

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Klavdija ŽERDONER

MIKROBIOTA HUMANEGA MLEKA

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja Živilstvo

MICROBIOTA OF HUMAN MILK

M. SC. THESIS
Master Study Programmes: Field Food Science and Technology

Ljubljana, 2013

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

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala dr. Bojano Bogovič Matijašič in za recenzentko prof. dr. Sonjo Smole Možina.

Mentorica: dr. Bojana BOGOVIČ MATIJAŠIČ

Recenzentka: prof. dr. Sonja SMOLE MOŽINA

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum predstavitve:

Ocena:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisani se strinjam z objavo svojega magistrskega dela na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddal v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Klavdija Žerdoner

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du2
- DK UDK 612.664:579.24/.26:57.083.1(043)=163.6
- KG humano mleko/bakterije humanega mleka/mikrobiota mleka leve dojke/mikrobiota mleka desne dojke/konvencionalne gojitvene tehnike/RAPD PCR/nukleotidno zaporedje *16 rDNA/Lactobacillus gasseri/Lactobacillus fermentum/Lactobacillus salivarius/Lactobacillus reuteri/Enterococcus faecium/Staphylococcus epidermidis/Bifidobacterium breve*
- AV ŽERDONER, Klavdija, dipl. inž. živ. in preh. (UN)
- SA BOGOVIČ MATIJAŠIĆ dr., Bojana (mentorica)/SMOLE MOŽINA prof. dr., Sonja (recenzentka)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
- LI 2013
- IN MIKROBIOTA HUMANEGA MLEKA
- TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Živilstvo)
- OP XII, 54 str., 16 pregl., 46 sl., 10 pril., 29 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Mikrobiota humanega mleka ima pomembno vlogo pri razvoju črevesne mikrobiote novorojenca ter zaščiti pred patogenimi mikroorganizmi. Namen naloge je bil raziskati bakterijske združbe v mleku 47-ih mater, odvzetega ločeno iz leve (L) in desne (D) dojke, 30. dan po porodu. Ugotavljali smo številčnost pomembnejših bakterijskih skupin, primerjali mikrobioto mleka leve in desne dojke ter sevno pestrost laktobacilov. Število kultivabilnih bakterij smo ugotavljali na gojiščih MRS (za mlečnokislinske bakterije), BHI (za mezofilne aerobne bakterije), M17 (za laktokoke in enterokoke), ROGOSA (za laktobacile), TOS z dodatkom mupirocina (za bifidobakterije) in kromogenem gojišču URI (za *Escherichia coli*, *Enterococcus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter* sp. ter druge). V humanem mleku smo potrdili prisotnost mlečnokislinskih bakterij, bifidobakterij in mezofilnih aerobnih bakterij, ki so bile najbolj zastopane. Po sestavi sta bili mikrobioti mleka L in D primerljivi, vendar pa se je koncentracija bakterij med vzorcema L in D iste mame lahko zelo razlikovala. Z metodo RAPD smo pregledali 86 izolatov iz gojišča za laktobacile, osamljenih iz mleka 11 mater. Predstavnike 11 različnih genotipov smo identificirali do vrste s pomočjo ugotavljanja zaporedja dela *16S rDNA*. Predstavniki 4 skupin (21 % izolatov) so pripadali vrsti *Lactobacillus (L.) gasseri*. Bakterije z vzorcem RAPD, ki se je najpogosteje ponovil (pri 48 % izolatov), so bile vrste *L. fermentum*. Ostale predstavnice so bile iz vrst *L. salivarius*, *L. reuteri*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus epidermidis* in *Bifidobacterium breve*. Pri primerjavi sevnih sestav mleka L in D iste matere z metodo RAPD nismo ugotovili bistvenih razlik. Iz rezultatov je mogoče zaključiti, da moramo za reprezentativno sliko mikrobiote mleka posamezne matere analizirati vzorca iz obeh dojk oziroma ju pred analizo združiti.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2

DC UDK 612.664:579.24/.26:57.083.1(043)=163.6

CX human milk/bacteria of human milk/microbiota of milk from left breast/ microbiota of milk from right breast/conventional culture-dependent techniques/ RAPD PCR/ nucleotide sequence of *16S rDNA/Lactobacillus gasseri/ Lactobacillus fermentum/Lactobacillus salivarius/Lactobacillus reuteri/ Enterococcus faecium/Staphylococcus epidermidis/Bifidobacterium breve*

AU ŽERDONER, Klavdija

AA BOGOVIČ MATIJAŠIĆ, Bojana (supervisor)/SMOLE MOŽINA, Sonja (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

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

PY 2013

TI MICROBIOTA OF HUMAN MILK

DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Food Science and Technology)

NO XII, 54 p., 16 tab., 46 fig., 10 ann., 29 ref.

LA sl

AL sl/en

AB The human milk microbiota plays an important role in the development of infant's intestinal microbiota and in the protection against pathogenic microorganisms. The aim of this study was to investigate the bacterial communities in human milk of 47 mothers, sampled separately from the left (L) and the right (D) breast, on the 30th day after birth. We determined the abundance of major bacterial groups in human milk, compared the milk microbiota from the left and the right breast and identified strain diversity of lactobacilli. To determine the number of cultivable bacterial cells we used different media as follows: MRS for lactic acid bacteria, BHI for aerobic mesophilic bacteria, M17 for lactococci and enterococci, ROGOSA for lactobacilli, TOS supplemented by mupirocin for bifidobacteria, and finally chromogenic URI for *Escherichia coli*, *Enterococcus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter* sp. and others. Results revealed that human milk contains lactic acid bacteria, bifidobacteria and mesophilic aerobic bacteria, which were also the most abundant groups. Although the microbial compositions of breast milk in samples L and D were comparable, the concentration of bacteria between the samples L and D from the same mother may vary. Using RAPD method 86 bacterial isolates from ROGOSA, obtained from breast milk of 11 mothers, were examined to the strain level. Moreover, representatives of 11 different genotypes were species identified using sequence analysis of *16S rDNA*. The representatives of 4 genotypes (21 % of all isolates) belonged to the species *Lactobacillus (L.) gasseri*. Bacteria with the most reproducible RAPD profile (48 % of isolates) belonged to the species *L. fermentum*. Other isolates were representatives of *L. salivarius*, *L. reuteri*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus epidermidis* and *Bifidobacterium breve* species. No significant differences were observed when strain composition of L and D milk from the same mother, obtained with RAPD method was compared. Results of our study suggest that complete and representative information of human milk microbiota is obtained with analysing or milk from both breasts or with combining milk samples from L and D breast before the analysis.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN IN CILJI NALOGE	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE NALOGE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 HUMANO MLEKO	3
2.2 MIKROORGANIZMI HUMANEGA MLEKA.....	5
2.2.1 Mlečnokislinske bakterije	8
2.2.2 Bakterije rodu <i>Bifidobacterium</i>	8
2.2.3 Mezofilne aerobne ali fakultativno anaerobne bakterije.....	9
2.3 RAZVOJ DOJENČKOVE MIKROBIOTE.....	10
3 MATERIALI IN METODE	11
3.1 NAČRT ANALIZE.....	11
3.2 MATERIALI	12
3.2.1 Vzorci.....	12
3.2.2 Gojišča	12
3.2.2.1 Gojišče MRS	13
3.2.2.2 Gojišče BHI.....	13
3.2.2.3 Gojišče M17	13
3.2.2.4 Gojišče ROGOSA	13
3.2.2.5 Gojišče TOS z dodatkom mupirocina	13
3.2.2.6 Gojišče URI.....	14
3.2.2.7 Bujon MRS s cisteinom	14
3.2.2.8 Bujon MRS s 30 % glicerolom	14
3.2.3 Ringerjeva raztopina $\frac{1}{4}$ jakosti	14
3.2.4 Reagenti za barvanje po Gramu	14
3.2.5 Reagenti za izvedbo metode RAPD PCR	15
3.2.5.1 Set za izolacijo genomske DNA.....	15
3.2.5.2 Reakcijska mešanica za izvedbo RAPD PCR.....	15
3.2.6 Reagenti za izvedbo agarozne gelske elektroforeze.....	16
3.2.6.1 Agarozni gel	16

3.2.6.2	Ostale kemikalije.....	16
3.2.7	Reagenti za pomnoževanje 16S rDNA z metodo PCR.....	16
3.2.7.1	Reakcijska mešanica za PCR	16
3.2.7.2	Reagenti za čiščenje pomnožkov PCR.....	17
3.3	METODE.....	17
3.3.1	Kvantifikacija bakterij s štetjem na ploščah.....	17
3.3.1.1	Priprava vzorcev za mikrobiološko analizo	17
3.3.1.2	Razredčevanje po Kochu.....	17
3.3.1.3	Nacepljanje vzorcev na selektivna gojišča in inkubacija	17
3.3.1.4	Ugotavljanje števila mikroorganizmov	17
3.3.2	Morfološki pregled kolonij s svetlobnim mikroskopom	18
3.3.3	Genotipizacija izbranih izolatov z metodo RAPD	18
3.3.3.1	Osamitev laktobacilov.....	18
3.3.3.2	Izolacija genomske DNA iz kolonij	19
3.3.3.3	Metoda RAPD PCR	19
3.3.3.4	Agarozna gelska elektroforeza	20
3.3.4	Pomnoževanje dela 16S rDNA z metodo PCR	21
3.3.4.1	Čiščenje pomnožkov PCR.....	21
3.3.4.2	Sekvenciranje in analiza nukleotidnih zaporedij.....	22
4	REZULTATI.....	23
4.1	MAKROMORFOLOŠKE LASTNOSTI KOLONIJ	23
4.1.1	Gojišče MRS.....	23
4.1.2	Gojišče BHI	23
4.1.3	Gojišče M17.....	24
4.1.4	Gojišče ROGOSA	24
4.1.5	Gojišče TOS z dodatkom mupirocina.....	25
4.1.6	Gojišče URI	26
4.2	MAKROMORFOLOŠKE LASTNOSTI KOLONIJ IN MIKROMORFOLOŠKE LASTNOSTI LAKTOBACILOV	27
4.3	PRIMERJAVA ŠTEVILA BAKTERIJ V MLEKU LEVE IN DESNE DOJKE. 28	
4.3.1	Gojišče MRS.....	29
4.3.2	Gojišče BHI	30
4.3.3	Gojišče M17.....	31
4.3.4	Gojišče ROGOSA	33
4.3.5	Gojišče TOS z dodatkom mupirocina.....	34
4.3.6	Gojišče URI	35
4.3.6.1	Temno roza do rdeče obarvane kolonije – <i>E. coli</i>	35
4.3.6.2	Turkizno modro obarvane kolonije – <i>Enterococcus</i>	37
4.3.6.3	Rumeno-zlato obarvane kolonije – <i>Staphylococcus aureus</i>	38
4.3.6.4	Belo obarvane kolonije – <i>Staphylococcus epidermidis</i>	40

4.3.6.5	Metalno-modro obarvane kolonije – <i>Enterobacter</i> , <i>Klebsiela</i> in <i>Citrobacter</i>	41
4.4	ŠTEVILO BAKTERIJ V HUMANEM MLEKU	43
4.5	RAZLIKOVANJE SEVOV LAKTOBACILOV Z METODO RAPD	44
4.6	UGOTAVLJANJE VRSTE LAKTOBACILOV S SEKVENCIRANJEM.....	45
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	46
5.1	RAZPRAVA	46
5.1.1	Število bakterij v humanem mleku	46
5.1.2	Razlika v številu bakterij mleka iz leve in desne dojke.....	46
5.1.3	Metoda RAPD	47
5.1.4	Sekvenciranje – ugotavljanje vrste za izolate iz gojišča ROGOSA	47
5.2	SKLEPI.....	48
6	POVZETEK.....	50
7	VIRI	52
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Primerjava sestave kolostruma in zrelega humanega mleka (Murtaugh in sod., 2011: 164)	4
---	---

Preglednica 2:

KAZALO SLIK

Slika 1: Hipotetični model prenosa črevesnih bakterij matere v mleko (Fernández in sod., 2013: 4).....	6
Slika 2: Shematični prikaz spreminjanja mikrobiote ženske mlečne žleze (Fernández in sod., 2013: 3).....	7
Slika 3: Shematski prikaz ključnih korakov analize.....	11
Slika 4: Vzorec mleka matere z oznako LJ-166	12
Slika 5: Set za izolacijo genomske DNA – Smart Helix® EZextract.....	15
Slika 6: Prikaz postopka prenosa posamezne kolonije v mikroepruveto (Smart Helix® EZextract, 2013).....	19
Slika 7: Kolonije bakterij iz humanega mleka na gojišču MRS	23
Slika 8: Kolonije mezofilnih aerobnih bakterij iz humanega mleka na gojišču BHI	24
Slika 9: Kolonije bakterij iz humanega mleka na gojišču M17	24
Slika 10: Kolonije bakterij iz humanega mleka na gojišču ROGOSA	25
Slika 11: Kolonije bifidobakterij iz humanega mleka na gojišču TOS z dodatkom mupirocina.....	25
Slika 12: Kolonije bakterij iz humanega mleka na gojišču URI.....	26
Slika 13: Kultura laktobacilov iz kolonije, po postopku barvanja po Gramu (Todar, 2009)	27
Slika 14: Kvantilni diagram.....	28
Slika 15: Število KE na gojišču MRS (log (KE/ml)).....	29
Slika 16: Razlika med mlekom D in L, za gojišče MRS (log (KE/ml))	29
Slika 17: Frekvenčna porazdelitev razlike v številu KE v ml mleka L in D posameznih mater, za gojišče MRS.....	30
Slika 18: Število KE na gojišču BHI (log (KE/ml))	30
Slika 19: Razlika med mlekom D in L, za gojišče BHI (log (KE/ml)).....	31
Slika 20: Frekvenčna porazdelitev razlike v številu KE v ml mleka L in D posameznih mater, za gojišče BHI	31
Slika 21: Število KE na gojišču M17 (log (KE/ml))	32
Slika 22: Razlika med mlekom D in L, za gojišče M17 (log (KE/ml)).....	32
Slika 23: Frekvenčna porazdelitev razlike v številu KE v ml mleka L in D posameznih mater, za gojišče M17.....	32
Slika 24: Število KE na gojišču ROGOSA (log (KE/ml)).....	33
Slika 25: Razlika med mlekom D in L, za gojišče ROGOSA (log (KE/ml))	33
Slika 26: Frekvenčna porazdelitev razlike v številu KE v ml mleka L in D posameznih mater, za gojišče ROGOSA.....	34
Slika 27: Število KE na gojišču TOS z dodatkom mupirocina (log (KE/ml)).....	34
Slika 28: Razlika med mlekom D in L, za gojišče TOS z mupirocinom (log (KE/ml)).....	35
Slika 29: Frekvenčna porazdelitev razlike v številu KE v ml mleka L in D posameznih mater, za gojišče TOS z mupirocinom	35

Slika 30: Število KE temno roza do rdeče barve na gojišču URI (log (KE/ml)).....	36
Slika 31: Razlika med mlekom D in L, za temno roza do rdeče kolonije gojišča URI (log (KE/ml))	36
Slika 32: Frekvenčna porazdelitev razlike v številu KE v ml mleka L in D posameznih mater, za roza do rdeče kolonije gojišča URI.....	37
Slika 33: Število KE turkizno modre barve na gojišču URI (log (KE/ml)).....	37
Slika 34: Razlika med mlekom D in L, za turkizne kolonije gojišča URI (log (KE/ml)) ..	38
Slika 35: Frekvenčna porazdelitev razlike v številu KE v ml mleka L in D posameznih mater, za turkizne kolonije gojišča URI	38
Slika 36: Število KE rumene barve na gojišču URI (log (KE/ml))	39
Slika 37: Razlika med mlekom D in L, za rumene kolonije gojišča URI (log (KE/ml)) ...	39
Slika 38: Frekvenčna porazdelitev razlike v številu KE v ml mleka L in D posameznih mater, za rumene kolonije gojišča URI	39
Slika 39: Število KE bele barve na gojišču URI (log (KE/ml)).....	40
Slika 40: Razlika med mlekom D in L, za bele kolonije gojišča URI (log (KE/ml)).....	40
Slika 41: Frekvenčna porazdelitev razlike v številu KE v ml mleka L in D posameznih mater, za bele kolonije gojišča URI	41
Slika 42: Število KE metalno-modre barve na gojišču URI (log (KE/ml)).....	41
Slika 43: Razlika med mlekom D in L, za metalno-modre kolonije gojišča URI (log (KE/ml))	42
Slika 44: Frekvenčna porazdelitev razlike v številu KE v ml mleka L in D posameznih mater, za metalno-modre kolonije gojišča URI.....	42
Slika 45: Število KE v ml mleka (L in D skupaj), za vsa gojišča, predstavljeno v logaritmiranih vrednostih	43
Slika 46: Pomnožki analize RAPD	44

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Nukleotidno zaporedje pomnožka – *Lactobacillus fermentum* (NCBI, 2013)
Priloga B: Nukleotidno zaporedje pomnožka – *Lactobacillus salivarius* (NCBI, 2013)
Priloga C: Nukleotidno zaporedje pomnožka – *Bifidobacterium breve* (NCBI, 2013)
Priloga D: Nukleotidno zaporedje pomnožka – *Lactobacillus gasseri* 1 (NCBI, 2013)
Priloga E: Nukleotidno zaporedje pomnožka – *Staphylococcus epidermidis* (NCBI, 2013)
Priloga F: Nukleotidno zaporedje pomnožka – *Lactobacillus reuteri* (NCBI, 2013)
Priloga G: Nukleotidno zaporedje pomnožka – *Lactobacillus gasseri* 2 (NCBI, 2013)
Priloga H: Nukleotidno zaporedje pomnožka – *Enterococcus faecalis* (NCBI, 2013)
Priloga I: Nukleotidno zaporedje pomnožka – *Lactobacillus gasseri* 3 (NCBI, 2013)
Priloga J: Nukleotidno zaporedje pomnožka – *Lactobacillus gasseri* 4 (NCBI, 2013)

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AGE	agarozna gelska elektroforeza
bp	bazni par
BHI	gojišče za mezofilne aerobne bakterije
DC	dendritična celica
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	mešanica nukleotidov
IgA	imunoglobulini A
KE	kolonijska enota
KE/g	kolonijskih enot na gram
KE/ml	kolonijskih enot na mililiter
M17	gojišče za laktokoke in enterokoke
MKB	mlečnokislinske bakterije
MRS	gojišče de Man, Rogosa in Sharpe
mleko D	mleko odvzeto iz desne dojke
mleko L	mleko odvzeto iz leve dojke
PCR	verižna reakcija s polimerazo
RAPD	pomnoževanje DNA z naključnimi začetnimi oligonukleotidi
16S <i>rDNA</i>	gen za ribosomsko podenoto 16S
16S rRNA	ribosomska podenota 16S
ROGOSA	gojišče Rogosa
sp.	species (vrsta)
TAE	TRIS acetatni pufer
TOS	gojišče z mešanico tri-, tetra-, penta- in heksasaharidov, pridobljenih z encimsko hidrolizo laktoze s pomočjo <i>Aspergillus oryzae</i> β -galaktozidaze
URI	kromogeno selektivno gojišče UriSelect™4 za osamitev in štetje urinarnih patogenov

1 UVOD

Magistrsko delo je del širše zastavljene raziskave »Vloga humanega mleka v razvoju črevesne mikrobiote dojenčka«.

Poseljevanje prebavi novorojenca z mikrobi nastopi že med porodom, ko pride otrok iz maternice v stik z zunanjim okoljem. Otrokova mikrobiota se nato razvija in oblikuje do njegovega drugega leta, ko se vzpostavi stabilna sestava, ki je podobna mikrobioti odrasle osebe. Na otrokovo mikrobioto ima zelo velik vpliv način prehranjevanja. V primeru dojenja predstavlja prav humano mleko ključni vir otrokovih bakterij.

Humano mleko je kompleksna in polnovredna biološka tekočina, ki predstavlja novorojencu edinstveno naravno obliko prehrane. Dojenčku zagotavlja hrano in zaščito, saj vsebuje vsa potrebna hranila, ki jih potrebuje v fazi rasti in razvoja, kakor tudi protimikrobne snovi, celice imunskega sistema in protitelesa. Poleg tega predstavlja enega od ključnih dejavnikov pri vzpostavitvi, razvoju in oblikovanju njegove črevesne mikrobiote. Humano mleko je bogat vir bakterij iz rodov *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* in *Bifidobacterium*. Te bakterije prehajajo z dojenjem v dojenčkovo črevesje, kjer posredno vplivajo na razvoj njegovega imunskega sistema ter mu zagotavljajo uspešno obrambo pred patogenimi mikrobi in pojavom alergij.

Raziskave mikrobiote humanega mleka odpirajo raziskovalcem nove izzive, saj je področje kompleksno, široko in dokaj novo. Mnoga vprašanja še vedno ostajajo nerešena, med drugimi tudi dilema ali mikrobiološka analiza mleka, odvzetega iz ene dojke, dovolj dobro odslikava mikrobioto, ki jo otrok dejansko zaužije z mlekom ali je morda potrebno v analize vključiti mleko iz obeh dojk. Na slednje vprašanje oz. dilemo sem v nalogi želela poiskati odgovor.

1.1 NAMEN IN CILJI NALOGE

Cilji magistrske naloge so bili:

- analizirati ter ovrednotiti pomembnejše bakterijske skupine (mlečnokislinske bakterije, bifidobakterije in mezofilne fakultativno aerobne bakterije) v kultivabilni mikrobioti mleka,
- primerjati mikrobioto mleka leve in desne dojke,
- primerjati izolate laktobacilov v mleku leve in desne dojke in tako ugotoviti sevno pestrost laktobacilov.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE NALOGE

Delovne hipoteze magistrske naloge so bile:

- materino mleko, odvzeto trideseti dan po porodu, vsebuje kultivabilne bakterije iz skupin mlečnokislinskih bakterij in aerobnih mezofilnih bakterij,
- mikrobioti mleka, odvzetega en mesec po porodu iz desne in leve dojke, bosta primerljivi tako po sestavi kot tudi po koncentraciji bakterij,
- posamezni izolati laktobacilov iz leve in desne dojke bodo identični.

2 PREGLED OBJAV

2.1 HUMANO MLEKO

Humano mleko je edinstvena bioaktivna tekočina, ki predstavlja novorojencu v obdobju prvih šestih mesecev najboljšo in najpopolnejšo obliko hrane. Z njegovim uživanjem pridobi otrok vsa potrebna hranila za rast in razvoj, poleg tega pa sodeluje pri oblikovanju njegovega imunskega sistema ter mu tako zagotavlja zaščito pred patogenimi mikroorganizmi. S prehranskega, fiziološkega in psihološkega vidika velja dojenje za »zlati standard« prehranjevanja novorojenca.

Sinteza mleka (laktogeneza) poteka v zrelih mlečnih žlezah, zgrajenih iz nabreklih alveolarnih celic in razvejanih mlečnih vodov. Proces laktogeneze poteka v dveh fazah, pri čemer nastopi prva že v obdobju druge polovice nosečnosti, ko se pod vplivom hormona prolaktina v alveolarnih celicah začne tvoriti in izločati manjša količina mleziva (kolostruma). Druga faza poteka v obdobju prvih štirih dni po porodu, ko se zaradi postopnega znižanja progesterona v krvi povečata sinteza in izločanje mleka. Nekaj dni po porodu količina mleziva usiha, takrat se prične sinteza prehodnega mleka. S tem se začne tudi proces laktacije, ki traja celotno obdobje dojenja. Laktacijo uravnava hipofizna hormona prolaktin in oksitocin. Na nastanek in sekrecijo mleka vpliva prolaktin, katerega izločanje stimulira otrokovo sesanje. Njegova koncentracija v krvi ne vpliva na količino nastalega mleka. Za izločanje mleka je odgovoren hormon oksitocin, ki se v kri izloča zaradi dražljajev, ki nastopijo pri sesanju mleka. Slednji hormon potuje po krvnem obtoku do mlečnih žlez, kjer stimulira krčenje gladkih mišic okoli alveol in posledično povzroči nevroendokrini refleks izbrizganja mleka. Oksitocin se lahko sprošča tudi zaradi psiholoških vzrokov, kot so misel na dojenje, otroka ali zaznava otroškega joka. Tri do štiri mesece po porodu nastopi faza involucije – stanja, ko se nivo prolaktina v krvi dokončno zniža, mlečne žleze pa se vrnejo v pred-nosečniško obliko (Johnson, 2010; Wambach in sod., 2005).

Glede na fazo laktacije in posledično različno sestavo mleka lahko mleko ločimo v tri različne stadije: kolostrum, mleko prehodnega obdobja ter zrelo mleko (Lutter, 2005). Prvo mleko, ki ga zaužije novorojenec, je kolostrum ali mlezivo. Mlečna žleza ga sintetizira že pred porodom, nastaja v manjših količinah, približno do 3 dni po porodu. Vizualno se od zrelega mleka razlikuje po barvi, kemijsko pa po vsebnosti proteinov, rastnih ter imunskih faktorjev, mineralov in vitaminov, ki jih je v kolostrumu več; ter po vsebnosti laktoze in maščobe, ki ju je v kolostrumu manj kot v zrelem mleku (Riordan, 2010). Ko se sinteza mleka poveča, nastaja prehodno mleko, po približno dveh tednih pa zrelo mleko. Sestava zrelega humanega mleka je relativno stalna in z izjemo maščobnih kislin in nekaterih vitaminov (pri materah vegetarijankah) ni odvisna od prehrane matere. Vsebuje preko 200 različnih snovi, med katerimi imajo nekatere tudi več funkcij hkrati, njihova vsebnost pa

Ker se sestava humanega mleka spreminja in prilagaja otrokovim potrebam, je v splošnem mleko na začetku dojenja bolj tekoče in vodeno, s trajanjem dojenja pa se gosti, pri čemer se povečujeta vsebnost maščob in energije. To je pomembno, saj daje novorojencu občutek sitosti, s tem pa se uravnava njegov tek in količina zaužitega mleka (Murtaugh in sod., 2011). V Preglednici 1 je prikazana primerjava v sestavi kolostruma in zrelega humanega mleka.

Preglednica 1: Primerjava sestave kolostruma in zrelega humanega mleka (Murtaugh in sod., 2011: 164)

Na razvoj imunskega sistema in inaktivacijo patogenih mikroorganizmov novorojenca vplivajo tudi t. i. bioaktivne komponente humanega mleka ter bakterije s probiotičnim delovanjem. Bioaktivne snovi v mleku so kompleksne molekule, ki delujejo po zapletenih bioloških in biokemičnih mehanizmihi. Med njimi najdemo imunoglobuline, laktoferin, lizocim, peptide in maščobne kisline s protimikrobnim delovanjem, poliamide in glikane (

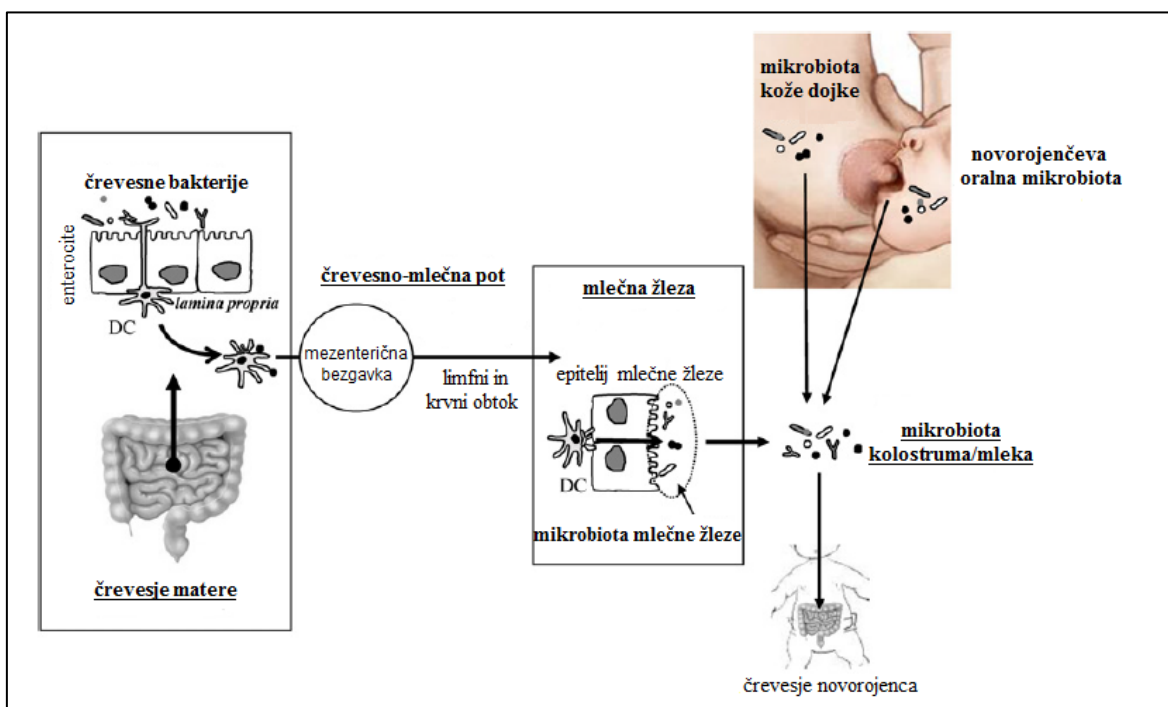
tankem črevesu in lahko uničujejo viruse ter bakterije. Te komponente delujejo sinergistično, kar pomeni, da v kombinaciji dosežajo najboljše inhibitorne učinke. K obrambi novorojenca pripomorejo tudi glikani, kompleksni ogljikovi hidrati humanega mleka. Z vezavo na receptorska mesta epitelnih celic črevesja preprečujejo vezavo patogenih bakterij (Newburg, 2005).

2.2 MIKROORGANIZMI HUMANEGA MLEKA

Medtem ko je včasih veljalo prepričanje, da je materino mleko sterilna tekočina, je danes dokazano prav nasprotno. Avtorji raziskav

V kasnejših študijah so zgornje domneve o drugačni poti prenosa mikroorganizmov v humano mleko potrdili. Rodríguez (2011) navaja razlike med mikrobioto dojke in mleka iste matere. Vrste laktobacilov in bifidobakterij, ki so jih osamili iz humanega mleka, niso našli v brisu dojke iste matere, poleg tega pa so se izolati iz obeh virov razlikovali genotipsko. V svoji raziskavi so izpostavili tudi dejstvo, da je rod bifidobakterij strogo anaeroben, zato je skoraj nemogoče, da bi koža predstavljala edini vir prenosa teh bakterij v mleko.

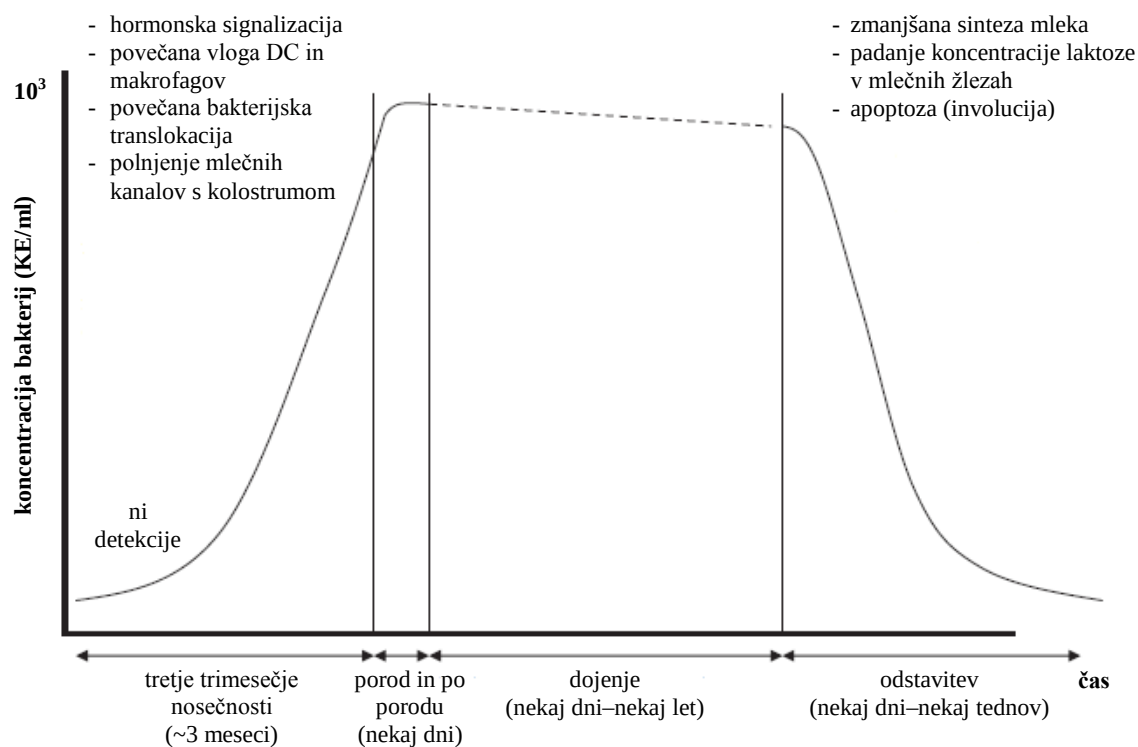
Vprašanje izvora bakterij v humanem mleku tako ostaja aktualno področje za raziskovanje. Tradicionalno mnenje, da je prisotnost bakterij v mleku posledica zunanje kontaminacije iz kože, dojke in ust dojenčka ob dojenju, so izpodrinila mnoga nova odkritja. Že zgoraj navedene ugotovitve kažejo na to, da lahko vsaj nekatere bakterije, prisotne v črevesju matere, prehajajo do njene mlečne žleze po endogeni poti.



Slika 1: Hipotetični model prenosa črevesnih bakterij matere v mleko (Fernández in sod., 2013: 4)

Prenos MKB v humano mleko se najverjetneje odvija po t. i. endogeni »črevesno-mlečni poti«, ki je shematsko prikazana na Sliki 1. Do kolonizacije mlečnih žlez s črevesnimi bakterijami verjetno pride že v času pozne nosečnosti, preko krvnega obtoka. Dendritične celice (DC) lahko penetrirajo skozi plast črevesnih epitelnih celic (enterocitov), v črevesni lumen, kjer vežejo MKB. Dendritične celice prenesajo MKB preko medceličnih prostorov enterocitov, pri čemer ostane črevesna sluznica nepoškodovana. Ko so bakterije enkrat v dendritičnih celicah, v drugih vrstah limfocitov in/ali v makrofagih, se lahko razširijo v druge predele telesa. Na ta način se MKB preko limfnega in krvnega obtoka prenašajo po

telesu, dosežejo lahko tudi mlečne žleze, od koder preidejo v mleko doječe matere in z dojenjem v otroka. Dendritična celica ima sposobnost, da tudi do več dni obdrži manjše število komenzalnih bakterij, ki jih »shrani« v me



2.2.1 Mlečnokislinske bakterije

Mlečnokislinske bakterije (MKB) so obširna in heterogena skupina bakterij, ki jim je skupno, da so po Gramu pozitivne, nepatogene, nesporogene, fermentativne, fakultativno anaerobne, običajno negibljive in katalaza negativne palčke ali koki. Energijo pridobivajo s fermentacijo glukoze, po homofermentativni poti, kjer nastaja kot končen produkt glikolize mlečna kislina, ali po heterofermentativni poti, kjer poleg mlečne kisline nastajajo še ostali produkti fermentacije, kot so očetna kislina, etanol, acetat in ogljikov dioksid. MKB so odporne proti ekstremnim dejavnikom, kot sta nizka ali visoka vrednost pH in povišana koncentracija soli (Adamič in sod., 2003; Jeršek, 2011). Predstavniki MKB naseljujejo mnoge okoljske niše, med drugimi tudi humano mleko.

Zastopanost in pestrost MKB lahko opazimo tudi v naravni mikrobioti materinega kolostruma in mleka. Največji delež vseh prisotnih bakterij v humanem mleku pripada prav MKB, iz rodov *Streptococcus*, *Lactobacillus* in *Enterococcus*. Glede na rezultate analize mikrobiote humanega mleka, avtorjev Sol

bifidobakterij specifične poti fermentacije sladkorja. S pomočjo encima fruktoza-6-fosfat fosfoketolaza razgradijo heksoza-fosfate na eritroza-4-fosfat in acetil fosfat. Končna produkta sta mlečna in očetna kislina (Biavati in sod., 2000).

Na količino in vrstno sestavo bifidobakterij v telesu posameznika vplivata predvsem njegova starost in prehrana. Njihova koncentracija z leti počasi upada. Medtem ko predstavljajo po nekaterih virih kar 91 % črevesne mikrobiote pri novorojenčkih, jih je pri odraslih le še okoli 3 % (Hadadji in sod., 2005). Z izločanjem biološko aktivnih snovi vplivajo bifidobakterije blagodejno na gostiteljevo zdravje. Ker delujejo zaviralno na rotaviruse, koliformne ter različne patogene bakterije, lahko preprečujejo diarejo in rotavirusne okužbe pri otrocih (Biavati in sod., 2000).

Po Sol

Enterobakterije so heterogena skupina bakterij družine *Enterobacteriaceae*. V humanem mleku zdrave matere najdemo predvsem predstavnike *Escherichia* sp., *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp. in *Citrobacter* sp.

Vrsta *Escherichia coli*, ki obsega nepatogene, patogene in tudi komenzalne seve, običajno predstavlja normalno in ekološko pomembno mikrofloro človeških sluznic. Po rezultatih molekularnih študij naj bi bila omenjena vrsta ena izmed prvih kolonizatorjev novorojenčevega črevesja. Sev *E. coli* Nissle 1917 (O6: K5: H1) je probiotičen, saj zmanjšuje pogostost okužb, spodbuja celični odziv in naravno imunost (Rodríguez, 2011).

2.3 RAZVOJ DOJENČKOVE MIKROBIOTE

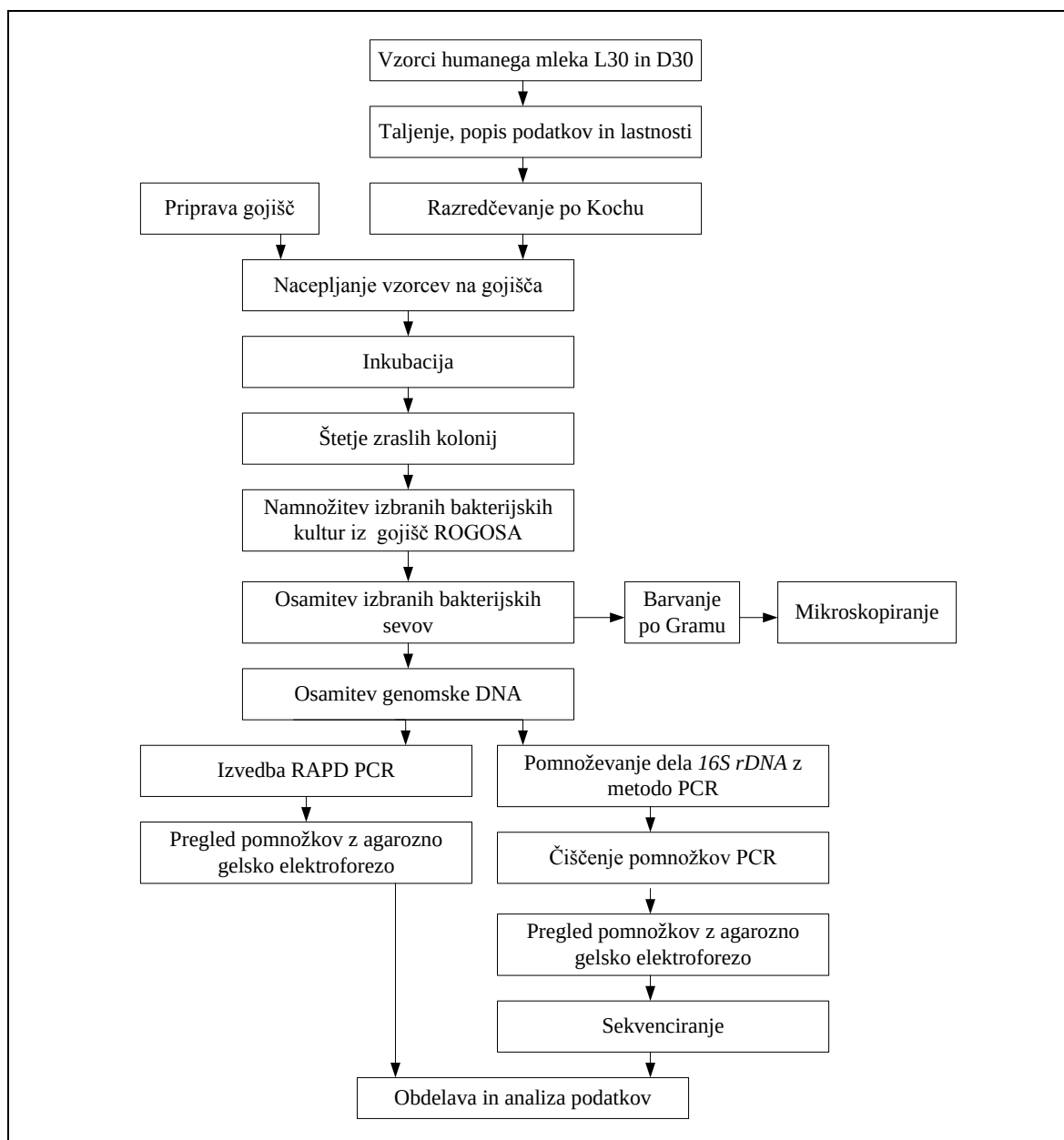
Novorojenec se rodi z nezrelim imunskim sistemom, poselitev njegovih prebavil z mikrobi pa se začne ob rojstvu, ko pride v stik z zunanjim okoljem. Kolonizacija z mikroorganizmi se nadaljuje nekje do drugega leta otrokovega življenja, ko se ob prehodu na mešano prehrano, v njegovem črevesju vzpostavi stabilna mikrobiota, podobna mikrobioti odraslega človeka (Coppa in sod., 2006; Newburg, 2005).

Mikrobiološka pestrost humanega mleka se kaže v dejstvu, da zaužije dojenček z 800 ml materinega mleka, od 10^5 do 10^7 bakterij, kar pomeni, da ga mleko neprekinjeno oskrbuje z mikroorganizmi. Mikrobiološka sestava dojenčkovega blata tako odraža mikrobiološko sestavo materinega mleka. Potemtakem predstavlja dojenje enega ključnih dejavnikov črevesne kolonizacije novorojenčka z mikroorganizmi (

3 MATERIALI IN METODE

3.1 NAČRT ANALIZE

V poskusu smo analizirali mikrobioto humanega mleka, pridobljenega od mater prostovoljk, vključenih v obširnejšo raziskavo »Vloga humanega mleka v razvoju črevesne mikrobiote dojenčka«. Ugotavljali smo številčnost ter pestrost bakterij v mleku in morebitne razlike v mikrobioti mleka leve in desne dojke na nivoju rodov ter skupin, za laktobacile pa tudi sevov. Slika 3 prikazuje ključne korake/postopke laboratorijskega dela.



Slika 3: Shematski prikaz ključnih korakov analize

Vzorci mleka smo na sobni temperaturi odtalili, premešali ter zabeležili njihovo oznako, barvo in količino. Razredčene vzorce smo nanесли na pripravljena selektivna gojišča MRS, TOS z mupirocinom, ROGOSA, M17, BHI in URI ter plošče pod ustreznimi pogoji inkubirali. Po inkubaciji smo prešteli vidne kolonije.

Mleko enajstih mater smo uporabili tudi za genotipsko analizo laktobacilov z metodo RAPD. Naključno izbranih 5 kolonij, ki so po nacepljanju mleka leve in desne dojke zrastle na gojišču ROGOSA, smo nagojili, prečistili in njihovo DNA analizirali z metodo RAPD. Izolatom, ki so se v vzorcih največkrat pojavili smo pomnožili del *16S rDNA* in ga sekvencirali ter določili vrsto laktobacilov. Opravili smo tudi mikroskopski pregled morfologije laktobacilov po postopku barvanja po Gramu.

3.2 MATERIALI

3.2.1 Vzorci

Analizirali smo vzorce humanega mleka 47-ih prostovoljk. Mleko je bilo odvzeto ločeno iz leve in desne dojke, trideseti dan po porodu, v sterilne plastične posodice, opremljene z oznako prostovoljke, vzorca ter datumom. Vzorci so bili zamrznjeni, shranjeni do enega tedna pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, kasneje pa preneseni v zamrzovalnik s temperaturo $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, do analize.



Slika 4: Vzorec mleka matere z oznako LJ-166

Na Sliki 4 je prikazan primer vzorca mleka matere z oznako LJ-166. Oznaka L30 pomeni, da je bilo mleko odvzeto iz leve dojke, trideseti dan po porodu; oznaka D30 pa pomeni, da je bilo mleko trideseti dan po porodu odvzeto iz desne dojke.

3.2.2 Gojišča

Vzorci humanega mleka smo nacepljali na različna selektivna gojišča za štetje posameznih bakterijskih skupin. Uporabili smo naslednja gojišča:

- MRS: za MKB (pretežno laktobacile),
- BHI: za mezofilne aerobne bakterije,
- M17: za MKB (pretežno laktokoke in enterokoke),
- ROGOSA: za laktobacile,
- TOS z dodatkom mupirocina: za bifidobakterije,
- URI: za bakterije vrste *E. coli*, *Enterococcus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter* sp., ter druge (*Klebsiella* sp., *Citrobacter* sp., *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp.)

3.2.2.1 Gojišče MRS

Gojišče MRS smo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck, Nemčija). Gojišče smo uporabili za ugotavljanje števila kolonijskih enot mlečnokislinskih bakterij, predvsem laktobacilov.

3.2.2.2 Gojišče BHI

Gojišče BHI smo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck, Nemčija). Gojišče smo uporabili za ugotavljanje števila kolonijskih enot mezofilnih aerobov.

3.2.2.3 Gojišče M17

Gojišče M17 smo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck, Nemčija). Gojišče smo uporabili za ugotavljanje števila kolonijskih enot mlečnokislinskih bakterij, predvsem laktokokov in enterokokov.

3.2.2.4 Gojišče ROGOSA

Gojišče ROGOSA smo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck, Nemčija). Gojišče smo uporabljali za ugotavljanje števila kolonijskih enot laktobacilov.

3.2.2.5 Gojišče TOS z dodatkom mupirocina

Gojišče TOS smo pripravili po navodilih proizvajalca (Yakult, Japonska). Mupirocin je antibiotik, ki zavira mlečnokislinske bakterije, ne zavira pa rast bifidobakterij. Gojišče smo uporabili za ugotavljanje števila kolonijskih enot bifidobakterij.

3.2.2.6 Gojišče URI

Gojišče URI smo pripravili po navodilih proizvajalca (Bio-Rad, Francija). Glede na različno obarvanje kolonije smo gojišče uporabili za ugotavljanje števila kolonijskih enot enterokokov (kolonije turkizno modre barve), *E. coli* (kolonije temno roza do rdeče barve), *Staphylococcus aureus* (kolonije zlato-rumene barve), *Staphylococcus epidermidis* (kolonije bele barve) ter ostalih bakterij (pretežno *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Staphylococcus* in *Streptococcus*).

3.2.2.7 Bujon MRS s cisteinom

Bujon MRS smo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck, Nemčija). Gojišče smo uporabili za namnožitev izbrane kolonije iz gojišča ROGOSA.

3.2.2.8 Bujon MRS s 30 % glicerolom

Bujon MRS smo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck, Nemčija). Glicerol je krioprotektant, zato je tako pripravljeno gojišče primerno za zamrzovanje in dolgoročno shranjevanje bakterijskih kultur.

3.2.3 Ringerjeva raztopina $\frac{1}{4}$ jakosti

Eno Ringerjevo tableto (Merck, Nemčija) smo raztopili v pol litra demineralizirane vode, razdelili v epruvete in avtoklavirali. Fiziološko raztopino (9 ml alikvoti) smo uporabljali pri postopku razredčevanja po Kochu.

3.2.4 Reagenti za barvanje po Gramu

Za postopek barvanja po Gramu smo uporabili komercialni set proizvajalca Bio-Merieux (Francija), ki je vseboval naslednje komponente:

- barvilo kristal-vijolično,
- lugolovo raztopino,
- mešanico aceton-etanol,
- barvilo safranin.

3.2.5 Reagenti za izvedbo metode RAPD PCR

3.2.5.1 Set za izolacijo genomske DNA

Za izolacijo genomske DNA smo uporabili komercialni set Smart Helix[®] EZextract (Sekvenator, Slovenija).



Slika 5: Set za izolacijo genomske DNA – Smart Helix[®] EZextract

3.2.5.2 Reakcijska mešanica za izvedbo RAPD PCR

Po protokolu avtorjev Torriani in sod. (1999) smo pripravili reakcijsko mešanico za RAPD PCR. Postopek smo opravili v sterilnih pogojih, pri tem smo uporabili rokavice. Vse potrebne kemikalije in reagente smo do uporabe shranili na ledu. Skupni volumen reakcijske mešanice smo predhodno izračunali glede na število analiziranih vzorcev. Reakcijska mešanica za en vzorec (25 µl) je vsebovala:

- 5 µl 5-kratnega pufra GoTaq flexi (Promega, Madison, ZDA),
- 4 µl MgCl₂ (25 mM) (Promega, Madison, ZDA),
- 1 µl začetnega oligonukleotida M13 (100 µM) (Integrated DNA technologies, ZDA),
- 0,25 µl dNTP (10 mM) (Thermo scientific, Waltham, ZDA),
- 0,1 µl GoTaq DNA-polimeraze (5 U/µl) (Promega, Madison, ZDA),
- 2 µl testne DNA,
- 11,75 µl H₂O.

3.2.6 Reagenti za izvedbo agarozne gelske elektroforeze

3.2.6.1 Agarozni gel

210 ml 1,8 % agaroznega gela smo pripravili po naslednjem postopku:

- v stekleničko smo zatehtali 3,78 g agaroznega gela in dolili 210 ml 1-kratnega TRIS-acetatnega pufra (TAE),
- raztopino smo segrevali v mikrovalovni pečici do popolne bistrosti,
- raztopino smo ohladili in vlili v modelček z glavnikom,
- ko se je gel strdil smo glavniček odstranili.

3.2.6.2 Ostale kemikalije

Ostali potrebni reagenti za izvedbo agarozne gelske elektroforeze so bili:

- pufer TAE,
- agarosa (Sigma Chemical, St. Louis, ZDA),
- barvilo Sybr Safe (Invitrogen, Oregon, ZDA),
- molekularni označevalec pomnožkov DNA – velikosti 1000 bp (Fermentas, Litva).

3.2.7 Reagenti za pomnoževanje *16S rDNA* z metodo PCR

3.2.7.1 Reakcijska mešanica za PCR

Reakcijsko mešanico smo pripravili v sterilnih pogojih, pri tem smo uporabili rokavice. Vse potrebne kemikalije in reagente smo do uporabe shranili na ledu. Skupni volumen reakcijske mešanice smo predhodno izračunali, glede na število analiziranih vzorcev. Reakcijska mešanica za en vzorec (50 µl) je vsebovala:

- 10 µl 5-kratnega pufra GoTaq z $MgCl_2$ (Promega, Madison, ZDA),
- 0,25 µl začetnega oligonukleotida 27f (100 µM) (Sigma Chemical, St. Louis, ZDA),
- 0,25 µl začetnega oligonukletida 1495R (100 µM) (Sigma Chemical, St. Louis, ZDA),
- 0,5 µl dNTP (10 mM) (Thermo scientific, Walthman, ZDA),
- 0,25 µl GoTaq DNA-polimeraze (5 U/µl) (Promega, Madison, ZDA),
- 2 µl testne DNA,
- 36,75 µl H_2O .

3.2.7.2 Reagenti za čiščenje pomnožkov PCR

Za čiščenje pomnožkov PCR smo uporabili komercialni set Wizard® SV gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, ZDA). Pomnožke smo spirali z raztopino Membrane Wash Solution, z 95 % etanolom in Nuclease-Free Water.

3.3 METODE

3.3.1 Kvantifikacija bakterij s štetjem na ploščah

3.3.1.1 Priprava vzorcev za mikrobiološko analizo

Vzorci humanega mleka so bili od prevzema do analize shranjeni v zamrzovalniku, pri temp. – 80 °C. Tajanje je potekalo pri sobni temperaturi, v mikrobiološki komori. Pred analizo smo zabeležili podatke vzorca (oznako matere, datum odvzema mleka, datum analize), njegovo barvo in količino. Na električnem mešalniku smo vsebino lončka dobro premešali, da smo zagotovili homogenost.

3.3.1.2 Razredčevanje po Kochu

Vzorci smo razredčevali v ¼ Ringerjevi raztopini do tiste razredčitve, pri kateri smo po nacepljanju in inkubaciji dobili števne plošče, od 10 do 300 kolonij.

3.3.1.3 Nacepljanje vzorcev na selektivna gojišča in inkubacija

0,1 ml vzorca ustrezne razredčitve smo nacepili na gojišča MRS, TOS z mupirocinom, ROGOSA, M17, BHI in URI. Inkubacija je potekala:

- anaerobno, pri temp. 37 °C, 4 dni za gojišča: MRS, TOS z dodatkom mupirocina in ROGOSA,
- aerobno, pri temp. 37 °C, 2 dni za gojišča: M17, BHI in URI.

3.3.1.4 Ugotavljanje števila mikroorganizmov

Po inkubaciji smo vidne kolonije prešteli s pomočjo elektronskega števca. Upoštevali smo pravilo, da so števne plošče tiste, ki vsebujejo od 10 do 300 kolonij. Število kolonijskih enot (KE) v ml humanega mleka smo izračunali po sledeči formuli (Jeršek, 2011):

$$N = \frac{\Sigma C}{(n_1 + 0,1 \times n_2) \times R} \quad \dots(1)$$

Legenda:

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

$\sum C$vsota vseh kolonij na števni plošči,

n_1število plošč prve razredčitve,

n_2število plošč druge razredčitve,

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

3.3.2 Morfološki pregled kolonij s svetlobnim mikroskopom

Za natančnejši pregled morfologije bakterij, zraslih na gojišču ROGOSA, smo uporabili metodo barvanja po Gramu. Na osnovi barvanja lahko bakterije razdelimo po Gramu pozitivne ali negativne. Kolonijo iz gojišča ROGOSA smo razmazali na objektno steklo, jo posušili na zraku in fiksirali nad ognjem. Preparat smo obarvali po protokolu, najprej s kristal-vijoličnim barvilom, nato z lugolovo raztopino. V celicah je prišlo do tvorbe kristalov in nastanka netopnega kompleksa kristalno-vijoličnega barvila z lugolom. Odvečno barvilo smo sprali z mešanico etanola in acetona, ki je razbarvala po Gramu negativne bakterije. Ob dodatku barvila safranin pa so se le te obarvale rožnato, medtem ko so po Gramu pozitivne bakterije ostale modro-vijolične barve (Smole Možina, 2000). Natančnejši potek postopka barvanja po Gramu je predstavljen v Preglednici 3.

Preglednica 3: Postopek barvanja po Gramu

Postopek	Čas (min)
nanos barvila kristal-vijolično	1
spiranje z vodo	
nanos barvila lugol	1
spiranje z vodo	
nanos mešanice aceton-etanol	1
spiranje z vodo	
nanos barvila safranin	1
spiranje z vodo	

Barvni preparat smo mikroskopirali s svetlobnim mikroskopom, pri 1000-kratni povečavi, ob predhodnem nanosu imerzijskega olja.

3.3.3 Genotipizacija izbranih izolatov z metodo RAPD

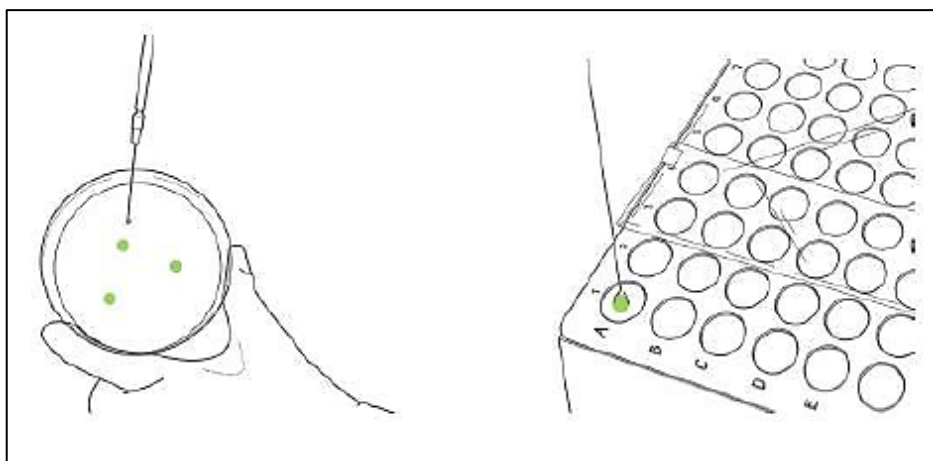
3.3.3.1 Osamitev laktobacilov

Pri izbranih 11-ih materah smo pregledali po 10 kolonij, ki so zrastle po nacepljanju vzorcev mleka L (5 kolonij) in mleka D (5 kolonij) na gojišču ROGOSA, z metodo RAPD.

Kolonije smo namnožili v mikroeprevetah, v tekočem bujonu MRS s cisteinom. Po inkubaciji smo kulture centrifugirali, odlili in zavrgli supernatant, usedlino z bakterijami pa shranili v tekočem gojišču MRS z glicerolom, v zamrzovalniku, pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Kasneje smo kulture odtalili in razmazali na novo gojišče ROGOSA ter po inkubaciji na anaerobnih pogojih (3 dni, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$) po eno kolonijo gojišča uporabili za osamitev DNA s setom Smart Helix[®] EZextract.

3.3.3.2 Izolacija genomske DNA iz kolonij

Za izolacijo DNA iz kolonije smo uporabili komercialen set Smart Helix[®] EZextract. Omenjeni set vsebuje mikrotitersko ploščo s 96 luknjicami in mešanico reagentov za izolacijo DNA. Izolacija DNA je potekala v aseptičnih pogojih. Kot je prikazano na Sliki 6, smo v posamezno luknjico mikrotiterske plošče prenesli po eno kolonijo iz gojišča ROGOSA ter premešali z mešanico reagentov.



Slika 6: Prikaz postopka prenosa posamezne kolonije v mikroepreveto (Smart Helix[®] EZextract, 2013)

Ko smo prenesli vseh 96 kolonij, smo ploščo pokrili in zalepili s priloženo folijo. Ploščo smo vstavili v aparaturo za PCR (Mastercycler Gradient, Eppendorf) ter termično obdelali pri $99\text{ }^{\circ}\text{C}/15\text{ min}$, nato pa ohladili na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zaradi visoke temperature je prišlo do poškodb bakterijskih celic, zato so se nukleinske kisline sprostile. S centrifugiranjem (10 min, $22\text{ }^{\circ}\text{C}$, 3000 RPM) smo DNA ločili od preostalega celičnega materiala. Supernatant z izolirano DNA smo prenesli v sterilno mikroepreveto in do nadaljnje analize shranili v zamrzovalniku, pri temp. $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3.3.3 Metoda RAPD PCR

Metoda RAPD PCR temelji na pomnoževanju naključnih predelov DNA, z uporabo poljubnih (nespecifičnih) začetnih oligonukleotidov, v verižni reakciji s polimerazo (PCR).

Tehnika omogoča razlikovanje genetsko različnih sevov, tudi znotraj iste bakterijske vrste, z uporabo začetnih oligonukleotidov, dolgih pod 10 bp. Pogoj pomnoževanja je, da se začetni oligonukleotid veže na nasproti si orientirani mesti prileganja, ki sta si dovolj blizu. Rezultat pomnoževanja so fragmenti RAPD, ki izvirajo iz različnih genomskih regij tarčne DNA. Pomnožene fragmente ločimo z elektroforezo na agaroznem gelu (Li in sod., 2009).

Za analizo smo izbrali univerzalni začetni oligonukleotid M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3') (Torriani in sod., 1999).

Uporabili smo reakcijsko mešanico, ki smo jo za vse vzorce skupaj pripravili po postopku, ki je opisan v poglavju 3.2.5.2. Skupno pripravljeno reakcijsko mešanico za 93 vzorcev smo premešali in razdelili v mikroeprovete za PCR.

V reakcijo RAPD smo vključili tudi negativno kontrolo, ki je vsebovala reakcijsko mešanico za izvedbo RAPD, namesto DNA vzorca pa smo dodali sterilno vodo. Mikroeprovete smo prenesli v aparaturo za PCR (Mastercycler Gradient, Eppendorf) in izbrali program za RAPD (Preglednica 4), z začetnim oligonukleotidom M13.

Preglednica 4: Program za analizo RAPD, z začetnim oligonukleotidom M13 (Torriani in sod., 1999)

Reakcija	Parametri	Število ciklov
začetek	95 °C, 5 min	1
denaturacija	95 °C, 1 min	40
prileganje	45 °C, 20 s	
podaljševanje	72 °C, 2 min	
zaključek	72 °C, 5 min	1

3.3.3.4 Agarozna gelska elektroforeza

Pomnožke DNA, ki smo jih pridobili z metodo RAPD PCR, smo ločili z agarozno gelsko elektroforezo (AGE). AGE je fizikalno kemijska metoda, ki ločuje fragmente DNA po njihovi velikosti. Zaradi negativne nabitosti potuje molekula DNA v električnem polju od anode h katodi. Krajši kot je fragment DNA, hitreje in dlje bo potoval skozi pore gela. Na hitrost potovanja fragmenta vplivata tudi koncentracije gela in napetost v električnem polju. Čim nižja je koncentracija agaroze oz. čim višja je napetost električnega polja, hitreje bo molekula DNA potovala (Brown T. A. in Brown K. A., 2003).

Pripravljen agarozni gel smo prenesli v posodo za elektroforezo, napolnjeno s pufrom TAE. Pri tem smo pazili, da je pufer v celoti prekril površino gela. Odstranili smo glavnik, pri tem pa so nastali žepki, kamor smo nanašali pomnožke PCR. V prvi in zadnji žepok smo nanekali molekularni označevalec velikosti 1000 bp. Elektroforeza je potekala 60 min,

pri 90 V. Po končanem postopku smo gel 30 do 45 min barvali v raztopini Sybr Safe (10,000-kratne koncentracije). Gel smo pregledali z 12-bitno CCD kamero, pri UV svetlobi, s pomočjo sistema za dokumentacijo gelov in analizo slik Syngene Chemigenius2.

3.3.4 Pomnoževanje dela 16S rDNA z metodo PCR

Z metodo PCR smo pomnoževali del 16S rDNA. Matrično DNA je predstavljala genomska DNA, ki smo jo izolirali iz kolonij, zrastlih na gojišču ROGOSA. Uporabili smo vrstno specifična začetna oligonukleotida 27f in 1495R (Yu in sod., 2011).

Reakcijsko mešanico za PCR, ki smo jo za vse vzorce skupno pripravili po postopku opisanem v poglavju 3.2.7.1, smo premešali in razdelili v mikroepruvete za PCR, po 50 µl.

Vzorce smo vstavili v aparaturo za PCR in izbrali ustrezen program, ki je prikazan v Preglednici 5.

Preglednica 5: Program za pomnoževanje dela 16S rDNA z analizo PCR (Yu in sod., 2011)

Reakcija	Parametri	Število ciklov
začetek	95 °C, 3 min	1
denaturacija	95 °C, 1 min	40
prileganje	59 °C, 1 min	
podaljševanje	72 °C, 2 min	
zaključek	72 °C, 5 min	1

3.3.4.1 Čiščenje pomnožkov PCR

Pomnožke DNA, ki smo jih pridobili z metodo PCR, smo očistili po navodilih proizvajalca Promega (ZDA), s komercialnim setom »Wizard® SV gel and PCR Clean-Up System«. Pomnožke smo prenesli v kolono, vstavljeno v zbirno mikroepruveto, inkubirali 1 minuto na sobni temp., nato pa centrifugirali (1 min, 20 °C, 14000 RPM). Tekočino v zbirni mikroepruveti smo zavrgli, kolono pa sprali z »Membrane Wash Solution«, centrifugirali ter postopek še enkrat ponovili. Nato smo kolono prenesli v novo mikroepruveto in dodali »Nuclease-Free Water« ter inkubirali na sobni temp. 1 minuto. Po ponovnem centrifugiranju smo kolono zavrgli, mikroepruvete s prečiščeno DNA pa shranili v zamrzovalniku, na temp. –20 °C.

Pred nanosom pomnožkov na agarozni gel smo dodali 2 µl 6-kratnega DNA nalagalnega pufra, ki vsebuje barvilo za DNA (0,25 % bromfenol modro, 0,25 % xylen-cianol, 30 %

vodna raztopina glicerola). Prečiščene pomnožke DNA smo pregledali z agarozno gelsko elektroforezo, kot je opisano v poglavju 3.3.3.4.

3.3.4.2 Sekvenciranje in analiza nukleotidnih zaporedij

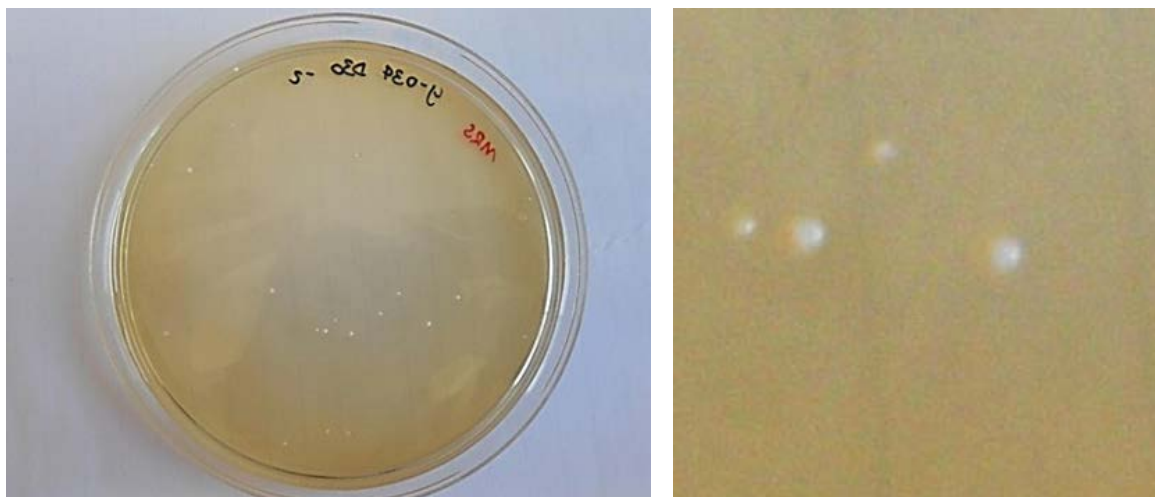
Prečiščeno DNA smo poslali v laboratorij Microsynth Avstrija (Dunaj), kjer so opravili analizo nukleotidnega zaporedja. Dobljena zaporedja nukleotidov smo s pomočjo programskega orodja BLAST (NCBI, 2013) primerjali s tistimi, ki so na voljo v genski banki NCBI (National Center for Biotechnology Informations, Rockville Pike, Bethesda, ZDA).

4 REZULTATI

4.1 MAKROMORFOLOŠKE LASTNOSTI KOLONIJ

4.1.1 Gojišče MRS

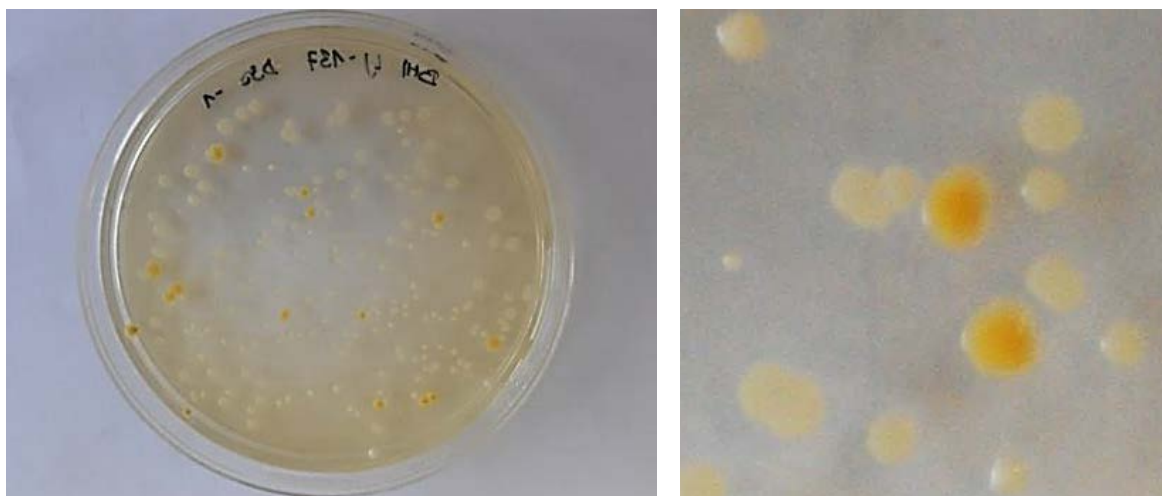
Kolonije, zrastle na gojišču MRS, so bile točkaste oblike, bele barve, izbočene, z gladko površino in s sijajem, premera do 1 mm. Na Sliki 7 je prikazan tipičen izgled kolonij, ki so prevladovali v vzorcih mleka. Gojišče MRS je prilagojeno za rast laktobacilov, vendar ker je le delno selektivno, zaradi natrijevega acetata oziroma nižje vrednosti pH (5,7), ni izključeno, da na njem zrastejo tudi bakterije drugih rodov, vendar predvsem predstavnice mlečnokislinskih bakterij.



Slika 7: Kolonije bakterij iz humanega mleka na gojišču MRS

4.1.2 Gojišče BHI

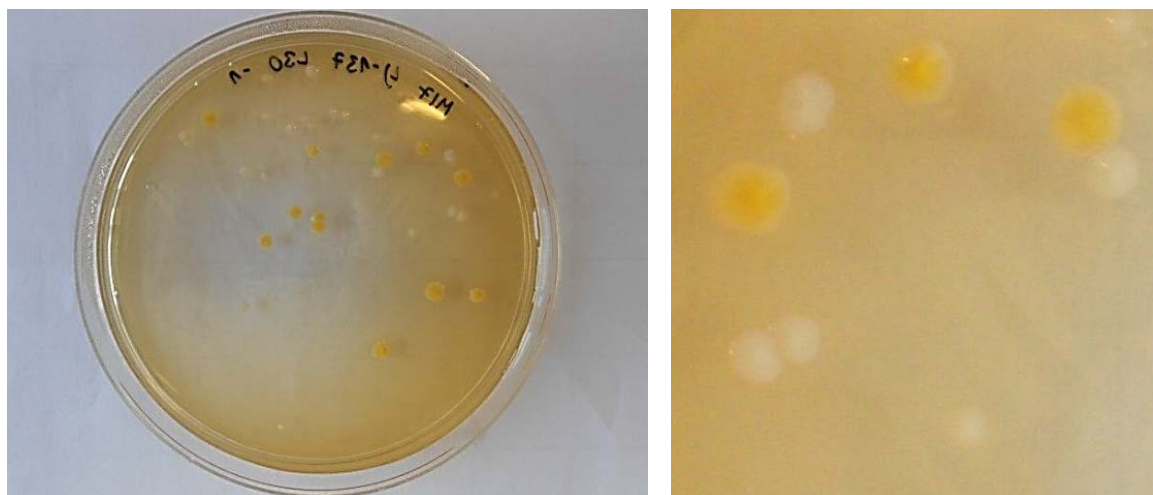
Na gojišču BHI so zrastle predstavnice mezofilne, aerobne mikrobiote humanega mleka. Po izgledu so bile izbočene, nepravilno okrogle oblike, bež ali oker barve, s svetlejším robom in s sijajem površine ter s popkasto dvignjenim vrhom, premera 2–5 mm (Slika 8).



Slika 8: Kolonije mezofilnih aerobnih bakterij iz humanega mleka na gojišču BHI

4.1.3 Gojišče M17

Gojišče M17 je prilagojeno za rast laktokokov in enterokokov, vendar ker ni selektivno, na njem zrastejo tudi bakterije drugih rodov. Po izgledu so bile kolonije izbočene, nepravilne okrogle oblike, bele ali rumeno-okere barve, s svetlejším robom in s sijajem površine ter s popkasto izbočenim vrhom, premera 2–5 mm (Slika 9).

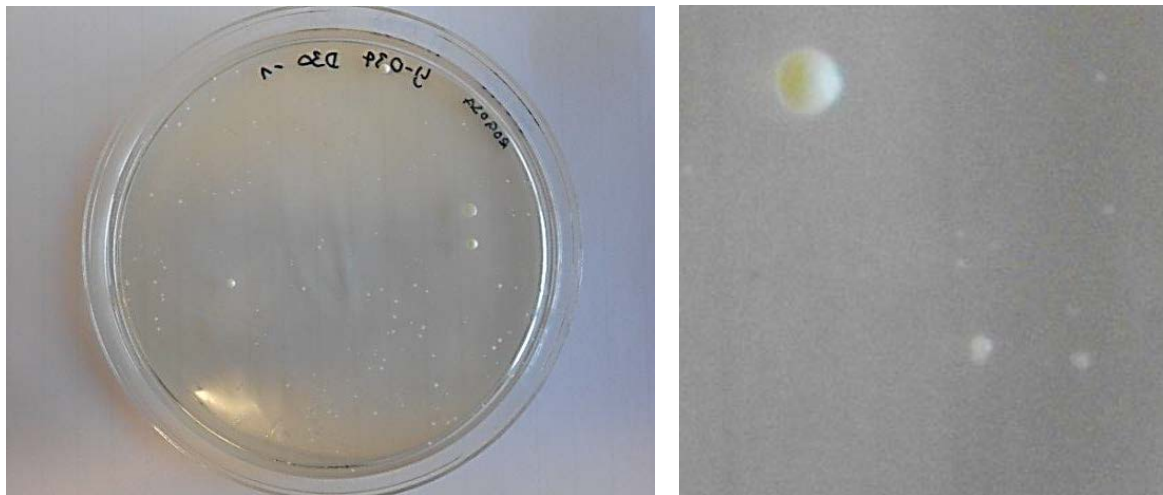


Slika 9: Kolonije bakterij iz humanega mleka na gojišču M17

4.1.4 Gojišče ROGOSA

Kolonije bakterij iz humanega mleka na gojišču ROGOSA (Slika 10) so bile izbočene, okrogle oblike, bele barve in s sijajem površine, dveh velikosti: točkaste – premera do 1 mm ali večje, premera do 5 mm. ROGOSA je selektivno gojišče za laktobacile.

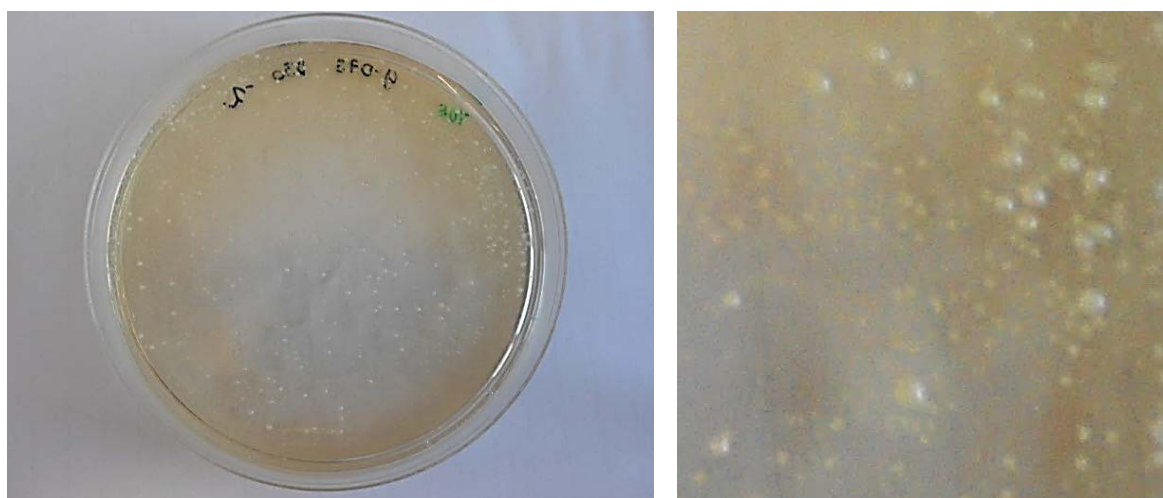
Selektivna dejavnika v tem gojišču sta očetna kislina in nizka vrednost pH (5,5), kar pa ne zagotavlja, da na gojišču ne zrastejo tudi posamezni predstavniki drugih rodov.



Slika 10: Kolonije bakterij iz humanega mleka na gojišču ROGOSA

4.1.5 Gojišče TOS z dodatkom mupirocina

Za nacepljanje bifidobakterij iz mleka smo uporabili selektivno gojišče TOS z dodatkom mupirocina. Izrasle kolonije so bile po izgledu pravilne okrogle oblike in s sijajem površine. Glede na velikost smo ločili majhne in točkaste, oker kolonije, premera do 1 mm ali večje in bele kolonije, s premerom do 3 mm (Slika 11).



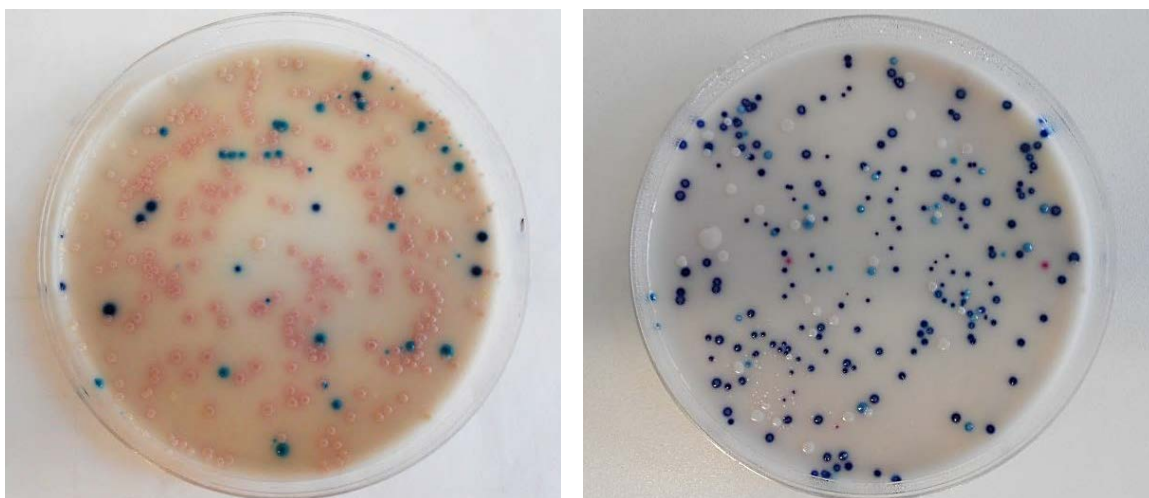
Slika 11: Kolonije bifidobakterij iz humanega mleka na gojišču TOS z dodatkom mupirocina

4.1.6 Gojišče URI

Na kromogenem gojišču URI (Slika 12) smo glede na različno obarvanje kolonije ugotavljali število kolonijskih enot naslednjih bakterijskih skupin:

- temno roza do rdeča barva – *E. coli*: kolonije so bile pravilne okrogle oblike, s svetlejším blede roza robom ter z motno površino, premera do 2 mm;
- turkizno modra barva – *Enterococcus* sp.: kolonije so bile okrogle oblike, z izbočenim vrhom, ter s temnejšim motnim robom in s sijajem površine, velikosti do 2 mm;
- rumeno-zlata barva – *Staphylococcus aureus*: kolonije so bile točkaste in s sijajem površine ter s premerom do 1 mm;
- bela barva – *Staphylococcus epidermidis*: kolonije so bile okrogle oblike, s sijajem površine in z gladkim robom, premera do 4 mm;
- metalno-modra barva – *Enterobacter* sp., *Klebsiela* sp. in *Citrobacter* sp.: kolonije so bile okrogle oblike, s sijajem in s svetlejším, motnim robom, premera do 4 mm.

Na gojišču URI zrastejo tudi drugi predstavniki rodov *Staphylococcus*, *Streptococcus* in ostalih bakterij, ki pa jih ni mogoče selektivno šteti po barvi.



Slika 12: Kolonije bakterij iz humanega mleka na gojišču URI

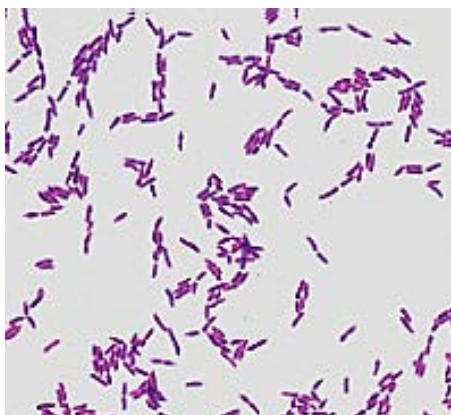
4.2 MAKROMORFOLOŠKE LASTNOSTI KOLONIJ IN MIKROMORFOLOŠKE LASTNOSTI LAKTOBACILOV

Pet različnih kolonij iz gojišča ROGOSA smo prečistili in mikroskopsko pregledali njihovo morfologijo. Izbrane kolonije gojišča ROGOSA so bile različnih oblik:

- okrogle, točkaste kolonije, smetanove barve, z gladkim robom in s sijajem površine, velikosti 1 mm;
- okrogle kolonije, smetanaste barve, z gladkim robom in brez sijaja površine, velikosti do 3 mm;
- prozorne, motne kolonije s črno piko, nepravilne oblike in s premerom do 5 mm.

Po postopku barvanja po Gramu smo preparate mikroskopirali pri 1000-kratni povečavi, s svetlobnim mikroskopom, po predhodnem nanosu imerzijskega olja.

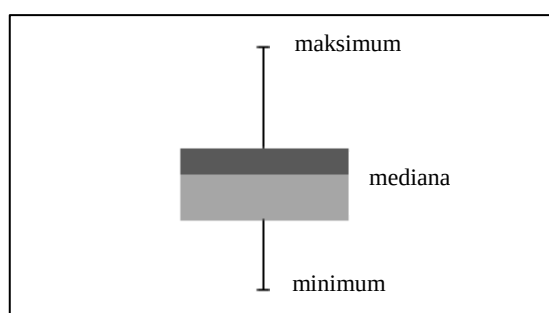
Bakterije, vseh petih mikroskopskih preparatov, so bile po Gramu pozitivne (vijolično obarvane) paličice, bodisi dolge ali pa oblike kokobacilov. Sklepamo, da so pripadale različnim sevom rodu *Lactobacillus*. Primer kulture laktobacilov, obarvanih po Gramu, je prikazan na Sliki 13.



Slika 13: Kultura laktobacilov iz kolonije, po postopku barvanja po Gramu (Todar, 2009)

4.3 PRIMERJAVA ŠTEVILA BAKTERIJ V MLEKU LEVE IN DESNE DOJKE

Rezultati primerjave števila bakterij v mleku leve in desne dojke so prikazani v obliki kvantilnih diagramov, ang. »box plot« (Slika 14). Osrednji, pobarvan del grafa ponazarja območje, znotraj katerega se nahaja 50 % vrednosti vzorcev. Meja med svetlim in temnim razdelkom je mediana. To je vrednost, ki se med vsemi nahaja točno na sredini, tako ima 50 % podatkov manjšo in 50 % večjo vrednost. Območje grafa s svetlo-sivim obarvanjem zajema 25 % rezultatov, ki imajo nižjo vrednost od mediane, območje s temno-sivim obarvanjem pa ponazarja tiste vrednosti, ki so za 25 % višje od mediane. Ročaje grafa določata najnižja (minimum) in najvišja (maksimum) vrednost med podatki populacije.



Slika 14: Kvantilni diagram

Vzorcem, katerih število kolonijskih enot je bilo pod mejo detekcije, smo v namene izračuna mediane, pripisali vrednost 50 KE/ml (polovično vrednost meje detekcije, ki je bila 100 KE/ml).

Preglednice in slike, ki sledijo, prikazujejo tabelarično ter grafično primerjavo števila bakterij v mleku leve (L) in desne (D) dojke, ki smo jo pridobili s štetjem kolonij na ustreznih gojiščih.

Slike s ponazoritvijo razlik med mlekom D in L iste matere, v obliki logaritmirane vrednosti KE/ml ($\log D - \log L$), prikazujejo na levi strani vzorce tistih mater, ki so imele višjo koncentracijo bakterij v vzorcu L, in na desni strani tistih, ki so imele višjo koncentracijo bakterij v vzorcu D. Na sredi grafa so vzorci mater, pri katerih se je število bakterij med vzorcema L in D najmanj razlikovalo.

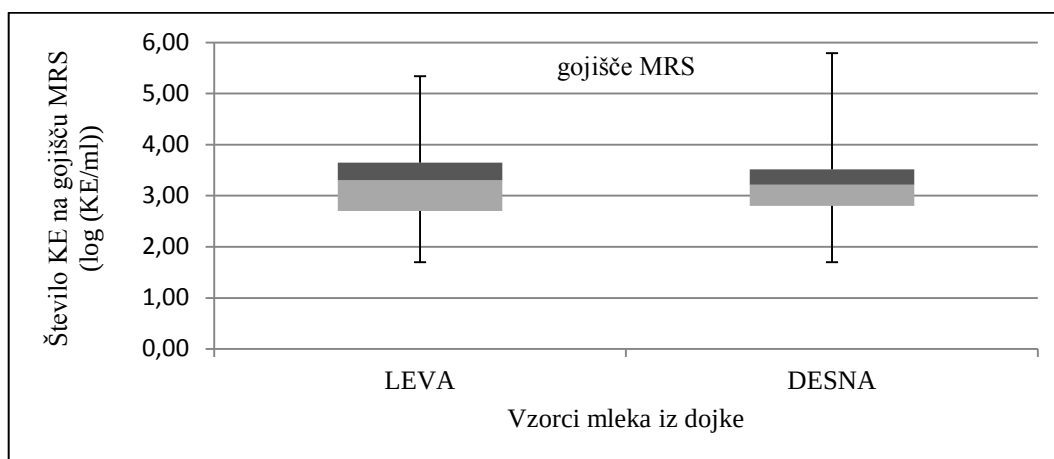
Na slikah frekvenčnih porazdelitev so prikazani razredi, v katere smo uvrstili matere, glede na razliko v številu bakterij med vzorcema mleka L in D ($ABS(\log D - \log L)$).

4.3.1 Gojišče MRS

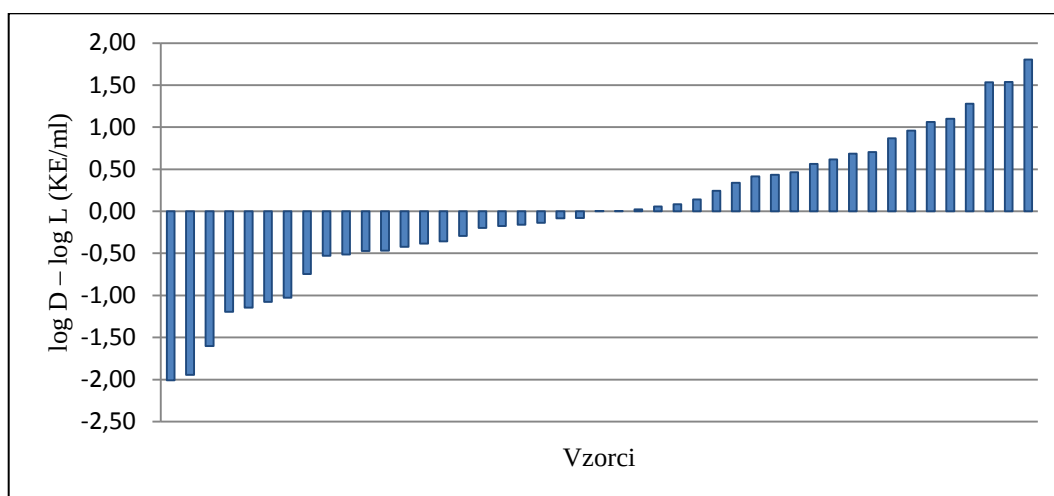
Na gojišču MRS zrastejo predvsem kolonije MKB. V analiziranih vzorcih humanega mleka smo jih ugotovili do $6,2 \times 10^5$ KE/ml. Na podlagi izračuna mediane (Preglednica 6, Slika 15) je razvidno, da ni bilo večjih razlik v številu KE mleka L in D. Če primerjamo rezultate štetja KE MKB v mleku L in D za vsako mamo posebej (Slika 16), pa ugotovimo, da se je koncentracija razlikovala tudi do 2 log vrednosti.

Preglednica 6: Število KE na gojišču MRS

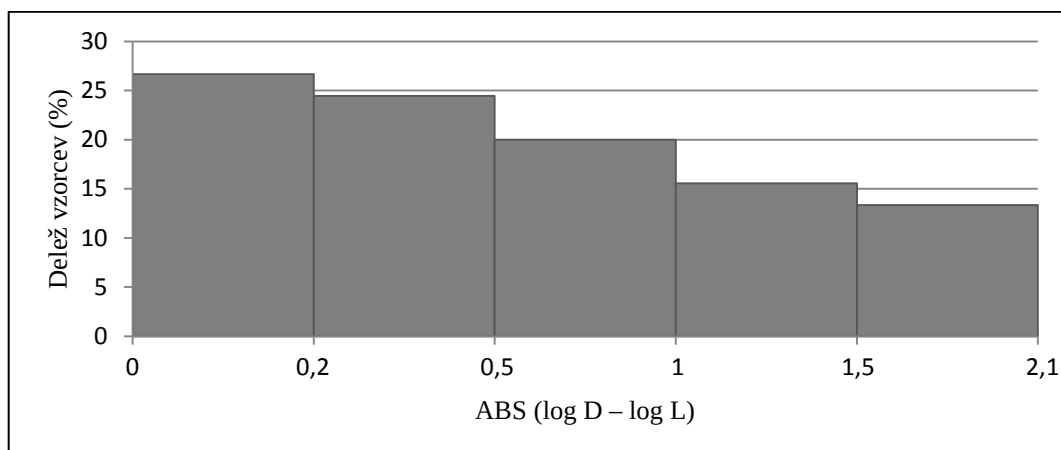
Izvor vzorcev mleka	Število vseh vzorcev	Število vzorcev pod mejo detekcije	Mediana (KE/ml)	Mediana (log (KE/ml))
L	45	2	$2,00 \times 10^3$	3,30
D	45	5	$1,65 \times 10^3$	3,22



Slika 15: Število KE na gojišču MRS (log (KE/ml))



Slika 16: Razlika med mlekom D in L, za gojišče MRS (log (KE/ml))



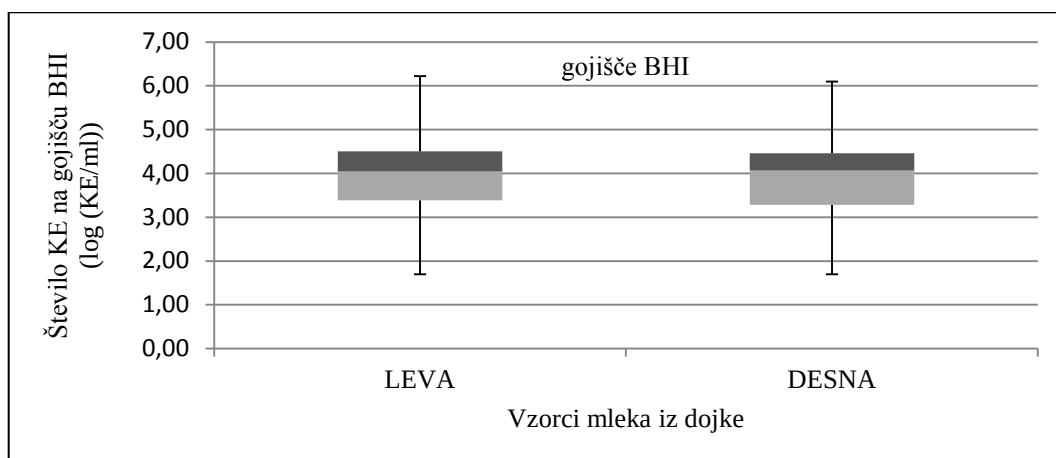
Slika 17: Frekvenčna porazdelitev razlike v številu KE v ml mleka L in D posameznih mater, za gojišče MRS

4.3.2 Gojišče BHI

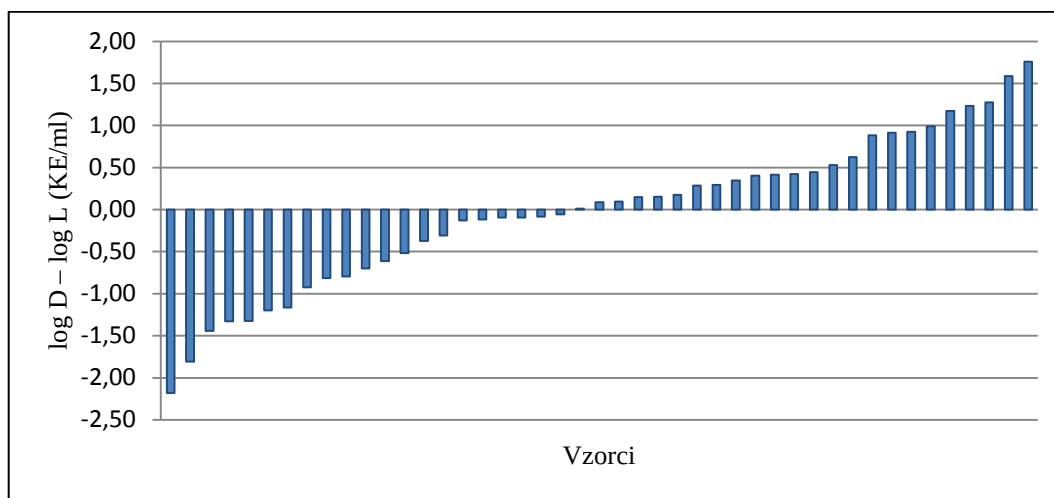
Število KE na gojišču BHI predstavlja koncentracijo mezofilnih aerobnih bakterij v humanem mleku. V analiziranih vzorcih so se omenjene bakterije pojavljale v območju do $1,7 \times 10^6$ KE/ml. Glede na izračunano mediano, razlik v njihovem številu med mlekom L in D nismo ugotovili. Pri primerjavi koncentracije bakterij v vzorcu L in D iste matere (Slika 20), pa se pri več kot 50 % mater le ta razlikuje nad 1 log vrednostjo.

Preglednica 7: Število KE na gojišču BHI

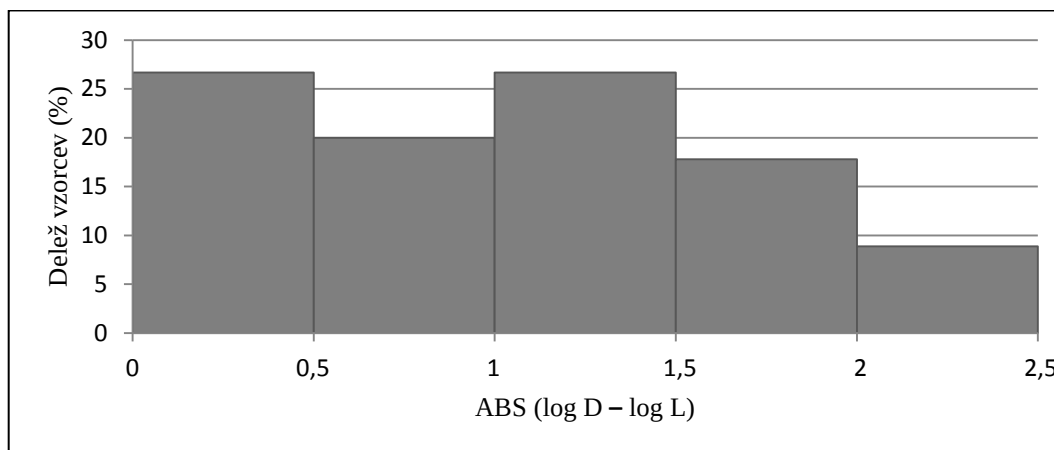
Izvor vzorcev mleka	Število vseh vzorcev	Število vzorcev pod mejo detekcije	Mediana (KE/ml)	Mediana (log (KE/ml))
L	45	3	$1,11 \times 10^4$	4,05
D	45	3	$1,17 \times 10^4$	4,07



Slika 18: Število KE na gojišču BHI (log (KE/ml))



Slika 19: Razlika med mlekom D in L, za gojišče BHI (log (KE/ml))



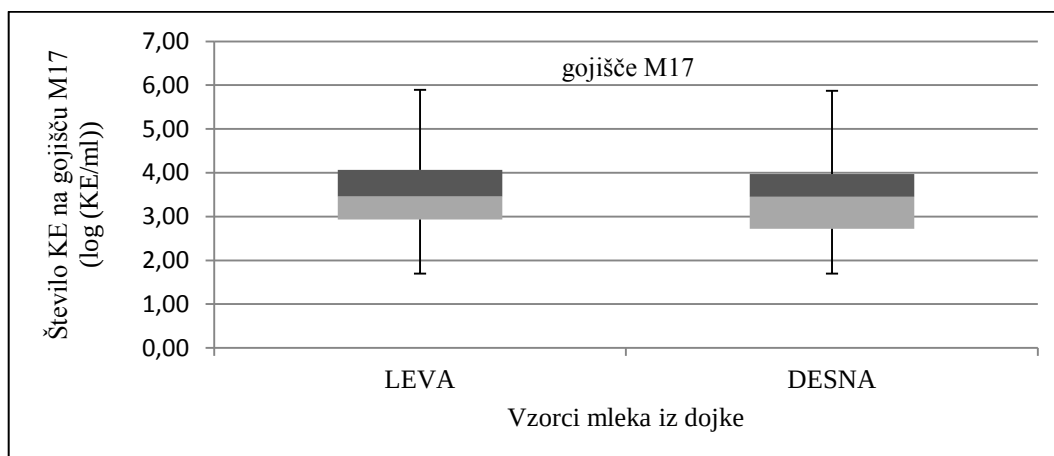
Slika 20: Frekvenčna porazdelitev razlike v številu KE v ml mleka L in D posameznih mater, za gojišče BHI

4.3.3 Gojišče M17

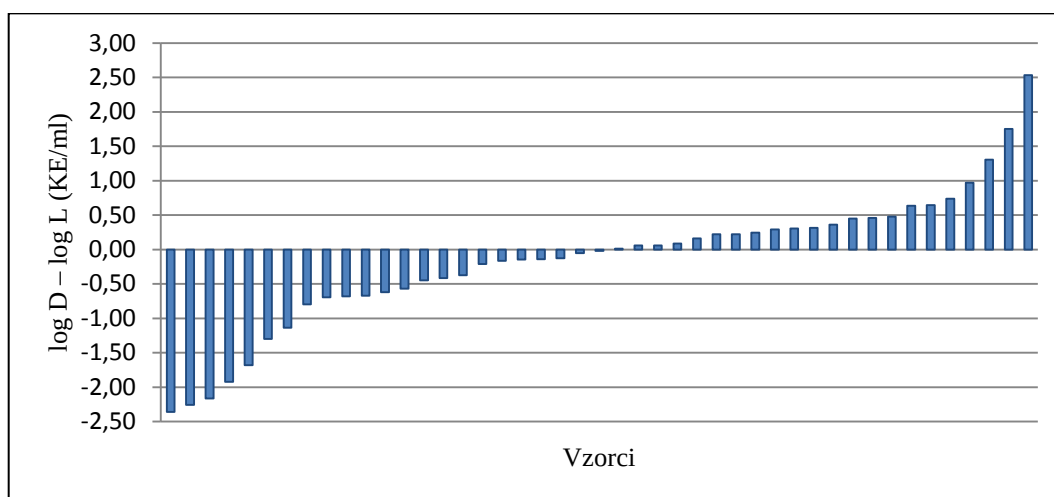
Na gojišču M17, ki je prilagojeno za rast laktokokov in enterokokov, smo ugotovili do $7,7 \times 10^5$ KE/ml. 13 % vzorcev D je vsebovalo število KE pod mejo detekcije. Razlike med vrednostjo mediane mleka L in D ne opažamo. Če primerjamo mleko L in D iste matere, je pri več mamah višje število bakterij ugotovljeno v mleku L. Pri več kot 50 % mater so te razlike v območju do 0,5 log vrednosti.

Preglednica 8: Število KE na gojišču M17

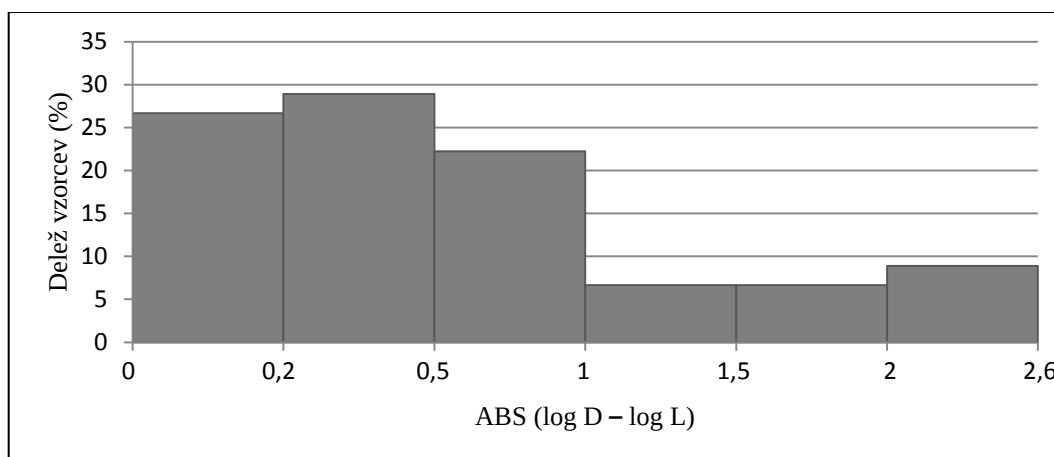
Izvor vzorcev mleka	Število vseh vzorcev	Število vzorcev pod mejo detekcije	Mediana (KE/ml)	Mediana (log (KE/ml))
L	45	1	$2,89 \times 10^3$	3,46
D	45	6	$2,82 \times 10^3$	3,45



Slika 21: Število KE na gojišču M17 (log (KE/ml))



Slika 22: Razlika med mlekom D in L, za gojišče M17 (log (KE/ml))



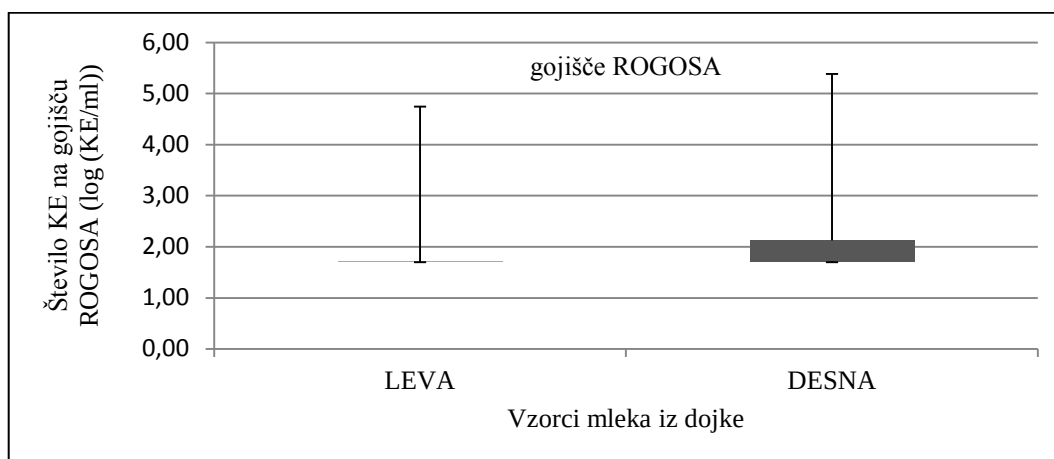
Slika 23: Frekvenčna porazdelitev razlike v številu KE v ml mleka L in D posameznih mater, za gojišče M17

4.3.4 Gojišče ROGOSA

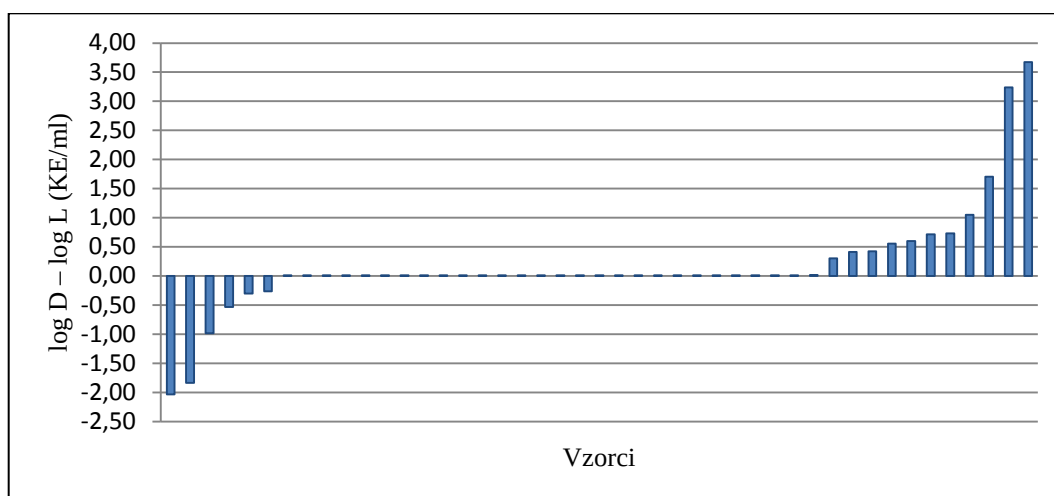
Iz več kot polovice vzorcev mleka, na gojišču ROGOSA, kolonije niso zrastle. Ker smo vzorcem pod mejo detekcije za namene izračuna median pripisali polovično vrednost meje detekcije, je v tem primeru vrednost mediane enaka tej vrednosti. Pri primerjavi vzorca L in D iste matere ugotovimo, da je večje število mater vsebovalo višjo število bakterij v vzorcu mleka D, z razliko v koncentraciji tudi do 3,5 log vrednosti.

Preglednica 9: Število KE na gojišču ROGOSA

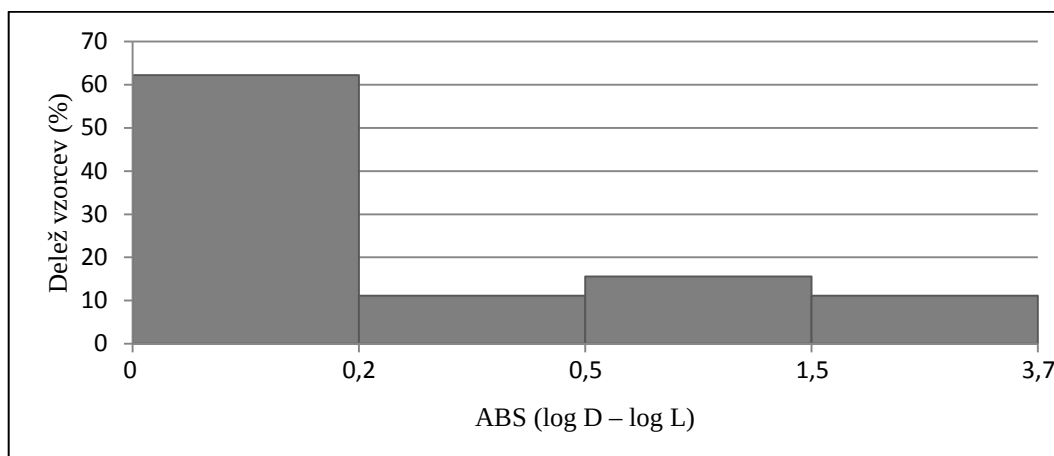
Izvor vzorcev mleka	Število vseh vzorcev	Število vzorcev pod mejo detekcije	Mediana (KE/ml)	Mediana (log (KE/ml))
L	45	35	$5,00 \times 10^1$	1,70
D	45	32	$5,00 \times 10^1$	1,70



Slika 24: Število KE na gojišču ROGOSA (log (KE/ml))



Slika 25: Razlika med mlekom D in L, za gojišče ROGOSA (log (KE/ml))



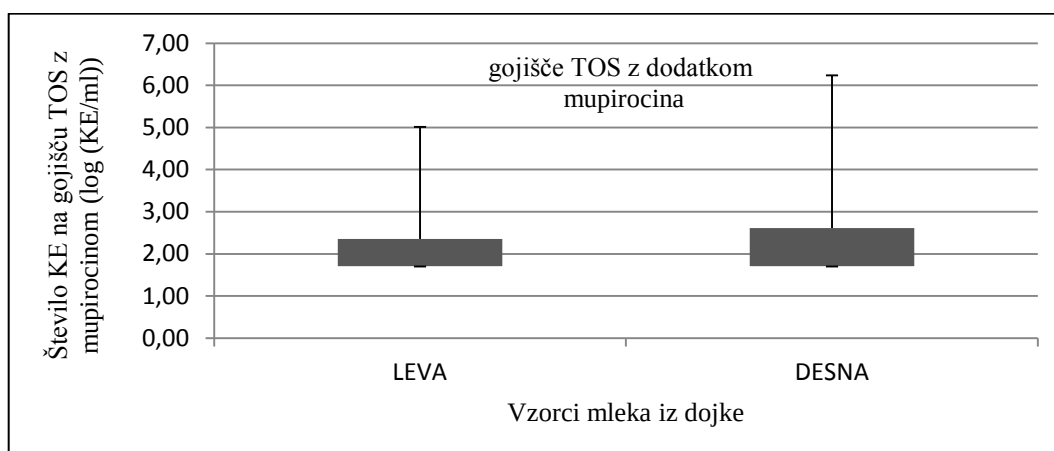
Slika 26: Frekvenčna porazdelitev razlike v številu KE v ml mleka L in D posameznih mater, za gojišče ROGOSA

4.3.5 Gojišče TOS z dodatkom mupirocina

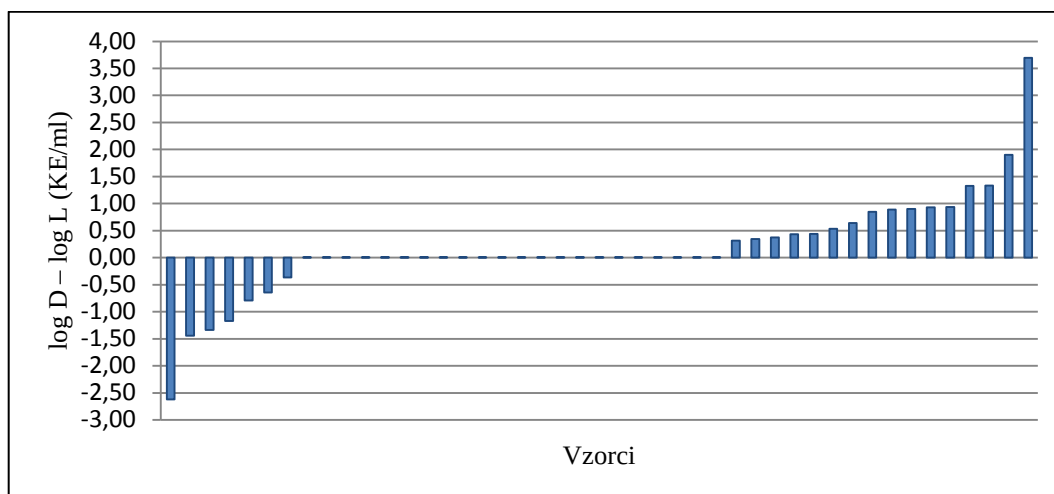
V vzorcih smo ugotovili do $1,7 \times 10^6$ KE/ml bifidobakterij. Več kot polovica vseh vzorcev je vsebovala število bakterij pod mejo detekcije, zato je mediana enaka vrednosti, ki smo jo pripisali vzorcem pod mejo detekcije (polovična vrednost meje detekcije). Če primerjamo vzorec L in D iste mame, se je pri dvakrat več mamah ugotovilo višje število bifidobakterij v mleku D. Pri 60 % vseh mater se razlike v številu bifidobakterij mleka D in L pojavljajo v območju pod 0,5 log vrednosti, kar je znotraj običajnih napak pri metodi štetja.

Preglednica 10: Število KE na gojišču TOS z dodatkom mupirocina

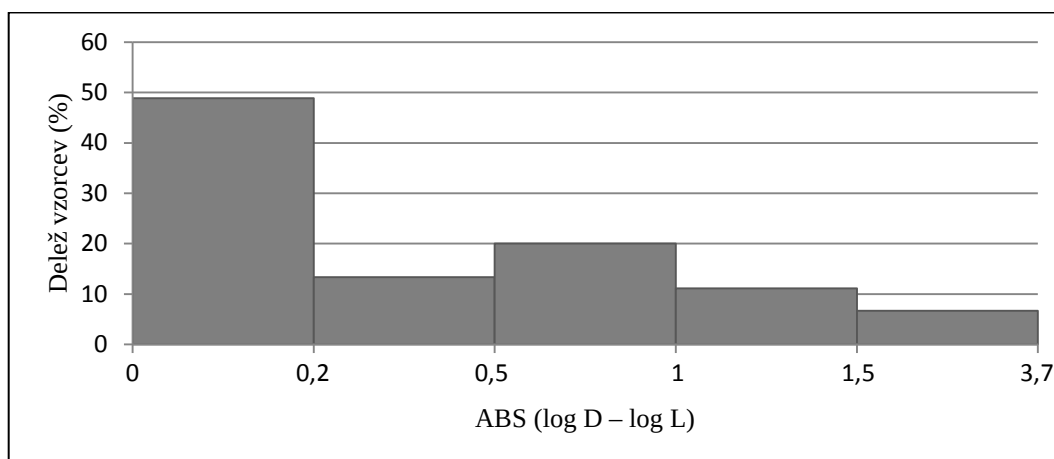
Izvor vzorcev mleka	Število vseh vzorcev	Število vzorcev pod mejo detekcije	Mediana (KE/ml)	Mediana (log (KE/ml))
L	45	30	$5,00 \times 10^1$	1,70
D	45	27	$5,00 \times 10^1$	1,70



Slika 27: Število KE na gojišču TOS z dodatkom mupirocina (log (KE/ml))



Slika 28: Razlika med mlekom D in L, za gojišče TOS z mupirocinom (log (KE/ml))



Slika 29: Frekvenčna porazdelitev razlike v številu KE v ml mleka L in D posameznih mater, za gojišče TOS z mupirocinom

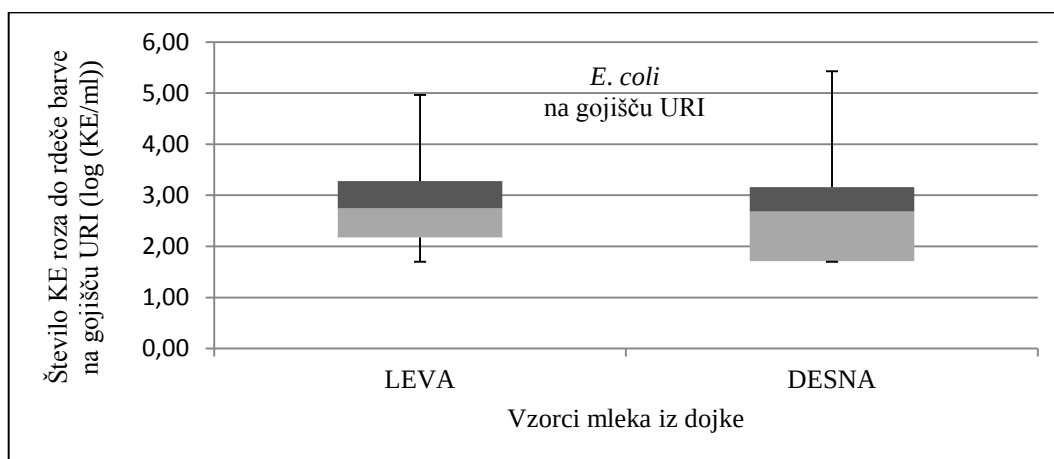
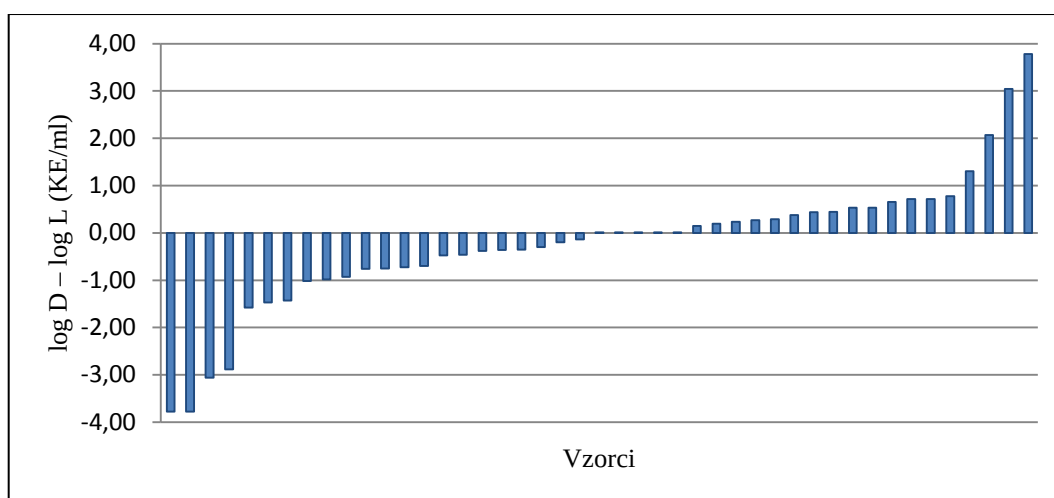
4.3.6 Gojišče URI

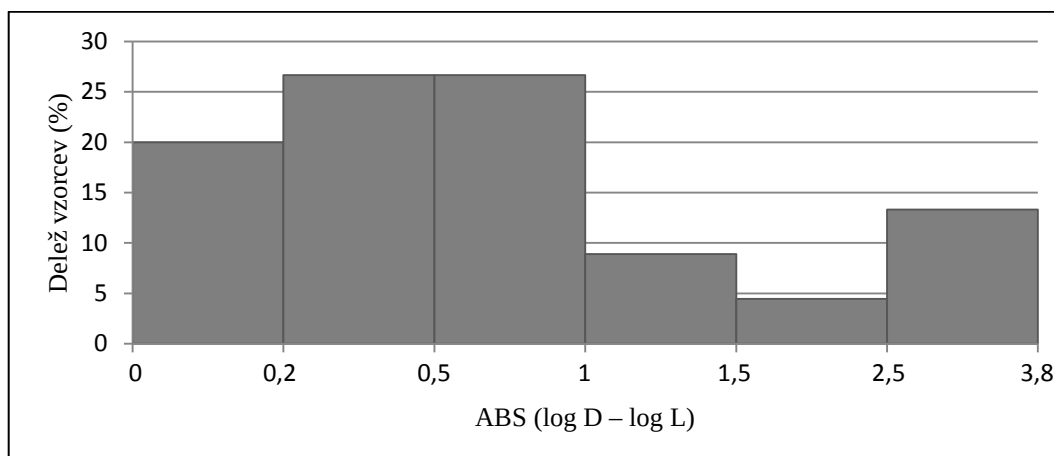
4.3.6.1 Temno roza do rdeče obarvane kolonije – *E. coli*

Temno roza do rdeče obarvanih kolonij, ki najverjetneje pripadajo vrsti *E. coli*, smo ugotovili do 3×10^5 KE/ml. Večjih razlik med medianama mleka L in D, razen da se v mleku D število KE bakterij giblje v večjem razponu, nismo opazili. Razliko pa lahko opazimo pri primerjavi vzorca L in D iste matere. Višje koncentracije bakterij se v tem primeru večkrat pojavljajo v mleku L, prav tako pa se pri več kot 10 % mater pojavljajo razlike med vzorcema L in D, ki so večje od 2,5 log vrednosti.

Preglednica 11: Število KE temno roza do rdeče barve na gojišču URI

Izvor vzorcev mleka	Število vseh vzorcev	Število vzorcev pod mejo detekcije	Mediana (KE/ml)	Mediana (log (KE/ml))
L	45	9	$5,40 \times 10^2$	2,75
D	45	15	$4,55 \times 10^2$	2,67

**Slika 30:** Število KE temno roza do rdeče barve na gojišču URI (log (KE/ml))**Slika 31:** Razlika med mlekom D in L, za temno roza do rdeče kolonije gojišča URI (log (KE/ml))



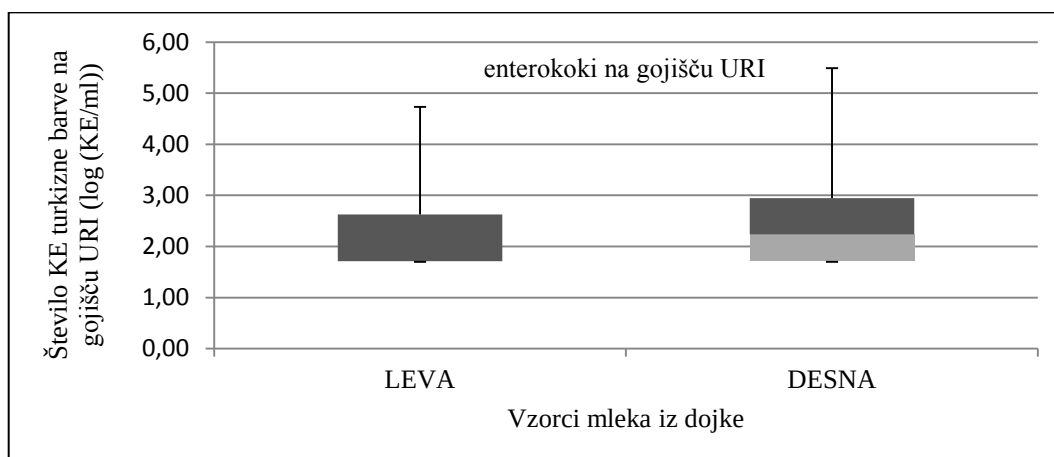
Slika 32: Frekvenčna porazdelitev razlike v številu KE v ml mleka L in D posameznih mater, za roza do rdeče kolonije gojišča URI

4.3.6.2 Turkizno modro obarvane kolonije – *Enterococcus*

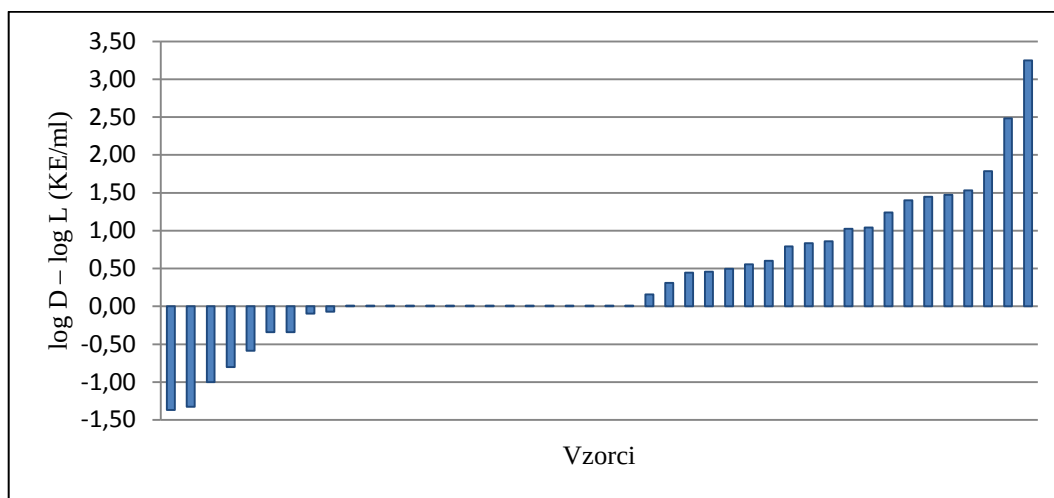
Število KE turkizno modre barve, zrastle na gojišču URI, ki najverjetneje pripadajo rodu *Enterococcus*, je bilo v razponu do $3,0 \times 10^5$ KE/ml. V kar 60 % vzorcev L in 43 % D je bilo število KE pod mejo detekcije. Pri vzorcih mleka D je opazna višja mediana, pa tudi višja maksimalna vrednost. Prav tako je pri 27-ih mamah, od skupno 45-ih, ugotovljeno višje število bakterij v mleku D. Tukaj je razlika med L in D tudi večja od 3 log vrednosti.

Preglednica 12: Število KE turkizno modre barve na gojišču URI

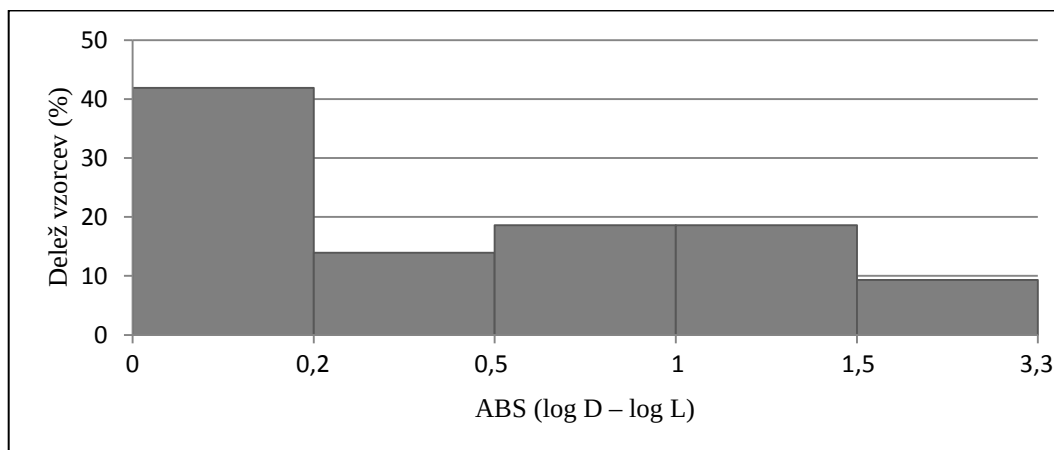
Izvor vzorcev mleka	Število vseh vzorcev	Število vzorcev pod mejo detekcije	Mediana (KE/ml)	Mediana (log (KE/ml))
L	43	26	$5,00 \times 10^1$	1,70
D	43	19	$1,70 \times 10^2$	2,23



Slika 33: Število KE turkizno modre barve na gojišču URI (log (KE/ml))



Slika 34: Razlika med mlekom D in L, za turkizne kolonije gojišča URI (log (KE/ml))



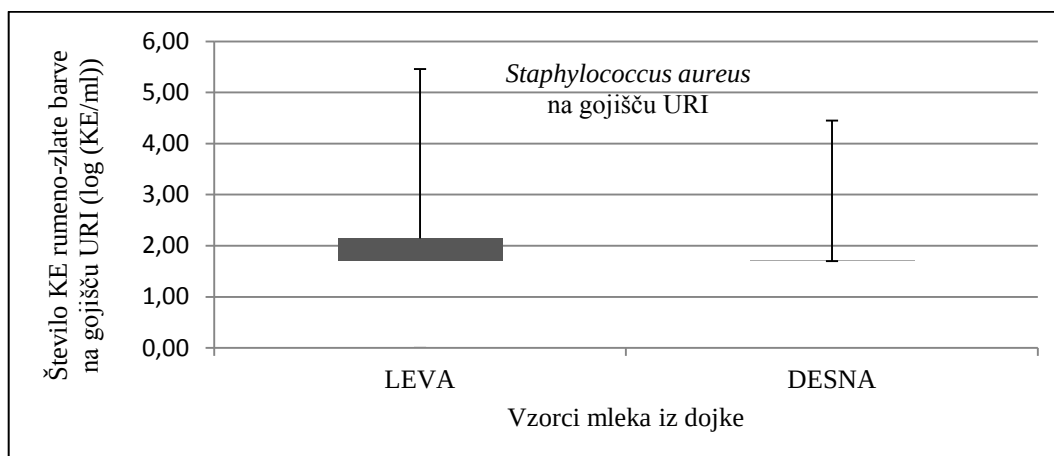
Slika 35: Frekvenčna porazdelitev razlike v številu KE v ml mleka L in D posameznih mater, za turkizne kolonije gojišča URI

4.3.6.3 Rumeno-zlato obarvane kolonije – *Staphylococcus aureus*

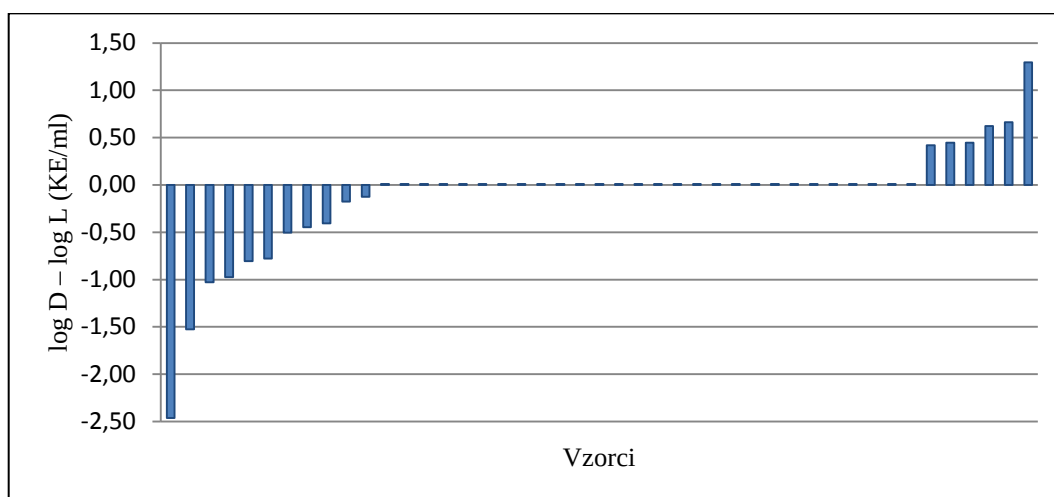
Rumeno-zlato obarvane kolonije gojišča URI pripadajo najverjetneje vrsti *Staphylococcus aureus*. Kot pričakovano je bila koncentracija nizka, saj smo prisotnost ugotovili samo pri 17-ih mamah (12 vzorcev L in 10 vzorcev D), zato je bila tudi mediana enaka polovični vrednosti meje detekcije.

Preglednica 13: Število KE rumeno-zlate barve na gojišču URI

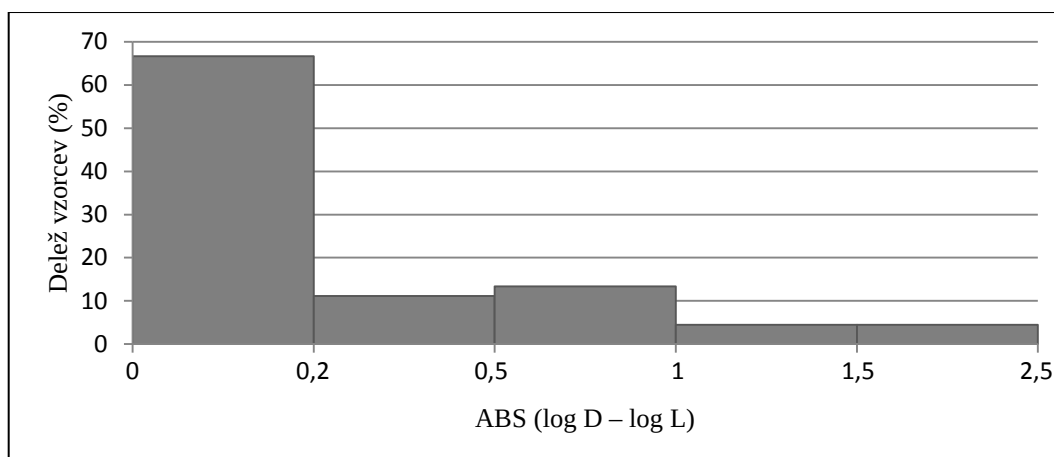
Izvor vzorcev mleka	Število vseh vzorcev	Število vzorcev pod mejo detekcije	Mediana (KE/ml)	Mediana (log (KE/ml))
L	45	33	$5,00 \times 10^1$	1,70
D	45	35	$5,00 \times 10^1$	1,70



Slika 36: Število KE rumene barve na gojišču URI (log (KE/ml))



Slika 37: Razlika med mlekom D in L, za rumene kolonije gojišča URI (log (KE/ml))



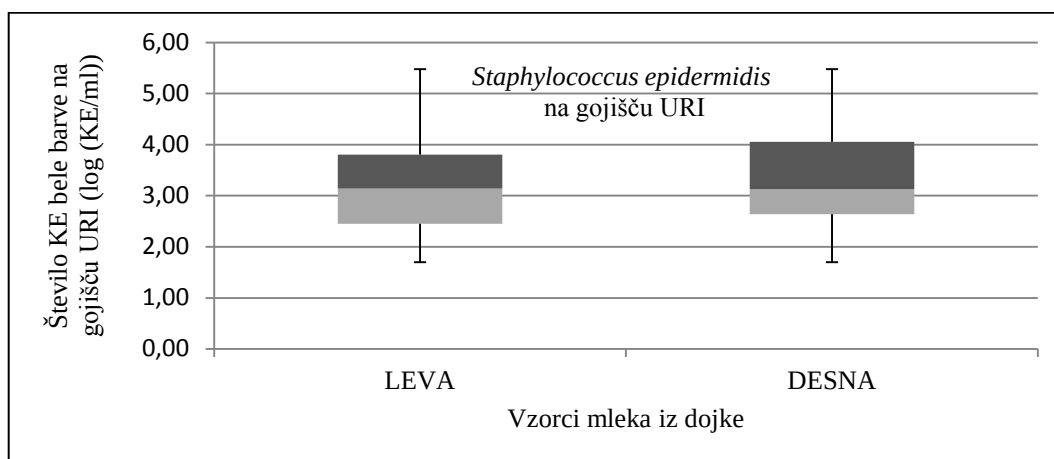
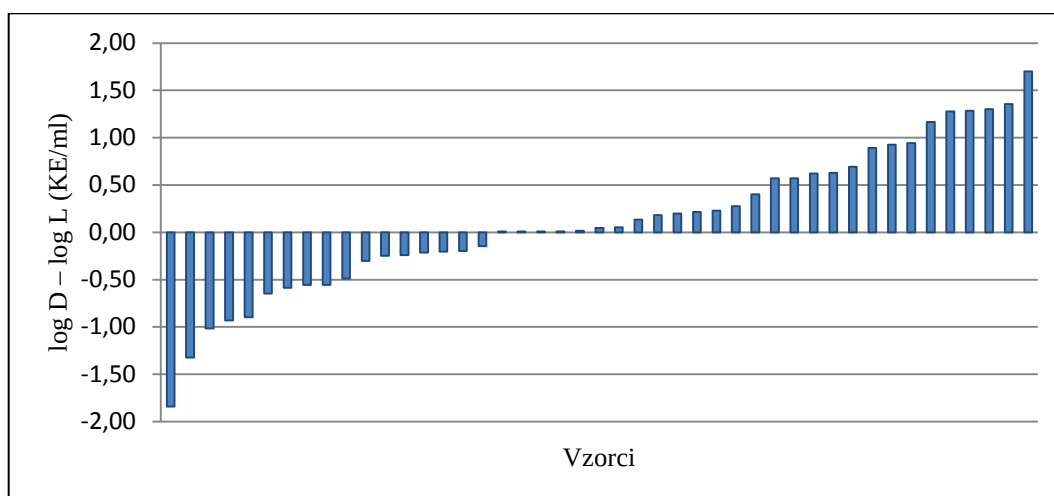
Slika 38: Frekvenčna porazdelitev razlike v številu KE v ml mleka L in D posameznih mater, za rumene kolonije gojišča URI

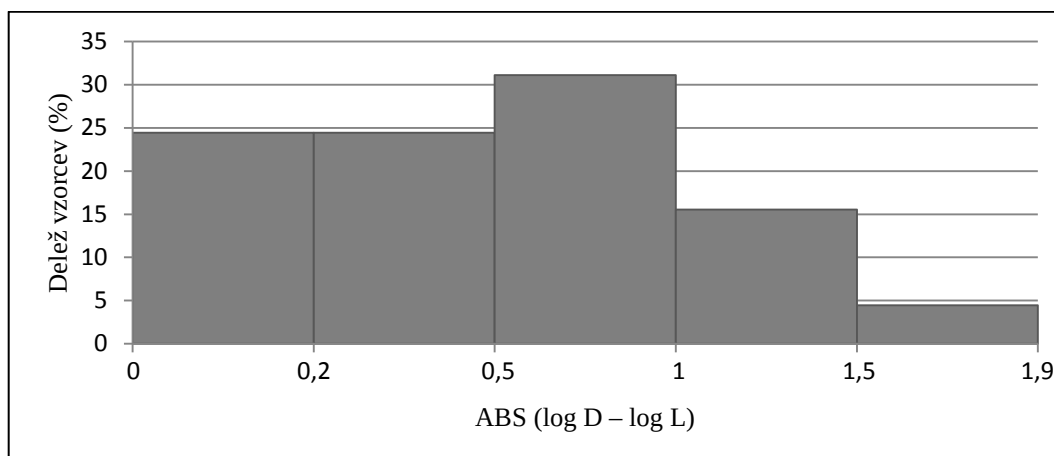
4.3.6.4 Belo obarvane kolonije – *Staphylococcus epidermidis*

Bele kolonije na gojišču URI, ki so najverjetneje pripadale vrsti *Staphylococcus epidermidis*, so se v vzorcih mleka pojavljale v koncentracijah do $3,0 \times 10^5$ KE/ml. Razlike v mediani med vzorci mleka L in D nismo ugotovili. Pri primerjavi razlike v številu bakterij L in D iste matere, pa ugotovimo, da je pri več kot polovicah mater razlika med številom bakterij v vzorcu L in D presegla 0,5 log vrednosti.

Preglednica 14: Število KE bele barve na gojišču URI

Izvor vzorcev mleka	Število vseh vzorcev	Število vzorcev pod mejo detekcije	Mediana (KE/ml)	Mediana (log (KE/ml))
L	45	4	$1,37 \times 10^3$	3,14
D	45	5	$1,35 \times 10^3$	3,13

**Slika 39:** Število KE bele barve na gojišču URI (log (KE/ml))**Slika 40:** Razlika med mlekom D in L, za bele kolonije gojišča URI (log (KE/ml))



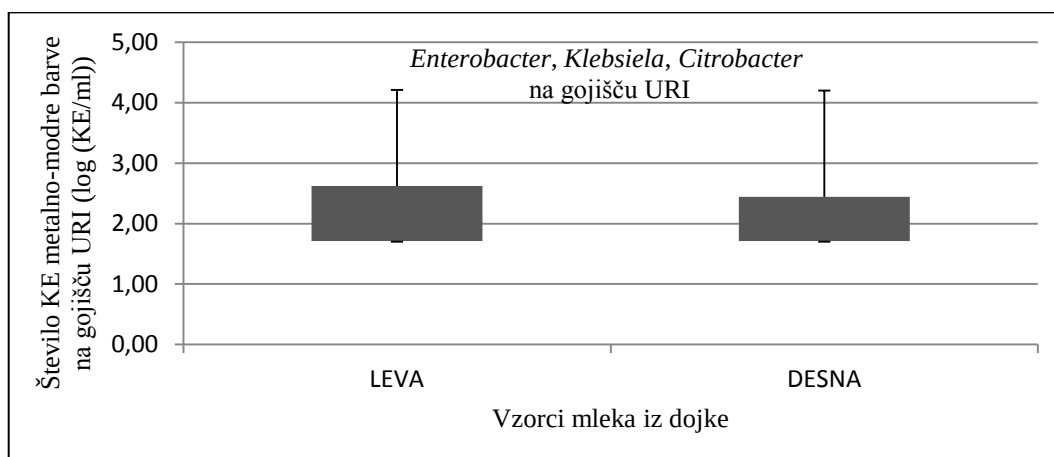
Slika 41: Frekvenčna porazdelitev razlike v številu KE v ml mleka L in D posameznih mater, za bele kolonije gojišča URI

4.3.6.5 Metalno-modro obarvane kolonije – *Enterobacter*, *Klebsiela* in *Citrobacter*

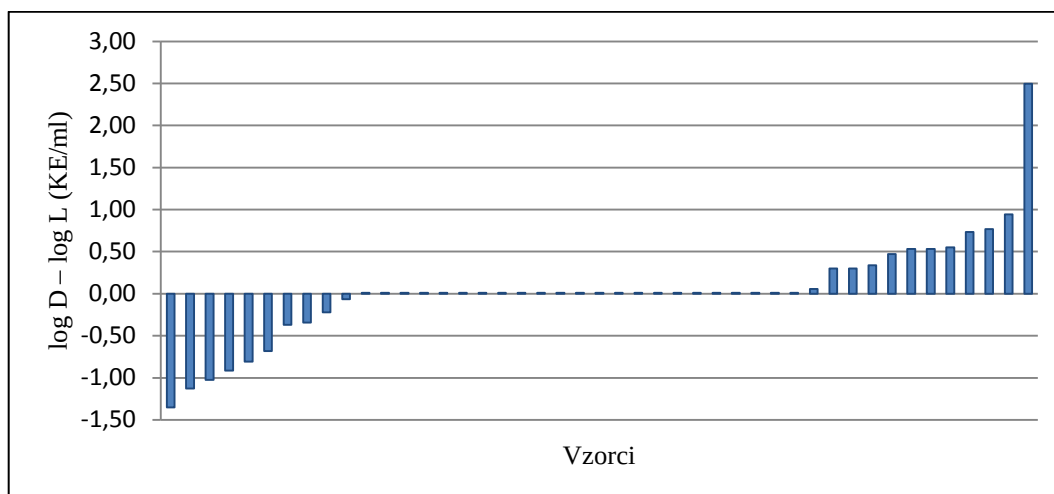
Število metalno-modro obarvanih KE na gojišču URI, ki najverjetneje pripadajo rodovom *Enterobacter*, *Klebsiela* in *Citrobacter*, je bilo v območju do $1,6 \times 10^4$ KE/ml. Tudi v tem primeru je več kot polovica vseh vzorcev vsebovala število KE pod mejo detekcije, in sicer kar 69 % iz leve dojke in 64 % iz desne. Mediana je bila zato enaka polovični vrednosti meje detekcije, tako za vzorce ene kot druge dojke.

Preglednica 15: Število KE metalno-modre barve na gojišču URI

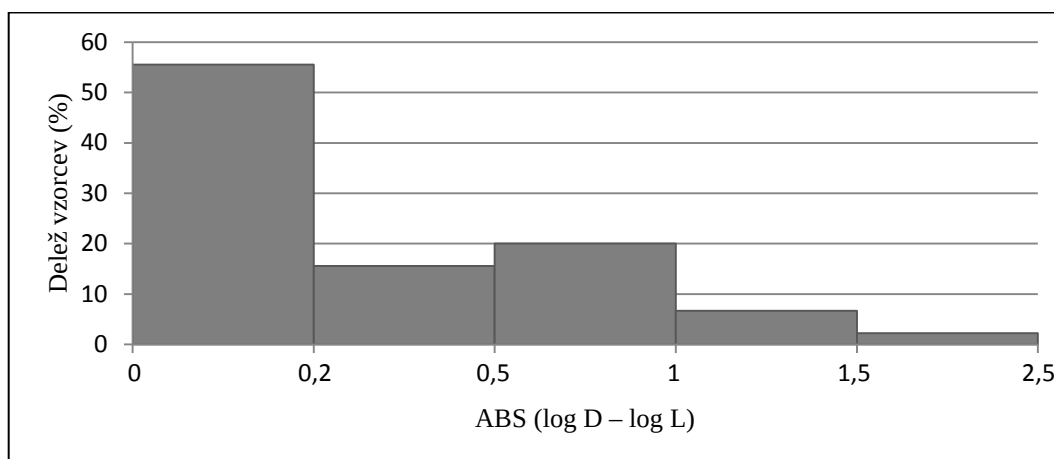
Izvor vzorcev mleka	Število vseh vzorcev	Število vzorcev pod mejo detekcije	Mediana (KE/ml)	Mediana (log (KE/ml))
L	45	30	$5,00 \times 10^1$	1,70
D	45	28	$5,00 \times 10^1$	1,70



Slika 42: Število KE metalno-modre barve na gojišču URI (log (KE/ml))



Slika 43: Razlika med mlekom D in L, za metalno-modre kolonije gojišča URI (log (KE/ml))



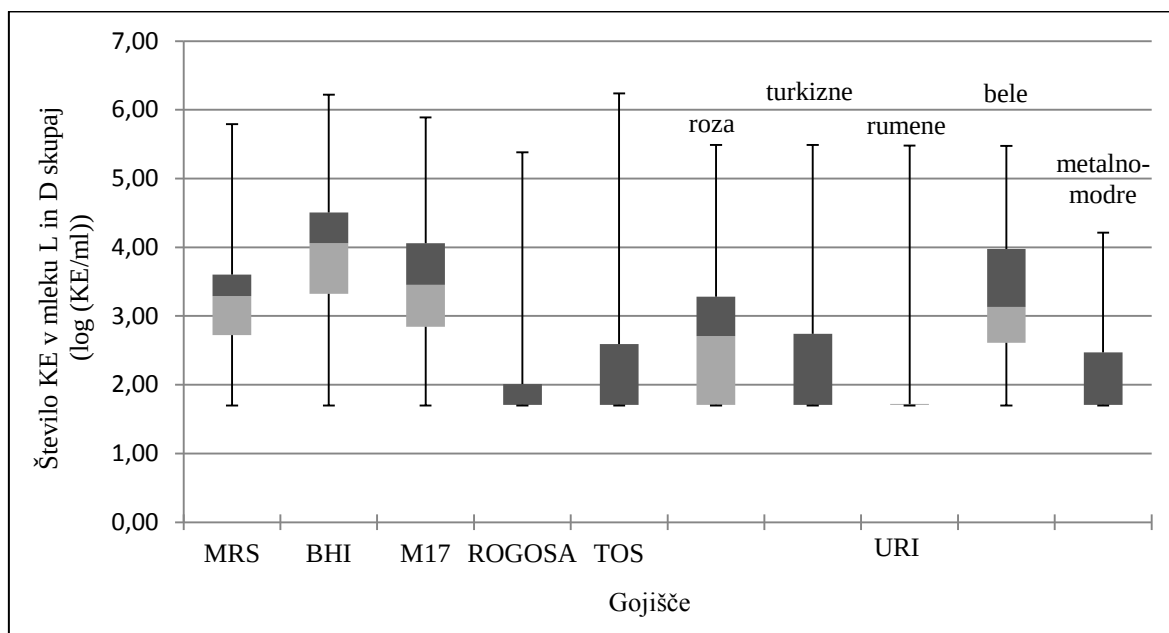
Slika 44: Frekvenčna porazdelitev razlike v številu KE v ml mleka L in D posameznih mater, za metalno-modre kolonije gojišča URI

4.4 ŠTEVILO BAKTERIJ V HUMANEM MLEKU

V Preglednici 16 so zbrani in združeni rezultati štetja KE vzorcev mleka L in D na različnih gojiščih.

Preglednica 16: Število bakterij (KE/ml) v analiziranih vzorcih mleka L in D

Gojišče	Št. vseh vzorcev	Št. vzorcev pod mejo detekcije	Mediana (KE/ml)	Mediana (log (KE/ml))
MRS	90	7	$1,95 \times 10^3$	3,29
BHI	90	6	$1,14 \times 10^4$	4,06
M17	90	7	$2,85 \times 10^3$	3,46
ROGOSA	90	67	$5,00 \times 10^1$	1,70
TOS z mupirocinom	90	57	$5,00 \times 10^1$	1,70
URI	rdeče-roza	90	$5,00 \times 10^2$	2,70
	turkizno modre	86	$5,00 \times 10^1$	1,70
	rumeno-zlate	90	$5,00 \times 10^1$	1,70
	bele	90	$1,36 \times 10^3$	3,13
	metalno-modre	90	$5,00 \times 10$	1,70



Slika 45: Število KE v ml mleka (L in D skupaj), za vsa gojišča, predstavljeno v logaritmiranih vrednostih

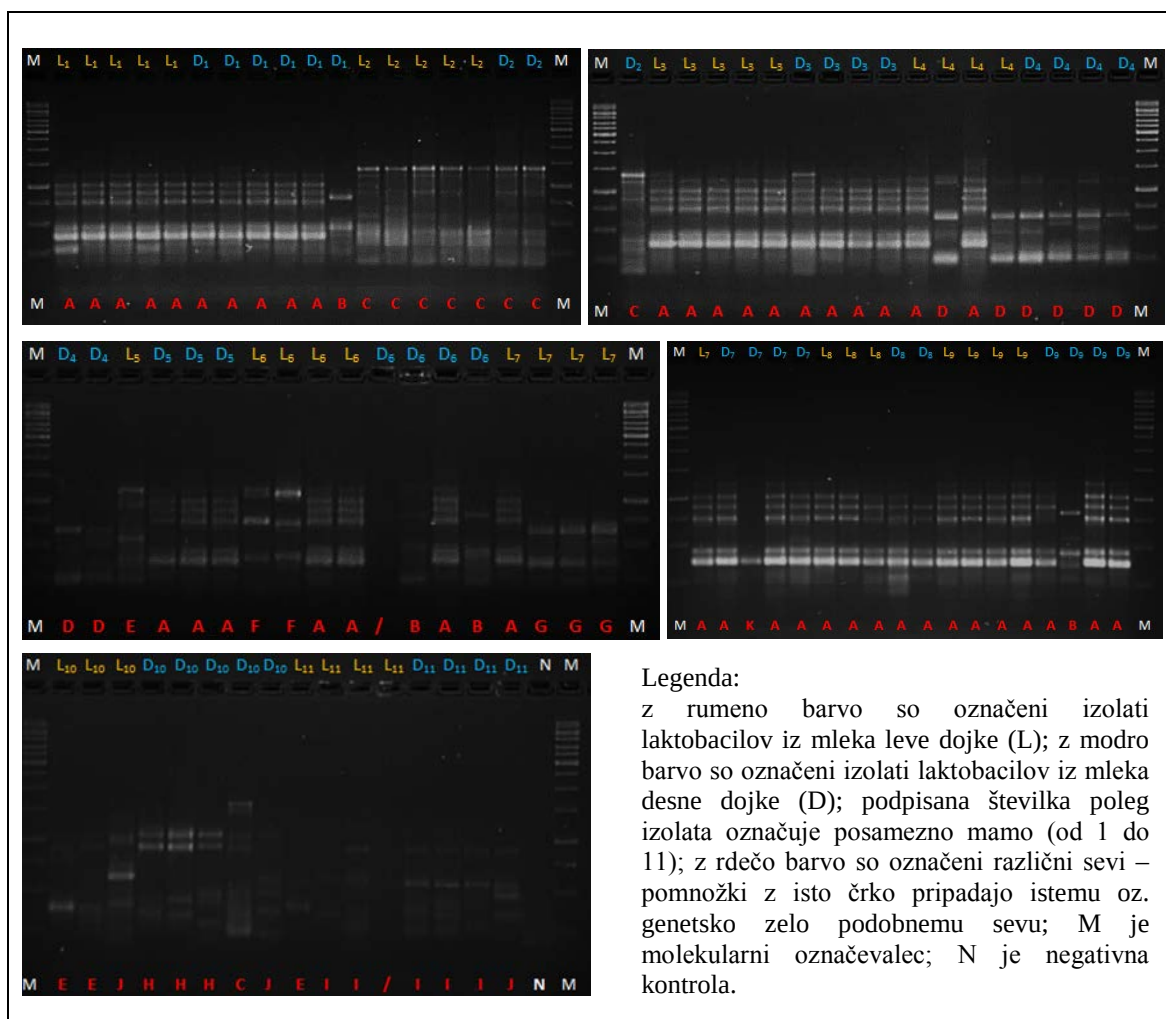
Na Sliki 45 so prikazani kvartilni diagrami logaritmirane vrednosti KE v ml mleka vseh vzorcev (mleko L in mleko D skupaj), za vsa gojišča. Razvidno je, da se najvišje vrednosti mediane pojavljajo pri gojiščih BHI (mezofilne aerobne bakterije), M17 (pretežno laktokoki in enterokoki), MRS (pretežno MKB), URI – kolonije bele barve (najverjetneje

Staphylococcus epidermidis) ter URI – temno roza do rdeče kolonije (najverjetneje *E. coli*). Pri ostalih gojiščih je zaradi velikega števila vzorcev, ki so imeli število KE pod mejo detekcije, mediana enaka polovični vrednosti meje detekcije.

4.5 RAZLIKOVANJE SEVOV LAKTOBACILOV Z METODO RAPD

Z metodo RAPD smo ugotavljali in primerjali pestrost, razlike in morebitno prevlado različnih sevov laktobacilov v mleku L in D enajstih mater. V ta namen smo iz kolonij, ki so zrastle na gojišču ROGOSA, osamili DNA ter jo uporabili v reakciji PCR z začetnim oligonukleotidom M13 (RAPD).

Po elektroforezi pomnožkov RAPD smo dobili 11 različnih vzorcev RAPD, ki so na Sliki 46 označeni s črkami A–K.



Slika 46: Pomnožki analize RAPD

Sodeč po rezultatih analize RAPD smo pri treh mamah večkrat osamili en sam sev laktobacilov (oziroma genetsko zelo podobne seve), ki je bil prisoten (so bili prisotni) tako v mleku L kot tudi D; pri štirih materah smo osamili po dva različna seva, pri treh po tri različne seve laktobacilov in pri eni 4 različne seve. Skupno smo osamili vsaj enajst različnih sevov (nekatero izolate zaradi slabe vidljivosti in jasnosti slike nismo mogli uvrstiti v določen vzorec RAPD). Pri tem smo opazili, da se vzorec RAPD, ki smo ga na Sliki 46 označili s črko A, pojavlja v mleku kar pri osmih mamah, vzorec B pa pri treh mamah. Ostali so se pojavili samo pri eni ali največ pri dveh mamah.

4.6 UGOTAVLJANJE VRSTE LAKTOBACILOV S SEKVENCIRANJEM

Po enega predstavnika sevov (en vzorec RAPD), ki smo jih na Sliki 46 poimenovali s črkami od A do J, smo potrdili s pomočjo ugotavljanja zaporedja nukleotidov v delu gena za 16S rRNA.

Prečiščeno DNA desetih izolatov smo poslali v laboratorij Microsynth na Dunaj, kjer so opravili analizo nukleotidnega zaporedja. S pomočjo programa BLAST smo dobljena zaporedja nukleotidov, dolga od 894 do 1012 bp (Priloge A–J), primerjali s tistimi, ki so na voljo v genski banki NCBI. Ugotovili smo, da vzorci RAPD, ki smo jih na Sliki 46 poimenovali s črkami od A do J, z veliko zanesljivostjo pripadajo naslednjim vrstam:

- Vzorec A: *Lactobacillus fermentum*,
- Vzorec B: *Lactobacillus salivarius*,
- Vzorec C: *Bifidobacterium breve*,
- Vzorec D: *Lactobacillus gasseri*,
- Vzorec E: *Staphylococcus epidermidis*,
- Vzorec F: *Lactobacillus reuteri*,
- Vzorec G: *Lactobacillus gasseri*,
- Vzorec H: *Enterococcus faecalis*,
- Vzorec I: *Lactobacillus gasseri*,
- Vzorec J: *Lactobacillus gasseri*.

Zanimiv je rezultat, da kar 7 od 10-ih izolatov pripada rodu *Lactobacillus*, od tega pa kar štirje vrsti *L. gasseri*.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Število bakterij v humanem mleku

Z metodo štetja kolonijskih enot na ustreznih gojiščih smo ugotavljali prisotnost bakterij v vzorcih mleka 47-ih mater, odvzetih iz leve (L) in iz desne (D) dojke, 30. dan po porodu. Primerjava izračunanih median (vsi vzorci mleka, L in D) je pokazala, da so bile v humanem mleku najbolj zastopane mezofilne aerobne bakterije ($1,14 \times 10^4$ KE/ml), sledili so jim laktokoki in enterokoki ($2,85 \times 10^3$ KE/ml), mlečnokislinske bakterije, ki zrastejo na gojišču MRS ($1,95 \times 10^3$ KE/ml), ter vrsta *Staphylococcus epidermidis* ($1,36 \times 10^3$ KE/ml). Kar dobro zastopane so bile tudi predstavnice *E. coli* ($5,00 \times 10^2$ KE/ml).

Dobljeni rezultati so do neke mere primerljivi s podatki avtorjev Solís in sod. (2010), ki so v raziskavi prav tako uporabili kultivacijske metode in metodo RAPD. Med glavnimi bakterijskimi predstavnicami humanega mleka, odvzetega 30. dan po porodu, so navedli stafilokoke (43 %), streptokoke (36 %), bifidobakterije (11 %) in laktobacile (7 %).

Streptokokov in stafilokokov v naši raziskavi nismo šteli posebej, so pa zajeti med predstavnike mezofilne aerobne mikrobiote, ki zraste na gojišču BHI. Bifidobakterij v dveh tretjinah vzorcev mleka nismo ugotovili, v ostalih pa.

Večina gojišč, ki smo jih uporabili za selektivno štetje posameznih vrst oziroma skupin bakterij, je le delno selektivnih, kar pomeni, da lahko poleg pričakovanih bakterij, ki praviloma prevladujejo, na gojišču izrastejo tudi drugi predstavniki.

V primeru ugotavljanja števila *E. coli* smo po natančnem pregledu navodil proizvajalca gojišča URI (Bio-Rad, 2007) ter literature ugotovili, da so si kolonije vrste *E. coli* in nekaterih vrst stafilokokov barvno zelo podobne. Samo na podlagi barve kolonij je zato ugotavljanje števila določenih vrst bakterij precej nezanesljivo. V našem primeru smo vse roza-rdeče kolonije gojišča URI pripisovali vrsti *E. coli*, seveda pa obstaja velika verjetnost, da so bili med njimi tudi predstavniki stafilokokov.

5.1.2 Razlika v številu bakterij mleka iz leve in desne dojke

Primerjava števila bakterij mleka, odvzetega iz leve (mleko L) in desne dojke (mleko D) je bila glede na vrednosti mediane pri vseh analiziranih vrstah oziroma skupinah bakterij primerljiva.

Pri primerjavi vzorcev posameznih mater, odvzetih iz različnih dojk, pa smo opazili tudi večje razlike v številu KE bakterij. Ugotovili smo, da se koncentracija bakterij med vzorcema L in D iste mame lahko zelo razlikuje, tudi nad 3 log enote. Rezultati kažejo na to, da moramo vzorca iz leve in desne dojke pred analizo zmešati ali pa analizirati oba, da dobimo reprezentativno sliko mikrobiote humanega mleka.

5.1.3 Metoda RAPD

Z metodo RAPD smo ugotavljali sevno sestavo oz. pestrost laktobacilov humanega mleka 11-ih mater. Isti vzorec RAPD se pojavi pri izolatih istega seva oziroma genetsko zelo sorodnih sevov. Z metodo smo razločili vsaj 11 različnih skupin izolatov, ki so zrastle na gojišču ROGOSA. Pri primerjavi sevne sestave mleka L in D iste matere nismo ugotovili bistvenih razlik. Sicer so se pri različnih mamah pojavljali tudi isti sevi oziroma izolati z istim vzorcem RAPD. Predvsem vzorec A, predstavnik vrste *L. fermentum*, je bil dobro zastopan v mleku različnih mam. Vzorec B, identificiran kot *L. salivarius*, smo zasledili pri treh mamah, ostale pa pri eni sami oziroma največ dveh mamah.

Metoda RAPD ima pred drugimi mnoge prednosti: je hitra, poceni ter občutljiva; njena pomanjkljivost pa se kaže v slabši ponovljivosti rezultatov (Li in sod., 2009). Kar zadeva rod *Lactobacillus*, metoda ne razlikuje najbolje med sevi vrste *L. acidophilus*, za druge vrste pa je bolj uspešna (Mahenthiralingam in sod., 2009). V naši raziskavi smo s to metodo uspešno razlikovali seve vrste *L. gasseri*, saj so bili predstavniki štirih različnih skupin RAPD identificirani kot *L. gasseri*.

5.1.4 Sekvenciranje – ugotavljanje vrste za izolate iz gojišča ROGOSA

Predstavnike različnih skupin izolatov, porazdeljenih na osnovi vzorca RAPD, smo identificirali z ugotavljanjem zaporedja nukleotidov v delu gena za 16S rRNA. Rezultati so pokazali, da z veliko zanesljivostjo pripadajo vrstam *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus salivarius*, *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus gasseri* (4), *Staphylococcus epidermidis*, *Lactobacillus reuteri* in *Enterococcus faecalis*.

V mleku desetih mam, od skupno 11-ih, smo z veliko verjetnostjo potrdili predstavnike laktobacilov (83 % vseh kolonij, uporabljenih v analizi z metodo RAPD). V največjem deležu se je pojavila vrsta *L. fermentum* (48 % vseh kolonij), ki smo jo potrdili pri osmih mamah, in pa *L. gasseri* (21 % vseh kolonij), ki smo jo potrdili pri štirih. Izolat vrste *L. salivarius* smo zasledili pri treh mamah, *L. reuteri* pa samo pri eni. Skupno smo v humanem mleku ugotovili štiri različne vrste laktobacilov.

Martín in sod. (2012) so v humanem mleku ugotovili naslednje pogostejše bakterijske vrste: *Staphylococcus epidermidis*, *S. hominis*, *Lactobacillus casei*, *L. gasseri*, *L. gastricus*,

L. fermentum, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. salivarius*, *L. vaginalis* ter *Bifidobacterium breve* in *B. longum*. Zanimivo je, da smo uspeli osamiti predstavnike kar šest od zgoraj naštetih vrst, vključno s *Staphylococcus epidermidis* ter *Bifidobacterium breve*, čeprav smo pregledovali le izolate z gojišča ROGOSA, ki je v prvi vrsti namenjeno gojenju in štetju laktobacilov. Omenjeni rezultati kažejo na to, da gojišče dobro podpira rast različnih vrst laktobacilov, ni pa dovolj selektivno, kar so omenjali že v preteklih raziskavah.

Dokaz na upravičen dvom glede zanesljivosti selektivnega štetja KE izbranih skupin (vrsta, rod, skupina) bakterij, je tudi rezultat, ki smo ga dobili z analizo nukleotidnega zaporedja izolatov z gojišča ROGOSA, ki smo jih z metodo RAPD razvrstili v 10 skupin. Glede na opis gojišča ROGOSA smo sklepali, da izrastle kolonije pripadajo rodu laktobacilov. Z analizo ugotovljenih nukleotidnih zaporedij *16S rDNA* pa smo potrdili, da so poleg laktobacilov (ki so bili sicer prevladujoči) bile na gojišču prisotne tudi kolonije bifidobakterij, stafilokokov in enterokokov. Gojišče ROGOSA, ki je bilo prvotno namenjeno za analize prašičjega blata, zato ni najboljše za selektivno gojenje laktobacilov iz humanega mleka.

5.2 SKLEPI

- V humanem mleku, odvzetem 30. dan po porodu, smo potrdili prisotnost mlečnokislinskih bakterij, bifidobakterij in mezofilnih aerobnih bakterij. Najbolje so bile zastopane aerobne mezofilne bakterije (med njimi predvsem vrsti *Staphylococcus epidermidis* in *E. coli*) ter enterokoki in laktokoki. Manj je bilo laktobacilov in bifidobakterij.
- Pri primerjavi vzorcev mleka, odvzetega pri posameznih mamah iz različnih dojk, smo opazili tudi večje razlike v koncentraciji različnih vrst oziroma skupin bakterij (KE/ml), iz česar sledi spoznanje, da je potrebno bodisi analizirati oba vzorca bodisi vzorca pred analizo premešati. Vzorec, odvzet samo iz ene dojke, namreč ne odraža prave slike mikrobiote mleka, ki jo dojenček zaužije med dojenjem.
- Nekatera izmed izbranih gojišč, ki smo jih uporabili za štetje KE rodov ali skupin bakterij, niso bila zadostno selektivna. V primeru gojišča ROGOSA se je pri identifikaciji izbranih izolatov pokazalo, da so sicer prevladovali laktobacili, katerim je gojišče namenjeno, zrastle pa so tudi stafilokoki vrste *S. epidermidis*, bifidobakterije vrste *B. breve* in enterokoki vrste *E. faecalis*.
- Pri kromogenem gojišču URI smo naleteli na težavo, saj so se kolonije roza-rdeče barve, ki jih po navodilih proizvajalca štejemo kot *E. coli*, razlikovale po barvnih odtenukih in morfologiji. Barvanje po Gramu je pokazalo, da imajo nekatere izmed njih obliko kokov. Tako na podlagi barve ni mogoče zagotoviti, da so vse roza-rdeče kolonije pripadale vrsti *E. coli*.
- Pri primerjavi sevne sestave mleka L in D iste matere z metodo RAPD nismo ugotovili bistvenih razlik.

- Z metodo RAPD smo uspešno razlikovali štiri različne seve *Lactobacillus gasseri*. Enega od njih smo zasledili pri dveh mamah, ostala dva pa vsakega pri eni od mam.
- Vzorec RAPD, ki se je največkrat ponovil, in to pri osmih mamah, smo s pomočjo identifikacije s sekvenciranjem *16S rDNA* pripisali izolat vrste *L. fermentum*.

6 POVZETEK

Humano mleko velja za edinstven naraven medij, ki predstavlja novorojencu prvo in najpopolnejšo obliko hrane. Poleg visokokakovostnih beljakovin in esencialnih maščobnih kislin vsebuje tudi zaščitne komponente, ki ščitijo otroka in pripomorejo k izoblikovanju njegovega imunskega sistema. Pestrosti hranil, ki jih otrok pridobi z dojenjem, tako ne moremo nadomestiti niti z zelo kakovostno mlečno formulo.

Pomembno vlogo pri razvoju in izoblikovanju črevesne mikroflore novorojenca, ter zaščitne funkcije pred patogenimi mikroorganizmi, imajo tudi bakterije humanega mleka. V magistrski nalogi sem raziskovala njihovo številčnost in pestrost, ter ugotavljala morebitne razlike med vzorci mleka iz obeh dojk.

Vzorci za analizo so bili pridobljeni v okviru raziskave »Vloga humanega mleka v razvoju črevesne mikrobiote dojenčka«, od 47-ih mater, 30. dan po porodu. Vzorce smo ločeno (mleko iz leve in desne dojke) precepili na gojišča MRS (za MKB), BHI (za mezofilne aerobne bakterije), M17 (za laktokoke in enterokoke), ROGOSA (za laktobacile), TOS z dodatkom mupirocina (za bifidobakterije) in kromogeno gojišče URI (za *E. coli*, *Enterococcus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter* sp., ter druge). Z metodo RAPD smo ugotavljali sevno raznolikost laktobacilov v humanem mleku, posamezne izolate pa smo potrdili tudi na nivoju vrste, z določanjem zaporedja nukleotidov v delu *16S rDNA*.

Najvišje koncentracije bakterij smo ugotovili na gojiščih BHI (mezofilne aerobne bakterije, v konc. $1,14 \times 10^4$ KE/ml), M17 (v največjem številu najverjetneje laktokoki in enterokoki, v konc. $2,85 \times 10^3$ KE/ml), MRS (mlečnokislinske bakterije, v konc. $1,95 \times 10^3$ KE/ml) in URI – kolonije bele barve (v največjem deležu najverjetneje *Staphylococcus epidermidis*, v konc. $1,36 \times 10^3$ KE/ml) ter URI – kolonije temno roza do rdeče barve (v največjem številu in konc. $5,00 \times 10^2$ KE/ml, najverjetneje *E. coli*).

Ena izmed težav pri ugotavljanju števila različnih skupin bakterij v humanem mleku je bila nezadostna selektivnost izbranih gojišč. Na gojišču MRS, ki je sicer prilagojeno za rast laktobacilov, nismo izključili verjetnosti, da zrastejo tudi ostale MKB. Prav tako so na gojišču M17, poleg laktokokov in enterokokov, verjetno izrastle tudi predstavnice ostalih rodov. Podobno lahko sklepamo tudi za gojišče ROGOSA, ki je delno selektivno in prilagojeno za laktobacile. Z metodo sekvenciranja smo na slednjem gojišču potrdili tudi kolonije stafilokokov, enterokokov in bifidobakterij. Problem je predstavljalo tudi kromogeno gojišče URI. Različne barvne odtenke kolonij večkrat nismo mogli zagotovo pripisati določeni bakterijski vrsti. Tako smo pri štetju vrste *E.coli* naleteli na težavo, da so nekatere roza-rdeče kolonije vsebovale koke, najverjetneje stafilokoke, barvnih odtenkov ali morfologije kolonij pa ni bilo mogoče dovolj zanesljivo razlikovati.

Z analizo RAPD smo analizirali DNA 86. izolatov, ki so zrastle na gojišču ROGOSA, po nacepljanju mleka 11-ih mater. Z reakcijo PCR, v kateri smo uporabili začetni oligonukleotid M13, smo ugotovili 11 različnih genotipov izolatov. Predstavniki sedmih skupin RAPD so bili s pomočjo sekvenciranja identificirani kot laktobacili (*L. fermentum*, *L. salivarius*, *L. gasseri*, *L. reuteri*), predstavniki treh pa kot *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus epidermidis* in *Bifidobacterium breve*. Daleč najbolj razširjen je bil vzorec RAPD, ki je pripadal predstavniku *Lactobacillus fermentum*, odkrili smo ga kar pri 48 % pregledanih izolatov, ki so bili pridobljeni iz mleka osmih mater. Dobro zastopana je bila tudi vrsta *L. gasseri*, saj so ji pripadali izolati s štirimi različnimi vzorci RAPD, oziroma 21 % vseh pregledanih kolonij, pridobljenih iz mleka štirih mater.

Pri primerjavi sevne sestave mleka L in D iste matere z metodo RAPD nismo ugotovili bistvenih razlik, sta se pa vzorca mleka iz različnih dojk lahko zelo razlikovala v številu KE/ml različnih skupin bakterij. Iz rezultatov je mogoče zaključiti, da vzorec, odvzet samo iz ene dojke, ne odraža prave slike mikrobiote mleka, ki jo dojenček zaužije med dojenjem, zato je potrebno bodisi analizirati oba vzorca bodisi vzorca pred analizo premešati.

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, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 1–45
- Biavati B., Vescovo M., Torriani S., Bottazzi V. 2000. Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Annals of Microbiology*, 50, 2: 117–131
- Bio-Rad. 2007. UriSelect™ 4. Clinical microbiology – Bacteriology. Hemel Hempstead, Bio-Rad Laboratories: 4 str.
<http://did.it/contenuti/biorad/UriSelect.pdf> (januar, 2013)
- Brown T. A., Brown K. A. 2003. Ancient DNA typing: methods, strategies and applications. *Human Genetics*, 114, 1: 124–125
- Coppa G. V., Zampini L., Galeazzi T., Gabrielli O. 2006. Prebiotics in human milk: a review. *Digestive and Liver Disease*, 38, Suppl. 2: S291–S294
- Donovan S. M. 2006. Role of human milk components in gastrointestinal development: current knowledge and future needs. *Journal of Pediatrics*, 149, 5: S49–S61
- Fernández L., Langa S., Martín V., Maldonado A., Jiménez E., Martín R., Rodríguez J. M. 2013. The human milk microbiota: Origin and potential roles in health and disease. *Pharmacological Research*, 69, 1: 1–10
- Goedhart A. C., Bindels J. G. 1994. The composition of human milk as a model for the design of infant formulas: recent findings and possible applications. *Nutrition Research Reviews*, 7, 1: 1–23
- Hadadji M., Benama R., Saidi N., Henni D. E., Kihal M. 2005. Identification of cultivable *Bifidobacterium* species isolated from breast-fed feces in West-Algeria. *African Journal of Biotechnology*, 4, 5: 422–430
- Jeršek B. 2011. Mikrobiološka analiza, navodila in delovni zvezek pri predmetu mikrobiološka analiza. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, oddelek za živilstvo: 4–21
- Johnson M. C. 2010. Anatomy and physiology of the breast. V: Management of breast diseases. Jatoi I., Kaufmann M. (eds.). Berlin, Springer Berlin Heidelberg: 1–36
- Li W., Raoult D., Fournier P. E. 2009. Bacterial strain typing in the genomic era. *FEMS Microbiology Reviews*, 33, 5: 892–916

Lutter C. K. 2005. Breast feeding. V: Encyclopedia of human nutrition, Vol. 1. Caballero B., Allen L., Prentice A. (eds.). 2nd ed. Amsterdam, Elsevier Academic Press: 232–236

Mahenthiralingam E., Marchbank A., Drevinek P., Garaiova I., Plummer S. 2009. Use of colony-based bacterial strain typing for tracking the fate of *Lactobacillus* strains during human consumption. BMC Microbiology, 9: 251, doi: 10.1186/1471-2180-9-251: 15 str.

- Smole Možina S. 2000. Eksperimentalne vaje iz živilske mikrobiologije. Splošna mikrobiološka tehnika: Skripta in delovni zvezek za študente 1. letnika živilstva. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Katedra za živilsko mikrobiologijo: 4–8
- Smole Možina S., Bem Z. 2003. Dejavniki razmnoževanja mikroorganizmov. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 47–86
- 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
- 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 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 10: 4351–4356
- Wambach K., Campbell S. H., Gill S. L., Dodgson J. E., Abiona T. C., Heinig M. J. 2005. Clinical lactation practice: 20 years of evidence. *Journal of Human Lactation*, 21, 3: 245–258
- Yu J., Wang W. H., Menghe B. L. G., Jiri M. T., Wang H. M., Liu W. J., Bao Q. H., Lu Q., Zhang J. C., Wang F. Xu H. Y., Sun T. S., Zhang H. P. 2011. Diversity of lactic acid bacteria associated with traditional fermented dairy products in Mongolia. *Journal of Dairy Science*, 94, 7: 3229–3241

ZAHVALA

Posebna zahvala gre mami in očetu, ki sta mi omogočila študijsko pot in me na njej vseskozi spremljala ter vzpodbujala.

Zahvaljujem se mentorici, dr. Bojani Bogovič Matijašić, za napotke in strokoven ter skrben pregled magistrskega dela.

Prav tako gre velika zahvala Tušar Tini in Sernel Tjaši, za pomoč v laboratoriju Katedre za mlekarstvo, pri izvedbi praktičnega dela naloge.

Za natančen pregled ter koristne nasvete za izboljšavo naloge se zahvaljujem recenzentki prof. dr. Sonji Smole Možina.

Hvala Lini Burkan za pregled referenc.

Navsezadnje hvala tudi fantu Tilnu za potrpežljivost in podporo, vsem prijateljem in sošolcem za nepozabna študijska leta, predvsem pa hvala tudi prijateljici Anji, s katero sem preživela prelepih pet študentskih let, v katerih nikoli ni manjkalo smeha.

Iskrena hvala vsem, ki ste tako ali drugače pripomogli k nastanku tega dela!

PRILOGE

Priloga A: Nukleotidno zaporedje pomnožka – *Lactobacillus fermentum* (NCBI, 2013)

NNGCTATANATGCAGTCGACGCGTTGGCCCAATTGATTGATGGTGCTTGCACC
TGATTGATTTTGGTCGCCAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTAA
CCTGCCCAGAAGCGGGGGACAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAAC
AGCGTTGTTTCGCATGAACAACGCTTAAAAGATGGCTTCTCGCTATCACTTCTGG
ATGGACCTGCGGTGCATTAGCTTGTGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCGAT
GATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGG
CCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGC
CTGATGGAGCAACACCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTG
TTGTTAAAGAAGAACACGTATGAGAGTAACTGTTTCATACGTTGACGGTATTTA
ACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG
CAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGAGTGCAGGCGGTTTTCTAAG
TCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGAAGTGCATCGGAACTGGATAA
CTTGAGTGCAGAAGAGGGTAGTGGAATCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAG
ATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTACCTGGTCTGCAACTGACGC
TGAGACTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATG
CCGTANACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGGAG
CTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGANACTCAN
AGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGC
TACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTGCGCCAACCCTAGANNNAGG
CGTT

Priloga B: Nukleotidno zaporedje pomnožka – *Lactobacillus salivarius* (NCBI, 2013)

NANMTGCAGTCGACGNNCTTTCTTACACCGAATGCTTGCATTCACCGTAAGAA
GTTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTAAAAGAAGGG
GATAACACTTGAAACAGGTGCTAATACCGTATATCTCTAAGGATCGCATGAT
CCTTAGATGAAAGATGGTTCTGCTATCGCTTTTAGATGGACCCGCGGCGTATTA
ACTAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGTGATGATACGTAGCCGAACCTGAG
AGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTACGGGAGGC
AGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGT
GAGTGAAGAAGGTCTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACACGAG
TGAGAGTAACTGTTTCATTTCGATGACGGTATCTAACCAGCAAGTCACGGCTAAC
TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTAT
TGGGCGTAAAGGGAACGCAGGCGGTCTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGG
CTTAACCGGAGTAGTGCAATTGGAACTGGAAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAG
AGTGGAACCTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAG
TGGCGAAAGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGTTTCGAAAGCGTGGG
TAGCANACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTANACGATGAATGCTA
GGTGTGAGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCAATAAGCATTCC
GCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCC
GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACC
AGGTCTTGACATCCTTTGACCACCTAAGAGATTAGGNTTTCCTTCGGGGACAA
AGTGAC

Priloga C: Nukleotidno zaporedje pomnožka – *Bifidobacterium breve* (NCBI, 2013)

ANGCAGTCGACGGGANNCNTCGGGCTTTGCCTGGTGGTGAGAGTGGCGAACG
GGTGAGTAATGCGTGACCGACCTGCCCCATGCACCGGAATAGCTCCTGGAAAC
GGGTGGTAATGCCGGATGCTCCATCACACCGCATGGTGTGTTGGGAAAGCCTT
TGCGGCATGGGATGGGGTCGCGTCCTATCAGCTTGATGGCGGGGTAAACGGCCC
ACCATGGCTTCGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACATTGGGA
CTGAGATACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACA
ATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGGAGGCCTTCGGG
TTGTAAACCTCTTTTGTAGGGAGCAAGGCANTTTNTGTTGAGTGTACCTTTCG
AATAANCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAA
GCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGTAGGCGGTTCGTNGCGTCC
GGTGTGAAAGTCCATCGCTTAACGGTGGATCCGCGCCGGGTACGGGCGGGCTT
GAGTGCGGTAGNNGAGACTGGAATTCCCGGTGTAACGGTGGAAATGTGTAGATA
TCGGGAAGAACACCAATGGCGAAGGCAGGTCTCTGNGCCGTTACTGACGCTGA
GGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC
GTAAACGGTGGATGCTGGATGTGGNGCNCGTTCCACGGGTTCCGTGTCGGAGC
TAACGCGTTAAGCATCCCGCCTGNNAGTACGGCCGCAAGGCTNNNACTCAAN
NNAATTGACGGGGGCCNNNNNNAGCGGNGGAGCATGCGGANNNATTTCGAT

Priloga D: Nukleotidno zaporedje pomnožka – *Lactobacillus gasseri* 1 (NCBI, 2013)

NCTTGCCNMNNATGAATTTGGTGCTTGACACCAAATGAACTNGATACAAGCGA
GCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCAAGWGACTGGGATAA
CACCTGGAAACAGATGCTAATACCGGATAACAACACTAGACGCATGTCTAGAG
TTTAAAAGATGGTTCTGCTATCACTCTTGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTAG
TTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAATGATGCATAGCCGNGTTGAGAGACT
GATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCA
GTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGT
GAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGGTAGTGAAGAAAGATAGAGGT
AGTAACTGGCCTTTATTTGACGGTAATTACTTAGAAAGTCACGGCTAACTACGT
GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGC
GTAAAGCGAGTGCAGGCGGTTCAATAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAA
CCGGAGAATTGCATCAGAACTGTTGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGG
AACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCG
AAGGCGGCTCTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCG
AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTANACGATGAGTGCTAAGTGT
TGGGAGGTTTCCGCCTCTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGG
GGAGTACGACCGCAAGGTTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAA
GCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCT
TGACNTCCAGTGCAAACCTAANANATTAGGAGTTCCCTTNGGGGANNNTGA

Priloga E: Nukleotidno zaporedje pomnožka – *Staphylococcus epidermidis* (NCBI, 2013)

TNNATGCAGTCGAGCGNCNGACGAGGAGCTTGCTCCTCTGACGTTAGCGGCGG
ACGGGTGAGTAACACGTGGNTAACCTACCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGA
AACCGGAGCTAATACCGGATAATATATTGAACCGCATNGTTCAATAGTGAAAG
ACGGTTTTGCTGTCACCTATAGATGGATCCGCGCCGCATTAGCTAGTTGGTAAG
GTAACGGCTTACCAAGGNAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGC
CACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA
ATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAA
GGTCTTCNGATCGTAAACTCTGNTATTAGNNAAGAACAAATGTGTAAGTAAC
TATGCACGTCTTGACGGTANCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAG
CAGCCRCGGNAATACGTANGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGNGCGNAAA
GCGCGCGTAGGCGNNTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGNG
NAGGGTCATTGGANACTGGNNNACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTC
CATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGCGGAAGG
CGACTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGATGTGCGAAAGCGTGNNGATCAAACA
GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTNNACGATGAGTGCTAAGTGTTANG
GGGTTTCCGNCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCNNCTGGNNA
GTACGACCGCNAGGTTGAAACTCANNGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCG
GTGGAGCATGTGGTTNAATTCNAANCAACGCGAANNNCCTTANNNAATCTTGN
NATCCTCTGANNNNTCTAGAGATAGAGTTTTCCCTNNNGGGGANAGA

Priloga F: Nukleotidno zaporedje pomnožka – *Lactobacillus reuteri* (NCBI, 2013)

GCANGTCGTACGCACTGGCNNNCTGATTGATGGTGCTTGACCTGATTGACGA
TGGATNACCAGTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTAACCTGCCCGG
GAGCGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACAAAAG
CCACATGGCTTTTGTGTTGAAAGATGGCTTTGGCTATCACTCTGGGATGGACCTG
CGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGATGATGCATAG
CCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGAAGTGAACACGGTCCATACTCC
TACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAG
CAACACCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTGGAG
AAGAACGTGCGTGAGAGTAACTGTTACGCAGTGACGGTATCCAACCAGAAA
GTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT
ATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTGCTTAGGTCTGATGT
GAAAGCCTTCGGCTTAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACCGGGCGACTTGAGTG
CAGAAGAGGACAGTGGAAGTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATG
GAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCT
CGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTANA
CGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGGAGCTAACGC
ATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATT
GACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGA
AGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTGCGCTAACCTTAGAGNTAAAGGNNTTC
CCN

Priloga G: Nukleotidno zaporedje pomnožka – *Lactobacillus gasseri* 2 (NCBI, 2013)

NCTATNNANGCAGTCGAGCGAGCTTGCCTAGATGAATTTGGTGCTTGCACCAG
ATGAAACTAGATACAAGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACC
TGCCCAAGAGACTGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGGATAACA
ACACTAGACGCATGTCTAGAGTTTAAAAGATGGTTCTGCTATCACTCTTGGATG
GACCTGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAATGAT
GCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCA
AACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGA
TGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGG
TAGTGAAGAAAGATAGAGGTAGTAACTGGCCTTTATTTGACGGTAATTACTTA
GAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAA
GCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGTGCAGGCGGTTCAATAAGTCT
GATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGGAGAATTGCATCAGAACTGTTGAACTT
GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGAT
ATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGCAACTGACGCTG
AGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCATGCC
GTANACGATGAGTGCTAAGTGTTGGGAGGTTTCCGCCTCTCAGTGCTGCAGCT
AACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAACTCAAAG
GAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAA
CGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCAGTGCAAACCTAAGAGATTAGGT
GTTCCCTT

Priloga H: Nukleotidno zaporedje pomnožka – *Enterococcus faecalis* (NCBI, 2013)

NNANGCAGTCGACGCTTCTTTCCTCCCGAGTGCTTGCACCTCNATTGGAAAGAG
GAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGAT
AACACTTGGAACAGGTGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATA
NGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAG
CTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGA
GGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGC
AGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCG
TGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGG
ACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAA
CTACGTGCCAGCAGCCGCGGNAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTA
TTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCG
GCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGA
GAGTGGAAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCA
GTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGG
GGAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTANACGATGAGTGCT
AAGTGTTGGAGGGTTTCCGCNCTTCAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTC
CGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGANACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC
CGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTAC
CAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTTCCTTCGGGGACA
AAGTGACA

Priloga I: Nukleotidno zaporedje pomnožka – *Lactobacillus gasseri* 3 (NCBI, 2013)

NCTATNNANGCAGTCGAGCGAGCTTGCCTAGATGAATTTGGTGCTTGCACCAA
ATGAAACTAGATACAAGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACC
TGCCCAAGAGACTGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGGATAACA
ACACTAGACGCATGTCTAGAGTTTAAAAGATGGTTCTGCTATCACTCTTGGATG
GACCTGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAATGAT
GCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCA
AACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGA
TGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGG
TAGTGAAGAAAGATAGAGGTAGTAACTGGCCTTTATTTGACGGTAATTACTTA
GAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAA
GCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGTGCAGGCGGTTCAATAAGTCT
GATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGGAGAATTGCATCAGAACTGTTGAACTT
GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGAT
ATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGCAACTGACGCTG
AGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCATGCC
GTANACGATGAGTGCTAAGTGTTGGGAGGTTTCCGCCTCTCAGTGCTGCAGCT
AACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAG
GAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAA
CGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCAGTGCAAACCTAAGANATTAGGA
GTTCCCTT

Priloga J: Nukleotidno zaporedje pomnožka – *Lactobacillus gasseri* 4 (NCBI, 2013)

NCTATNNANGCAGTCGAGCGAGCTTGCCTAGATGAATTTGGTGCTTGCACCAA
ATGAAACTAGATACAAGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACC
TGCCCAAGAGACTGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGGATAACA
ACACTAGACGCATGTCTAGAGTTTAAAAGATGGTTCTGCTATCACTCTTGGATG
GACCTGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAATGAT
GCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCA
AACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGA
TGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGG
TAGTGAAGAAAGATAGAGGTAGTAACTGGCCTTTATTTGACGGTAATTACTTA
GAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAA
GCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGTGCAGGCGGTTCAATAAGTCT
GATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGGAGAATTGCATCAGAACTGTTGAACTT
GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGAT
ATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGCAACTGACGCTG
AGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCATGCC
GTANACGATGAGTGCTAAGTGTTGGGAGGTTTCCGCCTCTCAGTGCTGCAGCT
AACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAG
GAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAA
CGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCAGTGCAAACCTAAGAGATTAGGA
GTTCCCTT

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Klavdija ŽERDONER

MIKROBIOTA HUMANEGA MLEKA

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Živilstvo

Ljubljana, 2013