

»Mladi za napredek Maribora 2018«

35. srečanje

VPLIV NARAVNIH UČINKOVIN NA ČREVESNO MIKROBIOTO

Raziskovalno področje: BIOLOGIJA

Raziskovalna naloga

Avtor: ANJA KORES

Mentor: MAJA RUPNIK, VALERIJA TKALEC

Šola: II. GIMNAZIJA MARIBOR

Maribor, februar 2018

»Mladi za napredek Maribora 2018«

35. srečanje

VPLIV NARAVNIH UČINKOVIN NA ČREVESNO MIKROBIOTO

Raziskovalno področje: BIOLOGIJA

Raziskovalna naloga

Maribor, februar 2018

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	6
1 UVOD	8
1.1 Raziskovalno vprašanje	9
1.2 Hipoteze	9
2 TEORETIČNO OZADJE	10
2.1 Črevesna mikrobiota in njena vloga	10
2.2 Sestava črevesne mikrobiote	10
2.3 Vpliv starosti na črevesno mikrobioto	11
2.4 Vpliv prehrane na črevesno mikrobioto	12
2.5 Vpliv antibiotikov na črevesno mikrobioto	12
2.6 Laktobacili in enterobakterije v črevesni mikrobioti	12
2.6.1 Rod <i>Lactobacillus</i>	12
2.6.2 Enterobakterije	13
2.7 Metode, ki jih uporabljamo za raziskave črevesne mikrobiote	15
2.7.1 Gojišča, ki jih uporabljamo za gojenje črevesne mikrobiote	15
2.8 Naravne učinkovine, ki vplivajo na črevesno mikrobioto	16
2.8.1 Česen	17
2.8.2 Borovnice	18
2.8.3 Srčna moč	18
2.8.4 Konoplja	18
3 MATERIALI IN METODE	19
3.1 Materiali	19
3.1.1 Gojišča	19
3.1.2 Ostalo:	20
3.2 Metode	21
3.2.1 Priprava učinkovin	21

3.2.2	Optimizacija gojišč.....	22
3.2.3	Določanje vrst osamljenih organizmov z aparatom MALDI-TOF (Bruker)	22
3.2.4	Testiranje učinkovin	23
4	REZULTATI.....	28
4.1	Primerjava gojišč za laktobacile	28
4.2	Primerjava gojišč za enterobakterije.....	29
4.3	Vpliv naravnih učinkovin na črevesno mikrobioto	30
4.3.1	Število laktobacilov in enterobakterij v fecesu otroka in odraslega človeka	30
4.3.2	Število CFU na izbranih selektivnih ploščah po 48 urah inkubacije fekalne suspenzije v bujonu Wilkins Chalgren.....	31
4.3.3	Vplivi izbranih učinkovin na črevesno mikrobioto	31
5	DISKUSIJA	34
6	ZAKLJUČEK	39
7	DRUŽBENA ODGOVORNOST	40
8	VIRI IN LITERATURA	41
9	PRILOGE.....	45

KAZALO SLIK

Slika 1: Delež proteobakterij pri različnih stanjih gostitelja (Vir: Shin in sod., 2015).....	14
Slika 2: Shema poteka dela	24
Slika 3: Mikrotitrski ploščici s 6 luknjicami z zaporedjem testnih učinkovin, ki smo jih vnesli	25
Slika 4: Ploščice na mešalu v anaerobni komori.....	25
Slika 5: Rast laktacilov na gojišču LAMB. Kultura na sliki izvira iz dvodnevne gojene črevesne mikrobiote v bujonu WCAB. Kolonije laktobacilov (večina vrste <i>Lactobacillus rhamnosus</i>) so sprva bele, potem pričnej.o postajati zelene. Na plošči stari 3 dni zato vidimo bele kolonije, bele z zelenim centrom in zelene. Drobne kolonije, ki v ozadju preraščajo ploščo so kolonije <i>Enterococcus faecium</i>	29
Slika 6: Primer rasti gojene črevesne mikrobiote na selektivnih ploščah za po Gramu negativne bacile. Na ploščah lahko razlikujemo med bakterijami, ki fermentirajo laktozo in tistimi, ki je ne. Na ploščah so večinoma porasle <i>E. coli</i> , ki fermentirajo sladkorje v gojišču (kovinska barva kolonij na ENDO, roza gojišče okrog kolonij pri MacConkey in rumeno gojišče na XLD).	30
Slika 7: Prikaz vpliva učinkovin na enterobakterije in laktobacile glede na tip fecesa. Oznaka 1,00 E+n pomeni 1 krat 10 na potenco n.....	33

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Določanje CFU iz fekalne suspenzije v točkah t0 (fekalna suspenzija), t1 (dvodnevna gojena črevesna mikrobiota), t2 (3-dnevna gojena črevesna mikrobiota z učinkovinami). Znak X označuje redčino, ki smo jo nanegli na ploščo.....	26
Preglednica 2: Število CFU laktobacilov na gojiščih LAMB in LAMVAB (1 mg/L).	29
Preglednica 3: Število CFU na gojiščih XLD, MacConkey in ENDO, ki so porasle iz dvodneve gojene črevesne mikrobiote. Števila so navedena za redčini 10 ⁻⁵ in 10 ⁻⁶ , ostale so bile v večini neštevne (> 300 CFU).	30
Preglednica 4: Število CFU/g laktobacilov in enterobakterij v fecesu otroka in odraslega človeka.	31
Preglednica 5: Število CFU/mL laktobacilov in enterobakterij v gojeni črevesni mikrobioti otroka in odraslega človeka.....	31

POVZETEK

V raziskovalni nalogi smo preizkušali, kako se črevesna mikrobiota v *in vitro* spreminja v prisotnosti naravnih učinkovin, ki naj bi pozitivno vplivale na prebavo. Za testiranje smo uporabili feces otroka in odraslega, ki smo ju gojili v prisotnosti izbranih učinkovin. Nato smo na selektivnih gojiščih določali število dveh skupin bakterij: enterobakterij in laktobacilov. V črevesni mikrobioti odraslega, sta tako korenika srčne moči kot česen zvišala število enterobakterij in laktobacilov, predvsem česen za več kot 10 krat. Industrijska konoplja je bistveno znižala število obeh skupin. Negativno so na rast enterobakterij vplivale tudi borovnice, vendar je v tem primeru število laktobacilov v primerjavi s kontrolo ostalo enako. Rezultati testiranja na otroški mikrobioti so se z odraslo skladali le delno; število enterobakterij pri borovnici in industrijski konoplji je namreč ostalo nespremenjeno. Laktobacilov v poskusu z otroško mikrobioto nismo zaznali.

ZAHVALA

Iskreno bi se rada zahvalila obema mentoricama za vso pomoč, namenjen čas in trud. Hvala tudi za vso pomoč pri pridobivanju literature. Zahvaljujem se tudi obema ustanovama za omogočeno uporabo laboratorijskih prostorov.

1 UVOD

Črevesna mikrobiota človeka je kompleksna združba arhej, gliv, praživali in bakterij. Ima pomemben vpliv na zdravje tkiva prebavnega trakta, prebavo, produkcijo hranil in vitaminov ter nudi odpornost proti patogenim bakterijam. Črevesna mikrobiota prav tako pomembno vpliva na gostiteljev razvoj imunskega sistema, telesno težo in celo na vedenje (Jandhyala in sod., 2015; Collen, 2016).

Sestavljena je iz velikega števila mikroorganizmov (10^{12} bakterij/gram blata). Zanja velja, da je vrstno zelo raznolika z visoko zastopanostjo dveh ali treh bakterijskih debel (*Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*) in da anaerobne bakterije v črevesni mikrobioti prevladujejo nad fakultativno anaerobnimi bakterijami (bakterije, ki lahko rastejo v prisotnosti ali odsotnosti kisika) (Buffie in Pamer, 2013; Žalig in Rupnik, 2014). V črevesni mikrobioti se nahajajo tudi laktobacili (predstavniki *Firmicutes*) in enterobakterije (predstavniki manj zastopanega debela *Proteobacteria*). Za laktobacile velja splošna domneva, da so v prebavnem traktu prisotni v velikem številu in da so bakterije s pozitivnim učinkom, vendar njihova vloga in položaj v črevesni mikrobioti zaenkrat ostajata slabo poznani (Tannock in sod, 2000). Kot omenjeno, so bakterije iz debela *Proteobacteria* v mikrobioti praviloma zastopane v nizkem deležu (do 4,6 %). Dokler so v manjšini ne povzročajo večjih težav. Pod določenimi pogoji se lahko namnožijo, postanejo škodljive in povzročijo vnetje. Dolgotrajni razrast proteobakterij v črevesju nakazuje na neuravnoteženo črevesno mikrobioto (Shin in sod. 2015).

Dejavniki, ki so v sodobni družbi vedno pogostejši (stres, nezdrava prehrana in nezdrav način življenja, jemanje različnih zdravil ...) lahko v črevesni mikrobioti povzročijo spremembe. Tako neuravnotežena mikrobiota nato lahko vodi do slabšega delovanja številnih organov in lahko dolgotrajno vodi tudi v bolezni, zato je dobro poznati tudi alternativne pristope za ponovno vzpostavitev ravnovesja v črevesni mikrobioti. Na to naj bi vplivali tudi prehranski izdelki, ki vsebujejo prebiotike ali druge aktivne sestavine, kot so rastlinske maščobne kisline in fitokemikalije (sekundarni produkt metabolizma rastlin). Te naj bi imele sposobnost zaviranja nekaterih škodljivih bakterij in spodbujale rast koristnih bakterij (*Bifidobacterium spp.* in *Lactobacillus spp.*; Laparra in Sanz, 2010). Zadnje čase se v alternativni medicini vse bolj promovira industrijska konoplja, ki naj bi imela zaradi vsebnosti vsebnosti celuloze nekaterih maščobnih kislin, kanabinoidov, alkaloidov in fenolov pozitiven učinek tudi na črevesje (Hieng, 2011; Khan in sod., 2014).

Za raziskavo smo se odločili, ker smo želeli prispevati k razumevanju delovanja in obsega učinka naravnih učinkovin na črevesno mikrobioto oz. dvoje predstavnikov: laktobacile in enterobakterije. Večje poznavanje tega področja bi lahko vodilo v pogostejšo uporabo naravnih učinkovin za vzdrževanje zdrave črevesne mikrobiote. Zaradi velikih razlik v sestavi črevesne mikrobiote otrok (do treh let) in odraslih ljudi smo delovanje testirali na dveh različnih fekalnih mikrobiotah iz teh starostnih skupin.

1.1 Raziskovalno vprašanje

V nalogi nas je zanimalo, kako vplivajo česen, korenika srčne moči, borovnice in industrijska konoplja na število laktobacilov in enterobakterij v črevesni mikrobioti zdravega otroka in zdravega odraslega človeka. Prav tako nas je zanimalo, katera gojišča bodo za določanje njihovih števil najbolj primerna: MRS ali LAMB (z in brez antibiotika) za laktobacile, ter XLD, MacConkey ali ENDO za enterobakterije.

1.2 Hipoteze

1. Glede na teorijo o koristnih vplivih naravnih učinkovin na črevesno mikrobioto predpostavljamo, da bo vsaj pri nekaterih učinkovinah število bakterij, ki jih povezujemo z uravnoteženo črevesno mikrobioto (laktobacilov), v primerjavi s kontrolo povečano oz. nespremenjeno.
2. Predpostavljamo, da bodo nekatere naravne učinkovine negativno vplivale na rast potencialno škodljivih enterobakterij.
3. Ker se sestavi črevesne mikrobiote odraslega in otroka razlikujeta, predpostavljamo, da se bodo vplivi učinkovin na otroško in odraslo črevesno mikrobioto nekoliko razlikovali.

2 TEORETIČNO OZADJE

2.1 Črevesna mikrobiota in njena vloga

Človeška črevesna mikrobiota je kompleksna združba bakterij, arhej, gliv in praživali. Ima pomemben vpliv na zdravje tkiva prebavnega trakta, prebavo, produkcijo hranil in vitaminov ter nudi kolonizacijsko odpornost. Slednja pomeni zaščito pred kolonizacijo zunanjih mikroorganizmov in zaviranje prekomerne rasti posameznih članov mikrobiote, ki so v prebavnem traktu normalno prisotni v nizkem deležu.

Črevesna mikrobiota prav tako pomembno vpliva na gostiteljev razvoj imunskega sistema, saj je ravno v človeškem črevesju več imunskih celic kot v vsem preostalem telesu. Bolezni 21. stoletja, ki so povezane z imunskim sistemom, kot so celiakija in revmatoidni artritis, zato pogosto nastanejo prav v črevesju (Buffie in Pamer, 2013; Žalig in Rupnik, 2014; Collen, 2016). Črevesna mikrobiota alergičnih ljudi se razlikuje od mikrobiote zdravih. Prvi imajo v črevesju manj bifidobakterij, te pa delujejo spremenjeno, saj vnetja spodbujajo namesto, da bi jih zmanjševala (Kojić, 2006).

Črevesna mikrobiota ima na telesno težo dosti večji učinek kot naši geni. Bäckhed in sodelavci poročajo, da je količina kalorij, ki jo pridobimo iz hrane, odvisna od naših prehranjevalnih navad, saj se glede na njih spreminjajo tudi bakterije, ki poseljujejo naše črevesje. Človek, ki uživa zelo malo maščob, ima zelo malo mikrobov, specializiranih za metabolizem maščob, zato bakterije ob občasni mastni hrani ne bi pridobile toliko kalorij, kot pri človeku, ki se z maščobami prehranjuje vsakodnevno (Collen, 2016).

Bakterije naj bi imele velik vpliv tudi na vedenje človeka ter ključno vlogo pri razvoju možganov v prvih letih življenja. Podrobnejše raziskave na tem področju še potekajo, saj je ugotovitev o povezavi vedenja in mikrobiote še relativno mlada (Collen, 2016).

2.2 Sestava črevesne mikrobiote

Čeprav se med odraslimi posamezniki črevesna mikrobiota lahko močno razlikuje, pa zanjo splošno velja, da je sestavljena iz velikega števila mikroorganizmov (10^{12} bakterij/gram blata), da je vrstno zelo raznolika z visoko zastopanostjo dveh ali treh bakterijskih debel

(*Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*) in da anaerobne bakterije prevladujejo nad fakultativno anaerobnimi bakterijami (bakterije, ki lahko rastejo v prisotnosti ali odsotnosti kisika, kot so npr. enterobakterije in enterokoki) (Buffie in Pamer, 2013; Žalig in Rupnik, 2014).

Na sestavo človeške črevesne mikrobiote v veliki meri vplivajo naša prehrana, starost in antibiotiki. Deblo *Firmicutes* zajema pomembne bakterijske rodove, vključno z rodovi kot so *Clostridium* ter *Lactobacillus* (s sevi tega rodu, ki veljajo za probiotike). Znano je, da se naša črevesna mikrobiota z nami razvija in da lahko imajo spremembe velike posledice, tako koristne, kot zdravju škodljive (Ley in sod., 2008).

S porušenjem ravnovesja v črevesni mikrobioti se vse zgoraj navedene karakteristike spremenijo, to pa lahko vodi v razne okužbe in bolezni. Do porušenja ravnovesja v črevesni mikrobioti lahko pride po terapiji z antibiotiki, zaradi nezdrave prehrane, jemanja močnih zdravil, stresnega in nezdravega načina življenja ali okužbe s patogeno bakterijo (Buffie in Pamer, 2013; Žalig in Rupnik, 2014).

Neravnovesje v črevesni mikrobioti naj bi bilo povezano s stanji kot so debelost (Zhang in sod., 2009), podhranjenost (Kau in sod., 2011), sistemske bolezni kot je diabetes (Qin in sod., 2012) in kroničnimi vnetnimi boleznimi (KVČB), ki vključujejo ulcerativni kolitis in Kronovo bolezen (Frank in sod. 2007). V neuravnoteženi mikrobioti slednjega so raziskovalci določili zmanjšan delež predstavnikov debela *Firmicutes* in povečanje predstavnikov skupine *Enterobacteriaceae* (Sokol in sod., 2010).

2.3 Vpliv starosti na črevesno mikrobioto

Črevesna mikrobiota dojenčkov je manj kompleksna kot mikrobiota odraslega človeka (Jimenez in sod., 2008; Fouhy in sod., 2012). Dojenčkovo črevo naseljujejo enterobaktri in enterokoki, ki jim sledijo bifidobakterije, klostridiji, bakteriodete, streptokoki in enterobakterije (Alderberth in Wold, 2009). Črevesna mikrobiota se razvija do tretjega leta, nakar postane podobna mikrobioti odraslega človeka (Palmer in sod., 2007). Mikrobiota zdravega človeka je raznolika in stabilnejša. S staranjem človeka se začne spreminjati tudi sestava črevesne mikrobiote. Pri starejših ljudeh se raznolikost črevesne mikrobiote spet zmanjša, prav tako opazamo zmanjšanje deleža predstavnikov *Firmicutes* (vključno

laktobacili) in bifidobakterij (aktinobakterije). Našteto poveča dovzetnost za bolezni. Ravno nasprotno pa se s starostjo poveča delež fakultativnih anaerobov kot so streptokoki, enterokoki in enterobakterije (Marx, 2015).

2.4 Vpliv prehrane na črevesno mikrobioto

V splošnem velja, da sestavo črevesne mikrobiote izboljšamo z rednim in pogostim uživanjem vlaknin, sadja in zelenjave. Že vsaka manjša sprememba v človekovi prehrani ima lahko na sestavo njegove mikrobiote znaten učinek. Če se oseba, ki redno uživa meso odloči za striktno vegetarijansko prehrano, se lahko njena mikrobiota opazno spremeni že v 24-ih urah. Zaradi razlike v prehranjevanju se sestava črevesne mikrobiote razlikuje tudi med ljudmi, ki živijo na geografsko oddaljenih območjih (Jandhyala in sod., 2015; Collen, 2016).

2.5 Vpliv antibiotikov na črevesno mikrobioto

Vpliv zdravljenja z antibiotiki ima na ekologijo črevesne mikrobiote kratkotrajne ali dolgotrajne učinke, saj antibiotiki ne uničijo samo patogenih bakterij, kot bi bilo zaželeno, ampak prav vse bakterije, ki na uporabljeni antibiotik niso odporne. Že sedemdnevna terapija povzroči v črevesni mikrobioti tako izrazite spremembe, da se ta v prvotno stanje uspe povrniti šele čez dve leti, s tem da raznolikost bakterij iz nekaterih rodov nikoli več ni tako pestra, kot je bila pred terapijo z antibiotikom (Jandhyala in sod., 2015).

2.6 Laktobacili in enterobakterije v črevesni mikrobioti

2.6.1 Rod *Lactobacillus*

Bakterije iz rodu *Lactobacillus* so fakultativni anaerobi, velikosti približno 0,5-1,2x1,0-10 µm in so paličaste oblike. Palčke se lahko združujejo v verige, daljše palčke lahko opazimo samostojne. So po Gramu pozitivne bakterije (v procesu barvanja po Gramu ostanejo vijolično oz. modro obarvane, saj imajo v celični steni več peptidoglikana in manj lipidov kot po Gramu negativne bakterije). odporne so na zelo nizek pH, zato jih lahko najdemo med drugim tudi v našem črevesju (Kocjan, 2015).

Za laktobacile velja splošna domneva, da so v prebavnem traktu prisotni v velikem številu, še zlasti v tankem črevesu, kjer se vežejo na epitelij. Vendar je kljub temu zelo malo eksperimentalnih podatkov, ki bi to potrjevali. Vloga in položaj laktobacilov v črevesni mikrobioti zaenkrat ostajata slabo poznani. Pri anaerobnem gojenju črevesne mikrobiote, laktobacili predstavljajo zelo majhen del mikrobiote, ki jo je mogoče gojiti in redko presežejo vrednost 10^8 enot, ki tvorijo kolonije (CFU) na gram fecesa (Tannock in sod., 2000). To predstavlja 0,01 % vseh CFU. Število se spreminja od človeka do človeka ter jih pri okrog 25 % vzorcih blata pri človeku ne zaznamo (Finegold in sod., 1983; Tannock in sod., 2000). Nizko število laktobacilov potrjujejo tudi raziskave mikrobiote na osnovi DNA. Večina laktobacilov, ki jih zaznamo v fecesu zelo verjetno izvira iz ustne votline ali hrane (Berg, 1996). V črevesju bi laktobacili lahko privzemali enostavne ogljikove hidrate, ki so jih iz kompleksnih razgradili drugi mikroorganizmi. Nekatere vrste (*L. acidophilus*, *L. plantarum*, and *L. paracasei*) so zmožne privzemanja tudi kompleksnih ogljikovih hidratov. Število laktobacilov v fecesu niha; delimo jih na prehodne (zaužiti s hrano, iz ustne votline) in trajne seve. Trajni sevi se v črevesju ohranjajo dalj časa (Walter, 2008).

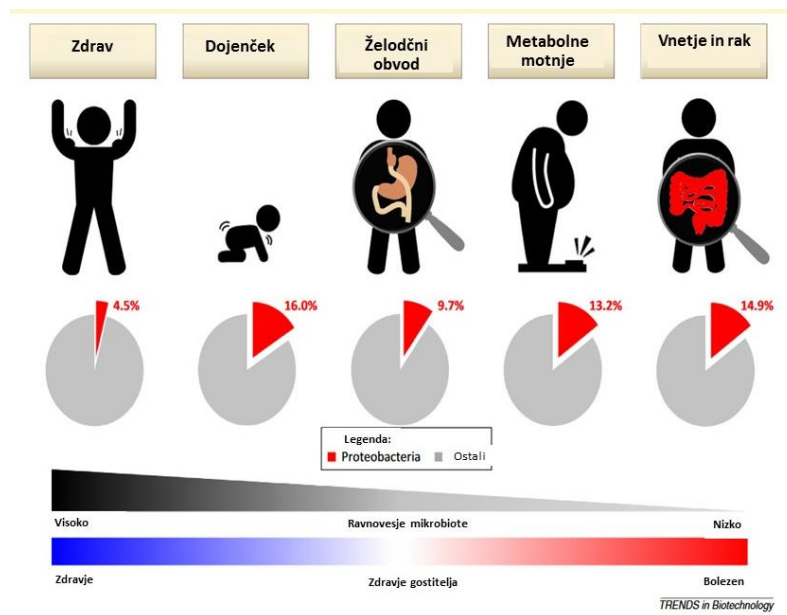
V črevesni mikrobioti veljajo za bakterije s pozitivnim učinkom. Nekatere vrste se uporabljajo kot probiotiki. So mlečnokislinske bakterije in tako kot glavni produkt mlečnokislinske fermentacije proizvajajo mlečno kislino. Mlečna kislina ustvari okolje, ki je do drugih bakterij neprijazno, poleg tega laktobacili ustvarjajo svoje antibiotike, ki v večini delujejo na sorodne po Gramu pozitivne bakterije, dokazano pa delujejo tudi na nekatere po Gramu negativne bakterije (npr. salmonelle) (Collen, 2016). Tvorijo še nekatere druge spojine, ki delujejo protimikrobno: vodikov peroksid, mravljično kislino in kratkoverižne maščobne kisline. Vendar je o učinku teh sestavin na člane črevesne mikrobiote in vpliv na sestavo mikrobiote še veliko neznanega. Delovali naj bi tudi protivnetno. Količino laktobacilov v naši črevesni mikrobioti lahko povečamo z uživanjem živil, ki vsebujejo laktozo, polifenole (podskupino fitokemikalij), prebiotike in probiotike (Singh, in sod., 2017).

2.6.2 Enterobakterije

Enterobakterije so po Gramu negativne bakterije paličaste oblike in spadajo v družino *Enterobacteriaceae*, deblo *Proteobacteria*. So fakultativni anaerobi. Veliko vrst iz družine *Enterobacteriaceae* je del normalne človeške mikrobiote in jih lahko izoliramo iz različnih okoljskih virov. Najdemo pa tudi takšne, ki povzročajo bolezni. Najbolj pogosto izolirana

bakterija v kliničnem laboratoriju je *Escherichia coli*, ki je prisotna pri vseh ljudeh (Guentzel, 1996).

Številne raziskave so pokazale, da razcvet proteobakterij v črevesju odraža neuravnoteženo črevesno mikrobioto. Tovrstne bakterije ne povzročajo večjih težav, dokler so v manjšini. Vendar pa pod določenimi pogoji lahko postanejo škodljive in povzročijo vnetje. Proteobakterije so med ostalimi debli v črevesni mikrobioti najmanj stabilne skozi čas. Pri zdravem posamezniku lahko njihov delež prehodno naraste celo do 45% (normalno so zastopane v 2,5%–46 %; Slika 1). Sklepamo, da so zelo občutljive na okoljske dejavnike kot je prehrana (npr. hrana z nizko vsebnostjo vlaknin). Vendar dolgotrajno povečanje za človeka lahko pomeni neravnovesje v črevesni mikrobioti ali pojav določene bolezni (Slika 1). V zdravem črevesu ima komenzalna mikrobiota zaščitno vlogo proti okužbam ali vnetju z vzpodbujanjem protivnetnih faktorjev. V primeru vnetja lahko enterobakterije te dele naselijo (anaerobno dihanje s pomočjo nitrata, ki se tvori pri vnetju) in izpodrinejo firmikute in bakteriodete, ki so odvisne od fermentacije in v tem okolju težje uspevajo. Uspešnost jim zelo verjetno poveča tudi hitra medsebojna izmenjava genov. Nenadzorovana razrast proteobakterij in zmanjšana kolonizacijska odpornost mikrobne združbe tako dalje spodbuja vnetje in omogoča okužbo z zunanjimi patogenimi bakterijami (Shin in sod., 2015).



Slika 1: Delež proteobakterij pri različnih stanjih gostitelja (Vir: Shin in sod., 2015)

2.7 Metode, ki jih uporabljamo za raziskave črevesne mikrobiote

Za raziskave črevesne mikrobiote običajno uporabljamo vzorce fecesa, saj naj bi dobro odražali stanje črevesne mikrobiote. Večina raziskav se osredotoča na bakterijske populacije, njihovo količino in vrste pa lahko določimo na dva načina: z gojenjem in molekularnimi metodami (na osnovi analize določenih DNA ali RNA). Oba načina sta v zadnjem desetletju zelo napredovala (Jandhyala in sod., 2015).

2.7.1 Gojišča, ki jih uporabljamo za gojenje črevesne mikrobiote

2.7.1.1 Wilkins-Chalgren anaerobe broth

Wilkins-Chalgren anaerobe broth je obogateno tekoče gojišče (bujon), ki se uporablja za rast anaerobnih organizmov. Vključuje peptone, glukozo in ekstrakt kvasovk, ki mikroorganizme oskrbuje z vitamini in nekaterimi drugimi snovmi, ki so nujno pomembni za dobro rast. Vključuje še aminokisljine, vitamine, soli, vire železa (hemin), da omogoča tudi rast zahtevnejših bakterij.

2.7.1.2 Gojišča za osamitev in gojenje laktobacilov

Za osamitev laktobacilov se uporabljajo bogatitvena gojišča z nizko pH vrednostjo, kot so trdna gojišča (agarji) MRS, LAMVAB, LBS in Rogosa (Hartemenik in Domenech, 1997).

MRS je bogatitveno gojišče za bakterije iz rodu *Lactobacillus*. Rast bakterij iz drugih rodov je omejena, a ne popolnoma zatrta. Tako se na gojiščih zraven laktobacilov v velikem številu pojavijo še bifidobakterije, streptokoki in enterokoki (Hartemenik in Domenech, 1997).

Gojišče LAMVAB ali *Lactobacillus Anaerobic MRS with Vancomycin and Bromocresol green* je selektivno gojišče za laktobacile. Osnova za pripravo gojišča je gojišče MRS, kateremu so dodani cistein-hidroklorid, glikopeptidni antibiotik vankomicin ter barvilo bromkrozol zeleno kot indikator vrednosti pH (Hartemenik in Domenech, 1997). Zaradi nizkega pH je rast po Gramu negativnih bakterij, kot so enterobakterije in klostridiji, zatrta. Vankomicin zavira rast vseh Gram pozitivnih bakterij, razen laktobacilov, ki so na vankomicin odporni oz. lahko rastejo v prisotnosti vankomicina, a jim vseeno bolj ustreza rast na gojišču brez prisotnosti vankomicina, saj so nekateri laktobacili na ta antibiotik občutljivi. LAMVAB je tako uporaben za osamitev bakterij iz rodu *Lactobacillus* iz človeškega fecesa.

Kolonije laktobacilov na gojišču LAMVAB privzemajo barvilo bromkrezol zeleno, posledično so kolonije modro-zelene barve. Nekatere vrste in sevi tega ne morejo, zato so kolonije teh sevov rumene ali bele barve. LAMVAB je v primerjavi z gojišči MRS in Rogosa bolj selektiven, čeprav se občasno na gojiščih pojavijo kvasovke in redke vrste kokov, ki so odporni na vankomicin (Hartemenik in Domenech, 1997; Kocjan 2015).

2.7.1.3 Gojišča za osamitev in gojenje enterobakterij

Za gojenje enterobakterij se lahko uporabljajo gojišča MacConkey, XLD ali ENDO.

MacConkey agar je diferencialno trdno gojišče za osamitev po Gramu negativnih črevesnih bacilov iz vode, mlečnih produktov in bioloških vzorcev in njihovo razlikovanje na osnovi fermentacije laktoze. Zaradi indikatorja se gojišče ob fermentaciji laktoze obarva rdeče (*E.coli*). V nasprotnem primeru je rumeno. Vsebuje tudi kristal vijolično in žolčne soli, ki zavirata rast po Gramu pozitivnih bakterij, s čemer gojišču omogočata selekcijo za rast po Gramu negativnih bakterij (Anderson, 2013).

XLD agar je trdno selektivno gojišče, v prvi vrsti namenjeno izolaciji salmonele in šigele iz kliničnih vzorcev ali hrane (Oxoid, 2007). Med salmonelami, šigelami in koliformi lahko razlikujemo na osnovi barve kolonij: salmonela tvori rdeče kolonije, nekatere s črnim centrom, šigela tvori rdeče kolonije in koliformi rumene do oranžne (Nye in sod., 2002).

ENDO agar je trdo gojišče (agar) roza barve. Splošno se uporablja za izolacijo koliformnih bakterij. Na agarju dobro raste večina po Gramu negativnih organizmov, rast po Gramu pozitivnih je zavarta. Razlikuje med organizmi, ki so sposobni fermentirati laktozo (tvorijo kolonije metalne barve; *E. coli*) od tistih, ki je niso. Slednji tvorijo brezbarvne kolonije (npr. vrste rodu *Salmonella*) (Oxoid, 2007).

2.8 Naravne učinkovine z možnim vplivom na črevesno mikrobioto

Na ponovno vzpostavitev ravnotežja v črevesni mikrobioti lahko vplivamo z uživanjem izdelkov, ki vsebujejo prebiotike ali druge aktivne sestavine. To vključuje tudi naravne učinkovine, kot so česen, borovnice in korenika srčne moči. Zadnje čase se v alternativni medicini vse bolj promovira industrijska konoplja, ki naj bi imela zaradi vsebnosti vsebnosti celuloze nekaterih maščobnih kislin, kanabinoidov, alkaloidov in fenolov pozitiven učinek

tudi na črevesje (Laparra in Sanz, 2009; Khan in sod., 2014; Hieng, 2011). Najbolje karakterizirane prehranske aktivne sestavine so prebiotiki, nenasičene maščobne kisline in fitokemikalije. Prebiotiki delujejo tako, da jih bakterije fermentirajo, pri tem pa nastajajo kratkoverižne maščobne kisline z različnim biološkim delovanjem. Nenasičene maščobne kisline vključujejo omega-3 in omega-6 maščobne kisline, ki vplivajo na imunost in metabolizem človeka (v črevesju navzkrižno delujejo s prebiotiki). Fitokemikalije so nehranljive bioaktivne rastlinske spojine, ki so lahko antioksidanti, antiestrogeni. Delujejo protivnetno, v nekaterih primerih tudi protirakavo, vzpodbujajo pa tudi imunski sistem. Fitokemikalije in njihovi produkti lahko prav tako zavirajo rast patogenih bakterij in vzpodbujajo rast koristnih bakterij. Največ pozornosti izmed fitokemičnih spojin so deležni fenoli in flavonoidi (Laparra in Sanz, 2009). Fenoli, ki so prisotni v olivah, borovnicah, vinu in čaju delujejo protimikrobno. Npr. fenoli, ki jih vsebuje čaj zavirajo rast vrst *Bacteroides*, *Clostridium*, *E. coli* in *Salmonella Typhimurium*. Nekateri flavonoidi, ki jih najdemo v vinu vzpodbujajo povečanje bakterij števila *Bifidobacterium* in *Lactobacillus* ter zavirajo rast in delovanje določenih patogenih bakterij. Omenjene učinkovine lahko spreminjajo tudi sestavo črevesne sluzi in tako vplivajo na pritrjevanje in kolonizacijo bakterij na črevesno steno (Laparra in Sanz, 2009).

2.8.1 Česen

Česen je ena najstarejših zdravilnih rastlin. Raziskave so potrdile, da ima protimikrobno delovanje, stimulira imunski sistem in je antioksidant. Deluje negativno na razna črevesna obolenja (kolera, tifus, paratifus, gripa), preprečuje napenjanje in boleče krče v telesu, tveganja za hude kronične bolezni. Z njim zdravimo akutne in kronične katarje v tankem in debelem črevesu. Ljudsko zdravilstvo za zdravljenje in preventivo uporablja česnovo tinkturo, česnov sok se daje otrokom v boju proti glistam (Ašič, 2008). Rezultati testiranja na predstavnikih črevesne mikrobiote so pokazali, da ima česen potencial spreminjanja mikrobiote, saj ima na nekatere predstavnike začasno protimikrobno delovanje. Laktobacili so bili proti njegovemu delovanju odporni (Filocamo in sod., 2012).

2.8.2 Borovnice

Suhe jagode ustavljajo drisko, medtem ko sveže delujejo odvajalno in tako pomagajo zoper zaprtje. Borovničev sok zdravi katar želodca in črevesja, pomaga pri prebavnih motnjah in neješčosti (Ašič, 2008).

Borovnice povišujejo število Bifidobakterij v črevesju, te pa mikrobioto krepijo in preprečujejo vnetje črevesja (Robertson, 2016). Zaradi aktivnih spojin imajo sposobnost zaviranja rasti nekaterih patogenov (*Salmonella*, *Heliobacter pylori*, *Bacillus cereus*).

Semena borovnic vsebujejo večkrat nenasičene mačobne kisline, ki v visokih koncentracijah zavirajo rast in oprijemljivost na mukus različnih sevov laktobacilov (Ho, et al., 2013; Laparra in Sanz, 2009).

2.8.3 Srčna moč

Za zdravljenje uporabljamo le koreniko. Čaj iz korenike srčne moči zaradi čreslovin (rastlinske polifenolne spojine trpkega, grenkega okusa) zelo dobro zdravi kronične kužne bolezni črevesja, griže, katarja in vnetje debelega črevesja ter je eno najboljših zdravil za črevesno tuberkulozo. Ker uničuje bakterije, se obnese tudi pri tistih obolenjih, pri katerih se menjavajo driske in zaprtje (Ašič, 2008).

2.8.4 Konoplja

Konoplja zaradi visoke vsebnosti celuloze na naše črevesje deluje pozitivno, saj celuloza predstavlja hrano za probiotike, prav tako tudi aminokisline, ki jih v telo dobimo z uživanjem konopljinca olja.

Vsebuje omega 3 in omega 6 maščobne kisline, ki vplivajo na črevesno mikrobioto, saj visoke koncentracije teh zavirajo rast in oprijemljivost na mukus različnih sevov laktobacilov.

Konopljinca olje se priporoča pri vnetjih črevesja (Hieng, 2011; Laparra in Sanz, 2009).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

3.1.1 Gojišča

3.1.1.1 Bujon Wilkins-Chalgren (WCAB; angl. Wilkins-Chalgren Anaerobe Broth)

Bujon smo pripravili po navodilih proizvajalca, kjer smo najprej natehtali 8,25 g dehidrirane podloge za bujon WCAB (Oxoid), ga raztopili v 250 mL destilirane H₂O (dH₂O) in sterilizirali z avtoklaviranjem 15 minut na 121 °C. Bujon smo ohladili na sobno temperaturo in ga preko noči pustili na sobni temperaturi. Do uporabe smo ga hranili na 4 °C, največ 1 teden. Pred uporabo smo gojišče premešali.

3.1.1.2 Trdno gojišče MRS

K 52,2 g MRS dehidrirane podloge za bujon (Merck) in 15 g agarja (Bioline) smo dolili dH₂O do končnega volumna 1L in sestavine raztopili. Tako pripravljeno raztopino smo avtoklavirali pri 121 °C, 15 min. Gojišče smo ohladili na 48 °C +/- 2°C, premešali in ga razlili v sterilne petrijevke (približno 18 mL na petrijevko).

3.1.1.3 Trdno gojišče LAMB

Sestavine:

- 52,2 g MRS dehidrirane podloge za bujon (Merck)
- 0,25 g cistein hidroklorida
- 0,025 g barvila brom krezol zeleno

Naštete sestavine smo raztopili v 900 mL dH₂O ter umerili vrednost pH na 5,0 +/- 0,2.

Raztopini smo nato dodali še agar (15 g/L) in jo sterilizirali z avtoklaviranjem pri 121 °C, 15 min. Gojišče smo ohladili na 48 °C +/- 2°C. Ohlajenemu gojišču smo po potrebi dodali ustrezno koncentracijo antibiotika vankomicin (LAMVAB; 1 µg/mL ali 20 µg/mL), dobro premešali in ga razlili v sterilne petrijevke. Plošče smo do uporabe hranili na 4 °C.

3.1.1.4 Trdna gojišča MacConkey, XLD in ENDO

Ustrezno količino posameznega dehidridiranega gojišča (51,5 g Sorbitol MacConkey agarja (Oxoid); 55,0 g XLD agarja (Merck); 41,5 g ENDO agarja (HiMedia)) smo raztopili v 1000 mL dH₂O. Gojišče smo nato avtoklavirali pri 121°C, 15 minut. Po končanem avtoklaviranju smo ga ohladili na 48 °C +/- 2°C, premešali in razlili v sterilne petrijevke. Plošče smo do uporabe hranili na 4 °C.

3.1.2 Ostalo:

<u>Materiali in oprema</u>	<u>Model/Proizvajalec</u>
Centrifugirke	50 mL, Sarstedt
Mikrocentrifugirke	1,5 mL, 5,0 mL, Eppendorf
Vrečke za gnetilnik	BagPage F, Interscience
Cepilna zanka	Golias
Mikrotitrna ploščica	(6 luknjic), Sarstedt
Plinski gorilnik	Campingaz
Anaerobna komora	Whitley A35, Don Whitley Scientific
Avtomatska pipeta 0,5-10 µl; 10-100 µl; 100-1000 µl	Eppendorf
Centrifuga	Mini spin plus, Eppendorf
Komercialni sistem za identifikacijo	Maldi Biotyper, Bruker Daltonics
MALDI-TOF	Bruker
Stresalnik	BioRad
Laboratorijsko mešalo	Vibromix 10, Tehnica
Laboratorijska tehtnica	Kern EWB, Sysmatec

3.1.2.1 Raztopine

- 70 % mravljična kislina (k 7 mL 98-100% mravljične kisline (Merck) dodamo 3 mL dH₂O)
- HCCA matriks za določanje bakterijske vrste z MALDI-TOF (ready-for-use HCCA; Bruker)
- **Fiziološka raztopina (FR)**

Skupno 4,25 g NaCl (Merck) smo raztopili v 500 mL dH₂O in sterilizirali s 15 minutnim avtoklaviranjem pri 121°C. Do uporabe smo raztopino hranili na sobni temperaturi.

3.2 Metode

3.2.1 Priprava učinkovin

3.2.1.1 Borovničev čaj (Flora)

3.2.1.1.1 Opis izdelka

Naziv produkta: Borovnica plod zeliščni čaj 80g – Flora

Priložena navodila za uživanje: 3 čajne žličke rastline prelijemo z 250 ml hladne vode, zavremo in po 10 minutah precedimo. Mlačen čaj pijemo nesladkan po 1 do 2 skodelici dnevno.

3.2.1.1.2 Priprava učinkovine v laboratoriju

Skupno 3 čajne žličke plodov učinkovine smo prelili s 25 mL hladne dH₂O, zavreli in po 10 minutah tekočino odpipetirali v 50 mL sterilno centrifugirko.

3.2.1.2 Konopljinolje (Hemptouch)

3.2.1.2.1 Opis izdelka

Amber konopljinoljne kapljice Hemptouch vsebujejo širok spekter kanabinoidov (5%), terpenov in drugih fitofarmaceutskih sestavin v hladno stiskanem oljčnem olju. Pridobljene so iz vršičkov konopljinih rastlin, sorte *Cannabis sativa*, gojenih povsem brez pesticidov in herbicidov. Ekstrakt je pridobljen brez prisotnosti topil ali alkohola. Konopljinoljne kapljice so testirane na prisotnost bakterij, gliv, kvasovk, pesticidov, težkih kovin in toksinov.

3.2.1.2.2 Priprava učinkovine v laboratoriju

Za testiranje uporabimo ustrezno količino (50 µL) originalne raztopine.

3.2.1.3 Česen

3.2.1.3.1 Opis izdelka

Česen jesenski, poreklo: Majcan Štefan, Rankovci 32, 9251 Tišina, Slovenija.

3.2.1.3.2 Priprava učinkovine v laboratoriju

Česen v vrečki za testiranje živil (Interscience) zdrobimo in sok odpipetiramo v epico.

3.2.1.4 Čaj korenike srčne moči (Flora)

3.2.1.4.1 Opis izdelka

Naziv produkta: Srčna moč (*Tormentillae radix*) zeliščni čaj (100g, Flora). Posušena in rezana korenika srčne moči.

Za pripravo čaja 1 do 3 jedilne žlice rastline prelijemo z 250 mL hladne vode, zavremo in kuhamo 15 minut, nato čaj precedimo. Pijemo 2 do 3 krat dnevno po 1 skodelico. Uporabimo ga tudi za mokre povoje ali za grgranje.

3.2.1.4.2 Priprava učinkovine v laboratoriju

Priprava v laboratoriju: 3 jedilne žlice rastline prelijemo z 25 ml hladne vode, zavremo in kuhamo 15 minut. Po 5 min tekočino odpipetiramo v sterilno 50 mL centrifugirko.

3.2.2 Optimizacija gojišč

3.2.2.1 Optimizacija selektivnih gojišč za laktobacile in enterobakterije

Za učinkovito določitev števila laktobacilov smo testirali gojišča MRS, LAMB, LAMBVAB (s koncentracijo vankomicina 1 mg/L in 20 mg/L). Za določitev števila enterobakterij smo testirali gojišča XLD, ENDO in MacConkey. To smo naredili tako, da smo na gojišča nanesli ustrezne redčine fekalne suspenzije ali gojene črevesne mikroioite (dvodnevna) ter na njih prešteli število kolonij laktobacilov oziroma enterobakterij. Porasle kolonije smo pri teh testiranjih preverili s sistemom za določanje vrst organizmov (MALDI-TOF, Bruker).

3.2.3 Določanje vrst osamljenih organizmov z aparatom MALDI-TOF (Bruker)

Na ploščico smo nanesli kulturo iz ene kolonije in jo razmazali po enem od določenih krogov na kovinski ploščici ter pustili na sobni temperaturi, da se posuši. Na te smo nanesli po 1 μ L 70 % mravljične kisline, posušili in nanesli še matriks (komercialni reagent, Bruker) ter ponovno posušili. Ploščico smo nato vnesli v aparat, ki nam je na osnovi analize naboja proteinov določil vrsto organizma.

3.2.4 Testiranje učinkovin

Izbrane učinkovine smo testirali na 2 dnevni gojeni črevesni mikrobioti, pripravljene v bujonu WCAB (Slika 2). Delo je vsebovalo 3 ključne korake: 1.) priprava fekalne suspenzije (t_0), 2.) priprava 2-dnevne gojene črevesne mikrobiote (t_1), 3.) testiranje učinkovin (t_2). Pri vsaki od točk smo v suspenziji določili še število enot, ki tvorijo kolonije (CFU) enetrobakterij in laktobacilov (Slika 2). Do priprave redčin in nacepitve na agarjeve plošče je delo potekalo v anaerobni komori (Don Whitley Scientific).

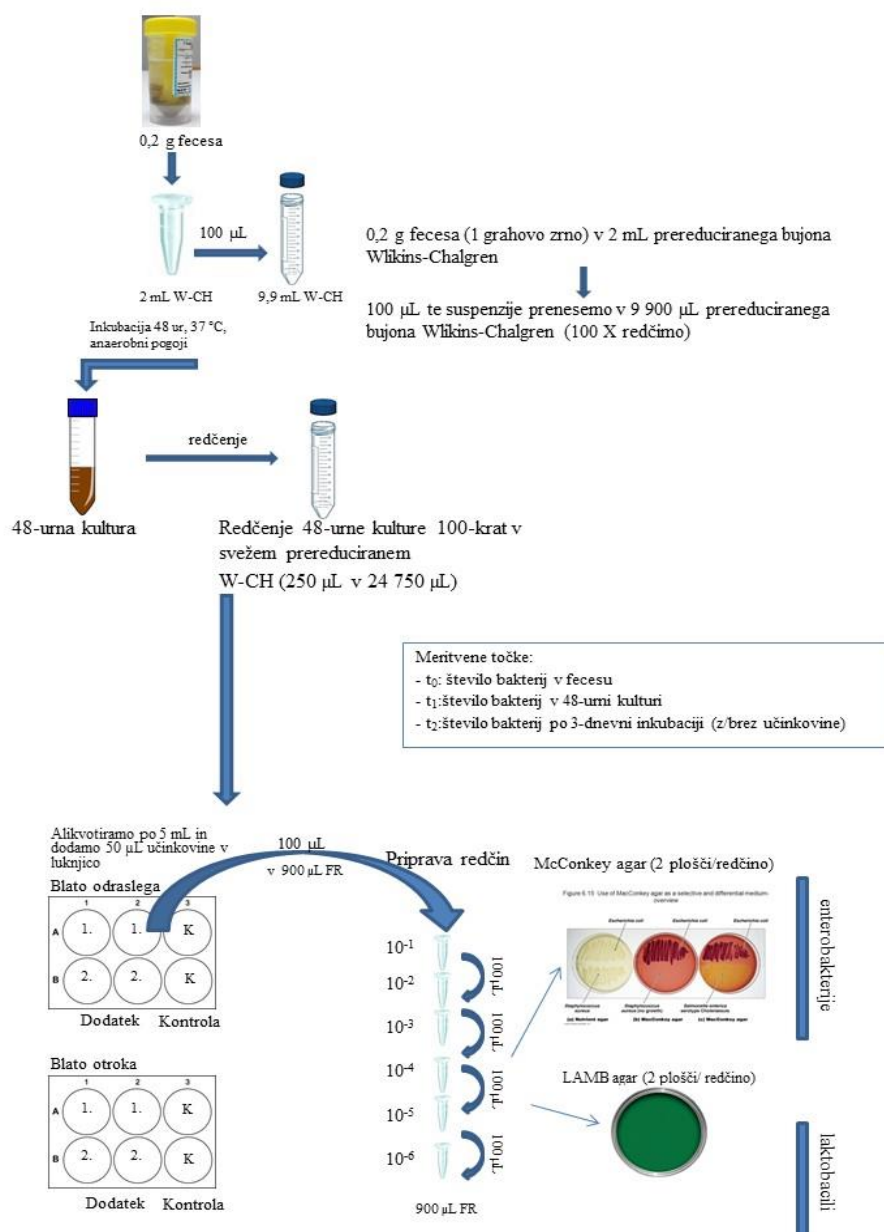
3.2.4.1 Priprava fekalne suspenzije

Skupno 0,2 grama fecesa smo resuspendirali v 2 mL prereduciranega bujona Wilkins-Chalgren (10-kratna redčina fecesa) (Slika 2). V nalogi smo uporabili:

- feces odraslega (> 15 let) zdravega prostovoljca in
- feces zdravega otroka starega 2,5 let.

3.2.4.2 Priprava dvodnevne gojene črevesne mikrobiote

Suspenzijo iz prejšnje točke (3.2.3.1) smo nato še 100-krat redčili tako, da smo 100 μ L te suspenzije prenesli v 9,9 mL prereduciranega bujona Wilkins-Chalgren. Tako pripravljeno kulturo smo potem inkubirali pri anaerobnih pogojih 48 ur pri 37°C (Slika 2).



Slika 2: Shema poteka dela

3.2.4.3 Testiranje učinkovin

Za testiranje učinkovin smo dvodnevno kulturo najprej 100 krat redčili (Slika 2) tako, da smo 300 µL suspenzije prenesli v 29,700 mL prereduciranega bujona Wilkins-Chalgren in alikvotirali v ploščico s šestimi luknjicami (v vsako luknjico 5 mL). Pri poskusu 1 smo v prvi dve luknjici na ploščici 1 dodali 50 µL konopljinih kapljic, v drugi dve 50 µL borovničevega čaja, v zadnji dve (kontrola) pa 50 µL destilirane vode z namenom ohranitve volumna. Podobno smo naredili za česen in čaj korenike srčne moči (Slika 3). Napolnjene ploščice smo inkubirali 3 dni na stresalniku (Slika 4), da so se tekom inkubacije poskusa bakterije v

mešanici mešale z raztopino (učinkovino in gojiščem). Po treh dneh smo ploščice vzeli iz anaerobne komore in kulture z dodano učinkovino dobro premešali z namenom, da smo dobili mešanico z enakomerno koncentracijo (homogeno raztopino). Nato je sledila priprava redčin, ki je opisana v naslednjem poglavju (3.2.4.4).



Slika 3: Mikrotitrski ploščici s 6 luknjicami z zaporedjem testnih učinkovin, ki smo jih vnesli



Slika 4: Ploščice na mešalu v anaerobni komori

3.2.4.4 Določanje CFU enterobakterij in laktobacilov

Kot omenjeno, smo po vsakem od zgoraj naštetih korakov (3.2.4.1, 3.2.4.2, 3.2.4.3) določili še število CFU enterobakterij in laktobacilov.

Iz prvotne fekalne suspenzije oziroma gojene črevesne mikrobiote smo najprej pripravili ustrezne razredčine (Preglednica 1, Slika 2). To smo naredili tako, da smo s pipeto v epice (v 4, 6 ali 7 – odvisno od točke testiranja; Preglednica 1) najprej vnesli po 900 μL fiziološke raztopine. Nato smo v prvo, prazno epico, prenesli 700 μL izvorne raztopine (oznaka neredčeno). Iz te smo 100 μL prenesli v prvo epico s fiziološko raztopino (oznaka 10^{-1} , Preglednica 1) epico zaprli, in s pomočjo mešala premešali. V epici 1 je tako nastala redčina

10⁻¹. Iz te epice smo prenesli 100 µL redčine v epico 2, v kateri je tako nastala redčina 10⁻². Postopek smo ponavljali do nastanka redčine 10⁻⁷. Po 100 µL pripravljenih redčin iz epic smo nato s pipeto nanašali na agarjeve plošče v duplikatih. Na gojišče MacConkey smo nanašali neredčeno suspenzijo in redčine v razponu od 10⁻² do 10⁻⁷ (odvisno od meritvene točke). Na gojišče LAMB smo nanašali neredčeno suspenzijo in redčine v razponu od 10⁻¹ do 10⁻⁴ (prav tako odvisno od meritvene točke).

Preglednica 1: Določanje CFU iz fekalne suspenzije v točkah t₀ (fekalna suspenzija), t₁ (dvodnevna gojena črevesna mikrobiota) in t₂ (3-dnevna gojena črevesna mikrobiota z učinkovinami). Znak X označuje redčino, ki smo jo nanegli na ploščo.

Vrsta fekalne mešanice	Redčine	Neredčeno	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
Fekalna suspenzija (točka t ₀)	MacConkey		X	X	X	X			
	LAMB	X	X	X					
2-dnevna gojena črevesna mikrobiota (točka t ₁)	MacConkey			X	X	X	X	X	
	LAMB	X	X	X	X	X			
3-dnevna gojena črevesna mikrobiota z učinkovinami (točka t ₂)	MacConkey			X	X	X	X	X	X
	LAMB	X	X	X	X	X			

Ko smo redčine prenašali iz epic na agarjeve plošče, smo redčine s tem še 10 krat redčili in to upoštevali pri izračunu koncentracije CFU v enem mililitru kulture oziroma gramu fecesa.

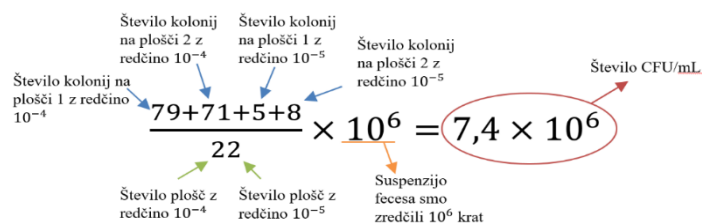
Po nanosu redčine smo plošče postavili v inkubator za 2 (agar MacConkey) oz. 3 (agar LAMB) dni, odvisno od hitrosti rasti bakterij.

3.2.4.4.1 Računanje CFU v 1 mL kulture oziroma v 1 gramu fecesa

Na osnovi prešteti kolonij na ploščah (4.3.1 Preglednica 4) smo izračunali koncentracijo CFU/mL za fekalno suspenzijo in tekočo kulturo gojene črevesne mikrobiote po enačbi 1 in koncentracijo CFU/g fecesa po enačbi 2.

$$\frac{\sum \text{vseh kolonij} \times 10}{N} \times \text{redčina v epici}$$

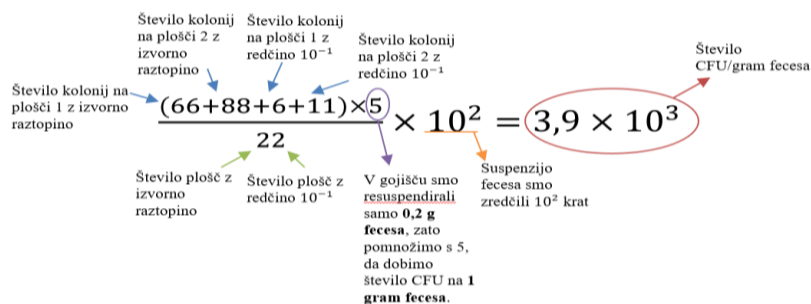
... Enačba 1.



Slika 5: Primer računanja števila CFU/mL na gojišču MacConkey na katere smo nacepili po 100 μ L redčin 10^{-4} in 10^{-5} v duplikatih. Število prešteti kolonij na plošči 10^{-4} : 79 in 71 CFU in na plošči 10^{-5} : 5 in 8 CFU. Pri pomnožku z 10^6 smo upoštevali redčino v epici (10^5 -krat) in redčenje, ki smo ga napravili, ko smo redčino nanesli na ploščo 100 μ L (10-krat)

$$\frac{\sum \text{vseh kolonij} \times 5 \times 10}{N} \times \text{redčina v epici}$$

... Enačba 2.



Slika 6: Primer računanja števila CFU/mL na gojišču LAMB, na katerega smo nacepili po 100 μ L redčin izvorne suspenzije in 10^{-1} v duplikatih. Število prešteti kolonij na plošči z izvorno suspenzijo: 66 in 88 CFU in na plošči 10^{-1} : 6 in 11 CFU. Pri pomnožku z 10^2 smo upoštevali redčino v epici (10-krat) in redčenje, ki smo ga napravili, ko smo redčino nanesli na ploščo 100 μ L (10-krat)

4 REZULTATI

4.1 Primerjava gojišč za laktobacile

Za gojenje laktobacilov smo testirali tri različna gojišča, in sicer MRS, LAMB (brez vankomicina), LAMVAB (1 mg/L; LAMB 1 mg/L vankomicina) in LAMVAB (20 mg/L; LAMB z 20 mg/L vankomicina).

Na gojiščih smo najprej preverili rast dveh vrst laktobacilov: *L.acidophilus* in *L. brevis*. Ugotovili smo, da tako na gojišču MRS kot na gojišču LAMVAB 1 mg/L rasteta obe vrsti laktobacilov, medtem ko *L.acidophilus* na LAMVAB s koncentracijo vankomicina (20 mg/L) ni rastel.

Ker na LAMVAB (z 20 mg/L vankomicina) eden od kontrolnih sevov ni rastel, smo to gojišče odstranili iz nadaljnjih testiranj. Pri teh smo določali ustreznost gojišča za izolacijo laktobacilov iz vzorcev fecesa in dvodnevne gojene črevesne mikrobiote (Slika 7). Število laktobacilov iz fecesa je na gojiščih LAMVAB z 1 mg/L vankomicina in LAMB brez dodanega antibiotika bilo primerljivo v obeh primerih (Preglednica 2). Večina določenih kolonij so bile bakterije vrste *Lactobacillus rhamnosus*, izolirali smo še *L. acidophilus* in *L. paracasei*. Na ploščah LAMB so v velikem številu porasle tudi drobne, zelenkaste kolonije, kasneje določene kot *Enterococcus faecium* (Slika 5).



Slika 5: Rast laktacilov na gojišču LAMB. Kultura na sliki izvira iz dvodnevne gojene črevesne mikrobiote v bujonu WCAB. Kolonije laktobacilov (večina vrste *Lactobacillus rhamnosus*) so sprva bele, potem pričnejo postajati zelene. Na plošči stari 3 dni zato vidimo bele kolonije, bele z zelenim centrom in zelene. Drobne kolonije, ki v ozadju preraščajo ploščo so kolonije *Enterococcus faecium*

Preglednica 2: Število CFU laktobacilov na gojiščih LAMB in LAMVAB (1 mg/L).

Testiran vzorec	Vrsta fecesa	Vrsta gojišča	Število CFU		
			Neredčeno	10 ⁻¹	10 ⁻³
Fekalna suspenzija	Odrasel	LAMB	53, 65	15, 17	/
		LAMVAB (1 mg/L)	66, 88	6, 11	/
	Otrok	LAMB	3, 2	0, 0	/
		LAMVAB (1 mg/L)	3, 3	0, 0	/
Dvodnevna gojena črevesna mikrobiota*	Odrasel	LAMB	>300	>300	165, 145
		LAMVAB (1 mg/L)	>300	>300	171, 146

*v gojeni otroški mikrobioti nismo zaznali nobenih kolonij laktobacilov, /- ni delano.

4.2 Primerjava gojišč za enterobakterije

Za detekcijo enterobakterij smo testirali tri različna gojišča: ENDO, MacConkey ter XLD (Slika 8) pri različnih atmosferskih pogojih (anaerobna atmosfera/na zraku). Pri tem smo uporabili dvodnevno gojeno črevesno mikrobioto. Število CFU na ploščah, ki smo jih inkubirali na zraku in v anaerobnih pogojih, se ni izrazito razlikovalo. Najmanj CFU je v večini poraslo na XLD, rast na MacConkey in ENDO je bila v večini zelo primerljiva (Preglednica 3).

Preglednica 3: Število CFU na gojiščih XLD, MacConkey in ENDO, ki so porasle iz dvodnevne gojene črevesne mikrobiote. Števila so navedena za redčini 10^{-5} in 10^{-6} , ostale so bile v večini neštevne (> 300 CFU).

Vrsta fecesa	Atmosferski pogoji	ENDO		MacConkey		XLD	
		10^{-5}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-6}
Odrasel	Anaerobi	41	/	29	/	8	/
	Aerobni	29	/	34	/	18	/
Otrok	Aerobni	>300	47	>300	47	>300	54

/-ni delano.



Slika 6: Primer rasti gojene črevesne mikrobiote na selektivnih ploščah za po Gramu negativne bacile. Na ploščah lahko razlikujemo med bakterijami, ki fermentirajo laktozo in tistimi, ki je ne. Na ploščah so večinoma porasle *E. coli*, ki fermentirajo sladkorje v gojišču (kovinska barva kolonij na ENDO, roza gojišče okrog kolonij pri MacConkey in rumeno gojišče na XLD)

4.3 Vpliv naravnih učinkovin na črevesno mikrobioto

Pri testiranju smo najprej določili število CFU laktobacilov in enterobakterij v začetnem materialu – fecesu in v tekoči kulturi gojene črevesne mikrobiote.

4.3.1 Število laktobacilov in enterobakterij v fecesu otroka in odraslega človeka

Število laktobacilov in enterobakterij smo določili ob dveh ločenih priložnostih (Poskus 1 in Poskus 2, Preglednica 4). Število CFU se je med testiranjem nekoliko razlikovalo.

V fecesu odraslega človeka smo določili višje število laktobacilov kot pri otroku, medtem ko je bilo v fecesu otroka prisotno višje število enterobakterij kot pri odraslem človeku.

Preglednica 4: Število CFU/g laktobacilov in enterobakterij v fecesu otroka in odraslega človeka.

Skupina bakterij	Število CFU/gram fecesa			
	Poskus 1		Poskus 2	
	Odrasel	Otrok	Odrasel	Otrok
Enterobakterije	$2,0 \times 10^5$	$8,0 \times 10^6$	$1,5 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4$
Laktobacili	$3,5 \times 10^3$	5	$2,8 \times 10^3$	5

4.3.2 Število CFU na izbranih selektivnih ploščah po 48 urah inkubacije fekalne suspenzije v bujonu Wilkins Chalgren

V gojeni črevesni mikrobioti odraslega človeka je bilo, tako kot pri fecesu, prisotno višje število laktobacilov kot pri otroku. V gojeni črevesni mikrobioti v bujonu Wilkins Chalgren smo prav tako določili višje število enterobakterij kot v gojeni mikrobioti odraslega človeka (Preglednica 5).

Preglednica 5: Število CFU/mL laktobacilov in enterobakterij v gojeni črevesni mikrobioti otroka in odraslega človeka.

Skupina bakterij	Število CFU/mL			
	Poskus 1		Poskus 2	
	Odrasel	Otrok	Odrasel	Otrok
Enterobakterije	$9,1 \times 10^7$	$3,2 \times 10^8$	$7,6 \times 10^7$	$3,6 \times 10^8$
Laktobacili	$1,6 \times 10^6$	0	$8,0 \times 10^7$	10

4.3.3 Vplivi izbranih učinkovin na črevesno mikrobioto

4.3.3.1 Vpliv učinkovin na enterobakterije

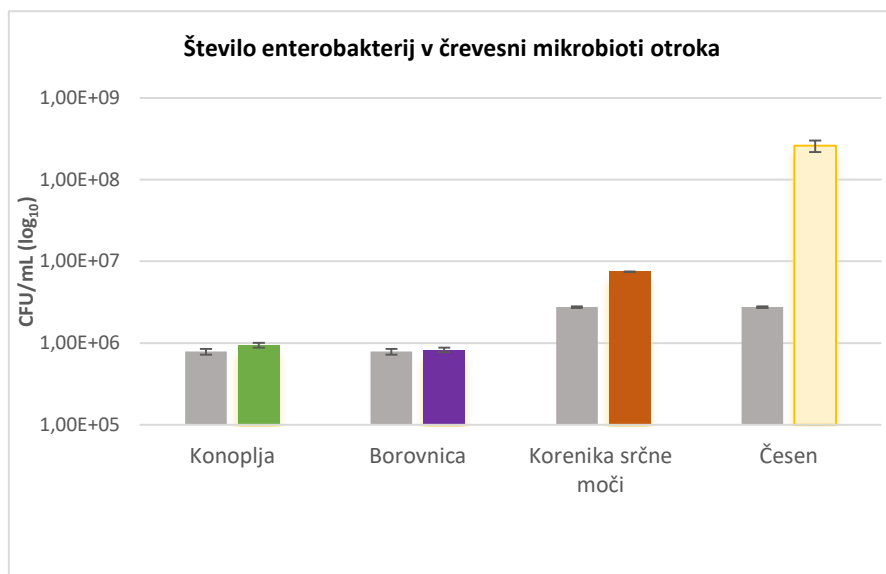
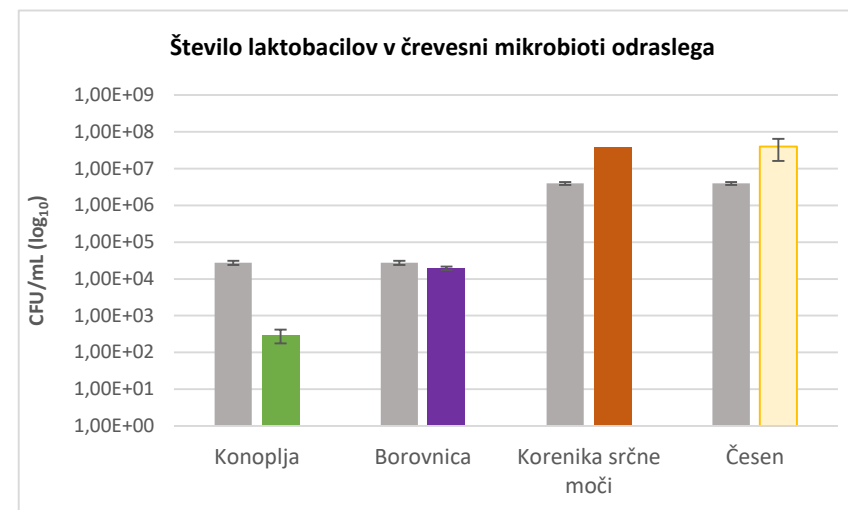
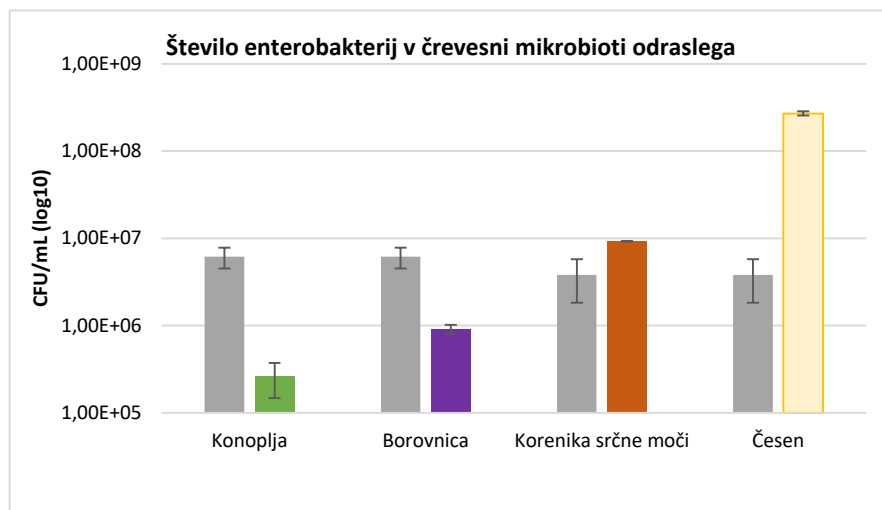
Število CFU enterobakterij v črevesni mikrobioti odraslega človeka, ki smo jih gojili v prisotnosti konopljinega olja je bilo za 23,6 krat nižje kot število CFU enterobakterij v kontroli (gojeni črevesni mikrobioti brez dodane učinkovine) (Slika 7, Priloga 1, Priloga 9). Pri testiranju z borovnicami pa je bilo število CFU v testnem vzorcu od kontrolnega manjše za več kot polovico (0,7 krat) (Slika 7, Priloga 1, Priloga 9). Število enterobakterij se pri poskusu z otroško mikrobioto s tema dvema učinkovinama ni bistveno razlikovalo (Slika 7, Priloga 3, Priloga 10). Ravno nasprotno, se je število enterobakterij v mikrobioti odraslega, ki smo jo

gojili s čajem korenike srčne moči in česnom v primerjavi s kontrolo povečala; pri koreniki srčne moči za 2,5 krat in pri česnu za več kot 100 krat (Slika 7, Priloga 5, Priloga 9). Podoben učinek smo opazili pri testiranju z otroško mikrobioto, kjer se je število CFU enterobakterij pri koreniki srčne moči povečalo za 2,7 krat, pri česnu pa prav tako za več kot 100 krat (Slika 7, Priloga 7, Priloga 10).

4.3.3.2 Vpliv učinkovin na laktobacile

Število CFU laktobacilov se je v gojeni kulturi odraslega človeka v prisotnosti konopljinega olja v primerjavi s kontrolo (brez dodane učinkovine), znižalo za približno 100 krat, medtem ko je pri borovnicah ostalo nespremenjeno (Slika 7, Priloga 2, Priloga 11) . Pri testiranju s koreniko srčne moči in česnom pa se je zvišalo, in sicer za 9,6 krat pri koreniki srčne moči in 10 krat pri česnu (Slika 7, Priloga 6, Priloga 11).

Na ploščah LAMB tako v primeru kontrole (fekalne kulture brez dodane učinkovine) kot v primeru kulture z dodanimi učinkovinami pri otroški mikrobioti ni zrasla nobena kolonija (Prilogi 4 in 8).



Laktobacili v otroški mikrobioti niso porasli.

Legenda:

- Kontrola
- Rast v bujonu z dodatkom konoplje
- Rast v bujonu z dodatkom borovnice
- Rast v bujonu z dodatkom korenike srčne moči
- Rast v bujonu z dodatkom česna

Slika 7: Prikaz vpliva učinkovin na enterobakterije in laktobacile glede na tip fecesa. Oznaka 1,00 E+n pomeni 1 krat 10 na potenco n

5 DISKUSIJA

Primerjava plošč za laktobacile

Na ploščah LAMVAB (1 mg/L) je bila rast laktobacilov primerljiva z rastjo na ploščah LAMB tako v primeru fekalne suspenzije otroka kot v primeru fekalne suspenzije odraslega.

Na ploščah LAMB (brez vankomicina) so nam, kot že omenjeno v literaturi o preizkušanju teh plošč (Hartemenik in Domenech, 1997), porasli enterokoki, vendar na rast laktobacilov niso vidno vplivali, prav tako so se po izgledu in velikosti kolonij ločili od laktobacilov. Laktobacili na ploščah so sprva bili beli, voščene barve in so sčasoma pridobili zeleni center oz. so se po več kot 3 dneh rasti obarvali zeleno, kar je posledica tega, da imajo nekateri laktobacili sposobnost privzemanja barvila bromkrezol zeleno, ki je bilo dodano v gojišče. Sposobnost privzemanja zelenega barvila so imeli tudi enterokoki. Ti so bili pri otroški mikrobioti številčnejši, a laktobacilov v večini primerov pri testiranju z otroško mikrobioto nismo zasledili oz. smo jih v zelo majhnem številu, zato nam enterokoki pri delu niso povzročali težav.

Na koncu smo za glavni poskus (5.3) izbrali plošče LAMB brez vankomicina, ker nam kontrolni sev *L. acidophilus* pri visokih koncentracijah vankomicina ni rasel in ker po predhodnih poročilih nekatere vrste laktobacilov na vankomicin sploh niso odporne. K odločitvi je doprineslo opažanje, da nam na LAMB ploščah ne poraščajo ostale bakterije v takšnem obsegu, da bi motile določanje števila laktobacilov.

Primerjava plošč za enterobakterije

Za detekcijo enterobakterij smo uporabili več plošč (XLD, MacConkey in ENDO), vse pa se v splošnem uporabljajo za izolacijo po Gramu negativnih bacilov ter nam omogočajo razlikovanje med njimi na osnovi metabolizma sladkorjev in detekcijo določenih bakterij (kot npr. *Salmonella* pri XLD agarju). Gojitev enterobakterij smo preizkusili tako pri anaerobnih kot pri aerobnih pogojih in ugotovili, da je rast med ploščami in atmosferskimi pogoji zelo primerljiva. Najmanj CFU nam je poraslo na ploščah XLD pri aerobnih pogojih, medtem ko je rast na ENDO in MacConkey agarju bila skoraj identična, a vendarle za malenkost boljša na ploščah MacConkey, zato smo se pri izvajanju glavnega poskusa (5.3) odločili za te.

Večina CFU na ploščah je predstavljala *E. coli*. Tekom dela so plošče MacConkey občasno porasli tudi enterokoki, z MALDI-TOF določeni kot *Enterococcus hirae*. Ker so ti porasli pri

nizkih redčinah, kjer so enterobakterije bile neštene, nas kolonije enterokokov pri delu niso motile.

Hipoteza 1 – vpliv učinkovin na laktobacile

V prvi hipotezi smo predpostavili, da bo pri nekaterih učinkovinah število bakterij, ki jih povezujemo z uravnoteženo črevesno mikrobioto (laktobacilov), v primerjavi s kontrolo povečano oz. nespremenjeno. O vlogi avtohtonih laktobacilov v črevesni mikrobioti je še veliko neznanega, a v splošnem veljajo za bakterije s pozitivnim učinkom (Tannock in sod., 2000). Ker naravne učinkovine na črevesno mikrobioto delujejo pozitivno in jo uravnovešajo, smo sklepali, da se bo število laktobacilov v njihovi prisotnosti povečalo.

Po predhodnih raziskavah med stalne prebivalce človeške črevesne mikrobiote spada zelo majhen delež laktobacilov. Večina laktobacilov je alohtonih in pridejo v črevesje iz ustne votline ter fermentirane hrane. Najpogosteje zaznane vrste laktobacilov v fecesu človeka so: *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. salivarius*, *L. ruminis*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. delbrueckii*, *L. sakei*, *L. vaginalis* in *L. curvatus* (Tannock in sod., 2000). V večini nam je na ploščah porasel *L. rhamnosus*. Za to vrsto je značilno, da ji ustreza življenje v zelo kislem želodcu. Nekateri sevi te vrste se uporabljajo kot probiotiki (živi mikroorganizmi, ki v zadostnih količinah pozitivno vplivajo na zdravje gostitelja). Vrsta *L. rhamnosus* spada med alohtone (črevesje samo prehaja) (Tannock in sod., 2000). Zanimivo je, da laktobacili niso vedno povezani z zdravim stanjem pri človeku ampak so jih v povečanem številu našli pri nekaterih bolezenskih stanjih kot je okužba CDI (v primeru te okužbe je prisotno povečanje laktobacilov in enterobakterij) (Vincent in Manges, 2015).

V nasprotju s splošnim prepričanjem je laktobacilov v fecesu malo (redko presežejo 10^8 CFU na gram fecesa pri odraslem, pri otroku pa je število še nižje; v nekaterih raziskavah jih sploh niso zaznali). Tako nas neporaslost plošč LAMB pri otroku ni zelo presenetila (Tannock in sod., 2000).

Kot smo omenili že prej, veljajo laktobacili za bakterije s pozitivnim učinkom, zato zmanjšanja števila laktobacilov pri gojenju mikrobiote odraslega s konopljo nismo pričakovali. Iz istega razloga nas je presenetilo nespremenjeno število laktobacilov pri dodatku borovnice, za katere so že pokazali, da vzpodbujajo rast drugih koristnih bakterij,

npr. bifidobakterij (Laparra in Sanz, 2009). Vendar pa industrijska konoplja in borovnice vsebujejo nenasičene maščobne kisline, ki po nekaterih poročilih v visokih koncentracijah zavirajo rast laktobacilov in njihovo pritrjanje na sluznico (Ho, in sod., 2013; Laparra in Sanz, 2009). Ker pričakujemo v konopljinem olju višje koncentracije nenasičenih maščobnih kislin, bi to lahko razložilo zmanjšanje rasti laktobacilov. Pri borovnicah se te nahajajo v semenih, zato se pri čaju najverjetneje ne pojavljajo v zadostnih količinah, da bi imele kakšen negativen vpliv na rast laktobacilov. Vendar pa je potrebno imeti v mislih, da naj bi bila vrsta laktobacila, ki je predstavljal veliko večino CFU na ploščah alohtona bakterija, ki le prehaja skozi črevesje, zato njena vloga v črevesju nima nujno pomembnega pozitivnega vpliva na ohranjanje ali vzpostavljanje ravnovesja v črevesni mikrobioti.

V fekalni kulturi odraslega se je število laktobacilov ob prisotnosti česna povišalo. Povišanje smo pričakovali zaradi podatkov predhodne raziskave, ki omenja, da česen vzpodbuja rast laktobacilov (Filocamo in sod., 2012).

O učinku korenike srčne moči na predstavnike črevesne mikrobiote nismo našli nobenih objavljenih raziskav. Naši rezultati nakazujejo, da na laktobacile deluje vzpodbujevalno, čeprav v manjšem obsegu kot česen.

Učinka naravnih učinkovin na laktobacile otroka ne moremo komentirati, saj ga v poskusu nismo zaznali niti pri kontroli.

Na podlagi dobljenih rezultatov lahko hipotezo 1 delno potrdimo; pri nekaterih testiranih učinkovinah se je število laktobacilov povečalo ali ostalo nespremenjeno.

Hipoteza 2 – vpliv učinkovin na enterobakterije

V hipotezi 2 smo predvidevali, da se bo v primeru dodanih naravnih učinkovin število enterobakterij vsaj v nekaterih fekalnih kulturah zmanjšalo, saj smo povezali podatka, da imajo naravne učinkovine pozitiven vpliv na ravnovesje v črevesni mikrobioti in da enterobakterije pod določenimi pogoji (če njihovo število v črevesni mikrobioti enormno naraste) lahko postanejo škodljive in povzročijo vnetje (Shin in sod., 2012). Tako bi se po našem sklepanju morale število enterobakterij ob dodanih naravnih učinkovinah zmanjšati.

V primeru dodane konoplje v fekalno kulturo odraslega se je število enterobakterij, kot smo pričakovali, zmanjšalo. Študije so pokazale veliko antibakterijsko delovanje konoplje, zaradi vsebnosti kanabinoidov (CBD, CBC, CBG ...), alkaloidov in fenolov. Konoplja zavira

patogene kot je *E. coli*, ki je v naših preiskovanih vzorcih fecesa z veliko večino prevladovala (Khan in sod., 2014).

Pričakovane rezultate smo dobili tudi pri fekalni kulturi odraslega z dodanim čajem iz borovnic, saj se je število enterobakterij v prisotnosti borovnic zmanjšalo, te pa že omenjajo tudi kot zaviralce urinarnih okužb z določenimi enterobakterijami (Ofek in sod. 1996).

Na enterobakterije v črevesni mikrobioti otroka ne konoplja in ne borovnica nista imeli vpliva. Verjetno je to povezano z dejstvom, da se črevesni mikrobioti otroka in odraslega po sestavi razlikujeta. Možna je razlika tudi v sevih znotraj določenih vrst.

Nepričakovano sta korenika srčne moči in česen znatno zvišala število enterobakterij tako pri otroški mikrobioti, kot pri odrasli. Ena predhodnih raziskav že omenja, da česen lahko spreminja sestavo črevesne mikrobiote z zaviranjem nekaterih bakterij in vzpodbujanjem drugih (vključno z laktobacili). Vendar v omenjeni raziskavi niso delali poskusov konkretno na enterobakterijah, ampak na črevesnih izolatih bifidobakterij, klostridijev in laktobacilov. Vpliv česna, skupaj s koreniko srčne moči je po naših podatkih do danes bil še neraziskan. V bodoče bi bilo priporočljivo tovrstne raziskave nadaljevati in pogledati še učinek na drugih fekalnih vzorcih.

Hipotezo 2 lahko na podlagi rezultatov potrdimo, saj so nekatere naravne učinkovine zmanjšale število enterobakterij v črevesni mikrobioti.

Hipoteza 3 – testiranje učinkovin na različnih tipih fecesa

Ker starost vpliva na sestavo črevesne mikrobiote smo predpostavili, da se bodo vplivi učinkovin na otroško in odraslo črevesno mikrobioto nekoliko razlikovali, saj je aktivnost učinkovin lahko odvisna tudi od presnavljanja učinkovin s strani črevesne mikrobiote. Konoplja in borovnica na enterobakterije v fecesu otroka nista imeli vpliva, v mikrobioti odraslega pa smo zaznali znižanje števila enterobakterij. To lahko morda pojasnimo s tem, da kot rečeno presnova učinkovin ni potekala na enak način, ali pa se v mikrobioti otroka ne nahajajo isti sevi, z istimi lastnostmi in dovzetnostjo za učinkovino, kot v mikrobioti odraslega.

Hipotezo 3 lahko na podlagi dobljenih rezultatov potrdimo, saj so se razlike v učinku naravnih učinkovin na laktobacile in enterobakterije pri otroku in pri odraslem v nekaterih primerih pojavile.

Pomen dobljenih rezultatov

Z raziskavo smo s pomočjo znanstvenih metod pokazali, da naravne učinkovine lahko imajo vpliv na določene predstavnike črevesne mikrobiote (laktobacile in enterobakterije) in s tem prispevali k poznavanju vpliva uživanja konoplje, borovnic, česna in korenike srčne moči. S tem smo naredili tudi majhen korak naprej v zdravljenju neravnovesja v črevesni mikrobioti.

Možne izboljšave

Raziskavo bi izboljšali, če bi opravili več ponovitev poskusa z različnimi vzorci fecesa, saj se lahko črevesna mikrobiota med posamezniki zelo razlikuje. Prav tako bi dobili natančnejšo srednjo vrednost, če bi eno redčino nanесли na več plošč, ne pa samo na dve, kot smo naredili v našem primeru. Boljše bi bilo, če poskusa ne razdelili na dva dela (v prvem delu smo preučevali vpliv borovnice in konoplje, v drugem delu poskusa pa vpliv česna in korenike srčne moči). Kontrola bi bila tako v vseh primerih enaka, prav tako fekalna suspenzija, saj se sestava mikrobiote lahko že znotraj enega vzorca nekoliko razlikuje. A da bi bilo to izvedljivo bi bilo potrebno več oseb, ki bi izvajale poskus, saj je čas dela z bakterijami izven optimalnega okolja omejen in bakterije po določenem času lahko začnejo odmirati, kar bi se odražalo v napačnih rezultatih.

Vrednotenje metode dela

Metoda dela je bila za preliminarne raziskave vpliva učinkovin popolnoma primerna. Da smo za izbran način testiranja (klasična mikrobiološka metoda, ki vključuje gojenje) zagotovili ustrezno kvaliteto metode, smo jo najprej optimizirali s preizkušanjem različnih variant (gojišča, atmosferski pogoji, kontrolni sevi). Rezultate bi v primeru nadaljnjega dela lahko potrdili še z molekularnimi metodami (osnovane na DNA/RNA analizi mikrobiote) in v delo vključili analize ostalih bakterij (npr. bifidobakterij) ter vključili poskuse v *in vivo*.

6 ZAKLJUČEK

Namen te raziskave je bil ugotoviti vpliv določenih prehrabnih učinkovin (industrijske konoplje, borovnic, korenike srčne moči in česna) na izbrane predstavnike črevesne mikrobiote: enterobakterije in laktobacile ter analizirati vpliv nanje v črevesni mikrobioti zdravega otroka in v črevesni mikrobioti zdravega odraslega človeka.

Rezultati raziskave so pokazali, da tako korenika srčne moči kot česen vplivata na zvišanje števila enterobakterij in laktobacilov v črevesni mikrobioti (odrasli in otroški). Industrijska konoplja je delovala ravno nasprotno, pri čemer smo določili bistveno znižanje enterobakterij in laktobacilov v mikrobioti odraslega človeka. Borovnica je imela vpliv samo na znižanje števila enterobakterij, medtem ko je število laktobacilov ostalo nespremenjeno. Laktobacilov v otroški mikrobioti nismo zaznali z gojitvenimi metodami, število enterobakterij pa je pri dodatku borovnice in konoplje ostalo nespremenjeno. To kaže na različen vpliv naravnih učinkovin na bakterije v fecesu otroka in na bakterije v fecesu odraslega. Na podlagi dobljenih rezultatov smo lahko potrdili vse naše hipoteze.

Z raziskavo smo s pomočjo znanstvenih metod pokazali, da naravne učinkovine lahko imajo vpliv na določene predstavnike črevesne mikrobiote (laktobacile in enterobakterije) in s tem prispevali k razvoju ukrepanja pri neuravnoveženi v črevesni mikrobioti s pomočjo naravnih učinkovin.

7 DRUŽBENA ODGOVORNOST

Pri izbiri teme raziskovalne naloge in eksperimentalno pridobljenih rezultatih smo upoštevali osnovna načela družbene odgovornosti.

Vsi poskusi so bili izvedeni v *in vitro*, za rezultate pridobljene na ta način pa ni nujno, da so popolnoma primerljivi z dogajanjem v *in vivo*. Možno je, da naravne učinkovine v človeškem črevesju vplivajo nekoliko drugače, kot lahko to ponazorimo v *in vitro*.

Eksperimentalnega dela smo se lotili odgovorno in vse kontaminirane materiale (uporabljene agarjeve plošče, epice, centrifugirke ...) primerno odstranili.

8 VIRI IN LITERATURA

- Anderson, C., 2013. *Great Adventures in the Microbiology Laboratory*. 7. izd. Pearson.
- Ašič, S., 2008. *Domača lekarna patra Simona Ašiča: priročnik za nabiranje zdravih zelišč*. Celje: Celjska Mohorjeva družba.
- Berg, R. D., 1996. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol*, 4, str. 430–435.
- Buffie, C.G., Pamer, E.G., 2013. Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nature Reviews Immunology*, 13, str. 790–801.
- Collen, A., 2016. *10-odstotno človek: vse kar morate vedeti o "svojih" bakterijah, ki jih še kako potrebujete*. Ljubljana: Mladinska knjiga.
- Filocamo, A., Nueno-Palop, C., Bisignano, C., Mandalari, G. in Narbad, A., 2012. Effect of garlic powder on the growth of commensal bacteria from the gastrointestinal tract. *Phytomedicine*. 19(8-9), str. 707–711.
- Finegold, S. M., Sutter, V. in Mathisen, G., 1983. Normal indigenous intestinal flora. V *D. J. Hentges (ed.), Human intestinal microbiota in health and disease*. Academic Press, New York, NY, str. 3–31.
- Fouhy, F., Guinane, C., Hussey, S., Wall, R., Ryand, A., Dempsey, E. in sod., 2012. High-Throughput Sequencing Reveals the Incomplete, Short-Term Recovery of Infant Gut Microbiota following Parenteral Antibiotic Treatment with Ampicillin and Gentamicin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, [elektronski vir] 56(11), str. 5811–5820. Dostopno na: <http://aac.asm.org/content/56/11/5811> [5. 2. 2018].
- Frank, D.N., St Amand, A.L., Feldman, R.A., Boedeker, E.C., Harpaz, N. in Pace, N.R., 2007. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 104(34), str. 13780–13785.
- Guentzel, M., 1996. *Medical Microbiology*. [elektronski vir] 4. izd. Galveston: The University of Texas Medical Branch. Dostopno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8035/> [20. 1. 2018].

- Hartemink, R., Domenech, V.R., Rombouts, F.M., 1997. LAMVAB—A new selective medium for the isolation of lactobacilli from faeces. *Journal of Microbiological Methods*, 29, str. 77–84.
- Hieng, B., 2011. *Konopljino olje in njegovi pozitivni učinki. Bodi eko*. [elektronski vir] Dostopno na: <https://www.bodiekeo.si/konopljino-olje> [12. 1. 2018].
- Ho, C., Mussinan, C., Shahidi, F. in Contis, E., 2013. *Nutrition, Functional and Sensory Properties of Foods*. [elektronski vir] Velika Britanija: CPI Group. Dostopno na: <http://bit.ly/2DacS2h> [13. 1. 2018].
- Jandhyala, S., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H, Sasikala, M., in Reddy, N., 2015. Role of the normal gut microbiota. *World Journal of Gastroenterology*, [elektronski vir] 21(29). Dostop na: <https://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v21/i29/8787.htm> [20. 1. 2018].
- Jiménez, E., Marín, M.L., Martín, R., Odriozola, J.M., Olivares, M., Xaus, J., Fernández, L., Rodríguez, J.M., 2008. Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Res. Microbiol.*, 159(3), str. 187–93.
- Kau, A., Ahern, P., Griffin, N., Goodman, A., Gordon, J., 2011. Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature*, 474, str. 327–336.
- Khan, B., Warner, P. in Wang, H., 2014. Antibacterial Properties of Hemp and Other Natural Fibre Plants: A Review. *BioResources* [elektronski vir] 9(2). Dostopno na: http://ojs.cnr.ncsu.edu/index.php/BioRes/article/view/BioRes_09_2_Khan_Antibacterial_Hemp_Fibre_Review [4. 2. 2018]
- Kocjan, J., 2015. *Selektivnost gojišč za ugotavljanje števila laktobacilov v probiotičnih izdelkih*. Diplomsko delo. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta.
- Kojić, T., 2006. S probiotiki nad alergene. *Viva*, [elektronski vir]. Dostopno na: <http://www.viva.si/Zdrav-na%C4%8Din-prehrane/1491/S-probiotiki-nad-prehranske-alergije> [13. 1. 2018].
- Laparra, J.M., Sanz, Y., 2009. Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. *Elsevier*, 61, str. 219–223.
- Ley, R. E., Lozupone, C. A., Hamady, M., Knight, R. in Gordon, J. I., 2008. Gordon Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.*, 6, str. 776–788.

- Marx, T., 2015. *Immunoprotective Effects of Probiotics in the Elderly; Foods and Dietary Supplements in the Prevention and Treatment of Disease in Older Adults*. [elektronski vir]. Academic Press. Dostopno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012418680400035X> [3. 2. 2018].
- Nye, K. J., Fallon, D., Frodsham, D. in sod., 2002. An evaluation of the performance of XLD, DCA, MLCB, and ABC agars as direct plating media for the isolation of *Salmonella enterica* from faeces. *J. Clin. Pathol.* 55(4), str. 286–8.
- Ofek I., Goldhar J., Sharon N., 1996. Anti-*Escherichia Coli* Adhesin Activity of Cranberry and Blueberry Juices. *Toward Anti-Adhesion Therapy for Microbial Diseases. Advances in Experimental Medicine and Biology*, 408.
- Oxoid, 2007. *Thermo Scientific: Oxoid Microbiology Products*. [elektronski vir] Dostopno na: <http://www.oxoid.com/UK/blue/index.asp?c=UK&lang=EN> [13. 1. 2018].
- Palmer, C., Bik, E., DiGiulio, D., Relman, D., Brown, P., 2007. *Plos Biology: Development of the Human Infant Intestinal Microbiota*. [elektronski vir]. Dostop na: <http://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.0050177> [5. 2. 2018].
- Qin, J., Li, Y., Cai, Z., Li, S., Zhu, J., Zhang, F. in sod., 2012. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*, 490(7418) str. 55–60.
- Robertson, R., 2016. *Health line: 10 Ways to Improve Your Gut Bacteria, Based on Science*. [elektronski vir] Dostopno na: <https://www.healthline.com/nutrition/improve-gut-bacteria> [13. 1. 2018].
- Shin, N., Whon, T., Bae, J., 2015. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota, *Trends in Biotechnology*, 33 (9), str., 496–503.
- Singh, R., Chang, H., Yan, D., Lee, K., Ucmak, D., Wong in sod., 2017. Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *Journal of Translational Medicine*, [elektronski vir] 15(73). Dostop na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5385025/> [14. 1. 2018].
- Sokol, H. in Seksik, P., 2010. The intestinal microbiota in inflammatory bowel diseases: time to connect with the host. *Curr Opin Gastroenterol*, 26, str. 327–331.
- Tannock, G. W., Munro, K., Harmsen, H. J., Welling, G.W., Smart, J., in Gopal, K. P., 2000. Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, str. 2578–2588.

- Vincent, C. in Manges, A., 2015. Antimicrobial Use, Human Gut Microbiota and *Clostridium difficile* Colonization and Infection. *Antibiotics* [elektronski vir] 4(3), str. 230–253. Dostopno na: <http://www.mdpi.com/2079-6382/4/3/230> [4. 2. 2018].
- Walter, J., 2008. Ecological Role of Lactobacilli in the Gastrointestinal Tract: Implications for Fundamental and Biomedical Research. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(16), str. 4985–4996.
- Zhang, H., DiBaise, J. K., Zuccolo, A., Kudrna, D., Braidotti, M., Yu, Y. in sod., 2009. Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, str. 2365–2370.
- Žalig, S., Rupnik, M., 2014. *Clostridium difficile* infection and gut microbiota. V *Seminars in Colon and Rectal Surgery* [elektronski vir] 25(3), str. 124–127. Dostopno na: <http://www.sciencedirect.com/journal/seminars-in-colon-and-rectal-surgery> [12. 1. 2018].

9 PRILOGE

Priloga 1: Število enot, ki so tvorile kolonije (CFU) na selektivnem gojišču **MacConkey** iz fekalne kulture **odraslega človeka**, ki smo jo namnožili v prisotnosti konopljinega olja in borovničevega čaja.

	Redčina	Število CFU								Število CFU/mL
		Neredčeno	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	
Pozitivna kontrola	kontrola 1	/	/	>300 CFU	>300 CFU	55, 41	6, 8	Ni rasti	0, 0	5,0×10 ⁶
	kontrola 2	/	/	>300 CFU	>300 CFU	70, 68	10, 13	0, 1	0, 0	7,3×10 ⁶
Rast v bujonu z dodatkom konopljinega olja	konoplja 1	/	/	179, 193	17, 14	1, 1	0, 1	0, 0	0, 0	1,8×10 ⁵
	konoplja 2	/	/	315, 355	29, 45	3, 4	0, 0	0, 0	0, 0	3,4×10 ⁵
Rast v bujonu z dodatkom borovničevega čaja	borovničev čaj 1	/	/	>300 CFU	116, 66	3, 13	0, 1	0, 1	0, 0	9,0×10 ⁵
	borovničev čaj 2	/	/	>300 CFU	99, 95	2, 6	0, 0	2, 0	0, 0	9,2×10 ⁵

/-določena redčina ni cepljena na ploščo

Tabela vsebuje rezultate dveh ponovitev posameznega vzorca in pozitivne kontrole v enem neodvisnem poskusu. Negativne kontrole vseh vzorcev na ploščah niso podale nobene rasti.

Priloga 2: Število enot laktobacilov, ki so tvorile kolonije (CFU) na selektivnem gojišču **LAMB** iz fekalne kulture **odraslega človeka**, ki smo jo namnožili v prisotnosti konopljinega olja in borovničevega čaja.

	Redčina	Število CFU					Število CFU/mL
		Neredčeno	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	
Pozitivna kontrola	kontrola 1	>300 CFU	227, 252	31, 31	3, 6	0, 0	2,5×10 ⁴
	kontrola 2	>300 CFU	275, 352	31, 36	13, 2	5, 2	3,0×10 ⁴
Rast v bujonu z dodatkom konopljinega olja	Konoplja1	20, 22	2, 0	0, 0	0, 0	0, 0	2,1×10 ²
	konoplja 2	40, 31	9, 3	0, 0	0, 0	0, 0	3,8×10 ²
Rast v bujonu z dodatkom borovničevega čaja	borovničev čaj 1	>300 CFU	173, 237	15, 32	2, 5	1, 3	2,1×10 ⁴
	borovničev čaj 2	>300 CFU	168, 177	32, 15	2, 5	3, 1	1,8×10 ⁴

Tabela vsebuje rezultate dveh ponovitev posameznega vzorca in pozitivne kontrole v enem neodvisnem poskusu. Negativne kontrole vseh vzorcev na ploščah niso podale nobene rasti.

Priloga 3: Število enot, ki so tvorile kolonije (CFU) na selektivnem gojišču **MacConkey** iz fekalne kulture **otroka**, ki smo jo namnožili v prisotnosti konopljinega olja in borovničevega čaja.

	Redčina	Število CFU								Število CFU/mL
		Neredčeno	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	10 ⁻⁷	
Pozitivna kontrola	kontrola 1	/	/	>300 CFU	69, 85	3, 6	1, 1	0, 0	0, 0	7,4×10 ⁵
	kontrola 2	/	/	>300 CFU	80, 87	8, 7	0, 1	0, 0	0, 0	8,3×10 ⁵
Rast v bujonu z dodatkom konopljinega olja	Konoplja1	/	/	>300 CFU	82, 111	10, 14	1, 2	0, 0	0, 0	9,9×10 ⁵
	konoplja 2	/	/	>300 CFU	90, 88	8, 11	0, 2	0, 1	0, 0	9,0×10 ⁵
Rast v bujonu z dodatkom borovničevega čaja	borovničev čaj 1	/	/	>300 CFU	81, 89	12, 7	1, 0	0, 0	0, 0	8,6×10 ⁵
	borovničev čaj 2	/	/	>300 CFU	80, 78	2, 13	1, 0	0, 0	0, 0	7,9×10 ⁵

/-določena redčina ni cepljena na ploščo

Tabela vsebuje rezultate dveh ponovitev posameznega vzorca in pozitivne kontrole v enem neodvisnem poskusu. Negativne kontrole vseh vzorcev na ploščah niso podale nobene rasti.

Priloga 4: Število enot laktobacilov, ki so tvorile kolonije (CFU) na selektivnem gojišču **LAMB** iz fekalne kulture **otroka**, ki smo jo namnožili v prisotnosti konopljinega olja in borovničevega čaja.

	Redčina	Število CFU					Število CFU/mL
		Neredčeno	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	
Pozitivna kontrola	kontrola 1	0, 0	0, 0	0, 0	0, 0	0, 0	0
	kontrola 2	0, 0	0, 0	0, 0	0, 0	0, 0	0
Rast v bujonu z dodatkom konopljinega olja	Konoplja1	0, 0	0, 0	0, 0	0, 0	0, 0	0
	konoplja 2	0, 0	0, 0	0, 0	0, 0	0, 0	0
Rast v bujonu z dodatkom borovničevega čaja	borovničev čaj 1	0, 0	0, 0	0, 0	0, 0	0, 0	0
	borovničev čaj 2	0, 0	0, 0	0, 0	0, 0	0, 0	0

Tabela vsebuje rezultate dveh ponovitev posameznega vzorca in pozitivne kontrole v enem neodvisnem poskusu. Negativne kontrole vseh vzorcev na ploščah niso podale nobene rasti.

Priloga 5: Število enot, ki so tvorile kolonije (CFU) na selektivnem gojišču **MacConkey** iz fekalne kulture **odraslega človeka**, ki smo jo namnožili v prisotnosti čaja korenike srčne moči in česna.

	Redčina	Število CFU								Število CFU/mL
		Neredčeno	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	
Pozitivna kontrola	kontrola 1	/	/	>300 CFU	199, 175	22, 26	1, 4	1, 0	0, 0	2,4×10 ⁶
	kontrola 2	/	/	>300 CFU	>300 CFU	49, 57	0, 9	0, 0	0, 0	5,2×10 ⁶
Rast v bujonu z dodatkom čaja korenike srčne moči	korenika srčne moči 1	/	/	>300 CFU	>300 CFU	93, 78	16, 8	3, 0	0, 0	8,9×10 ⁵
	korenika srčne moči 2	/	/	>300 CFU	>300 CFU	73, 64	7, 5	1, 3	0, 0	9,6×10 ⁵
Rast v bujonu z dodatkom česna	česen 1	/	/	>300 CFU	>300 CFU	>300 CFU	259, 273	21, 24	0, 4	2,6×10 ⁸
	česen 2	/	/	>300 CFU	>300 CFU	>300 CFU	274, 278	34, 30	3, 5	2,8×10 ⁸

/-določena redčina ni cepljena na ploščo

Tabela vsebuje rezultate dveh ponovitev posameznega vzorca in pozitivne kontrole v enem neodvisnem poskusu. Negativne kontrole vseh vzorcev na ploščah niso podale nobene rasti.

Priloga 6: Število enot laktobaciov, ki so tvorile kolonije (CFU) na selektivnem gojišču **LAMB** iz fekalne kulture **odraslega človeka**, ki smo jo namnožili v prisotnosti čaja korenike srčne moči in česna.

	Redčina	Število CFU					Število CFU/mL
		Neredčeno	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	
Pozitivna kontrola	kontrola 1	>300 CFU	>300 CFU	>300 CFU	>300 CFU	38, 46	4,2×10 ⁶
	kontrola 2	>300 CFU	>300 CFU	>300 CFU	>300 CFU	50, 24	3,7×10 ⁶
Rast v bujonu z dodatkom čaja korenike srčne moči	korenika srčne moči 1	>300 CFU	>300 CFU	>300 CFU	>300 CFU	>300 CFU	>300
	korenika srčne moči 2	>300 CFU	>300 CFU	>300 CFU	>300 CFU	378, 380	3,8×10 ⁷
Rast v bujonu z dodatkom česna	česen 1	>300 CFU	>300 CFU	>300 CFU	>300 CFU	543, 587	5,7×10 ⁷
	česen 2	>300 CFU	>300 CFU	>300 CFU	>300 CFU	224, 237	2,3×10 ⁷

Tabela vsebuje rezultate dveh ponovitev posameznega vzorca in pozitivne kontrole v enem neodvisnem poskusu. Negativne kontrole vseh vzorcev na ploščah niso podale nobene rasti.

Priloga 7: Število enot, ki so tvorile kolonije (CFU) na selektivnem gojišču **MacConkey** iz fekalne kulture **otroka**, ki smo jo namnožili v prisotnosti čaja korenike srčne moči in česna.

	Redčina	Število CFU								Število CFU/mL
		Neredčeno	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	10 ⁻⁷	
Pozitivna kontrola	kontrola 1	/	/	>300 CFU	283, 273	26, 31	4, 3	0,0	0,0	2,8×10 ⁶
	kontrola 2	/	/	>300 CFU	278, 246	31, 30	Ni rasti	0, 1	0,0	2,7×10 ⁶
Rast v bujonu z dodatkom čaja korenike srčne moči	korenika srčne moči 1	/	/	>300 CFU	>300 CFU	72, 78	10, 5	0, 1	0,0	7,5×10 ⁶
	korenika srčne moči 2	/	/	>300 CFU	>300 CFU	79, 71	5, 8	0, 2	0,0	7,4×10 ⁶
Rast v bujonu z dodatkom česna	česen 1	/	/	>300 CFU	>300 CFU	>300 CFU	218, 239	24, 16	6, 5	2,3×10 ⁸
	česen 2	/	/	>300 CFU	>300 CFU	>300 CFU	258, 310	34, 27	3, 5	2,9×10 ⁸

/-določena redčina ni cepljena na ploščo

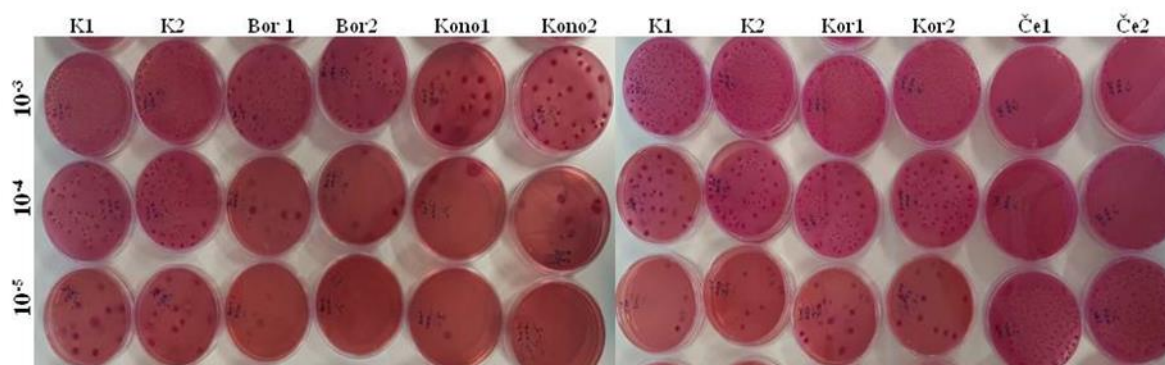
Tabela vsebuje rezultate dveh ponovitev posameznega vzorca in pozitivne kontrole v enem neodvisnem poskusu. Negativne kontrole vseh vzorcev na ploščah niso podale nobene rasti.

Priloga 8: Število enot laktobacilov, ki so tvorile kolonije (CFU) na selektivnem gojišču **LAMB** iz fekalne kulture **otroka**, ki smo jo namnožili v prisotnosti čaja korenike srčne moči in česna.

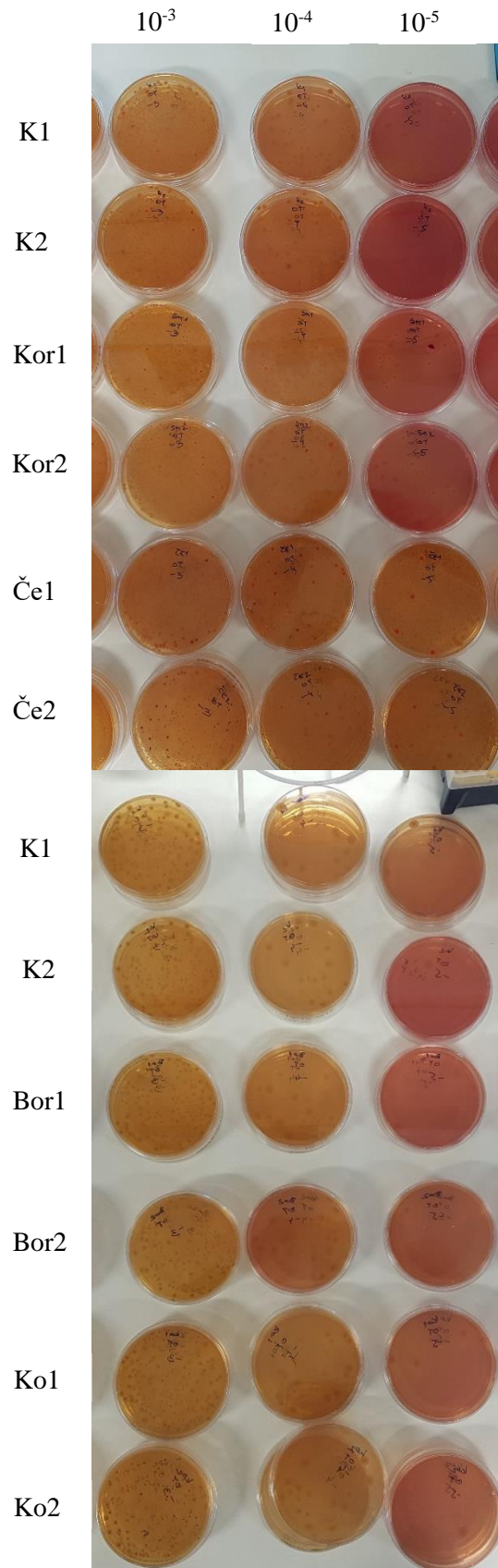
	Redčina	Število CFU				Število CFU/mL
		Neredčeno	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	
Pozitivna kontrola	kontrola 1	0, 0	0, 0	0, 0	0, 0	0
	kontrola 2	0, 0	0, 0	0, 0	0, 0	0
Rast v bujonu z dodatkom čaja korenike srčne moči	korenika srčne moči 1	0, 0	0, 0	0, 0	0, 0	0
	korenika srčne moči 2	0, 0	0, 0	0, 0	0, 0	0
Rast v bujonu z dodatkom česna	česen 1	0, 0	0, 0	0, 0	0, 0	0
	česen 2	0, 0	0, 0	0, 0	0, 0	0

Tabela vsebuje rezultate dveh ponovitev posameznega vzorca in pozitivne kontrole v enem neodvisnem poskusu. Negativne kontrole vseh vzorcev na ploščah niso podale nobene rasti.

Priloga 9: Kolonije na MacConkey agarju, ki so porasle iz gojene črevesne mikrobiote odraslega v prisotnosti učinkovin in njihove kontrole. K-kontrola, Bor-borovnica, Kono-industrijska konoplja, Kor-korenika srčne moči, Če-česen. Vse so bile narejene v duplikatih (1, 2)



Priloga 10: Kolonije na MacConkey agarju, ki so porasle iz gojene črevesne mikrobiote otroka v prisotnosti učinkovin ter njihove njihove kontrole. K-kontrola, Bor-borovnica, Kono-industrijska konoplja, Kor-korenika srčne moči, Če-česen. Vsi so bili narejeni v duplikatih (1, 2)



Priloga 11: Kolonije na LAMB agarju, ki so porasle iz gojene črevesne mikrobiote odraslega v prisotnosti učinkovin ter njihove kontrole. K-kontrola, Bor-borovnica, Kono-industrijska konoplja, Kor-korenika srčne moči, Če-česen. Vse so bile narejene v duplikatih (1, 2)

