

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Polona ZABUKOVEC

**IDENTIFIKACIJA BIFIDOBAKTERIJ OSAMLJENIH  
IZ ČREVESNE SLUZNICE OTROK**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja Prehrana

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Polona ZABUKOVEC

**IDENTIFIKACIJA BIFIDOBAKTERIJ OSAMLJENIH IZ ČREVESNE  
SLUZNICE OTROK**

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij - 2. stopnja Prehrana

**IDENTIFICATION OF BIFIDOBACTERIA ISOLATED FROM  
INTESTINAL MUCOSA OF CHILDREN**

M. Sc. Thesis  
Master Study Programmes: Field Nutrition

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Prehrana. Opravljeno je bilo na Katedri za mlekarstvo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala doc. dr. Andrejo Čanžek Majhenič in za recenzentko izr. prof. dr. Barbaro Jeršek.

Mentorica: doc. dr. Andreja Čanžek Majhenič

Recenzentka: izr. prof. dr. Barbara Jeršek

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

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.

Polona Zabukovec

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ŠD | Du2                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| DK | UDK 579.22/.25:579.86:577.2.083(043)=163.6                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| KG | bifidobakterije/probiotiki/črevesna mikrobiota/črevesna sluznica/morfološke lastnosti/primernost gojišč/molekularne tehnike/PCR identifikacija rodu/RAPD razlikovanje sevov/encimski test F6PPK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| AV | ZABUKOVEC, Polona, dipl. inž. živ. in preh. (UN)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| SA | ČANŽEK MAJHENIČ, Andreja (mentorica)/ JERŠEK, Barbara (recenzentka)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| KZ | SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| ZA | Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| LI | 2015                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| IN | IDENTIFIKACIJA BIFIDOBakterij OSAMLJENIH IZ ČREVESNE SLUZNICE OTROK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| TD | Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja Prehrana)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| OP | X, 76 str., 15 pregl., 21 sl., 80 vir.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| IJ | sl                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| JI | sl/en                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| AI | Bifidobakterije so skupina mikroorganizmov, ki med prvimi poselijo prebavni trakt. Naselitev se začne že ob rojstvu, ko iz materinega genitalnega in prebavnega trakta naselijo dojenčkov gastrointestinalni trakt. Pri raziskovalni nalogi smo se posvetili identifikaciji in karakterizaciji 56 izolatov bifidobakterij osamljenih iz črevesne sluznice otrok. Z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) smo vse preiskovane bakterije potrdili za pripadnice rodu <i>Bifidobacterium</i> . Z naključno pomnoženo polimorfno DNA (RAPD) z dvema začetnima oligonukleotidoma, smo ugotovili veliko genetsko raznolikost med posameznimi sevi bifidobakterij. PCR in RAPD sta omogočila identifikacijo izolatov iz kompleksnega okolja kot je črevesna sluznica ter določitev njihove raznolikosti. |

## KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2

DC UDC 579.22/.25:579.86:577.2.083(043)=163.6

CX bifidobacteria/probiotics/gut microbiota/intestinal mucosa/morphological properties/suitability of media/molecular techniques/PCR method for genus/RAPD method for strains/enzymatic test F6PPK

AU ZABUKOVEC, Polona

AA ČANŽEK MAJHENIČ, Andreja (supervisor)/ JERŠEK, Barbara (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

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

PY 2015

TY IDENTIFICATION OF BIFIDOBACTERIA ISOLATED FROM INTESTINAL MUCOSA OF CHILDREN

DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Nutrition)

NO X, 76 p., 15 tab., 21 fig., 80 ref.

LA sl

Al sl/en

AB Bifidobacteria are group of microorganisms, that are among the first to colonize the intestinal tract. Colonization begins at birth, with mother-to-infant transmission of bifidobacteria from her genital and digestive tract. Our research was focused on the identification of 56 bifidobacteria isolated from the intestinal mucosa of children, where different phenotypic and genotypic methods were used. Polymerase chain reaction (PCR) revealed all analysed bacteria as members of genus *Bifidobacterium*. By the use of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) with two different RAPD primers, the genetic diversity between strains of bifidobacteria was determined. These methods enabled us to identify isolates from a complex environment like intestinal mucosa is and determine their diversity.

## 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 SLIK .....</b>                                                             | <b>VII</b>  |
| <b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>                                                       | <b>VIII</b> |
| <b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....</b>                                                     | <b>IX</b>   |
| <b>1 UVOD .....</b>                                                                  | <b>1</b>    |
| 1.1 NAMEN DELA.....                                                                  | 2           |
| 1.2 DELOVNE HIPOTEZE.....                                                            | 2           |
| <b>2 PREGLED OBJAV .....</b>                                                         | <b>3</b>    |
| 2.1 RAZVOJ ČREVESNE MIKROBIOTE.....                                                  | 3           |
| 2.2 ROD <i>BIFIDOBACTERIUM</i> .....                                                 | 4           |
| 2.2.1 Zgodovinski razvoj .....                                                       | 4           |
| 2.2.2 Taksonomija .....                                                              | 5           |
| 2.2.3 Splošne značilnosti.....                                                       | 6           |
| 2.2 EKOLOGIJA BIFIDOBAKTERIJ .....                                                   | 8           |
| 2.3 BIFIDOBAKTERIJE KOT PROBIOTIKI .....                                             | 12          |
| 2.3.1 Definicije probiotikov skozi zgodovino .....                                   | 12          |
| 2.3.2 Probiotični mikroorganizmi .....                                               | 13          |
| 2.3.3 Izbira probiotičnega seva .....                                                | 14          |
| 2.3.3.1 Varnostni kriterij.....                                                      | 14          |
| 2.3.3.2 Funkcionalni kriterij.....                                                   | 15          |
| 2.3.3.3 Tehnološki kriterij.....                                                     | 16          |
| 2.3.4 Vpliv probiotikov na zdravje .....                                             | 16          |
| 2.4 METODE SELEKCIJE IN IDENTIFIKACIJE BAKTERIJ RODU <i>BIFIDOBACTERIUM</i><br>..... | 16          |
| 2.4.1 Klasične metode kultivacije.....                                               | 18          |
| 2.4.1.1 Osamitev bifidobakterij z uporabo neselektivnih in selektivnih gojišč .....  | 19          |
| 2.4.2 Molekularne tehnike.....                                                       | 21          |
| 2.4.2.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR) .....                                    | 22          |
| 2.4.2.2 Metoda naključno pomnožene polimorfne DNA (RAPD).....                        | 23          |
| 2.4.3 Encimske tehnike.....                                                          | 25          |
| 2.4.3.1 Fruktaza-6-fosfat fosfoketolazni test (F6PKK) .....                          | 25          |
| <b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>                                                   | <b>26</b>   |
| 3.1 POTEK POSKUSA .....                                                              | 26          |
| 3.2 MATERIALI.....                                                                   | 28          |

|                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2.1 Sevi bifidobakterij .....                                                                                      | 28 |
| 3.2.2 Gojišča za bifidobakterije .....                                                                               | 29 |
| 3.2.2.1 Tekoče gojišče MRS s cisteinom.....                                                                          | 29 |
| 3.2.3 Reagenti za barvanje po Gramu .....                                                                            | 30 |
| 3.2.4 Reagenti in encimi za osamitev DNA .....                                                                       | 30 |
| 3.2.5 Reagenti za PCR in RAPD .....                                                                                  | 30 |
| 3.2.6 Reagenti za analizo pomnožkov v agaroznem gelu .....                                                           | 32 |
| 3.2.7 Reagenti za fruktoza-6-fosfat fosfoketolazni test F6PPK.....                                                   | 32 |
| 3.3 LABORATORIJSKI MATERIAL IN OPREMA .....                                                                          | 33 |
| 3.4 METODE .....                                                                                                     | 33 |
| 3.4.1 Priprava bakterijskih sevov bifidobakterij .....                                                               | 33 |
| 3.4.2 Ugotavljanje morfoloških značilnosti bifidobakterij.....                                                       | 33 |
| 3.4.3 Osamitev DNA .....                                                                                             | 35 |
| 3.4.4 Priprava reakcijskih mešanic za PCR in RAPD .....                                                              | 35 |
| 3.4.4.1 Potrjevanje rodu <i>Bifidobacterium</i> s PCR in začetnima oligonukleotidoma<br>Bif 164-f in Bif 662-r ..... | 35 |
| 3.4.5 RAPD .....                                                                                                     | 36 |
| 3.4.5.1 RAPD z začetnim oligonukleotidom M13 .....                                                                   | 36 |
| 3.4.5.2 RAPD z začetnim oligonukleotidom KGT-70GC.....                                                               | 36 |
| 3.4.5.3 RAPD z začetnim oligonukleotidom KGT-80GC.....                                                               | 37 |
| 3.4.5.4 RAPD z začetnim oligonukleotidom GTG5 .....                                                                  | 37 |
| 3.4.5.5 Razmere PCR oz. RAPD.....                                                                                    | 38 |
| 3.4.6 Agarozna gelska elektroforeza .....                                                                            | 39 |
| 3.4.7 Fruktoza -6- fosfat fosfoketolazni test.....                                                                   | 40 |
| 3.4.7.1 Priprava celičnega lizata bifidobakterij.....                                                                | 40 |
| 3.4.7.2 Ugotavljanje aktivnosti encima F6PPK .....                                                                   | 41 |
| 4 REZULTATI.....                                                                                                     | 42 |
| 4.1 MORFOLOŠKA ANALIZA BIFIDOBAKTERIJ .....                                                                          | 42 |
| 4.2 IDENTIFIKACIJA IN TIPIZACIJA OSAMLJENIH BIFIDOBAKTERIJ S PCR....                                                 | 43 |
| 4.2.1 Potrditev rodu <i>Bifidobacterium</i> .....                                                                    | 43 |
| 4.2.2 Tipizacija sevov rodu <i>Bifidobacterium</i> z različnimi RAPD začetnimi<br>oligonukleotidi .....              | 44 |
| 4.3 FRUKTOZA-6-FOSFAT FOSFOKETOLAZNI TEST .....                                                                      | 53 |
| 5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....                                                                                            | 55 |
| 5.1 RAZPRAVA .....                                                                                                   | 55 |
| 5.1.1 Makromorfološke in mikromorfološke lastnosti bifidobakterij .....                                              | 56 |
| 5.1.2 PCR in RAPD .....                                                                                              | 59 |
| 5.1.3 Fruktoza-6-fosfat fosfoketolazni test.....                                                                     | 61 |
| 5.2 SKLEPI.....                                                                                                      | 63 |
| 6 POVZETEK .....                                                                                                     | 64 |
| 7 VIRI.....                                                                                                          | 67 |
| ZAHVALA                                                                                                              |    |

## KAZALO SLIK

|                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Slika 1: Filogenetsko drevo predstavnikov rodu <i>Bifidobacterium</i> (Turrone in sod., 2011: 38). .....  | 6  |
| Slika 2: Presnovna pot ogljikovih hidratov pri bifidobakterijah (Biavati in Mattarelli, 2006: 328). ..... | 7  |
| Slika 3: Habitati rodu <i>Bifidobacterium</i> pri človeku (Biavati in Mattarelli, 2006: 332). .....       | 9  |
| Slika 4: Vrste bifidobakterij, ki jih najdemo pri živalih (Biavati in Mattarelli, 2006:332). ..           | 9  |
| Slika 5: Ciklični termostat za PCR .....                                                                  | 23 |
| Slika 6: Diagram poteka dela .....                                                                        | 27 |
| Slika 7: Precepljanje sevov bifidobakterij v tekoče gojišče MRS+cys.....                                  | 29 |
| Slika 8: Reagenti za PCR in RAPD .....                                                                    | 32 |
| Slika 9: Opazovanje mikromorfoloških lastnosti bifidobakterij s svetlobnim mikroskopom .....              | 34 |
| Slika 10: Komora za pripravo reakcijskih mešanic za PCR in RAPD .....                                     | 35 |
| Slika 11: Model za vlivanje gela z glavnički in steklenička z raztopljenim agaroznim gelom.....           | 39 |
| Slika 12: Elektroforetska banjica.....                                                                    | 39 |
| Slika 13: Sonikator.....                                                                                  | 41 |
| Slika 14: Kolonije čiste kulture bifidobakterij na gojišču MRS + cys (Foto: Čanžek Majhenič A.).....      | 42 |
| Slika 15: Mikroskopski preparat bifidobakterij pod svetlobnim mikroskopom (Todar, 2009) .....             | 43 |
| Slika 16: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov RAPD z začetnim oligonukleotidom M13. ....              | 44 |
| Slika 17: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov RAPD z začetnim oligonukleotidom KGT70-GC .....         | 46 |
| Slika 18: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov RAPD z začetnim oligonukleotidom KGT80-GC .....         | 47 |
| Slika 19: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov RAPD z začetnim oligonukleotidom GTG5 .....             | 49 |
| Slika 20: Dendrogram relativne podobnosti bifidobakterij osamljenih iz črevesne sluznice otrok .....      | 51 |
| Slika 21: Rezultati encimskega F6PPK testa izolatov bifidobakterij .....                                  | 54 |

**KAZALO PREGLEDNIC**

|                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Preglednica 1: Vrste bifidobakterij in njihov izvor (Russel in sod., 2011: 90). ....                                        | 11 |
| Preglednica 2: Mikroorganizmi, ki jih uporabljamo kot probiotike (Gardiner in sod., 2002: 433). ....                        | 14 |
| Preglednica 3: Tehnike identifikacije bifidobakterij na nivoju rodu, vrste in sevov (Biavati in Mattarelli, 2006: 335)..... | 18 |
| Preglednica 4: Sestava gojišč za bifidobakterije ter dodatki (Ferraris in sod., 2010: 470). .                               | 19 |
| Preglednica 5: Sevi bifidobakterij, osamljeni iz črevesnih bioptov .....                                                    | 28 |
| Preglednica 6: Sestavine komercialnega kompleta DNA Wizard® Genomic DNA Purification Kit .....                              | 30 |
| Preglednica 7: Začetni oligonukleotidi specifični za rod <i>Bifidobacterium</i> .....                                       | 31 |
| Preglednica 8: Začetni oligonukleotidi za RAPD .....                                                                        | 31 |
| Preglednica 9: Postopek barvanja po Gramu.....                                                                              | 34 |
| Preglednica 10: Sestava 20 µl reakcijske mešanice za PCR z začetnima oligonukleotidoma Bif 164-f in Bif 662-r. ....         | 36 |
| Preglednica 11: Sestava reakcijske mešanice za RAPD z začetnim oligonukleotidom M13. ....                                   | 36 |
| Preglednica 12: Sestava reakcijske mešanice za RAPD z začetnim oligonukleotidom KGT-70GC. ....                              | 37 |
| Preglednica 13: Sestava reakcijske mešanice za RAPD z začetnim oligonukleotidom KGT-80GC. ....                              | 37 |
| Preglednica 14: Sestava reakcijske mešanice za RAPD z začetnim oligonukleotidom GTG5.....                                   | 37 |
| Preglednica 15: Razmere PCR oz. RAPD z različnimi začetnimi oligonukleotidi. ....                                           | 38 |

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

| Okrajšava      | Pomen                                                                                               |
|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ARDRA          | restrikcijska analiza odsekov rDNA, pomnoženih s PCR (Amplified ribosomal DNA restriction analysis) |
| <i>B.</i>      | <i>Bifidobacterium</i>                                                                              |
| Bb-12          | Oznaka seva <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>                                                 |
| BFM            | Gojišče <i>Bifidobacterium</i> medium                                                               |
| bp             | Bazni par                                                                                           |
| BSM            | Gojišče <i>Bifidobacterium</i> selective medium                                                     |
| cys            | Cistein                                                                                             |
| dNTP           | Mešanica nukleotidov                                                                                |
| DGGE           | Poliakrilamidna gelska elektroforeza v kombinaciji z denaturacijskim gradientom                     |
| DNA            | Deoksiribonukleinska kislina                                                                        |
| DSM            | Nemška zbirka mikroorganizmov (nem. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen)                          |
| <i>E.</i>      | <i>Enterococcus</i>                                                                                 |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i>                                                                             |
| EDTA           | ang. Ethylenediamine tetraacetic acid (etilendiamintetraocetna kislina)                             |
| FAO            | ang. Food and Agriculture Organisation                                                              |
| FISH           | Metoda fluorescentne <i>in situ</i> hibridizacije (ang. Fluorescence <i>in situ</i> hybridization)  |
| F6PPK          | Fruktoza-6-fosfat fosfoketolaza                                                                     |
| GRAS           | ang. Generally Recognized as Safe                                                                   |
| ITS            | Regija notranjih distančnikov rDNA (ang. Internal transcribed spacer)                               |
| KE             | Kolonijske enote                                                                                    |
| KE/g           | Kolonijskih enot na gram                                                                            |
| <i>L.</i>      | <i>Lactobacillus</i>                                                                                |
| MKB            | Mlečnokislinske bakterije                                                                           |
| MRS            | Gojišče de Man- Rogosa- Sharpe                                                                      |
| MTPY           | Modificirano gojišče TPY (ang. Modified TPY)                                                        |
| NNLP           | Neomicin, nalidiksična kislina, litijev klorid in paramomicin sulfat                                |
| PCR            | Verižna reakcija s polimerazo (ang. polymerase chain reaction)                                      |

|        |                                                                                                                                                                 |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| PFGE   | Gelska elektroforeza v pulzirajočem polju (ang. Pulsed-field gel electrophoresis)                                                                               |
| RAPD   | Naključno pomnožena polimorfna DNA (randomly amplified polymorphic DNA)                                                                                         |
| REA    | Analiza z restrikcijskimi encimi (ang. restriction enzyme analysis)                                                                                             |
| RFLP   | Analiza polimorfizmov dolžin restrikcijskih fragmentov (ang. Restriction fragment length polymorphism)                                                          |
| rRNA   | Ribosomska ribonukleinska kislina                                                                                                                               |
| sp.    | species                                                                                                                                                         |
| subsp. | subspecies                                                                                                                                                      |
| TAE    | Tris acetatni EDTA pufer                                                                                                                                        |
| TCA    | Trikloroocetna kislina                                                                                                                                          |
| TOS    | Gojišče z mešanico tri-, tetra-, penta- in heksasaharidov, pridobljenih z encimsko hidrolizo laktoze s pomočjo <i>Aspergillus oryzae</i> $\beta$ -galaktozidaze |
| TPY    | Gojišče ang. Tryptone Phytone Yeast                                                                                                                             |
| z.o.   | začetni oligonukleotid                                                                                                                                          |
| WCB    | Gojišče Wilkins-Chalgren za rod <i>Bifidobacterium</i>                                                                                                          |
| WCBM   | Modificirano gojišče Wilkins-Chalgren za rod <i>Bifidobacterium</i>                                                                                             |
| WHO    | ang. World Health Organisation                                                                                                                                  |

## 1 UVOD

Bifidobakterije so pomembna skupina mikroorganizmov, ki med prvimi naselijo prebavni trakt. Poselitev prebavnega trakta z mikrobi se začne ob rojstvu, ko pride novorojenček v stik z materino vaginalno in črevesno mikrobioto. Tako predstavljajo bifidobakterije kar 91 % črevesne mikrobiote pri dojenih dojenčkih in 75 % pri zalivančkih, medtem ko jih je pri odraslih le še okoli 3 %. Med starostnimi skupinami se črevesna mikrobiota po sestavi zelo razlikuje, vendar je pri vsakemu posamezniku edinstvena in stabilna (Hadadji in sod., 2005).

Bifidobakterije že kar tradicionalno opisujemo skupaj z mlečnokislinskimi bakterijami (MKB), čeprav so filogenetsko precej oddaljene od njih, razlikujejo pa se tudi po metabolni poti razgradnje heksoz. So grampozitivne, obvezno anaerobne, nesporogene, negibljive, rahlo ukrivljene do razvejane paličice, katerih oblika spominja na črko Y, sladkorje pa razgrajujejo po specifični in edinstveni fruktoza-6-fosfat fosfoketolazni poti (Tannock, 1999). Njihove naravne ekološke niše so prebavni trakt, ustna votlina, živila, prebavila insektov in odplake, kot sestavni del pa jih najdemo v številnih probiotičnih izdelkih, kjer pomagajo pri vzpostavljanju obrambnih sposobnosti organizma, pri sintezi nekaterih vitaminov, pri stimulaciji imunskega sistema kot tudi pri zmanjšanju alergijskih reakcij (Rogelj, 2009). Bifidobakterije osamljene iz črevesne sluznice so zelo primerni kandidati za probiotike, ker so humanega izvora in varne za uporabo. Z izločanjem biološko aktivnih snovi blagodejno vplivajo na gostiteljevo zdravje (Biavati in sod., 2000).

Bifidobakterije so predmet raziskav že vrsto let, njihova osamitev iz črevesne sluznice pa je obetavna, saj gre za izolate, ki bi se, zaradi prilagojenosti na to specifično mikrookolje, ob zaužitju kot probiotiki v črevesni sluznici zagotovo laže naselili ali vsaj zadržali krajši čas. Pri osamitvi bifidobakterij iz kompleksnih bioloških vzorcev pa pogosto naletimo na težave kot so pomanjkljiva selektivnost gojišč za bifidobakterije ter njihovo odmiranje med precepljanjem (Ferraris in sod., 2010). Zato so med potencialno probiotičnimi bifidobakterijami zanimivi predvsem robustnejši sevi s toleranco za nižje koncentracije kisika. Vse pogostejše pa se za prepoznavanje bifidobakterij uporabljajo molekularne metode, ki temeljijo na neposredni analizi DNA posameznih sevov s pomočjo verižne reakcije s polimerazo (PCR), specifične za rod, katere zanesljivost pa zmanjšujejo možni lažno pozitivni rezultati. Zanesljivejše metode temeljijo na ugotavljanju zaporedja nukleotidov

gena za 16S rRNA, ki pa ni primeren za pregledovanje večjega števila izolatov (Matsuki in sod., 2003). Velika prednost metod analize DNA je njihova neodvisnost od okoljskih dejavnikov (Smole Možina in Jeršek, 2001).

## 1.1 NAMEN DELA

V nalogi smo se posvetili identifikaciji bifidobakterij, predhodno osamljenih iz vzorcev črevesne sluznice otrok. Z različnimi fenotipskimi (barvanje po Gramu, fruktoza-6-fosfat fosfoketolazni test) in genotipskimi metodami (PCR, RAPD), ki omogočajo potrjevanje pripadnosti rodu/vrsti oz. razlikovanje med sevi bi olajšali in izboljšali pridobivanje zanimivih izolatov bifidobakterij (potencialni probiotiki) iz kompleksnih bioloških vzorcev.

## 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Črevesna sluznica otrok vsebuje bifidobakterije.
- Kombinacija fenotipskih in molekularnih metod omogoča določanje in karakterizacijo bakterij rodu *Bifidobacterium*.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 RAZVOJ ČREVESNE MIKROBIOTE

Mikrobiota prebavnega trakta je zelo raznolik mikrobn sistem. Številne raziskave so pokazale, da je naravna mikrobna populacija, ki naseljuje prebavni trakt, zelo dobro prilagojena in izjemno stabilna. Med starostnimi skupinami se zelo razlikuje, pri posamezniku pa je stabilna in močno vpliva na njegovo fiziologijo (Tannock, 2001).

Po predvidevanjih naj bi človeški prebavni trakt naseljevalo med 500 in 1000 različnih bakterijskih vrst, ki pripadajo vsaj 50-im rodovom. Obvezni anaerobi so predstavniki rodov *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, medtem ko fakultativni anaerobi pripadajo rodovom *Lactobacillus*, *Klebsiella*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus* ter vrsti *Escherichia coli* (Grmanova in sod., 2010).

Metabolno je debelo črevo najbolj aktiven telesni organ, kjer mikrobiota prispeva k razgradnji in absorpciji hrane, s komunikacijo z gostiteljevimi celicami pa vzpodbuja specifične odzive, ki sodelujejo v različnih pomembnih fizioloških funkcijah – vpliva na obrambne sposobnosti, izgradnjo črevesne stene ter razvoj in delovanje imunskega sistema (Rogelj, 2009).

V želodcu je zaradi kislega okolja in posledično nizke vrednosti pH najmanj bakterij v primerjavi z drugimi deli črevesja, prevladujejo pa predvsem laktobacili, streptokoki in nekatere kvasovke (Bibek in Arun, 2008). Zaradi agresivne črevesne tekočine (žolč, pankreatični sok) in kratkega tranzitnega časa tudi dvanajstnik vsebuje majhno število mikrobov. Nato število mikrobov hitro narašča in doseže največjo velikost v debelem črevesu ( $10^{10}$ – $10^{12}$  KE/g vsebine) (Rogelj, 2009).

V tankem črevesu prevladujejo vrste rodov *Lactobacillus* in *Enterococcus*, v debelem pa družina *Enterobacteriaceae* in različne vrste iz rodov *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium* in *Lactobacillus* (Bibek in Arun, 2008).

Poselitev prebavi z mikrobi se začne ob rojstvu, ko je novorojenec po bivanju v sterilnem okolju izpostavljen okolju, bogato poseljenem z mikroorganizmi (Rogelj, 2009). Bakterije iz materinega genitalnega trakta in črevesne vsebine naselijo dojenčkov gastrointestinalni trakt med porodom. Po treh dneh življenja lahko iz blata osamimo bakterije rodu *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium* in *Enterobacter*, ki so obvezni anaerobi (Ventura in sod., 2012). Po drugem letu starosti je sestava črevesne mikrobiote že zelo podobna kot pri odraslih. S preходом na normalno hrano se poveča število bakterij rodu *Bacteroides* in grampozitivnih kokov (Goldin, 2003).

Številčnost bifidobakterij niha pri ljudeh skozi celotno življenjsko obdobje. Velika porast bifidobakterij je v dobi dojenja, saj predstavlja kar 91% celotne mikrobiote (Vlkova in sod., 2004), v odrasli dobi predstavljajo le še 25% celotne črevesne mikrobiote, do drastičnega padca števila bifidobakterij pa pride pri starostnikih zaradi zmanjšane izločanja želodčnega soka, kar privede do porasta predvsem klostridijev in koliformnih bakterij (O'Connell, 2009).

## 2.2 ROD *Bifidobacterium*

### 2.2.1 Zgodovinski razvoj

Prva spoznanja o bifidobakterijah segajo v konec devetnajstega stoletja, ko je Tissier iz blata dojenčka osamil bakterije z obliko Y in jih poimenoval *Bacillus bifidus*. V istem času je tudi italijanski raziskovalec osamil bakterije s podobno morfologijo, ki pa so se po njegovem mnenju razlikovale od Tissierjevih izolatov in jih je zato uvrstil v rod *Lactobacillus*. Ne glede na razlike je Holland leta 1920 predlagal enotno ime *Lactobacillus bifidus* (Turroni in sod., 2011).

Kasneje je Orla-Jensen pri razvrščanju in opisovanju mikroorganizmov uporabil metode, ki so temeljile na novih kriterijih fiziologije, prehranskih potreb ter metabolnih in encimatskih lastnosti obravnavanega mikroorganizma (Scardovi, 1986).

Razvoj kemotaksonomije je v šestdesetih letih prejšnjega stoletja zaznamoval začetek novega obdobja v taksonomiji. Biokemijske raziskave prokariontov so pokazale, da je analiza celičnih komponent koristna pri opisovanju in razvrščanju bakterij. Scardovi in

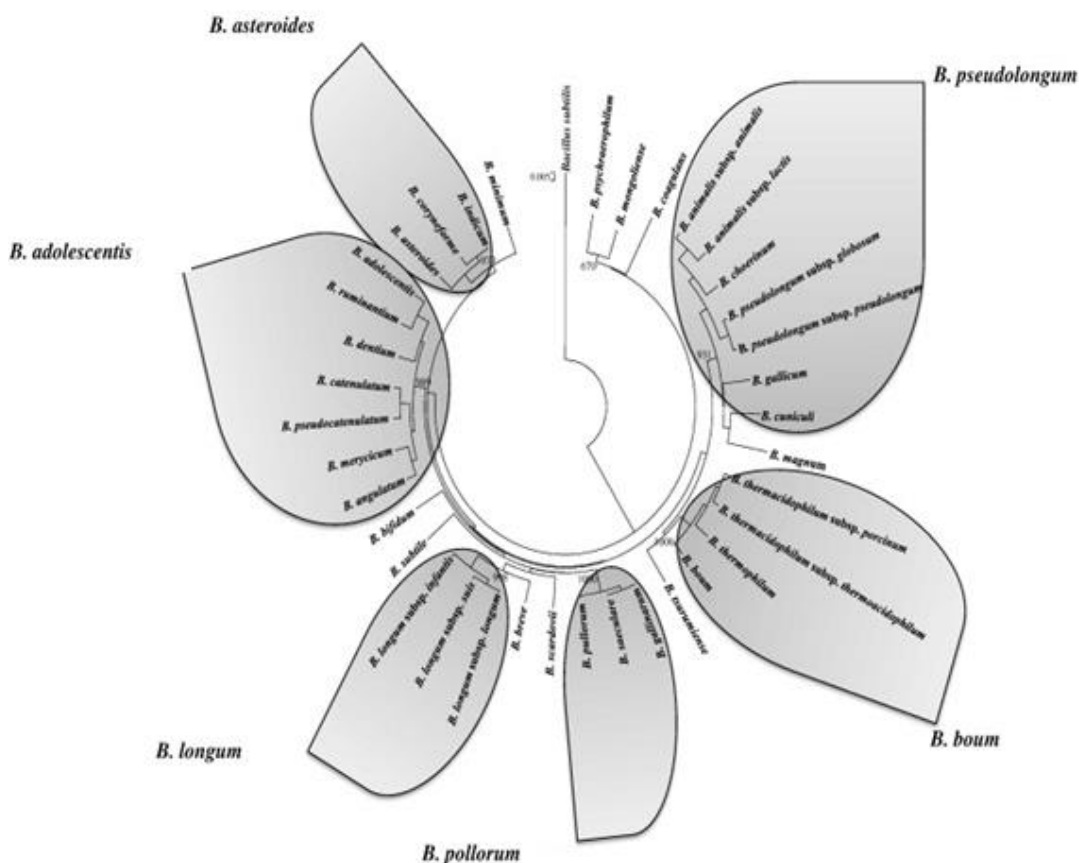
Trovatelli (1965) sta pri bifidobakterijah odkrila encim fruktoza-6-fosfat fosfoketolazo (F6PPK) in ugotovila, da bifidobakterije nimajo aldolaze in glukoza-6-fosfat dehidrogenaze, dveh encimov, ki sta prisotna pri laktobacilih (DeVries in Stouthamer, 1967).

Leta 1974 se je v osmi izdaji Bergeyevega priročnika zapis *Bifidobacterium* prvič pojavil kot samostojen rod, ki je takrat vključeval 11 vrst bifidobakterij. Kasneje so se pojavili zagovorniki ideje o sorodnosti bifidobakterij z aktinomicetami (Stackebrandt in Woese, 1981). Po ugotovitvah Fernandez in sod. (1984) se bifidobakterije razlikujejo od aktinomicet le po mureinski strukturi celične stene in zato jih še danes uvrščamo med aktinobakterije (razred *Actinobacteria*).

### 2.2.2 Taksonomija

Rod *Bifidobacterium* predstavlja eno večjih bakterijskih taksonomskih enot. So predstavnice družine *Bifidobacteriaceae* in reda *Bifidobacteriales*, ki pripada razredu *Actinobacteria* (Biavati in sod., 2000).

Na sliki 1 je prikazano filogenetsko drevo predstavnikov rodu *Bifidobacterium*, ki jih zaradi nahajanja v različnih ekoloških nišah lahko razdelimo v šest različnih filogenetskih skupin: *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium asteroides*, *Bifidobacterium bovis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium pullorum* in *Bifidobacterium pseudolongum* (Turroni in sod., 2011).



Slika 1: Filogenetsko drevo predstavnikov rodu *Bifidobacterium* (Turroni in sod., 2011: 38).

Ne dolgo nazaj so bile osamljene še tri nove vrste rodu *Bifidobacterium* iz čmrljevega prebavnega trakta in sicer *Bifidobacterium actinocoloniiforme*, *Bifidobacterium bohemicum* in *Bifidobacterium bombi* (Killer in sod., 2011).

### 2.2.3 Splošne značilnosti

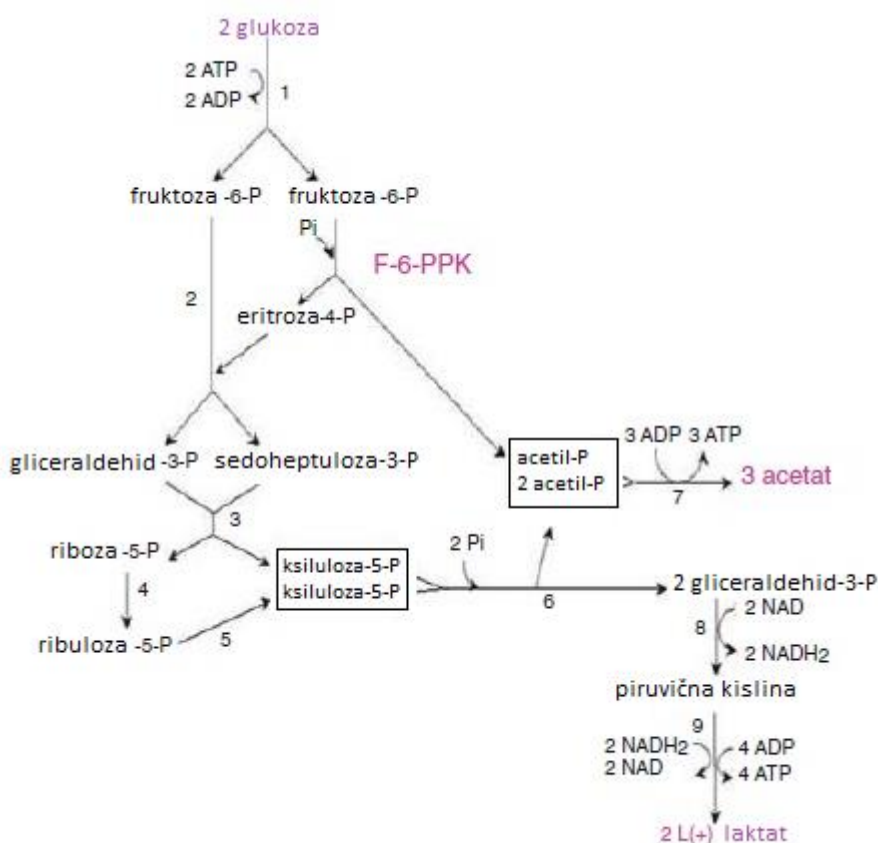
Bifidobakterije so obvezno anaerobne, negibljive, nesporogene in po gramupozitivne paličaste do ukrivljene in celo razvejane bakterije ki dajejo videz v obliki črke V, X ali Y. Njihove kolonije so gladke, izbočene, svetleče in mehke strukture (Rada in Petr, 2002).

Ogljikove hidrate presnavljajo v mlečno in očetno kislino po fruktoza-6-fosfat fosfoketolazni poti (F6PKK) in so edine znane črevesne bakterije, ki uporabljajo to fermentacijsko pot (Jay, 1992). Tako jih tudi lažje ločimo od ostalih mlečnokislinskih bakterij (MKB), ki so jim podobne po morfoloških in fizioloških lastnostih. Encim F6PKK katalizira cepitev fruktoze-6-fosfata na eritrozo-4-fosfat in acetil-fosfat do končnih

produktov. Na sliki 2 je prikazana presnovna pot ogljikovih hidratov, ki je značilna za rod *Bifidobacterium*.

Aktivnost F6PPK v celičnih ekstraktih je uporabna metoda za razlikovanje bifidobakterij od morfološko podobnih bakterij, npr. laktobacilov. Pri fermentaciji glukoze po F6PPK poti nastajata očetna in mlečna kislina v razmerju 3:2 (Tannock, 1999).

Bifidobakterije humanega izvora lahko kot vir ogljika poleg glukoze izkoriščajo tudi galaktozo, laktozo in fruktozo. Pri fermentaciji ogljikovih hidratov tvorijo kisline, ne tvorijo pa plinov (Felis in Dellaglio, 2007).



Slika 2: Presnovna pot ogljikovih hidratov pri bifidobakterijah (Biavati in Mattarelli, 2006: 328).

Optimalne razmere rasti bifidobakterij so pri temperaturi 37-41 °C, a ne pod 25 °C (Gomes in Malcata, 1999). Optimalna temperatura rasti bifidobakterij humanega izvora je 36-38 °C in bifidobakterij animalnega izvora od 41-43 °C. Izjema je *B. thermacidophilum*, ki raste tudi pri 49,5 °C. Rod bifidobakterij je tolerantan za kislo okolje, optimalne razmere rasti so

pri vrednosti pH 6-7. Pod pH 4,5 in nad 8,5 ni rasti, izjema je zopet vrsta *B. thermacidophilum*, ki raste pri pH 4 (Biavati in Mattarelli, 2006).

Večina bifidobakterij humanega izvora proizvaja vitamine B kompleksa kot so tiamin, riboflavin, vitamin B<sub>6</sub>, folna kislina, niacin in piridoksin (Jay, 1992).

Tehnološka uporabnost bifidobakterij kot starterskih kultur v mlekarški industriji je omejena, predvsem z vidika primernosti sevov za gojenje ter obstojnosti med tehnološkimi postopki, skladiščenjem in distribucijo živila kakor tudi negativnega vpliva na senzorične lastnosti izdelka (McCartney, 2003). Ker gre za striktno anaerobne mikroorganizme je zaradi izvajanja tehnoloških postopkov v aerobnih razmerah prisotno njihovo odmiranje, zaradi tvorbe očetne kisline kot enega glavnih produktov metabolizma heksoz pri bifidobakterijah pa dobi izdelek okus po kislu. Po drugi strani pa lahko bifidobakterije prav zaradi tvorbe očetne kisline delujejo protimikrobno (Mohammadi in sod., 2012).

Poleg organskih kislin pa lahko bifidobakterije delujejo protimikrobno tudi s tvorbo bakteriocinov oz. bakteriocinom podobnih protimikrobnih snovi. V zadnjih 30-ih letih so bili med drugim raziskani in opisani bifidin, bifidocin B, bifilong, bifilact Bb-46, bifilact Bb-12, thermophilicin B67, bifidin I in lantibiotik bisin, ki so protimikrobno aktivni proti različnim bakterijskim vrstam, vključujoč grampozitivne, gramnegativne, patogene bakterije in bakterije kvarljivke (Martinez in sod., 2013).

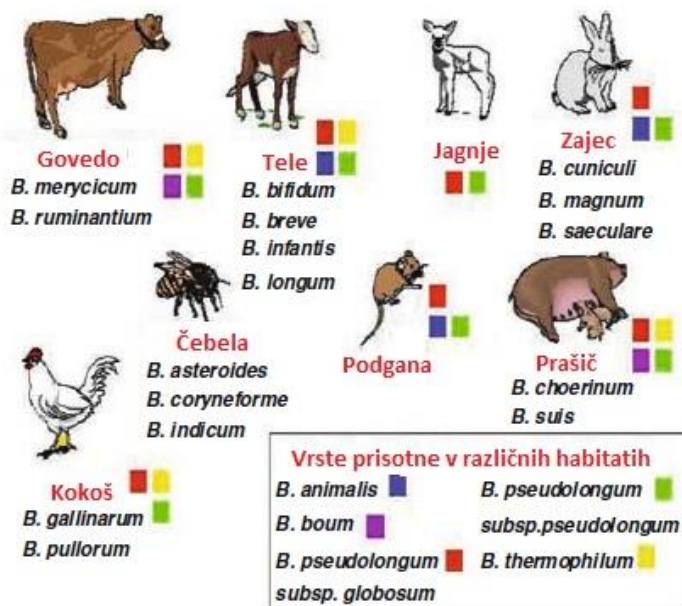
V primerjavi s koliformnimi bakterijami in enterokoki najdemo v človeškem blatu od 10 do 100 krat več bifidobakterij. Najdemo jih tudi v ovčjih in telečjih vampih (Turroni in sod., 2011).

## 2.2 EKOLOGIJA BIFIDOBAKTERIJ

Bifidobakterije se nahajajo v prebavnem traktu ljudi in živali, ustni votlini, odplakah, krvi in hrani (Ventura in sod., 2012). Osamili so jih iz blata dojenčka in odraslega človeka, vagine in zobnega kariesa (Biavati in sod., 2000). Sliki 3 in 4 prikazujeta različne ekološke niše rodu *Bifidobacterium*.



Slika 3: Habitati rodu *Bifidobacterium* pri človeku (Biavati in Mattarelli, 2006: 332).



Slika 4: Vrste bifidobakterij, ki jih najdemo pri živalih (Biavati in Mattarelli, 2006:332).

Za preiskovanje pestrosti populacije bifidobakterij, ki jih najdemo v črevesni sluznici in blatu ljudi, se uporablja večfazni pristop, ki temelji na kombinaciji gojitvenih metod osamitve s pomočjo selektivnih gojišč in v nadaljevanju ugotavljanja nukleotidnega zaporedja ter karakterizacijo njihovih genov na 16S rRNA (Turrone in sod., 2011).

Po navedbah Scardovi (1986) naj bi v prebavnem traktu odraslega človeka prevladovala bifidobakterije iz vrst *B. bifidum*, *B. catenulatum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. angulatum*, *B. gallicum* in *B. dentium*.

Z uporabo klasičnih gojitvenih metod se je izkazalo, da sta vrsti *B. adolescentis* in *B. longum* prevladujoči v prebavnem traktu odraslega človeka (Gavini in sod., 2001) in da sta vrsti *B. infantis* in *B. breve* prevladujoči v prebavnem traktu dojenčkov (Hadadji in sod., 2005). Pri dojenih dojenčkih pa so najpogostejše zastopane vrste *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum* in *B. bifidum* (Vlkova in sod., 2005).

Kot prikazuje preglednica 1, poseljujejo bifidobakterije predvsem sedem različnih ekoloških niš in sicer črevesje človeka, vagino, ustno votlino, živila, prebavni trakt živali, odplake in črevesje čebel.

Preglednica 1: Vrste bifidobakterij in njihov izvor (Russel in sod., 2011: 90).

| VRSTA                                                                                         | Ekološka niša, iz katere so vrsto najprej osamili- izvor              |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| 1. <i>B. adolescentis</i>                                                                     | Blato odraslega človeka, vamp goveda, odplake, vagina                 |
| 2. <i>B. actinocolonii</i> forme                                                              | Črevo čmrljev                                                         |
| 3. <i>B. angulatum</i>                                                                        | Črevo odraslega človeka, odpadna voda                                 |
| 4. <i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i> ;<br><i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>     | Blato podgane in piščancev, odpadna voda<br>Jogurt                    |
| 5. <i>B. asteroides</i>                                                                       | Prebavila čebel                                                       |
| 6. <i>B. bifidum</i>                                                                          | Blato dojenčka, blato odraslega človeka, vagina človeka               |
| 7. <i>B. bohemicum</i>                                                                        | Črevo čmrljev                                                         |
| 8. <i>B. boum</i>                                                                             | Vamp govedi, blato prašičev                                           |
| 9. <i>B. bombi</i>                                                                            | Črevo čmrljev                                                         |
| 10. <i>Bombiscardovia coagulans</i>                                                           | Črevo čmrljev                                                         |
| 11. <i>B. breve</i>                                                                           | Črevo dojenčka, blato odraslega človeka, vagina človeka, odpadna voda |
| 12. <i>B. catenulatum</i>                                                                     | Blato odraslega človeka, blato dojenčka, odpadna voda                 |
| 13. <i>B. choerinum</i>                                                                       | Blato prašiča, odpadna voda                                           |
| 14. <i>B. coryneforme</i>                                                                     | Prebavila čebel                                                       |
| 15. <i>B. crudilactis</i>                                                                     | Sveže mleko in siri                                                   |
| 16. <i>B. cuniculi</i>                                                                        | Blato kunca                                                           |
| 17. <i>B. denticolens</i>                                                                     | Zobni karies                                                          |
| 18. <i>B. dentium</i>                                                                         | Zobni karies, ustna votlina, blato odraslega človeka                  |
| 19. <i>B. gallicum</i>                                                                        | Črevo odraslega človeka                                               |
| 20. <i>B. gallinarum</i>                                                                      | Slepo črevo piščancev                                                 |
| 21. <i>B. indicum</i>                                                                         | Prebavila čebel                                                       |
| 22. <i>B. infantis</i>                                                                        | Črevo dojenčka, črevo mladih tele                                     |
| 23. <i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> ;<br>subsp. <i>infantis</i> ;<br>subsp. <i>suis</i> | Blato odraslega človeka<br>Blato dojenčka<br>Blato prašičev           |
| 24. <i>B. inopinatum</i>                                                                      | Zobni karies                                                          |
| 25. <i>B. lactis</i>                                                                          | Fermentirani mlečni izdelki                                           |
| 26. <i>B. magnum</i>                                                                          | Blato kunca                                                           |
| 27. <i>B. merycicum</i>                                                                       | Vamp govedi                                                           |
| 28. <i>B. minimum</i>                                                                         | Odpadna voda                                                          |
| 29. <i>B. mongoliense</i>                                                                     | Fermentiran mlečni izdelek iz kobiljega mleka iz Mongolije            |
| 30. <i>B. pseudocatenulatum</i>                                                               | Blato dojenčka, odpadna voda                                          |
| 31. <i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i> ;<br>subsp. <i>pseudolongum</i>             | Vamp govedi, prašičev, piščancev, podgan in morskih prašičkov         |
| 32. <i>B. psychraerophilum</i>                                                                | Blato dojenčka, blato mladih telet, odpadna voda                      |
| 33. <i>B. pullorum</i>                                                                        | Blato telet, podgan, ovac, vamp govedi, odpadna voda                  |
| 34. <i>B. ruminantium</i>                                                                     | Blato prašičev                                                        |
| 35. <i>B. saeculare</i>                                                                       | Vamp govedi, blato piščancev                                          |
| 36. <i>B. scardovii</i>                                                                       | Blato kunca, vamp govedi                                              |
| 37. <i>B. stercoris</i>                                                                       | Blato kunca                                                           |
| 38. <i>B. subtile</i>                                                                         | Človeška kri                                                          |
| 39. <i>B. suis</i>                                                                            | Odpadna voda, blato odraslega človeka                                 |
| 40. <i>B. thermacidophilum</i> subsp.<br><i>theracidophilum</i>                               | Blato prašiča                                                         |
| 41. <i>B. thermophilum</i> subsp. <i>porcinum</i>                                             | Blato prašiča, odpadna voda                                           |
| 42. <i>B. tsurumiense</i>                                                                     | Blato prašiča<br>Zobni plak hrčkov                                    |

## 2.3 BIFIDOBakterije KOT PROBIOTIKI

### 2.3.1 Definicije probiotikov skozi zgodovino

Beseda probiotik izhaja iz grške besede »pro bios« in v prevodu pomeni »za življenje« (Svensson in Håkansson, 2014).

Zgodovinski koncept probiotikov sega tisočletja v preteklost, saj so že takrat uživanje fermentiranega mleka povezovali z ugodnimi učinki na zdravje. Danes je znano, da je prav fermentirano mleko glavni vir MKB s probiotičnim delovanjem oz. zdravju koristnimi učinki (Ranadheera in sod., 2010).

Sodobni koncept probiotikov sega v začetek 20. stoletja, ko je ruski nobelovec Elie Metchnikoff prišel do prvih spoznanj o terapevtskih lastnostih fermentiranih vrst mleka in pomembnosti MKB pri vzdrževanju zdravja. Poročal je o bolgarskih kmetih, pri katerih je opazil zelo dolgo življenjsko dobo, kar je pripisoval njihovem načinu prehranjevanja, predvsem uživanju velikih količin kislega mleka. Ugotovil je, da se črevesna mikrobiota spremeni z uživanjem kislega mleka ter da so za fermentacijo mleka pomembne grampozitivne paličaste bakterije *Bacillus bulgaricus*. Slednjo poznamo danes pod imenom *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, ki je skupaj s *Streptococcus thermophilus* odgovorna za tradicionalno fermentacijo mleka v jogurt (Vasiljevic in Shah, 2008).

O zdravju koristnih učinkih mikroorganizmov je na prelomu iz 19. v 20. stoletje poročal tudi Tissier, ko je otrokom z drisko predpisoval kozarec čiste kulture *Bacillus acidiparalactici* ali v mešanici z *Bacillus bifidus*, saj naj bi bile te kulture sposobne izriniti patogene bakterije (Rogelj, 2001).

Izraz probiotik sta leta 1965 prvič uporabila Lilly in Stillwell, s katerim sta opisala snovi, ki jih proizvaja en mikroorganizem in stimulirajo rast drugih mikroorganizmov. Leta 1974 je Parker uporabil izraz probiotik za opis dodatkov živalski krmi, ki pospešujejo rast. Fuller pa je leta 1989 preoblikoval Parkerjevo definicijo, da so probiotiki živ mikrobni dodatek krmi, ki ugodno vpliva na žival gostiteljico z izboljšanjem njenega mikrobnega ravnotežja (Gueimonde in Salminen, 2013).

Leta 1992 je Havenaar s sodelavci predlagal razširitev definicije probiotikov tudi na humano prehrano in njeno dopolnitev, da je probiotik mono- ali mešana kultura živih mikroorganizmov, ki koristno učinkujejo na človeka ali žival z izboljšanjem lastnosti obstoječe mikrobiote (Svensson in Håkansson, 2014).

V letu 1998 sta bili podani dve definiciji probiotikov in sicer ena s strani delovne skupine v okviru ILSI (ang. International Life Science Institute) kot »prehranskih dodatkov z živimi mikroorganizmi, ki ugodno vplivajo na zdravje gostitelja« ter druga podana s strani Guarner in Schaafsma, da so »probiotiki živi mikroorganizmi, ki dokazano ugodno učinkujejo na zdravje, če jih zaužijemo v zadostni količini«.

Slednja je od 2002 dalje veljavna definicija probiotikov, ki sta jo povzeli tudi Organizacija za prehrano in kmetijstvo (ang. Food and Agriculture Organization, FAO) ter Svetovna zdravstvena organizacija (ang. World Health Organization, WHO) (WHO/FAO, 2001).

### **2.3.2 Probiotični mikroorganizmi**

Zadnja leta je bifidobakterijam namenjeno veliko pozornosti zaradi številnih zdravju pozitivnih učinkov, pa čeprav so nekateri mehanizmi delovanja še vedno nepojasneni (Turroni in sod., 2011).

Večina probiotičnih mikroorganizmov je iz vrst mlečnokislinskih bakterij (MKB), saj so le te normalni prebivalci prebavnega trakta. Med MKB prevladujejo predvsem predstavniki laktobacilov, veliko pa je tudi bifidobakterij, ki že zelo zgodaj po rojstvu poselijo prebavni trakt. Eden glavnih selekcijskih kriterijev za izbiro probiotične bakterije je uspešna preživelost pri prehodu skozi prebavni trakt, saj je to osnovni pogoj za uspešno učinkovanje v črevesju (Tamime in sod., 2005).

Probiotične bakterije morajo biti odporne proti nizkim vrednostim pH, glede hranil pa so zahtevni organizmi. Večinoma se nahajajo v okolju bogatem s hranilnimi snovmi, kot so mleko, sir, jogurt, meso, pijače, zelenjava in sadje, kjer je na voljo veliko enostavnih sladkorjev za pretvorbo v energijo (Adamič in sod., 2003). Nekatere MKB in bifidobakterije so članice normalne črevesne mikrobiote in vagine sesalcev. Pomembna je tudi njihova

vloga v proizvodnji fermentirane hrane in pri zdravem prehranjevanju, saj so poleg proizvodnje mlečne kisline odgovorne tudi za raznoliko aromo in teksturo fermentiranih izdelkov (Russell in sod., 2011).

V preglednici 2 so zbrane najpomembnejše vrste bakterij, ki se uporabljajo v probiotičnih izdelkih. Najpogosteje uporabljeni probiotični mikroorganizmi so laktobacili. Sledijo jim bifidobakterije, enterokoki in ostali, ki ne pripadajo MKB. Le ti se redko uporabljajo v mlečnih izdelkih, pogosteje jih najdemo v liofilizirani obliki v farmacevtskih preparatih (Gaggia in sod., 2010).

Preglednica 2: Mikroorganizmi, ki jih uporabljamo kot probiotike (Gardiner in sod., 2002: 433).

| Laktobacili                                   | Bifidobakterije        | Enterokoki         | Ostali                                         |
|-----------------------------------------------|------------------------|--------------------|------------------------------------------------|
| <i>Lb. acidophilus</i>                        | <i>B. bifidum</i>      | <i>E. faecium</i>  | <i>Saccharomyces boulardii</i>                 |
| <i>Lb. plantarum</i>                          | <i>B. infantis</i>     | <i>E. faecalis</i> | <i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i>   |
| <i>Lb. casei</i>                              | <i>B. adolescentis</i> |                    | <i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>cremoris</i> |
| <i>Lb. rhamnosus</i>                          | <i>B. longum</i>       |                    | <i>Leuconostoc mesenteroides</i>               |
| <i>Lb. delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i> | <i>B. breve</i>        |                    | <i>Propionibacterium freudenreichii</i>        |
| <i>Lb. fermentum</i>                          | <i>B. lactis</i>       |                    | <i>Pediococcus acidilactici</i>                |
| <i>Lb. johnsonii</i>                          |                        |                    | <i>Streptococcus thermophilus</i>              |
| <i>Lb. gasseri</i>                            |                        |                    | <i>Escherichia coli</i>                        |
| <i>Lb. salivarius</i>                         |                        |                    |                                                |
| <i>Lb. reuteri</i>                            |                        |                    |                                                |

### 2.3.3 Izbira probiotičnega seva

Sevi, ki jih uporabljamo kot probiotike morajo biti taksonomsko definirani in varni za uporabo. Potrebno jih je dobro proučiti in poznati njihov mehanizem delovanja. Za izbiro probiotičnega seva moramo upoštevati vidike varnostnega, funkcionalnega in tehnološkega kriterija.

#### 2.3.3.1 Varnostni kriterij

Z varnostnega vidika je zaželeno, da so sevi vrstno specifični, torej so humanega izvora in uporabni za prehrano ljudi, so nepatogeni in netoksični (Vasiljevic in Shah, 2008). Prav tako je pomembno, da imunski sistem tolerira sev in da proti njemu ne tvori protiteles (Collins in sod., 1998).

Bakterije, ki jih uporabljajo kot probiotike, ne smejo vsebovati genov za odpornost proti antibiotikom. Težave nastopijo pri sevih, ki pripadajo vrstam, za katere je znano, da imajo nekateri njihovi predstavniki prisotne virulenčne dejavnike in lahko povzročajo bolezni pri človeku (npr. *Enterococcus* sp., *E. coli*, *Bacillus* sp.,...). Odpornost proti antibiotikom je lastnost, ki jo je treba pri probiotičnih sevih še posebej proučiti.

Probiotični izdelki navadno vsebujejo bakterije vrst, ki so priznane kot varne s statusom GRAS (ang. Generally Recognized As Safe). To so organizmi, za katere je značilno, da je njihova nepatogenost dokazana z dolgoletno varno uporabo (Rogelj in Bogovič Matijašič, 2004). Pri proučevanju probiotičnega seva nas zanima tudi njegova aktivnost v prebavnem traktu in sposobnost naselitve, saj tako lahko ugotovimo morebitne pozitivne ali negativne učinke posameznega seva (Saarela in sod., 2000).

#### 2.3.3.2 Funkcionalni kriterij

Probiotični sev mora zadostiti osnovnim pogojem oz. kriterijem funkcionalnosti, kot so (Saarela in sod., 2000):

- odpornost proti želodčni kislini in žolčnim solem, saj zaradi kislega okolja lahko preživijo prehod,
- sposobnost vezave na črevesne epitelne celice in odstranitev patogenih bakterij,
- proizvodnja koristnih encimov ali metabolitov,
- učinkovitost proti patogenim bakterijam, kot so *Helicobacter pylori*, *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes* in *Clostridium difficile*,
- antimutageno in antikancerogeno delovanje nekaterih probiotičnih sevov, ki naj bi bili sposobni vezave in razgradnje kancerogenih snovi, modulacije prokancerogenih encimov in zatiranja tumorjev z mehanizmi imunskega odziva,
- klinično dokazani in dokumentirani zdravstveni učinki.

Ena od številnih lastnosti probiotičnega seva je tvorba protimikrobnih snovi kot so organske kisline, vodikov peroksid, ogljikov dioksid, diacetil, acetaldehid, D-izomere aminokislin, bakteriocini in druge. S proizvodnjo teh snovi MKB zavirajo rast črevesnih patogenov.

### 2.3.3.3 Tehnološki kriterij

Probiotični sevi morajo poleg varnostnih in funkcionalnih kriterijev zadostiti tudi tehnološkemu kriteriju med tehnološkim postopkom proizvodnje živila. Tehnološki kriteriji zahtevajo primernost sevov za gojenje, sposobnost preživetja med posameznimi tehnološkimi postopki, obstojnost med časom skladiščenja in transporta, primerne senzorične lastnosti ter genetsko stabilnost seva in odpornost proti fagom (Vasiljevic in Shah, 2008).

Na preživetje probiotičnih bakterij v fermentiranih mlečnih izdelkih vplivajo tudi interakcije z drugimi sevi, fiziološko stanje kulture ter nastali metabolni produkti. Prav tako pa je preživetje odvisno tudi od dostopnosti hranil, prisotnosti rastnih faktorjev, koncentracije sladkorjev, raztopljenega kisika, temperature inkubacije, časa fermentacije in ter temperature in časa skladiščenja (Shah, 2000).

### 2.3.4 Vpliv probiotikov na zdravje

V številnih raziskavah je bilo ugotovljeno, da probiotični sevi ugodno vplivajo na zdravje človeka. Vežejo se na črevesne celice in izboljšajo zdravje prebavnega trakta, znižujejo fekalno encimsko aktivnost, preprečujejo driske, spodbujajo imunski sistem, blažijo simptome laktozne intolerance, zvišujejo imunsko odpornost in lajšajo simptome alergij (Orel, 2010).

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

Prepoznavanje in identifikacija bifidobakterij sta zahtevni nalogi zaradi njihove fenotipske in genotipske heterogenosti. K boljšemu razumevanju njihove taksonomije prispeva poznavanje morfoloških, fizioloških in molekularnih značilnosti posameznih vrst (Biavati in Mattarelli, 2006).

Izbira metode je odvisna od vrste izdelka in preiskovanih mikroorganizmov, pogosto pa so v uporabi kombinacije različnih metod.

Osnova so kultivacijske metode, kjer z uporabo različnih selektivnih gojišč in dodatkov omogočimo rast določenih vrst bakterij, medtem ko je rast ostalih vrst zelo slaba ali v celoti zavirna. Analiza vključuje opazovanje morfoloških lastnosti zraslih kolonij, barve in velikosti (Tabasco in sod., 2007). Razlikovanje posameznih vrst bakterij je mogoče tudi na podlagi opazovanja drugih značilnosti, kot so občutljivost za kisik in antibiotike, poraba hranil ter produkcija metabolitov (Charteris in sod., 1997).

Klasične kultivacijske metode so velikokrat dolgotrajne in zahtevne, zato se vedno bolj poslužujemo hitrih, specifičnih in občutljivih metod, ki temeljijo na analizi DNA, najpogosteje z metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR) (Coeuret in sod., 2004).

Obstaja več vrst PCR in kombinacij z drugimi molekularnimi metodami, ki jih lahko izvedemo pred ali po pomnoževanju DNA s PCR. Takšni primeri so vrstno/rodovno specifična PCR v kombinaciji z gelsko elektroforezo, RAPD (naključno pomnožena polimorfna DNA), DGGE (poliakrilamidna gelska elektroforeza v kombinaciji z denaturacijskim gradientom), REA (analiza z restrikcijskimi encimi) in druge (Smole Možina in Jeršek, 2001).

V preglednici 3 so predstavljene najpogosteje uporabljene metode za identifikacijo bifidobakterij in sicer na nivoju rodu, vrste ali seva.

Preglednica 3: Tehnike identifikacije bifidobakterij na nivoju rodu, vrste in sevov (Biavati in Mattarelli, 2006: 335).

| Identifikacija na nivoju rodu                              | Identifikacija na nivoju vrste                                                                             | Identifikacija na nivoju seva                                                                                 |
|------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Fruktoza-6-fosfat fosfoketolazni test                      | Ugotavljanje morfologije celic                                                                             | Analiza polimorfizmov dolžin restrikcijskih fragmentov (ang. Restriction fragment length polymorphism – RFLP) |
| Plinska kromatografija fermentiranih izdelkov              | Ugotavljanje fermentacijskega profila                                                                      | Elektroforeza v pulzirajočem polju (ang. Pulsed-field gel electrophoresis – PFGE)                             |
| Uporaba za rod specifičnih-začetnih oligonukleotidov v PCR | Elektroforeza                                                                                              | Ribotipizacija                                                                                                |
|                                                            | Analiza strukture celične stene                                                                            |                                                                                                               |
|                                                            | Regija notranjih distančnikov ribosomske DNA (ang. Internal transcribed spacer - ITS)                      |                                                                                                               |
|                                                            | Uporaba vrstno specifičnih markerjev                                                                       |                                                                                                               |
|                                                            | Restrikcijska analiza pomnožene ribosomske DNA (ang. Amplified ribosomal DNA restriction analysis – ARDRA) |                                                                                                               |
|                                                            | Metoda naključno pomnožene DNA (ang. Random amplified polymorphic DNA – RAPD)                              |                                                                                                               |
|                                                            | Metoda fluorescentne <i>in situ</i> hibridizacije (ang. Fluorescence <i>in situ</i> hybridization - FISH)  |                                                                                                               |

#### 2.4.1 Klasične metode kultivacije

Pri kultivacijski mikrobiološki tehniki gre za določitev velikosti populacije mikroorganizmov v vzorcih na podlagi primerne razredčitve osnovnega vzorca in kultivaciji le-tega na primernem selektivnem gojišču ob predpisanih optimalnih pogojih (Mullan, 2002).

Za gojitev se, odvisno od namena preiskave, uporabljajo različna gojišča, na primer osnovna, obogatitvena, diferencialna in selektivna gojišča ter gojišča za ugotavljanje biokemijskih lastnosti. Pri klasični identifikaciji bakterij je potrebno osamiti čisto kulturo na primarnem selektivnem gojišču, nato pa izvesti serijo biokemijskih in seroloških testov (Jeršek, 2009).

V splošnem so vrste rodu *Bifidobacterium* odporne proti gentamicinu in nalidiksični kislini, so pa slabše odporne proti neomicinu. Proučevali so tudi selektivnost gojišč za

bifidobakterije, ki namesto glukoze vsebujejo maltozo, rafinozo, salicin, melibiozo ali katerega od ostalih ogljikovih hidratov (Mullan, 2002).

#### 2.4.1.1 Osamitev bifidobakterij z uporabo neselektivnih in selektivnih gojišč

Gojišča za osamitev in štetje kolonij bifidobakterij v grobem delimo na neselektivna in selektivna gojišča (Biavati in Mattarelli, 2006), kjer se neselektivna gojišča uporabljajo predvsem za precepljanje, gojenje in ugotavljanje velikosti populacij čistih kultur bifidobakterij, selektivna gojišča pa so namenjena za selektivno osamitev bifidobakterij iz kompleksnih vzorcev.

V preglednici 4 je prikazana sestava neselektivnih in selektivnih gojišč, najpogosteje uporabljenih pri mikrobioloških manipulacijah osamitve bifidobakterij iz humanega blata.

Preglednica 4: Sestava gojišč za bifidobakterije ter dodatki (Ferraris in sod., 2010: 470).

| GOJIŠČE             | OKRAJŠAVA | IME GOJIŠČA                                               | OSNOVNO GOJIŠČE                     | DODATKI                                            |
|---------------------|-----------|-----------------------------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------------------------|
| <b>Neselektivno</b> | mMRS      | ang. Modified MRS                                         | MRS agar                            | L-cistein HCl                                      |
|                     | TPY       | ang. Tryptone Phytone Yeast                               |                                     |                                                    |
|                     | WCB       | Wilkins-Chalgren za rod <i>Bifidobacterium</i>            | ang. Wilkins-Chalgren Anaerobe agar | Tween 80, glukoza, L-cistein HCl                   |
| <b>Selektivno</b>   | BSM       | ang. <i>Bifidobacterium</i> selective medium              | MRS                                 | L-cistein HCl, Mupirocin                           |
|                     | MTPY      | ang. Modified TPY                                         | TPY                                 | Tween 80, očetna kislina, L-cistein HCl, Mupirocin |
|                     | BFM       | ang. <i>Bifidobacterium</i> medium                        |                                     | 13 različnih dodatkov                              |
|                     | Beerens   | Beerens agar                                              | Columbia agar                       | Propionska kislina                                 |
|                     | WCBM      | ang. Wilkins-Chalgren za <i>Bifidobacterium</i> Mupirocin | WCB                                 | Mupirocin                                          |

Poskusi z bifidobakterijami, osamljenimi iz blata človeka, govejega vampa in prebavnega trakta čebel, so pokazali, da sta glavni sestavini neselektivnega gojišča TPY, ki omogočata rast in preživelost bifidobakterij, tripton in fiton. Poleg rasti in stabilnosti bifidobakterij omogoča to gojišče tudi izolacijo in kultivacijo sevov, ki pripadajo zelo raznolikim vrstam rodu *Bifidobacterium* iz različnih ekoloških niš. Ker pa gojišče ni selektivno, lahko privede do rasti tudi drugih mikroorganizmov, kot so laktobacili in streptokoki (Ferraris in sod., 2010).

Biavatti in Mattarelli (2006) navajata, da je gojišče TPY zelo uporabno za osamitev bifidobakterij iz blata človeka. Na tem gojišču so dobro vidne morfološke lastnosti bifidobakterij, kot so število in razporeditev kolonij, medtem ko so pod mikroskopom dobro vidni celični obrisi, velikost in razvejanost kolonij.

Selektivnost gojišč za bifidobakterije lahko povečamo tako, da čimbolj zavremo rast spremljajoče mikrobne populacije, kar dosežemo z dodatkom različnih selektivnih suplementov v gojišče, kot so litijev klorid, natrijev propionat ali propionska kislina, iodoocetna kislina, z znižanjem vrednosti pH gojišča na 5,5 ali manj, ali pa z dodatkom rastnih faktorjev kot so riboflavin, dušikovi derivati, piruvična kislina, enostavni ali sestavljeni ogljikovi hidrati (rafinoza, laktoza, laktuloza, oligosaharidi), ki vplivajo na boljšo rast bifidobakterij (Biavatti in Mattarelli, 2006).

Tako je za osamitev bifidobakterij iz mlečnih izdelkov od leta 2010 v veljavi standard, ki opisuje metodo selektivnega ugotavljanja domnevnih bifidobakterij v mlečnih izdelkih z uporabo tehnike štetja kolonij pri temperaturi 37 °C v anaerobnih razmerah na gojišču TOS, ki mu je dodan antibiotik mupirocin (ISO 29981/IDF 220:2010). Metoda se uporablja za analizo prisotnih in živih bifidobakterij, ki se, skupaj z drugimi MKB, nahajajo v fermentiranih in nefermentiranih mlečnih izdelkih, v mleku v prahu, mlečnih formulah za dojenčke ter v starterskih kulturah.

Če želimo osamiti bifidobakterije iz mlečnih izdelkov moramo uporabiti dodatke, ki zavirajo rast drugih prisotnih probiotičnih mikroorganizmov in/ali tehnoloških MKB (laktobacili, streptokoki) (Roy, 2001). Bifidobakterije v mlečnih izdelkih pogosto pripadajo vrstam

*Bifidobacterium adolescentis*, *B. animalis* subsp. *animalis*, *B. animalis* subsp. *lactis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis* in *B. longum*.

Lahko rečemo, da je selektivnost gojišča zelo pomembna, saj s primernimi dodatki v hranilno gojišče omogočimo rast le tarčni bakterijski vrsti, zato se poleg že navedenih selektivnih dodatkov pogosto uporabljajo tudi antibiotiki (gentamicin, nalidiksična kislina, neomicin), različni viri ogljikovih hidratov, soli in žolč (Mullan, 2002).

Že leta 1978 so Terraguchi in sod. (1978) za osamitev in kvantitativno določanje bifidobakterij predlagali uporabo selektivnih dodatkov, kot so neomicin, nalidiksična kislina, litijev klorid in paramomicin sulfat (NNLP) (Mullan, 2002).

Po drugi strani pa za osamitev bifidobakterij iz humanega blata še ni na voljo primerne in validiranega gojišča, zato iščejo raziskovalci nove možnosti. Eno novejših selektivnih gojišč za bifidobakterije je WCBM (Wilkins-Chalgren za *Bifidobacterium* Mupirocin), ki ga pripravimo tako, da osnovnemu komercialno pripravljenemu gojišču WCAA (ang. Wilkins-Chalgren Anaerobe Agar) dodamo glukozo, Tween ter cistein in dobimo gojišče WCB (ang. Wilkins-Chalgren *Bifidobacterium*), katerega selektivnost pa dosežemo z dodatkom selektivnega faktorja mupirocina. Poleg enostavne priprave, je gojišče WCBM učinkovito za selektivno osamitev bifidobakterij iz vzorcev humanega blata (Ferraris in sod., 2010). Antibiotik mupirocin zavira rast laktobacilov, enterokokov in streptokokov, ne pa tudi bifidobakterij (Thitaram in sod., 2005).

#### **2.4.2 Molekularne tehnike**

Pri identifikaciji in razvrščanju mikroorganizmov se velikokrat uporabljajo molekularne tehnike, ker so natančne in hitre (Baleiras Couto in sod., 1994). Pri ugotavljanju stopnje sorodnosti mikroorganizmov pogosto uporabljamo metode tipiziranja DNA, kot je na primer metoda verižne reakcije s polimerazo (PCR), ki temelji na preiskavi DNA in se uporablja tudi za ugotavljanje prisotnosti mikroorganizmov v živilih in drugih vzorcih (Jeršek, 2009).

#### 2.4.2.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction, PCR) je metoda, ki omogoča kopiranje odsekov DNA s pomočjo encima DNA polimeraze in je omogočila nove, hitre analize za identifikacijo različnih mikroorganizmov (Matsuki in sod., 2003). Stopnje, ki so vključene v preiskavo vzorca s PCR so priprava DNA, priprava in izvedba PCR in analiza pomnožkov (Jeršek, 2009).

Princip metode je *in vitro* pomnožitev dela tarčne DNA z encimom DNA-polimeraza v cikličnem termostatu. Polimeraza je termostabilen encim, ki so ga osamili iz termofilnih bakterij vrste *Thermus aquaticus*. Optimalna temperatura delovanja encima je 72 °C, svojo aktivnost pa ohrani tudi pri višjih temperaturah, ki so potrebne za denaturacijo dvoverižne DNA (Gasparič in Komel, 1996; Kwon in sod., 2005).

Termostat zagotavlja zvezno spreminjanje temperature v ciklu, ki zajema tri faze:

1. denaturacija oziroma razdvajanje dvoverižne DNA (npr. 95 °C, 30 s),
2. prileganje začetnih oligonukletidov (npr. 55-72 °C, 5-60 s),
3. podaljševanje verige (npr. 72 °C, 60 s).

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

Za pomnoževanje dela DNA je potrebna reakcijska mešanica, ki poleg tarčnih molekul DNA, vsebuje termostabilno DNA-polimerazo, mešanico dNTP,  $Mg^{2+}$ , reakcijski pufer in par začetnih oligonukleotidov. Vsak potek PCR moramo glede na izvedbo in namen optimizirati (določiti temperature in čase v ciklu, število ponovitev ciklusa in določiti sestavo reakcijske mešanice) (Jeršek, 2009).

Izbira začetnih oligonukleotidov je odvisna od vrste PCR, vrste preiskovanih mikroorganizmov ter zaporedja baz adenin, timin, gvanin in citozin v začetnih oligonukleotidih (Matsuki in sod., 2003).

Pomnožke PCR najpreprosteje preverimo in analiziramo z agarozno gelsko elektroforezo tako, da njihovo velikost primerjamo z molekularnim označevalcem z znanimi velikostmi odsekov (Jeršek, 2009).

PCR je zelo specifična in občutljiva metoda. Predpogoj za uspešno in selektivno pomnoževanje je predhodno poznavanje nukleotidnega zaporedja vsaj enega dela genoma bakterije (Poljak in sod., 1994).

Številne raziskave predpostavljajo, da PCR predstavlja ključ za natančno analizo mikrobnih interakcij v prebavnem traktu, vključno s proučevanjem vloge probiotičnih bakterij v tem procesu (Ahmed in sod., 2013).



Slika 5: Ciklični termostat za PCR

#### 2.4.2.2 Metoda naključno pomnožene polimorfne DNA (RAPD)

Ena od najpogostejše uporabljenih molekularno bioloških metod na osnovi verižne reakcije s polimerazo DNA, ki omogoča odkrivanje raznolikosti mikroorganizmov, je metoda naključno pomnožene polimorfne DNA (angl. randomly amplified polymorphic DNA, RAPD).

Metoda je primerna za analize velikega števila bakterijskih sevov v dokaj kratkem času (Kwon in sod., 2005).

Osnova RAPD je verižna reakcija s polimerazo, v katero sta vključena genomska DNA, ki služi kot matrica in začetni oligonukleotidi z naključnim oligonukleotidnim zaporedjem, ki pomnožuje naključne odseke na matrični verigi DNA. Metoda poteka s ponavljanjem enakih

faz kot pri PCR (denaturacija dvoveržnih verig DNA, prileganje začetnih oligonukleotidov in sinteza DNA) (Šrutkova in sod., 2011).

Pri RAPD ni potrebno predhodno poznavanje zaporedja DNA, saj uporabimo nespecifične in krajše začetne oligonukleotide s poljubnim zaporedjem, kar nam omogoča tudi analizo neznanih vrst oz. sevov (Menard in Mouton, 1993). Pri RAPD uporabimo večinoma le en začetni oligonukleotid in če se le-ta veže na komplementarna mesta DNA, ki niso oddaljena več kot 3000 baznih parov, se regija med obema mestoma prileganja začetnega oligonukleotida podvoji (Tcherneva in sod., 2000).

Dolžina začetnih oligonukleotidov, ki se najpogosteje uporabljajo v RAPD, je 10 nukleotidov. Prav zaradi kratkega začetnega oligonukleotida je verjetnost, da le-ta najde večje število komplementarnih mest v genomu dovolj velika. Pri tem se samo v eni reakciji pomnoži več različno dolgih pomnožkov DNA, ki izvirajo iz različnih delov genoma (Caetano Anoles, 1993).

Metoda je učinkovita pri ugotavljanju genetskih raznolikosti med organizmi in pri razlikovanju znotraj posameznih vrst organizmov. Glavne prednosti metode so enostavnost in nezahtevnost ter predvsem možnost razlikovanja sevov iste vrste (Riede in sod., 1994). Izrazita pomanjkljivost metode pa so slaba ponovljivost in relativno težka interpretacija rezultatov, kar naj bi bila posledica različnih koncentracij in čistosti DNA, sestave reakcijskega pufra ter različne intenzitete enako dolgih namnoženih odsekov DNA (Baleiras Couto in sod., 1994). Ponovljivost lahko močno izboljšamo s standardizacijo posameznih faz metode RAPD ter uporabo reagentov vedno od istega proizvajalca (Tcherneva in sod., 2000).

### **2.4.3 Encimske tehnike**

Biokemijske značilnosti so prav tako pomemben kriterij pri identifikaciji bakterij. Z različnimi biokemijskimi testi dokazujemo aktivnost encimov (koagulaza, oksidaza), sposobnost razgradnje različnih substratov (ogljikovi hidrati, beljakovine, škrob,...) ter na kakšen način poteka razgradnja (fermentativno, oksidativno). Za posamezne seve je tudi značilno, da za rast potrebujejo dodatne rastne dejavnike.

#### **2.4.3.1 Fruktoza-6-fosfat fosfoketolazni test (F6PKK)**

Z encimskimi metodami ugotavljamo aktivnost encima fruktoza-6-fosfat fosfoketolaza (F6PKK), ki je značilen za metabolizem sladkorjev pri bifidobakterijah. S pomočjo encimogramov lahko odkrivamo še izoencime specifičnih encimov F6PPK, transaldolaz ali 6-fosfoglukonat dehidrogenaz (Fanedl, 2002).

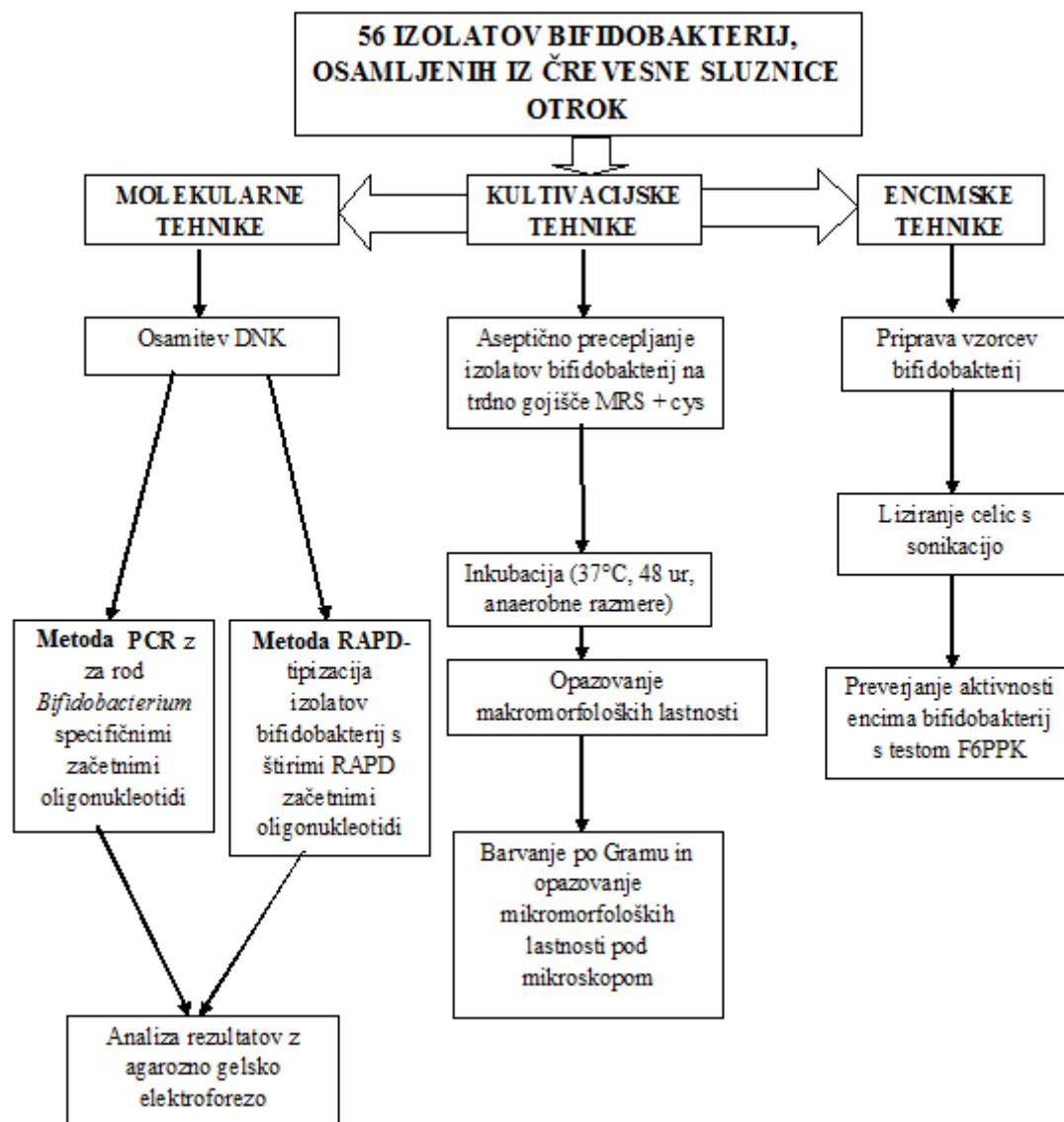
### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 POTEK POSKUSA

V nalogi smo se posvetili identifikaciji bifidobakterij, predhodno osamljenih iz vzorcev črevesne sluznice otrok. Pri tem smo uporabili biokemijski test ugotavljanja aktivnosti encima fruktoza-6-fosfat fosfoketolaze ter molekularni pristop, kjer smo v PCR z rodovno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi potrjevali pripadnost rodu *Bifidobacterium*, v RAPD pa smo bifidobakterije razvrstili v skupine na nivoju seva oz. zelo sorodnih sevov.

V nalogi smo se osredotočili tudi na pripravo oz. iskanje tekočih gojišč, prilagojenih za kultivacijo bifidobakterij, saj zaenkrat takih gojišč komercialno ni na voljo. Trenutno edini možni način priprave takih gojišč bi bilo njihovo sestavljanje iz posameznih komponent, kar pa se je izkazalo za precej drag pristop, zato smo ta del naloge opustili.

Potek dela je prikazan na sliki 6.



Slika 6: Diagram poteka dela

## 3.2 MATERIALI

### 3.2.1 Sevi bifidobakterij

Magistrska naloga je bila del širše zastavljenega projekta KC Brin, katerega partner je bil tudi Inštitut za mlekarstvo in probiotike, kjer je potekalo pričujoče delo. Ker so bili izhodiščni vzorci za pridobitev bifidobakterij biopti črevesne sluznice otrok in ker so to zelo dragoceni vzorci, z njimi nismo neposredno rokovali, temveč smo dobili iz bioptov že osamljene bakterijske seve bifidobakterij, ustrezno shranjenih pri  $-20^{\circ}\text{C}$ . V preglednici 4 so zbrani sevi bifidobakterij, predhodno osamljeni iz črevesnih bioptov.

Preglednica 5: Sevi bifidobakterij, osamljeni iz črevesnih bioptov

| Zaporedna številka | OZNAKA SEVA            | Zaporedna številka | OZNAKA SEVA                           |
|--------------------|------------------------|--------------------|---------------------------------------|
| 1                  | 1                      | 32                 | 28 mala velika                        |
| 2                  | 3                      | 33                 | 29 mala                               |
| 3                  | 10                     | 34                 | 29 velika                             |
| 4                  | 11                     | 35                 | 30 velika                             |
| 5                  | 15                     | 36                 | 31 velika mala                        |
| 6                  | 1 iz WCA               | 37                 | 31 velika velika                      |
| 7                  | 2 iz WCA               | 38                 | 33                                    |
| 8                  | 3 iz WCA               | 39                 | 35                                    |
| 9                  | 4 iz WCA               | 40                 | 37 mala                               |
| 10                 | 5 iz WCA               | 41                 | 37 velika                             |
| 11                 | 6 iz WCA               | 42                 | 38 velika mala                        |
| 12                 | 13A 3A                 | 43                 | 40                                    |
| 13                 | 18A 3A                 | 44                 | 41 velika prosojna                    |
| 14                 | 17 (rumena) 3A TOS     | 45                 | 43 mala                               |
| 15                 | 17 (rumena) 3A MRS+CYS | 46                 | 43 velika                             |
| 16                 | 17 (roza) 3A           | 47                 | 36 (iz URI)                           |
| 17                 | 1 iz URI 2A            | 48                 | 16 iz MRS+CYS krem 2A (iz URI) velika |
| 18                 | 1 iz MRS+CYS velika 2A | 49                 | T1 mala mala                          |
| 19                 | 11 iz bujona 2B        | 50                 | T1 mala velika                        |
| 20                 | 16 iz MRS+CYS bela 2A  | 51                 | T1 velika mala                        |
| 21                 | 20 mala mala           | 52                 | T1 velika velika                      |
| 22                 | 20 mala velika         | 53                 | T5 mala mala                          |
| 23                 | 20 velika mala         | 54                 | T5 mala velika                        |
| 24                 | 20 velika velika       | 55                 | T5 velika velika                      |
| 25                 | 21 velika              | 56                 | T9                                    |
| 26                 | 22 mala                |                    |                                       |
| 27                 | 22 velika              |                    |                                       |
| 28                 | 23 mala                |                    |                                       |
| 29                 | 23 velika              |                    |                                       |
| 30                 | 27 velika              |                    |                                       |
| 31                 | 28 mala mala           |                    |                                       |

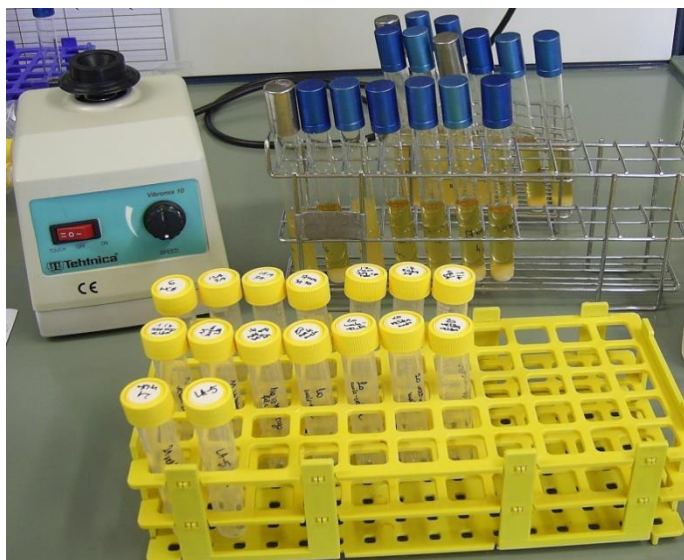
Za preverjanje aktivnosti encima fruktoze 6-fosfat fosfoketolaze (F6PPK) smo pri raziskovalni nalogi uporabili sev *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 (DSM 15954), ki nam je služil kot pozitivna kontrola ter kot negativno kontrolo uporabili sev *Lactobacillus acidophilus* La-5 (DSM 13241).

Sev *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 je eden najbolj razširjenih sevov bifidobakterij v probiotičnih izdelkih. Sev ni humanega izvora, vendar pa mu toleranca za kislo okolje in za prisotnost kisika omogočata uporabo v različnih živilih in prehranskih dopolnilih (Mohammadi in sod., 2012).

### 3.2.2 Gojišča za bifidobakterije

#### 3.2.2.1 Tekoče gojišče MRS s cisteinom

Za pripravo tekočega gojišča MRS z dodatkom cisteina (MRS+cys) smo zatehtali 52,2 g dehidriranega gojišča MRS (Merck, Darmstadt, Nemčija) in ga raztopili v 1 litru demineralizirane vode ter dodali cistein (Merck) v koncentraciji 0,05 %. Gojišče smo nato razdelili po 10 ml v epruvete in ga avtoklavirali pri 118 °C 15 minut. Tekoče gojišče smo uporabili za namnoževanje bifidobakterij.



Slika 7: Precepljanje sevov bifidobakterij v tekoče gojišče MRS+cys

### 3.2.3 Reagenti za barvanje po Gramu

Za barvanje po Gramu smo uporabili komplet Color Gram 2 (BioMérieux, Marcy-L'Etoile, Francija), ki vsebuje barvilo kristal vijolično, barvilo lugol, mešanico acetona in etanola (1:1) in barvilo safranin. Pred mikroskopiranjem smo preparatu na objektnejem stekelcu dodali imerzijsko olje.

### 3.2.4 Reagenti in encimi za osamitev DNA

DNA bifidobakterij smo osamili s pomočjo komercialnega kompleta DNA Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, ZDA), katerega sestavine so predstavljene v preglednici 6.

Preglednica 6: Sestavine komercialnega kompleta DNA Wizard® Genomic DNA Purification Kit

| Zaporedna številka | KOMPONENTA                          | FUNKCIJA                          |
|--------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|
| 1                  | ang. Cell Lysis Solution            | Raztopina za lizo celic           |
| 2                  | ang. Nuclei Lysis Solution          | Raztopina za lizo celičnega jedra |
| 3                  | ang. Protein Precipitation Solution | Raztopina za obarjanje proteinov  |
| 4                  | ang. DNA Rehydration Solution       | Raztopina za rehidracijo DNA      |
| 5                  | ang. RNase solution                 | Raztopina RNaza                   |

Poleg komercialnega kompleta smo uporabili še sledeče reagente:

- 2500 U/ml mutanolizin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- 10 mg/ml lizocim (Sigma)
- 50 mM EDTA, pH=8 (Sigma)
- Izopropanol (Merck)
- 70 % etanol (Merck)

### 3.2.5 Reagenti za PCR in RAPD

Za pripravo reakcijskih mešanic za PCR oz . RAPD smo uporabili kemikalije iz kompleta GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega):

- 5X zeleni Go Taq® flexi pufer za polimerazo brez MgCl<sub>2</sub>
  - 25 mM MgCl<sub>2</sub>
  - Go Taq® DNA polimeraza (5U/μl)
- in ostale reagentne:
- mešanico dNTP, vsak v koncentraciji 10 mM (Fermentas, Vilna, Litva)
  - začetni oligonukleotidi (založna koncentracija 100 μM) (Invitrogen, Molecular probes, Oregon, ZDA)
  - deionizirana, mikrofiltrirana in sterilna voda MilliQ

Preglednici 7 in 8 prikazujeta začetne oligonukleotide, ki smo jih uporabili pri PCR in RAPD.

Preglednica 7: Začetni oligonukleotidi specifični za rod *Bifidobacterium*

| Tarčni rod             | Oznaka začetnega oligonukleotida | Nukleotidno zaporedje                               | Velikost pomnožka (bp) | Vir                    |
|------------------------|----------------------------------|-----------------------------------------------------|------------------------|------------------------|
| <i>Bifidobacterium</i> | Bif 164-f<br>Bif 662-r           | 5'-GGGTGGTAATGCCGGATG-3'<br>5'-CCACCGTTACACCGGAA-3' | 520                    | Satokari in sod., 2001 |

Preglednica 8: Začetni oligonukleotidi za RAPD

| Oznaka začetnega oligonukleotida | Nukleotidno zaporedje | Vir                                  |
|----------------------------------|-----------------------|--------------------------------------|
| M13                              | 5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3' | Torriani in sod., 1999               |
| KGT-70GC                         | 5'-AGCGGGCGTA-3'      | Inštitut za mlekarstvo in probiotike |
| KGT-80GC                         | 5'-CGCGTGCCCA-3'      | Inštitut za mlekarstvo in probiotike |
| GTG5                             | 5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3' | Versalovic in sod., 1994             |



Slika 8: Reagenti za PCR in RAPD

### 3.2.6 Reagenti za analizo pomnožkov v agaroznem gelu

- Agaroz: SeaKem<sup>®</sup> LE Agarose (Londa, Rockland, ZDA)
- 0,5x pufer TAE (Tris Acetatni EDTA pufer), pH=8,0
- velikostna lestvica DNA: GeneRuler<sup>™</sup> 100bp DNA Ladder (Fermentas)
- DNA barvilo: Sybr Safe<sup>™</sup> DNA Gel Stain (Invitrogen)

### 3.2.7 Reagenti za fruktoza-6-fosfat fosfoketolazni test F6PPK

Za ugotavljanje aktivnosti F6PPK smo uporabili naslednje reagente (Tannock, 1999):

- 0,05 M fosfatni pufer (pH 6,5) z dodatkom cisteina (500 mg/l; Merck)
- raztopina NaF (natrijev fluorid; 6 mg/ml; Sigma-Aldrich) in NaI acetat (natrijev iodoacetat; 10 mg/ml; Sigma-Aldrich)
- NH<sub>2</sub>OH HCl (hidroksilamin hidroklorid; 13,9 g/100 ml vode; Sigma-Aldrich), sveže nevtraliziran z NaOH do vrednosti pH 6,5
- TCA (trikloroocetna kislina; 15 % (w/v) v vodi; Merck)
- HCl (klorovodikova kislina; 4 M; Merck)
- FeCl<sub>3</sub> x 6H<sub>2</sub>O (železov III klorid heksa hidrat; 6,5 % (w/v) v 0,1 M HCl; Sigma-Aldrich)
- fruktoza 6-fosfat (natrijeva sol; 80 mg/ml; Sigma-Aldrich)

za lizo celic pa smo pri sonikaciji uporabili še:

- mutanolizin, založna raztopina 2500 U/ml (Sigma)
- lizocim, založna raztopina 6 mg/ml (Sigma)

### 3.3 LABORATORIJSKI MATERIAL IN OPREMA

- Komora za pripravo reakcijskih mešanic PCR (UV sterilizing cabinets and workstation UVP),
- UV transiluminator Chemi Genius<sup>2</sup> (Bio imaging system),
- Avtoklav (A-21 CA Kambič, Slovenija),
- Inkubator (BT150, Marijan Krokter, Slovenija),
- Centrifuga (mikro 22R, Hettich Zentrifugen, Nemčija),
- Mikrovalovna pečica (32 L, Bosch, Nemčija),
- pH meter (Mettler Toledo MP 120, Mettler, Nemčija),
- Laboratorijski pribor: epruvete, pipete, pincete, steklovina, stojala, gorilnik, nastavki za pipete, tehnica,
- Sonikator (Soniprep 150, MSE Scientific Instruments, UK),
- Ciklični termostat za izvedbo PCR (Mastercycler gradient, Eppendorf, Nemčija),
- Svetlobni mikroskop (Reichert, Avstrija),
- Oprema za elektroforezo: elektroforetska banjica za vlivanje gela, glavnički, banjica z barvilom Sybr Safe<sup>™</sup>.

### 3.4 METODE

#### 3.4.1 Priprava bakterijskih sevov bifidobakterij

Bifidobakterije, predhodno osamljene iz vzorcev črevesne sluznice otrok in prečiščene s precepljanjem na trdno gojišče MRS+cys, smo oživili iz zamrznjenih kultur, hranjenih pri -20 °C v mikrobni zbirki Inštituta za mlekarstvo in probiotike Biotehniške fakultete v Domžalah. S cepilno zanko smo jih precepili v tekoče gojišče MRS+cys.

Izrast bifidobakterij smo zagotovili z inkubacijo cepljenih gojišč 48 ur pri 37 °C v anaerobnih razmerah (GenBox in generatorji anaerobnih razmer; BioMerieux).

#### 3.4.2 Ugotavljanje morfoloških značilnosti bifidobakterij

Za opis morfoloških značilnosti bifidobakterij smo opazovali njihove makro- in mikromorfološke lastnosti.

Pri makromorfoloških značilnostih smo opazovali izgled površine, velikost, obliko in barvo kolonij, zraslih na gojišču MRS+cys, medtem ko smo za opisovanje mikromorfoloških značilnosti pripravili preparate izbranih kolonij in s pomočjo svetlobnega mikroskopa pri 1000-kratni povečavi opazovali, obliko, velikost, formacijo in obarvanje po Gramu.



Slika 9: Opazovanje mikromorfoloških lastnosti bifidobakterij s svetlobnim mikroskopom

Za barvanje po Gramu smo pripravili preparat tako, da smo ob gorilniku na objektno stekelce kanili kapljico raztopine dikalijevega hidrogen fosfata in vanjo vmešali izbrano kolonijo bifidobakterije, ki smo jo s trdnega gojišča prenesli s cepilno zanko. Razmaz smo posušili na zraku ob gorilniku ter ga nato s 3-kratnim potegom skozi plamen fiksirali. Sledilo je barvanje po Gramu, kot je prikazano v preglednici 9.

Preglednica 9: Postopek barvanja po Gramu.

| Potek                                                     | Trajanje (min) |
|-----------------------------------------------------------|----------------|
| Nanos barvila kristal vijolet                             | 1              |
| Spiranje z vodo                                           |                |
| Nanos barvila lugol                                       | 1              |
| Spiranje z vodo                                           |                |
| Razbarvanje preparata z mešanico etanola in acetona (1:1) |                |
| Spiranje z vodo                                           |                |
| Nanos barvila safranin                                    | 1              |
| Spiranje z vodo                                           | 1              |
| Sušenje                                                   |                |

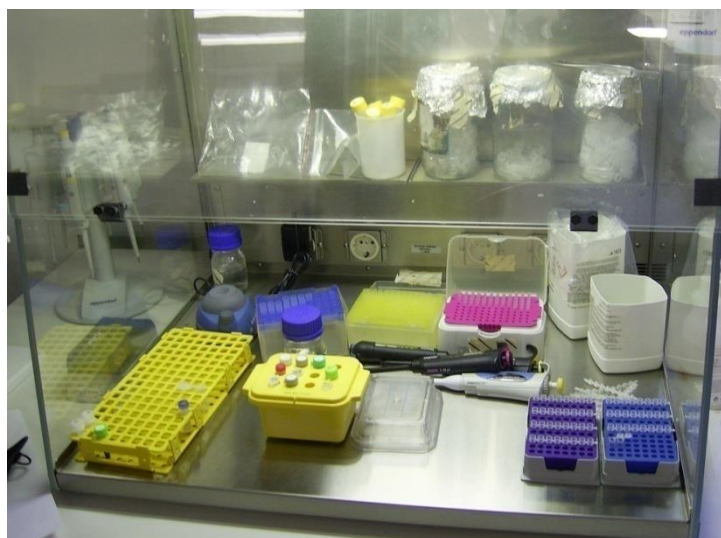
### 3.4.3 Osamitev DNA

Za osamitev DNA smo po 1 ml namnoženih bakterijskih kultur bifidobakterij prenesli v mikrocentrifugirke in sledili navodilom komercialnega kompleta Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega).

Osamljeno DNA posameznih sevov bifidobakterij smo do uporabe v PCR in RAPD hranili v zamrzovalniku (-20 °C).

### 3.4.4 Priprava reakcijskih mešanic za PCR in RAPD

Reakcijske mešanice za PCR in RAPD smo pripravljali v posebni komori za PCR, ki smo jo predhodno 30 min osvetljevali z UV svetlobo. Pri svojem delu smo uporabljali zaščitne rokavice, da ne bi prišlo do kontaminacije. Vse kemikalije za reakcijske mešanice, ki smo jih pripravili s pomočjo kompleta GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega), smo hranili na ledu. Končni volumen posamezne reakcijske mešanice je bil 20 µl.



Slika 10: Komora za pripravo reakcijskih mešanic za PCR in RAPD

#### 3.4.4.1 Potrjevanje rodu *Bifidobacterium* s PCR in začetnima oligonukleotidoma Bif 164-f in Bif 662-r

Preglednica 10 prikazuje sestavo reakcijske mešanice za PCR z izbranimi začetnima oligonukleotidoma Bif 164-f in Bif 662-r.

Preglednica 10: Sestava 20 µl reakcijske mešanice za PCR z začetnima oligonukleotidoma Bif 164-f in Bif 662-r.

| Sestavina                                                        | Količina (µl) |
|------------------------------------------------------------------|---------------|
| DNA vzorca                                                       | 1,0           |
| Mikrofiltrirana in avtoklavirana voda                            | 14,5          |
| Zeleno obarvan GoTaq <sup>®</sup> pufer z MgCl <sub>2</sub> (5x) | 4,0           |
| Začetni oligonukleotid Bif 164-f (100 µM)                        | 0,1           |
| Začetni oligonukleotid Bif 662-r (100 µM)                        | 0,1           |
| dNTP (10 mM)                                                     | 0,2           |
| GoTaq <sup>®</sup> DNA polimeraza (5U/µl)                        | 0,1           |

### 3.4.5 RAPD

Genetsko raznovrstnost oz. istovetnost preiskovanih bifidobakterij smo ugotavljali z RAPD, v katerih smo uporabili 4 različne RAPD začetne oligonukleotide in sicer M13, KGT-70GC, KGT-80GC in GTG5. V preglednicah 11, 12, 13 in 14 so prikazane sestave reakcijskih mešanic za RAPD s posameznimi začetnimi oligonukleotidi. V vsak RAPD smo vključili tudi negativno kontrolo, ki smo jo pripravili tako, da smo v reakcijsko mešanico namesto DNA vzorca dodali mikrofiltrirano in avtoklavirano vodo.

#### 3.4.5.1 RAPD z začetnim oligonukleotidom M13

Preglednica 11 prikazuje sestavo reakcijske mešanice za RAPD z začetnim oligonukleotidom M13.

Preglednica 11: Sestava reakcijske mešanice za RAPD z začetnim oligonukleotidom M13.

| Sestavina                                          | Količina (µl) |
|----------------------------------------------------|---------------|
| DNA vzorca                                         | 2,0           |
| Mikrofiltrirana in avtoklavirana voda              | 10,4          |
| Zeleno obarvan GoTaq <sup>®</sup> flexi pufer (5x) | 4,0           |
| MgCl <sub>2</sub> (25 mM)                          | 3,2           |
| Začetni oligonukleotid M13 (100 µM)                | 0,1           |
| dNTP (10 mM)                                       | 0,2           |
| GoTaq <sup>®</sup> DNA polimeraza (5U/µl)          | 0,1           |

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

Preglednica 12 prikazuje sestavo reakcijske mešanice za RAPD z začetnim oligonukleotidom KGT-70GC.

Preglednica 12: Sestava reakcijske mešanice za RAPD z začetnim oligonukleotidom KGT-70GC.

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

#### 3.4.5.3 RAPD z začetnim oligonukleotidom KGT-80GC

Preglednica 13 prikazuje sestavo reakcijske mešanice za RAPD z začetnim oligonukleotidom KGT-80GC.

Preglednica 13: Sestava reakcijske mešanice za RAPD z začetnim oligonukleotidom KGT-80GC.

| Sestavina                                | Količina (μl) |
|------------------------------------------|---------------|
| DNA vzorca                               | 1,0           |
| Mikrofiltrirana in avtoklavirana voda    | 11,2          |
| Zeleno obarvan GoTaq® flexi pufer (5x)   | 4,0           |
| MgCl <sub>2</sub> (25 mM)                | 3,2           |
| Začetni oligonukleotid KGT-80GC (100 μM) | 0,1           |
| dNTP (10 mM)                             | 0,4           |
| GoTaq® DNA polimeraza (5U/μl)            | 0,1           |

#### 3.4.5.4 RAPD z začetnim oligonukleotidom GTG5

Preglednica 14 prikazuje sestavo reakcijske mešanice za RAPD z začetnim oligonukleotidom GTG5.

Preglednica 14: Sestava reakcijske mešanice za RAPD z začetnim oligonukleotidom GTG5.

| Sestavina                              | Količina (μl) |
|----------------------------------------|---------------|
| DNA vzorca                             | 2,0           |
| mikrofiltrirana in avtoklavirana voda  | 2,5           |
| zeleno obarvan GoTaq® flexi pufer (5x) | 4,0           |
| MgCl <sub>2</sub> (25 mM)              | 2,4           |
| začetni oligonukleotid GTG5(100 μM)    | 4,0           |
| dNTP (2 mM)                            | 5,0           |
| GoTaq® DNA polimeraza (5U/μl)          | 0,1           |

### 3.4.5.5 Razmere PCR oz. RAPD

PCR je potekal v cikličnem termostatu z encimom DNA polimeraza. Cikel je zajemal denaturacijo dvovertične DNA, prileganje začetnih oligonukleotidov in podaljševanje verig. Ko smo mikroeprovete s pripravljenimi reakcijskimi mešanici prenesli v ciklični termostat, smo posamezne PCR oz. RAPD izvedli v razmerah, ki jih prikazuje preglednica 15.

Preglednica 15: Razmere PCR oz. RAPD z različnimi začetnimi oligonukleotidi.

| Vrsta metode                      | Cikel reakcije                       | Razmere       | Število ciklov | Vir                                   |
|-----------------------------------|--------------------------------------|---------------|----------------|---------------------------------------|
| PCR za rod <i>Bifidobacterium</i> | Začetna denaturacija DNA             | 95 °C, 3 min  | 1              | Satokari in sod., 2001                |
|                                   | Denaturacija DNA                     | 95 °C, 30 s   | 30             |                                       |
|                                   | Prileganje začetnih oligonukleotidov | 62 °C, 30 s   |                |                                       |
|                                   | Podaljševanje verige DNA             | 72 °C, 40 s   |                |                                       |
|                                   | Zaključno podaljševanje verige DNA   | 72 °C, 5 min  | 1              |                                       |
| RAPD z z.o. M13                   | Začetna denaturacija DNA             | 95 °C, 3 min  | 1              | Torriani in sod., 1999                |
|                                   | Denaturacija DNA                     | 95 °C, 1 min  | 40             |                                       |
|                                   | Prileganje začetnih oligonukleotidov | 45 °C, 20 sec |                |                                       |
|                                   | Podaljševanje verige DNA             | 72 °C, 2 min  |                |                                       |
|                                   | Zaključno podaljševanje verige DNA   | 72 °C, 5 min  | 1              |                                       |
| RAPD z z.o. KGT 70-GC             | Začetna denaturacija DNA             | 95 °C, 3 min  | 1              | Inštitut z a mlekarstvo in probiotike |
|                                   | Denaturacija DNA                     | 95 °C, 1 min  | 35             |                                       |
|                                   | Prileganje začetnih oligonukleotidov | 37 °C, 2 min  |                |                                       |
|                                   | Podaljševanje verige DNA             | 72 °C, 2 min  |                |                                       |
|                                   | Zaključno podaljševanje verige DNA   | 72 °C, 5 min  | 1              |                                       |
| RAPD z z.o. KGT 80-GC             | Začetna denaturacija DNA             | 95 °C, 3 min  | 1              | Inštitut z a mlekarstvo in probiotike |
|                                   | Denaturacija DNA                     | 95 °C, 1 min  | 35             |                                       |
|                                   | Prileganje začetnih oligonukleotidov | 37 °C, 2 min  |                |                                       |
|                                   | Podaljševanje verige DNA             | 72 °C, 2 min  |                |                                       |
|                                   | Zaključno podaljševanje verige DNA   | 72 °C, 5 min  | 1              |                                       |
| RAPD z z.o. GTG5                  | Začetna denaturacija DNA             | 94 °C, 4 min  | 1              | Versalovic in sod., 1994              |
|                                   | Denaturacija DNA                     | 94 °C, 30 sec | 35             |                                       |
|                                   | Prileganje začetnih oligonukleotidov | 42 °C, 30 sec |                |                                       |
|                                   | Podaljševanje verige DNA             | 72 °C, 30 sec |                |                                       |
|                                   | Zaključno podaljševanje verige DNA   | 72 °C, 4 min  | 1              |                                       |

### 3.4.6 Agarozna gelska elektroforeza

Z agarozno gelsko elektroforezo smo analizirali pomnožke PCR in RAPD, ki smo jih dobili z različnimi oligonukleotidi. Agarozne gele, ki so bili glede na pričakovano velikost pomnožkov različno zamreženi, smo pripravili iz agaroze in pufru TAE, ki smo ju v mikrovalovni pečici segrevali do bistrosti. Nato smo gel ohladili in ga razlili v model z vstavljenimi glavnički. Ko se je gel strdil, smo odstranili glavničke in gel prenesli v elektroforezno banjico z 0,5-kratnim pufrom TAE. V prvo luknjico v gelu smo vedno nanesti 2,5  $\mu$ l velikostne lestvice DNA 100 bp, v ostale luknjice pa po 20  $\mu$ l pomnožkov RAPD oz. PCR. Na gele smo nanesti še pozitivno kontrolo (PCR z za rod *Bifidobacterium* specifičnimi začetnimi oligonukleotidi), (pozitivna kontrola) ki je bila DNA seva *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 in negativno kontrolo (RAPD, PCR z za rod *Bifidobacterium* specifičnimi začetnimi oligonukleotidi), kjer smo namesto DNA dodali mikrofiltrirano in avtoklavirano vodo. Po končani elektroforezi, ki je potekala 60 minut pri napetosti 90 V, smo gel prenesli v banjico z barvilom Sybr Safe™, ki se je vezalo na odseke pomnožene DNA in pri analizi gela pod UV svetlobo fluoresciralo. Z UV transiluminatorjem smo računalniško obdelali rezultate.



Slika 11: Model za vlivanje gela z glavnički in steklenička z raztopljenim agaroznim gelom



Slika 12: Elektroforetska banjica

### 3.4.7 Fruktaza -6- fosfat fosfoketolazni test

Za preverjanje aktivnosti encima fruktoze 6-fosfat fosfoketolaze (F6PPK) smo uporabili protokol Tannock-a (1999):

- ločitev celic iz 24-urnih bakterijskih kultur s centrifugiranjem
- spiranje pridobljenih bakterijskih celic s fosfatnim pufrom
- resuspendiranje usedline spranih celic s fosfatnim pufrom, ki sta mu dodana encima mutanolizin in lizocim
- liziranje tako pripravljenih suspenzij celic s sonikacijo
- ugotavljanje F6PPK aktivnosti soniciranih suspenzij celic s pomočjo dodatka substrata fruktoza-6-fosfat in ostalih reagentov (NaF, NaI acetat,  $\text{NH}_2\text{OH HCl}$ , TCA,  $\text{HCl}$ ,  $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ )
- opazovanje pojava rdeče vijolične barve koz pozitivne reakcije- aktivnosti encima fruktoza-6-fosfat fosfoketolaze

#### 3.4.7.1 Priprava celičnega lizata bifidobakterij

Za pripravo celičnih lizatov smo 10 ml bakterijskih kultur bifidobakterij v MRS+cys, predhodno osamljenih iz črevesne sluznice otrok, po 24-urni inkubaciji v anaerobnih razmerah pri 37 °C centrifugirali 5 min pri 3500 g (6000 obr/min). Usedline celice smo 2x sprali, najprej z 10 ml in nato z 1 ml 0,05 M fosfatnega pufru. Sprane celice smo resuspendirali v 900 µl mešanice za lizo, ki smo jo pripravili iz 0,05 M fosfatnega pufru (641 µl) ter založnih raztopin mutanolizina (9 µl) in lizocima (250 µl). Sledil je postopek sonikacije, s čimer smo naše celice dokončno lizirali.

Pred samo sonikacijo smo kovinsko sondo najprej previdno privili na sonikator, čašo z ledom pa postavili na podstavek sonikatorja. Mikroepreveto z vzorcem celic, resuspendiranih v mešanici za lizo, smo odprli, vstavili v držalo in potisnili navzgor, da se je sonda dotaknila njenega dna. Nato smo mikroepreveto spustili do polovice nivoja vzorca in pazili, da se stene mikroeprevete niso dotikale sonde, podstavek s čašo ledu pa smo dvignili tako visoko, da je bila mikroepreveta do roba potopljena v led. Sledil je vklop sonikatorja in nastavitev pogojev sonikacije (čas delovanja s pavzo ter število ciklov).

Program sonikacije za posamezen vzorec smo izvedli v treh zaporednih ciklih, kjer je bil vsak sestavljen iz 30 sekundnega delovanja in 15 sekundne pavze. Po končani sonikaciji smo odstranili mikroepreveto in sondo očistili z etanolom.

#### 3.4.7.2 Ugotavljanje aktivnosti encima F6PPK

Za ugotavljanje aktivnosti encima F6PPK smo uporabili mikrotitrne plošče, kamor smo nanесли po 25  $\mu$ l soniciranih celic bifidobakterij in sicer vsak vzorec v 3 luknjice. V vsako luknjico smo nato dodali po 6  $\mu$ l mešanice NaF in NaI acetata, v dve luknjici še po 6  $\mu$ l fruktoze-6-fosfata, medtem ko je tretja luknjica služila kot negativna kontrola. Sledila je 30-minutna inkubacija mikrotitrskih plošč pri 37 °C. Po končani inkubaciji smo reakcijo ustavili z dodatkom 37,5  $\mu$ l hidroksilamin hidroklorida v vse luknjice in pustili pri sobni temperaturi 10 minut. V vse luknjice smo nato dodali 25  $\mu$ l TCA, 25  $\mu$ l HCl ter 25  $\mu$ l  $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ . Kot rezultat smo opazovali pojav rdeče vijolične barve, kar je znak fruktoza-6-fosfat fosfoketolazne aktivnosti.



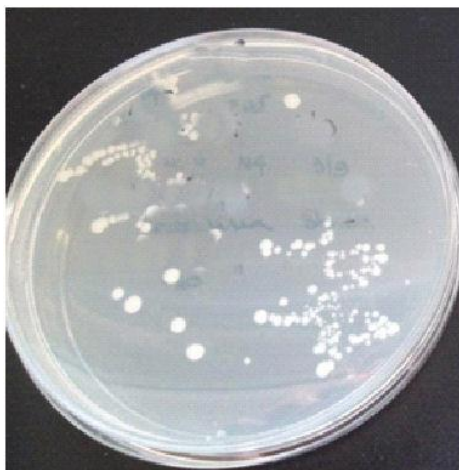
Slika 13: Sonikator

## 4 REZULTATI

### 4.1 MORFOLOŠKA ANALIZA BIFIDOBAKTERIJ

Makromorfološke lastnosti izolatov bifidobakterij smo opazovali z njihovo izrastjo na trdnem gojišču MRS z dodatkom cisteina, medtem ko smo mikromorfološke lastnosti opazovali s pregledovanjem preparatov pod svetlobnim mikroskopom.

Kolonije bifidobakterij, ki so zrasle na trdnem gojišču MRS z dodatkom cisteina (MRS + cys) so bile velike približno 1-2 mm v premeru, bele barve in okrogle oblike z gladkim robom. Slika 14 prikazuje rast bifidobakterij na trdnem gojišču MRS z dodatkom cisteina.



Slika 14: Kolonije čiste kulture bifidobakterij na gojišču MRS + cys (Foto: Čanžek Majhenič A.)

Bifidobakterije sodijo v skupino grampozitivnih bakterij, kar smo dokazali s pregledovanjem po Gramu pobarvanih mikroskopskih razmazov pod svetlobnim mikroskopom. Po obliki so to kratke palčke, ki so na koncu odebeljene in razvejane v obliko črke Y ali V ter modro vijolične barve. Naštete lastnosti so bile določene za vse seve, ki so navedeni v preglednici 5.



Slika 15: Mikroskopski preparat bifidobakterij pod svetlobnim mikroskopom (Todar, 2009)

## 4.2 IDENTIFIKACIJA IN TIPIZACIJA OSAMLJENIH BIFIDOBAKTERIJ S PCR

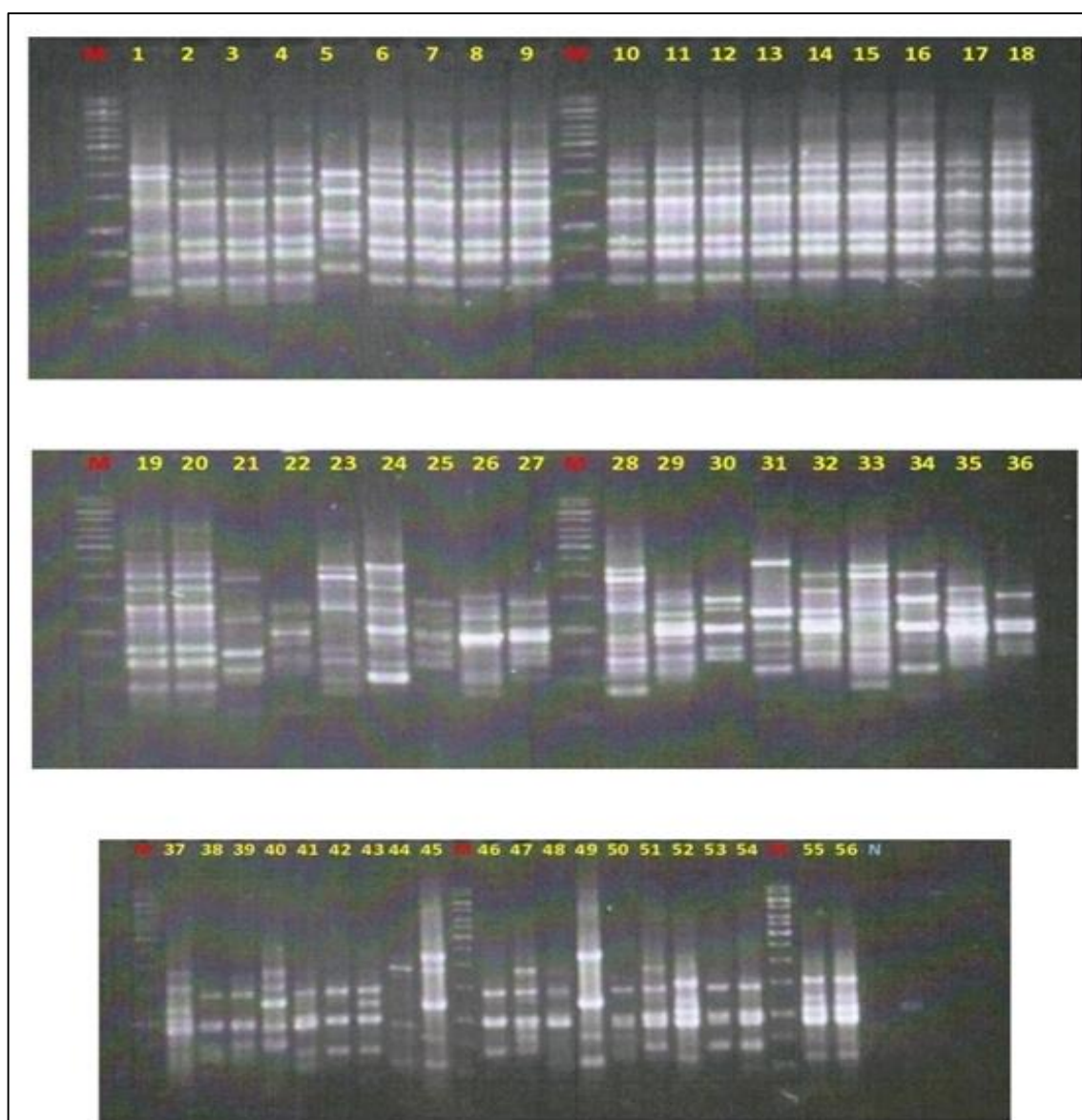
Za osamitev DNA iz bifidobakterij smo sledili navodilom komercialnega kompleta Wizard® Genomic DNA Purification Kit in osamljeno DNA uporabili v PCR in RAPD. Pri PCR smo z uporabo specifičnih oligonukleotidnih začetnikov Bif 164-f in Bif 662-r, ki sta značilna za rod *Bifidobacterium*, določili velikost pomnožka 520 bp. Pri RAPD, s katero smo ugotavljali genetsko podobnost izolatov, pa smo uporabili štiri različne začetne oligonukleotide. Analizo pomnožkov PCR in RAPD smo izvedli z agarozno gelsko elektroforezo. V žepke agaroznega gela smo nanесли po 20 µl pomnožkov, medtem ko smo v prvi žepki nanесли 2,5 µl molekulskega označevalca velikosti 100 bp.

### 4.2.1 Potrditev rodu *Bifidobacterium*

S PCR in uporabo začetnih oligonukleotidov, specifičnih za rod *Bifidobacterium*, smo želeli preveriti, ali je bilo gojišče MRS z dodatkom cisteina dovolj selektivno za izrast bakterij iz rodu *Bifidobacterium*, osamljenih iz bioptov črevesne sluznice otrok. Tako smo vseh 56 naključno izbranih kolonij z gojišča s PCR in uporabo začetnih oligonukleotidov Bif 164-f in Bif 662-r potrdili za pripadnike rodu *Bifidobacterium*.

#### 4.2.2 Tipizacija sevov rodu *Bifidobacterium* z različnimi RAPD začetnimi oligonukleotidi

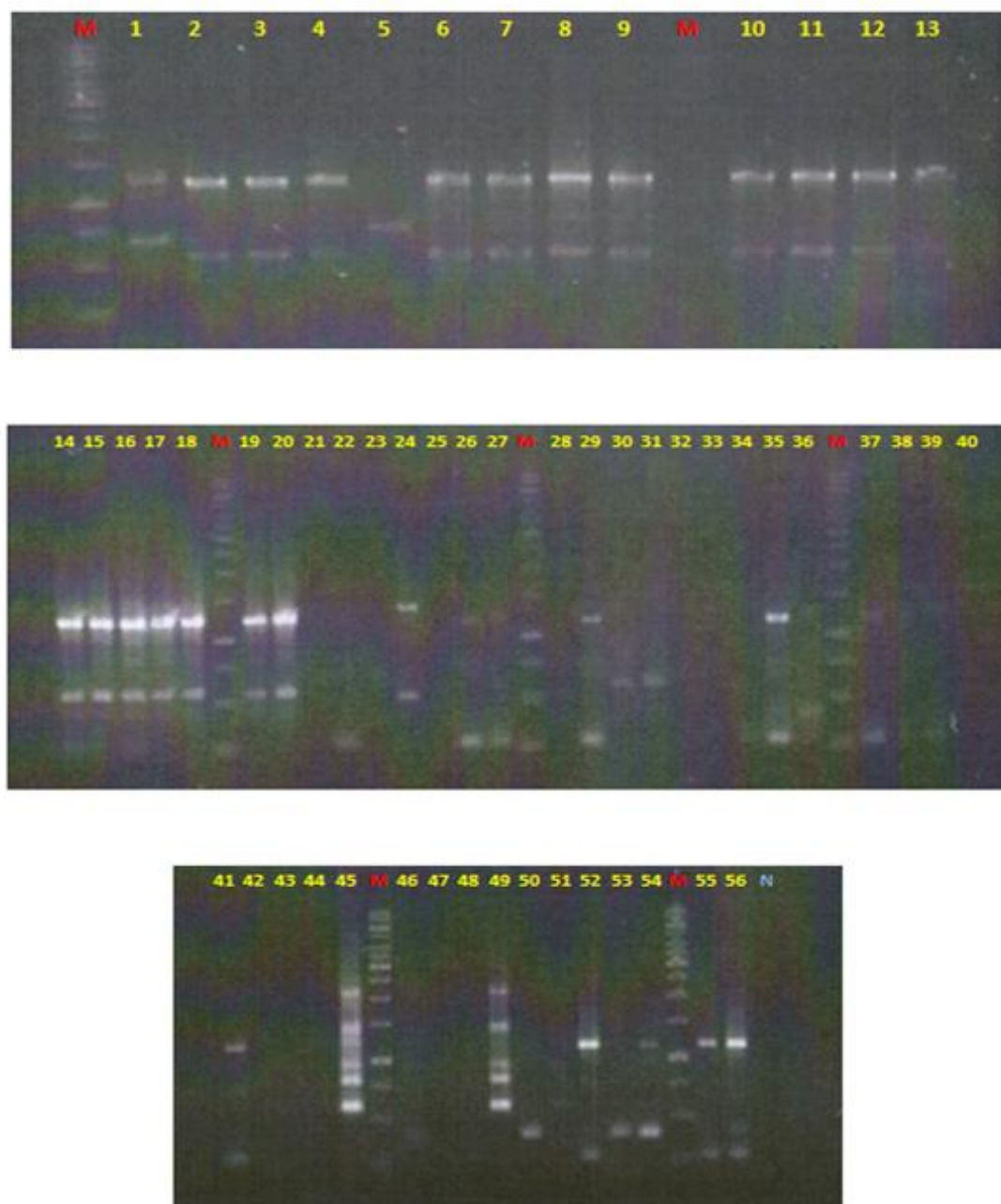
Z RAPD smo ugotavljali sorodnost med sevi bifidobakterij, ki so bile osamljene iz črevesne sluznice otrok. Osamljeno DNA smo kot tarčno DNA uporabili v RAPD s štirimi različnimi začetnimi oligonukleotidi in sicer M13, KGT70-GC, KGT80-GC in GTG5. Po analizi pomnožkov RAPD z gelsko elektroforezo smo dobili različne vzorce pomnožkov- profile RAPD, ki jih prikazujejo slike 16 (M13), 17 (KGT70-GC), 18 (KGT80-GC) in 19 (GTG5).



Slika 16: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov RAPD z začetnim oligonukleotidom M13.

Legenda: N: negativna kontrola, M: molekularni označevalec 100 bp lestvica (Fermentas), 1-56: izolati črevesnih bifidobakterij

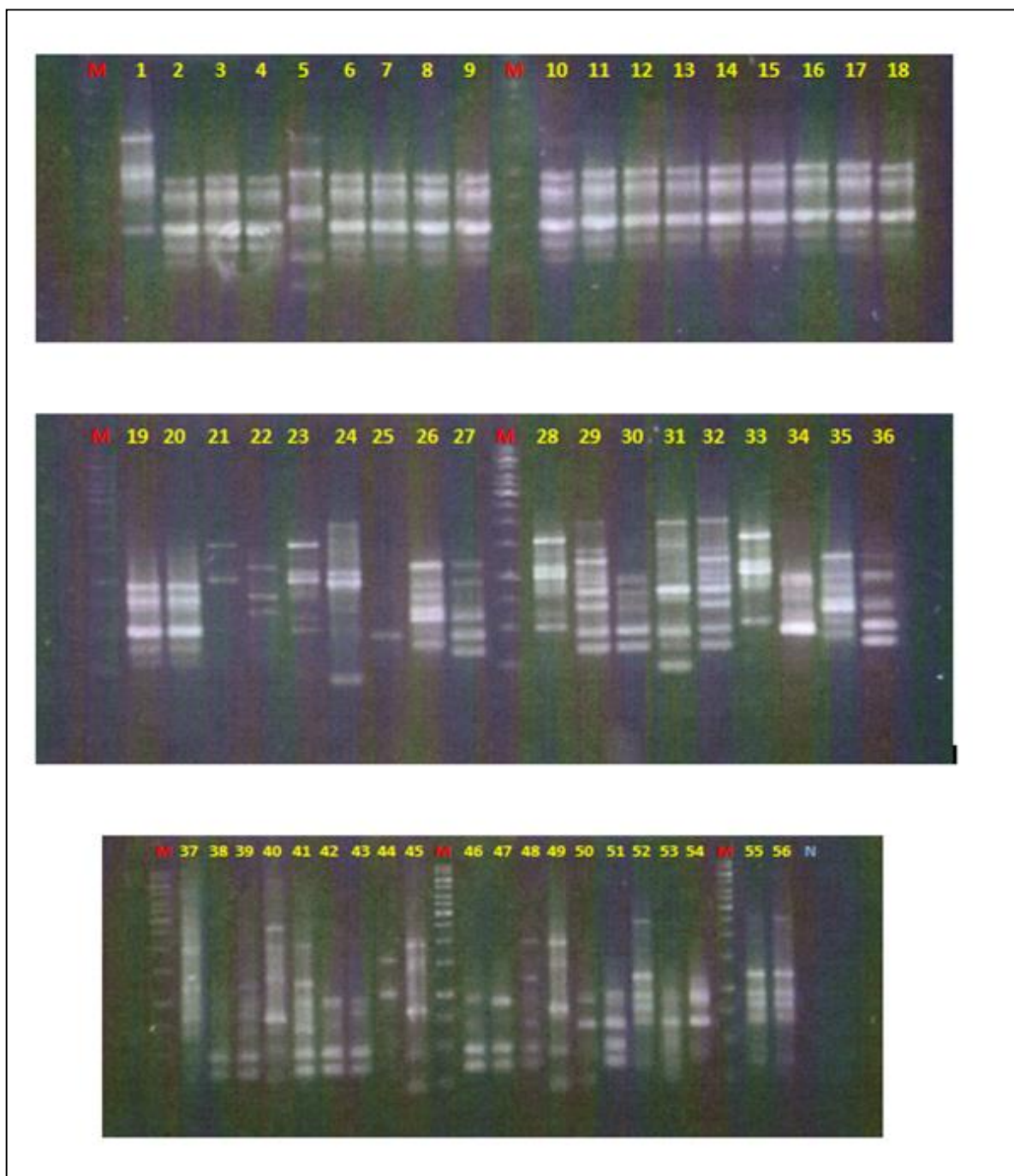
Pri analizi vzorcev pomnožkov z začetnim oligonukleotidom M13, smo opazili različne profile RAPD. Iz slike 16 lahko vidimo, da smo pri osemnajstih sevih (2-4 in 6-20) opazili podoben vzorec RAPD, ki je bil skladen z vzorci pomnožkov pri vseh uporabljenih oligonukleotidih za RAPD (slike 17, 18 in 19). Naslednji potencialen in dobro viden sev bi lahko opisali na osmih progah s sevi 24, 26, 27, 29, 30, 32, 34 in 35. Na petih sevih (52-56) smo dobili podoben vzorec pomnožkov, iz česar lahko sklepamo, da gre spet za podoben sev. Dvakrat smo na treh progah opazili pomnožke, iz katerih lahko domnevamo da gre za podobne seve (41-43 in 46-48). Vzorci pomnožkov na ostalih progah so si bili podobni v največ dveh (22 in 25, 38 in 39, 45 in 49) ali enem pomnožku (1, 5, 21, 23, 28, 31, 33, 36, 37, 40, 44, 50, 51).



Slika 17: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov RAPD z začetnim oligonukleotidom KGT70-GC  
 Legenda: N: negativna kontrola, M: molekularni označevalec 100 bp lestvica (Fermentas), 1-56: izolati črevesnih bifidobakterij

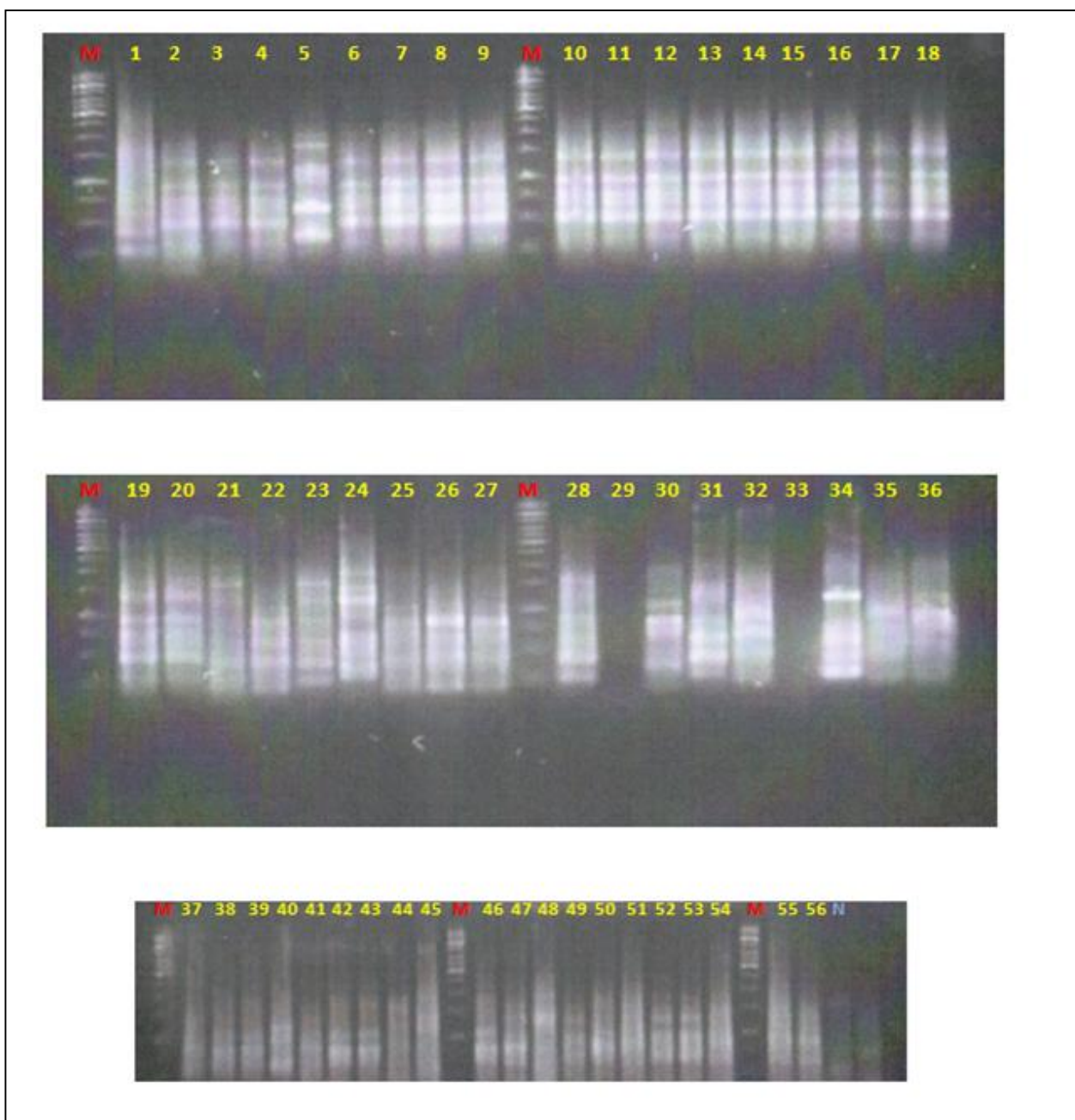
Tako smo z začetnim oligonukleotidom KGT70-GC na osemnajstih progah (2-4 in 6-20) opazili enak vzorec pomnožkov, iz česar lahko sklepamo, da gre za podoben sev. Na štirih progah (41, 52, 55 in 56) je bilo prav tako opaziti podoben sev. Tri proge (50, 53 in 54) so imele spet drugačen vzorec pomnožkov od ostalih iz katerega lahko sklepamo, da gre za

naslednji podoben sev. Ostali pomnožki pa so si bili podobni v največ dveh progah (29 in 35; 30 in 31; 45 in 49). Zaradi slabše ločljivosti pomnožkov na progah 5, 21-24, 25-28, 32-34, 36-40, 42-44, 46-48 in 51 pa rezultate težko komentiramo.



Slika 18: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov RAPD z začetnim oligonukleotidom KGT80-GC  
Legenda: N: negativna kontrola, M: molekularni označevalec 100 bp lestvica (Fermentas), 1-56: izolati črevesnih bifidobakterij

Pri začetnem oligonukleotidu KGT80-GC smo na osemnajstih progah (2-4 in 6-20) opazili enak RAPD vzorec iz česar zaključujemo, da smo tudi z začetnim oligonukleotidom KGT80-GC potrdili podobnost sevov. Na osmih progah (38, 39, 41, 42, 43, 46, 47 in 51) je bilo prav tako opaziti podobnost sevov. Dobro viden sev je bilo opaziti na štirih progah (29-32) in na treh progah (50, 53 in 54; 52, 55 in 56). Agarozni elektroforezni pomnožki (23, 24), (26, 27), (28, 33) in (34, 36) so si bili podobni v največ dveh progah. Ostale profile prog pa zaradi nejasnosti pomnožkov težko komentiramo.

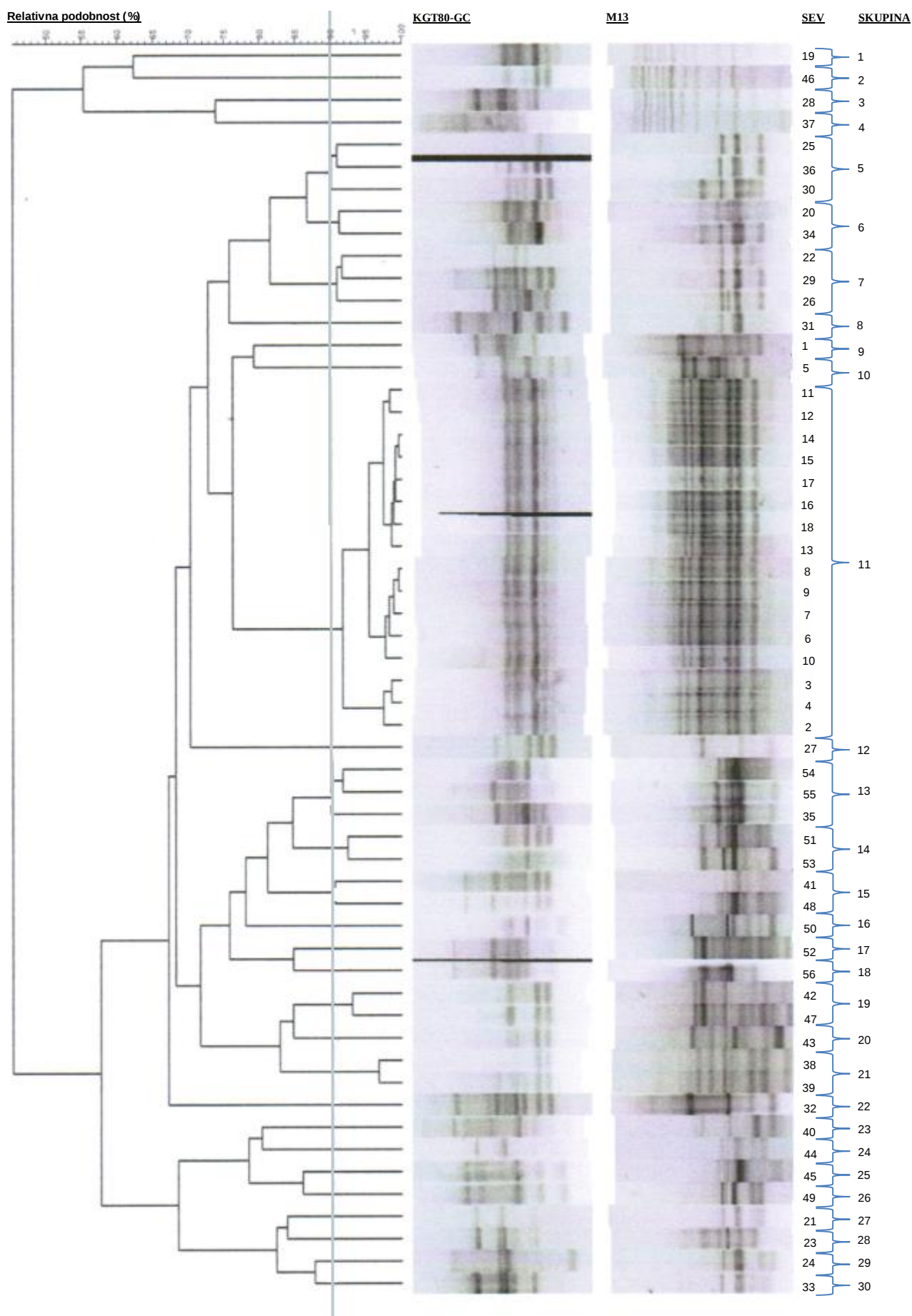


Slika 19: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov RAPD z začetnim oligonukleotidom GTG5  
Legenda: N: negativna kontrola, M: molekularni označevalec 100 bp lestvica (Fermentas), 1-56: izolati črevesnih bifidobakterij

Tudi z zadnjim uporabljenim začetnim oligonukleotidom GTG5 smo na osemnajstih progah (2-4 in 6-20) odčitali podoben RAPD vzorec in domnevamo, da gre za podoben sev. Na treh progah (21-23) je bilo prav tako opaziti enak vzorec prog. Ostali pomnožki so bili vidni v dveh (26-27, 31-32 in 35-36) ali eni progi (5, 24, 25, 28, 29, 30, 33, 34). Proge 37-56 pa so zaradi slabega signala dale neločljivo sliko pomnožkov.

S primerjavo rezultatov profilov RAPD na slikah 16, 17, 18 in 19, ki smo jih pridobili z uporabo različnih RAPD začetnih oligonukleotidov, smo opazili precej raznolike slike pomnožkov bifidobakterij. Pri vseh profilih RAPD opazimo podoben sev na osemnajstih progah (2-4 in 6-20). Z začetnimi oligonukleotidi M13, KGT70-GC in KGT80-GC opazimo štiri proge (53-56), ki so si med seboj podobne. Podobnost prog je opaziti še na treh progah (29, 30 in 32) z začetnima oligonukleotidoma M13 in KGT80-GC. Zaradi slabše vidljivosti in jasnosti slike pa vseh izolatov nismo mogli identificirati oz. jih uvrstiti v določen vzorec RAPD.

Da bi lahko primerjali seve smo v nadaljevanju z računalniškim programom BioNumerics na osnovi Pearson-ovega koeficienta korelacije izdelali dendrogram, s katerim smo primerjali profile RAPD mikrobnih združb bifidobakterij, pomnoženimi z začetnima oligonukleotidoma KGT80-GC in M13. Slika 20 prikazuje dendrogram relativne podobnosti bifidobakterij osamljenih iz različnih vzorcev.



Slika 20: Dendrogram relativne podobnosti bifidobakterij osamljenih iz črevesne sluznice otrok

**Legenda slike 20:**

KGT80-GC, M13: začetna oligonukleotida  
Sev: Sevi črevesnih bifidobakterij (1-56)  
Skupina: Skupine bifidobakterij (1-30)

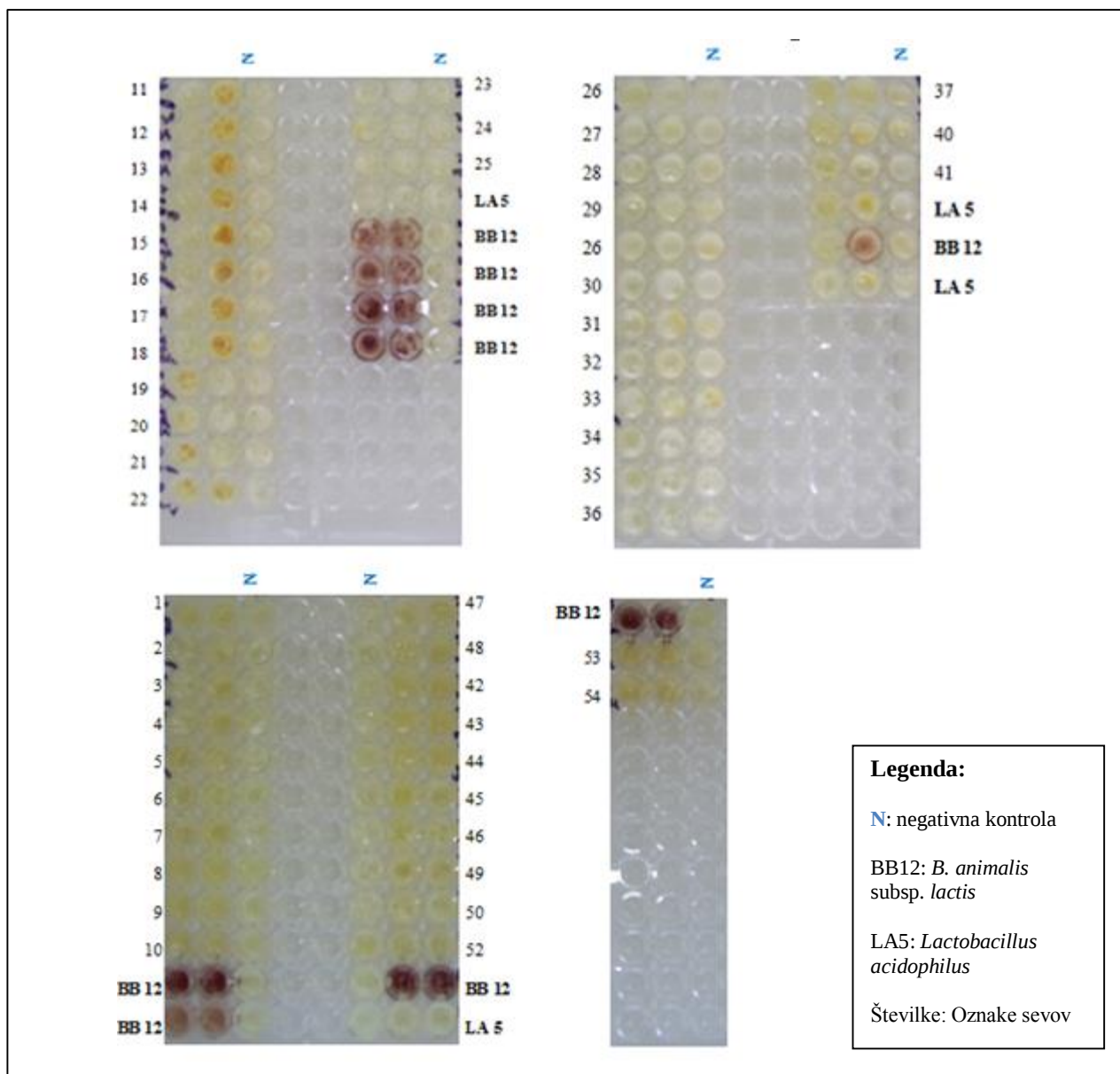
Po primerjavi profilov RAPD na sliki 20 ugotovimo, da je dendrogram razdelil seve v več skupin. Z uporabo dveh različnih začetnih oligonukleotidov, KGT80-GC in M13, smo 56 sevov razdelili v kar 30 skupin pri 90 % relativni podobnosti bifidobakterij.

Vzorci pomnožkov smo primerjali med seboj in rezultat je dendrogram relativne podobnosti testiranih bifidobakterij. Torriani in sod. (1999) so v svoji študiji preizkusili začetni oligonukleotid M13 in seve bifidobakterij razdelili v skupine pri 90 % relativni podobnosti. Za primerjavo sevov smo uporabili RAPD-profile, ki smo jih dobili z začetnima oligonukleotidoma M13 in KGT80-GC. Pri 90 % relativni podobnosti smo seve razdelili v 30 skupin. Sakata in sod. (2002) navajajo identifikacijo bifidobakterij in njihovo razporeditev v skupine sevov na podlagi genetske podobnosti pri vrednosti 95 %. Pri tej vrednosti pa pri nas dobimo kar 42 skupin.

Z uporabo začetnih oligonukleotidov je bilo 56 sevov bifidobakterij pri 90 % relativni podobnosti razdeljenih v 30 skupin (slika 20). Iz dendrograma vidimo, da je v skupini 11 kar 16 sevov (2-4, 6-18). Skupine 5, 7 in 13 imajo v skupini po tri seve. Iz dendrograma so razvidne še skupine 6, 14, 15 in 19 s po dvema sevoma. Ostale skupine so vsebovale le en sev. Dendrogram relativne podobnosti bifidobakterij osamljenih iz črevesne sluznice otrok kaže na veliko raznolikost osamljenih bifidobakterij, saj smo pri 90 % relativni podobnosti dobili le eno večjo skupino sevov (skupina 11), medtem ko so bili drugi sevi razvrščeni v skupine s 1-3 sevi. Ker nimamo podatkov o ostalih lastnostih bifidobakterij (preglednica 5), drugih povezav ne moremo predvidevati.

#### 4.3 FRUKTOZA-6-FOSFAT FOSFOKETOLAZNI TEST

Izolate bifidobakterij, osamljene iz črevesne sluznice otrok, smo analizirali še s fruktoza-6-fosfat fosfoketolaznim testom. Test je pokazatelj encimske aktivnosti bifidobakterij, saj so edine bakterije, ki presnavljajo ogljikove hidrate po fruktoza-6-fosfat fosfoketolazni poti. Pojav rdeče vijolične barve je znak fruktoza-6-fosfat fosfoketolazne aktivnosti. Če zasledimo rumeno obarvanje je test negativen. Sliki 21 in 22 prikazujeta rezultate fruktoza-6-fosfat fosfoketolaznega testa proučevanih 52 izolatov bifidobakterij.



Slika 21: Rezultati encimskega F6PPK testa izolatov bifidobakterij

Za kontroli v encimskem testu smo kot pozitivno kontrolo za bifidobakterije uporabili sev *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12, ki se je obarval rdeče ter za negativno kontrolo uporabili sev *Lactobacillus acidophilus* La-5, ki se je obarval rumeno. Oba predstavnika sta iz rodov potencialnih probiotikov. Pri F6PPK testu smo od skupno 56 vzorcev bifidobakterij analizirali le 52 vzorcev, ker so štirje izolati odmrli med raziskavo. Ker test ni pokazal značilnega rdečega obarvanja preiskovanih vzorcev bifidobakterij, lahko zaključimo, da so testirane bifidobakterije pokazale negativen rezultat na F6PPK test.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Človeški prebavni trakt je mikrobno zelo raznolik in dinamičen sistem, saj ga poseljuje različna mikrobiota. Črevesna mikrobiota ima številne vloge kot so skrb za vzdrževanje črevesne homeostaze, predstavlja naravno pregrado pred naselitvijo patogenih bakterij, prebavlja in vpliva na resorpcijo hranil, vpliva na imunski sistem in modulira izražanje genov (Ventura in sod., 2012).

V črevesju odraslega človeka je približno  $10^{14}$ /g bakterij, od katerih so nekatere pripete na črevesni epitelij, druge pa zgolj prehajajo naše črevo (Grmanova, 2010). Posebej zanimiva je črevesna mikrobiota otroka, saj je zelo raznolika in gosto naseljena. Vedno bolj se je potrebno zavedati pomena vloge črevesne mikrobiote za razvoj še ne popolnoma razvitega dojenčkovega imunskega sistema. Črevesna mikrobiota namreč spodbuja razvoj dojenčkovega imunskega sistema in na tak način pogosto prepreči pojav različnih bolezni (Ventura in sod., 2012).

Črevesna mikrobiota dojenih otrok je sestavljena pretežno iz bakterij rodu *Bifidobacterium*. Zanje velja, da igrajo pomembno vlogo v prvih mesecih otrokovega življenja (Solís in sod., 2010). Redno uživanje bifidobakterij učinkovito zmanjša pogostnost in jakost blagih do zmernih prebavnih motenj (predvsem driske), povezanih s porušenjem normalne črevesne mikrobiote in vzdržuje normalno peristaltiko črevesja (Vlková in sod., 2005).

Rod bifidobakterij predstavlja eno glavnih skupin v prebavnem traktu ljudi in živali. Paličaste, kratke ukrivljene do razvejane grampozitivne bakterije so odkrili s številnimi kultivacijskimi in molekularnimi metodami (Tabasco in sod., 2007).

Pri raziskovalni nalogi smo začeli z identifikacijo 56 izolatov bifidobakterij osamljenih iz črevesne sluznice otrok na selektivnem tekočem gojišču MRS z dodatkom cisteina. Sledilo je potrjevanje njihove pripadnosti rodu *Bifidobacterium* s PCR in rodovno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi. Nadaljevali smo z RAPD, s katero smo ugotavljali genetsko raznolikost med posameznimi sevi znotraj rodu *Bifidobacterium*. Za konec smo opravili še

encimski test fruktoza-6-fosfat fosfoketolazni test, s katerim smo želeli dokazati aktivnost encima pri bifidobakterijah.

### **5.1.1 Makromorfološke in mikromorfološke lastnosti bifidobakterij**

Tradicionalne metode osamitve in identifikacije bifidobakterij temeljijo na selektivnem gojenju izolatov na podlagi morfoloških lastnosti in biokemijskih testov. Te metode so dolgotrajnejše za pripravo, zahtevajo daljšo inkubacijsko dobo in težje primerjamo večje število vzorcev med seboj v primerjavi z molekularnimi metodami (Tannock, 1999).

Osamitev bifidobakterij je bila predhodno izvedena z nacepljanjem homogeniziranih vzorcev črevesnih sluznic otrok na trdno gojišče MRS z dodatkom cisteina in inkubacijo v anaerobnih razmerah (neobjavljeni rezultati, Katedra za mlekarstvo). Literatura navaja, da je gojišče primerno za osamitev in kultivacijo bifidobakterij, dodatek cisteina, kot reducenta, ki veže nase kisik, pa dodatno prispeva k vzpostavitvi anaerobnih pogojev za dobro rast bifidobakterij.

Leta 1989 sta Cheng in Sandine gojišču na osnovi sirotke dodala L-cistein v koncentraciji 0,05 % in kvasni ekstrakt v koncentraciji 0,3 %. Rezultat je bila dobra rast bifidobakterij v pogojih z zmanjšano vsebnostjo kisika.

Pri makromorfološkem pregledu (4.1) so bile kolonije na gojišču MRS z dodatkom cisteina bele barve, okrogle oblike z gladkim robom in svetleče površine. Pri pregledu mikromorfoloških lastnosti (4.1) pod svetlobnim mikroskopom smo opazili modro-vijolično obarvanje celic, s katerimi smo lahko potrdili, da gre za grampozitivne bakterije. Bakterije so bile paličaste do razvejane oblike in z odebeljenimi konci v obliki črke Y ali V, kar je značilna oblika celic rodu *Bifidobacterium*.

Za kultivacijo bifidobakterij je na voljo precej komercialnih trdnih gojišč, kar je že leta 2001 predstavil v svojem preglednem članku Roy (2001), kjer obravnava različna osnovna, obogatitvena, diferencialna in selektivna trdna gojišča za osamitev in štetje bifidobakterij iz mlečnih izdelkov. Med drugim navaja gojišče RCM (ang. Reinforced Clostridial Medium

Agar), mRCM (modificirano gojišče z dodatkom laktoze in ovčje krvi), gojišče BL (ang. Glucose Blood Liver), ki vsebuje glukozo in jetrno kri, gojišče TPY (ang. Tryptone Phytone Yeast), gojišče mMRS (modificirano gojišče z dodatkom cisteina) in RPM gojišče iz rekonstituiranega posnetega mleka ter še mnoga druga, a na koncu zaključuje, da med vsemi trdnimi gojišči še vedno ni na voljo standardnega in predpisanega gojišča za zanesljivo identifikacijo bifidobakterij. Mednarodni standard ISO 29981/IDF 220 (2010) pa za določanje bifidobakterij v mlečnih izdelkih s tehniko štetja kolonij predlaga uporabo selektivnega gojišča TOS z mupirocinom.

Bifidobakterije so relativno zahtevni mikroorganizmi in zahtevajo posebne rastne pogoje, ker pa so kot potencialno probiotične bakterije pogosto prisotne v fermentiranih mlečnih izdelkih, je bilo veliko raziskav namenjenih izboljšanju njihove preživelosti med tehnološkimi postopki in skladiščenjem. Talwalkar in sod. (2001) so proučevali vpliv kisika na probiotične bakterijske vrste iz rodu *Bifidobacterium* in ugotovili, da sevi bolje rastejo v anaerobnih razmerah. Prav tako bi z uporabo različnih prebiotikov lahko izboljšali gojišče in bifidobakterijam omogočili rast.

Komercialno dostopni gojišči RCM in MRS z dodatkom cisteina zagotovita anaerobne razmere, omogočata pa bolj neselektivno kot selektivno izrast bifidobakterij. Vključevanje cisteina v medije za rast bifidobakterij je pomembno, saj cistein kot reducent znižuje oksidoredukcijski potencial in tako pozitivno vpliva na rast bifidobakterij. Dodatek oligosaharidov, kot je na primer rafinoza, služijo kot bifidogeni faktorji, ki spodbudijo rast bifidobakterij (Ferraris in sod., 2010).

Obogateni gojišči RCM in BL naj bi bili primerni za določanje bifidobakterij v fermentiranih mlečnih izdelkih, vendar so iz njunih originalnih formul umaknili nekatere dodatke, zaradi njihove težke dostopnosti in s tem visoke cene, kakor tudi dolgotrajne priprave gojišč s temi dodatki (Roy, 2001).

Med trdnimi gojišči lahko omenimo gojišče WCB (ang. Wilkins-Chalgren) za bifidobakterije, ki je sestavljeno iz osnovnega Wilkins-Chalgren agarja, glukoze, agarja, Tweena ter L-cisteina-HCl. Gojišče WCB zagotavlja optimalno rast za neselektivno štetje

bifidobakterij, ne potrebuje umeritve pH, lahko je avtoklavirano z vsemi dodatki in ne zahteva dolge inkubacije (36-48h) (Ferraris in sod., 2010).

Novejše alternativno selektivno gojišče je tudi WCBM (Wilkins-Chalgren za rod *Bifidobacterium* Mupirocin), ki je z dodatkom antibiotika mupirocina še bolj učinkovito in selektivno za določanje bifidobakterij iz vzorcev humanega blata. Njegova priprava je enostavna, samo gojišče pa učinkovito za rutinske analize (Ferraris in sod., 2010).

Hartemink in sodelavci (1999) so za osamitev bifidobakterij testirali trdna gojišča: PROP (ang. Beerens propionic acid medium-gojišče z dodatkom propionske kisline), gojišče RB (ang. Raffinose-*Bifidobacterium* medium- gojišče z dodatkom rafinoze, ki je prebiotik) in gojišče NPNL (gojišče z neomicinom, nalidiksično kislino, litijevim kloridom in paramomicin sulfatom). Na gojišča so cepili vzorce blata ljudi in živali. Na gojišču RB so bakterije tvorile rumeno-zelene kolonije, kar pa ni značilna barva kolonij predstavnikov rodu *Bifidobacterium*, ki se ponavadi obarvajo belo. Kljub vsemu se je za najbolj selektivno izkazalo gojišče NPNL, saj je bila pretežna večina izolatov, ki so jih na njem osamili iz vzorcev blata ljudi, pripadnikov bifidobakterij. Visoko selektivnost temu gojišču zagotavljajo številni dodatki, ki omogočajo rast bifidobakterijam in posledično zavirajo rast drugih bakterij. Tudi mikromorfološka analiza je potrdila večje število bifidobakterij z gojišča NPNL. Na gojišču RB je bilo opaziti lažno pozitivne rezultate, saj ni bilo prisotnih tipičnih kolonij bifidobakterij. Opaziti je bilo prisotnost kokov, klostridijev in laktobacilov, kar je otežilo identificiranje bifidobakterij.

Selektivna gojišča in fenotipska identifikacija (pregled mikro in makromorfoloških lastnosti bifidobakterij) omogočajo precej dobro ločbo bifidobakterij od morfološko podobnih bakterij (Tannock, 1999), vendar pa iz rezultatov teh testov ne moremo potrditi kateri vrsti oz. rodu preiskovana skupina bakterij pripada.

### 5.1.2 PCR in RAPD

Zaradi številnih pomanjkljivosti konvencionalnih gojitvenih metod se čedalje bolj uveljavljajo molekularne metode. Zato smo tudi v naši nalogi fenotipsko identifikacijo sevov kot potencialnih pripadnikov rodu *Bifidobacterium* nadgradili z genotipsko identifikacijo. V ta namen smo uporabili PCR z rodovno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi, poleg tega izkazuje metoda ponovljivost, je specifična, hitra ter enostavna za izvedbo.

Pri novejših molekularnih metodah je za ugotavljanje sorodstvenega odnosa med bakterijami zelo pomembna primerjava genotipskih lastnosti in analiza zaporedij genov za 16S rRNA in 23S rRNA (Ventura in sod., 2012).

DNA, osamljeno iz bakterijskih sevov, ki smo jih pridobili z nacepljanjem črevesnih bioptov, smo kot tarčno DNA uporabili v PCR in RAPD. S PCR smo želeli potrditi rod *Bifidobacterium*, z genotipizacijsko metodo RAPD pa razlikovati seve znotraj rodu *Bifidobacterium*.

Vseh 56 analiziranih sevov smo v PCR potrdili za pripadnike rodu *Bifidobacterium*, saj smo z agarozno gelsko elektroforezo pri vseh potrdili prisotnost pričakovanega 520 bp velikega pomnožka, namnoženega z začetnimi oligonukleotidi Bif 164-f in Bif 662-r (Satokari in sod., 2001).

V drugem delu naloge je sledilo proučevanje genetske variabilnosti sevov z RAPD. Metoda je enostavna in hitra za izvajanje, vendar pa se njena pomanjkljivost kaže v slabši ponovljivosti rezultatov in moči razlikovanja sevov (Li in sod., 2009). Da bi dobili večjo možnost razlikovanja sevov, smo v nalogi uporabili štiri različne RAPD začetne oligonukleotide in sicer M13 (Torriani in sod., 1999), KGT70-GC, KGT80-GC (Inštitut za mlekarstvo in probiotike) in GTG5 (Versalovic in sod., 1994).

Iz rezultatov RAPD smo ugotovili, da je večina analiziranih bifidobakterij oblikovala take profile RAPD, da so se, ne glede na uporabljeni začetni oligonukleotid za RAPD, večinoma podobno razvrstile v skupine. Ugotovimo lahko, da smo z uporabo različnih začetnih

oligonukleotidov dobili večjo moč razlikovanja RAPD za posamezni sev. Vzorce pomnožkov za posamezen sev smo odčitali vizualno in pri tem nismo upoštevali intenzitete posameznega pomnožka.

Iz primerjave agaroznih gelskih elektroforez pomnožkov RAPD se pri vseh štirih začetnih oligonukleotidih na osemnajstih progah (2-4 in 6-20) in znotraj posameznega začetnega oligonukleotida pojavljajo podobni vzorci RAPD. Ker se podobnost pojavlja na istih progah lahko domnevamo, da gre za isti sev. S primerjavo med začetnimi oligonukleotidi M13, KGT70-GC in KGT80-GC opazimo na štirih progah (53-56) podoben RAPD vzorec. Podobnost profilov smo zaznali še na progah 29, 30 in 32 z začetnima oligonukleotidoma M13 in KGT80-GC. Iz danih rezultatov lahko zaključimo, da nam je z RAPD uspelo osamiti 30 različnih sevov pri 90 % relativni podobnosti.

Številne študije navajajo, da so sevi bifidobakterij, ki so bili izolirani iz črevesne sluznice otrok, pokazali visoko raven genetske podobnosti med vrstama *B.infantis* in *B.longum*, kar 82 %. Ti sevi so genetsko zelo povezani in si med seboj podobni. Pozitivna stran RAPD je, da omogoča razlikovanje ne samo med vrstami istega rodu in med sevi določene vrste, ampak tudi med mutanti, ki pripadajo istemu klonu (Sakata in sod., 2002; Masco in sod., 2003).

Analizirani izolati, ki se v profilu RAPD razlikujejo za eno ali več prog, se običajno razlikujejo v genotipu. Različen genotip med posameznimi sevi določamo na podlagi prisotnosti ali odsotnosti prog RAPD (Bart-Delabesse in sod., 2001).

Slabše izražene proge izolatov si lahko razlagamo kot posledico prisotnosti drugih sevov bakterij, ne le iz rodu bifidobakterij, ali pa da pogoji pri RAPD niso bili popolnoma ustrezni. Eden izmed ključnih korakov predstavlja osamitev DNA iz vzorca, pri čemer je občutljivost mikrobnih celic na postopke liziranja zelo različna (Smole Možina in Jeršek, 2001).

Začetni oligonukleotid M13 je po navedbi avtorjev uspešno uporabljen za razlikovanje med sevi znotraj bakterijskih podvrst bifidobakterij (Torriani in sod., 1999), podobno pa je bila

ugotovljena tudi primernost začetnega oligonukleotida KGT-80GC za tipizacijo mlečnokislinskih bakterij (Rot, 2011).

Rot (2011) navaja uporabo začetnih oligonukleotidov M13 in KGT-80GC, katere smo preiskusili tudi v naši nalogi. Po navedbi avtorice se je začetni oligonukleotid KGT-80GC najbolje izkazal pri tipizaciji sevov vrste *B. animalis* subsp. *lactis*, medtem ko je bil začetni oligonukleotid M13 učinkovitejši pri tipizaciji sevov vrste *L. acidophilus*.

### 5.1.3 Fruktaza-6-fosfat fosfoketolazni test

Fruktaza-6-fosfat fosfoketolaza je encim, značilen za bifidobakterije. Ugotavljanje fruktoza-6-fosfat fosfoketolazne aktivnosti je hitra in relativno enostavna metoda, ki nam omogoča potrditev rodu *Bifidobacterium* iz različnih ekoloških niš, ki jih bakterije številčno naseljujejo, npr. prebavni trakt ljudi in živali, ustna votlina, odplake, kri in hrana (Grill in sod., 1995).

Za rod *Bifidobacterium* je značilna posebna presnovna pot, po kateri se razgradnja ogljikovih hidratov razlikuje od razgradnje pri ostalih bakterijah, saj fermentacija heksoz pri bifidobakterijah poteka po poti fruktoze-6-fosfata. Z encimskimi testi ugotavljamo prisotnost za bifidobakterije edinstvenega encima F6PPK (Grill in sod., 1995).

Vlkova in sod. (2005) so v raziskavi ugotavljali encimsko aktivnost encima F6PPK bifidobakterij, ki so jih osamili iz vzorcev blata 51-ih dojenih dojenčkov, starih od 3 do 276 dni. S testom F6PPK so pri analizi bifidobakterij iz vzorcev blata 29-ih novorojenčkov, ki so se značilno rdeče obarvale, ugotovili tudi visoko vrednost dveh encimov,  $\alpha$ -galaktozidaze in  $\alpha$ -glukozidaze. Poleg tega se je izkazalo, da je velikost populacije bifidobakterij v vzorcih blata novorojenčkov, starih več kot teden dni, presegla 9 log KE/g blata, med njimi pa sta bili najpogostejše zastopani vrsti *Bifidobacterium longum* in *Bifidobacterium breve*. Predvsem *Bifidobacterium breve* je pogosto zastopana vrsta pri dojenih dojenčkih (Vlkova in sod., 2005). Iz raziskave so zaključili, da se je preverjanje F6PPK aktivnosti izkazalo za zanesljivo metodo pri potrjevanju bakterij iz rodu *Bifidobacterium*.

Tudi mi smo ugotavljali aktivnost encima fruktoza-6-fosfat fosfoketolaze. Po predhodni pripravi izolatov, liziranju in sonikaciji celic ter izpeljavi testa, smo v luknjicah mikrotitrskih ploščic opazili rumeno obarvanje, kar pa je posledica neaktivnosti encima F6PPK. Kljub večkratni ponovitvi testa po koncu reakcije nismo zaznali rdečega obarvanja, razen pri pozitivni kontroli, ki bi bil pozitiven rezultat za aktivnost encima, ampak smo vedno zaznali le rumeno obarvanje, kar je negativen rezultat. Glede na naše rezultate bi lahko zaključili, da je opisan encimski test morda vseeno premalo informativen oziroma prerobusten, ki zahteva dolgo pripravo in natančno izvedbo in je zato bolj redko v uporabi, čemur v prid pa so govorile tudi maloštevilne objave o uporabnosti testa.

## 5.2 SKLEPI

- Vsi preiskovani sevi bifidobakterij so imeli na gojišču MRS z dodatkom cisteina za njih značilne makromorfološke lastnosti.
- Vsi sevi bifidobakterij so bile grampozitivne, značilno odebeljene in razvejane palčke v obliki črke Y ali V.
- S PCR smo vse seve bifidobakterij identificirali kot bakterije rodu *Bifidobacterium*.
- Z RAPD z dvema začetnima oligonukleotidoma smo seve bifidobakterij razvrstili v 30 skupin.

## 6 POVZETEK

V črevesju novorojenčka se kmalu po rojstvu vzpostavi kompleksna mešanica različnih vrst mikroorganizmov, ki jo poznamo kot normalna črevesna mikrobiota. Čeprav je črevesna mikrobiota otroka precej raznolika, prevladujejo predvsem bakterije iz rodu *Bifidobacterium*. Zanje velja, da igrajo pomembno vlogo v prvih mesecih otrokovega življenja saj pripomorejo k razvoju dojenčkovega imunskega sistema in pogosto preprečijo pojav bolezni.

V magistrski nalogi smo z različnimi pristopi skušali identificirati bifidobakterije, osamljene iz črevesne sluznice otrok. Predhodno osamljene, prečiščene in zamrznjene izolate smo najprej oživili z nacepljanjem v tekoče gojišče MRS s cisteinom. Nato smo jih cepili na trdno gojišče MRS s cisteinom ter po izrasti opazovali njihove makromorfološke lastnosti, z barvanjem po Gramu naključno izbranih kolonij pa smo pod mikroskopom opazovali še njihove mikromorfološke značilnosti. V nadaljevanju smo z molekularno metodo PCR z rodovno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi ugotavljali njihovo pripadnost rodu *Bifidobacterium*, z RAPD pa smo izvedli njihovo genotipizacijo. Na koncu smo izvedli še encimski test ugotavljanja aktivnosti encima fruktoza-6-fosfat fosfoketolaze.

Na trdnem gojišču MRS z dodatkom cisteina smo opazili izrast kolonij bele barve, okroglih oblik z gladkim robom in sijajem na površini. Da bi se prepričali ali gre za bakterije iz rodu *Bifidobacterium* smo za natančnejši pregled morfologije bakterij uporabili metodo barvanja po Gramu. Sledil je pregled mikromorfoloških lastnosti pod svetlobnim mikroskopom. Razvidno je bilo, da bifidobakterije sodijo v skupino grampozitivnih bakterij, saj smo opazili kratke, odebeljene, razvejane in modro vijolične palčke v obliki črke Y ali V.

S PCR smo vseh 56 preiskovanih kolonij potrdili za pripadnike rodu *Bifidobacterium*. Pri tem smo uporabili za rod specifične začetne oligonukleotide, s katerimi smo pridobili specifične, 520 bp velike pomnožke.

Sledila je genotipizacijska metoda RAPD, s katero smo določevali genetsko podobnost sevov. Z RAPD smo analizirali DNA 56. izolatov, ki so zrastle na gojišču MRS + cys.

Iz rezultatov pomnožkov RAPD z začetnima oligonukleotidoma M13 in KGT80-GC lahko sklepamo, da smo seve bifidobakterij razvrstili v 30 genetsko raznolikih skupin. Prav tako je rezultat na osemnajstih progah identičen pri vseh štirih začetnih oligonukleotidih. V našem primeru sta se za najbolj primerna začetna oligonukleotida izkazala M13 in KGT80-GC, saj sta podala najlepše slike pomnožkov. Zaradi čimboljših rezultatov pa smo uporabili še dva začetna oligonukleotida, ki sta potrdila podobnost na osemnajstih progah. V primerjavi z ostalimi progami pa so bile slike pomnožkov slabše vidne in je iz takega rezultata težko sklepati, ali gre za nov sev ali ne. Z računalniškim programom BioNumeric smo svoje rezultate potrdili, saj nam je dendrogram relativne podobnosti z začetnima oligonukleotidoma M13 in KGT80-GC prikazal jasno sliko razporeditve sevov v 30 skupin na podlagi 90 % relativne genetske podobnosti bifidobakterij.

Na podlagi naših rezultatov lahko potrdimo primernost metode RAPD, saj smo iz dobljenih profilov RAPD izolate bifidobakterij razvrstili po genetski raznolikosti v posamezne skupine. Slabše izražene proge izolatov so lahko posledica prisotnosti drugih mikroorganizmov ali pa naša nenatančnost pri izvajanju samega poskusa. Kljub temu pa lahko rečemo, da je RAPD metoda, ki je primerna za razlikovanje sevov, saj nam je v kratkem času uspelo večino bakterij iz rodu *Bifidobacterium*, ki so bile osamljene iz črevesne sluznice otrok, razvrstiti po raznolikosti v posamezno skupino.

Za konec smo opravili še specifičen encimski test za bifidobakterije, s katerim smo ugotavljali encimsko aktivnost fruktoza-6-fosfat fosfoketolaza. Za pozitiven rezultat smo na mikrotiterskih ploščicah pričakovali pojav rdečega obarvanja. Žal smo s testom dobili negativne rezultate, saj je bilo prisotno zgolj rumeno obarvanje. Kljub večkratnim ponovitvam testa lahko zaključimo, da je test premalo informativen glede na dolgo pripravo.

Po skupnem pregledu vseh metod, ki smo jih izvedli, pa je jasno, da z vidika uspešnosti identifikacije bakterij, metode med seboj niso primerljive. Molekularne metode so nam dale pričakovan rezultat, medtem ko smo z encimskim testom proti pričakovanjem dobili

negativne rezultate. Bolj smo bili zadovoljni z uporabo molekularnih metod, saj so nam hitro dale pozitivne rezultate in niso zahtevale dolge priprave. Nekatere metode, kot so izbira primerne selektivnega gojišča za bifidobakterije in encimski test F6PPK, pa so zaradi dolgotrajne priprave in težko dostopnih ter dragih dodatkov precej dolgotrajnejše in pomanjkljivejše za potrditev pozitivnih rezultatov. Njihova zanesljivost je pomanjkljiva in omejena.

## 7 VIRI

- Adamič J., Smole Možina S., Jeršek B. 2003. Vloga in pomen mikroorganizmov v živilih in taksonomija. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 1-45
- Ahmed J., Reddy B.S., Mølbak L., Leser T.D., MacFie J. 2013. Impact of probiotics on colonic microflora in patients with colitis: A prospective double blind randomised crossover study. *International Journal of Surgery*, 10: 1131-1136
- Baleiras Couto M. M., van der Vossen J. M. B. M., Hofstra H., Huis in't Veld J. H. J. 1994. RAPD analysis: a rapid technique for differentiation of spoilage yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 24: 249-260
- Bart-Delabesse E., Sarfati J., Debeaupuis J.P., van Leeuwen W., van Belkum A., Bretagne S., Latge J.P. 2001. Comparison of restriction fragment length polymorphism, microsatellite length polymorphism and random amplification of polymorphic DNA analyses for fingerprinting *Aspergillus fumigatus* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 39 7: 2683-2686
- Biavati B., Mattarelli P. 2006. The family *Bifidobacteriaceae*. *Prokaryotes*, 3: 322-382
- Biavati B., Vescovo M., Torriani S., Botazzi V. 2000. Bifidobacteria: History, ecology, physiology and applications. *Annals of Microbiology*, 50: 117-131
- Bibek R., Arun B. 2008. *Fundamental food microbiology*. 4<sup>th</sup> ed. Boca Raton, Taylor & Francis Group, CRC Press: 163-174
- Caetano Anolles G. 1993. Amplifying DNA with arbitrary oligonucleotide primers. *PCR Methods and Applications*, 3, 2: 85 – 94

- Charteris W.P., Kelly P.M., Morelli L., Collins J.K. 1997. Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations. *International Journal of Food Microbiology*, 35: 1-27
- Coeuret V., Geuguen M., Vernoux P.J. 2004. Numbers and strains of lactobacilli in some probiotic products. *International Journal of Food Microbiology*, 97: 147-156
- Collins J.K., Thornton G., Sullivan G.O. 1998. Selection of probiotic strains for human applications. *International Dairy Journal*, 8: 487-490
- De Vries W., Stouthamer A.H. 1967. Pathway of glucose fermentation in relation to the taxonomy of bifidobacteria. *Journal of Bacteriology*, 93: 574-576
- Fanaro S., Chierici R., Guerrini P., Vigi V. 2003. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *International Journal of Paediatrics*, 441: 48–55
- Fanedl L. 2002. Osamitev in molekularna identifikacija bifidobakterij iz tankega črevesa podgan, krmljenih s surovim fižolom (*Phaseolus vulgaris* L.). Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 3-32
- Felis G. E., Dellaglio F. 2007. Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 8, 2: 44-61
- Fernandez F., Collins M.D., Hill M. J. 1984. Production of vitamin K by human gut bacteria. *Biochemical Society Transactions*, 13: 223-224
- Ferraris L., Aires J., Waligora-Dupriet A.-J., Butel M.-J. 2010. New selective medium for selection of bifidobacteria from human feces. *Anaerobe*, 16, 469-471
- Gaggia F., Mattarelli P., Biavati B. 2010. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *International Journal of Food Microbiology*, 141: 515-529

- Gardiner G., Ross R.P., Kelly P.M., Stanton C., Collins J.K., Fitzgerald G. 2002. Microbiology of therapeutic milks. V: Dairy microbiology handbook: The microbiology of milk and milk products. 3<sup>rd</sup> ed. Robinson R.K. (ed.). New York, John Wiley & Sons: 431-478
- Gasparič A., Komel R. 1996. Metode izboljšanja delovnih mikroorganizmov. V: Biotehnologija – osnovna znanja. Raspor P. (ur.). Ljubljana, BIA, d.o.o.: 185-212
- Gavini F., Cayuela C., Antoine J.M., Lecoq C., Lefebvre B., Membré J.M., Neut C. 2001. Differences in the distribution of bifidobacterial and enterobacterial species in human faecal microflora of three different (children, adults, elderly) age groups. Microbial Ecology in Health and Disease, 13: 40-45
- Goldin B.R. 2003. Microflora of intestine. V: Encyclopedia of food science and nutrition. Vol. 6. 2<sup>nd</sup> ed. Caballero B., Trugo L. C., Finglas P.M. (eds.). Amsterdam, Academic Press: 3904-3916
- Gomes A. M. P., Malcata X. F. 1999. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. Trends in Food Science & Technology, 10: 139-157
- Grill J., Crociani J., Ballongue J. 1995. Characterization of fructose 6 phosphate phosphoketolase purified from *Bifidobacterium* species. Current Microbiology, 31: 49-54
- Grmanova M., Vlkova E., Rada V., Homutova I. 2010. Survival of Bifidobacteria in adult intestinal tract. Folia Microbiologica, 55 3: 281-285
- Gueimonde M., Salminen S. 2013. Microbiota of the intestine: Probiotics. V: Encyclopedia of human nutrition. Vol. 3. 3<sup>rd</sup> ed. Caballero B., Prentice A., Allen L. H. (eds.). Amsterdam, Academic Press, 3: 175-181

- Hadadji M., Benama R., Saidi N., Henni D. E., Kihal M. 2005. Identification of cultivable bifidobacterium species isolated from breast-fed infant feces in West-Algeria. *African Journal of Biotechnology*, 4, 5: 422–430
- Hartemink R., Rombouts F. M. 1999. Comparison of media for the detection of bifidobacteria, lactobacilli and total anaerobes from faecal samples. *Journal of Microbiological Methods*, 36: 181-192
- ISO 29981:2010/IDF 220:2010. Milk products. Enumeration of presumptive bifidobacteria. Colony count technique at 37 degrees C. 1<sup>st</sup> ed. 2010: 17 str.
- Jay M. J. 1992. *Modern food microbiology*. 4<sup>th</sup> ed. New York London, Chapman and Hall: 426-427
- Jeršek B. 2009. *Higiena živil: Laboratorijske vaje za študente živilstva in prehrane*. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 21-38
- Killer J., Kopečný J., Mrázek J., Koppová I., Havlík J., Benada O., Kott T. 2011. *Bifidobacterium actinocoloniiforme* sp. nov. and *Bifidobacterium bohemicum* sp. nov. from the bumblebee digestive tract. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61: 1315–1321
- Kwon H.-S., Yang E.-H., Lee S.-H., Yeon S.-W., Kang B.-H., Kim T.-Y. 2005. Rapid identification of potentially probiotic *Bifidobacterium* species by multiplex PCR using species-specific primers based on the region extending from 16S rRNA through 23S rRNA. *FEMS Microbiology Letters*, 250: 55-62
- Li W., Raoult D., Fournier P. E. 2009. Bacterial strain typing in the genomic era. *FEMS Microbiology Reviews*, 33 5: 892–916
- Martinez F.A.C, Balciunas E.M., Converti A., Cotter P.D., de Souza Oliveira R.P. 2013. Bacteriocin production by *Bifidobacterium* spp. *Biotechnology Advances*, 31: 483–488

- Masco L., Huys G., Gevers D., Verbruggen L., Swings J. Identification of *Bifidobacterium* species using rep-PCR fingerprinting. 2003. Systematic and Applied Microbiology, 26: 557-563
- Matsuki T., Watanabe K., Fujimoto J., Kado Y., Takada T., Matsumoto K., Tanaka R. 2003. Quantitative PCR with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers for analysis of human intestinal bifidobacteria. Applied and Environmental Microbiology, 70 1: 167-173
- McCartney A. L. 2003. Bifidobacteria in foods. V: Encyclopedia of food sciences and nutrition. Vol. 1. 2<sup>nd</sup> ed. Caballero B., Trugo L. C., Finglas P.M. (eds.). London, Academic Press: 463-470
- Menard C., Mouton C. 1993. Randomly amplified polymorphic DNA analysis confirms the biotyping scheme of *Porphyromonas gingivalis*. Microbiological Research, 144: 445-455
- Mohammadi R., Sohrabvandi S., Mohammad Mortazavian A. 2012. The starter culture characteristics of probiotic microorganisms in fermented milks. Engineering in Life Sciences, 12, 4: 399–409
- Mullan W.M.A. 2002. Probiotics: Properties, benefits, mechanisms of action, safety and enumeration. Northern Ireland, Dairy Science and Food Technology: 14 str. <http://www.dairyscience.info/probiotics.html> (marec 2008)
- O'Connell M. 2009. Bifidobacteria. V: Prebiotics and probiotics. Jardine S (ed.). Leatherhead, Leatherhead Publishing and Blackwell Publishing: 79-91
- Orel R. 2010. Probiotiki in njihova klinična uporaba. Naša lekarna, 39: 42-48 <http://www.nasa-lekarna.si> (januar, 2010)

- Poljak M., Avšič-Županc T., Seme K. 1994. Verižna reakcija s polimerazo: nova raziskovalna in diagnostična metoda v virologiji. *Medicinski razgledi*, 33: 379-400
- Rada V., Petr. J. 2002. Enumeration of bifidobacteria in animal intestinal samples. *Veterinarni Medicina*, 47 1: 1-4
- Ranadheera R. D. C. S., Baines S. K., Adams M. C. 2010. Importance of food in probiotic efficacy. *Food Research International*, 43: 1-7
- Riede C. R., Fairbanks D. J., Andersen W. R., Kehrer R. L., Robinson L. R. 1994. Enhancement of RAPD analysis by restriction-endonuclease digestion of template DNA in wheat. *Plant Breeding*, 113: 254-257
- Rogelj I. 2009. Črevesna mikrobiota in probiotiki. V: Specialne probiotične kulture za preprečevanje in zdravljenje posameznih težav (zbornik prispevkov). Strokovno izobraževanje za magistre farmacije in farmacevtske tehnike. Rogelj I., Orel R., Koning C., Čater N. (ur.). Ljubljana, Lekarniška zbornica Slovenije: 4-17
- Rogelj I., Bogovič Matijašić B. 2004. Probiotiki in varnost. V: Varnost živil. 22. Bitenčevi dnevi, Radenci, 18. in 19. marec 2004. Gašperlin L., Žlender B (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 181-189
- Rogelj I. 2001. Probiotiki, prebiotiki in sinbiotiki. V: Probiotiki in možnost njihove uporabe: zbornik predavanj, Ljubljana 8. marec 2001. Pavčič M., Vitezić N. (ur.). Ljubljana, Zbornica nutricionistov in dietetikov: 6-16
- Rot S. 2011. Ugotavljanje prisotnosti probiotičnih bakterij *L. acidophilus* in *B. animalis* ssp. *lactis* v blatu odraslih. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 62 str.
- Roy D. 2001. Media for the isolation and enumeration of bifidobacteria in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 69: 167-182

- Russell D. A., Ross R. P., Fitzgerald G. F., Stanton C. 2011. Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 149: 88-105
- Saarela M., Morgensen G., Fonden R., Matto J., Matilla-Sandholm T. 2000. Probiotic bacteria: Safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84: 197-215
- Sakata S., Kitahara M., Sakamoto M., Hayashi H., Fukuyama M., Benno Y. 2002. Unification of *Bifidobacterium infantis* and *Bifidobacterium suis* as *Bifidobacterium longum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52: 1945-1951
- Satokari R.M., Vaughan E.E., Akkermans A. D. L., Saarela M., De Vos W.M. 2001. Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus - specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 2: 504–513
- Scardovi V. 1986. Genus *Bifidobacterium*. V: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 2. Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.D. (eds.). Baltimore, Williams and Wilkins: 1418-1434
- Scardovi V., Trovatielli L.D. 1965. The fructose-6-phosphate shunt as peculiar pattern of hexose degradation in the genus *Bifidobacterium*. *Annals of Microbiology*, 15: 19-29
- Shah N. P. 2000. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy products. *Journal of Dairy Science*, 83: 894-907

- Smole Možina S., Jeršek B. 2001. Mikrobiološke in molekularne metode karakterizacije probiotičnih dodatkov funkcionalnim živilom. V: Funkcionalna hrana. 21. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož 8. in 9. November 2001. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 207-218
- 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, 3: 307–310
- Stackebrandt E., Woese C. R. 1981. Towards a phylogeny of actinomycetes and related organisms. *Current Microbiology*, 5: 131-136
- Svensson U. K., Håkansson J. 2014. Safety of food and beverages: Safety of probiotics and prebiotics. V: *Encyclopedia of Food Safety*. Vol. 3. 1<sup>st</sup> ed. Motarjemi Y., Moy G., Todd E. (eds.). London, Academic Press: 441-446
- Šrutkova D., Španova A., Špano M., Dráb V., Schwarzer M., Kozakova H., Rittich B. 2011. Efficiency of PCR-based methods in discriminating *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* and *Bifidobacterium longum* ssp. *infantis* strains of human origin. *Journal of Microbiological Methods*, 87 1: 10-16
- Tabasco R., Paarup T., Janer C., Pelaez C., Requena T. 2007. Selective enumeration and identification of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus*. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *L. acidophilus*. *L. paracasei* subsp. *paracasei* and *Bifidobacterium lactis* in fermented milk. *International Dairy Journal*, 17: 1107-1114
- Talwalkar A., Kailasapathy K., Peiris K., Arumugaswamy R. 2001. Application of RBGR a simple way for screening of oxygen tolerance in probiotic bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 71: 245-248

- Tamime A.Y., Saarela M., Korslund S.A., Mistry V.V. Shah N.P. 2005. Production and maintenance of viability of probiotic micro-organisms in dairy products. V: Probiotic dairy products. Tamime A.Y. (ed.). Oxford, Blackwell Publishing: 39-73
- Tannock G. W. 2001. Molecular assessment of intestinal microflora. American Journal of Clinical Nutrition, 73: 410-414
- Tannock G. W. 1999. Identification of lactobacilli and bifidobacteria. Current Issues Molecular Biology, 1 1: 53-64
- Tcherneva E., Rijpens N., Jersek B., Herman L. M. F. 2000. Differentiation of *Brucella* species by random amplified polymorphic DNA analysis. Journal of Applied Microbiology, 88: 69-80
- Thitaram S.N., Siragusa G.R., Hinton A. 2005. *Bifidobacterium*-selective isolation and enumeration from chicken caeca by a modified oligosaccharide antibiotic-selective agar medium. Letters in Applied Microbiology, 41 4: 355-360
- Todar K. 2009. The normal bacterial flora of humans. Madison, University of Wisconsin, Department of Bacteriology: 7 str.  
<http://textbookofbacteriology.net/themicrobialworld/NormalFlora.html> (januar, 2013)
- Torriani S., Zapparoli G., Dellaglio F. 1999. Use of PCR-based methods for rapid differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* subsp. *lactis*. Applied and Environmental Microbiology, 65, 10: 4351–4356
- Turroni F., van Sinderen D., Ventura M. 2011. Genomics and ecological overview of the genus *Bifidobacterium*. International Journal of Food Microbiology, 149: 37-44
- Vasiljevic T., Shah N. P. 2008. Probiotics – From Metchnikoff to bioactives. International Dairy Journal, 18: 714 – 728

- Ventura M., Turrone F., Motherway O'Connell M., MacSharry J., van Sinderen D. 2012. Host-microbe interactions that facilitate gut colonization by commensal bifidobacteria. *Trends in Microbiology*, 20: 467-476
- Versalovic J., Schneider M., de Bruijn F. J., Lupski J.R. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, 5: 25-40
- Vlková E., Nevoral B., Jencikova B., Kopečný J., Godefrooij, Trojanová I., Rada V. 2005. Detection of infant faecal bifidobacteria by enzymatic methods. *Journal of Microbiological Methods*, 60: 365-373
- Vlková E., Rada V., Trojanova I. 2004. Enumeration, isolation and identification of bifidobacteria from dairy products. *Acta Agriculturae Slovenica*, 84 1: 31-36
- WHO/FAO. 2006. Probiotics in food: Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations: 1-33

## **ZAHVALA**

Iskreno se zahvaljujem mentorici doc. dr. Andreji Čanžek Majhenič za strokovno pomoč in koristne napotke ter za razumevanje in potrpežljivost pri nastajanju magistrske naloge.

Za natančen in hiter pregled ter koristne predloge se zahvaljujem recenzentki izr. prof. dr. Barbari Jeršek.

Zahvala gre tudi uni. dipl. inž. Lini Burkan Makivić za pregled referenc in končno podobo magistrske naloge.

Hvala vsem na Katedri za mlekarstvo, ki ste mi omogočili opravljanje eksperimentalnega dela naloge v prijetnem vzdušju.

Posebna zahvala gre mojim staršem, mami in oči, hvala ker sta mi omogočila študij in mi tekom nabiranja znanja ves čas stala ob strani, me podpirala in delila koristne nasvete.

Hvala Aleš in Andrej za koristne bratske nasvete.

In nenazadnje, najlepša hvala mojemu Marku in najinemu sinčku Eriku, ker mi ves čas stojita ob strani, hvala za vso podporo, spodbudne besede in potrpežljivost.

Hvala vsem, ki ste na kakršen koli način pripomogli nastajanju tega dela.