

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Simona ČAMPA

***EX VIVO VEZAVA PROBIOTIKOV NA ČREVESNO SLUZNICO  
TANKEGA ČREVESA PRAŠIČEV IN TEKMOVANJE Z *E. coli* O8:K88***

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

***EX VIVO ADHESION OF PROBIOTICS ON THE INTESTINAL  
MUCOSA OF THE SMALL INTESTINE OF PIGS AND  
COMPETITION WITH *E. coli* O8:K88***

GRADUATION THESIS  
University Studies

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija kmetijstvo - zootehnika. Opravljeno je bilo na Katedri za mlekarstvo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje Oddelka za zootehniko je za mentorico diplomskega dela imenovala znan. svet. dr. Bojano Bogovič Matijašić in za somentorico dr. Petro Mohar Lorbeg.

Recenzentka: prof. dr. Irena Rogelj

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Janez SALOBIR

Članica: znan svet. dr. Bojana BOGOVIČ MATIJAŠIĆ

Članica: dr. Petra MOHAR LORBEG

Članica: prof. dr. Irena ROGELJ

Datum zagovora:

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

Simona ČAMPA

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn  
DK UDK 636.4.084/.087:579(043.2)=163.6  
KG prašiči/prehrana živali/krmni dodatki/probiotiki/*E. coli* O8:K88/vezava *ex vivo*/zaviranje patogenov  
KK AGRIS L51/5300  
AV ČAMPA, Simona  
SA BOGOVIČ MATIJAŠIĆ, Bojana (mentorica)/MOHAR LORBEG, Petra (somentorica)  
KZ SI-1230 Domžale, Groblje 3  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko  
LI 2016  
IN EX VIVO VEZAVA PROBIOTIKOV NA ČREVESNO SLUZNICO TANKEGA ČREVESA PRAŠIČEV IN TEKMOVANJE Z *E. coli* O8:K88  
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
OP XI, 60 str., 5 pregl., 14 sl., 18 pril., 99 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI Z uporabo probiotikov kot krmnih dodatkov je mogoče do določene mere preprečiti ali omiliti oz. skrajšati trajanje drisk pri prašičih, ki jih povzročajo bakterije iz vrste *Escherichia coli*. Pri tem igra pomembno vlogo uspešna vezava probiotikov na črevesno sluznico in sposobnost tekmovanja za vezavo s patogenimi bakterijami. Namen naše naloge je bil ugotoviti, ali sta se probiotična seva *Lactobacillus gasseri* K7 in *Lactobacillus gasseri* LF221 sposobna vezati na sveže tkivo črevesne sluznice prašičev (*ex vivo*) ter tekmovati z *Escherichia coli* O8:K88 za vezavo v testnih razmerah tekmovanja, izključevanja ali izpodrivanja. Rezultati so pokazali, da sta seva *L. gasseri* K7 in *L. gasseri* LF221 sposobna vezave na črevesno sluznico prašičev v razmerah *ex vivo*. Prav tako so se na črevesno sluznico dobro vezale bakterije seva *E. coli* O8:K88. Seva *L. gasseri* K7 ter *L. gasseri* LF221 nista izkazala statistično značilnega vpliva na vezavo *E. coli* na črevesno sluznico prašičev (*ex vivo*) v testnih razmerah tekmovanja, izključevanja ali izpodrivanja. Rezultati tega dela so koristni s stališča morebitne uporabe probiotičnih sevov *L. gasseri* K7 in LF221 za zaviranje infekcij pri tej vrsti živali.

#### KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDC 636.4.084/.087:579(043.2)=163.6  
CX pigs/animal nutrition/feed additives/probiotics/*E. coli* O8:K88/*ex vivo* adhesion/zaviranje patogenov  
CC AGRIS L51/5300  
AU ČAMPA, Simona  
AA BOGOVIČ MATIJAŠIĆ, Bojana (supervisor)/MOHAR LORBEG, Petra (co-supervisor)  
PP SI-1230 Domžale, Groblje 3  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Animal Science  
PY 2016  
TI EX VIVO ADHESION OF PROBIOTICS ON THE INTESTINAL MUCOSA OF THE SMALL INTESTINE OF PIGS AND COMPETITION WITH *E. coli* O8:K88  
DT Graduation Thesis (University studies)  
NO XI, 60 p., 5 tab., 14 fig., 18 ann., 99 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB Probiotics as feed additives can to a certain extent prevent, mitigate or shorten the duration of diarrhea in pigs, caused by bacteria of the species *Escherichia coli*. An important role in such activity plays successful adhesion of probiotics on the intestinal mucosa and their ability to compete with pathogenic bacteria for adhesion sites. The aim of our study was to examine whether the probiotic strains *Lactobacillus gasseri* K7 and *Lactobacillus gasseri* LF221 are capable of adhesion to the fresh tissue of the intestinal mucosa of pigs (*ex vivo*) and compete with *Escherichia coli* O8: K88 binding in the test conditions of competition, exclusion or displacement. The results showed that the strain *L. gasseri* K7 and *L. gasseri* LF221 exhibit the ability of adhesion to the intestinal mucosa of piglets in the *ex vivo* conditions. The successful adhesion of *E. coli* O8:K88 was also demonstrated. Strains *L. gasseri* K7 and *L. gasseri* LF221, however, were not demonstrated to exhibit any statistically significant effect on the adhesion of *E. coli* to porcine intestinal mucosa (*ex vivo*) in the test conditions of competition, exclusion or displacement. The results of this work are beneficial from the standpoint of the potential use of probiotic strains *L. gasseri* K7 and LF221 to inhibit infection in this animal species.

## KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key Words Documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	VIII
Kazalo prilog	IX
Okrajšave in simboli	XII
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	<b>3</b>
2.1 PREBAVILA	3
2.2 MIKROBIOTA PREBAVNega TRAKTA	10
<b>2.2.1 Razvoj mikrobiote pri prašičih</b>	<b>13</b>
2.3 PROBIOTIKI	14
<b>2.3.1 Definicija</b>	<b>14</b>
<b>2.3.2 Zgodovina probiotikov</b>	<b>14</b>
<b>2.3.3 Pogoji, uporaba probiotikov</b>	<b>15</b>
<b>2.3.4 Probiotiki za živali</b>	<b>16</b>
<b>2.3.5 Zakonodaja o krmnih dodatkih</b>	<b>18</b>
<b>2.3.6 Načini delovanja probiotikov in probiotičnih krmnih dodatkov</b>	<b>19</b>
2.3.6.1 Kompetitivno izključevanje	19
2.3.6.1.1 Vezava na steno prebavnega trakta z namenom preprečevanja kolonizacije s patogenimi mikroorganizmi	20
2.3.6.1.2 Tekmovanje s patogenimi bakterijami za hranila v črevesju	20
2.3.6.2 Bakterijski antagonizem	21
2.3.6.3 Imunska modulacija	21
2.4 <i>LACTOBACILLUS GASEERI</i> LF221 in <i>LACTOBACILLUS GASEERI</i> K7	22
2.5 <i>ESCHERICHIA COLI</i>	23
2.6 RAZISKOVANJE FUNKCIONALNIH LASTNOSTI PROBIOTIKOV	24
2.7 PROBIOTIKI KOT NADOMESTILO ZA ANTIBIOTIKE	24
<b>3 MATERIAL IN METODE</b>	<b>26</b>
3.1 IZVEDBA POSKUSA	26
<b>3.1.1 Poskusne živali</b>	<b>26</b>
<b>3.1.2 Potek poskusa</b>	<b>26</b>
3.1.2.1 Potek dela	26
3.2 MATERIAL	27
<b>3.2.1 Črevesna sluznica iz tankega črevesa</b>	<b>27</b>
<b>3.2.2 Bakterijski sevi</b>	<b>27</b>
<b>3.2.3 Gojišča</b>	<b>27</b>
3.2.3.1 Trda gojišča	27
3.2.3.2 Tekoča gojišča in diluenti	27

3.3	METODE	28
3.3.1	<b>Obdelava kontrolnih vzorcev črevesne sluznice</b>	<b>28</b>
3.3.2	<b>Optimiziranje protokola vezave bakterij – spiranje nevezanih bakterij</b>	<b>29</b>
3.3.3	<b>Priprava standardiziranih bakterijskih suspenzij</b>	<b>30</b>
3.3.4	<b>Priprava črevesnega tkiva</b>	<b>31</b>
3.3.5	<b>Vezava ali adhezija</b>	<b>32</b>
3.3.6	<b>Spiranje</b>	<b>33</b>
3.3.7	<b>Homogeniziranje</b>	<b>33</b>
3.3.8	<b>Razredčitve in nacepitve na komercialni selektivni gojišči</b>	<b>33</b>
3.3.9	<b>Barvanje po Gramu</b>	<b>33</b>
3.4	STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	34
3.4.1	<b>Statistični model</b>	<b>34</b>
4	<b>REZULTATI</b>	<b>35</b>
4.1	REZULTATI MIKROSKOPIRANJA ČREVESNE SLUZNICE S PRIPETIMI TESTNIMI LAKTOBACILI	35
4.2	REZULTATI KONTROLE SPIRANJA VZORCEV (VZOREC »0«)	36
4.3	NAČIN SPIRANJA (PO ADHEZIJI)	37
4.4	PRIMERJAVA MED KONCENTRACIJO SUSPENZIJE IN VEZANIMI CELICAMI	38
4.5	VEZAVA	39
5	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	<b>44</b>
6	<b>POVZETEK</b>	<b>50</b>
7	<b>VIRI</b>	<b>52</b>
	<b>ZAHVALA</b>	
	<b>PRILOGE</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: pH vrednosti različnih predelov prašičjega prebavnega trakta (Ewing, 2008)	5
Preglednica 2: Probiotiki, običajni v živalski prehrani (Yirga, 2015)	17
Preglednica 3: Razlike v kemični zgradbi celične stene po Gramu pozitivnih in negativnih bakterij	34
Preglednica 4: Kontrola izpiranja prvotne mikrobiote iz koščkov jejunuma (vzorec nič »0«)	36
Preglednica 5: Povprečne koncentracije suspenzij <i>E. coli</i> , ter sevov K7 in LF221 (log KE/ml) v posameznih poskusih celotne naloge, izražene v logaritemskih vrednostih	39

## KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Prebavni sistem prašiča (povzeto po Oregon state University, 2004)	<b>Ошишка!</b>
<b>Закладка не определена.</b>	
Slika 2: Prerez stene tankega črevesa (povzeto po Histologija tankega črevesa, 2016)	6
Slika 3: Črevesna resica in mikroresice (povzeto po Resica-zgradba, 2016)	8
Slika 4: MO prebavnega trakta (povzeto po Mikroorganizmi prebavil, 2016)	11
Slika 5: Mikrobiološke interakcije v črevesju (povzeto po Yirga, 2015)	19
Slika 6: Kopičenje nepatogenih bakterij na patogene (povzeto po Ewing in Cole, 1994)	20
Slika 7: Nepatogene in patogene bakterije pogosto tekmujejo za hranila (povzeto po Ewing in Cole, 1994)	21
Slika 8: Mikroskopski preparati (a-f) črevesne sluznice s pripetimi laktobacili ( <i>L. gasseri</i> K7), pripravljeni z barvanjem po Gramu. Celice laktobacilov so obarvane vijolično, celice enterocitov pa sivo - rumeno	36
Slika 9: Vpliv postopka spiranja	37
Slika 10: Primerjava koncentracije laktobacilov v suspenziji s številom vezanih laktobacilov	38
Slika 11: Vezava <i>L. gasseri</i> K7 na tanko črevo prašičev pri različni začetni koncentraciji	39
Slika 12: Vezava <i>L. gasseri</i> LF221 na tanko črevo prašičev pri različni začetni koncentraciji	41
Slika 13: Zaviranje vezave <i>E. coli</i> , na črevesno sluznico tankega črevesa prašičev, z <i>L. gasseri</i> K7, pri različnih koncentracijah dodane suspenzije <i>E. coli</i> , pod pogoji izključevanja (K7/Ec), izpodrivanja (Ec/K7) in tekmovanja (K7+Ec)	42
Slika 14: Zaviranje vezave <i>E. coli</i> na črevesno sluznico tankega črevesa prašičev z <i>L. gasseri</i> LF221, pri različnih koncentracijah dodane suspenzije <i>E. coli</i> , pod pogoji izključevanja (LF/Ec), izpodrivanja (Ec/LF) in tekmovanja (LF+Ec)	43

## KAZALO PRILOG

- Priloga A: Vpliv poskusa in vpliv skupine v modelu (Laktobacili) - preglednica ANOVA, metoda najmanjših kvadratov.
- Priloga B: P - vrednosti za posamezne vplive modela (log Lb.).
- Priloga C: Vpliv poskusa in skupine v modelu (*E. coli*) - preglednica ANOVA, metoda najmanjših kvadratov.
- Priloga D: P - vrednosti za posamezne vplive modela (log *E. coli*).
- Priloga E: Razlike med logaritmiranimi srednjimi vrednostmi skupin vezane *E. coli* in p-vrednosti za vpliv skupin, pridobljeni z metodo najmanjših kvadratov.
- Priloga F: Razlike med logaritmiranimi srednjimi vrednostmi skupin vezanih laktobacilov K7 oz. LF221 in p-vrednosti za vpliv skupin, pridobljeni z metodo najmanjših kvadratov.
- Priloga G: Razlike med logaritmiranimi srednjimi vrednostmi skupin vezane *E. coli* in p-vrednosti za vpliv skupin, pridobljeni z metodo najmanjših kvadratov.
- Priloga H: Razlike med logaritmiranimi srednjimi vrednostmi skupin vezanih laktobacilov K7 oz. LF221 in p-vrednosti za vpliv skupin, pridobljeni z metodo najmanjših kvadratov.
- Priloga I: Razlike med logaritmiranimi srednjimi vrednostmi vezane *E. coli* in njihove p-vrednosti za vpliv interakcije med poskusom in skupino v prvem poskusu, pridobljeni z metodo najmanjših kvadratov.
- Priloga J: Razlike med logaritmiranimi srednjimi vrednostmi skupin vezanih laktobacilov K7 oz. LF221 in p-vrednosti za vpliv interakcije med poskusom in skupino v prvem poskusu, pridobljeni z metodo najmanjših kvadratov.
- Priloga K: Razlike med logaritmiranimi srednjimi vrednostmi vezanih laktobacilov K7 oz. LF221 in njihove p-vrednosti za vpliv interakcije med poskusom in skupino v drugem poskusu, pridobljeni z metodo najmanjših kvadratov.
- Priloga L: Razlika med logaritmiranimi srednjimi vrednostmi vezane *E. coli* in njihove p-vrednosti za vpliv interakcije med poskusom in skupino v tretjem poskusu, pridobljeni z metodo najmanjših kvadratov.
- Priloga M: Razlika med logaritmiranimi srednjimi vrednostmi vezanih laktobacilov K7 oz. LF221 in njihove p-vrednosti za vpliv interakcije med poskusom in skupino v tretjem poskusu, pridobljeni z metodo najmanjših kvadratov.
- Priloga N: Razlika med logaritmiranimi srednjimi vrednostmi vezane *E. coli* in njihove p-vrednosti za vpliv interakcije med poskusom in skupino v četrtem poskusu, pridobljeni z metodo najmanjših kvadratov.

Priloga O: Razlika med logaritmiranimi srednjimi vrednostmi vezanih laktobacilov K7 oz. LF221 in njihove p-vrednosti za vpliv interakcije med poskusom in skupino v četrtem poskusu, pridobljeni z metodo najmanjših kvadratov.

Priloga P: Razlika med logaritmiranimi srednjimi vrednostmi vezane *E. coli* in njihove p-vrednosti za vpliv interakcije med poskusom in skupino v petem poskusu, pridobljeni z metodo najmanjših kvadratov.

Priloga R: Razlika med logaritmiranimi srednjimi vrednostmi vezanih laktobacilov K7 oz. LF221 in njihove p-vrednosti za vpliv interakcije med poskusom in skupino v petem poskusu, pridobljeni z metodo najmanjših kvadratov.

Priloga S: Kontrola izpiranja prvotne mikrobiote iz koščkov jejunuma (vzorec nič »0«).

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

MKB	mlečnokislinske bakterije
SCAN	Scientific Committee of Animal Nutrition
GRAS	Generally regarded as safe
MO	mikroorganizmi
IML-PRO	Inštitut za mlekarstvo in probiotike
EMB	gojišče, ki vsebuje eozin, metilensko modro, laktodo in saharozo
MRS	gojišče po de Man, Rogosa in Sharpe
PBS	fosfatni pufer s soljo
NaCl	natrijev klorid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	di-natrijev-hidrogen-fosfat-anhidrid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	kalijev dihidrogen fosfat
H <sub>2</sub> O	voda
L.	rod <i>Lactobacillus</i>
LF	<i>Lactobacillus gasseri</i> LF221
K7	<i>Lactobacillus gasseri</i> K7
Ec	<i>Escherichia coli</i> O8:K88
SD	standardna deviacija
KE/ml	število kolonijskih enot v 1 mililitru
KE/g	število kolonijskih enot v 1 g vsebine
FAO	Organizacija združenih narodov za prehrano in kmetijstvo (Food and Agricultural Organization of the United Nations)
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija (World Health Organization)
Pos.1	poskus 1

## 1 UVOD

Probiotiki so živi mikroorganizmi (MO), ki ob zaužitju v zadostni količini pozitivno delujejo na zdravje gostitelja (FAO/WHO, 2001). Tako delujejo bodisi neposredno, ali pa posredno z okrepitevijo fizioloških oz. obrambnih mehanizmov.

Probiotiki se vedno bolj uporabljajo v živinorejski dejavnosti. Pospešena proizvodnja namreč povzroča rušenje bakterijskega ravnovesja v prebavilih proizvodnih živali in posledično črevesna obolenja pri teh. Sledi neučinkovita prebava in absorpcija hranil, nato pa slabši proizvodni rezultati. Do nedavnega so se kot krmni dodatki, ki so zmanjšali pojav drisk in izboljšali konverzijo krme, ter s tem povečali prirast živali, množično in nekontrolirano uporabljali antibiotiki. Njihovi ostanki v živalskih proizvodih prispevajo k širjenju proti antibiotikom odpornih mikroorganizmov, kar predstavlja tveganje za zdravje potrošnikov. V Evropski uniji so leta 2006 uvedli popolno prepoved uporabe antibiotikov kot krmnih dodatkov (Cho in sod., 2011). Probiotiki predstavljajo možno alternativo antibiotikom. Potrebno pa je še veliko pojasniti glede učinkovitosti in osnovnih mehanizmov njihovega delovanja. Uspešen probiotični sev mora ustrezati številnim zahtevam. Med najpomembnejšimi sta sposobnost preživetja v prebavnem traktu in tekmovanja s preostalo črevesno mikrobioto, seveda pa tudi varnost. V črevesju se bakterijam uspe zadržati in delovati le, če se razraščajo hitreje, kot pa poteka sama peristaltika črevesja, ali pa če se vežejo na epitelne celice črevesja (Fuller in Cole, 1988). Sposobnost vezave probiotikov na črevesno sluznico, ter uspešno tekmovanje za vezna mesta na črevesni sluznici oz. preprečevanje vezave predstavnikov *Escherichia coli* (*E. coli*, ki so najpogostejši povzročitelji drisk pri prašičih, so torej pomembni kriteriji za izbiro probiotičnih sevov.

Osnovni namen diplomske naloge je bil proučiti sposobnost vezave humanih izolatov *Lactobacillus gasseri* K7 in *Lactobacillus gasseri* LF221 na črevesno sluznico prašičev ter sposobnost vezave oz. inhibicije vezave *E. coli* O8:K88 na črevesno sluznico prašičev (*ex vivo*). Z obema obravnavanima probiotikoma so bili predhodno uspešno opravljeni že številni testi *in vitro* ter *in vivo*.

Testiranje probiotičnih sevov oziroma izolatov je nujen in dolgotrajen proces, pri katerem lahko uporabimo različne pristope *in vitro*, *ex vivo* in *in vivo*. Rezultati pomagajo pri odkrivanju dejanskega dogajanja v prebavilih.

*Cilji naloge:*

- Ugotoviti, ali sta se seva *L. gasseri* LF221 in *L. gasseri* K7 sposobna vezati na črevesno sluznico prašičev.
- Ugotoviti sposobnost vezave seva *E. coli* O8:K88 na črevesno sluznico prašičev.
- Ugotoviti, ali pride do tekmovanja, izključevanja ali izpodrivanja *E. coli* O8:K88 s strani laktobacilov.

Hipoteze:

1. Seva *L. gasseri* K7 in *L. gasseri* LF221 sta sposobna vezave na črevesno sluznico (*ex vivo*).
2. Bakterije seva *E. coli* O8:K88 so se sposobne vezati na črevesno sluznico prašičev (*ex vivo*).
3. Seva *L. gasseri* K7 ter *L. gasseri* LF221 bosta uspešno tekmovala z *Escherichia coli* za vezavo na črevesno sluznico v različnih testnih razmerah (tekmovanje, izključevanje, izpodrivanje).

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 PREBAVILA

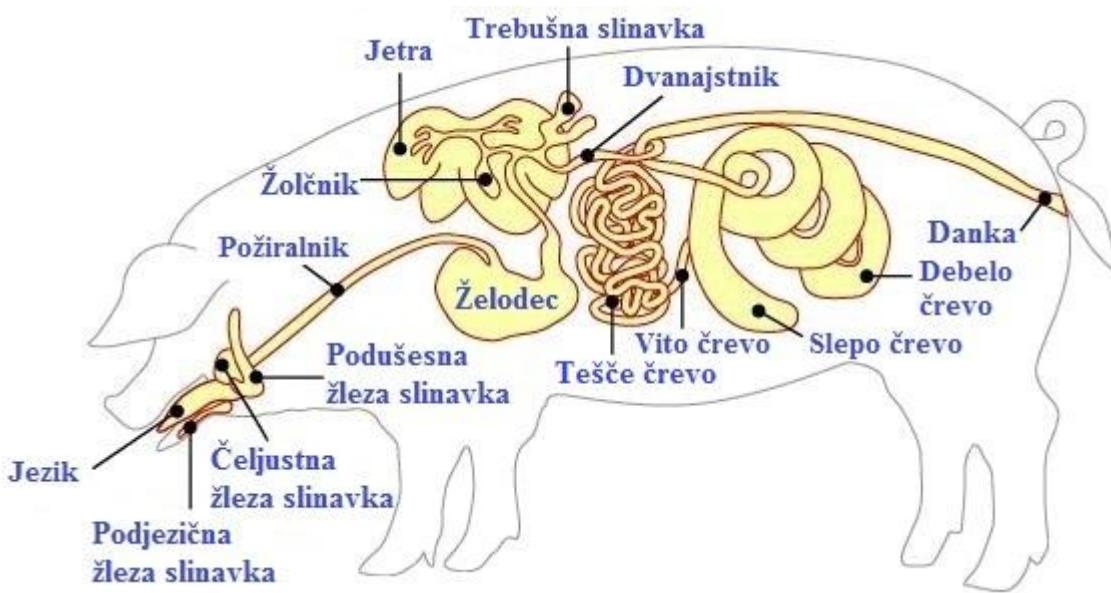
Prebavila oziroma prebavni sistem predstavlja dolga prebavna cev (*tractus alimentarius*), ki sega od ustne odprtine do zadnjika (anus). Prebavna cev sestoji iz treh plasti: sluznice (tunica mucosa), žlezno mišične plasti (tunica muscularis) in vezivnotkivne ali serozne opne (tunica serosa). Dele prebavne cevi izven seroznih open obdaja rahlo vezivno tkivo (tunica adventitia) (Rebesko, 1983).

Notranjost prebavne cevi obdaja sluznica, ki v bližini telesnih odprtin prehaja v zunanjkožo. V ustni votlini, požiralniku in predželodcih prezvekovovalcev, kjer je sluznica izpostavljena močnejšim mehaničnim vplivom, ta prevzame nekatere lastnosti kože, zaradi česar se tudi imenuje kožna ali kutana sluznica. Ta je zaradi slinske in sluzne žleze vlažna in spolzka, je brez žlez in zgrajena iz večplastnega epitela, ki leži na papilarni osnovi. Na močno izpostavljenih mestih vrhnji epitel oroženi (Rebesko, 1983).

Črevesna sluznica prebavnega trakta je v stalinem stiku z vsebino črevesja. Predstavlja povezavo med metabolizmom živali in okoljem, zato ima funkcijo črevesne bariere. Preprečuje vdor patogenih bakterij in antigenov v telo in preprečuje translokacijo bakterij iz črevesa v krvni obtok in druga tkiva (Ewing in Cole, 1994; Kocijančič in sod., 2005; Petrovič in Zorc, 2005; Zorc in sod., 2006).

Plasti črevesne stene so enakomerno pretkane s kolagenskimi vlakni, ki se med seboj škarjasto križajo (škarjasta mreža). Ta mreža se premika s pomočjo mišičnih trakcev mišične opne (tunica muscularis), ki so v njo vrinjeni, kar je za motorično delovanje črevesja (peristaltika) velikega pomena (Rebesko, 1983).

Prebavila se začenjajo z ustno votlino (cavum oris) in žrelom (pharynx), ki se nadaljuje v požiralnik (oesophagus). Slednji sega do želodca (ventriculus seu gaster), v katerega se izliva. Za želodcem se nahaja tanko črevo, ki ga sestavljajo dvanajstnik (duodenum), tešče črevo (jejunum) in kratko vito črevo (ileum). Tanko črevo se izliva v debelo črevo (intestinum crassum), ki ga sestavljajo slepo črevo (caecum), debelo črevo (colon) in danka (rectum) (Rebesko, 1983).



Slika 1: Prebavni sistem prašiča (povzeto po Oregon state University, 2004)

V ustih se hrana prežveči. Žleze slinavke izločajo slino, v kateri so voda, mucin, pri nekaterih rastlinojedih živalih in človeku pa še amilaze, ki pomagajo pri razgradnji škroba v maltozo.

Dobro prežvečena in napojena hrana potuje po požiralniku v želodec. Prašiči, perutnina in ljudje so neprežvekovalci in imajo enodelen želodec. Zaradi tega se ne zanašajo na simbiotski odnos z mikrobioto v prebavnem traktu, kot prežvekovalci, pri katerih je to za preživetje zelo pomembno. Pri neprežvekovalcih pa bakterijska populacija prebavnega trakta hrane ni sposobna razkrojiti in fermentirati v tolikšni meri, da bi razcepila neprebavljive materiale do snovi, ki jih telo lahko absorbira. Manj raznolika mikrobiota v primerjavi s prežvekovalci torej pomeni, da imajo neprežvekovalci manjšo sposobnost prebavljanja, zato so zanje potrebe po hrani z višjo hranilno vrednostjo nujne. Slabo kakovostno, revno krmo, ki vsebuje velike količine celuloze, lignina in strukturnih ogljikovih hidratov, ne izkoriščajo dobro, zato potrebujejo kakovostnejšo prehrano, sploh kar se tiče vsebnosti aminokislín in vitaminov (Ewing in Cole, 1994).

Želodec je organ prebave in skladiščenja. Pri odraslem prašiču je njegova kapaciteta okrog 8 litrov. Čeprav je to enodelen želodec, ga delimo na štiri poglavitejše cone (srčna, želodčna, pilorusna in požiralniška). Hormon pilorin v pilorusni regiji stimulira proizvodnjo črevesnega soka. pH prašičjega želodca je okrog 2. V končni fazi proteazni encimi v črevesnem soku razcepijo polipeptide v krajše aminokislinske verige. Protein je končno razdeljen na enostavne peptide ali aminokislíne. Požiralniški del želodca ne proizvaja nobenih žleznih izločkov. V požiralniku so v vseh obdobjih življenja živali prisotni laktobacili (Tannock in Smith, 1970). Tip in število bakterij, še posebej laktobacilov in streptokokov, je odvisno od njihove sposobnosti vezave in koloniziranja površine sluznice.

Normalna vrednost pH v želodcu prašičev je pod 3,5. Takšna vrednost pH ima dvojno funkcijo: omogoča nemoteno delovanje želodčnih encimov in preprečuje vdor nezaželenih

mikroorganizmov v tanko črevo. Pri slabo razvitih prebavilih novorojenih prašičev za zadostno zakisanje poskrbijo mlečnokislinske bakterije, ki mlečni sladkor (laktozo) spremenijo v mlečno kislino in tako ustvarijo ustrezeno vrednost pH. Problem nastane vselej ob spremembi krme. Zadrževanje te v prebavilih, dokler se encimski sistem tankega črevesa ne pripravi nanjo, in pa višji pH v želodcu omogoča razvoj nevarnih patogenih mikroorganizmov (Bolduan in sod., 1988).

pH črevesja se od ust, preko želodca, pa vse do danke močno spreminja (Preglednica 1). Vsebina želodca je močno kisla zaradi klorovodikovih kislin, proteaz in žolčnih soli, ter lahko doseže tudi pH 1,5. Vendar pa je pH odraslih živali ponavadi okrog 2,5-4,5 (še posebej pri prašičih) in 4,5-7 pri mladih sesnih pujskih. pH želodca je v obratnem sorazmerju z zastopanostjo bakterij. Kadar je koncentracija mikrobov visoka, se poveča fermentacija v lumnu, črevesna prebava (razgradnja krme do oblike, primerne za absorpcijo) pa se zato odvija kasneje. Visoka zakisanost želodca limitira rast mikroorganizmov (Ewing in Cole, 1994).

pH slepega in debelega črevesa je bolj nevtralen (pH 6-8), zato tu poteka mnogo mikrobioloških aktivnosti. Višje pH vrednosti bi črevesnim patogenom, npr. *E. coli*, nudile ugodne pogoje za prehitro rast (Ewing in Cole, 1994).

Preglednica 1: pH vrednosti različnih predelov prašičjega prebavnega trakta (Ewing, 2008)

Področje	pH
Želodec	1,5-6,0
Dvanajstnik	6,0-8,5
Sleplo črevo	6,0-9,0
Ostali predeli debelega črevesa	8,0-9,0

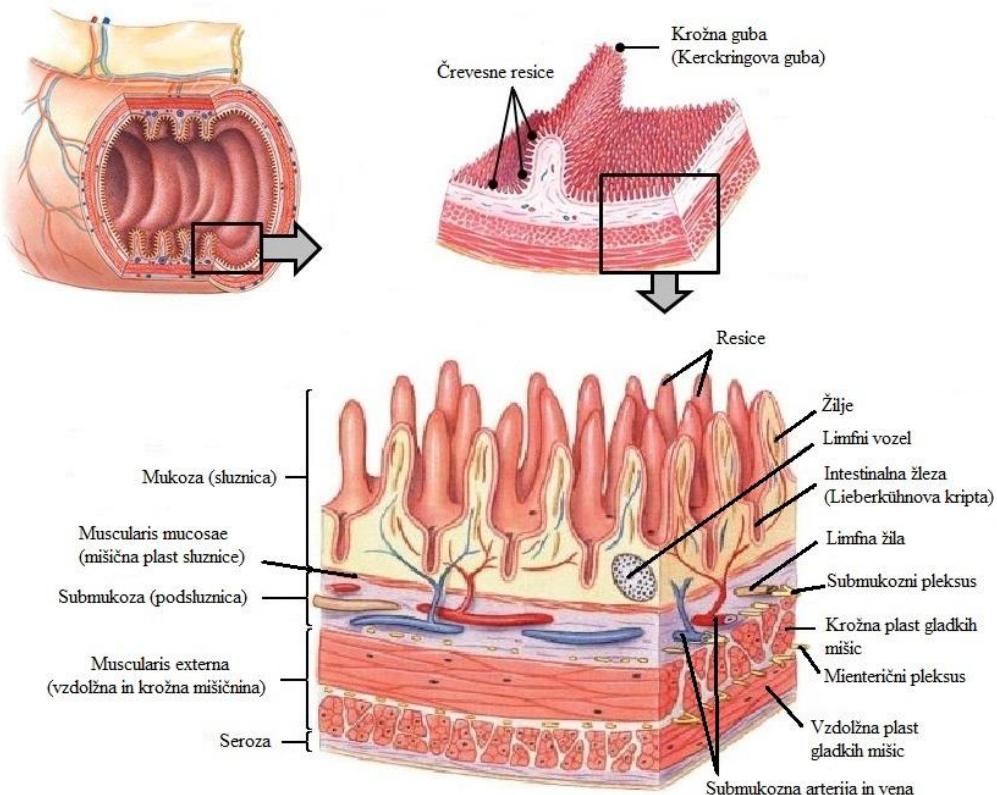
Črevesni kanal (intestinum) sestoji torej iz prednjega, tanjšega dela, to je tanko črevo (intestinum tenue) in zadnjega, širšega dela, imenovanega debelo črevo (intestinum crassum). Kanal sega od želodčnega vratarja (pilorusa) do kratkega končnega dela, zadnjika (anus) (Rebesko, 1983).

Tanko črevo je dolg, cevast, zavit organ, ki se prične pri želodčnem vratarju (pilorusu) in konča pri ileo-cekalcnem delu (vito črevo se tu odpira v debelo črevo). Njegova dolžina pri odraslem prašiču lahko meri tudi nad 20 metrov in zavzema eno tretjino volumna prebavnega trakta (Ewing, 2008).

Tanko črevo je sestavljenlo iz treh delov (slika 1):

- dvanajstnika (duodenum), predstavlja začetni, proksimalni del tankega črevesa, vanj se izlivajo izločki trebušne slinavke in žolč jeter,
- teščega črevesa (jejunum), ki zavzema kar 85% celotne dolžine tankega črevesa,
- vitega črevesa (ileum), ki predstavlja končni, distalni del tankega črevesa (Ewing, 2008).

Stena tankega črevesa (slika 2) je sestavljena iz štirih plasti (tunik): sluznice (mukoza) in podsluznice (submukoza), gladko-mišičnega sloja (muscularis externa) in seroze (Ewing in Cole, 1994; Pocajt in Širca, 1997).



Slika 2: Prerez stene tankega črevesa (povzeto po Histologija tankega črevesa, 2016)

Mukoza (sluznica) tankega črevesa (slika 2) je sestavljena iz treh slojev: epitelni sloj, rahlo vezivno tkivo (lamina propria) in mišična plast sluznice (muscularis mucosae) (Pocajt in Širca, 1997; Kocijančič in sod., 2005; Petrovič in Zorc, 2005; Tanko črevo, 2015).

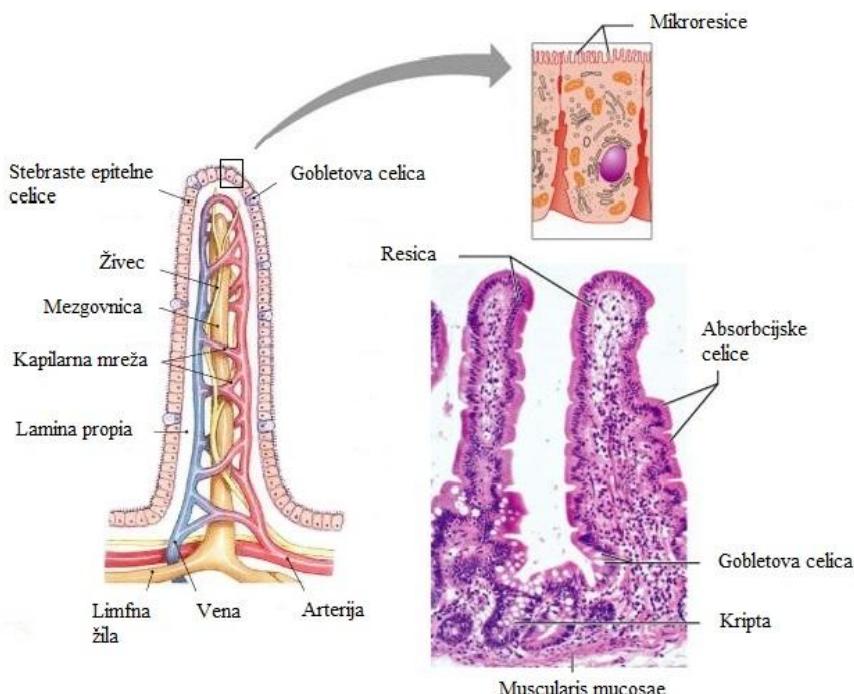
Epitelni sloj ali epitelij (epithelium) je sluznica, ki jo tvorijo enoskladne visokoprizmatske vpojne celice, imenovane enterociti in gobletove celice. Izločajo sluz (mukus), ki ščiti epitelij. Mukus med drugimi sestavljajo glikoproteini in imunoglobulini. Vse epitelijske celice sluznice tankega črevesa nastanejo iz istih izvornih celic, ki so na dnu vdolbinic oz. Liberkühnovih kript. Črevesni epitelij se nenehno obnavlja, saj se vsak dan odlušči in na novo razvije več kot milijarda epitelijskih celic (Pocajt in Širca, 1997; Kocijančič in sod., 2005; Petrovič in Zorc, 2005; Tanko črevo, 2015).

Črevesni epitelij je sluznica z največjo površino, v kateri se usklajeno odvijajo prebava, absorpcija, endokrine in imunske funkcije. Epitelne celice izločajo sluz (mukus), ki ščiti prebavni trakt in tudi omogoča različnim bakterijam, da se pripenjajo in se tako v črevesju zadržijo dalj časa. Te bakterije lahko pomagajo pri razgrajevanju hrane ter sodelujejo pri vzpostavljanju, delovanju in obnovi imunskega sistema (Kocijančič in sod., 2005; Petrovič in Zorc, 2005; Pocajt in Širca, 1997; Tanko črevo, 2015).

Lamino proprio je pomembna bariera proti vdoru patogenih bakterij. Tvorijo jo limfociti, makrofagi in mnoge druge celice, ki so del črevesnega imunskega sistema in sodelujejo pri imunskem odzivu. V Lamino proprio se skoraj do mišične plasti sluznice med resicami vdirajo jamice epitelija, imenovane Liberkühnove kripte. Izločajo bazičen črevesni sok, z veliko količino sluzi in encimov, potrebnih za razgradnjo hrane. Črevesni sok tu izločajo tudi številne žleze (Pocajt in Širca, 1997; Kocijančič in sod., 2005; Petrovič in Zorc, 2005).

Sluznica (tunica mucosa) ima zaradi velike površine veliko absorptivno (vsrkovalno in izločevalno) sposobnost. (Kocijančič in sod., 2005 in Petrovič in Zorc, 2005). To povečanje ji omogočajo tri vrste gub, iz katerih je sestavljena:

- 1) Kerckringove gube (plicae circulares) (Slika 2) so gube, ki potekajo prečno glede na luminalno površino tankega črevesa, ter so spiralaste, krožne oblike. Nahajajo se v dvanajstniku, najbolj izrazite so v teščem in v prednjem delu vitega črevesa, nato se znižujejo in proti koncu tega izginejo. S pomočjo peristaltike mešajo zaužito hrano, absorptivno površino pa povečajo za 3-krat (Kocijančič in sod., 2005; Petrovič in Zorc, 2005).
- 2) Črevesne resice ali vili (villi intestinales) (Slika 3) so izrastki sluznice, visoki okrog 1 mm, ki podobni prstkom segajo daleč v lumen črevesa. Absorptivno površino sluznice povečajo za 10-krat. Prekrivajo jih epitelne celice (epitelij), večinoma sestavljen iz absorptivnih enterocitov. Sredino resic zapolnjujejo prepletena živčna vlakna, krvne žilice, limfne kapilare, gladke mišične celice in rahlo vezivo z limfociti. Najpogosteje in najviše so v začetku dvanajstnika, do konca vitega črevesa se postopoma skrajšajo, razredčijo in tako zmanjšajo tudi površino resic (Kocijančič in sod., 2005; Petrovič in Zorc, 2005). Na velikost resic vplivajo prehrana, starost in vrsta živali, ter izločki želodca, trebušne slinavke in jeter. Dokazano je, da se prašičem po odstavitvi zaradi stresa resice skrajšajo (Ewing in Cole, 1994), prav tako so zapisi o popolni deformaciji resic in kript pri človeku z boleznijsko imenovano celiakijo (Dolinšek in sod., 2006).



Slika 3: Črevesna resica in mikroresice (povzeto po Resica-zgradba, 2016)

Pri pujskih so v fetalnem obdobju resice ozke, nepravilnih višin in sorazmerno redke. Prvih deset dni po rojstvu pa se močno povečata masa tankega črevesa in masa sluznice. Močno se povečujejo tudi premer in dolžina tankega črevesa (Cranwell, 1995). Po približno 14. dnevu življenja je morfologija tankega črevesa pri pujskih podvržena velikemu zmanjšanju mase resic in hkrati povečanju širine resic in kanalov kript. Med odstavitevijo pa so spremembe še večje (Cranwell, 1995).

Med resicami so vdolbinice, imenovane Lieberkühnove kripte (*glandulae intestinales*) (slika 2). To so cevaste črevesne žleze, ki izločajo bazični črevesni sok z veliko sluzi in encimi, potrebnimi za razgradnjo hrane. Tudi kripte povečajo absorpcijsko površino črevesa. Vsebujejo pri regeneraciji tkiva pomembne črevesne izvorne oz. matične celice, ki so osnova za nastanek različnih vrst epitelijskih celic (enterocitov, čašastih celic, enteroendokrinih celic) (Pocajt in Širca, 1997; Kocijančič in sod., 2005; Petrovič in Zorc, 2005; Tanko črevo, 2015; The Histology Guide, 2016).

3) Mikroresice ali mikrovili (Slika 3) se nahajajo na epitelijskih celicah oz. enterocitih resic. Vsaka celica ima od 3000 do 7000 mikroresic. Absorptivno površino tankega črevesa povečajo za 20-krat. Dolge so približno 1 µm, njihov premer pa je 0,1 µm. Prekriva jih posebna plazemska membrana, kjer so prisotni tudi glavni sluznični prebavni encimi (npr. aminopeptidaze, lipaze, disaharidaze) (Kocijančič in sod., 2005; Petrovič in Zorc, 2005; The Histology Guide, 2016).

Submukozo (Slika 2) sestavlja vezivo, krvne in limfne žile, živci, živčni vozli, lahko tudi maščobne celice. Tu so Brunnerjeve žleze, ki izločajo viskozno tekočino, ki ščiti proksimalni del tankega črevesa in nevtralizira kislo vsebino, ki pride iz želodca (Kocijančič in sod., 2005; Petrovič in Zorc, 2005).

Mišični sloj (Slika 2) je iz vzdolžne in krožne mišičnine. Te mišice omogočajo peristaltično gibanje ob procesu prebave, saj se ritmično krčijo. Medtem ko vzdolžna mišičnina s krčenjem prestavlja vsebino črevesa naprej proti debelemu črevesu, krožna mišičnina omogoča stik s sluznico ter meša črevesno vsebino s prebavnimi sokovi (Petrovič in Zorc, 2005; Pocajt in Širca, 1997).

Seroza (Slika 2) sestoji iz ploščatega epitelija na zunanji strani tankega črevesa. Razen proti koncu dvanajsternika, je sicer prisotna po vsej dolžini tankega črevesa (Petrovič in Zorc, 2005).

Ko delno prebavljena hrana prispe v tanko črevo, se tu izvrši pomemben, dokončen del prebave. Razgradnja krme poteka s pomočjo žolča, izločkov trebušne slinavke in dvanajstnika. Ogljikovi hidrati in maščobe se cepijo na osnovne sestavne dele, ki jih stena tankega črevesa absorbira, nato potujejo do jeter in kasneje v krvni obtok. Pomembna je mikrobna fermentacija (tako pri monogastričnih živalih, še bolj pa pri prežvekovalcih) in proizvodnja encimov ter hormonov. Številčnost mikrobiote proti debelemu črevesu narašča. Tu poteka glavni del absorpcije končnih produktov prebavnih procesov. Absorpcija pa poteka lažje zaradi resic (Ewing in Cole, 1994).

Glavne fiziološke naloge tankega črevesa so torej prebava hrane in absorpcija hranil, elektrolitov in vode, pomembne pa so tudi metabolna, endokrina (tvorba hormonov), imunska (obramba pred bakterijami, endotoksi in antigeni), živčna (tvorba nevrotransmiterjev) in sekretorna dejavnost (Kocijančič in sod., 2005; Ross in sod., 2004; Ovejero in Negri, 1993).

### Debelo črevo

Debelo črevo je sestavljeno iz slepega črevesa (caecum), debelega črevesa (kolon), danke (rekturn) in anusa.

Debelo črevo nima resic, ima pa tankemu črevesu podobno histološko zgradbo, vendar debelejšo sluznico z globljimi kriptami. Epitelij ne vsebuje Panethovih celic, katerih funkcija v tankem črevesu je tudi zaščita izvornih celic, protimikrobnog delovanje in vzdrževanje črevesne intestinalne pregrade. Je pa epitelij debelega črevesa zgrajen iz kolumnarnih absorptivnih (vpojnih) celic s progastimi mejami, veliko gobletovih (čašastih) in endokrinih celic, in pa matičnih celic, toda ne Panethovih. Površinske epitelne celice so obrnjene v lumen in se tedensko obnavljajo. Lamina propria in submukoza sta podobni kot v tankem črevesu. Zunanji mišični sloj debelega črevesa je iz treh vzdolžnih plasti gladkih mišic, pri anusu pa krožne mišice tvorijo analni sfingter (The Histology Guide, 2016; Ewing, 2008).

Dokončen razkroj hrane v debelem črevesu omogoča več milijard tu živečih bakterij. Pri tem nastajajo plini ogljikov dioksid, vodik, vodikov sulfid in metan. Sluznica v debelem črevesu izloča sluz, ki maže iztrebke in jim lajša pot, protitelesca v njej pa organizem ščitijo pred bakterijskimi okužbami. Ne izloča pa prebavnih sokov in encimov, saj je

prebava hrane tukaj že končana, dokončna razgradnja neprebavljenih sestavin pa je odvisna od bakterij (Rebesko, 1983; Černe, 1996; Petrovič in Zorc, 2005; McDonald in sod., 2010).

Funkcije debelega črevesa so resorpcija vode, natrija in nekaterih vitaminov, iz kaše, katera prihaja iz tankega črevesa, pa mora tvoriti iztrebke, ter vse do izpraznitve zadrževati blato (McDonald in sod., 2010).

## 2.2 MIKROBIOTA PREBAVNEGA TRAKTA

Črevesna mikrobiota vsebuje raznolike mikroorganizme, ki naseljujejo prebavila. Sem spadajo poleg bakterij tudi virusi, glice in arheje, ki so prav tako običajni prebivalci črevesa (Quigley, 2013).

Mikrobiota predstavlja enega izmed najbolj izpopolnjenih mikrobnih ekosistemov. Pri vsakem posamezniku je mikrobiota stabilna in zanj specifična. Število mikroorganizmov narašča vzdolž prebavne poti. Pri zdravem osebku prevladujejo zdravju koristni mikroorganizmi, prisotnih pa je tudi nekaj patogenov (Rajilić Stojanović in de Vos, 2014; Qin in sod., 2010; Ley in sod., 2006).

Študij črevesne ekologije je postal eden najbolj atraktivnih. Sodobne, molekularno genetske metode odkrivajo tudi tiste vrste, ki jih s klasičnimi mikrobiološkimi metodami ni bilo možno videti (Scheinbach, 1998; Dunne in sod., 2001). Pri človeku je znanih čez 1000 različnih filotipov črevesnih bakterij, od katerih je večji del striktnih anaerobov (Qin in sod., 2010; Rajilić Stojanović in de Vos, 2014). Mikrobna populacija prebavnega trakta je zelo dobro prilagojena na okolje gostitelja, med posamezniki in različnimi starostnimi skupinami pa se zelo razlikuje. Vsaka sprememba v mikrobnem ravnotežju lahko povzroči preobrat iz koristnega v škodljivo delovanje (saj mikrobiota prispeva tako k homeostazi zdravja, kot patogenezi bolezni (Quigley, 2013).

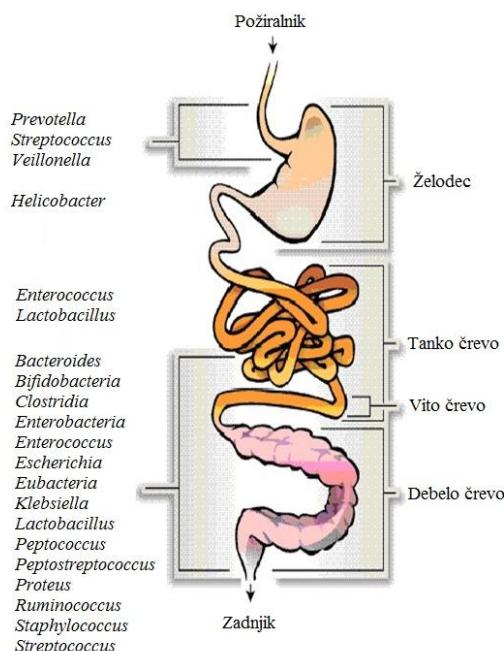
Bakterije vstopajo v telo skozi ustno votlino in nadaljujejo pot po prebavnem traktu. V želodcu jih večinoma uniči želodčni sok, zato jih ostane le malo, najpogosteje po Gramu pozitivne fakultativno anaerobne bakterije, npr. *Streptococcus*, *Staphylococcus* in *Lactobacillus*. Podobna, vendar številčnejša je nato populacija bakterij v tankem črevesu (dvanajstnik in tešče črevo). Največ je po Gramu pozitivnih aerobov, nekaj pa je tudi koliformnih in anaerobnih bakterij (Goldin in sod., 1988).

Bakterije so prokariotski organizmi. Se hitro namnožujejo (npr. generacijski čas bakterije *E. coli* je v ugodnih pogojih 15-20 minut), zaradi svoje majhnosti pa so izredno prilagodljive. Lahko so sferične, paličaste ali zavite oblike, glede na delitev nastanejo tudi pari (diplokoki), grozdasti skupki (stafilocoki), verižice (streptokoki, streptobacili) ali paketi po 4 do 8 celic (sarcine) (Smole-Možina in Marić, 1992). Bakterije se glede na razlike v zgradbi celične stene, ki jih ugotovimo z diferencialnim barvanjem po Gramu, delijo v dve veliki skupini: po Gramu pozitivne ( $G^+$ ) in po Gramu negativne ( $G^-$ ).

Naseljenost z mikrobioto v prebavnem traktu človeka, ki je zelo podoben prašičjemu, narašča od zelo redko naseljenega želodca, prek dvanajstnika in tankega črevesa do obilno naseljenega debelega črevesa. Tekom življenja sta število in sestava bakterijske združbe vzdolž prebavil spremenljiva. Skupno število bakterij v želodcu je običajno pod  $10^4$  kolonijskih enot /g vsebine (CFU/g; colony forming units), od tega je število bifidobakterij (BF) do  $10^2$  CFU/g, laktobacilov (LB) do  $10^3$  CFU/g. Vzrok nizkemu številu je kisla vsebina (Goldin in sod., 1988; Teskač in sod., 2008; Medigan in Martinko, 2005).

V tankem črevesu najdemo različno veliko bakterij glede na predel. Do  $10^4$  KE/ml vsebine jih je v začetnem delu, do  $10^5$  KE/g v jejunumu, sledi ileum z  $10^4$ - $10^9$  CFU/g bakterij. Glavni omejitveni dejavnik za poselitev bakterij v tankem črevesu je hiter prehod hrane, ter izločki žolča in pankreasnih encimov (Goldin in sod., 1988; Teskač in sod., 2008; Medigan in Martinko, 2005).

Debelo črevo je precej gostejše poseljen mikrobeni ekosistem. Gram vsebine vsebuje od  $10^9$  do  $10^{12}$  KE bakterij. Prevladujejo anaerobne bakterije, ki jih je veliko več kot aerobnih. Količinsko sta tako pri živalih kot pri človeku najpomembnejši skupini *Bacteroides* (do 30%) in bifidobakterije (do 25%). Številčno prevladujejo po Gramu negativne vrste *Bacteroides* (npr. *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides fragilis* in *Bacteroides thetaiotaomicron*). V tem rodu so tako proteolitične kot saharolitične vrste. Najštevilčnejše anaerobne bakterije so predstavnice *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Fusobacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Peptococcus* in *Peptostreptococcus*. V manjšem obsegu so prisotne še številne druge vrste (Goldin in sod., 1988; Teskač in sod., 2008).



Slika 4: MO prebavnega trakta (povzeto po Mikroorganizmi prebavil, 2016)

Nekateri mikroorganizmi rastejo na površini resic (epitelija), drugi živijo prosto v lumnu črevesja, tretji pa se razraščajo po kanalih kript in po epitheliju. V vsakem posamezniku se vzpostavi značilna združba bakterij, ki so med seboj v ravnotesju. Za to ravnotesje skrbi

stalna selekcija s snovmi okolja prebavil, kot npr. vodikov sulfid, hlapljive maščobne in žolčne kisline, lizolecitin, lizocin in imunoglobini. Razen tega se morajo bakterije spopadati še s konstantnim peristaltičnim gibanjem hrane iz prednjih delov črevesja proti zadnjim. V črevesju jim uspe ostati, če se razraščajo hitreje, kot poteka sama peristaltika črevesja, ali če se vežejo na epitelne celice črevesja (Fuller in Cole, 1988).

Pri mlečnokislinskih bakterijah, vključno z bifidobakterijami, je bilo dokazano, da lahko ovirajo vezavo in/ali invazijo patogenov na črevesnih epitelnih celicah. Vezava je prvi pogoj za kolonizacijo gastrointestinalne črevesne sluznice, zaviranje vezave pa je lastnost, ki lahko pomaga preprečiti ali zmanjšati infekcijo (Bogovič Matijašič in sod., 2006).

Mikroorganizmi, ki naseljujejo sluznico, predstavljajo učinkovito oviro za patogene bakterije, saj zasedajo mesta pripenjanja in s tem preprečujejo njihovo vezavo na sluz ali črevesne epitelne celice, proizvajajo protimikrobne snovi in tekmujejo s patogenimi bakterijami za hranilne snovi (Vaughan in sod., 1999). Raziskave kažejo, da tudi uravnavajo homeostazo gostiteljevih obrambnih mehanizmov, ter da obstaja komunikacija med mikroorganizmi, črevesnimi epitelnimi celicami in imunskimi celicami.

Bakterije, ki prebivajo na površini ali v notranjosti sluznice, sodelujejo v interakcijah z imunskim sistemom gostiteljice, medtem ko so tiste, ki prosto zapolnjujejo lumen, dejavnejše pri presnovi hrane in interakcijah s presnovki. Živijo v sožitju z gostiteljem in korist je obojestranska. Ni dvomov o tem, da imajo velik pomen pri ohranjanju zdravja in razvoju bolezni. Problem pri raziskovanju predstavlja nedostopnost populacij v tankem in debelem črevesu, zato je bila večina raziskav črevesne mikrobiote narejena na podlagi fekalnih vzorcev, kar pa predstavlja veliko omejitve, saj ne pokaže popolne slike dogajanja v črevesju (Carroll in sod., Chang, Y. H., Packey, C. D., Sartor, E. B., Ringel Y. 2011; Swidsinski in sod., 2005; Quigley, 2013).

Mikrobioti v prebavilih pripisujemo vrsto učinkov na gostitelja, med katerimi so najpomembnejši naslednji:

- učinkovanje na bakterije v prebavilih s kislinami (mlečna, ocetna, maslena, propionska kislina) in vodikovim peroksidom protimikrobnimi snovmi (bakteriocini in drugimi), ki jih izločajo,
- tekmovanje s patogenimi mikrobi za vezna mesta na sluznicah (npr. *E. coli* s K88 antigenom),
- tekmovanje za hranila,
- spodbujanje imunskega sistema,
- vpliv na imunski sistem.

Vsaka sprememba v mikrobnem ravnotežju lahko povzroči preobrat iz koristnega v škodljivo delovanje. Do škodljivega delovanja pa privede tudi prehajanje bakterij skozi sluznico črevesja ob nepravilnem delovanju sluznične ovire. Dokazi na živalih kažejo, da so vzroki za prehajanje povečana prepustnost črevesne sluznice, prehitra rast bakterij v tankem črevesu in nepravilnosti v imunski zaščiti gostitelja. Živi MO, ki z limfo pridejo v notranje organe, npr. jetra, se lahko razširijo po vsem telesu in povzročijo sepsko, odpoved organov, šok ali smrt. Ciroza jeter, pankreatitis, črevesna vnetja in črevesno zaprtje so

bolezni, pri katerih prihaja do povečanega prehajanja bakterij (Guarner in Malagelada, 2003).

Na sestavo in delovanje mikroorganizmov torej vplivajo gostitelj, bakterijski dejavniki in okolje. Vlogo mikrobiote, ki jo lahko smatramo kar za organ, pri vzdrževanju zdravja oziroma razvoju bolezni, so v preteklosti podcenjevali. Številna nova dognanja pa kažejo na povezave med bolezenskimi stanji in mikrobioto ter odpirajo možnosti za terapevtsko uporabo mikroorganizmov, preko spreminjanja mikrobiote (Quigley, 2013; Marchesi in sod., 2016).

### 2.2.1 Razvoj mikrobiote pri prašičih

Ob rojstvu je črevesje pujskov sterilno in predstavlja idealen medij za hitro razrast bakterij, ki jih žival dobi iz okolja (Maxwell in Stewart, 1995; McDonald in sod., 2010). Že po treh urah je prisotna manjša populacija mikroorganizmov. Pri večini živali najprej kolonizirajo črevo nepatogeni sevi vrste *Escherichia coli*, ter predstavniki rodov *Streptococcus* in *Lactobacillus*. Kasneje, ko aerobne bakterije porabijo kisik, postanejo dominantne anaerobne bakterije, npr. *Clostridium*. 10-12 ur po rojstvu vsebuje 1 g blata že  $10^8$  -  $10^9$  bakterij. Laktobacili postanejo glavni prebivalci želodca in tankega črevesa po prvem dnevu. Prisotnost *Bacteroides sp.* je opažena šele 32 ur po rojstvu, po tem času pa predstavljajo najštevilčnejši delež uravnovešene mikrobiote debelega črevesa (Maxwell in Stewart, 1995).

Novorojeni prašiček pridobi mikrobioto v porodnem kanalu, iz bližnje okolice, glavni vir pa predstavlja materino blato. Določene bakterije imajo lastnosti, ki jim omogočijo dobro tekmovalnost, zaradi česar njihovo število zelo poraste, tako da predstavljajo glavni del mikrobiote. Problemi se lahko pojavijo s prisotnostjo patogenih mikroorganizmov, ki pa motijo razvoj normalne mikrobiote (Maxwell in Stewart, 1995). Škodljive, strupene ali patogene bakterije, ki kolonizirajo v prebavnem traktu, proizvajajo strupene odpadne produkte, ti pa vodijo k plinjenju, napenjanju, driski, zaprtju, razjedam ali zastrupitvi s hrano (FEFANA). S probiotiki lahko na naraven način zajezimo to invazijo patogenov. Koristni mikroorganizmi proizvajajo encime, ki dopolnjujejo prebavne sposobnosti gostitelja, njihova prisotnost pa predstavlja oviro pred preplavitvijo patogenov (Yirga, 2015).

Pri prašičih poteka glavni del mikrobne prebave v debelem črevesu, kjer sodelujejo mikroorganizmi. Pred tem prebavni encimi mikrobiota tankega črevesa že opravijo svojo nalogu. Lastno amilazo vsebujejo samo nekatere vrste, npr. *Bifidobacterium bifidum*, *Streptococcus equinus*, *S. bovis*, *Clostridium butyricum* in *Cl. perfringens*, medtem ko večina vrst črevesnih bakterij pri prašičih razgrajuje monosaharide (fruktozo, glukozo in galaktozo). Bakterije vrste *Cl. butyricum* pri prašiču predstavljajo glavni izvor alfa-amilaze v debelem črevesu, v slepem črevesu pa se z njihovo pomočjo prebavi surov škrob. Kuhan škrob se prebavi že v tankem črevesu. Laktobacili in streptokoki fermentirajo maltotozo in maltotriozo do mlečne kisline iz katere kasneje nastanejo hlapne maščobne kisline. Prašič nima lastnih celulolitičnih encimov, zato mikrobiota pomembno prispeva k prebavi hrane (Černe, 1996).

## 2.3 PROBIOTIKI

### 2.3.1 Definicija

Izraz probiotik, z današnjim pomenom, je prvi uporabil Parker leta 1974 (cit. po Fuller, 1992). Probiotike je označil kot organizme in snovi, ki prispevajo k črevesnemu mikrobnemu ravnotežju. Izraz je uporabil za opis dodatkov živalski krmi, ki pospešujejo rast. Parkerjevo definicijo je preoblikoval Fuller (2006), ki je opisal probiotike kot žive mikrobne dodatke krmi, ki ugodno vplivajo na žival gostiteljico, z izboljšanjem njenega črevesnega mikrobnega ravnotežja. Dolgo je bila definicija omejena samo na uporabo v živalski prehrani.

Razširitev definicije na uporabo v človeški prehrani je prispevala k razvoju in dodajanju probiotikov na različnih področjih (respiratorni trakt, urogenitalni trakt, koža). Po Huis in't Veldu in Havenaarju (1991) se glasi opis probiotikov kot »mono- ali mešanih kultur živilih mikroorganizmov, ki učinkujejo koristno na človeka in žival z izboljšanjem lastnosti obstoječe (lastne) mikrobiote«.

Leta 1988 sta Guarner in Schaafsma zapisala, da so to živi mikroorganizmi, ki ob zaužitju ob zadostni količini pozitivno delujejo na zdravje neposredno, ali posredno z okrepitevijo fizioloških oziroma obrambnih mehanizmov. Kasneje je bil uveden tudi pojem probiotično aktivna snov, saj so ugotovili, da stimulacija imunskega sistema ni omejena zgolj na žive celice, kot je bilo najprej mišljeno, ampak gre za celične komplekse (mrtve celice ali dele celic) mlečnokislinskih bakterij ali drugih probiotičnih mikroorganizmov, ki tudi vplivajo na imunski odgovor in na funkcijo črevesne sluznice (Naidu in sod., 1999).

Danes uveljavljena definicija probiotikov, ki sta jo sprejeli tudi organizaciji FAO in WHO, pravi, da so to živi MO, ki ob zaužitju v zadostni količini pozitivno delujejo na zdravje gostitelja (FAO/WHO, 2001; Hill in sod., 2014).

### 2.3.2 Zgodovina probiotikov

Uživanje hrane z mikrobiološko aktivnostjo se je začelo že v začetku človeške civilizacije. Fermentirano mleko je najverjetneje bilo prvo živilo, ki je vsebovalo aktivne mikroorganizme. Znanstvene raziskave o pozitivnih učinkih uživanja fermentiranih mlečnih izdelkov pa so se pričele v začetku 20. stoletja (Jimenez, 2010; Yirga, 2015).

Konec 19. stoletja so bili narejeni zapisi o prvi uporabi mikroorganizma *Bacterium terumo*. Te bakterije je Arnold Canani pri zdravljenju pljučne tuberkuloze s sprejem neposredno vnesel v pljuča in ugotovil pozitivne učinke (Fuller, 1999).

V začetku prejšnjega stoletja so ugotovili, da Bolgari povprečno živijo dalj časa, kar naj bi bilo posledica uživanja jogurta. Nobelov nagrajenec Ilija Metchnikov, ki je takrat deloval na Pasteurjevem inštitutu v Parizu, je pojasnjeval, da *Lactobacillus bulgaricus* in *Streptococcus thermophilus* iz jogurta izpodrineta črevesne mikrobe, ki proizvajajo toksine

(avtointoksikacija). Deloma je bila kasneje trditev ovržena, saj organizmi iz jogurta v črevesu ne preživijo najbolje, okrepilo pa se je prepričanje, da je uživanje teh in drugih mlečnokislinskih mikroorganizmov zelo koristno (Fuller, 1999; Jimenez, 2010). Delo Metchnika je vodilo do sodobnih jogurtov, pridobljenih iz mleka, fermentiranega z *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in *Streptococcus thermophilus* (Fuller, 1999). Danes vemo, da ti dve vrsti ponavadi uporabljajo in sta tipični za jogurte, vendar pa slabu preživita.

Japonci so leta 1930 s sevom *Lactobacillus casei* pričeli pripravljati limonin mlečni napitek Yakult. Ta je petinšestdeset let kasneje prišel tudi na evropsko tržišče in je prvi izmed t.i. funkcionalnih živil (Reid, 2015).

Do intenzivnejšega trgovanja s probiotiki je prišlo šele po letu 1960, ko so jih začeli uporabljati pri farmskih živalih. Leta 1968 je King dosegel pomembno povečanje rasti pri prašičih z dodajanjem *Lactobacillus acidophilus* krmil živali (Fuller, 1999).

Objave Swann Committee v zvezi z zlorabljanjem antibiotikov v veterinarski praksi in priteji živali leta 1969 so spodbudile nadaljnjo uporabo probiotikov za farmske živali. Predlagano zmanjšanje uporabe antibiotikov v živalski prehrani, kjer ti niso uporabljeni v terapevtske namene, je spodbudilo razvoj probiotikov za živali (Fuller, 1999).

Nasprotovanje uporabi antibiotikov je povzročala tudi skrb po zmanjšanju njihovih stranskih učinkov, npr. diareji, ki pogosto spremlja tako zdravljenje. Vedeli so tudi, da antibiotiki sicer lahko zmanjšajo kolonizacijo črevesja piščancev s salmonelo, a se ustvari problem ogroženosti zdravja ljudi zaradi širjenja rezistence proti antibiotikom med bakterijami. Pravkar izvaljeni piščančki so lahko zavarovani pred kolonizacijo salmonele v črevesju, če jim predhodno dajemo suspenzijo preparata črevesne vsebine zdravih odraslih piščancev. To spoznanje Nurme in Rantala iz leta 1973 je predstavlja naslednji mejnik v razvoju probiotikov za živali (Fuller, 1999).

Podpora probiotikom je prihajala tudi s strani lobijev, usmerjenih proti prekomerni uporabi aditivov v prehrani, ki so antibiotike videli kot tuje substance, katere ne bi smelete biti prisotne v krmil živali, medtem ko so probiotiki predstavniki mikroorganizmov, ki so naravnoprisotni v favni in v črevesju zdravih živali brez kakršnegakoli škodljivega učinka (Fuller, 1999).

V ZDA so Rettger in njegovi sodelavci v prepričanju, da je kolonizacija in rast v črevesju prvi pogoj probiotične aktivnosti, uporabili črevesne izolate vrste *L. acidophilus*. Vse večje poznvanje črevesne mikrobiote pokazalo, da je mlečnokislinska mikrobiota črevesja veliko bolj obsežna in zapletena, kot so vedeli v preteklosti, in zato tudi dopušča uporabo velikega števila različnih rodov mikroorganizmov (Fuller, 1999).

### 2.3.3 Pogoji, uporaba probiotikov

Probiotiki so mikroorganizmi, ki pomagajo vzpostaviti črevesno mikrobioto živali in ljudi v uravnovešeno stanje (Fuller, 1999). Poznamo bakterijske probiotike, kulture kvasovk in

plesni ter kombinirane pripravke. Najpomembnejšo skupino probiotičnih bakterij predstavljajo mlečnokislinske bakterije (MKB), katere veljajo za varne bakterije (Rogelj in Bogovič Matijašić, 2004). MKB so prisotne tudi v prebavilih živali in ljudi. Sevi, ki so najpogosteje v probiotičnih izdelkih, so predstavniki vrst *Lactobacillus acidophilus* (na primer sev La5), *L. casei* (predvsem sev *Shirota*), *L. rhamnosus* (naprimer sev GG), *Bifidobacterium bifidum* in *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* (naprimer sev BB12). Za probiotične lahko razglasimo le tiste seve MKB, pri katerih so bili učinki dokazani. Bakterijski sev, ki ga uporabljamo kot probiotični, mora tekmovati z obstoječo mikrobioto za hranljive snovi, atmosferske potrebe in mesta pripenjanja na črevesni epitelij.

Izbira probiotika vedno temelji na kriterijih, ki vključujejo varnost in klinične učinke. Potrebno je:

- poznati vrsto in lastnosti, ki so povezane z varnostjo (izvor, identifikacija, karakterizacija, virulenza, invazivnost, rezistenca proti antibiotikom),
- proučiti farmakokinetične lastnosti seva (preživetje in aktivnost v črevesu, vezava in s tem kolonizacija, možna invazivnost, odnos med odmerkom in učinkom),
- raziskati interakcije med sevom in gostiteljem (vezava na črevesno tkivo, selektivna stimulacija koristnih bakterij in zaviranje škodljivih, stimulacija/supresija imunskega odgovora, klinični stranski učinki). Vedno več pozornosti je namenjeno varnosti probiotikov (FAO/WHO, 2002).

Posebno pozornost pri proučevanju varnosti je treba posvetiti enterokokom, ki jih uporabljajo kot probiotike. Posamezniki tega rodu so namreč lahko patogeni, nekateri pa so tudi sposobni prenesti gene za odpornost proti antibiotikom (vankomicin) na druge mikroorganizme (Franz in Holzapfel, 2004).

#### 2.3.4 Probiotiki za živali

Probiotike za živalih uporabljajo za ponovno vzpostavitev uravnotežene mikrobiote, ki je bila prizadeta zaradi različnih negativnih dejavnikov okolja. Bolezni z njimi ni možno pozdraviti in prav tako probiotiki niso specifični za posamezno bolezen, kot je to pri zdravilih, ki jih uporabljajo v veterinarski medicini. Zato probiotikov ne predpisujejo veterinarji. Delovanje probiotikov na gostitelja vključuje neposredne učinke na mikrobioto, ali posredne učinke, vključno z nekaterimi, ki se lahko pojavijo znotraj tkiv gostitelja, kot npr. imunski odgovor (SCAN, 2000; Matsuzaki, 1998; Dunne in sod., 1999). Pri živalih je zanimiva predvsem kontrola možnih patogenov (Tortuero in sod., 1995), z namenom preprečevanja bolezni in smrti, še posebej pri mladih prašičih. Ugodno delovanje mikrobov se kaže tudi preko kakovosti živalskih proizvodov (Vanbelle, 2001).

Mikroorganizmi, prisotni v probiotikih za živali, so izbrani na podlagi raziskav. Najpogosteje so to predstavniki rodov *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Pediococcus* in *Enterococcus*. Te skupine, skupaj z *Bacillus* sp., kvasovkami in nitastimi glivami, so glavne komponente probiotikov, danes splošno uporabljenih pri farmskih živalih. Različni probiotični preparati lahko vsebujejo samo en sev, ali pa vsebujejo mnogo sevov in imajo tako širši spekter delovanja (Fuller, 1999; Yirga, 2015).

Probiotiki, ki se običajno uporabljajo v prehrani živali, so prikazani v preglednici 2.

Preglednica 2: Probiotiki, običajni v živalski prehrani (Yirga, 2015)

Rod	Vrsta
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. lactis</i> <i>B. longum</i> <i>B. pseudolongum</i> <i>B. thermophilum</i> <i>B. bifidum</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecalis</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. acidophilus</i> <i>L. amylovorus</i> <i>L. brevis</i> <i>L. casei</i> <i>L. farciminis</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. reuteri</i> <i>L. rhamnosus</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>L. lactis</i>
<i>Leuconostoc</i>	<i>L. citreum</i> <i>L. lactis</i> <i>L. mesenteroides</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>P. acidilactici</i> <i>P. pentosaceus subsp. <i>pentosaceus</i></i>
<i>Streptococcus</i>	<i>S. infantarius</i> <i>S. salivarius</i>
<i>Bacillus</i>	<i>B. cereus</i> <i>B. licheniformis</i> <i>B. subtilis</i>
<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i> ( <i>S. boulardii</i> ) <i>S. pastorianus</i> ( <i>S. carlsbergensis</i> )
<i>Aspergillus</i>	<i>A. oriza</i> <i>A. niger</i>

Rod *Bifidobacterium* taksonomsko sicer ne pripada mlečnokislinskim bakterijam, vendar pa ima nekaj sorodnih lastnosti (npr. so po Gramu pozitivne, fermentativne, tvorijo laktat) in si delijo z MKB iste ekološke niše zato jih pogosto povezujejo. Probiotikom podobne učinke imajo tudi kvasovke (npr. *S. boulardii*) (Saarela in sod., 2002).

Fuller (2006) je navajal številne potencialne dobrodejne učinke probiotikov pri farmskih živalih:

- boljša odpornost živali proti infekcijskim boleznim,
- povečan prirast,
- izboljšana konverzija krme,
- izboljšana prebava,

- večja sposobnost absorpcije hranilnih snovi,
- boljša oskrba z esencialnimi hranilnimi snovmi,
- povečanje mlečnosti,
- izboljšana kakovost mleka,
- povečana produkcija jajc,
- izboljšana kakovost jajc,
- izboljšana kakovost klavnih trupov,
- manjše onesnaževanje.

Dejansko so se probiotiki najbolj izkazali pri preprečevanju in kot podpora terapiji pri infekcijah s patogenimi mikroorganizmi, kot so *E. coli*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Clostridium* in rotavirusi. Tako prispevajo k zmanjšanju uporabe antibiotikov (De Magalhaes in sod., 2015).

### 2.3.5 Zakonodaja o krmnih dodatkih

Uredba Evropskega parlamenta in Sveta (ES) št. 1831/2003 o dodatkih za uporabo v prehrani živali 2003 definira krmne dodatke kot snovi, mikroorganizme ali pripravke, ki niso niti posamična krmila niti premiksi in se namenoma dodajajo krmni ali vodi za živali.

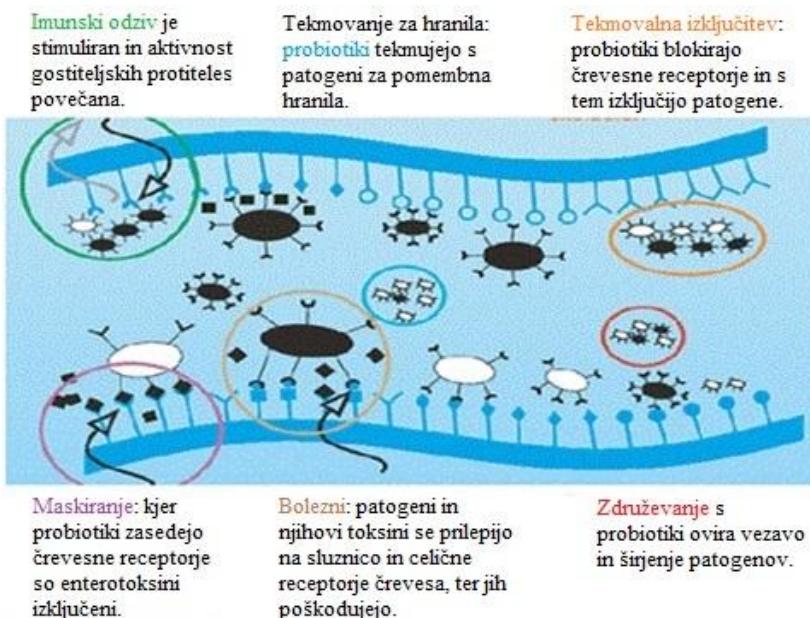
V skladu z zgoraj navedeno Uredbo, krmne dodatke razvrščamo v eno ali več kategorij, odvisno od njihovih funkcij in lastnosti:

- tehnološki dodatki (se dodajajo krmni iz tehnoloških razlogov),
- senzorični dodatki (izboljšujejo organoleptične lastnosti krme ali vizualne lastnosti proizvodov živalskega izvora),
- nutritivni dodatki (za prehranske namene, na primer vitamini, elementi v sledovih, aminokisline...),
- zootehniški dodatki (ugodno vplivajo na prirejo zdravih živali ali na okolje),
- kokcidiostatiki in sredstva proti histomonijazi.

To so snovi, ki za nemoteno delovanje živalskega organizma sicer niso nujno potrebne, njihov vpliv pa se kaže v boljši proizvodnji živali. Običajno se uporabljajo v zelo majhnih količinah. Pri tem morajo biti izpolnjene temeljne zahteve, da ne delujejo škodljivo niti na živalsko telo, niti pozneje na porabnika živalskih proizvodov.

V evropskem registru krmnih dodatkov (European Union Register of Feed Additives) najdemo tudi različne probiotične seve, ki so uvrščeni v kategorijo zootehniških dodatkov, funkcionalno skupino stabilizatorjev mikrobiote, ki so opisani kot » mikroorganizmi ali druge kemijsko definirane snovi, ki imajo, če z njimi krmimo živali, ugoden vpliv na mikrofloro prebavil«.

### 2.3.6 Načini delovanja probiotikov in probiotičnih krmnih dodatkov



Slika 5: Mikrobiološke interakcije v črevesju (povzeto po Yirga, 2015)

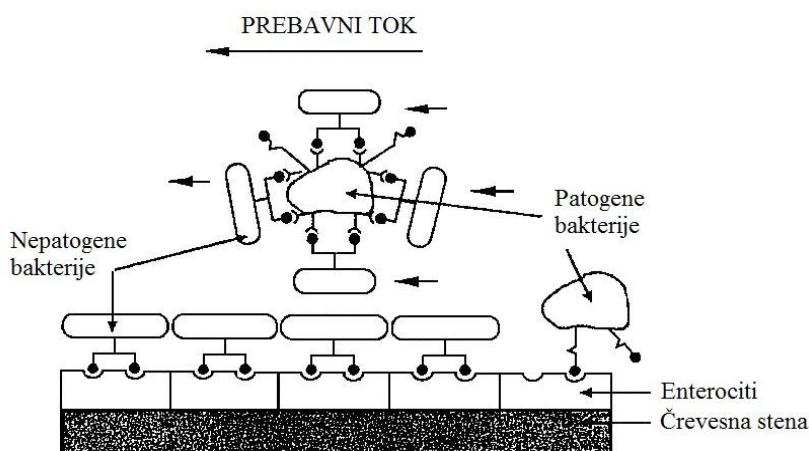
Probiotiki v prebavnem traktu s svojim delovanjem zmanjšujejo okužbe črevesja in nastanek diareje, zaradi različnih probiotikov z različnimi mehanizmi oz. načini delovanja, pa imajo tudi bolj splošen vpliv (Fuller, 1992; Cho in sod., 2011). Dobro zdravje osebka je pogojeno z ugodnim mikrobnim ravnovesjem v črevesju. Probiotiki, kot podpora naravnih črevesnih mikrobiot, pripomorejo k temu, zato se živalim dodajajo v obliki krmnih dodatkov. Delovanje probiotičnih krmnih dodatkov temelji predvsem nakompetitivnem izključevanju, bakterijskem antagonizmu in imunski modulaciji (Hughes in Heritage, 2002; Steiner, 2009).

#### 2.3.6.1 Kompetitivno izključevanje

Kompetitivno izključevanje temelji na zaščitni sposobnosti normalne mikrobiote pred škodljivimi patogeni. Kulture izbranih, koristnih mikroorganizmov, dodanih krm, tekmujejo s potencialno škodljivimi bakterijami, pri čemer tekmujejo za vezavo na črevesno sluznico ter porabljajo iste organske substrate (predvsem ogljik in energijo) kot druge bakterije (Steiner, 2009). Vezava na steno prebavnega trakta lahko služi ali preprečiti naselitve patogenih mikroorganizmov, ali tekmovanju za hranila (Yirga, 2015).

### 2.3.6.1.1 Vezava na steno prebavnega trakta z namenom preprečevanja kolonizacije s patogenimi mikroorganizmi

Škodljive bakterije se morajo najprej pritrditi na črevesno steno, da lahko tam delujejo (McDonald in sod., 2010). Zato je pričakovani učinek dodajanja probiotikov povečanje kolonizacije koristne mikrobiote v črevesju in posledično zaviranje vezave škodljivih patogenov na črevesni epitelij, s čimer se blokirajo receptorska mesta in je preprečena pritrditev drugih bakterij, vključno s škodljivimi vrstami (Cho in sod., 2011). S takšnim ravnanjem probiotične bakterije izključujejo patogene in jim tako preprečijo povzročitev okužb (Hughes in Heritage, 2002).



Slika 6: Kopičenje nepatogenih bakterij na patogene (povzeto po Ewing in Cole, 1994)

Kompetitivno izključevanje je lahko tudi rezultat vezave nepatogenih bakterij na patogene v predelih prebavnega pretoka (Slika 6), kar povzroči odstranitev patogenov iz črevesja (Ewing in Cole, 1994).

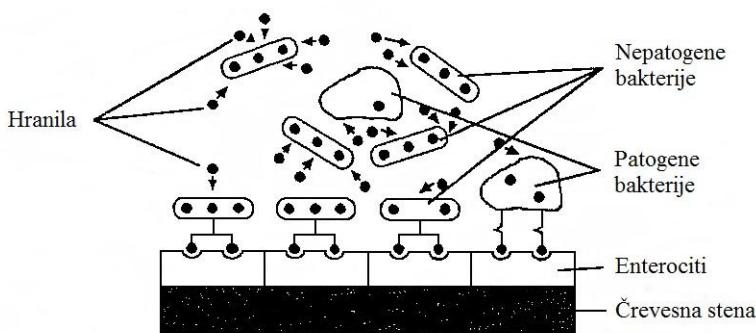
Kompetitivno izključevanje je lahko tudi rezultat vezave nepatogenih bakterij na patogene, posledica združevanja pa preprečuje vezavo patogenov na pritrdilna mesta in vodi k njihovi odstranitvi iz črevesa (slika 6) (The living gut).

Različne študije so pokazale, da je potencial probiotikov zmanjšanje nevarnosti okužb in črevesnih obolenj. Prav tako so pokazale, da je bila rast *E.coli* uspešno zavrta z različnimi sevi *Lactobacillus*. Poročali so tudi, da je kombinacija različnih mlečnokislinskih bakterij bistveno znižala raven *Salmonelle* v vsebini slepiča piščancev, ki so jim oralno dozirali patogene. Pri prašičih je prehransko dopolnilo z *Enterococcus faecium* zavrlo vezavo *E. coli* na epitelij tankega črevesa (Yirga, 2015).

### 2.3.6.1.2 Tekmovanje s patogenimi bakterijami za hranila v črevesju

Probiotiki lahko tekmujejo za hranila in absorpcijska mesta s patogenimi bakterijami (sliki 5 in 7). Tekmovanje za energijo in hranilne snovi med probiotiki in drugimi bakterijami povzroči zatiranje patogenih vrst. Probiotiki imajo dobro fermentativno sposobnost in

spodbujajo prebavo. Znano je, da laktobacili proizvajajo mlečno kislino in proteolitične encime, ki lahko izboljšajo prebavo hranil v prebavnem traktu (Yu in sod., 2008). Različne študije kažejo, da probiotiki izboljšajo presnovo surovih beljakovin in pridobivanje energije iz njih, v primerjavi s tistimi, ki niso tretirani s probiotiki (Yu in sod., 2008).



Slika 7: Nepatogene in patogene bakterije pogosto tekmujejo za hranila (povzeto po Ewing in Cole, 1994)

Nepatogene in patogene bakterije pogosto tekmujejo za hranila, npr. ogljik, dušik in minerale. Nepatogene bakterije lahko uspešno konkurirajo patogenim in tako v večjem obsegu kolonizirajo črevesje.

### 2.3.6.2 Bakterijski antagonizem

Ko so probiotični mikroorganizmi naseljeni v črevesju, lahko proizvajajo snovi z bakteriocidnim (ubijanje bakterij) ali bakteriostatičnim delovanjem (zaviranje rasti in razmnoževanja bakterij) (Hughes in Heritage, 2002; Steiner, 2009).

Mlečnokislinske bakterije fermentirajo laktozo v mlečno kislino, s čimer se zmanjša pH v črevesju na raven, ki je škodljive bakterije ne prenašajo. Proizvaja se tudi vodikov peroksid, ki zavira rast po Gram-u negativnih bakterij (McDonald in sod., 2010).

### 2.3.6.3 Imunska modulacija

Imunska modulacija je za gostitelja ugodno uravnavanje imunskega sistema. Probiotiki lahko delujejo kot spodbuda imunskemu sistemu. Mikrobne združbe lahko podprejo obrambo živali proti invaziji patogenov s stimulacijo črevesnega imunskega odziva, s stimulacijo proizvodnje protiteles in povečanjem aktivnosti fagocitov (McDonald in sod., 2010). Nekateri probiotični sevi, kot so predstavniki rodu *Lactobacillus*, so se izkazali, da so sposobni stimulirati imunski sistem. Tako lahko delujejo žive celice, ki se vežejo na specifične receptorje ali migrirajo skozi črevesno steno, ali pa deli bakterijskih celic, ki se sprostijo po razpadu mrtvih celic (Klaenhammer in sod., 2012).

Kar 70-80% imunskega sistema, ki je glavni obrambni mehanizem organizma, je v predelu črevesja. Skozi črevo prihaja s hrano glavnina toksinov, mikroorganizmov in drugih tujkov, ki jih morajo celice imunskega sistema (levkociti) nevtralizirati. Pri opravljanju te

vloge pa imajo pomoč. Rečemo lahko, da so v črevesju tri "obrambne linije" celic. Prvo obrambno črto predstavljajo bakterije (vključno s probiotičnimi), ki so na notranji strani črevesja (v črevesni svetlini in v sluzi). Druga obrambna črta so celice črevesne stene, ki prepuščajo v notranjost organizma molekule in druge delce, predvsem tiste, ki so dovolj majhne. Šele v tretji liniji so celice imunskega sistema, ki "čakajo" v limfi in krvnih žilah za črevesno steno, "prepoznaajo" morebitne tujke (strupene molekule, viruse,...), ki jih je prepustila črevesna stena, ter jih napadejo. Vloga probiotikov v tem obrambnem sistemu je zelo pomembna. Nekatere študije kažejo, da vežejo probiotiki nase karcinogene snovi iz hrane, ki se skupaj s fekalijami izločijo iz organizma, ali pa jih razkrajajo (Rotovnik-Kozjek, 2003).

## 2.4 *LACTOBACILLUS GASEERI* LF221 in *LACTOBACILLUS GASEERI* K7

V zbirkki Inštituta za mlekarstvo in probiotike (IML-PRO) sta med drugim shranjena dva humana bakterijska izolata, ki sta bakteriocinogena in imata širok spekter protimikrobnne aktivnosti. To sta *Lactobacillus gasseri* LF221 in *Lactobacillus gasseri* K7. Spadata v skupino bakterij *Lactobacillus acidophilus*, ki so splošno priznane kot varne za uporabo pri ljudeh. Oba seva sta bila izolirana iz blata dojenčkov (Bogovič Matijašić in sod., 2004).

Rod *Lactobacillus* je taksonomska skupina, ki spada v skupino mlečnokislinskih bakterij, vsebuje pa več kot dvesto različnih vrst. Značilnost rodu so po Gramu pozitivne, nesporogene bakterije, ki energijo dobivajo izključno s fermentacijo sladkorjev, prisotne pa so v surovinah rastlinskega in živalskega izvora (Hammes in Hertel, 2006).

Sev *Lactobacillus gasseri* LF221 ima številne lastnosti probiotika. Raste v prisotnosti 1,5 % žolča, preživi pri vrednosti pH 2 in ima širok spekter protimikrobnne aktivnosti. Iz supernatanta so uspeli očistiti dva različna bakteriocina, za katera se je na osnovi ugotovljenega zaporedja nukleotidov genov za bakteriocina izkazalo, da se razlikujeta od že opisanih bakteriocinov v literaturi. Poimenovali so ju acidocin LF221 A in acidocin LF221 B (Bogovič Matijašić in sod., 1998).

Bakteriocini so poleg organskih kislin, vodikovega peroksida in diacetila, eni izmed mnogih antimikrobnih substanc, ki jih proizvajajo mlečno kislinske bakterije. Sestava bakteriocinov je proteinska, vendar z bakterijskim načinom delovanja, proizvedenim z vrsto mikroorganizmov (Tagg in sod., 1976). Zaviralni spekter acidocina B vsebuje tudi nekatere ne-mlečno kislinske bakterije, kot so *Clostridium sporogenes*, *Listeria monocytogenes* in *Brochothrix thermosphacta* (Ten-Brink in sod., 1994; Van der Vossen in sod., 1994). Acidocin A je drugi bakteriocin *L. acidophilus*, katerega spekter delovanja vključuje tudi zmožnost zaviranja nekaterih patogenov, ki povzročajo kvarjenje hrane, med katere spada tudi *Listeria monocytogenes* (Kanatani in sod., 1995). Delovanje bakteriocinov seva LF221 je še obširnejše, saj zavirajo nekatere seve iz rodov, ki niso laktobacili: *Lactococcus*, *Staphylococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Listeria* in *Bacillus*. Opaženo je tudi delovanje proti oportunistični bakteriji *Cl. difficile*, katera povzroča z antibiotiki povezano diarejo ali celo življenjsko nevarnemu psevdomembranskemu kolitisu, ter proti drugim klostridijem. Sev LF221 je sposoben zavirati tudi nekatere seve *B. cereus* (Bogovič Matijašić in sod., 1998).

Sev *Lactobacillus gasseri* K7 je dobro raziskan probiotik z znanim celotnim genomom (Treven in sod., 2014).

Je prav tako odporen proti žolčnim solem in nizkim vrednostim pH, ima širok spekter protimikrobnne aktivnosti, njegove produkcijske sposobnosti (tvorba bakteriocinov) pa so večje kot pri sevu LF221 (Bogovič Matijašić in Rogelj, 2000).

Sposoben je rasti v prisotnosti 0,3% žolčnih soli in dobro preživeti v kislem okolju (pH=3). Bakteriocini nastajajo med eksponentno fazo rasti. Maksimalna aktivnost teh v supernatantu MRS kulture je bila zaznana po 8-urni inkubaciji. Med drugim zavira tudi klostridije. Vegetativne celice *Clostridium tyrobutyricum* so pokazale večjo občutljivost za bakteriocine K7 kot pa spore (Bogovič Matijašić in Rogelj, 2000).

Vsaj začasno je tudi sposoben preživeti prehod skozi prebavni trakt in kolonizirati črevesno sluznico gnotobičnih in konvencionalnih prašičkov (Bogovič Matijašić in sod., 2003; Stojković, 2003).

V dosedanjih raziskavah so pri sevih LF221 in K7 ugotovili vrsto lastnosti, ki so predpogoji za uporabo izbranih bakterij kot probiotikov. Oba humana izolata poleg organskih kislin, kot pomembnih protimikrobnih dejavnikov, tvorita tudi bakteriocine s širokim spektrom delovanja (Bogovič Matijašić in Rogelj, 2000; Bogovič Matijašić in Rogelj, 1999; Bogovič Matijašić in sod., 1998). Njuna sposobnost zaviranja vrst *Clostridium*, med katerimi sta tudi patogeni oziroma oportunistični vrsti *C. difficile* in *C. perfringens* (prve kot povzročiteljice psevdomembranskega kolitisa, druge kot patogene bakterije, nevarne za ljudi in živali), je zanimiva s stališča preprečevanja ali hitrejšega zdravljenja tovrstnih infekcij tako pri ljudeh kot pri živalih (Bogovič Matijašić in Rogelj, 2000; Bogovič Matijašić in Rogelj, 1999; Bogovič Matijašić in sod., 1998; Rogelj in sod., 1999). Med zanimivejšimi mikroorganizmi, ki jih je sposoben inhibirati LF221, so še posamezni sevi *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* in *Staphylococcus aureus* (Bogovič Matijašić in sod., 1998). Dobro se vežeta na enterocite v celični kulturi (Caco-2) (Bogovič Matijašić in sod., 2003).

## 2.5 *ESCHERICHIA COLI*

Vrsto *E. coli* je leta 1885 prvi opisal nemški zdravnik Escherich. Vrste iz rodu *Escherichia* so tipične predstavnice enterobakterij. So po Gramu negativni, fakultativno anaerobni bacili. Večina sevov je gibljiva. Medtem ko virulentni sevi povzročajo okužbe v prebavilih in zunaj črevesne okužbe pri človeku in živalih, so nevirulentni sevi *E. coli* del normalne črevesne mikrobiote (Andlovic, 2002).

Vrsta *E. coli*, je ena izmed najobičajnejših predstavnic črevesne in fekalne mikrobiote, spada med koliformne bakterije, ter je prisotna v črevesju že takoj po rojstvu. Hkrati je to tudi prva bakterijska vrsta, ki začne po smrti razkrnjati truplo (Batis in Brglez, 1984).

Medtem ko so nekateri sevi *E. coli* neškodljivi, drugi lahko povzročijo različne okužbe, predvsem okužbe sečil, tudi mastitis, črevesna obolenja in drugo V preteklih letih so poročali o povečanju števila okužb z *E. coli*, odpornimi proti več antibiotikov hkrati, kar predstavlja dodatno grožnjo za zdravje ljudi (Povzetek dejstev za splošno javnost, 2016).

## 2.6 RAZISKOVANJE FUNKCIONALNIH LASTNOSTI PROBIOTIKOV

Pri testiranju posameznih mikroorganizmov se lahko poslužujemo *in vivo*, *in vitro* ali *ex vivo* pristopa.

Definicije, ki jih navaja Slovenski medicinski slovar (Kališnik, 2002) se glasijo:

- *in vivo* = v živem organizmu,
- *in vitro* = v umetnem okolju (npr. v epruveti ali v posodi za kulturo tkiva),
- *ex vivo* = v poskusnih razmerah zunaj živega organizma.

Raziskave *in vivo* se izvajajo na živem organizmu, torej živali ali človeku. So zelo drage in zamudne, za izvedbo potrebujemo večje število živali oz. ljudi. Kljub temu so potrebne, tudi pri proučevanju učinkov probiotikov (Lavrenčič, 2003).

Zaradi vse ostrejše zakonodaje, ki preprečuje ali omejuje najrazličnejše posege na živalih, so raziskave *in vivo* še težavnejše. Z metodami *in vitro* simuliramo pogoje, ki so podobni tistim, ki so v gostitelju (npr. v prebavilih) (Lavrenčič, 2003). Običajno prva selekcija zanimivih sevov poteka *in vitro*, zanimivejše seve pa nadalje testirajo še *in vivo*, da pridobijo podatke o njihovi učinkovitosti.

## 2.7 PROBIOTIKI KOT NADOMEŠTILO ZA ANTIBIOTIKE

Odkritje antibiotikov pomeni enega najpomembnejših mejnikov v razvoju medicine. Njihova uporaba je močno zmanjšala smrtnosti zaradi infekcijskih bolezni, hkrati pa omogočila razvoj vse več bakterijskih sevov, ki so odporni (rezistentni) proti posameznim ali celo več različnim antibiotikom. Pojav bakterijske odpornosti proti antibiotikom je znan že od samega začetka njihove uporabe v zdravljenju bakterijskih okužb. Širitev odpornih bakterijskih sevov omogoča preobsežna in velikokrat nekritična uporaba antibiotikov, (predvsem dodajanje antibiotikov za spodbujanje rasti farmskih živali). Tako je zaradi široke uporabe penicilina že konec 40-ih let prejšnjega stoletja prišlo do selekcije in razširjanja proti penicilinu odpornih bakterijskih sevov. Odpornost proti penicilinu so najprej zasledili pri vrsti *Staphylococcus aureus*. Že leta 1950 je bilo več kot 50% sevov te vrste odpornih proti penicilinu (Seme, 2002).

V posebno skupino antibiotikov štejemo heterogeno skupino antibiotikov – promotorjev rasti, ki se uporablajo kot dodatek živalski hrani (angleški naziv *feed grade*). V preteklosti so tudi v Evropi te spojine dodajali krmi zaradi boljših prirastov živali. Za ta namen se uporablajo le antibiotiki, ki se sicer ne uporablajo v humani ali veterinarski medicini. (Pokorný in sod., 1992). Medtem ko so v Evropi tovrstno uporabo antibiotikov dokončno prepovedali leta 2006, so nekateri antibiotiki še vedno dovoljeni v Aziji, Avstraliji in ZDA.

S 1. januarjem 2006 v EU ni več dovoljeno uporabljati nutritivnih antibiotikov (flavofosfolipol, natrijev monenzin, natrijev salinomicin, avilamicin) v prehrani živali. To pa ne velja za posebno skupino antibiotikov imenovanih kokcidiostatiki in sredstev proti histomonijazi. Njihova uporaba je še vedno dovoljena, vendar v točno določenih količinah (Uredba Komisije (ES) št. 574/2011 z dne 16. junija 2011 o spremembji Priloge I k Direktivi 2002/32/ES Evropskega parlamenta in Sveta glede mejnih vrednosti za nitrit, melamin, Ambrosio spp. ter prenosa nekaterih kokcidiostatikov ali sredstev proti histomonijazi in o konsolidaciji prilog I in II k Direktivi).

Razvojni oddelki farmacevtskih družb so do začetka 80. let učinkovito razvijali in sintetizirali nove antibiotike, s katerimi se je močno razširil spekter protibakterijskega delovanja. Po tem obdobju pa so, prepričani, da je cilj dokončno dosežen, postopoma upočasnili oz. celo ukinjali razvoj na tem področju. Bakterije so doslej odgovorile na prav vsak novi antibiotik s pojavom odpornih sevov, včasih hitreje, drugič počasneje. Danes, po več kot 70 letih uporabe antibiotikov in razvoju stotin različnih protimikrobnih zdravil, ugotavlja, da se pri zdravljenju okužb s sevi nekaterih bakterijskih vrst nevarno približujemo stanju pred odkritjem penicilina (Seme, 2002; EFSA/ECDC, 2015).

Med možnimi alternativami antibiotikom kot rastnim promotorjem so encimi, anorganske in organske kisline, probiotiki in pa ukrepi obvladovanja okužb, predvsem respiratornih, na način preventivne naselitve dobre mikrobiote (Yirga, 2015). Kombinacija različnih pristopov pa omogoča še bolj ugodno ravnovesje v črevesju in s tem dobro počutje in zmogljivost živali. Upoštevani so namreč različni vidiki prebavnega trakta: mikrobiologija, presnova hranilnih snovi in oskrba tkiv (Yirga, 2015).

Nekatere skupine naravno prisotnih bakterij se po uživanju antibiotikov še dolgo potem, ko zdravljenja ni več, ne opomorejo (Robinson in Young, 2010; Quigley, 2013).

Odkar je uporaba antibiotikov kot pospeševalcev rasti prepovedana, se trudijo najti druga sredstva, ki bi prav tako pospeševala rast, izkoriščanje krme in ugodno vplivala na zdravje živali, bi pa bila bolj prijazna okolju in človekovemu zdravju.

Probiotiki delujejo po principu kompetitivnega izključevanja. Tako lahko preprečijo nastanek bolezni, npr. dihal pri prašičih, ki bi sicer zahtevale antibiotično zdravljenje (Yirga, 2015).

Obstaja veliko dokazov o učinkovitosti probiotikov v preventivi in celo terapiji nekaterih bolezni farmskih živali. Eden od primerov učinkovite rabe MKB probiotikov predstavlja preventiva oz. zdravljenje diareje, ki je pri mladih živalih, vključno z mladimi puijski, glavni vzrok obolenosti in smrtnosti (Vanbelle, 2001).

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 IZVEDBA POSKUSA

##### 3.1.1 Poskusne živali

V poskus so bili vključeni devet mesecev stari prašiči pitanci. Uporabili smo osrednji del tankega t.i. teščega črevesa – jejunuma. Črevesje je bilo takoj po zakolu odvzeto, ohlajeno in na ledu preneseno v laboratorij. Tu je potekalo nadaljnje izpiranje ter obdelava. Pomembno je bilo, da so bile analize končane v času dveh ur po zakolu. Kasneje namreč aktivnosti in življenske funkcije črevesnih enterocitov upadajo.

##### 3.1.2 Potek poskusa

###### 3.1.2.1 Potek dela

Tako po izkravljivitvi testnih prašičev smo odvzeli njihovo tanko črevo. Obstojecu mikrobioto smo sprali s pufrom, nato pa pripravili vzorce velikosti  $10\text{ cm}^2$ . Seva *L. gasseri* K7 in *L. gasseri* LF221 smo predhodno namnožili s kultivacijo v komercialnem gojišču MRS. S centrifugiranjem smo odstranili preostalo gojišče, celice pa resuspendirali v pufru z ustrezno pH vrednostjo, tako da smo dobili suspenzije s približno  $10^8$  KE/ml.

Pripravljene vzorce tkiva smo vsakič potopili v suspenzijo celic enega od preskušanih sevov in inkubirali pri  $37\text{ }^\circ\text{C}$  30 minut, s čimer smo omogočili vezavo preskušanih bakterij na še vedno žive črevesne epitelne celice. Nevezne celice smo sprali z vzorcev tkiva. Na koncu smo število vezanih celic ugotovili tako, da smo vzorce prenesli v steklenice s fiziološko raztopino, vsakega posebej homogenizirali, pripravili razredčitve, jih nacepili na komercialno selektivno gojišče, inkubirali in prešteli zrasle kolonije.

V drugem delu poskusa smo vzorce tkiva po enaki začetni obdelavi, torej vezavi v suspenzijah bakterijskih celic in inkubaciji, fiksirali v 10 %-nem formalinu, dehidrirali z naraščajočimi koncentracijami alkohola in vključili v parafin.

Pripravljeno tkivo smo z mikrotomom narezali na rezine, debele  $5\text{ }\mu\text{m}$ .

Tkvne rezine smo nato pobrvali z metodo po Gramu. Pri tem se po Gram-u pozitivne bakterije obarvajo modro, po Gram-u negativne rdeče ali rožnato, jedra so rdeča, ostali tkivni elementi pa rumeni (Mäyrä-Mäkinen in sod., 1983; Kos, 2001).

### 3.2 MATERIAL

#### 3.2.1 Črevesna sluznica iz tankega črevesa

Pri poskusu smo uporabljali koščke teščega črevesa takoj po zakolu prašičev. Velikost vzorcev je bila 10 cm<sup>2</sup>. Razrez črevesa smo izvajali pravokotno na njegovo dolžino, posamezen košček je bil dolg 2,5 cm, širok pa 4 cm.

#### 3.2.2 Bakterijski sevi

Pred poskusom smo testne seve precepili v sveže gojišče MRS in inkubirali 18 ur. Uporabljeni so bili naslednji bakterijski sevi:

- *Lactobacillus gasseri* LF221 (Zbirka IML-PRO, Oddelek za zootehniko, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani),
- *Lactobacillus gasseri* K7 (Zbirka IML-PRO, Oddelek za zootehniko, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani),
- *Escherichia coli* O8:K88 (Research Institute of Experimental Veterinary Medicine, Košice, Slovaška).

#### 3.2.3 Gojišča

##### 3.2.3.1 Trda gojišča

Hranljivi agar MRS smo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija). Popolnoma raztopljenega smo nalili v 200 ml steklenice in dali v avtoklav, kjer je potekala sterilizacija. Ohljenega na 45 °C smo uporabljali za razlitje v petrijeve plošče in sicer kot trdo gojišče, ustrezno za rast laktobacilov.

Po navodilih proizvajalca smo agar EMB (Merck, Darmstadt, Nemčija) raztopili v demineralizirani vodi. Suspenzijo smo nalili v 200 ml steklenice, zaprli in dali sterilizirati. EMB je komercialno selektivno gojišče vijolično rdeče barve. Njegova sestava ustreza potrebam enterobakterij, katerim pripada tudi vrsta *E. coli*.

Sterilna hranljiva gojišča smo pred razlivanjem segreli v mikrovalovni pečici in jih ohladili na primerno temperaturo (45 °C) v vodni kopeli.

##### 3.2.3.2 Tekoča gojišča in diluenti

Bujon MRS je tekoče gojišče za gojenje laktobacilov. Pripravili smo ga po navodilih proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija), odpipetirali v epruvete, ter avtoklavirali pri 121 °C. Potrebovali smo ga za pripravo 18-urne kulture sevov *Lactobacillus gasseri* K7 in *Lactobacillus gasseri* LF221.

Fiziološko ( $\frac{1}{4}$  Ringerjevo) raztopino smo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija). Ena tableta zadostuje za 500 ml vode. Raztopino smo z avtomatskim dispenzerjem porazdelili v epruvete po 9,4 ml, preostalo pa v steklenico (500 ml). Sterilizacija je potekala v avtoklavu pri 121 °C 15 minut.

Pripravili smo 20-kratno založno raztopino fosfatnega pufra (PBS) z naslednjo sestavo:

- 170 g NaCl (Merck, Darmstadt, Nemčija),
- 42,9 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 12 H<sub>2</sub>O (Merck, Darmstadt, Nemčija),
- 10,8 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck, Darmstadt, Nemčija).

Natehtane sestavine smo stresli v erlenmajerico z 800 ml destilirane vode, ter vsebino premešali s pomočjo magnetnega mešala. Nato smo uravnali vrednost pH na 7,4, dopolnili z vodo do 1000 ml in sterilizirali v avtoklavu. Založno raztopino sterilnega pufra smo hranili pri 4°C. Kadar smo potrebovali PBS v končni koncentraciji, smo 50 ml založne raztopine dodali 950 ml demineralizirane in sterilizirane vode.

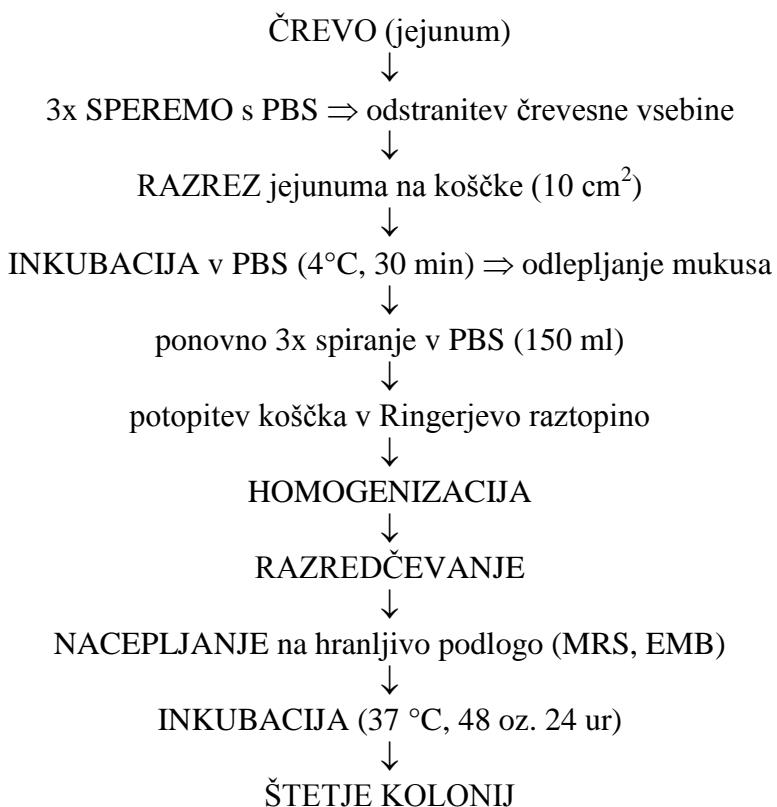
### 3.3 METODE

#### 3.3.1 Obdelava kontrolnih vzorcev črevesne sluznice

Na začetku poskusa smo preverili, ali postopek obdelave vzorcev tankega črevesa, ki smo ga povzeli po literaturi, zadostuje za odstranitev obstoječe mikrobiote, vezane na črevesno sluznico tankega črevesa živali.

Notranjost črevesa smo trikrat sprali z ohlajenim pufrom PBS (glej shemo 1), ter s tem odstranili vsebino. Nato smo, prav tako kot kasneje vsakič v nadaljevanju poskusa, jejunum razrezali na koščke, velike 10 cm<sup>2</sup>. Potopili smo jih v PBS in inkubirali v hladilniku pri 4°C, 30 minut, da se je sluz (mukus) odluščila. S pinceto smo nato prijeli vsak posamezen košček ter ga narahlo še 3-krat sprali v časi s cca. 150 ml vsakič svežega pufra PBS. Dva od koščkov smo dali v steklenici s po 100 ml  $\frac{1}{4}$  Ringerjeve raztopine, homogenizirali, dopolnili do 100 ml, razredčili, nacepili na hranljivi gojišči MRS in EMB, ter po inkubaciji pri 37 °C prešteli zrasle kolonije. Gojišča z agarjem MRS smo inkubirali 48 ur v anaerobnih razmerah (GenBOX anaer, Bio-Merieux, Marcy l'Etoile, Francija), gojišča z EMB pa 24 ur v aerobnih. Ta vzorec smo označili z oznako »0«. Postopek smo ponovili pri vsakem nadalnjem poskusu.

SHEMA 1: Kontrola spiranja črevesa s PBS  
(VZOREC »0«)



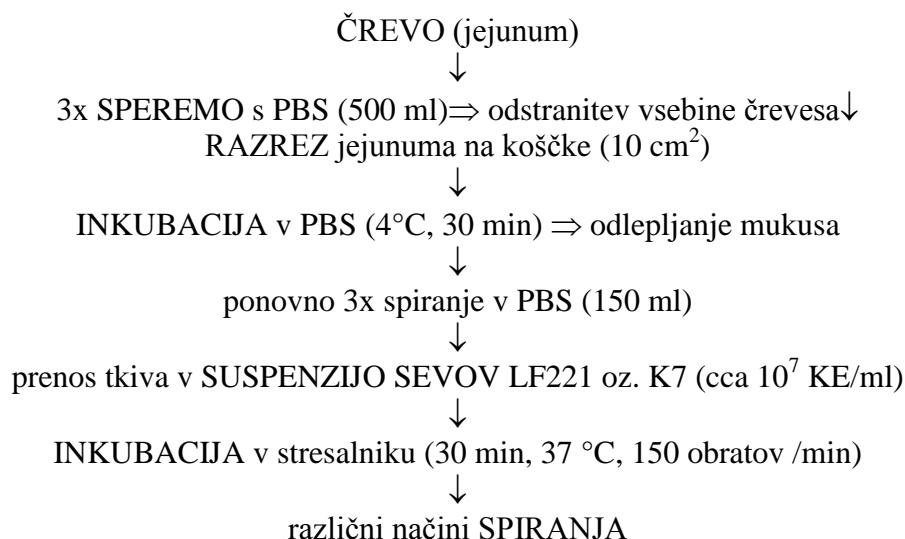
### 3.3.2 Optimiziranje protokola vezave bakterij – spiranje nevezanih bakterij

V nadaljevanju smo ugotavljali, ali je enkratno spiranje po vezavi testnih laktobacilov zadostno za odstranitev nevezanih bakterij. V poskusu pripenjanja na črevesno sluznico smo uporabljali dva testna seva, *Lactobacillus gasseri* LF221 in *Lactobacillus gasseri* K7.

Pet koščkov jejunuma, pripravljenih kot je opisano v začetku poglavja 3.3.1, smo potopili v vsako od dveh steklenic, s po 200 ml pripravljene suspenzije ustrezne koncentracije (cca.  $10^7$  KE/ml) dveh sevov laktobacilov. Obe steklenici smo postavili v stresalnik, kjer smo vzorce ob rahlem stresanju inkubirali 30 minut, pri 37 °C in 150 obratih/minuto (glej shemo 2). Po končani inkubaciji v stresalniku smo iz obeh steklenic s pinceto pobrali vsak posamezen košček ter ga sprali v pufru PBS. Uporabili smo štiri različne načine spiranja:

- 1) prvi košček iz vsake od steklenic samo ročno spiranje (narahlo, prijem s sterilno pinceto),
- 2) naslednji košček najprej ročno spiranje, nato še 5 minut v stresalniku pri 37 °C in 150 obratih/minuto v 200 ml pufra PBS,
- 3) ročno, nato dvakrat po 5 minut spiranja v stresalniku z vmesno menjavo pufra ali
- 4) ročno in 3-krat po 5 minut spiranja v stresalniku z vmesno menjavo pufra.

SHEMA 2: Izvedba postopka spiranja koščkov črevesa po vezavi laktobacilov



### 3.3.3 Priprava standardiziranih bakterijskih suspenzij

Priprava 18-urnih kultur bakterijskih celic je potekala tako, da smo v epruvete s sterilnim bujonom MRS (10 ml) odpipetirali 100 ml kulture *L. gasseri* K7, *L. gasseri* LF221 oz. *E. coli*, prejšnji dan nacepljene iz zamrznjenih celic. Inkubirali smo 18 ur pri temperaturi 37 °C. Do uporabe smo epruvete potopili v mrzlo vodo z ledom in tako preprečili nadaljnje razmnoževanje.

Epruvete vseh treh 18-urnih kultur smo v nadaljevanju centrifugirali (3700 g, 5 minut). Celice so se ob tem ločile od bujona in ostale na dnu epruvet. Bujon smo previdno odlili, vzeli sterilne steklenice z ustrezno količino vode in PBS, ter s pipeto popolnoma izprali sediment celic iz epruvet, in sicer v prvo steklenico celice seva LF221, v drugo seva K7, ter v tretjo steklenico celice *E. coli*. Vsebino steklenic smo dobro premešali.

Želeli smo pripraviti suspenzije treh sevov s čim bolj enakimi koncentracijami. Na podlagi podatkov, pridobljenih v predhodnih poskusih, smo suspenzije pripravili tako:

LF221: 142,5 ml vode (avtoklavirane)  
7,5 ml pufra PBS (20-kratna koncentracija)  
celice LF, pridobljene iz 6 ml 18-urne kulture  
Skupaj: 150 ml.

K7: 142,5 ml vode (avtoklavirane)  
7,5 ml pufra PBS (20-kratna koncentracija)  
celice K7, pridobljene iz 4 ml 18-urne kulture  
Skupaj: 150 ml.

*E.coli*: 237,5 ml vode (avtoklavirane)

12,5 pufra PBS (20-kratna koncentracija)  
celice *E. coli*, pridobljene iz 1,2 ml 18-urne kulture  
Skupaj: 250 ml.

Pripravljene suspenzije celic smo vsakič razdelili v devet 200 ml sterilnih steklenic ter dodali ustrezno količino pufra PBS enkratne koncentracije, ohlajenega na 4 °C, v naslednjih kombinacijah:

- |              |  |
|--------------|--|
| 1) LF:       | 50 ml suspenzije LF + 50 ml pufra PBS (2 steklenici) |
| 2) K7 :      | 50 ml suspenzije K7 + 50 ml pufra PBS (2 steklenici) |
| 3) Ec :      | 50 ml suspenzije Ec + 50 ml pufra PBS (3 steklenice) |
| 4) Ec + LF : | 50 ml suspenzije LF + 50 ml susp. Ec (1 steklenica)  |
| 5) Ec + K7 : | 50 ml suspenzije K7 + 50 ml susp. Ec (1 steklenica). |

Koncentracije celic so bile približno enake v prvih treh poskusih, v četrtem in petem pa smo uporabili 10x večje koncentracije laktobacilov, medtem ko je koncentracija *E. coli* ostala enaka. Pri vsakem poskusu smo suspenzije bakterij tudi nacepili na ustrezna gojišča, da smo ugotovili dejansko koncentracijo bakterijskih sevov (KE/ml). Laktobacile smo nacepili na gojišče MRS ter inkubirali 48 h pri 37 °C v anaerobnih razmerah (GenBOX anaer, Bio-Merieux, Marcy l'Etoile, Francija). *E. coli* smo nacepili na gojišče EMB, kolonije pa prešteli po 24 h inkubacije pri 37 °C.

Kolonije smo prešteli, s pomočjo elektronskega števca kolonij (EŠKO, Ljubljana, Slovenija), na tistih petrijevih ploščah, kjer je zraslo od 30 do 300 kolonij. V primeru da je bilo število kolonij na ploščah nižje od 30, smo rezultat izrazili kot »manj kot 30 KE/ml oz. na 10 cm<sup>2</sup> vzorca«.

Število kolonijskih enot v 1 ml smo izračunali po formuli:

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

N - število kolonijskih enot (KE/cm<sup>2</sup> oz. KE/ml)

ΣC - število preštetih kolonij na vseh ploščah

n<sub>1</sub> - število števnih plošč (30 do 300 kolonij) prve razredčitve

n<sub>2</sub> - število števnih plošč (30 do 300 kolonij) druge razredčitve

d - razredčitveni faktor, ki ustreza prvi razredčitvi

### 3.3.4 Priprava črevesnega tkiva

Notranjost črevesa smo s pomočjo lijaka vsakič trikrat sprali z dobro ohlajenim pufrom PBS in s tem odstranili vsebino. Nato smo z ostrom rezilom odvzeli deset koščkov jejunuma, velikih 10 cm<sup>2</sup>. Potopili smo jih v posodo s PBS, ter dali za 30 minut v hladilnik. Ta inkubacija pri 4°C je povzročila, da se je sluz (mukus) odluščila. En košček smo homogenizirali in analizirali takoj, da smo se prepričali, ali je spiranje zadostovalo za odstranitev prisotne mikrobiote. Preostalih devet koščkov smo uporabili za poskus vezave.

### 3.3.5 Vezava ali adhezija

Z adhezijo smo želeli ugotoviti sposobnost vezave samostojnih čistih sevov LF221, K7 ter *E. coli* *ex vivo*. Hkrati je bil namen ugotoviti, do kolikšnega tekmovanja (competition), izključevanja (exclusion) oziroma izpodrivanja (displacement) *E. coli* pride s strani laktobacilov oz. če do česarkoli omenjenega v primeru simulacije *ex vivo* vezave probiotikov sploh pride.

Tekmovanje med *E. coli* in *L. gasseri* LF221 smo opazovali tako, da smo v testu uporabili suspenzijo, ki je vsebovala oba seva hkrati (Ec+LF), tekmovanje med *E. coli* in sevom K7 pa z mešanico kultur *E. coli* in *L. gasseri* K7 (Ec+K7).

Morebitno izpodrivanje *E. coli* s strani laktobacilov smo opazovali tako, da smo posamezne koščke pomočili najprej v suspenzijo Ec, potem pa v suspenzijo enega od testnih laktobacilov. Oznaka teh vzorcev je bila Ec/LF oziroma Ec/K7.

Izklučevanje *E. coli* s strani laktobacilov je bilo simulirano na način, da smo posamezne koščke črevesa inkubirali najprej v suspenziji enega od testnih sevov laktobacilov, nato pa, po vmesnem spiranju, v suspenziji Ec. Oznaki vzorcev sta bili LF/Ec in K7/Ec.

Koščke črevesne sluznice za teste adhezije smo pripravili tako, kakor je opisano zgoraj (3.3.2). S sterilno pinceto (alkohol + ogenj) smo iz posode s PBS vzeli košček črevesne sluznice, ga narahlo 3x sprali v čaši z 250 ml pufra PBS, ki smo ga vmes vsakič zamenjali, ter s tem izprali še zadnje ostanke mukusa in vsebine črevesja. Endogeno mikrobioto smo torej pretežno odstranili, koščke črevesa pa smo nato prenesli v prej pripravljene steklenice s suspenzijami:

- v steklenico z oznako »LF« dva koščka,
- v steklenico z oznako »K7« prav tako dva koščka,
- v steklenico z oznako »Ec« tri koščke,
- v steklenico z oznako »LF+Ec« en košček,
- v steklenico z oznako »K7+Ec« prav tako en košček črevesa.

Vseh pet steklenic smo postavili za 30 minut v stresalnik, kjer je potekala vezava preskušanih bakterij na še vedno žive črevesne epitelne celice, in sicer pri 37 °C in hitrosti stresanja 75 obratov na minuto.

Po en košček iz mešanic LF+Ec, K7+Ec, ter čistih suspenzij LF, K7 in Ec smo po končani vezavi takoj sprali in prenesli v fiziološko raztopino (100 ml), kasneje pa homogenizirali in razredčitve nacepili na ustrezno gojišče. Drugega od obeh koščkov iz steklenic LF in K7 smo prenesli v novi steklenici s suspenzijo seva *E. coli*, v katerih je nato potekala inkubacija s sevom *E. coli*. Označili smo ju kot LF/Ec, oz. K7/Ec. Prav tako drugega od treh koščkov iz steklenice Ec smo dali v steklenico s sevom LF, ter označili Ec/LF, tretjega pa v suspenzijo K7 in označili Ec/K7. Tudi te štiri steklenice smo inkubirali v stresalniku pri enakih pogojih (30 min, 37 °C, 75 obr/min).

### 3.3.6 Spiranje

Vsakega od koščkov smo po končani vezavi najprej narahlo ročno sprali v PBSu, prenesli v steklenice s po 150 ml ohlajenega pufra in te postavili v stresalnik. Vzorce smo stresali 5 minut pri 150-ih obratih/minuto in 37 °C. S tem so bile odstranjene bakterije, ki se niso vezale na črevesni epitel.

### 3.3.7 Homogeniziranje

Po spiranju v stresalniku smo koščke še ročno sprali v PBSu in prenesli v označene steklenice s po 100 ml sterilne, dobro ohlajene fiziološke raztopine. Vsebine vseh devetih, poleg teh pa tudi vsebino steklenice z oznako »0«, ki je vsebovala vzorec za preverjanje uspešnosti odstranjevanja prvotne mikrobiote, so bile pripravljeni za homogeniziranje, ki smo ga opravili z aparatom Ultra Turrax T25 basic (Ika, Staufen, Nemčija).

Hitrost homogeniziranja je bila 11000 obratov/minuto, čas pa 2-3 minute. Pred obdelavo vsakega naslednjega vzorca je bilo potrebno homogenizator dobro očistiti ter sprati v 70% alkoholu, nato pa še v pufru PBS. Sledilo je nadaljnje razredčevanje ter nacepljanje na selektivna gojišča.

### 3.3.8 Razredčitve in nacepitve na komercialni selektivni gojišči

Po pripravi suspenzij smo iz dobro premešanih vsebin steklenic z oznakami LF, K7, Ec, LF+Ec in K7+Ec, ter prav tako iz homogeniziranega vzorca z oznako »0«, aseptično odpipetirali po 1 ml vsebine v sterilne epruvete z 9 ml fiziološke raztopine. Tako smo dobili desetkrat razredčene vzorce (razredčitev  $10^{-1}$ ). Epruvete smo postavili v posodo z ledom. V nadaljevanju smo pripravljali zaporedne 10-kratne razredčitve posameznih vzorcev do  $10^{-5}$ . Razredčitve smo nacepili v selektivna trda gojišča in inkubirali pri ustreznih pogojih, opisanih zgoraj (3.3.3).

### 3.3.9 Barvanje po Gramu

Bakterije lahko ločujemo na po Gramu pozitivne in po Gramu negativne, na podlagi barvanja po Gramu. Za različno barvanje je odgovorna celična stena, ki obdaja citoplazmo in citoplazemsko opno, bakterijski celici pa daje obliko in trdnost. Stena je po zgradbi podobna mrežici, njena glavna sestavina pa je peptidoglikan ali murein, ki je kompleks N-acetyl glukozamina in N-acetyl-muraminske kislina, vsebuje pa tudi alanin, glutaminsko kislino, lizin in diaminopimelično kislino. Murein je mrežasto grajen in je različno sestavljen pri po Gramu pozitivnih in negativnih bakterijah. Tako se kristali metilvijoličnega barvila, ki nastanejo po dodatku raztopine joda, pri po Gramu pozitivnih bakterijah ujamejo v debelo plast peptidoglikana, pri po Gramu negativnih pa ne. Po spiranju z zmesjo acetona in etanola se tako le po Gramu negativne bakterije razbarvajo, po Gramu pozitivne pa ostanejo vijolične. V zadnjem koraku barvanja se po Gramu negativne bakterije obarvajo z barvilom safranin rdeče.(Bratis in Brglez, 1984).

Preglednica 3: Razlike v kemični zgradbi celične stene po Gramu pozitivnih in negativnih bakterij

	Gram +	Gram -
Aminokisline	glutaminska kislina in alanin -	večina aminokislin diaminopimelična kislina
Lipidi	do 2% lipidov	10-20% lipidov
Polisaharidi	36-60% polisaharidov	15-20% polisaharidov
Teihoična kislina	do 50%	-
Murein	večplasten	enoplasten

### 3.4 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Za statistično obdelavo smo uporabili statistični paket SAS/STAT (1994) iz programskega paketa SAS.

Vse vrednosti, ki smo jih dobili po štetju mikroorganizmov na petrijevih ploščah, smo pred testiranjem pretvorili v logaritemske vrednosti.

#### 3.4.1 Statistični model

Lastnosti v poskusu smo obdelali s statističnim modelom. Kot sistematska vpliva smo v model vključili poskus ( $P_i$ ) in skupino ( $S_j$ ), značilnosti njunih vplivov pa testirali po metodi najmanjših kvadratov. Za analizo razlik med skupinami smo uporabili test sredin in Tukeyev test.

$$y_{ijk} = \mu + P_i + S_j + PS_{ij} + e_{ijk} \quad \dots (2)$$

$y_{ij}$  – število vezanih kolonijskih enot seva K7 oz. LF221 oz. *E. coli*

$\mu$  - srednja vrednost

$P_i$  - vpliv poskusa, ( $i = 1, 2, 3, 4, 5$ )

$S_j$  - vpliv skupine, ( $j = 1, 2, \dots, 7$  oz. 8)

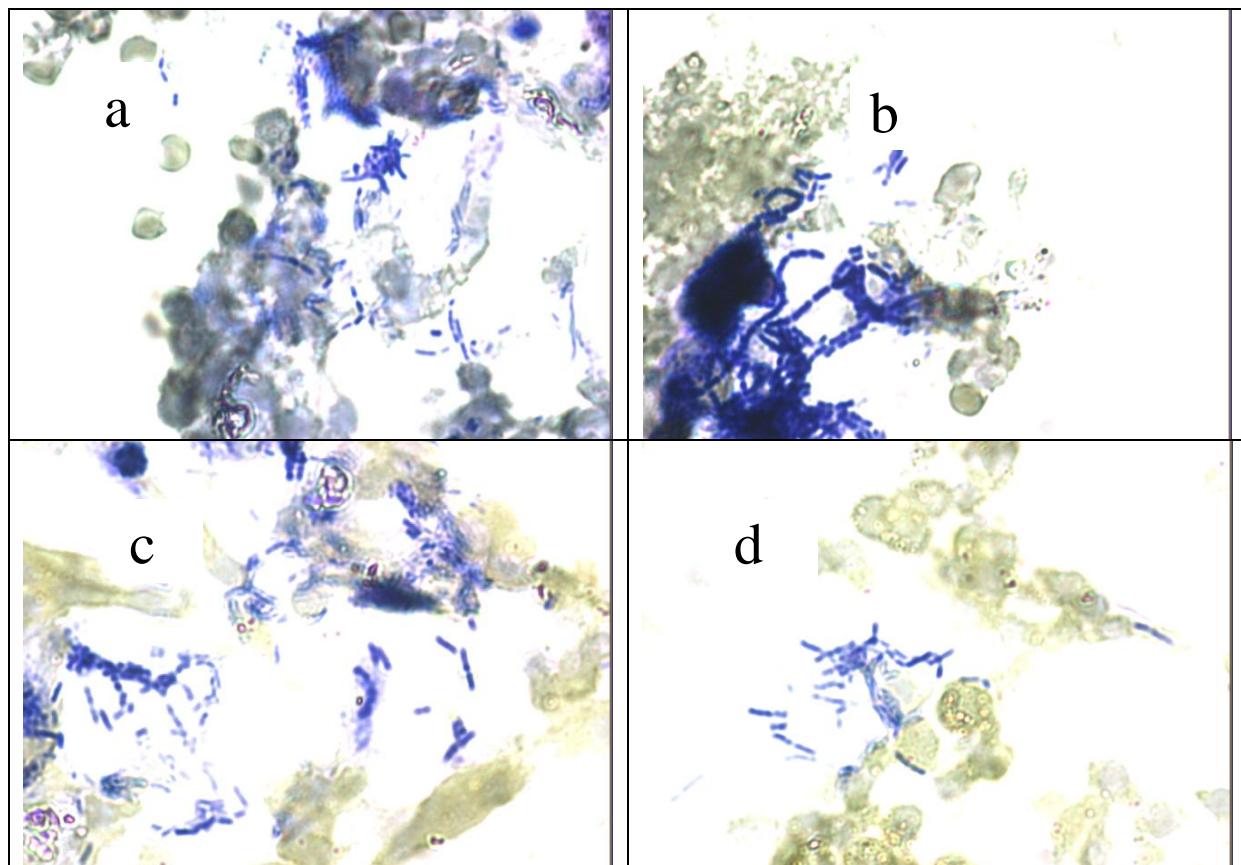
$PS_{ij}$  - vpliv interakcije med poskusom in skupino

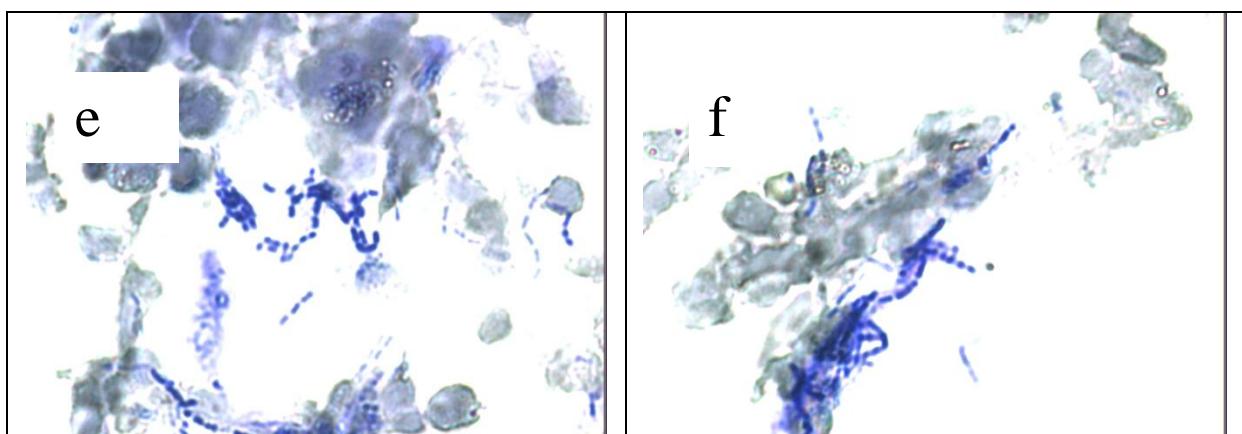
$e_{ij}$  - ostanek

## 4 REZULTATI

### 4.1 REZULTATI MIKROSKOPIRANJA ČREVESNE SLUZNICE S PRIPETIMI TESTNIMI LAKTOBACILI

Rezultati mikroskopiranja črevesne sluznice, ki je bila najprej obdelana tako, da smo odstranili črevesno vsebino, mukus in naravno mikrobioto, zatem pa jo izpostavili celicam *L. gasseri* K7 ali *L. gasseri* LF221, so pokazali, da se oba seva vežeta na enterocite črevesne sluznice. Vezali so se dovolj čvrsto, da jih s spiranjem nismo odstranili s površine vzorcev. Nevezane bakterije smo s spiranjem s fosfatnim pufrom pred barvanjem odstranili. Celice laktobacilov so obarvane vijolično, celice enterocitov pa sivo- rumeno. Vezavo smo ovrednotili s štetjem na ploščah, kar je opisano v nadaljevanju.





Slika 8: Mikroskopski preparati (a-f) črevesne sluznice s pripetimi laktobacili (*L. gasseri* K7), pripravljeni z barvanjem po Gramu. Celice laktobacilov so obarvane vijolično, celice enterocitov pa sivo - rumeno

#### 4.2 REZULTATI KONTROLE SPIRANJA VZORCEV (VZOREC »0«)

Tekom poskusa smo dodatno izvajali kontrolno izpiranje prvotne mikrobiote iz vzorcev črevesne sluznice. Prvotno mikrobioto smo s spiranjem želeli odstraniti, da ne bi motila preskusa.

Za preskus, ali je bilo odstranjevanje prvotne mikrobiote uspešno, smo homogenizirane vzorce črevesne sluznice nacepili na plošče z gojiščema EMB (za *E. coli*) in MRS (za laktobacile).

Preglednica 4: Kontrola izpiranja prvotne mikrobiote iz koščkov jejunuma (vzorec nič »0«)

MRS:	A	B	SD	POVP.	LOG A	LOG B	SD LOG	POVP. Log
Pos. 1<0«	4000	4000	0	4000	3,60	3,60	0	3,60
Pos. 3<0«	48000	43000	3535,53	45500	4,68	4,63	0,03	4,66
Pos. 4<0«	1	0	0,71	0,5	0	0	0	0
Pos. 5<0«	3	2	0,71	2,5	0,48	0,30	0,12	0,39

EMB	A	B	SD	POVP.	LOG A	LOG B	SD LOG	POVP. Log
Pos. 1<0«	387000	384000	2121,32	385500	5,59	5,58	0,00	5,59
Pos. 3<0«	29000	22000	4949,75	25500	4,46	4,34	0,09	4,40
Pos. 4<0«	0	14	9,90	7	0	1,15	0,81	0,57
Pos. 5<0«	3	10	4,95	6,5	0,48	1	0,37	0,74

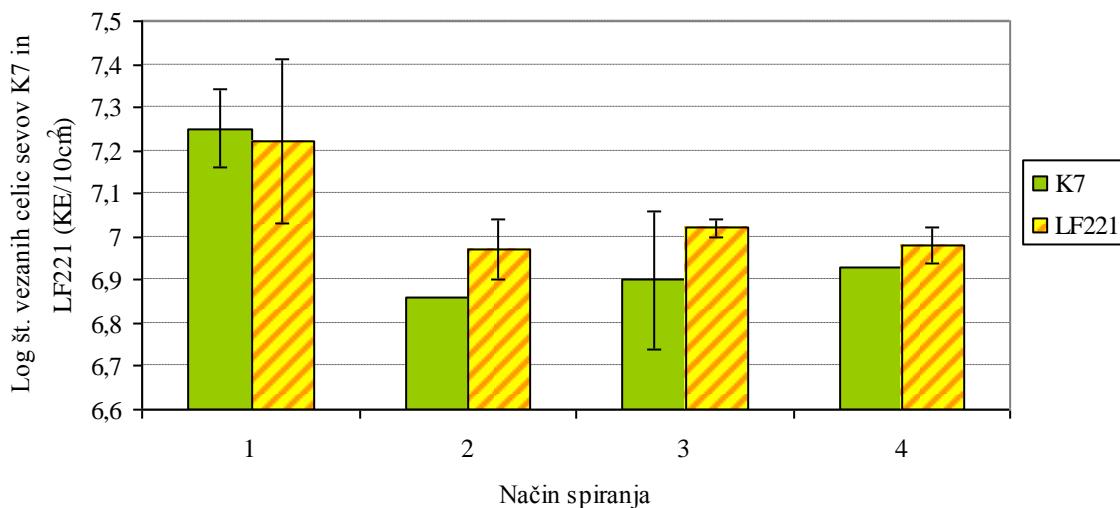
Legenda:

- »0« košček jejunuma brez kakršnihkoli dodatkov, samo spran  
A,B paralelki; koščka jejunuma, velika 10 cm  
SD standardna deviacija  
POVP. povprečna vrednost števila mikroorganizmov, preštetih na ploščah, dobljenih od paralelk A in B  
LOG A logaritmirana vrednost rezultatov vzorca A  
LOG B logaritmirana vrednost rezultatov vzorca B  
Pos. poskus

Preštete kolonije (KE) smo pretvorili v logaritemsko vrednost. Iz preglednice 4 je razvidno, da so ostanki mikroorganizmov v prvih dveh poskusih veliko večji kot v naslednjih, čeprav je bil način izvajanja poskusa enak. Mlečnokislinskih bakterij, ki smo jih šteli na gojišču MRS, je bilo v vseh vzorcih manj kot  $10^5$  na  $10\text{ cm}^2$ , kar je bilo za potrebe testiranja zadovoljivo. Z izjemo enega vzorca je bilo v vseh drugih vzorcih tudi preostalih enterobakterij, ki smo jih nacepljali na gojišče EMB, manj kot  $10^5$  na  $10\text{ cm}^2$ , kar pomeni za 2 log enoti manjše število od povprečnega števila vezanih *E. coli* v preskusih.

#### 4.3 NAČIN SPIRANJA (PO ADHEZIJI)

Med procesom vezave se laktobacili vežejo na resice črevesa. Nevezane laktobacile pa je pred nadaljnjam postopkom obdelave potrebno sprati. V tem delu poskusa smo ugotavljali najprimernejši način spiranja vzorcev, potrebnega za odstranitev nevezanih bakterij.



Slika 9: Vpliv postopka spiranja

Legenda:

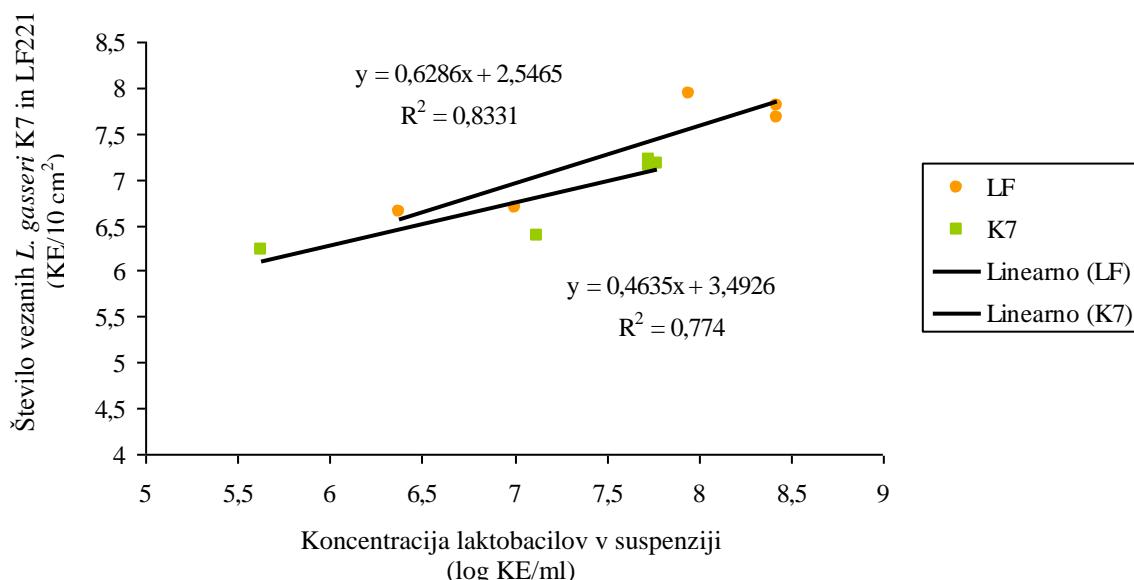
- Spiranje 1 košček črevesa smo spirali samo ročno (narahlo s pomakanjem v pufru PBS)  
Spiranje 2 najprej ročno spiranje, nato še 5 minut v stresalniku ( $37\text{ }^\circ\text{C}$ , 150 obratov/min. v 200 ml pufra PBS)  
Spiranje 3 ročno, nato dvakrat po 5 minut v stresalniku  
Spiranje 4 ročno in še 3 x 5 minut v stresalniku z vmesno menjavo pufra

Glede na rezultate (slika 9) je razvidno, da je po prvem načinu spiranja, ki je vključevalo le ročno spiranje s pomakanjem v pufer, ostalo pripetih na vzorce sluznice značilno več testnih laktobacilov kot pri ostalih treh postopkih, ki so vključevali še dodatne korake inkubacije v stresalniku. Pri sevu K7 je število vezanih celic pri postopku 1 značilno večje ( $p<0,05$ ) od števila, dobljenega pri ostalih treh postopkih. Rezultati postopkov 2, 3 in 4 se med seboj ne razlikujejo. Podobno lahko zaključimo za sev LF221.

Že en ciklus stresanja je odstranil slabše vezane laktobacile, saj se po enem ali dveh dodatnih ciklih stresanja število vezanih laktobacilov ni več značilno zmanjšalo. Na

podlagi rezultatov tega preskusa smo v nadalnjih testih uporabljali protokol, ki je vključeval najprej ročno in nato še enkratno pet minutno spiranje vzorcev v stresniku, v pufru PBS.

#### 4.4 PRIMERJAVA MED KONCENTRACIJO SUSPENZIJE IN VEZANIMI CELICAMI



Slika 10: Primerjava koncentracije laktobacilov v suspenziji s številom vezanih laktobacilov

Slika 10 prikazuje primerjavo med koncentracijo suspenzij sevov LF221 oz. K7 in logaritemskim številom vezanih kolonijskih enot obeh laktobacilov. Pri tem je razvidno, tako pri sevu LF221 kot K7, da je višji koncentraciji suspenzije sledilo tudi večje število vezanih kolonijskih enot. Koeficient determinacije v primeru seva LF221 je znašal  $R^2 = 0,8331$  in je pomenil, da smo pojasnili 83,31% variabilnosti. V primeru seva K7 je bil  $R^2 = 0,774$  in je bilo pojasnjene 77,4% variabilnosti. V obeh primerih je dodana tudi regresijska enačba. Linearna funkcija slabše opiše povezavo med izhodiščnim številom laktobacilov v suspenziji in številom laktobacilov, ki so se vezali na črevesno sluznico (nizke vrednosti  $R^2$ ).

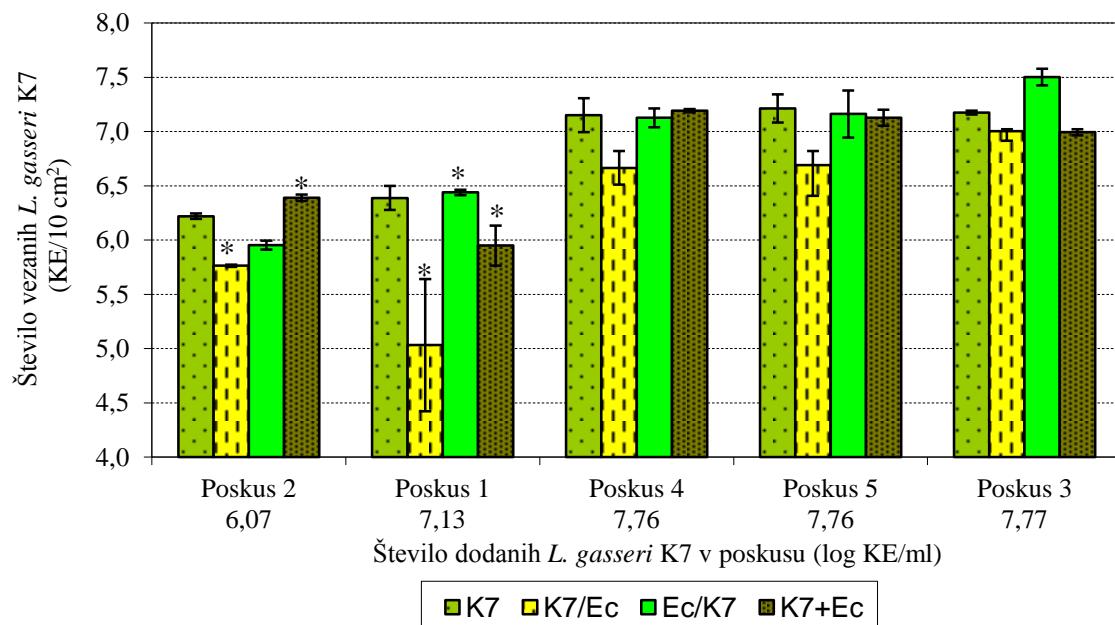
Primerjava med koncentracijo suspenzije ter številom vezanih *L. gasseri* K7 in LF221 kaže, da se nekoliko bolje veže LF221, kar lahko izračunamo tudi z regresijsko enačbo. Pri obeh sevih je razvidno, da je višji koncentraciji suspenzije sledilo tudi večje število vezanih kolonijskih enot.

#### 4.5 VEZAVA

Preglednica 5: Povprečne koncentracije suspenzij *E. coli*, ter sevov K7 in LF221 (log KE/ml) v posameznih poskusih celotne naloge, izražene v logaritemskih vrednostih

	Poskus 1	Poskus 2	Poskus 3	Poskus 4	Poskus 5
Ec	7,83	6,54	7,88	7,85	7,85
K7	7,13	6,07	7,77	7,76	7,76
LF	7,01	6,48	7,95	8,42	8,42

Koncentracije suspenzij sevov *E. coli* O8:K88, K7 ter LF221 v posameznem poskusu celotne naloge (preglednica 5). Pri tem smo želeli, da bi bile koncentracije suspenzij *E. coli* pri vseh petih poskusih čim bolj enake, pri obeh laktobacilih pa različne. Najnižje koncentracije suspenzij smo imeli v drugem poskusu.



Slika 11: Vezava *L. gasseri* K7 na tanko črevo prašičev pri različni začetni koncentraciji

Legenda:

Susp. K7 – koncentracija suspenzij seva *L. gasseri* K7 (KE/ml)

K7 - inkubacija tkiva v suspenziji samostojnih sevov *L. gasseri* K7

K7/Ec – inkubaciji tkiva v suspenziji *L. gasseri* K7 je sledila inkubacija v suspenziji *E. coli* (izključevanje)

Ec/ K7 - inkubaciji tkiva v suspenziji *E. coli* je sledila inkubacija v suspenziji *L. gasseri* K7 (izpodrivanje)

K7+Ec – inkubacija tkiva v mešanici obeh sevov (tekmovanje)

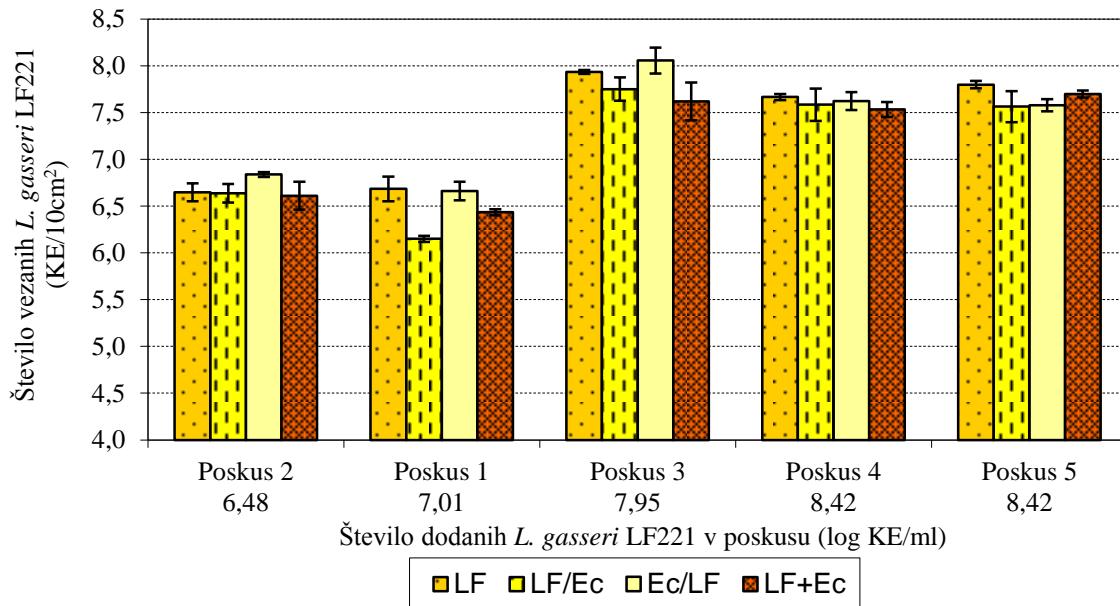
Prikazane so srednje vrednosti  $\pm$  SD dveh ponovitev. Zvezdica (\*) ponazarja srednjo vrednost, ki se je statistično značilno ( $p<0,05$ ) razlikovala od kontrolnega vzorca, to je čiste kulture *L. gasseri* K7 (K7).

Slika 11 prikazuje uspešnost vezave *L. gasseri* K7 (KE/10 cm<sup>2</sup>) glede na koncentracijo dodanih *L. gasseri* K7 (log KE/ml) v vseh petih poskusih. Pri tem smo v sliki po velikosti razvrstili dodano količino suspenzije (log KE/ml) in temu primerno razvrstili zaporedno številko opravljenega poskusa. Prikazana je vezava *L. gasseri* K7 samostojnega seva, ter v

poskusih izključevanja (K7/Ec), izpodrivanja (Ec/K7) in tekmovanja (K7+Ec). Podatki prikazujejo logaritmirane srednje vrednosti  $\pm$  SD dveh ponovitev. Na sliki je opaziti, da se je *L. gasseri* K7 sposoben vezati in da z naraščanjem koncentracije suspenzije narašča tudi količina vezanega seva K7. Prav tako je opaziti, da je število vezanih K7 v primeru izključevanja (K7/Ec) pri vseh poskusih nekoliko nižje od ostalih načinov (samostojno vezanje seva, tekmovanje, izpodrivanje).

Primerjava statistično značilnega odstopanja od samostojno vezanega seva K7 kaže, da je to le pri poskusu 1, kjer je koncentracija dodane K7 (7,13 log KE/ml) in sicer statistično značilno odstopa izključevanje (K7/Ec), ( $P<0,0001$ ). Pri ostalih poskusih ni bilo statistično značilnega odstopanja od samostojno vezanega seva K7.

Če pa med sabo primerjamo vse načine vezave znotraj poskusa vidimo, v poskusu 2, kjer je koncentracija dodane K7 (6,07 log KE/ml), statistično značilno odstopanje v primeru izključevanja (K7/Ec) in tekmovanja (K7+Ec). Na grafu je statistično značilno odstopanje ponazorjeno z zvezdico (\*). V poskusu 1 se v tem primeru statistično značilno razlikujejo vsi načini vezave. Pri ostalih poskusih ni bilo statistično značilnega odstopanja.



Slika 12: Vezava *L. gasseri* LF221 na tanko črevo prašičev pri različni začetni koncentraciji

Legenda:

Susp. LF – koncentracija suspenzij seva *Lactobacillus gasseri* LF221 (KE/ml)

Susp. Ec – koncentracija suspenzij *E. coli* (KE/ml)

Ec - inkubacija tkiva v suspenziji samostojne *E. coli*

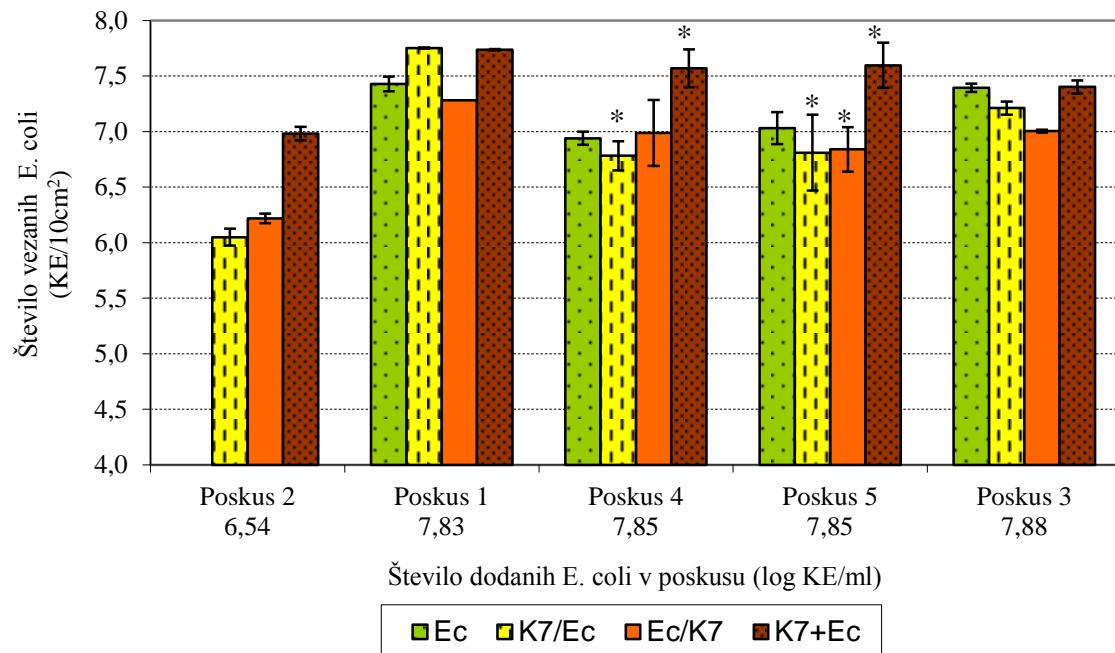
LF/Ec – inkubaciji tkiva v suspenziji seva LF221 je sledila inkubacija v suspenziji *E. coli* (izključevanje)

Ec/LF - inkubaciji tkiva v suspenziji *E. coli* je sledila inkubacija v suspenziji seva LF221 (izpodrivanje)

LF+Ec – inkubacija tkiva v mešanici obeh sevov (tekmovanje)

Prikazane so srednje vrednosti  $\pm$  SD dveh ponovitev. Zvezdica (\*) ponazarja srednjo vrednost, ki se je statistično značilno ( $p<0,05$ ) razlikovala od kontrolnega vzorca, to je čiste kulture *L. gasseri* LF221 (LF).

Slika 12 prikazuje uspešnost vezave seva *L. gasseri* LF221 ( $\log \text{KE}/10 \text{ cm}^2$ ) na črevesno sluznico prašičev. Podatki prikazujejo logaritmirane srednje vrednosti  $\pm$  SD dveh ponovitev. V sliki smo po velikosti razvrstili dodano količino suspenzije (log KE/ml) in temu primerno razvrstili zaporedno številko opravljenega poskusa. Vidimo, da se je *L. gasseri* LF221 sposoben vezati na celice črevesne sluznice. Z večjo koncentracijo dodane suspenzije LF221 se poveča tudi število vezanih sevov. Tudi tu smo želeli, da bi bile koncentracije suspenzij *E. coli* pri vseh petih poskusih čim bolj enake, pri laktobacilu pa različne (preglednica 5). Do najvišjega števila vezanih *L. gasseri* LF221 je prišlo v poskusu 3, kjer smo dodali 7,95 KE/ml LF221, pri višji koncentraciji suspenzije pa se je količina vezanih laktobacilov nekoliko zmanjšala. Razlike so sicer majhne, lahko pa pomislimo, da je prišlo do zasičenosti vezave laktobacila. Statistična obdelava kaže, da se nobena od skupin izključevanja, izpodrivanja ali tekmovanja statistično značilno ne razlikuje.



Slika 13: Zaviranje vezave *E. coli*, na črevesno sluznico tankega črevesa prašičev, z *L.gasseri* K7, pri različnih koncentracijah dodane suspenzije *E. coli*, pod pogoji izključevanja (K7/Ec), izpodrivanja (Ec/K7) in tekmovanja (K7+Ec)

Legenda:

Susp. Ec – koncentracija suspenzij seva *E. coli* (KE/ml)

K7 - inkubacija tkiva v suspenziji samostojnih sevov *L. gasseri* K7

K7/Ec – inkubaciji tkiva v suspenziji *L. gasseri* K7 je sledila inkubacija v suspenziji *E. coli*

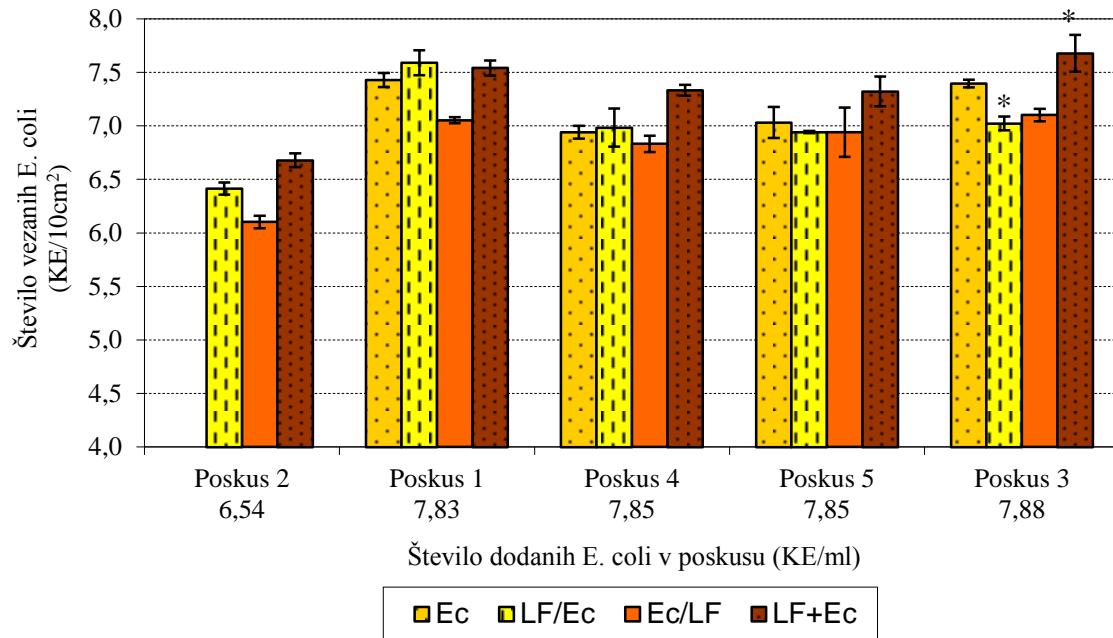
Ec/ K7 - inkubaciji tkiva v suspenziji *E. coli* je sledila inkubacija v suspenziji *L. gasseri* K7

K7+Ec – inkubacija tkiva v mešanici obeh sevov

Prikazane so srednje vrednosti  $\pm$  SD dveh ponovitev. Zvezdica (\*) ponazarja srednjo vrednost, ki se je statistično značilno ( $p<0,05$ ) razlikovala od kontrolnega vzorca, to je čiste kulture *E. coli* (Ec).

Slika 13 nam prikazuje vezavo oz. zaviranje vezave *E. coli* na črevesno sluznico tankega črevesa prašičev z *L. gasseri* K7. Vseh pet poskusov smo na sliki razvrstili glede na količino dodane suspenzije *E. coli* in sicer od najmanjše (6,54 KE/ml), pa do največje (7,88 KE/ml). Različne so tudi dodane suspenzije K7 in sicer (6,07), (7,13), (7,76), (7,76) in (7,77 KE/ml). Razvidno je, da se je *E. coli* sposobna vezati na epitelne celice črevesa, tako samostojno, kot ob učinkovanju seva *L. gasseri* K7. V poskusu dva, pri načinu, kjer je inkubacija tkiva potekala samo v čisti suspenziji *E. coli*, je najverjetnejše prišlo do napake pri delu, zaradi tega na gojišču niso zrasle kolonije *E. coli*. Kljub temu primeri izključevanja, izpodrivanja in tekmovanja kažejo sposobnost vezave *E. coli* tudi v celotnem drugem poskusu. Statistično analizo smo opravili z GLM proceduro, Studentovim *t* testom. Primerjali smo rezultate znotraj vsakega od petih poskusov. Kontrolne vzorce so ponazarjale srednje vrednosti vezane samostojne oz. čiste *E. coli* (Ec). V poskusu 2 tega rezultata nismo dobili, zato v tem primeru statistična obdelava ni bila mogoča. V dveh (poskusa 4 in 5) od petih preskusov smo opazili nekaj značilnih razlik

( $p<0,05$ ) v vezavi *E. coli* (Ec) v čisti kulturi od vezave v primerih tekmovanja, izpodrivanja in izključevanja. Izključevanje (K7/Ec) in izpodrivanje (Ec/K7) *E. coli* s strani laktobacila K7 v večini primerov ni bilo statistično značilno.



Slika 14: Zaviranje vezave *E. coli* na črevesno sluznico tankega črevesa prašičev z *L. gasseri* LF221, pri različnih koncentracijah dodane suspenzije *E. coli*, pod pogoji izključevanja (LF/Ec), izpodrivanja (Ec/LF) in tekmovanja (LF+Ec)

Legenda:

Susp. Ec – koncentracija suspenzij *E. coli* (KE/ml)

Ec - inkubacija tkiva v suspenziji samostojne *E. coli*

LF/Ec – inkubaciji tkiva v suspenziji seva LF221 je sledila inkubacija v suspenziji *E. coli*

Ec/LF - inkubaciji tkiva v suspenziji *E. coli* je sledila inkubacija v suspenziji seva LF221

LF+Ec – inkubacija tkiva v mešanici obih sevov

Prikazane so srednje vrednosti  $\pm$  SD dveh ponovitev. Zvezdica (\*) ponazarja srednjo vrednost, ki se je statistično značilno ( $p<0,05$ ) razlikovala od kontrolnega vzorca, to je čiste kulture *E. coli* (Ec).

Slika 14 nam prikazuje vezavo oz. zaviranje vezave *E. coli* na črevesno sluznico tankega črevesa prašičev z *L. gasseri* LF221. Količine dodane suspenzije LF221 v posameznem poskusu so različne in sicer pri 6,54 KE/ml *E. coli* je dodano (6,48 KE/ml) LF221, nadalje (7,01), (8,42), (8,42), in pri 7,88 KE/ml dodane suspenzije *E. coli* je bilo suspenzije LF221 (7,95 KE/ml). Podatki prikazujejo srednje vrednosti  $\pm$  SD dveh ponovitev. Razvidno je, da se je *E. coli* sposobna vezati na epitelne celice črevesa, tako v primeru, kjer smo tkivo inkubirali samo v suspenziji *E. coli*, kot tam, kjer je učinkoval dodan sev LF221.

V poskusu 2, za tkivo samo v čisti suspenziji Ec., kjer je dodane *E. coli* 6,54 KE/ml, zaradi najverjetnejše napake pri delu in posledično manjkajočega rezultata, statistična obdelava ni bila mogoča. Sicer pa ta kaže, da se, z eno izjemo (poskus 3, LF/Ec) nobena od skupin

izključevanja, izpodrivanja ali tekmovanja statistično značilno ne razlikuje od primerjalne skupine, kjer smo tkivo inkubirali v suspenziji samostojne *E. coli*. Na sliki pa je razvidno, da je v vseh poskusih najuspešnejša vezava *E. coli* v primeru tekmovanja, najmanj pa pri izpodrivanju *E. coli* s strani LF221.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Vezava na črevesno sluznico je pomemben kriterij za izbiro probiotičnih sevov. Narejen je bil poskus vezave dveh probiotikov, *L. gasseri* LF221 in *L. gasseri* K7, na črevesno sluznico tankega črevesa prašičev. Prej imenovani *L. gasseri* LF221 so kasneje prerazporedili v vrsto *L. gasseri*. Človeška probiotična seva *L. gasseri* K7 in LF221 sta izolirana iz različnih otrok ter ob različnem času, izkazalo pa se je, da producira enake bakteriocine. Ugotovili so, da so genski nukleotidni zapisi za bakteriocina seva K7, poimenovana gassericin K7 A (GenBank EF392861) in gassericina K7 B (GenBank AY307382), podobni zapisom za bakteriocine seva LF221 (acidocin LF221 A in acidocin LF221 B) (Bogovič Matijašić in Rogelj, 1998; Zorič-Peternel in sod., 2010).

V poskus v tem delu so bili vključeni devet mesecev stari prašiči pitanci. Uporabili smo osrednji del teščega črevesa (jejunuma). Prebavni sistem prašičev je primerljiv s človeškim, zato so prašiči večkrat uporabljeni kot testne živali znanstvenih poskusov, med njimi tudi poskusov glede uporabe probiotikov (Goldin in sod., 1988; Singer in sod., 2003; Jensen in sod., 2011).

Ohlajene vzorce črevesne sluznice, ki smo jih takoj po žrtvovanju živali na ledu prenesli v laboratorij, smo sprali s pufrom, da smo odstranili obstoječo mikrobioto črevesa, nato smo narezali vzorce velikosti 10 cm<sup>2</sup>. Po ponovnem spiranju s pufrom smo nekaj vzorcev sluznice pregledali s štetjem na ploščah, da smo videli, kako uspešno smo odstranili endogeno mikrobioto, rezultate pa imenovali »vzorec 0«. To kontrolo smo izvajali tekom vseh petih neodvisnih poskusov. Ugotovili smo, da smo endogeno mikrobioto v večji meri odstranili, saj je ostalo za najmanj 2 log enoti manj kot se je na sluznico vezalo testnih laktobacilov oz. *E. coli*.

Seva *L. gasseri* K7 in *L. gasseri* LF221, ki sta znana kot varna probiotika, ter sta bakteriocinogena in imata širok spekter protimikrobne aktivnosti (Bogovič Matijašić in sod., 2004), smo predhodno namnožili s kultivacijo v komercialnem gojišču MRS. S centrifugiranjem smo odstranili preostalo gojišče, celice pa resuspendirali v pufru z ustrezno pH vrednostjo, tako da smo dobili ustrezne koncentracije suspenzij, v katere smo pomakali koščke. Koncentracije suspenzij obeh laktobacilov in *E. coli* v petih neodvisnih poskusih, nacepljene in preštete na petrijevih ploščah so variirale:

- K7 od 1,2x10<sup>6</sup> KE/ml do 5,95x10<sup>7</sup> KE/ml,
- LF221 od 3x10<sup>6</sup> KE/ml do 2,65x10<sup>8</sup> KE/ml,
- E.c. od 3,5x10<sup>6</sup> KE/ml do 7,55x10<sup>7</sup> KE/ml.

Pripravljene vzorce tkiva smo vsakič potopili v suspenzijo celic enega od preskušanih sevov in inkubirali pri 37 °C 30 minut, s čimer smo omogočili vezavo preskušanih bakterij na še vedno žive črevesne epitelne celice. Nevezane celice smo sprali z vzorcev tkiva. Na koncu smo število vezanih celic ugotovili tako, da smo vzorce prenesli v steklenice s fiziološko raztopino, vsakega posebej homogenizirali, pripravili razredčitve, jih nacepili na komercialno selektivno gojišče, inkubirali in prešteli zrasle kolonije.

Rezultate povprečnih koncentracij suspenzij sevov LF221, K7 ter *E. coli* v posameznem poskusu smo pretvorili v logaritemske vrednosti (preglednica 5). Pri tem smo žeeli, da bi bile koncentracije suspenzij *E. coli* pri vseh petih poskusih čim bolj enake, kar je uspelo v zadnjih štirih poskusih, pri obeh laktobacilih pa različne (dokaj enake so v zadnjih treh poskusih).

Znano je, da nekateri mikroorganizmi rastejo na površini resic (epitelija), drugi živijo prosto v lumnu črevesja, tretji pa se razraščajo po kanalih kript in po epitheliju. (Fuller, 1984). Želeli smo prešteti samo vezane mikroorganizme. Ročno spiranje, s tresenjem koščka s pinceto v PBS, in nato še 5 minutno spiranje v stresalniku pri 37 °C, 150 obratih/min., v 200 ml pufra PBS, se je pokazalo kot najprimernejši način spiranja nevezanih laktobacilov. Postopek spiranja je bil uspešen in smo ga izvajali tekom vseh poskusov.

Ugotavljalci smo sposobnost *ex vivo* vezave *L. gasseri* K7 na črevesno sluznico tankega črevesa prašičev. Po Kališniku (2002) metoda *ex vivo* pomeni delovanje v poskusnih razmerah zunaj živega organizma. Delali smo s tkivom, katero je bilo dnevno sproti odvzeto prašičem, v manj kot dveh urah po odvzemu pa smo pričeli izvajati poskus. Življenske funkcije črevesa so torej bile še aktivne in tako je bilo ustvarjeno čim bolj kompleksno in fiziološko živemu podobno črevesno okolje.

Dokazana je že bila sposobnost vezave laktobacilov na ploščate epitelijske celice v grlu in požiralniku prašičev in drugih živali Fuller in sod., 1978. Mäyrä-Mäkinen in sod. (1983) so proučevali vezavo različnih laktobacilov na stebričaste epitelne celice z *in vitro* metodo. Po Kališniku, 2002 *in vitro* raziskave potekajo v umetnem okolju (v epruveti ali v posodi za kulturo tkiva). Pri tem simuliramo pogoje, ki so podobni tistim v gostitelju (npr. v prebavilih) (Lavrenčič, 2003).

Naš adhezijski test je bil izveden in prirejen po metodi Mäyrä-Mäkinen (1983). Sposobnost vezave *L. gasseri* K7 na epitelne celice črevesne sluznice smo dokazali (slika 11). Večji koncentraciji dodanih laktobacilov je vedno sledilo večje število vezanih laktobacilov K7. Opazimo, da je kljub večji razliki v količini dodane suspenzije med drugim in prvim poskusom napram prvim in četrtem poskusom, vezava pri slednjem večja. Ta preskok lahko pove, da je za dovoljšno vezavo in uspešno delovanje dobre mikrobiote v črevesju potrebna določena količina posameznega laktobacila. Zato moramo biti pozorni pri navedbi vsebovane količine ali roku uporabe izdelka z laktobacili, saj količina laktobacilov s starostjo izdelka pada, posledično pa tudi število vezanih laktobacilov.

Ugotavljalci smo tudi sposobnost *ex vivo* vezave *L. gasseri* LF221 na črevesno sluznico tankega črevesa prašičev. Spencer in Chesson (1994) sta izolate, prvotno zrasle na MRS

agarju in preštete pod mikroskopom, razdelila na močno vezane in nevezane oz. slabo vezane na enterocite jejunuma. V poskusu je bilo vključenih 43 laktobacilov izoliranih iz različnih delov prebavnega trakta, med njimi je bilo 11 primerkov sevov *L. acidophilus*, nato *L. fermentum*, *L. salivarius*, *L. delbrueckii*, *L. plantarum* in drugi. V nadaljevanju poskusa na sveže pripravljenih prašičjih enterocitih se je kot najmočneje vezan izkazal *L. fermentum*, nasprotno od pričakovanega, pa so se vsi sevi *L. salivarius* in večina sevov *L. acidophilus* izkazali kot slabo vezani na enterocite jejunuma. V našem primeru je vezava potekala dobro (slika 12), opaziti pa je, da je najboljša vezava potekala v poskusu 3 s 7,95 log ke/ml dodanih LF221, pri višji vrednosti dodanih laktobacilov pa je bila vezava nekoliko slabša, kar kaže tudi na vpliv dodane količine suspenzije in morebitno zasičenost. Spencer in Chesson (1994) tudi navajata veliko boljšo sposobnost vezave tistih trdno vezanih *Lactobacillus spp.*, ki so rasli na MRS trdem gojišču, kot pa v tekočem gojišču MRS. V našem poskusu smo uporabili tekoče gojišče MRS, vezava pa je bila kljub temu uspešna.

Mäyrä-Mäkinen in sod. (1983) navajajo, da so bili pri prašičih iz črevesnega tkiva in blata najpogosteje izolirani sevi vrst *L. delbrueckii*, *L. acidophilus* in *L. fermentum*. Pri tem se je na epitelne celice prašičev dobro vezalo 13 od 22 sevov laktobacilov, kar dokazuje uspešnost vezave. Splošno pa je vezava bila variabilna celo med sevi iste vrste. Sicer pa so tudi dokazali, da adhezivni sevi pri prašičih tolerirajo nizek pH in žolčne kisline, kar je pomembno za njihovo preživetje pod pogoji, ki so v želodcu in črevesju.

Primerjali smo tudi vezavo obeh sevov testnih laktobacilov *L. gasseri*. Relacija med številom dodanih in vezanih celic v poskusu je bila določena z regresijsko analizo pa metodi najmanjših kvadratov (slika 15). Vidimo, da se sev LF221 veže bolje kot sev K7. Linearna funkcija slabše opiše povezavo med izhodiščnim številom laktobacilov v suspenziji in številom laktobacilov, ki so se vezali na črevesno sluznico (nizke vrednosti  $R^2$ ). Razvidno pa je, da z naraščajočo količino dodane suspenzije narašča tudi količina vezanih laktobacilov, tako pri K7 kot LF221. Koeficient determinacije v primeru seva LF221 znaša ( $R^2 = 0,833$ ), s tem smo pojasnili 83,31% variabilnosti. Bogovič Matijašić in sod. (2003) prav tako navajajo, da višji koncentraciji suspenzije sledi večje število vezanih kolonijskih enot, vse dokler ne pride do zasičenosti.

V nadaljevanju nas je zanimala reakcija laktobacilov v primerih, ko v realni situaciji delovanja črevesa prostora epitelnih celic ne zasedajo sami, ampak se morajo boriti s posameznimi patogeni. Vključena so bile tudi bakterije *E. coli*, kot tipični tipične predstavnice enterobakterij.

Preizkušali smo vezavo obeh sevov laktobacilov ter *E. coli* v razmerah tekmovanja (laktobacili in *E. coli* dodani istočasno), izključevanja (laktobacili dodani pred *E. coli*) oziroma izpodrivanja (*E. coli* dodana pred laktobacili).

Pri statistični obdelavi podatkov smo za testiranje vezave laktobacilov na sluznico črevesa, simulirano kot izpodrivanje, izključevanje in tekmovanje, uporabili Studentov *t* test ( $p < 0,05$ ) in sicer na podlagi primerjav s kontrolnimi primeri, katere so predstavljali čisti sevi. Značilnost posameznih vplivov nam povedo *p* – vrednosti.

Vpliv poskusa in vpliv skupine v modelu laktobacilov (model 1) smo obdelali z metodo najmanjših kvadratov, ANOVA. V analizo je vključenih 5 poskusov, 8 skupin, vseh opazovanj je bilo 80. Koeficient determinacije modela 1 znaša  $R^2 = 0,920963$ . S tem modelom smo torej pojasnili 92,1% variabilnosti. Vpliv poskusa je visoko statistično značilen ( $p < 0,0001$ ), prav tako je visoko statistično značilen vpliv skupine ( $p < 0,0001$ ) (priloga A).

Rezultati nadaljnje razdelitve na posamezne nivoje vplivov v modelu laktobacilov (model 1) kažejo, da je vpliv poskusa 1 in 2 visoko statistično značilen ( $p < 0,0001$ ), poskusa 3 statistično značilen ( $p = 0,0421$ ), poskusa 4 pa statistično neznačilen ( $p = 0,6216$ ). Vpliv skupine je bil visoko statistično značilen v primeru tekmovanja (K7+Ec) in izključevanja (K7/Ec), vpliv ostalih posameznih skupin je bil statistično značilen, medtem ko je vpliv t.i. tekmovanja med sevom LF in *E. coli* (LF+Ec), statistično neznačilen ( $p = 0,6491$ ). (priloga B).

Vpliv poskusa in vpliv skupine v modelu *E. coli* (model 2), smo obdelali z metodo najmanjših kvadratov, ANOVA. V analizo je vključenih 5 poskusov, 7 skupin. Vseh opazovanj je bilo 70, zaradi manjkajočih podatkov jih je bilo v analizo vključenih 67. Koeficient determinacije modela 2 znaša  $R^2 = 0,8613$  in pove, da smo z modelom pojasnili 86,13% variabilnosti. Vpliv poskusa je visoko statistično značilen ( $p < 0,0001$ ), prav tako je na vezavo seva *E. coli* na sluznico črevesa visoko statistično značilno vplivala skupina ( $p < 0,0001$ ) (priloga C).

Rezultati nadaljnje razdelitve na posamezne nivoje vplivov modela 2 kažejo, da sta poskusa 1 in 2 visoko statistično značilno vplivala na število (log ke) vezanih sevov *E. coli* ( $p < 0,0001$ ). Poskus 3 je statistično značilno vplival ( $p = 0,0078$ ), poskus 4 pa je bil statistično neznačilen. Visoko statistično značilni sta bili skupini tekmovanja (K7+Ec) in (LF+Ec), skupina izpodrivanja (Ec/LF) je vplivala statistično značilno ( $p = 0,0275$ ), vpliv ostalih skupin pa je bil statistično neznačilen (priloga D).

Z metodo najmanjših kvadratov je bilo ugotovljeno, da je  $p$  – vrednost vsakega od nivojev skupin, tako pri modelu 1, kot modelu 2, enaka  $p < 0,0001$ , vpliv skupin je torej statistično značilen. Pri tem je bil za model 1 uporabljen Tukey-ev test, za model 2 pa Tukey-Kamarjev test.

Z metodo najmanjših kvadratov, vpliv interakcije med poskusom in skupino, pri vezavi *L. gasseri* K7 (slika 11, priloga J) so v poskusu 2, kjer je bilo število dodanih laktobacilov K7 7,13 log KE/ml, statistično značilne razlike med izključevanjem (K7/Ec) in tekmovanjem (K7+Ec). V poskusu 1 so statistično značilne razlike med izključevanjem (K7/Ec) in izpodrivanjem (Ec/K7), med izključevanjem (K7/Ec) in vezavo čiste kulture K7 (K7), ter med izključevanjem (K7/Ec) in tekmovanjem (K7+Ec). V tretjem, četrtem in petem poskusu ni bilo statistično značilnih razlik. Opaziti je, da je število vezanih *L. gasseri* K7 v primeru izključevanja (K7/Ec) pri vseh poskusih nekoliko nižje od ostalih načinov (samostojno vezanje seva, tekmovanje, izpodrivanje).

Dokazali smo tudi uspešnost vezave *L. gasseri* LF221 v primerih izključevanja, izpodrivanja in tekmovanja, vendar statistično značilnih razlik ni bilo (slika 12). Do

najvišjega števila vezanih *L. gasseri* LF221 je prišlo v poskusu 3, kjer smo dodali 7,95 log KE/ml LF221, pri višji koncentraciji dodane suspenzije pa se je količina vezanih laktobacilov nekoliko zmanjšala. Razlike so sicer majhne, lahko pa pomislimo, da je prišlo do zasičenosti vezave laktobacila. Nekoliko več LF221 je vezanih v primeru izpodrivanja (Ec/LF). To bi morda lahko pomenilo, da je v primeru okužbe črevesja s sevi *E. coli* smiselno uživati *L. gasseri* LF221, saj se ta v primeru izpodrivanja (Ec/LF), kljub invaziji patogena, še nekoliko uspešnejše veže.

Vezavo oz. zaviranje vezave *E. coli* na črevesno sluznico tankega črevesa prašičev z *L. gasseri* K7 smo dokazali (slika 13). Statistično analizo smo opravili z metodo najmanjših kvadratov, GLM proceduro, Tukey-Kramerjev test, odvisna spremenljivka je log *E. coli*; Studentovim *t* testom. Primerjali smo rezultate znotraj vsakega od petih poskusov, vpliv interakcije med poskusom in skupino. Kontrolne vzorce so ponazarjale srednje vrednosti vezane samostojne oz. čiste *E. coli* (Ec). V poskusu 2 tega rezultata nismo dobili, zato v tem primeru statistična obdelava ni bila mogoča. Rezultati analiz preostalih poskusov nam kažejo, da se od vezave *E. coli* v čisti kulturi (Ec) statistično značilno razlikuje ( $p<0,05$ ) samo t.i. tekmovanje (K7+Ec) med *E. coli* in K7 ( $p=0,0234$ ), in sicer znotraj poskusa 4. Izključevanje (K7/Ec) in izpodrivanje (Ec/K7) *E. coli* s strani laktobacila K7 ni statistično značilno.

Vezavo oz. zaviranje vezave *E. coli* na črevesno sluznico tankega črevesa prašičev z *L. gasseri* LF221 prikazuje slika 14. Nobena od skupin izključevanja, izpodrivanja ali tekmovanja se statistično značilno ne razlikuje od primerjalne skupine, kjer smo tkivo inkubirali v suspenziji čiste kulture *E. coli*. Na sliki pa je razvidno, da je v vseh poskusih najuspešnejša vezava *E. coli* v primeru tekmovanja, najmanj pa pri izpodrivanju *E. coli* s strani LF221. V poskusu 3, kjer je bilo največ dodane *E. coli*, pa se vezava te statistično značilno razlikuje med izključevanjem (LF/Ec) in tekmovanjem (LF+Ec).

Literature s podobno temo raziskovanja skorajda ni, zato je neposredna primerjava nemogoča. Podobno kot v našem delu, so Spencer in Chesson (1994) opazili, da testiranje v razmerah izključevanja (laktobacili dodani pred *E. coli*), tekmovanja (laktobacili in *E. coli* dodani hkrati) in izpodrivanja (*E. coli* dodane pred laktobacili) vplivalo na vezavo enterotoksigene *E. coli* na prašičje enterocite.

Ražman (2009) navaja, da so seva K7 in LF221 odkrili v črevesni sluznici nekaterih žrtvovanih živali peti dan po začetku dajanja (oralno), v blatu pa še šest dni po končanem krmljenju s sevoma. To dokazuje, da sta seva sposobna pripenjanja na črevesno sluznico in imata dobre preživitvene sposobnosti v prebavnem traktu (Ražman, 2009).

Stojković in sod. (2003) navajajo rezultate raziskave *in vivo* (v živem organizmu) o inhibiciji *E. coli* z *L. gasseri* K7 na gnotobičnih pujskih. Laktobacili K7 so preživeli in začasno kolonizirali prebavni trakt pujskov. Pri zaviranju *E. coli* s strani seva K7 so bili prisotni različni mehanizmi, kot stimulacija imunskega sistema in produkcija organskih kislin ter tudi tekmovalno izključevanje. Opazovanje živali je pokazalo pozitivni učinek *L. gasseri* K7 na kondicijo in zdravje prašičev. Vnetij ali razdraženosti na črevesju živali, tretiranih s sevom K7 ni bilo opaziti, kar potrjuje varnost uporabe seva.

Bogovič Matijašić in sod. (2004) so oba seva, LF221 in K7, odstavljenim pujskom aplicirali v obliki suspenzije celic (*in vivo* poskusi) in, podobno kot pri miših, dokazali prisotnost obeh sevov v blatu. Pri tem so opazili pozitivne učinke predvsem seva K7 na prirast in do določene mere tudi na konverzijo krme, kot pomembnih dejavnikov ekonomske prireje prašičev. Vsi pujski so ostali zdravi in tudi ni bilo diareje. Kolonije identične sevom LF221 in K7 so bile izolirane le iz blata živali, ki so bile krmljene s sevi LF221 oziroma sevi K7.

Čeprav je Fuller (2006) dvomil, da je vezava na črevesni epitel pomemben kolonizacijski faktor, se je zavedal, da je kolonizacija bistven predpogoj probiotične aktivnosti, saj tako probiotičnim mikroorganizmom med drugim omogoči čas za izvrševanje njihovih učinkov. Vezava na črevesni steni tudi upočasni premikanje organizmov s peristaltiko. In z našo nalogo je bilo dokazano, da so tako *L. gasseri* K7, *L. gasseri* LF221, kot *E. coli* sposobni vezave na črevesno sluznico prašičev tudi *ex vivo*.

## 5.2 SKLEPI

Glede na rezultate, ki smo jih dobili z raziskavo, smo prišli do nekaterih pomembnih sklepov:

- Seva *L. gasseri* K7 in *L. gasseri* LF221 sta sposobna vezave na črevesno sluznico (*ex vivo*).
- Bakterije seva *E. coli* O8:K88 so se sposobne vezati na črevesno sluznico prašičev (*ex vivo*).
- Seva *L. gasseri* K7 ter *L. gasseri* LF221 nista izkazala statistično značilnega vpliva na vezavo *E. coli* na črevesno sluznico prašičev (*ex vivo*) v testnih razmerah tekmovanja, izključevanja ali izpodrivanja.

Prvi dve hipotezi, ki smo si ju zastavili pred izvajanjem poskusa, smo tako potrdili, zadnje pa ne.

## 6 POVZETEK

Namen našega dela je bil proučiti vezavo dveh sevov laktobacilov s probiotičnimi lastnostmi, ki so jih dokazali v številnih predhodnih raziskavah *in vitro* in *in vivo*. Zanimalo nas je, ali sta seva *Lactobacillus gasseri* K7 in *Lactobacillus gasseri* LF221 sposobna *ex vivo* vezave na črevesno sluznico prašičev. Prav tako smo ugotavljalji sposobnost vezave *Escherichia coli* O8:K88 same na črevesno sluznico *ex vivo*, kakor tudi vezave v razmerah tekmovanja, izključevanja oziroma izpodrivanja.

Uporabili smo osrednji del prašičjega tankega črevesa, to je teščega črevesa ali jejunuma, ki smo ga takoj po odvzemu na ledu prinesli v laboratorij in obdelali.

Črevo smo vsakič trikrat sprali s PBS in tako odstranili črevesno vsebino, nato pa ga razrezali na koščke, velike  $10\text{ cm}^2$ . Sledila je inkubacija v hladilniku ( $4^\circ\text{C}$ , 30 min), da se je mukus-sluz odluščila, ter ponovno trikratno spiranje vsakega koščka v PBS. Najprej smo s štetjem na ploščah preverili, ali smo iz vzorcev črevesne sluznice uspeli odstraniti endogeno mikrobioto. V ta namen smo vzorce homogenizirali, ustrezno razredčili, nacepili na hranljivi podlogi MRS za mlečnokislinske bakterije ter EMB za enterobakterije, inkubirali ( $37^\circ\text{C}$ , 48 oz. 24 ur) in nato prešteli kolonije. Ugotovili smo, da je prvotna mikrobiota zadovoljivo izprana.

Pred poskusom smo testne seve *L. gasseri* K7, *L. gasseri* LF221 in *E. coli* O8:K88 nacepili v sveže gojišče in inkubirali 18 ur.

Z adhezijo smo najprej želeli ugotoviti sposobnost vezave čistih sevov *L. gasseri* LF221, *L. gasseri* K7 ter *E. coli* *ex vivo*.

Tekmovanje med *E. coli* in *L. gasseri* LF221 smo izvedli tako, da smo v testu uporabili suspenzijo, ki je vsebovala oba seva hkrati (Ec+LF), tekmovanje med *E. coli* in sevom K7 z mešanico kultur *E. coli* in *L. gasseri* K7 (Ec+K7).

Morebitno izpodrivanje *E. coli* s strani laktobacilov smo opazovali tako, da smo posamezne koščke pomočili najprej v suspenziji *E. coli*, potem pa v enega od testnih laktobacilov osnovnega vzorca. Oznaka teh je bila Ec/LF oziroma Ec/K7.

Izklučevanje *E. coli* s strani laktobacilov je bilo simulirano na način, da smo posamezne koščke črevesa inkubirali najprej v suspenziji enega od testnih sevov laktobacilov, nato pa, po vmesnem spiranju, v suspenziji *E. coli*. Oznaki vzorcev sta bili LF/Ec in K7/Ec.

Pri izvajanjiju poskusa vezave sevov na koščke črevesa smo po že zgoraj omenjeni začetni obdelavi črevesa in po trikratnem spiranju vsakega koščka v PBS, le te potapljali v suspenzije celic preskušanih sevov in inkubirali pri  $37^\circ\text{C}$  30 minut, s čimer smo omogočili vezavo preskušanih bakterij na enterocite črevesne sluznice.

Nevezane celice smo, po prej dokazanem najprimernejšem načinu, sprali z vzorcev tkiva najprej ročno, nato še 5 minut v stresalniku ( $37^\circ\text{C}$ , 150 obratov/min. v 200 ml pufra PBS).

Vzorce smo prenesli v steklenice s fiziološko raztopino, homogenizirali, pripravili razredčitve, jih nacepili na komercialno selektivno gojišče, inkubirali in po metodi štetja na ploščah prešteli zrasle kolonije.

Za statistično obdelavo smo uporabili statistični paket SAS/STAT (1994) iz programskega paketa SAS. Vse vrednosti, ki smo jih dobili po štetju mikroorganizmov na petrijevih ploščah, smo pred testiranjem pretvorili v logaritemske vrednosti. Lastnosti v poskusu smo obdelali s statističnim modelom. Kot sistematska vpliva smo v model vključili poskus ( $P_i$ ) in skupino ( $S_j$ ), značilnosti njunih vplivov pa testirali po metodi najmanjših kvadratov. Za analizo razlik med skupinami smo uporabili test sredin in Tukeyev test.

Rezultati mikroskopiranja črevesne sluznice so pokazali, da se oba seva, *L. gasseri* K7 in *L. gasseri* LF221, vežeta na enterocite črevesne sluznice.

Primerjava med koncentracijo suspenzije ter številom vezanih *L. gasseri* K7 in LF221 je pokazala, da se nekoliko bolje veže LF221, kar smo izrazili tudi z regresijsko enačbo. Pri obeh sevih je razvidno, da je višji koncentraciji suspenzije sledilo tudi večje število vezanih kolonijskih enot.

Tudi sev *L. gasseri* K7 se je uspešno vezal na črevesno sluznico (*ex vivo*). V večini preskusov nismo opazili, da bi bila vezava seva K7 v prisotnosti *E. coli* drugačna kot v primeru, ko so bili vzorci izpostavljeni le laktobacilom seva K7. Podobno se je pokazalo tudi pri preskušanju seva *L. gasseri* LF221 samega oziroma v kombinacijah z *E. coli*.

Sev *E. coli* O8:K88 je izkazal sposobnost vezave na črevesno sluznico (*ex vivo*), tako v primeru dodajanja čiste kulture kot tudi v razmerah izključevanja, izpodrivanja in tekmovanja. Pri tem prisotnost sevov *L. gasseri* K7 ali *L. gasseri* LF221 ni značilno vplivala na vezavo *E. coli* na črevesno sluznico prašičev.

## 7 VIRI

- Andlović A. 2002. *Escherichia coli*. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski Razgledi: 185-188
- Batis J., Brglez I. 1984. Mikrobiologija za veterinarje: skripta. Splošni del. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, VTOZD za veterinarstvo: 112 str.
- Bogovič Matijašić B., Rogelj I. 1998. Bacteriocin complex of *Lactobacillus gasseri* LF221 — production studies in MRS media at different pH values and effect against *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009. *Process Biochemistry*, 33, 3: 345-352
- Bogovič Matijašić B., Rogelj I., Nes I. F., Holo H. 1998. Isolation and characterization of two bacteriocins of *Lactobacillus gasseri* LF221. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49: 606-612
- Bogovič Matijašić B., Rogelj I. 1999. Bacteriocinogenic activity of lactobacilli isolated from cheese and baby faeces. *Food Technology and Biotechnology*, 37, 2: 93-100
- Bogovič Matijašić B., Rogelj I. 2000. *Lactobacillus K7* – a new candidate for a probiotic strain. *Food Technology and Biotechnology*, 38, 2: 113-119
- Bogovič Matijašić B., Narat M., Zorič M. 2003. Adhesion of two *Lactobacillus gasseri* probiotic strains on Caco-2 cells. *Food Technology and Biotechnology*, 41, 1: 83-88
- Bogovič Matijašić B., Narat M., Zorič M., Rogelj I. 2006. Ability of *Lactobacillus gasseri* K7 to inhibit *E. coli* adhesion in vitro on Caco-2 cells and *ex vivo* on pigs' jejunal tissue. *International Journal of Food Microbiology*, 107, 92-96
- Bogovič Matijašić B., Stojković S., Salobir J., Malovrh Š., Rogelj I. 2004. Evaluation of the *Lactobacillus gasseri* K7 and LF221 strains in weaned piglets for their possible probiotic use and their detection in the faeces. *Animal Research*, 53: 35-44
- Bolduan G., Jung H., Schneider R. 1988. Recent advances in the nutrition of weaner piglets. *Pigs News and Information*, 9, 4: 381-385
- Carroll I. M., Ringel-Kulka T., Keku T. O., Chang, Y. H., Packey, C. D., Sartor, E. B., Ringel Y. 2011. Molecular analysis of the luminal-and mucosal-associated intestinal microbiota in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *American Journal of Physiology, Gastrointestinal and Liver Physiology*, 301, 5: G799–G807
- Cho J. H., Zhao P. Y., Kim I. H. 2011. Probiotics as a Dietary Additive for Pigs. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10: 2127-2134

Cranwell P. D. 1995. Development of the National Gut and Enzymes System. V: The national Pig development and Survival. Varley M. A. (ur.). Leeds, Department of Animal Physiology and Nutrition: 99-153

Černe M. 1996. Morfološke, morfometrijske in histokemične raziskave tankega črevesa pri malabsorpcijskem sindromu prašičev odstavljenecv. Doktorska disertacija. Ljubljana, Veterinarska fakulteta: 168 str.

De Magalhaes J. T., Bitencourt L. L., Teixeira leite M. C., do Carmo A. P., de Morase, C. A. 2015. The use of probiotics to enhance animal performance. V: Probiotics and Prebiotics: Current research and future trends. Venema K., do Carmo A. P. (ur.). UK, Norfolk, Caister Academic Press: 459-468

Dolinšek J, Urlep-Žužej D, Mičetić-Turk D. 2006. Sodobni principi diagnostike celiakije. Zdravstveni Vestnik, 75: II-89-97

Dunne C., Murphy L., Flynn S., O'Mahony L., O'Halloran S., Feeney M., Morrissey D., Thornton G., Fitzgerald G., Daly C., Kiely B., Quigley E. M., O'Sullivan G. C., Shanahan F., Collins J. K. 1999. Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. Antonie Van Leeuwenhoek, 76: 279-292

Dunne C., O'Mahony L., Murphy L., Thornton G., Morrissey D., O'Halloran S., Feeney M., Flynn S., Fitzgerald G., Daly C., Kiely B., O'Sullivan G., Shanahan F., Collins J. K. 2001. *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. American Journal of Clinical Nutrition, 73 (suppl.): 386S–392S

EFSA/ECDC. (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control). 2015. EU Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013. EFSA Journal, 13, 2: 4036

Ewing W. N., Cole D. J. A. 1994. The living gut. An introduction to micro-organisms in nutrition. 1<sup>st</sup> ed. Trowbridge, Redwood Books: 220 str.

Ewing W. N. 2008. The living Gut, 2nd ed. Nottingham, Nottingham University Press: 192 str.

FAO/WHO. 2001. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation, Argentina, 1-4 October 2001: 34 str.  
[http://www.mesanders.com/probio\\_report.pdf](http://www.mesanders.com/probio_report.pdf) (5. jul. 2016)

- FAO/WHO. 2002. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food: report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002. [http://www.who.int/foodsafety/fs\\_management/en/probiotic\\_guidelines.pdf](http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf) (5. jul. 2016)
- Franz C. M. A. P., Holzapfel W. H. 2004. The genus *Enterococcus*: Biotechnological and safety issues. V: Lactic acid bacteria: Microbiology and Functional Aspects. Third Edition. Salminen S., von Wright A., Ouwehand A. (ur.). CRC Press: 199-247
- Fuller R., Barrow P. A., Brooker B. E. 1978. Bacteria associated with the gastric epithelium of neonatal pigs. *Applied and Environmental Microbiology*, 35, 3: 582-591
- Fuller R., Cole C. B. 1988. The scientific basis on the probiotic concept. V: Probiotics – Theory and Applications. Stark, B. A., Wilkinson, J. M. (ur.). Chalcombe Publications, Marlow: 1-14
- Fuller R. 1989. Probiotics in Man and Animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66, 5: 365-378
- Fuller R. 1992. History and Development of Probiotics. V: Probiotics. The Scientific Basis. Fuller R. (eds.). London, Chapman & Hall: 1-8
- Fuller R. 1999. Probiotics for farm animals. V: Probiotics: a critical review. Tannock G. (ur.). England, Horizon Scientific Press: 15-22
- Goldin B. R., Lichtenstein A. H., Gorbach S. L. 1988. The roles of Intestinal Flora. V: Modern nutrition in health and disease. 7th ed., Philadelphia, Lea & Febiger: 500-515
- Guarner F., Malagelada J. R. 2003. Gut flora in health and disease. *Lancet*, 361, 9356: 512-519
- Hammes W. P., Hertel C. 2006. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. V: The Prokaryotes, Vol. 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria. Dworkin M., Falkow S. (ur.). Springer Science & Business Media: 320-403.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi/> (25. maj 2016)
- Hill C., Guarner F., Reid G., Gibson G. R., Merenstein D. J., Pot B., Morelli L., Canani R. B., Flint H. J., Salminen S., Calder P. C. and Sanders M. E. 2014. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11: 506-514
- Histologija tankega črevesa. 2016. SlidePlayer. The digestive system 2 (lekcija 16, poglavje 24, sličica 18).  
<http://slideplayer.com/slide/8398599/> (5 jul. 2016)

Hughes P., Heritage J. 2002. Food and Agriculture Organization. Antibiotic growth-promoters in food animals.  
<http://www.fao.org/docrep/007/y5159e/y5159e08.htm> (5. jul. 2016)

Huis in't Veld J., Havenaar R. 1991. Probiotics and health in man and animal. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 51, 4: 562-567

Jensen S. R., Fink L. N., Struve C., Sternberg C., Andersen J. B., Brynskov J., Nielsen O. H., Brix S. 2011. Quantification of specific *E. coli* in gut mucosa from Crohn's disease patients. Journal of Microbiological Methods, 86, 1: 111-114

Jimenez G. 2010. Probiotics in Animal Nutrition – a Century of Research. Webinar. Piglets. Pig Progress. <http://www.allaboutfeed.net/Nutrition/Feed-Additives/2010/7/Probiotics-in-animal-nutrition---a-century-of-research-AAF011607W/> (5. jul. 2016)

Kališnik M. 2002. Slovenski medicinski slovar. Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta: 1007 str.

Kanatani K., Oshimura M., Sano K. 1995. Isolation and characterization of acidocin A and cloning of the bacteriocin gene from *Lactobacillus acidophilus*. Applied and Environmental Microbiology, 61, 3: 1061-1067

Klaenhammer T. R., Kleerebezem M., Kopp M. V., Rescigno M. 2012. The impact of probiotics and prebiotics on the immune system. Nature reviews - Immunology, 12: 728-734

Kocijančič A., Mrevlje F., Štajer D. 2005. Interna medicina. 3. izdaja, Ljubljana, Littera picta: 493-496

Kos B. 2001. Probiotički koncept: in vitro istraživanja s odabranim bakterijama mlijeko-kiseline. Disertacija. Zagreb, Prehrambeno – Biotehnički fakultet Sveučilišta u Zagrebu: 144 str.

Lavrenčič A. 2003. Vaje pri predmetu Prehrana domaćih živali. Ljubljana, Veterinarska fakulteta: 116 str.

Ley R. E., Peterson D. A., Gordon J. I. 2006. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. Cell, 124: 837-848

Marchesi J. R., Adams D. H., Fava F., Hermes G. D. A., et al. 2016. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. Gut, 65: 330-339

Matsuzaki T. 1998. Immunomodulation by treatment with *Lactobacillus casei* strain Shirota. International Journal of Food Microbiology, 41, 2: 133-140

Maxwell F. J., Stewart C. S. 1995. Microbiology of the gut and the role of probiotics. V: The national Pig, Development and Survival. Varley M. A. (ur.). Leeds, CAB International: 155-186

Mäyrä-Mäkinen A., Manninen M., Gyllenberg H. 1983. The adherence of lactic acid bacteria of the columnar epithelial cells of pigs and calves. The Journal of Applied Bacteriology, 55, 2: 241-245

McDonald P., Edwards R. A., Greenhalgh J. F. D., Morgan C. A., Sinclair L. A., Wilkinson, G. 2010. Animal Nutrition. 7<sup>th</sup> ed. Toronto, Pearson Books: 714 str.

Medigan M. T., Martinko J. M. 2005. Microbial Interactions with Humans. V: Brock Biology of Microorganisms. London, Pearson Prentice Hall: 700-725

Mikroorganizmi prebavil. 2016. SlidePlayer. Aspectos bioquímicos da interação dos probióticos com a mucosa intestinal (sličica 10).  
<http://slideplayer.com.br/slide/2633364/> (5. jul. 2016)

Naidu A. S., Bidlack W. R., Clemens R. A. 1999. Probiotic spectra of Lactic Acid Bacteria (LAB). Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 38, 1: 13-126

Ovejero A. F., Negri M. 1993. Fiziologija človeka. Ljubljana, Mladinska knjiga: 34-37

Petrovič D., Zorc M. 2005. Histologija – učbenik. Ljubljana, Inštitut za histologijo in embriologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani: 173-178

Oregon state University, Department of Animal Sciences, OSU Extended Campus (2004), Applied Animal Nutrition, Introduction to feeding swine.  
[https://courses.ecampus.oregonstate.edu/ans312/ten/swine\\_1.htm](https://courses.ecampus.oregonstate.edu/ans312/ten/swine_1.htm) (15. feb. 2015)

Pocajt M., Širca A. 1997. Anatomija in fiziologija za medicinske šole. Ljubljana, DZS: 97-98, 107-117

Pokorný M., Filipovič B., Čadež J., Japelj M. 1992. Proizvodnja antibiotikov in drugih sekundarnih metabolitov. V: Biotehnologija. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Bia: 385-403

Povzetek dejstev za splošno javnost. 2016. ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control).  
<http://ecdc.europa.eu/sl/eaad/antibiotics-get-informed/factsheets/Pages/general-public.aspx> (20. jun. 2016)

Qin J., Li R., Raes J., Arumugam M., in sod. 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. Nature, 464: 59-65

Quigley E. M. 2013. Gut Bacteria in Health and Disease. Gastroenterology & Hepatology, 9: 560–569

Rajilić Stojanović M., de Vos W. M. 2014. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. FEMS Microbiology Reviews, 38: 996-1047

Ražman, S. 2009. Vpliv sevov *Lactobacillus gasseri* LF221 in K7 na morfometrične parametre resic in sestavo mikrobne združbe tankega črevesja pri odstavljenih pujskih: Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek zootehniko: 55 str.

Rebesko B. 1983. Fiziologija z anatomijo domačih živali, Ljubljana, Državna založba Slovenije: 364 str.

Reid G. 2015. Regulatory and clinical aspects of dairy probiotics. FAO/WHO Expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of powder milk with live lactic acid bacteria.

<ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/reid.pdf> (15. feb. 2015)

Resica-zgradba. 2016. SlidePlayer. The digestive tract (sličica 45).

<http://slideplayer.com/slide/1703117/> (5. jul. 2016)

Robinson C. J., Young V. B. 2010. Antibiotic administration alters the community structure of the gastrointestinal micobiota. Gut Microbes, 1, 4: 279–284

Rogelj I., Narat M., Hočevar I. 1999. The immune response in mice immunized with *Lactobacillus gasseri* LF221 – a potential probiotic strain. Food Technology and Biotechnology, 37, 3: 153-158

Rogelj I., Bogovič Matijašić B. 2004. Probiotiki in varnost. V: Varnost živil. 22. Bitenčevi živilski dnevi 2004, Radenci, 18-19 marec 2004. Gašperlin L., Žlender B. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 181-189

Ross M. H., Kaye G. I., Wojciech P. 2004. Histology. A text and atlas with cell and molecular biology. 4th ed. Baltimore, Philadelphia, Williams&Wilkins: 475-478, 491-501

Rotovnik-Kozjek N. 2003. Probiotiki in prebiotiki v onkologiji. Onkologija/ problemi in perspektive: 35-37.

<http://www.onko-i.si/fileadmin/onko/datoteke/dokumenti/1-2001-kozjek.pdf> (24. avg. 2016)

Saarela M., Lähteenmäki L., Crittenden R., Salminen S., Mattila-Sandholm T. 2002. Gut bacteria and health foods – The European perspective. International Journal of Food Microbiology, 78, 1-2: 99–117

SCAN (Scientific Committee for Animal Nutrition). 2000. Report of the Scientific Committee on Animal Nutrition on the assessment under directive 87/153/EEC of the efficacy of micro-organisms used as feed additives.  
[http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scan/out40\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scan/out40_en.pdf) (18. feb. 2000)

Scheinbach S. 1998. Probiotics: Functionality and commercial status. *Biotechnology Advances*, 16, 3: 581-608

Seme K. 2002. Mehanizmi bakterijske odpornosti proti antibiotikom. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M, Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 439-446

Singer R.S., Finch R., Wegener H.C., Bywater R., Walters J., Lipsitch M. 2003. Antibiotic resistance – the interplay between antibiotic use in animals and human beings. *The Lancet Infectious Diseases*, 3, 1: 47-51

Smole-Možina S., Marić V. 1992. Bakterije. V: Biotehnologija. Raspov P. (ur.), Ljubljana, Bia: 29-42

Spencer R. J., Chesson A. 1994. The effect of *Lactobacillus* spp. on the attachment of enterotoxigenic *Escherichia coli* to isolated porcine enterocytes. *The Journal of Applied Bacteriology*, 77, 2: 215-220

Steiner T. 2009. Probiotics in Poultry and Pig Nutrition. Basics and Benefits, The Poultry site.

<http://www.thepoultrysite.com/articles/1564/probiotics-in-poultry-and-pig-nutrition-basics-and-benefits/> (24. avg. 2016)

Stojković S. 2003. Preživetje in učinkovitost sevov *Lactobacillus* K7 in LF221 v različnih okoljskih razmerah. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 133 str.

Stojković S., Rogelj I., Bogovič Matijašić B., Bomba A., Nemcova R., Gancarčíkova S., Jonecova Z., Scirankova L., Koščova J., Cigankova V., Pistl J., Buleca J. 2003. Inhibition of *Escherichia coli* 08K88H9 ent- by *Lactobacillus gasseri* K7 – in vivo study on gnotobiotic piglets. V: Milk & dairy products, European Dairy Congress 03, Portorož, Slovenia, 15.-18. nov. 2003. Domžale, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 53 str.

Swidsinski A., Weber J., Loening-Baucke V., Hale L.P., Lochs H. 2005. Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 7: 3380–3389

Tagg J. R., Dajani A. S., Wannamaker L. W. 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriological Reviews*, 40, 3: 722-756

Tanko črevo. 2015. Wikipedia (7. sept. 2015).  
[https://sl.wikipedia.org/wiki/Tanko\\_%C4%8Drevo](https://sl.wikipedia.org/wiki/Tanko_%C4%8Drevo) (23. apr. 2016)

Tannock G. W., Smith J. D. B. 1970. The micro-flora of the pig stomach and its possible relationship to ulceration on the pars oesophagia. *Journal of Comparative Pathology*, 80: 359-367

- Ten-Brink B., Minekus M., Van der Vossen J. M., Leer R. J., Huis in't Veld J. H. 1994. Antimicrobial activity of Lactobacilli: preliminary characterization and optimization of production of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46. *Journal of Applied Bacteriology*, 77, 2: 140-148
- Teskač k., Hudournik N., Marinšek-Logar R., Kristl J. 2008. Pomen probiotikov kot prehranskih dopolnil in zdravil. *Farmacevtski Vestnik*, 59: 287-292
- The Histology Guide. Small intestine.  
[http://www.histology.leeds.ac.uk/digestive/small\\_intestine.php](http://www.histology.leeds.ac.uk/digestive/small_intestine.php) (2. maj 2016)
- Tortuero F., Rioperez J., Fernandez E., Rodriguez M. L. 1995. Response of piglets to oral administration of lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection*, 58, 12: 1369-1374
- Treven P., Trmčić A., Bogovič Matijašić B., Rogelj I. 2014. Improved draft genome sequence of probiotic strain *Lactobacillus gasseri* K7. *Genome Announcements*, 2, 4: 1-2
- Uredba Evropskega parlamenta in Sveta (ES) št. 1831/2003 o dodatkih za uporabo v prehrani živali. 2003. Uradni list Evropske unije L 268: 29
- Uredba Komisije (ES) št. 574/2011 o spremembi Priloge I k Direktivi 2002/32/ES Evropskega parlamenta in Sveta glede mejnih vrednosti za nitrit, melamin, Ambrosio spp. ter prenosa nekaterih kokcidiostatikov ali sredstev proti histomonijazi in o konsolidaciji prilog I in II k Direktivi. 2011. Uradni list Evropske unije L 159: 7
- Vanbelle M. 2001. Current status and future perspectives in E.U. for antibiotics, probiotics, enzymes and organic acids in animal nutrition. V: *Gut environment of pigs*. Piva A., Bach Knudsen K. E., Lindberg J. E. (ur.). Nottingham, Nottingham University Press: 231-256
- Van der Vossen J. M. B. M., Van-Herwijnen M. H. M., Leer R. J., Ten-Brink B., Pouwels P. H., Huis in't Veld J. H. J. 1994. Production of acidocin B, a bacteriocin of *Lactobacillus acidophilus* M46 is a plasmid encoded trait: plasmid curing, genetic marking by in vivo plasmid integration and gene transfer. *FEMS Microbiology Letters*, 166, 3: 333-340
- Vaughan E. E., Mollet B., de Vos W. M. 1999. Functionality of probiotics and intestinal lactobacilli: Light in the intestinal tract tunnel. *Current Opinion in Biotechnology*, 10, 5: 505-510
- Yirga H. 2015. The Use of Probiotics in Animal Nutrition. *Journal of Probiotics & Health*, 3: 132
- Yu H., Braun P., Yildrum M. A., Lemmens I., Venkatesan K., in sod. 2008. High-Quality Binary Protein Interaction Map of the Yeast Interactome Network. *Science*, 322: 104-11

Zorc Pleskovič R., Gošnak Dahmane R., Milutinović Živin A. 2006. Histologija. 1. izdaja.  
Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Visoka šola za zdravstvo: 45-47

Zorič-Peternel M., Čanžek Majhenič A., Holo H., Nes I. F., Salehian Z., Berlec A., Rogelj I. 2010. Wide-Inhibitory Spectra Bacteriocins Produced by *Lactobacillus gasseri* K7. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2, 4: 233-240

## ZAHVALA

Neskončno se zahvaljujem mentorici, znan. svet. dr. Bojani Bogovič Matijašić, ki je vložila veliko časa in potrpljenja in do konca verjela vame, ter mi pomagala, da smo nalogu pripeljali do konca.

Zahvaljujem se somentorici dr. Petri Mohar Lorbeg, da mi je omogočila dokončati in zagovarjati nalogu.

Posebna zahvala gre tudi recenzentki prof. dr. Ireni Rogelj za literaturo in strokovno pomoč pri nastajanju dela. Že kot predavateljica ste mi bili vzgled in vedno z veseljem preberem vaša dela.

Zahvaljujem se predsedniku komisije prof. dr. Janezu Salobirju.

Prav tako se zahvaljujem vsem članom kolektiva Inštituta za mlekarstvo in probiotike, ki so mi pomagali pri izvedbi praktičnega dela diplomske naloge in mi svetovali.

Hvala dr. Nataši Siard in doc. dr. Špeli Malovrh.

Najlepša hvala vsem v knjižnici in gospe Sabini Knehtl.

Iskreno se zahvaljujem vsem neimenovanim, ki so mi kakorkoli pomagali pri nastajanju diplomskega dela.

Romč, klic v petek me je spodbudil. Hvala ti.

Hvala mojemu možu Marku, sinovoma in mami! Brez vas mi ne bi uspelo.

Nekje – čisto na koncu, ko sem imela opravljene že vse izpite, večji del naloge, ..., sem se ustavila.

Sam Bog ve, zakaj!?

Želela sem si, da bi prej našla moč za dokončanje tega dela...

Pa vendar – bolje sedaj, kot nikoli!

Hvala vsem.

Tudi tebi, ki bereš te vrstice...

## PRILOGE

### Statistična obdelava podatkov

Za testiranje vezave laktobacilov na sluznico črevesa, simulirano kot izpodrivanje, izključevanje in tekmovanje, smo uporabili Studentov *t* test ( $p<0,05$ ) in sicer na podlagi primerjav s kontrolnimi primeri, katere so predstavljali čisti sevi. Značilnost posameznih vplivov nam povedo *p* – vrednosti. Rezultati za posamezne vplive so navedeni v spodnjih preglednicah.

#### Priloga A:

Vpliv poskusa in vpliv skupine v modelu (Laktobacili) - preglednica ANOVA, metoda najmanjših kvadratov

Vpliv	Stopinje prostosti	Vsota kvadratov	Srednji kvadrat	F-vrednost	P>F
Poskus	4	23,4233	5,8552	138,84	<0,0001
Skupina	7	9,9956	1,4279	33,86	<0,0001

#### Priloga B:

*P* - vrednosti za posamezne vplive modela (log Lb.)

Vpliv	p - vrednost	Vpliv	p - vrednost
----- Poskus: -----			
1	<0,0001	Ec/K7	0,0016
2	<0,0001	Ec/LF	0,0228
3	0,0421	K7	0,0013
4	0,6216	K7+Ec	<0,0001
5	-	K7/Ec	<0,0001
----- Skupina: -----			
		LF	0,0262
		LF+Ec	0,6491
		LF/Ec	-

#### Priloga C:

Vpliv poskusa in skupine v modelu (*E. coli*) - preglednica ANOVA, metoda najmanjših kvadratov

Vpliv	Stopinje prostosti	Vsota kvadratov	Srednji kvadrat	F-vrednost	P>F
Poskus	4	8,160	2,040	61,23	<0,0001
Skupina	6	3,4261	0,5710	17,14	<0,0001

### Priloga D:

P - vrednosti za posamezne vplive modela ( $\log E. coli$ )

Vpliv	p - vrednost	Vpliv	p - vrednost
-----Poskus: -----		-----Skupina: -----	
1	<0,0001	Ec	0,6059
2	<0,0001	Ec/K7	0,1504
3	0,0078	Ec/LF	0,0275
4	0,9108	K7+Ec	<0,0001
5	-	K7/Ec	0,3988
		LF+Ec	0,0002
		LF/Ec	-

Metoda najmanjših kvadratov:

Z metodo najmanjših kvadratov je bilo ugotovljeno, da je p – vrednost vsakega od nivojev skupin, tako pri modelu 1, kot modelu 2, enaka  $p<0,0001$ . Vpliv vseh skupin je torej bil statistično značilen. Pri tem je bil za model 1 uporabljen Tukey-ev test, za model 2 pa Tukey-Kramarjev test.

Metoda najmanjših kvadratov za vpliv SKUPINA, Tukey-Kramer, GLM, odvisna spremenljivka je  $\log E. coli$

### Priloga E:

Razlike med logaritmiranimi srednjimi vrednostmi skupin vezane  $E. coli$  in p-vrednosti za vpliv skupin, pridobljeni z metodo najmanjših kvadratov.

Skupina	Ec	Ec/K7	Ec/LF	K7+Ec	K7/Ec	LF+Ec	LF/Ec
Ec	0,167834	0,230129	-0,421497	0,114746	-0,274189	0,045335	
Ec/K7	0,5089		0,062295	-0,589331	-0,053087	-0,442023	-0,122499
Ec/LF	0,1356	0,9893		-0,651626	-0,115383	-0,504318	-0,184794
K7+Ec	0,0002	<0,0001	<0,0001		0,536243	0,147308	0,466832
K7/Ec	0,8430	0,9954	0,7923	<0,0001		-0,388935	-0,069411
LF+Ec	0,0407	<0,0001	<,0001	0,5507	0,0003		0,319524
LF/Ec	0,9985	0,7678	0,2797	<0,0001	0,9782	0,0044	

Metoda najmanjših kvadratov za vpliv SKUPINA, Tukey, GLM procedura, odvisna spremenljivka je  $\log Lb$ :

### Priloga F:

Razlike med logaritmiranimi srednjimi vrednostmi skupin vezanih laktobacilov K7 oz. LF221 in p-vrednosti za vpliv skupin, pridobljeni z metodo najmanjših kvadratov.

Skupina	Ec/K7	Ec/LF	K7	K7+Ec	K7/Ec	LF	LF+Ec	LF/Ec
Ec/K7		-0,515351	0,007147	0,106082	0,605665	-0,510162	-0,343334	-0,301361
Ec/LF	<,0001		0,522498	0,621434	1,121017	0,005189	0,172018	0,213990
K7	1,0000	<0,0001		0,098935	0,598519	-0,517309	-0,350481	-0,308508
K7+Ec	0,9416	<0,0001	0,9594		0,499583	-0,616244	-0,449416	-0,407443
K7/Ec	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001		-1,115827	-0,948999	-0,907026
LF	<0,0001	1,0000	<0,0001	<0,0001	<0,0001		0,166828	0,208801
LF+Ec	0,0087	0,5738	0,0068	0,0002	<0,0001	0,6114		0,041973
LF/Ec	0,0331	0,2931	0,0266	0,0009	<0,0001	0,3232	0,9998	

**Skupina\*poskus:** Metoda najmanjših kvadratov za vpliv skupina, odvisna sp.=Ec. V zgornjem delu razpredelnice so navedene razlike povprečnih srednjih vrednosti med skupinami, v spodnjem delu pa njihove p-vrednosti.

#### Priloga G:

Razlike med logaritmiranimi srednjimi vrednostmi skupin vezane *E. coli* in p-vrednosti za vpliv skupin, pridobljeni z metodo najmanjših kvadratov.

Skupina	Ec	Ec/K7	Ec/LF	K7+Ec	K7/Ec	LF+Ec	LF/Ec
Ec		0,169780	0,216969	-0,377425	0,059706	-0,269175	0,064211
Ec/K7	0,2968		0,047189	-0,547205	-0,110074	-0,438955	-0,105569
Ec/LF	0,0639	0,9952		-0,594393	-0,157262	-0,486143	-0,152757
K7+Ec	0,0002	<,0001	<,0001		0,437131	0,108250	0,441636
K7/Ec	0,9776	0,7604	0,3160	<,0001		-0,328881	0,004505
LF+Ec	0,0115	<,0001	<,0001	0,7243	0,0013		0,333386
LF/Ec	0,9680	0,7929	0,3483	<,0001	1,0000	0,0011	

#### Priloga H:

Razlike med logaritmiranimi srednjimi vrednostmi skupin vezanih laktobacilov K7 oz. LF221 in p-vrednosti za vpliv skupin, pridobljeni z metodo najmanjših kvadratov.

Skupina	Ec/K7	Ec/LF	K7	K7+Ec	K7/Ec	LF	LF+Ec	LF/Ec
Ec/K7		-0,515351	0,007147	0,106082	0,605665	-0,510162	-0,343334	-0,301361
Ec/LF	<,0001		0,522498	0,621434	1,121017	0,005189	0,172018	0,213990
K7	1,0000	<,0001		0,098935	0,598519	-0,517309	-0,350481	-0,308508
K7+Ec	0,7413	<,0001	0,8018		0,499583	-0,616244	-0,449416	-0,407443
K7/Ec	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001		-1,115827	-0,948999	-0,907026
LF	<,0001	10,000	<,0001	<,0001	<,0001		0,166828	0,208801
LF+Ec	0,0002	0,1818	0,0001	<,0001	<,0001	0,2115		0,041973
LF/Ec	0,0011	0,0440	0,0008	<,0001	<,0001	0,0533	0,9981	

#### Priloga I:

Razlike med logaritmiranimi srednjimi vrednostmi vezane *E. coli* in njihove p-vrednosti za vpliv interakcije med poskusom in skupino v prvem poskusu, pridobljeni z metodo najmanjših kvadratov.

Skupina	Ec	Ec/K7	Ec/LF	K7+Ec	K7/Ec	LF+Ec	LF/Ec
Ec		0,145543	0,376191	-0,307534	-0,323187	-0,112369	-0,161133
Ec/K7	1,0000		0,230648	-0,453077	-0,468730	-0,257912	-0,306676
Ec/LF	0,6261	0,9997		-0,683725	-0,699379	-0,488560	-0,537324
K7+Ec	0,8913	0,6545	0,0095		-0,015653	0,195165	0,146401
K7/Ec	0,8435	0,5963	0,0073	1,0000		0,210818	0,162055
LF+Ec	1,0000	0,9983	0,1958	0,9994	0,9982		-0,048764
LF/Ec	1,0000	0,9845	0,0999	1,0000	1,0000	1,0000	

**Priloga J:**

Razlike med logaritmiranimi srednjimi vrednostmi skupin vezanih laktobacilov K7 oz. LF221 in p-vrednosti za vpliv interakcije med poskusom in skupino v prvem poskusu, pridobljeni z metodo najmanjših kvadratov.

Skupina	Ec/K7	Ec/LF	K7	K7+Ec	K7/Ec	LF	LF+Ec	LF/Ec
Ec/K7		-0,222744	0,051478	0,489622	1,406756	-0,245623	0,004234	0,288839
Ec/LF	0,9999		0,274223	0,712367	1,629500	-0,022879	0,226978	0,511584
K7	1,0000	0,9955		0,438144	1,355278	-0,297101	-0,047244	0,237361
K7+Ec	0,3296	0,0089	0,5555		0,917134	-0,735245	-0,485388	-0,200783
K7/Ec	<,0001	<,0001	<,0001	0,0001		-1,652379	-1,402522	-1,117917
LF	0,9993	1,0000	0,9857	0,0057	<,0001		0,249857	0,534462
LF+Ec	1,0000	0,9998	1,0000	0,3462	<,0001	0,9990		0,284605
LF/Ec	0,9903	0,2517	0,9996	1,0000	<,0001	0,1851	0,9921	

**Priloga K:**

Razlike med logaritmiranimi srednjimi vrednostmi vezanih laktobacilov K7 oz. LF221 in njihove p-vrednosti za vpliv interakcije med poskusom in skupino v drugem poskusu, pridobljeni z metodo najmanjših kvadratov.

Skupina	Ec/K7	Ec/LF	K7	K7+Ec	K7/Ec	LF	LF+Ec	LF/Ec
Ec/K7		-0,885163	-0,266446	-0,436299	0,189912	-0,694618	-0,657301	-0,684611
Ec/LF	0,0003		0,618717	0,448864	1,075075	0,190545	0,227862	0,200552
K7	0,9971	0,0494		-0,169853	0,456358	-0,428172	-0,390855	-0,418164
K7+Ec	0,5642	0,5051	1,0000		0,626211	-0,258319	-0,221002	-0,248311
K7/Ec	1,0000	<,0001	0,4706	0,0434		-0,884530	-0,847213	-0,874523
LF	0,0125	1,0000	0,6027	0,9983	0,0003		0,037317	0,010008
LF+Ec	0,0250	0,9998	0,7703	0,9999	0,0006	1,0000		-0,027309
LF/Ec	0,0151	1,0000	0,6497	0,9991	0,0003	1,0000	1,0000	

**Priloga L:**

Razlika med logaritmiranimi srednjimi vrednostmi vezane *E. coli* in njihove p-vrednosti za vpliv interakcije med poskusom in skupino v tretjem poskusu, pridobljeni z metodo najmanjših kvadratov.

Skupina	Ec	Ec/K7	Ec/LF	K7+Ec	K7/Ec	LF+Ec	LF/Ec
Ec		0,391174	0,293554	-0,006530	0,183853	-0,282412	0,372455
Ec/K7	0,5576		-0,097620	-0,397704	-0,207321	-0,673585	-0,018719
Ec/LF	0,9256	1,0000		-0,300084	-0,109701	-0,575965	0,078902
K7+Ec	1,0000	0,5279	0,9106		0,190383	-0,275881	0,378985
K7/Ec	0,9998	0,9986	1,0000	0,9996		-0,466264	0,188603
LF+Ec	0,9472	0,0113	0,0558	0,9576	0,2588		0,654867
LF/Ec	0,6431	1,0000	1,0000	0,6133	0,9997	0,0155	

**Priloga M:**

Razlika med logaritmiranimi srednjimi vrednostmi vezanih laktobacilov K7 oz. LF221 in njihove p-vrednosti za vpliv interakcije med poskusom in skupino v tretjem poskusu, pridobljeni z metodo najmanjših kvadratov.

Skupina	Ec/K7	Ec/LF	K7	K7+Ec	K7/Ec	LF	LF+Ec	LF/Ec
Ec/K7		-0,555458	0,327286	0,508748	0,499742	-0,432504	-0,118544	-0,249073
Ec/LF	0,1367		0,882744	1,064206	1,055200	0,122955	0,436914	0,306385
K7	0,9532	0,0003		0,181462	0,172456	-0,759790	-0,445830	-0,576359
K7+Ec	0,2610	<,0001	1,0000		-0,009006	-0,941252	-0,627292	-0,757821
K7/Ec	0,2920	<,0001	1,0000	1,0000		-0,932245	-0,618286	-0,748815
LF	0,5822	1,0000	0,0035	<,0001	<,0001		0,313959	0,183431
LF+Ec	1,0000	0,5613	0,5193	0,0426	0,0498	0,9711		-0,130529
LF/Ec	0,9991	0,9786	0,0992	0,0036	0,0044	1,0000	1,0000	

**Priloga N:**

Razlika med logaritmiranimi srednjimi vrednostmi vezane *E. coli* in njihove p-vrednosti za vpliv interakcije med poskusom in skupino v četrtem poskusu, pridobljeni z metodo najmanjših kvadratov.

Skupina	Ec	Ec/K7	Ec/LF	K7+Ec	K7/Ec	LF+Ec	LF/Ec
Ec		-0,048455	0,107628	-0,630273	0,157320	-0,392061	-0,044012
Ec/K7	1,0000		0,156083	-0,581818	0,205775	-0,343606	0,004443
Ec/LF	1,0000	1,0000		-0,737902	0,049692	-0,499690	-0,151640
K7+Ec	0,0234	0,0510	0,0037		0,787594	0,238212	0,586261
K7/Ec	1,0000	0,9988	1,0000	0,0016		-0,549382	-0,201332
LF+Ec	0,5535	0,7678	0,1691	0,9913	0,0837		0,348049
LF/Ec	1,0000	1,0000	1,0000	0,0475	0,9991	0,7497	

**Priloga O:**

Razlika med logaritmiranimi srednjimi vrednostmi vezanih laktobacilov K7 oz. LF221 in njihove p-vrednosti za vpliv interakcije med poskusom in skupino v četrtem poskusu, pridobljeni z metodo najmanjših kvadratov.

Skupina	Ec/K7	Ec/LF	K7	K7+Ec	K7/Ec	LF	LF+Ec	LF/Ec
Ec/K7		-0,497260	-0,025933	-0,065631	0,462412	-0,540835	-0,408104	-0,458995
Ec/LF	0,3010		0,471327	0,431629	0,959672	-0,043575	0,089156	0,038265
K7	1,0000	0,4042		-0,039698	0,488345	-0,514902	-0,382171	-0,433062
K7+Ec	1,0000	0,5863	1,0000		0,528043	-0,475204	-0,342473	-0,393364
K7/Ec	0,4433	<,0001	0,3346	0,2023		-1,003247	-0,870516	-0,921407
LF	0,1692	1,0000	0,2411	0,3878	<,0001		0,132731	0,081840
LF+Ec	0,6958	1,0000	0,8046	0,9247	0,0004	1,0000		-0,050891
LF/Ec	0,4586	1,0000	0,5795	0,7599	0,0001	1,0000	1,0000	

**Priloga P:**

Razlika med logaritmiranimi srednjimi vrednostmi vezane *E. coli* in njihove p-vrednosti za vpliv interakcije med poskusom in skupino v petem poskusu, pridobljeni z metodo najmanjših kvadratov.

Skupina	Ec	Ec/K7	Ec/LF	K7+Ec	K7/Ec	LF+Ec	LF/Ec
Ec		0,190858	0,090501	-0,565362	0,220839	-0,289857	0,089535
Ec/K7	0,9996		-0,100357	-0,756220	0,029981	-0,480715	-0,101324
Ec/LF	1,0000	1,0000		-0,655863	0,130337	-0,380359	-0,000967
K7+Ec	0,0657	0,0027	0,0153		0,786200	0,275504	0,654896
K7/Ec	0,9967	1,0000	1,0000	0,0016		-0,510696	-0,131304
LF+Ec	0,9333	0,2165	0,6071	0,9581	0,1457		0,379392
LF/Ec	1,0000	1,0000	1,0000	0,0155	1,0000	0,6115	

**Priloga R:**

Razlika med logaritmiranimi srednjimi vrednostmi vezanih laktobacilov K7 oz. LF221 in njihove p-vrednosti za vpliv interakcije med poskusom in skupino v petem poskusu, pridobljeni z metodo najmanjših kvadratov.

Skupina	Ec/K7	Ec/LF	K7	K7+Ec	K7/Ec	LF	LF+Ec	LF/Ec
Ec/K7		-0,416130	-0,050651	0,033972	0,469506	-0,637230	-0,536953	-0,402966
Ec/LF	0,6591		0,365479	0,450102	0,885636	-0,221099	-0,120823	0,013164
K7	1,0000	0,8630		0,084623	0,520157	-0,586578	-0,486302	-0,352315
K7+Ec	1,0000	0,4994	1,0000		0,435534	-0,671201	-0,570925	-0,436938
K7/Ec	0,4121	0,0003	0,2250	0,5678		-1,106735	-1,006459	-0,872471
LF	0,0358	0,9999	0,0843	0,0194	<,0001		0,100277	0,234264
LF+Ec	0,1788	1,0000	0,3426	0,1080	<,0001	1,0000		0,133987
LF/Ec	0,7187	1,0000	0,9011	0,5612	0,0003	0,9997	1,0000	

**REZULTATI KONTROLE SPIRANJA VZORCEV (vzorec »0«)**

**Priloga S:**

Kontrola izpiranja prvotne mikrobiote iz koščkov jejunuma (vzorec nič »0«)

MRS:	A	B	SD	POVP.	LOG A	LOG B	SD LOG	POVP. Log
Pos. 1<0<	4000	4000	0	4000	3,60206	3,60206	0	3,60206
Pos. 3<0<	48000	43000	3535,534	45500	4,681241	4,633468	0,03378	4,657355
Pos. 4<0<	1	0	0,707107	0,5	0	0	0	0
Pos. 5<0<	3	2	0,707107	2,5	0,477121	0,30103	0,124515	0,389076

EMB	A	B	SD	POVP.	LOG A	LOG B	SD LOG	POVP. Log
Pos. 1<0<	387000	384000	2121,32	385500	5,587711	5,584331	0,00239	5,586021
Pos. 3<0<	29000	22000	4949,747	25500	4,462398	4,342423	0,084835	4,40241
Pos. 4<0<	0	14	9,899495	7	0	1,146128	0,810435	0,573064
Pos. 5<0<	3	10	4,949747	6,5	0,477121	1	0,369731	0,738561

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Simona ČAMPA

***EX VIVO VEZAVA PROBIOTIKOV NA ČREVESNO  
SLUZNICO TANKEGA ČREVESA PRAŠIČEV IN  
TEKMOVANJE Z *E. coli* O8:K88***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2016