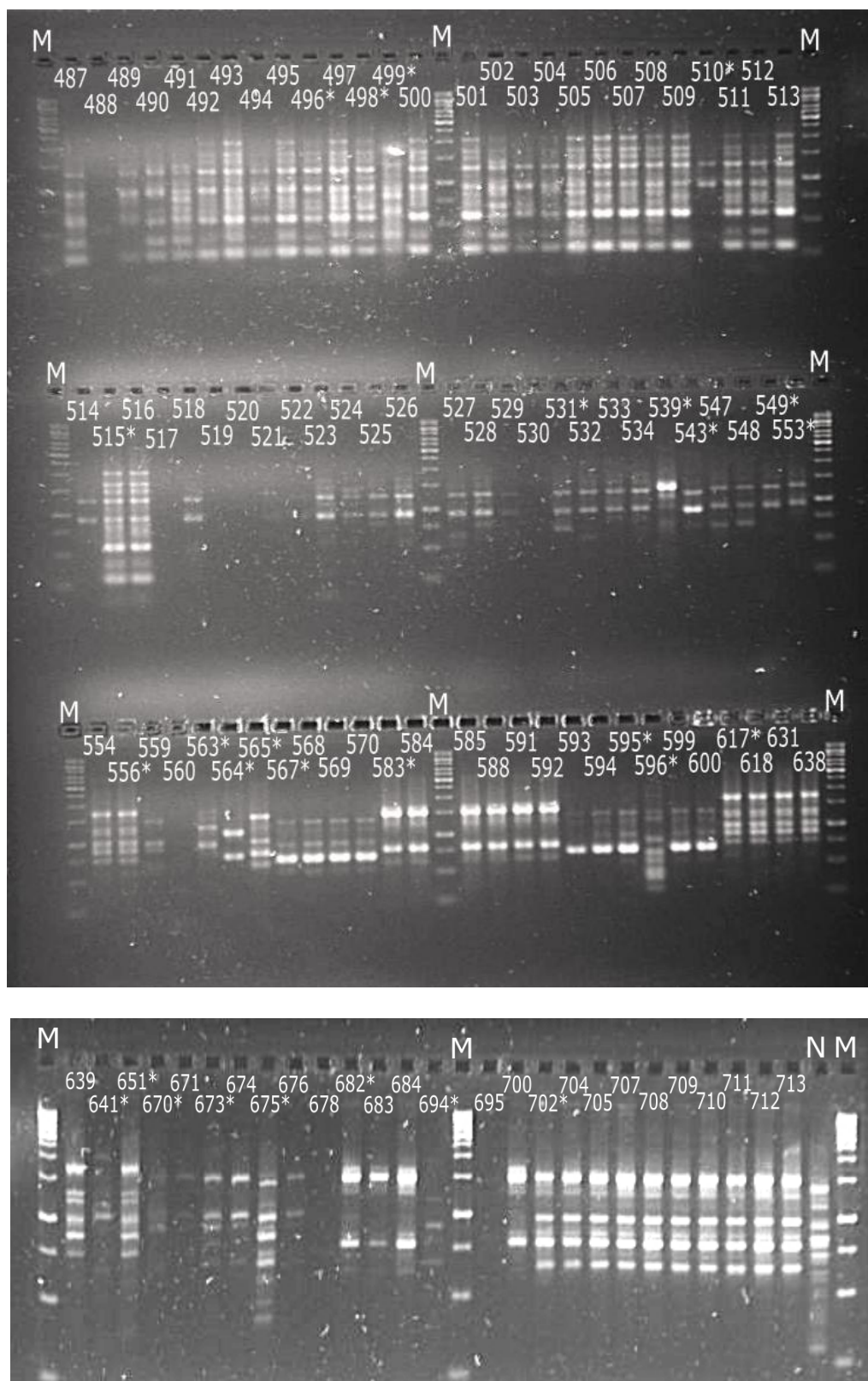
Prav tako se zahvaljujem vsem, ki ste me med mojo študijsko potjo spodbujali in mi stali ob strani.

## PRILOGE:

### Priloga A: Rezultati analiz RAPD



Priloga A1: Vzorci RAPD z z. o. M13 (levo) in KGT 70-GC (desno), Stolpec M: Molekulski označevalec velikosti DNA (1 kb), Stolpec N: negativna kontrola. Vsi izolati so iz vzorcev zrelega mleka, zraslih na gojiščih Rogosa, izolati, ki smo jih izbrali za nadaljnje analize so označeni z \*



Priloga A2: Vzorci RAPD z z. o. M13, Stolpec M: Molekulski označevalec velikosti DNA (1 kb), Stolpec N: negativna kontrola. Vsi izolati so iz vzorcev kolostruma, zraslih na gojiščih Rogosa, izolati, ki smo jih izbrali za nadaljnje analize so označeni z \*