

56. srečanje mladih raziskovalcev Slovenije 2022

# Vrstna pestrost ocetnokislinskih bakterij v kombuči

Raziskovalno področje: BIOLOGIJA SŠ

Raziskovalna naloga

**Avtorji:** Zoja Gobec, Ema Švarc

**Mentorji:** Jure Škraban, Janja Trček, Tadeja Vajdič

**Šola:** II. Gimnazija Maribor

**Maribor, 2022**

## Povzetek

S to raziskovalno nalogo smo želeli raziskati pestrost ocetnokislinskih bakterij (OKB) v kombuči. Na podlagi že opravljenih raziskav je pestrost mikroorganizmov v tej pijači velika, zato smo pričakovali veliko vrstno pestrost OKB. V kombučarni BeLife v Kamniku smo pridobili vzorec kombuče, ki smo ga cepili na gojišči RAE in MYP in precepljali do pridobitve čistih kultur. Izbrane izolante smo nato identificirali z barvanjem po gramu in analizo medgenske regije 16S-23S rDNA za OKB in regije ITS1-5.8S rDNA-ITS2 za kvasovke. Po identifikaciji nismo našli še neopisane vrste, a smo vseeno potrdili, da so v kombuči raznoliki mikroorganizmi, tako kvasovke kot tudi ocetnokislinske bakterije. Pri raziskovalni nalogi smo uporabili preverjene in zanesljive znanstvene metode za identifikacijo sevov. Za natančnejšo določitev pripadnostim vrstam bi lahko uporabili tudi dražje metode določevanja vrst in bi lahko v prihodnje naše izolante podrobneje ločili med posameznimi vrstami, kot smo jih identificirali tekom te raziskave.

**Ključne besede:** ocetnokislinske bakterije, kvasovke, kombuča, fermentacija, sekvenciranje, filogenetsko drevo.

**Abstract:** The goal of this research paper was to investigate the diversity of acetic acid bacteria (AAB) in kombucha. According to the already done research, it appears that there is a high variety of microorganisms found in kombucha hence we expected to find large AAB species diversity during our exploration. Firstly, we acquired kombucha samples from a local brewery BeLife, located in Kamnik. We took the samples and began the fission process with transferring the samples onto the two different growth mediums; RAE and MYP. We continued until pure cultures were reached. We have later chosen 6 cultures and identified them by using the method of gram staining and the analysis of the intergenic regions 16S–23S rDNA for AAB and ITS1–5.8 rDNA–ITS2 for yeast species. We also made a phylogenetic tree. We have not found a yet unknown species, however we still confirmed the knowledge of different microorganisms like acetic acid bacteria as well as fungi being present in kombucha. During our research we have used accurate and reliable methods for strain identification. Nevertheless, the usage of more expensive methods and equipment in the future would result in a better identification of our isolates.

**Keywords:** kombucha, acetic acid bacteria, yeast, fermentation, sequencing, phylogenetic tree.

## **Zahvala**

Vsem trem mentorjem se zahvaljujeva za ves vložen trud in vodenje pri raziskovanju ter pisanju te raziskovalne naloge. Brez vašega mentorstva nama ne bi uspelo.

Prav tako se zahvaljujeva Fakulteti za naravoslovje in matematiko Univerze v Mariboru, ki nama je nudila prostore za raziskovanje, kot tudi aparature, sofinancirane v okviru projekta Razvoj raziskovalne infrastrukture za mednarodno konkurenčnost slovenskega RRI prostora RI-SI-LIFEWATCH.

Vsem še enkrat hvala.

# Kazalo

Povzetek .....	2
Zahvala.....	3
1. Uvod.....	7
2. Teoretično ozadje .....	8
2.1 Producija kombuče in njen vpliv na zdravje .....	8
2.2 Pomen ocetnokislinskih bakterij in drugih mikroorganizmov v kombuči.....	9
2.3 Identifikacija ocetnokislinskih bakterij .....	10
2.3.1 Morfološke in biokemijske značilnosti ocetnokislinskih bakterij .....	11
2.3.2 Genotipske značilnosti ocetnokislinskih bakterij .....	11
2.4 Zanimive lastnosti ocetnokislinskih bakterij .....	12
2.4.1 Oksidacija substratov .....	12
2.4.2 Tvorba polisaharidov.....	12
3. Raziskovalno vprašanje.....	14
4. Materiali in metode .....	14
4.1 Seznam uporabljenih materialov, aparatur in kemikalij .....	14
4.2 Vzorčenje fermentacijske brozge v kombučarni ter prenos vzorcev na mikrobiološka gojišča..	18
4.2.1 Izbor posameznih kolonij za nacepitev do čiste kulture ter shranjevanje izolatov.....	20
4.3 Identifikacija izolatov .....	22
4.3.1 Morfološke lastnosti izolatov - priprava mikroskopskih preparatov za barvanje po Gramu	22
4.3.2 Preverjanje rasti v stacionarnem gojišču ter fenotipska določitev produkcije biofilma .....	23
4.3.3 Genotipska identifikacija izolatov.....	23
4.4 Izdelava filogenetskega drevesa .....	27
5. Rezultati .....	28
5.1 Pridobitev izolatov in osnovne filogenetske značilnosti .....	28
5.2 Rezultati pomnoževanja z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) značilnih regij za določevanje vrst .....	40
5.3 Ocenitev koncentracije očiščenega pomnožka s spektrofotometrom.....	41

5.4 Rezultati sekvenciranja za genetsko identifikacijo izolatov.....	41
5.5 Podobnost opisanih bakterijskih vrst oziroma sevov z izolati te raziskave.....	42
5.6 Filogenetsko drevo .....	43
6. Razprava in zaključki .....	43
7. Viri in literatura.....	49

Tabela 1: Sestavine za reakcijsko mešanico.....	24
Tabela 2: Seznam uporabljenih začetnih oligonukleotidov za identifikacijo izolatov. ....	25
Tabela 3: Primerjava začetne in končne cepitve izoliranih kolonij na gojišču RAE 0,5.....	28
Tabela 4: Opis rasti in morfologije kolonij izolatov kombuče, pridobljenih na gojiščih RAE z dodatkom 0,5 % etanola in 0,5% ocetne kisline.....	30
Tabela 5: Opis rasti čistih kultur izolatov ZE1016, ZE2036, ZE3036, ZE4046, ZE5046, ZE6055, ZE7056 po stacionarnem gojenju v tekočem gojišču RAE z dodatkom 0,5 % etanola in 0,5 % ocetne kisline .....	31
Tabela 6: Primerjava začetne in končne plošče izoliranih kolonij na gojišču MYP, X označuje izolate, ki smo pridobili, a smo jih avtoklavirali preden bi jih uspeli fotografirati.....	33
Tabela 7: Opis rasti čistih kultur izolatov ZE9046, ZE10044, ZE11044, ZE12046, ZE13056, ZE14056 po stacionarnem gojenju v tekočem gojišču MYP.....	36
Tabela 8: Opis rasti in morfologije kolonij izolatov kombuče, pridobljenih na gojiščih MYP. ....	38
Tabela 9: Oznaka nanesenih vzorcev na elektroforezni gel. Oznaka M predstavlja standardno DNA lestvico (za določitev velikosti pomnožkov), preostale oznake predstavljajo PCR-pomnožke. ....	40
Tabela 10: Koncentracije PCR-pomnožkov značilnih regij izbranih sevov, ki smo jih izolirali iz kombuče. ....	41
Tabela 11: Rezultati določitev vrste po uporabi programa BLAST na podlagi rezultatov, ki smo jih dobili za PCR-pomnožke značilnih regij za določitev vrst sekvencirane po Sanger tehnologiji. ....	41
Tabela 12: Odstotki podobnosti medgenske regije 16S-23S že popisanih vrst bakterij v literaturi v primerjavi s sekvenciranimi zaporedji izolatov, ki spadajo med ocetnokislinske bakterije. Vsi rezultati so podani v odstotkih (%). Oznaka D predstavlja dolžino prileganja v odstotkih (angl.=query cover). Oznaka P predstavlja odstotek podobnosti (angl. percent identity). ....	42

Slika 1: SCOPY v čajni osnovi (Uffindell, 2022).....	9
Slika 2: Priprava gojišč (lastni vir).....	17
Slika 3: Kombučarna BeLife, Kamnik. Fermentacijska soba, kjer se nahaja 10 sodov s kombučo. Na sliki so 4 sodi, kot poteka fermentacija ter sod št. 4, ki je pripravljen na vzorčenje (odstranjenja prevleka, ki ščiti pred kontaminacijo insektov). .....	19
Slika 4: Priprava redčin vzorcev v mikrocentrifugirki ob gorilniku (aseptično delo). Na sliki so tudi prikazane petrijevke s pripravljenimi gojišči (RAE 0,5 in MYP) za nacepitev vzorca oz. redčin vzorca. ....	19
Slika 5: Izbor posameznih kolonij za nadaljnjo osamitev do čiste kulture. Slike prikazujejo, na katerih ploščah smo izbrali posamezne kolonije (obkrožene).....	20
Slika 6: Cepljenje do posameznih kolonij s sterilno mikrobiološko zanko v štirih korakih ob upoštevanju aseptičnega dela.....	21
Slika 7: Prikaz cepljenja do posameznih kolonij ter nadaljnji izbor kolonije za pridobitev čiste kulture .....	21
Slika 8: Namizna centrifuga, ki smo jo uporabljali pri laboratorijskem delu.....	24
Slika 9: Prikaz preparata izolata ZE3036, barvanega po Gramu, pod svetlobnim mikroskopom (1000x povečava). .....	39
Slika 10: Vizualizacija rezultatov PCR-pomnožkov značilnih regij za določevanje vrste. ....	40
Slika 11: Filogenetsko drevo izolatov OKB iz kombuče v primerjavi z najsorodnejšimi opisanimi bakterijskimi vrstami. Za sestavo drevesa je bil uporabljen program za risanje filogenetskih dravov MEGAX (algoritem UPGMA). Enote na osi predstavljajo število substitucij v nukleotidnem zaporedju na določenem odseku sekvene.....	43
Slika 12: <i>Pichia membranifaciens</i> (Kurtzman, 2011).....	46
Slika 13: <i>Acetobacter lovaniensis</i> (König, Unden, Fröhlich, 2009).....	47

## **1. Uvod**

Ena od že dolgo znanih pijač, ki je komaj pred kratkim začela pridobivati na svoji popularnosti, je fermentiran čaj, poznan tudi pod imenom kombuča. Vedno bolj prepoznavna pa ni le zaradi svojega dobrega okusa ampak tudi zaradi vseh zdravilnih lastnosti, za katere je v veliki meri odgovorna pestra kultura mikroorganizmov, ki jih pijača vsebuje. Probiotska vrednost kombuče je približno 10 milijard mikroorganizmov na gram vzorca. Glede na že opravljene raziskave (Marsh in sod., 2014) so v kombuči prisotne kvasovke in bakterije. Slednjih je največ iz skupin mlečno kislinskih ter ocetnokislinskih bakterij, ki so v vzorcih kombuče najštevilčnejše in so tako postale predmet našega raziskovanja. Zaradi naraščaja popularnosti te pijače se je tudi v Sloveniji v zadnjih letih odprlo nekaj kombučarn, med drugim tudi prvo slovensko podjetje, ki se ukvarja s proizvodnjo kombuče – BeLife iz Kamnika.

Namen te raziskovalne naloge je preučiti vrstno pestrost ocetnokislinskih bakterij v kombuči podjetja BeLife. Zato smo se odločili, da bomo s pomočjo metod PCR in DNA sekvenciranja analizirali medgensko regijo 16S-23S rDNA. Gre za ITS regijo, ki se pogosto uporablja v taksonomiji za vrstno identifikacijo, zaradi mnogih prednosti, kot je na primer enostavno zaznavanje tudi iz manjših količin DNA in visoke variacije tudi med tesno sorodnimi vrstami (Baldwin in sod., 2010). Glede na opravljene dosedanje raziskave in opisano pestrost mikroorganizmov v kombuči (Marsh in sod., 2014) pričakujemo, da bomo v kombuči našli in identificirali več različnih vrst ocetnokislinskih bakterij, morda celo kakšno še nepopisano vrsto. Vedenje o vrstni pestrosti ocetnokislinskih bakterij bo zanimivo tudi za kombučarno, saj bodo lahko to v prihodnosti izkoristili za izboljšanje nadzora nad procesom fermentacije, saj so prav ocetnokislinske bakterije ene od ključnih faktorjev, ki vplivajo na aroma in okus kombuče.

## 2. Teoretično ozadje

### 2.1 Producija kombuče in njen vpliv na zdravje

Kombuča je fermentirana, rahlo šumeča, slatkana pijača črnega ali zelenega čaja, ki se običajno uživa zaradi svojih domnevnih zdravstvenih koristi. Ta tradicionalna azijska pijača se pripravlja v odprtih posodi pri sobni temperaturi. Osnovni postopek priprave kombuče se prične s pripravo čaja, ki mu dodajo saharozo. Sladkan čaj se ohladi na sobno temperaturo, ki mu dodajo pelikel oziroma kombuča kulturo (iz bakterij in gliv) ter od 10 do 20 % tekočine iz predhodne fermentacije (Arendt in sod., 2019).

Osnovi sestavini, slatkemu čaju, se doda t. i. SCOPY (angl. »Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast« oziroma simbiotska kultura bakterij in kvasovk). Da bi zagotovili uspešno fermentacijo, je treba čajno osnovo prilagoditi tako, da se ustvari za simbiontsko kulturo primerno okolje z optimalno pH-vrednostjo in temperaturo. Mikroorganizmi SCOPY so acidofili, kar pomeni, da ti mikroorganizmi uspevajo v kislem okolju. Razen zeliščnih čajev imajo čaji, ki se uporabljajo za kombučo, na splošno nizko pH-vrednost v razponu od 2,9 do 6,3 (Singh, Jindal, 2013). Po dodatku SCOPY čajni osnovi, le-to pustimo na sobni temperaturi od sedem do deset dni. V tem času poteka prva fermentacija, kjer mora biti kisik prisoten v izobilju, saj so za fermentacijo odgovorni mikroorganizmi, ki so obligatni aerobi in za svojo rast kisik nujno potrebujete. Daljše kot je obdobje prve fermentacije, bolj je končen produkt kisel in nižja je vsebnost sladkorja. Primarni metaboliti fermentacije kombuče so tako sladkorji in organske kisline (Arendt in sod., 2019).

Kvasovke v tem času pretvorijo sladkor v organske kisline, etanol in ogljikov dioksid. Saharozo pretvorijo v glukozo in fruktozo ter producira etanol. Ocetnokislinske bakterije nato pretvorijo etanol v ocetno kislino, ki daje kombuči kiselkast okus. D-glukozo pretvorijo v glukonsko kislino in bakterijsko celulozo (Borges in sod., 2018). Pijača pripravljena za uživanje ima pH-vrednost okoli 2,6. Fermentacijo ustavijo ali upočasnijo, sicer koncentracija ocetne in/ali glukonske kisline naraste do vrednosti, ko pijača zaradi močno kislega okusa ni več primerna za uživanje (Ercolini in sod., 2018). Običajno kombuča gobo, kot tudi imenujejo SCOPY, ob koncu prve fermentacije odstranijo iz tekočine. V kombuči so še vedno prisotni mikroorganizmi, potrebni za potek druge fermentacije, ki pa poteka v zaprtem sistemu. V času druge stopnje fermentacije acidofilne kvasovke proizvajajo CO<sub>2</sub> in s tem se kombuča gazira. Za večjo pestrost okusov se k čaju ali v času druge fermentacije pogosto dodajajo različni

sokovi, začimbe, sadje ali druge arome. Mikroorganizmi še naprej presnavljajo preostali sladkor in tako proizvajajo ob CO<sub>2</sub> še mlečno in ocetno kislino ter etanol. Kombuča tako postane manj sladka, z bolj ostrim okusom (Phung, 2019).

Zaradi kiselkastega okusa in rahle gaziranosti je kombuča zelo pitna, ob tem pa naj bi imela številne pozitivne učinke na naše zdravje in počutje. Vzrok za slednje je vsebnost probiotičnih bakterij, ki v našem prebavnem traktu preprečujejo namnoževanje drugih, tudi patogenih, bakterij. Hkrati pa mikroorganizmi v kombuči z metaboliti (npr. ocetna kislina), ki jih izločajo v medij preprečujejo kontaminacijo same pijače (Escalante-Aburto in sod., 2018).

Kombuča je vir številnih organskih kislin (ocetna, glukozna in glukuronska kislina) in polifenolov. Te učinkovine delujejo protirakavo, proti sladkorni bolezni, krepijo imunski sistem, znižujejo holesterol, pomagajo pri zdravljenju želodčnega čira in imajo detoksifikacijski potencial (Ercolini in sod., 2018).

## 2.2 Pomen ocetnokislinskih bakterij in drugih mikroorganizmov v kombuči

Na fermentirajoči tekočini plava pelikel oz. biofilm, v katerega so ujeti mikroorganizmi.



Slika 1: SCOBY v čajni osnovi (Uffindell, 2022)

Že omenjena »kombuča goba« je sestavljena iz celulozne membrane, v katero so ujete večinoma ocetnokislinske bakterije in acidofilne kvasovke. Ta tvorba plava na tekočini,

ocetnokislinske bakterije so namreč aerobne in le na površju tekočine dobijo dovolj kisika za rast.

Mikrobnia sestava pijače je odvisna od sestave inokuluma. V inokulumu mora biti vsaj ena vrsta ocetnokislinskih bakterij, ki tvori celulozo (*Komagataeibacter xylinus* je učinkovit proizvajalec celuloze (Ercolini in sod., 2018)) in vsaj ena vrsta, ki lahko razgradi saharozo v fruktozo in glukozo. Te vloge lahko opravlja različne vrste, ki lahko hkrati tvorijo tudi sekundarne metabolite, ki prispevajo k okusu pijače.

Najpogosteje izolirane bakterije so iz rodov *Acetobacter* (A.), *Komagataeibacter* (K.), *Gluconacetobacter* (Ga.) in *Lactobacillus*. Prevladajoče vrste ocetnokislinskih bakterij so *K. xylinus*, *A. pasteurianus*, *A. aceti*, *G. oxydans*, *K. xylinus* in *A. xylinum*. Te vrste se v kombuči najpogosteje pojavljajo in so odgovorne za tvorbo pelikla (Arendt in sod., 2019).

Rodovi kvasovk izolirani iz kombuče so *Brettanomyces*, *Candida*, *Kloeckera*, *Mycoderma*, *Mycotorula*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspora*, *Pichia* in *Zygosaccharomyces* (Borges in sod., 2018).

## 2.3 Identifikacija ocetnokislinskih bakterij

Ocenokislinske bakterije (OKB) so bile v preteklosti prepoznane kot »bakterije kisa«, saj so bile prve raziskave narejeni prav na kisu, kasneje pa tudi na pokvarjenem pivu in soku. V zadnjih nekaj desetletjih se je taksonomija bakterij močno spremenila. Prve klasifikacije teh bakterij so bile narejene na osnovi morfoloških in biokemijskih značilnosti, medtem ko je današnja klasifikacija rezultat fenotipskih, kemotaksonomske in genotipskih lastnosti (citirano po Mori Štornik, 2015). Ocetnokislinske bakterije je leta 1837 Friedrich Kützing opisal kot maso miniaturnih organizmov, ki tvori sluz na površini zakisanega vina in piva. Ocetna kislina brez te biomase ne nastaja, kar je že leta 1868 dokazal Louis Pasteur. Na podlagi različnih oblik, velikosti in metabolnih lastnosti, so bile ocetnokislinske bakterije skoraj stoletje razvrščene v dva rodovala: *Acetobacter* in *Gluconobacter*. Konec 20. stoletja pa je uporaba orodij molekularne biologije omogočila opis številnih novih rodov in vrst, kar je pomenilo začetek velikih sprememb na področju sistematike ocetnokislinskih bakterij. Danes je znotraj družine Acetobacteraceae znanih 19 rodov, med katerimi so najbolj znani in najštevilnejši rodovi

ocetnokislinskih bakterij *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter*, *Komagataeibacter* in *Kozakia* (Trček in Barja, 2015, citirano po Marič, 2020).

### **2.3.1 Morfološke in biokemijske značilnosti ocetnokislinskih bakterij**

OKB so po Gramu negativne, mezofilne in striktno aerobne bakterije, ki oksidirajo sladkorje in alkohole do različnih kislin, aldehidov in ketonov. Ker so sposobne učinkovite oksidacije etanola v ocetno kislino, so najbolj poznane kot proizvodni mikroorganizmi pri pridobivanju kisa (Cepec, 2021). So elipsoidne do paličaste oblike (Borges in sod., 2018). Rastejo posamično, po dve skupaj ali tvorijo verižice, v neugodnih razmerah pa lahko oblikujejo tudi nitaste strukture (Cleenwerck in De Vos, 2008). Glede na temperaturno območje jih uvrščamo med mezofilne mikroorganizme z optimalno temperaturo rasti med 25 °C in 30 °C. Rastejo lahko v kislem okolju, optimalna pH-vrednost je med 5 in 6,5. Iz te lastnosti izhaja odpornost proti ocetni kislini, njihovem glavnem produktu (Borges in sod., 2018).

V naravi so prisotne marsikje, najdemo jih v zemlji, kjer lahko delujejo kot spodbujevalci rasti, saj so zmožne pretvoriti atmosferski dušik ( $N_2$ ) v amonijeve ione ( $NH_4^+$ ), obliko, ki rastlini služi kot vir dušika, prisotne pa so tudi na sadju, cvetju in tudi v prebavilih žuželk, kjer svojim gostiteljem omogočajo boljši izkoristek hranil iz organskih virov (Jančič, 2019).

Ob prisotnosti kisika imajo ocetnokislinske bakterije sposobnost oksidacije alkoholov, aldehidov in sladkorjev. Oksidacije substratov v aerobnih pogojih so sicer sposobni mnogi mikroorganizmi, posebnost ocetnokislinskih bakterij je, da ta proces pri njih lahko poteka v močno kislem okolju. Pri tem nastajajo produkti kot je ocetna kislina, ki se skladišči v mediju. Reakcije katalizirajo dehidrogenaze (encimi, ki oksidirajo različne substrate tako, da jim odvzamejo enega ali več protonov, ter jih prenesajo na prejemnike) na zunanjji strani citoplazemske membrane. Ocetna kislina se iz bakterije sprosti v mediju, kjer se lahko akumulira v relativno visokih količinah. *Komagataeibacter* je primer rodu, ki lahko raste v mediju z do 20 % ocetno kislino. Nekateri rodovi so celo sposobni pretvorbe ocetne kisline v ogljikov dioksid in vodo (Borges in sod., 2018).

### **2.3.2 Genotipske značilnosti ocetnokislinskih bakterij**

Identifikacija OKB samo na osnovi fenotipskih lastnosti je zelo nenatančna in hkrati tudi zamudna. Z genetskimi analizami lahko mnogo bolj natančno določimo vrste OKB in ugotavljam genetsko sorodnost med njimi (Trček in Teuber, 2002, povzeto po Mori Štornik, 2015). Za ugotavljanje genetskih sorodnosti med OKB se danes najpogosteje uporablja

hibridizacija DNA-DNA, analize nukleotidnih zaporedij 16S rDNA ter analize medgenske regije 16S-23S rDNA (Ruiz s sod., 2000, Clennwerck in De Vos, 2008, povzeto po Mori Štornik, 2015). Geni za ribosomske RNA, ki so prisotni v vseh živih bitjih, so se izkazali za izredno ohranjene in stabilne, zaradi česar so najuporabnejši za molekulsko identifikacijo bakterijskih vrst (Lim s sod., 2012, Woese, 1987, povzeto po Mori Štornik, 2015). Bakterijska rRNA je sestavljena iz 16S, 23S in 5S rRNA, geni, ki kodirajo posamezne rRNA, pa so ločeni z medgenskimi regijami (Barry s sod., 1991, Ruiz s sod., 2000, González s sod., 2006, povzeto po Mori Štornik, 2015). Za identifikacijo mikroorganizmov se pogosto uporablja analiza nukleotidnega zaporedja za gen 16S rRNA. Nukleotidno zaporedje gena za 16S rRNA je veliko približno 1500 baznih parov, kar je dovolj, da na njih najdemo zelo ohranjena zaporedja, ločena z bolj variabilnimi zaporedji (Patel, 2001, povzeto po Mori Štornik, 2015). V primeru OKB je ohranjenost gena za 16S rRNA zelo velika (tudi do 100 %) in velikokrat ne razlikuje med posameznimi vrstami, zato se je zaradi manjše ohranjenosti nukleotidnih zaporedij medgenskih regij 16S-23S rDNA le-ta izkazala za primernejšo za identifikacijo (povzeto po Mori Štornik, 2015). Medgenska regija 16S-23S rRNA je med genoma za 16S rRNA in 23S rRNA; dolga je do 800 baznih parov ter vsebuje visoko ohranjene regije za tRNA in antiterminalno sekvenco (Trček in Barja, 2015, povzeto po Mori Štornik, 2015).

## 2.4 Zanimive lastnosti ocetnokislinskih bakterij

### 2.4.1 Oksidacija substratov

Na zunani strani notranje celične membrane imajo OKB vpet bogat nabor dehidrogenaz, kar jim omogoča proizvodnjo številnih sladkorjev in alkoholov, ki so še posebej zanimivi za farmacevtsko industrijo. Pri takšni namestitvi encimov mora substrat preiti le zunano membrano in vstopiti v periplazemski prostor, saj transport v citoplazmo ni potreben, proizvodi oksidacije pa ponovno enostavno potujejo preko porinov zunanje membrane v namnoževalno gojišče, kjer se kopičijo. To precej olajša pridobivanje in čiščenje produktov, kar je ugodno z industrijskega vidika (Deppenmeier in Ehrenreich, 2009).

### 2.4.2 Tvorba polisaharidov

Še ena presnovna lastnost OKB, koristna na več področij, je tvorba polisaharidov, ki jih te bakterije izločajo v okolico in ki okoli celice oblikujejo plast sluzi. Bakterijske polisaharide, med njimi tudi polisaharide OKB, je nato možno očistiti in jih uporabiti v živilstvu kot zgoščevalce, v medicini kot nosilce za nadzorovan sproščanje zdravil in obliže za rane, na

področju elektroindustrije kot membrane za zvočnike ter v tekstilni industriji, kjer razvijajo tehnike za uporabo bakterijske celuloze za izdelavo oblačil. Polisaharidi v sluzi so sestavljeni iz različnih monomernih enot, najbolj pogosto iz glukoze, galaktoze in manoze. Različni sestava in razvejanost polisaharidov sta pri makromolekulah vzroka za različno strukturo, molekulsko maso in stopnost vodi le-teh (Deppenmeier in Ehrenreich, 2009). Predstavljena sta dva najpogostejsa, ki se že uporablja v industriji, čeprav nove študije OKB navajajo, da so ti mikroorganizmi tudi vir drugih polisaharidov z novimi potencialnimi možnostmi uporabe (povzeto po Jančič, 2019).

#### 2.4.2.1 Bakterijska celuloza

Eden pomembnejših polisaharidov je bakterijska celuloza, ki jo sintetizirajo nekatere vrste bakterij pod specifičnimi pogoji, in ima številne zanimive lastnosti, kot so mikroporoznost, visoka sposobnost zadrževanja vode, dobre mehanske lastnosti in dobra biokompatibilnost, zaradi česar je potencialni biomaterial za medicinsko uporabo. Sestavljena je iz mreže celuloznih nanovlaken (3–8 nm), ki so zelo enoosno usmerjena (Park, Jung, 2009). Bakterijska celuloza se uporablja za povijanje ran, dostavo zdravil, umetne krvne žile, inženiring kostnega tkiva in podobno. Poleg tega je s to celulozo mogoče preprosto manipulirati, da se tvorijo njeni derivati ali kompoziti z izboljšanimi fizikalno-kemijskimi in funkcionalnimi lastnostmi (Wahid, Longhui, 2021).

#### 2.4.2.2 Bakterijski levan

Levan je naravno prisoten fruktan, homopolimer fruktoze. Njegova glavna veriga je sestavljena iz ponavljajočih se petčlenskih fruktofuranozilnih obročev, povezanih z  $\beta$ -(2 → 6) členi. Molekulska masa in stopnja razvejanosti levanov se pri različnih organizmih, ki jih proizvajajo, razlikuje. Poleg tega je molekulska masa bakterijskih levanov zaradi večkratne razvejanosti veliko večja od rastlinskih levanov (Park, Jung, 2009). Levan se sintetizira kot zunajcelični polisaharid (angl. exopolysaccharide (EPS)) tudi v zunajceličnem matriksu določenih vrst različnih OKB rodov, kot so *Acetobacter*, *Gluconobacter* kot tudi drugih bakterij (*Aerobacter*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*). Bakterijski levani imajo številne koristne lastnosti; so biokompatibilni, biorazgradljivi, antioksidanti in delujejo protivnetno. Te lastnosti izkorisčamo v farmaciji, medicini, živilski in kozmetični industriji. V živilski industriji služijo kot stabilizatorji, emulgatorji, okolju prijazna vezivna sredstva in bio zgoščevalci. Uporabljajo se v nekaterih brezalkoholnih piščkah kot sladilo ali kot dodatek živilom brez glutena, za boljši okus in

teksturo. Brezglutenskemu kruhu na primer izboljša okus in teksturo. Levane obravnavamo tudi kot probiotike, saj produkti hidrolize, kratki fruktooligosaharidi, stimulirajo rast intestinalnih bifidobakterij. V kozmetični industriji so pomembni kot dodatki raznim kremam. Pomembni so tudi iz medicinskega aspekta, dokazano je namreč, da bakterijski levan deluje antivnetno in celo antitumorno (De Vero in sod., 2018).

Ocetnokislinske bakterije lahko proizvajajo tudi acetan, ki je vodotopen polisaharid podoben ksantanu. Acetan je heteropolisaharid sestavljen iz glukoze, manoze, ramnoze in glukuronske kisline. Za acetan ali acetanu podobne heteropolisaharide se v prihodnosti obetajo različne aplikacije (Jančič, 2019).

### **3. Raziskovalno vprašanje**

Z raziskovalno nalogo sva žeeli odgovoriti na vprašanje:

Kakšna je pestrost in vrstna sestava ocetnokislinskih bakterij v kombuči proizvajalca BeLife?

### **4. Materiali in metode**

#### **4.1 Seznam uporabljenih materialov, aparatur in kemikalij**

Materiali in aparature:

- Standardna laboratorijska oprema za gojenje mikroorganizmov:
  - sterilne erlenmajerice z zamaški (250 mL),
  - petrijevke,
  - cepilne zanke,
  - gorilnik,
  - 5-ml steklene epruvete,
  - avtomatske pipete
- Aparature:
  - avtoklav A-65 (Kambič),
  - 23L inkubator (Domel),
  - stresalnik (Labnet 222DS),

- namizna centrifuga (Eppendorf minispin),
- termoblok (Labnet digital dry bath),
- ciklični termostat za PCR (Analytikjena qTower3 G),
- mikrovalovna pečica (Gorenje),
- transiluminator BioDocAnalyze (Biometra),
- spektrofotometer (Eppendorf BioSpectrometer) ter mikrokiveta (Eppendorf  $\mu$ Cuvette G1.0),
- elektroforezni aparat Biometra PS 3003 ter kadička Compact M s Casting System Compact (Biometra).

Uporabljene kemikalije:

- Glukoza,
- Pepton,
- Citronska kislina,
- Kvasni ekstrakt,
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ ,
- Agar,
- Manitol,
- Etanol,
- Ocetna kislina,
- Cikloheksamid,
- Glicerol,
- Metilvijolično barvilo,
- Raztopina joda,
- Rdeče barvilo,
- Aceton,
- Imerzijsko olje,
- PrepMan raztopina,
- Destilirana voda,
- TAE Pufer,
- $\text{MgCl}_2$ ,
- Agaroza,

- Raztopina EtBr.

Encimi in nukleotidi za PCR in elektroforezo :

- Taq DNA polimeraza,
- Začetni oligonukleotidi
- Mešanica nukleotidov dNTP,
- DNA velikostni standard.

Mikrobiološka gojišča:

»RAE 0,5 poltrdno gojišče« oz. RAE poltrdno gojišče z 0.5% etanola in 0.5% ocetne kisline

1. 40 g glukoze,
2. 10 g peptona,
3. 10 g kvasnega ekstrata,
4. 1,57 g citronske kisline,
5. 3,38 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O,
6. 10 g agarja,
7. deionizirana H<sub>2</sub>O do 1 L.

Po avtoklaviranju na 121°C, 15 min smo v ohlajeno gojišče na 50 °C dodali še 5 mL (0,5 %) etanola ter 5 mL (0,5 %) ocetne kisline. Vse smo dobro premešali ter sterilno razlili v petrijevke po 20 mL gojišča.

»RAE 0,5 tekoče gojišče« oz. RAE tekoče gojišče z 0.5% etanola in 0.5% ocetne kisline

1. 40 g glukoze,
2. 10 g peptona,
3. 10 g kvasnega ekstrata,
4. 1,57 g citronske kisline,
5. 3,38 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O,
6. deionizirana H<sub>2</sub>O do 1 L.

Po avtoklaviranju na 121°C, 15 min smo v ohlajeno gojišče na 50 °C dodali še 5 mL (0,5 %) etanola ter 5 mL (0,5 %) ocetne kisline. Vse smo dobro premešali ter do uporabe tekoče gojišče hranili v zaprti steklenici na 4 °C.

### »MYP trdno gojišče«

1. 25 g manitola,
2. 5 g kvasnega ekstrakta,
3. 3 g peptona,
4. 15 g agarja,
5. deionizirana H<sub>2</sub>O do 1 L.

Po avtoklaviranju na 121°C, 15 min smo v ohlajeno gojišče na 50 °C dodali še 20 mL (0.005%) cikloheksamida. Cikloheksamid smo pripravili v deionizirani H<sub>2</sub>O ter ga filtrirali skozi 0,45 µm filter (sterilizacija).

### »MYP tekoče gojišče«

1. 25 g manitola,
2. 5 g kvasnega ekstrakta,
3. 3 g peptona,
4. deionizirana H<sub>2</sub>O do 1 L.

Pripravljeno sestavine smo dobro raztopili in premešali ter avtoklavirali na 121°C, 15 min.



Slika 2: Priprava gojišč (lastni vir)

## 4.2 Vzorčenje fermentacijske brozge v kombučarni ter prenos vzorcev na mikrobiološka gojišča

Dne 21. 10. 2021 smo v fermentacijski sobi kombučarne BeLife v Kamniku odvzeli vzorce kombuče, Naključno smo izbrali tri sodne (slika 1) izmed desetih, kjer je potekala fermentacija in tem sodom odvzeli po mešanju celotne vsebine soda 100 mL fermentacijske brozge v sterilne erlenmajerice. Fermentacijske brozge smo združili v novi sterilni erlenmajerici. To nam je predstavljajo začetni reprezentativni vzorec. Uporabili smo 100 µL tega začetnega vzorca in tudi po 100 µL redčin vzorcev, ki smo jih pripravili v sterilni fiziološki raztopini v mikrocentrifugirkah (redčine  $10^{-1}$  do  $10^{-6}$ ). Redčine so bile pripravljene s prenosom 100 µL začetnega vzorca oz. nadaljnje redčine v 900 µL fiziološke raztopine. Po 100 µL začetnega vzorca oziroma ustreznih redčin smo nato nacepili na dve različni gojišči; gojišče RAE 0,5 ter gojišče MYP. Vzorce oz. redčine smo enakomerno nanesli s spatulo Drigalski po celotni površini petrijevke. Vzorce smo takoj prenesli v mikrobiološki laboratorij Fakultete za naravoslovje in matematiko v Mariboru. Nacepljena gojišča v petrijevkah smo inkubirali v inkubatorju na 30 °C. V primeru uporabe gojišča MYP smo inkubirali nacepljena gojišča v petrijevkah 5 dni. V primeru uporabe gojišča RAE 0,5 smo inkubirali petrijevke v vlažni atmosferi (v dodatni zaprti posodici z navlaženim papirjem) 4 dni.



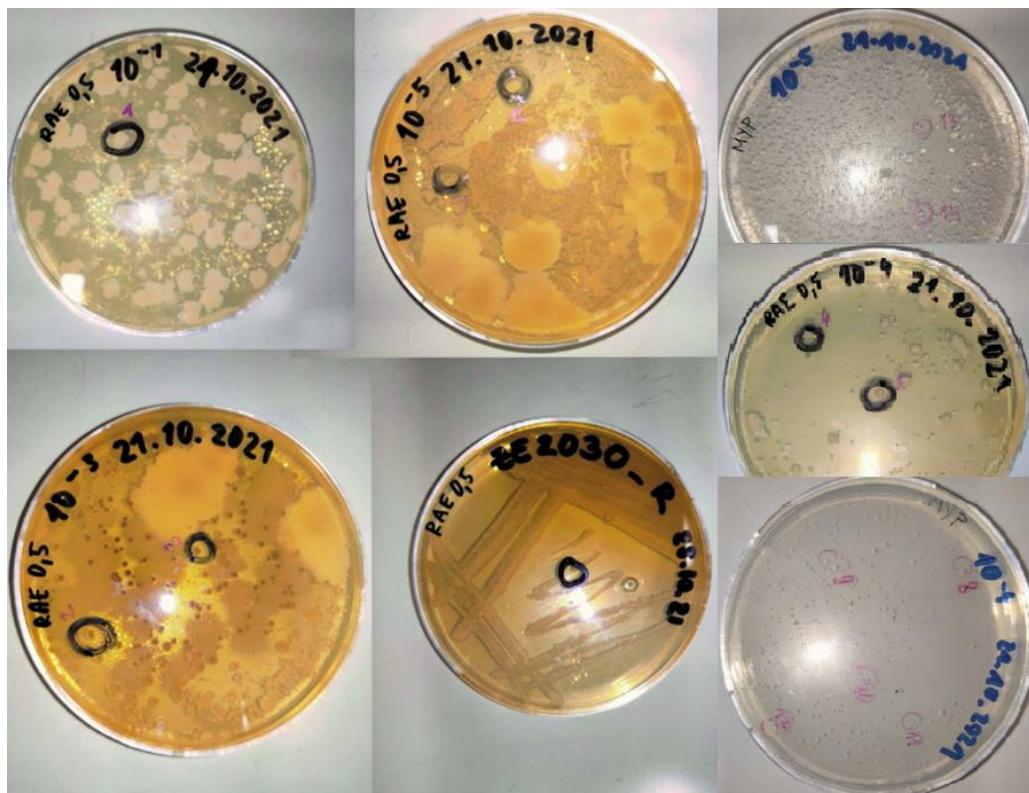
Slika 3: Kombučarna BeLife, Kamnik. Fermentacijska soba, kjer se nahaja 10 sodov s kombučo. Na sliki so 4 sodi, kot poteka fermentacija ter sod št. 4, ki je pripravljen na vzorčenje (odstranjenja prevleka, ki ščiti pred kontaminacijo insektov).



Slika 4: Priprava redčin vzorcev v mikrocentrifugirki ob gorilniku (aseptično delo). Na sliki so tudi prikazane petrijevke s pripravljenimi gojišči (RAE 0,5 in MYP) za nacepitev vzorca oz. redčin vzorca.

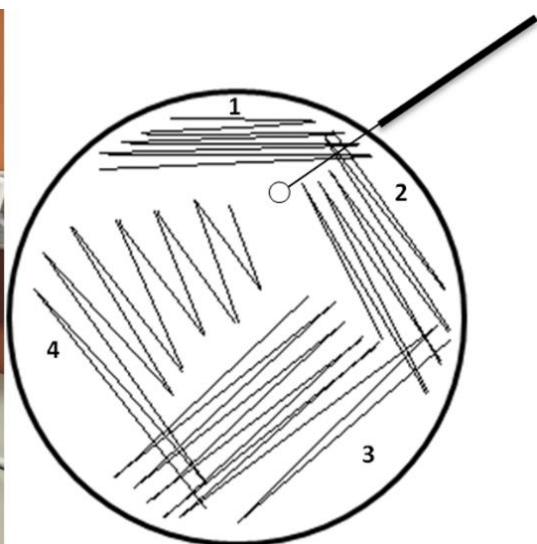
#### **4.2.1 Izbor posameznih kolonij za nacepitev do čiste kulture ter shranjevanje izolatov**

Po inkubaciji smo nacepljena gojišča pregledali (slika 4) in naključno izbrali po 7 dobro ločenih kolonij na vsakem tipu gojišča (RAE 0,5 in MYP); skupaj 14 kolonij.



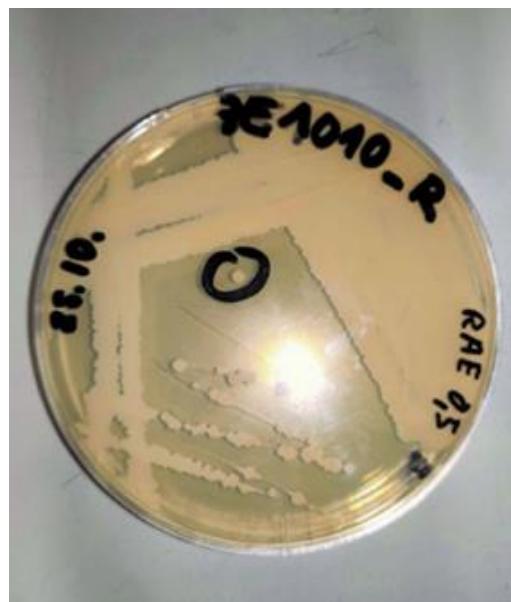
Slika 5: Izbor posameznih kolonij za nadaljnjo osamitev do čiste kulture. Slike prikazujejo, na katerih ploščah smo izbrali posamezne kolonije (obkrožene).

Izbrane kolonije smo zajeli s sterilno mikrobiološko zanko ter jo prenesli na novo gojišče istega tipa. Izbrano kolonijo smo nanesli na manjši del gojišča in tako naredili prvi razmaz. S sterilno mikrobiološko zanko smo nadaljevali po tehniki cepljenja do posameznih kolonij v štirih korakih (Trček, 2013), kot je prikazano na spodnji sliki. Nacepljena gojišča smo nato znova inkubirali v inkubatorju; v primeru uporabe gojišča MYP smo inkubirali nacepljena gojišča v petrijevkah 5 dni. V primeru uporabe gojišča RAE 0,5 smo inkubirali petrijevke v vlažni atmosferi (v dodatni zaprti posodici z navlaženim papirjem) 4 dni.



Slika 6: Cepljenje do posameznih kolonij s sterilno mikrobiološko zanko v štirih korakih ob upoštevanju aseptičnega dela.

Izbrane kolonije smo poimenovali, in sicer v obliki ZE plus štiri oz. pet števk. Tisočica oz. desettisočica predstavlja zaporedno številko izolata (od 1 do 14); števka desetice predstavlja, iz katere redčine vzorce smo izbrali začetno kolonijo – npr. ZE3036 predstavlja redčitev  $10^{-3}$  ter zadnja števka koliko zaporednih razmazov iz posamezne kolonije smo naredili, da smo prišli do čiste kulture (npr. pri izolatu ZE4046 smo opravili 6 precepljanj). Prvih sedem izolatov smo izolirali na gojišču RAE 0,5, preostalih 7 na gojišču MYP po ustaljenem postopku inkubacije, opisanem zgoraj.



Slika 7: Prikaz cepljenja do posameznih kolonij ter nadaljnji izbor kolonije za pridobitev čiste kulture

Po več tednih precepljanj smo uspeli pridobiti čiste kulture izolatov na gojišču RAE 0,5 (ZE1016, ZE2036, ZE3036, ZE4046, ZE5046, ZE6055 in ZE7056) ter na gojišču MYP (ZE8047, ZE9046, ZE10044, ZE11044, ZE12046, ZE13056, ZE14056). Rast na petrijevkah smo sproti opazovali; pri čemer smo opazovali obliko kolonij, vključno z robom ter profilom kolonije. Opazovali smo tudi barvo ter površino in ustroj kolonij. Pri zadnjem precepljenju posameznega izolata smo opazili, da imajo vse posamezne kolonije enake vizualne lastnosti.

Izolate (oz. posamezno kolonijo izolata) smo za dolgotrajnejše shranjevanje nacepili v tekoče gojišče RAE 0,5 oz. MYP in jih gojili na stresalniku (220 vrtljajev/min, 30 °C, 3 dni). V kriovialo smo prenesli 600 µL kulture v tekočem gojišču ter dodali 400 µL sterilne 50 % raztopine glicerola. Tako pripravljene izolate smo nato shranili pri -80 °C v zbirku mikroorganizmov Fakultete za naravoslovje in matematiko Univerze v Mariboru.

## 4.3 Identifikacija izolatov

### 4.3.1 Morfološke lastnosti izolatov - priprava mikroskopskih preparatov za barvanje po Gramu

Mikroskopske preparate smo pripravili iz kultur na trdnem gojišču. Na objektno stekelce smo kanili 50 µL fiziološke raztopine ter iz trdnega gojišča z mikrobiološko zanko prenesli posamezno kolonijo, ki smo jo razmazali po kapljici fiziološke raztopine na objektnem stekelcu. Pustili smo preparat, da se posuši na zraku ter ga nato 2 do 3-krat na hitro povlekli skozi plamen. Preparat smo barvali po Gramu po sledečem postopku:

- a) Razmaz smo prelili z raztopino kristal vijoličnega in barvali 1 min. Nato smo raztopino odlili in sprali z vodo.
- b) Razmaz smo prelili z lugolovo raztopino in barvali 1 min. Nato smo raztopino odlili in sprali z vodo.
- c) Razmaz smo razbarvali z etanolom ter sprali z vodo.
- d) Razmaz smo prelili z raztopino safranina in barvali 1 min. Po barvanju smo znova sprali pod vodo.
- e) Preparat smo posušili in ga pogledali pod svetlobnim mikroskopom pod povečavama 400x in 1000x (uporabili smo imerzijsko olje).

### **4.3.2 Preverjanje rasti v stacionarnem gojišču ter fenotipska določitev produkcije biofilma**

Posamezne kolonije izolatov iz (pol)trdnih gojišč smo z mikrobiološko zanko prenesli v 10-mL sterilne epruvete s 3 mL tekočega gojišča RAE. Gojišča smo inkubirali v inkubatorju 5 dni na 30°C (brez stresanja) ter po inkubaciji preverjali nastanek biofilma.

Genotipska identifikacija izolatov na osnovi analize nukleotidnih zaporedij 16S rDNA ter analize medgenske regije 16S-23S rDNA.

### **4.3.3 Genotipska identifikacija izolatov**

Genotipsko identifikacijo izolatov smo opravili po naslednjem zaporedju:

- Izolacija genomske DNA (gDNA)
- Verižna reakcija s polimerazo (PCR) za pomnoževanje nukleotidnih zaporedij 16S rDNA oz. medgenske regije 16S-23S rDNA
- Elektroforeza pomnožkov PCR ter vizualizacija pomnožkov
- Čiščenje ustreznih pomnožkov PCR ter priprava vzorcev za sekvenciranje po Sangerju
- Interpretacija elektroferogramov s programom Chromas
- Preverba zaporedij s programom Blast

#### *4.3.3.1 Izolacija genomske DNA*

Izolatom smo izolirali genomsko DNA s pomočjo kita PrepMan™ Ultra sample preparation solution (Thermo Fischer) po naslednjem postopku:

1. 1 mL tekoče kulture smo odpipetirali v 2 mL mikrocentrifugirko.
2. Centrifugirali smo v namizni centrifugi (13400 vrtljajev/min, 2 min).
3. Odlili supernatant.
4. Dodali 50 µL PrepMan Solution raztopine in dobro premešali z vorteksiranjem.
5. Mikrocentrifugirko smo inkubirali v termobloku za 10 min na 100 °C
6. Ohladili na sobno temperaturo (vsaj 2 min)
7. Centrifugirali v namizni centrifugi (13400 vrtljajev/min, 2 min)
8. 40 µL supernatanta smo prenesli v novo mikrocentrifugirko in jih dobro označili ter shranili na -20 °C.



Slika 8: Namizna centrifuga, ki smo jo uporabljali pri laboratorijskem delu.

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

Verižno reakcijo s polimerazo smo pripravili v 50 µL reakcijskih mešanicah. Za matrično DNA smo uporabili izolirane genomske DNA iz prejšnje točke. Pri vseh reakcijah PCR smo pripravili pozitivno in negativno kontrolo, kjer namesto ciljne gDNA dodamo 3 µL vode (negativna kontrola) ali pa 3 µL za že identificirane gDNA (pozitivna kontrola). Za pozitivno kontrolo smo uporabili matrične gDNA identificiranih ocetnokislinskih bakterij ali kvasovk iz raziskav, ki se izvajajo v mikrobiološkem laboratoriju Fakultete za naravoslovje in matematiko Univerze v Mariboru.

Tabela 1: Sestavine za reakcijsko mešanico

Kemikalije (koncentracija)	Volumen (µL)
dNTP (2mM)	5
Začetni oligonukleotid 1 (100 pmol/µL)	0,5
Začetni oligonukleotid 2 (100 pmol/µL)	0,5
10x pufer	5
H <sub>2</sub> O	30,75
MgCl <sub>2</sub>	5
Taq polimeraza	0,25
Matrična DNA	+3

Tabela 2: Seznam uporabljenih začetnih oligonukleotidov za identifikacijo izolatov.

Začetni oligonukleotid	Ciljni mikroorganizem	Odsek	Temperatura prileganja
ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' 18SF1 5'-AGGTTCCGTAGGTGAACCT-3'	kvasovke	ITS1-5.8 rDNA-ITS2	56 °C
SpaFw 5'-TGC GGCTGGATCACCTC-3' SpaRev 5'- GTGCCAAGGCATCCACC -3'	OKB	medgenska regija 16S-23S rDNA	58 °C
rH1542 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3' fD1 5'-AGAGTTGATCMTGGCTCAG-3'	OKB	16S rDNA	56 °C

Verižno reakcijo s polimerazo (PCR) smo izvedli v aparatu Analytikjena qTower3 G. Reakcija PCR je potekala pri naslednjih pogojih:

- 1 min pri 95 °C (začetna denaturacija)
- 30-krat cikel pomnoževanja:
  - o 30 s pri 95 °C (denaturacija)
  - o 30 s pri temperaturi prileganja (glej tabelo zgoraj za temperaturo prileganja posameznega para začetnih oligonukleotidov)
  - o 30 s pri 72 °C
- 10 minut pri 72 °C (zaključno podaljševanje)

#### 4.3.3.3 Ločevanje DNA z gelsko elektroforezo in vizualizacija

1. (Z uporabo rokavic) smo pripravili 100 mL 1% gel (agarosa 1%), 1x TAE pufer gela, da smo:
  - a. 20 ml TAE (50-kratni TAE) z vodo razredčili do 1000 ml (za 1 liter 1x TAE pufra).
  - b. 100 ml 1x TAE pufru dodali 1 g gela.
  - c. Vsebino dali v mikrovalovko in segreli do vretja.
2. Vsebino smo prelili v nastavek z glavnički.

3. Ko se je vsebina strdila, smo previdno odstranili glavnice in gel prenesli v elektroforezno kadičko.
4. Elektroforezo smo prelili z enakim pufrom (1x TAE pufer). Pazili smo, da so "luknjice" bile prekrite s tekočino.
5. Na paletah smo si pripravili vzorce, ki smo jih prenesli v luknjice v gelu na elektroforezi. Pripravili smo 0,5 µl nanašalnega pufra (pred uporabo premešan) in 4,5 µl vzorca. Z nanašalnim pufrom smo obtežili DNA.
6. V prvo luknjico smo dali 5 µl velikostnega standarda- Ladder mix (pred uporabo smo premešali) in nadaljevali s pripravljenimi vzorci (0,5 µl nanašalnega pufra + 4,5 µl vzorca).
7. Vklopili smo elektriko in počakali približno 30 minut (pred tem smo preverili, da so bile nastavite ustrezne: - + in 130 volтов). Previdno smo obrezali s skalpelom porabljen gel, neporabljen gel pa prelili z enakim pufrom, pokrili s folijo in postavili v hladilnik. Pritisnili smo stop in ugasnili elektroforezo.

Za prenašanje gela smo uporabljali rokavice in ustrezne lopatke.

1. Najprej smo dali porabljen gel v raztopino etidijevega bromida za 10 min.
2. Po desetih minutah smo prenesli porabljen gel v H<sub>2</sub>O za 15 minut.
3. Gel smo prenesli v transiluminator (pazili smo, da ni bilo mehurčkov). Vklopili napravo in računalnik, ter odprli program BioDocAnalyse.
4. Program: tretji gumb, vklopili smo zgornji gumb (navadna svetloba- da smo preverili ali je gel sploh bil v vidnem območju), ugasnili zgornji gumb, vklopili spodnji gumb (UV svetloba) in pritisnili znak II (zamrznitev slike). Slike smo shranili v formatih TIF in JPG.
5. Gel smo zavrgli v posebne odpadke in očistili podlago. Izklopili smo računalnik.

#### *4.3.3.4 Čiščenje PCR pomnožkov*

Da bi lahko ocenili koncentracijo pomnožkov, jih je potrebno najprej očistiti. To storimo pri sobni temperaturi po naslednjem postopku:

1. PCR pomnožkom smo dodali enak volumen "Binding Buffer", kot je znašal volumen pomnožkov-45,5 µL (imeli 50 µL, 4,5 µL porabili za elektroforezo) in dobro premešali.

2. Mešanico smo prenesli v pripravljene kolone (skupaj 91 µL) iz komercialnega paketa. Centrifugirali smo 30-60 sekund pri maksimalnih obratih. Pretečeno vsebino smo zavrgli iz zbiralnih kolon.
3. Dodali smo 700 µL "Wash Buffer". Centrifugirali 30-60 sekund. Nato smo zavrgli pretečeno vsebino iz zbiralnih kolon. Dvakrat smo centrifugirali prazne kolone 1 minuto pri maksimalnih obratih.
4. Vzorce smo prenesli v nove 1,5 mL centrifugirke. Dodali smo 25 µL sterilne vode. Centrifugirali smo 1 minuto pri maksimalnih obratih.
5. Pretečeno vsebinos smo shranili.

#### *4.3.3.5 Sekvenciranje pomnožkov po Sanger metodi ozziroma priprava vzorec*

Da bi lahko izolate genotispmo identificirali, smo jih poslali na sekvenciranje v podjetje Microsynth, Dunaj, Avstrija. Potrebno je poslati 150 ng DNA v 12 µL. Najprej je bilo potrebno oceniti koncentracijo pomnožkov s spektrofotometrom, nato pa pripraviti raztopine za pošiljanje skupaj z dodanim začetnim oligonukletidom v koncentraciji, kot jo zahteva podjetje.

#### *4.3.3.6 Pregled elektroferogramov rezultatov sekvenciranj*

1. pridobljene rezultate sekvenciranj smo odprli v programu Chromas
2. Preverimo čistost zaporedij
3. Uporabimo FASTA format tistih določenih regij, kjer so sekvence čiste
4. Naše podatke primerjamo s podatki že znanih vrst (določene prej s sekvenciranjem) s programom BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

### 4.4 Izdelava filogenetskega drevesa

Da ugotovimo več o sorodnosti med vrstami mikrorganizmov iz vzorca kombuče, smo se odločili za izdelavo filogenetskega drevesa po postopku:

1. nukleotidna zaporedja dobljena pri sekvenciranju smo poravnamo z orodjem CLUSTALO (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).
2. Pretvorimo v FASTA format.
3. Naše podatke primerjamo s podatki že znanih vrst (določene prej s sekvenciranjem) s programom BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

## 5. Rezultati

### 5.1 Pridobitev izolatov in osnovne filogenetske značilnosti

Iz začetne brozge kombuče Kombučarne BeLife, Kamnik, ki smo jo nacepili v več redčinah na gojišče RAE z dodanim 0,5 % etanolom in 0,5 % ocetno kislino smo pridobili naslednje izolate, za katere smo sklepali, da imamo čiste kulture.

Tabela 3: Primerjava začetne in končne cepitve izoliranih kolonij na gojišču RAE 0,5

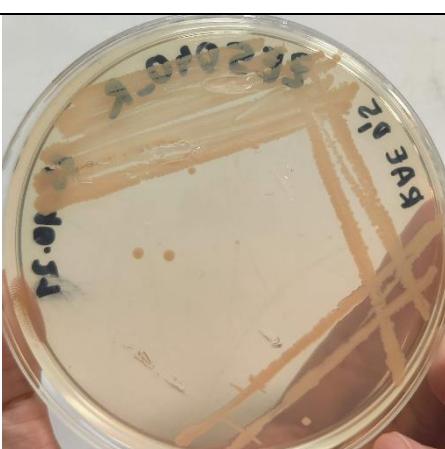
Oznaka izolata	Začetna plošča za pridobitev čiste kulture	Zadnja plošča, kjer smo za identifikacijo uporabili posamezno kolonijo
ZE1016		
ZE2036		

Tabela se nadaljuje na naslednji strani.

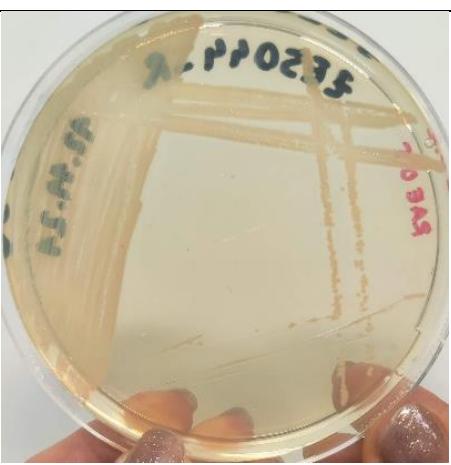
ZE3036		
ZE4046		
ZE5046		

Tabela se nadaljuje na naslednji strani.

ZE6055		
ZE7056		

Tabela 4: Opis rasti in morfologije kolonij izolatov kombuče, pridobljenih na gojiščih RAE z dodatkom 0,5 % etanola in 0,5% ocetne kislino.

Oznaka izolata	Opis morfologije kolonij
ZE1016	velike izbočene kolonije, neraven rob, verjetno kvasne celice, plošče se sčasoma obarvajo rjava
ZE2036	pri začetnem čiščenju kulture rjava pigmentiranost, ki je tekom pridobivanja čiste kulture izginila, okrogle kolonije
ZE3036	okrogle kolonije
ZE4046	zelo drobne kolonije, počasi rastoče
ZE5046	kolonije so nepravilne oblike, srednje velikosti
ZE6055	srednje velike kolonije, raven rob
ZE7056	okrogle in srednje velike kolonije, raven rob

Tabela 5: Opis rasti čistih kultur izolatov ZE1016, ZE2036, ZE3036, ZE4046, ZE5046, ZE6055, ZE7056 po stacionarnem gojenju v tekočem gojišču RAE z dodatkom 0,5 % etanola in 0,5 % ocetne kisline

Oznaka izolata	Opis rasti čiste kulture ter morebitna tvorba biofilma v tekočem gojišču	Fotografija namnožene kulture po stacionarnem gojenju v tekočem gojišču
ZE1016	Vidni večji peleti, »koščki«	
ZE2036	malo večja viskoznost gojišča	
ZE3036	ni posebnih opažanj	

Tabela se nadaljuje na naslednji strani.

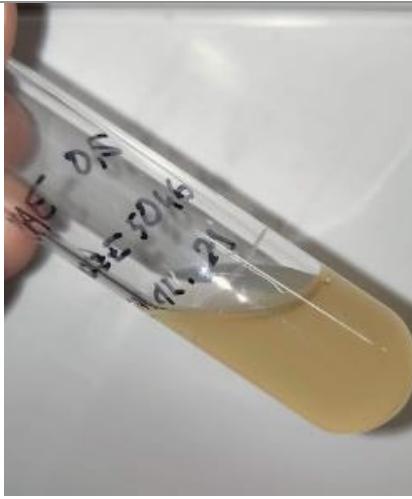
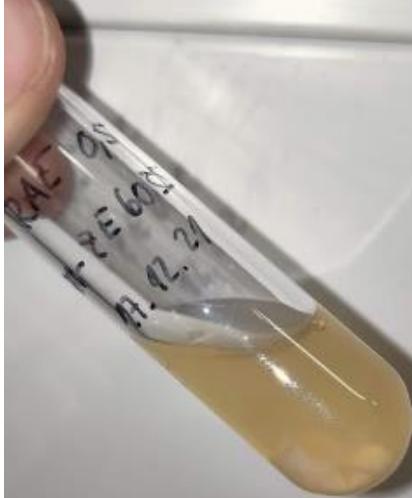
ZE4046	Viskozno gojišče, motnost je bolj opazna	
ZE5046	ni posebnih opažanj	
ZE6055	nastal biofilm, ki se je posedel	

Tabela se nadaljuje na naslednji strani.

ZE7056	nastali so peleti, večinoma posedeni	
--------	--------------------------------------	--

Iz začetne brozge kombuče Kombučarne BeLife, Kamnik, ki smo jo nacepili v več redčinah na gojišče MYP z dodanim antimikrobom cikloheksamidom, ki preprečuje rast evkariontskim celicam, smo pridobili naslednje izolate, za katere smo sklepali, da imamo čiste kulture.

Tabela 6: Primerjava začetne in končne plošče izoliranih kolonij na gojišču MYP, X označuje izolate, ki smo pridobili, a smo jih avtoklavirali preden bi jih uspeli fotografirati

Oznaka izolata	Začetna plošča za pridobitev čiste kulture	Zadnja plošča, kjer smo za identifikacijo uporabili posamezno kolonijo
ZE8047		

Tabela se nadaljuje na naslednji strani.

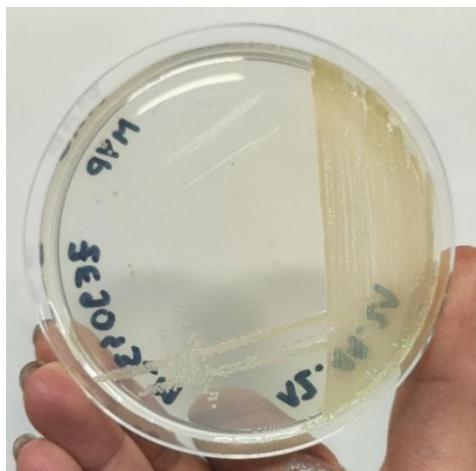
ZE9046	x	
ZE10044	x	x
ZE11044		x
ZE12046		x

Tabela se nadaljuje na naslednji strani.

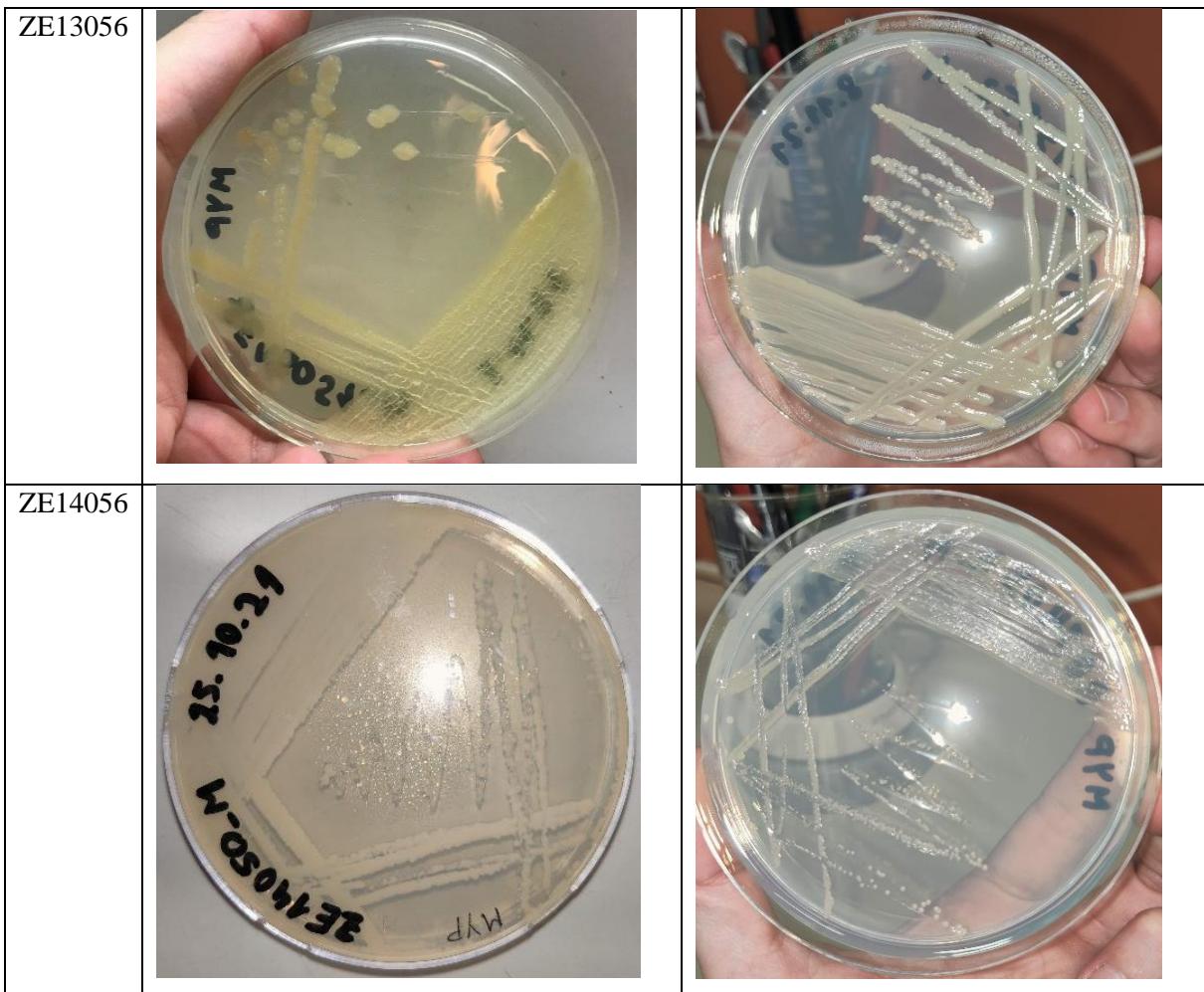


Tabela 7: Opis rasti čistih kultur izolatov ZE9046, ZE10044, ZE11044, ZE12046, ZE13056, ZE14056 po stacionarnem gojenju v tekočem gojišču MYP.

Oznaka izolata	Opis rasti čiste kulture ter morebitna tvorba biofilma v tekočem gojišču	Fotografija namnožene kulture po stacionarnem gojenju v tekočem gojišču
ZE8047	peleti, posedeni	
ZE9046	peleti (malo večji), posedeni	

Tabela se nadaljuje na naslednji strani.

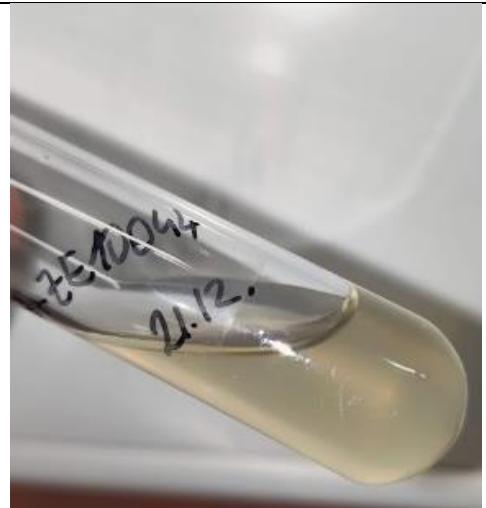
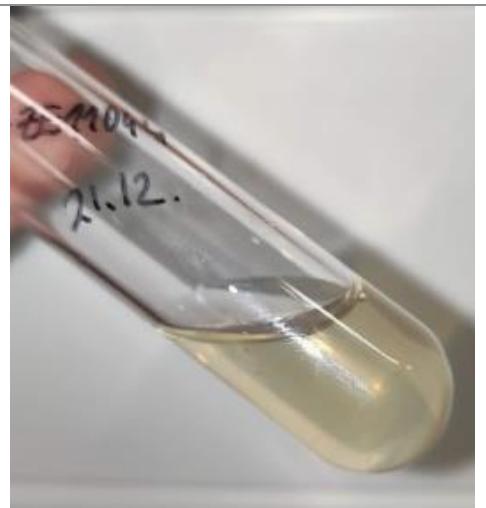
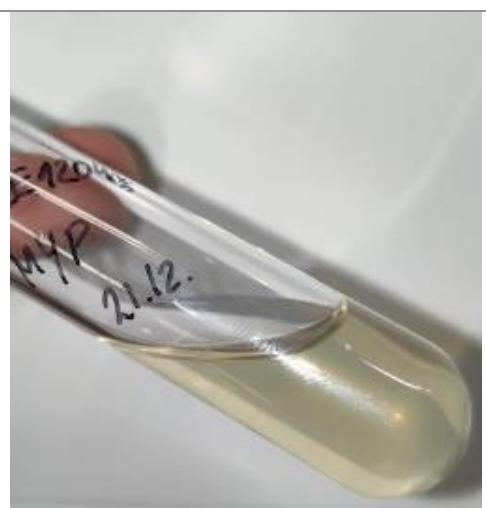
ZE10044	malo bolj viskozno	
ZE11044	malo bolj viskozno	
ZE12046	ni posebnih opažanj	

Tabela se nadaljuje na naslednji strani.

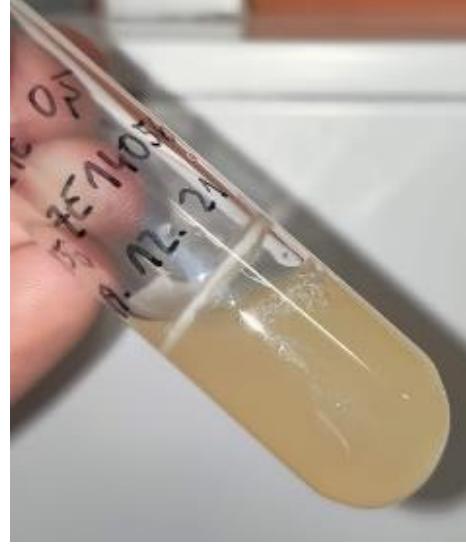
ZE13056	peleti, posedeni	
ZE14056	peleti, trakci, posedeni. Bolj viskozno (RAE 0,5)	

Tabela 8: Opis rasti in morfologije kolonij izolatov kombuče, pridobljenih na gojiščih MYP.

Oznaka izolata	Opis morfologije kolonij
ZE8047	ni posebnih opažanj
ZE9046	ni posebnih opažanj
ZE10044	počasnejša rast
ZE11044	počasnejša rast
ZE12046	počasnejša rast

Tabela se nadaljuje na naslednji strani.

ZE13056	ni posebnih opažanj
ZE14056	Na MYP gojišču je bila zelo počasna rast, zato smo posamezno kolonijo nacepili na gojišče RAE 0,5. Na tem gojišču (RAE 0,5) smo zaznali boljo rast; okrogle in srednje velike kolonije, raven rob

Za vse izolate ZE1016, ZE2036, ZE3036, ZE4046, ZE5046, ZE6055, ZE7056, ZE8047, ZE9046, ZE10044, ZE11044, ZE12046, ZE13056 in ZE14056 smo izvedli tudi barvanje po Gramu.

Po Gramu negativnoobarvanje (močno rdeče obarvanje) smo opazili pri izolatih ZE2036, ZE3036, ZE4046, ZE5046, ZE6055, ZE7056, ZE8047, ZE9046, ZE10044, ZE11044, ZE12046, ZE13056 in ZE14056. Pod mikroskopom smo določili tudi obliko celic. Pri izolatih ZE2036, ZE3036, ZE4046, ZE5046, ZE6055, ZE7056, ZE8047, ZE9046, ZE10044, ZE11044, ZE12046, ZE13056 in ZE14056 smo zasledili ob rdečem obarvanju celic tudi paličasto obliko le-teh.

Izolat ZE1016 se je pri barvanju po Gramu obarval modrikasto, celice so bile precej večje (okroglo) in lahko smo jih opazovali že pod 400x povečavo, kar je nakazovalo na prisotnost kvasovk.



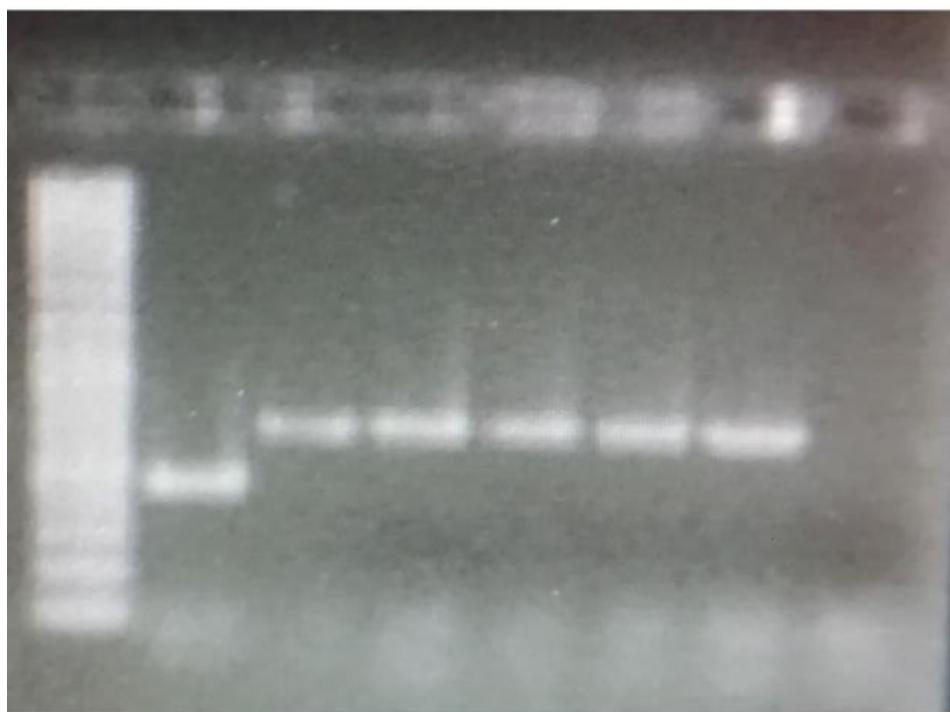
Slika 9: Prikaz preparata izolata ZE3036, barvanega po Gramu, pod svetlobnim mikroskopom (1000x povečava).

## 5.2 Rezultati pomnoževanja z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) značilnih regij za določevanje vrst

Verižno reakcijo s polimerazo smo izvedli z izoliranimi genomske DNA izolatov, ki so navedene v spodnji tabeli. V primeru oznake s številkami so bili uporabljeni začetni oligonukleotidi za pomnoževanje medgenske regije 16S-23S rDNA, značilne za določevanje ocetnokislinskih vrst. V primeru K je bil uporabljen par začetnih oligonukleotidov za določevanje 16S rDNA.

Tabela 9: Oznaka nanesenih vzorcev na elektroforezni gel. Oznaka M predstavlja standardno DNA lestvico (za določitev velikosti pomnožkov), preostale oznake predstavljajo PCR-pomnožke.

Izolat		ZE1016	ZE2036	ZE3036	ZE5046	ZE6055	ZE7056	ZE1016
Oznaka	M	K	2	3	4	5	6	1/K
	M	K	2	3	4	5	6	1



Slika 10: Vizualizacija rezultatov PCR-pomnožkov značilnih regij za določevanje vrste.

## 5.3 Ocenitev koncentracije očiščenega pomnožka s spektrofotometrom

Tabela 10: Koncentracije PCR-pomnožkov značilnih regij izbranih sevov, ki smo jih izolirali iz kombuče.

Sev	PCR-pomnožek	Koncentracija (ng/mL)
ZE1016	ITS1-5.8S rDNA–ITS2	23,3
ZE2036	Medgenska regija 16S-23S	21,7
ZE3036	Medgenska regija 16S-23S	33,9
ZE5046	Medgenska regija 16S-23S	32,8
ZE6055	Medgenska regija 16S-23S	24,1
ZE7056	Medgenska regija 16S-23S	35,1

## 5.4 Rezultati sekvenciranja za genetsko identifikacijo izolatov

Na sekvenciranje je bilo poslanih šest sevov. Rezultati so naslednji:

Tabela 11: Rezultati določitev vrste po uporabi programa BLAST na podlagi rezultatov, ki smo jih dobili za PCR-pomnožke značilnih regij za določitev vrst sekvencirane po Sanger tehnologiji.

Izolat	PCR-pomnožek	Uvrstitev	Vrsta
ZE1016	ITS1-5.8S rDNA–ITS2	Kvasovka	<i>Pichia membranifaciens</i>
ZE2036	Medgenska regija 16S-23S	OKB	<i>Acetobacter lovaniensis</i> ali <i>Acetobacter ghanensis</i>
	16S rDNA	OKB	<i>Acetobacter lovaniensis</i> ali <i>Acetobacter ghanensis</i>
ZE3036	Medgenska regija 16S-23S	OKB	<i>Acetobacter lovaniensis</i> ali <i>Acetobacter ghanensis</i>
ZE5046	Medgenska regija 16S-23S	OKB	<i>Acetobacter lovaniensis</i> ali <i>Acetobacter ghanensis</i>
	16S rDNA	OKB	<i>Acetobacter lovaniensis</i> ali <i>Acetobacter ghanensis</i>
ZE6055	Medgenska regija 16S-23S	OKB	<i>Acetobacter okinawensis</i>
ZE7056	Medgenska regija 16S-23S	OKB	<i>Acetobacter lovaniensis</i> ali <i>Acetobacter ghanensis</i>

## 5.5 Podobnost opisanih bakterijskih vrst oziroma sevov z izolati te raziskave

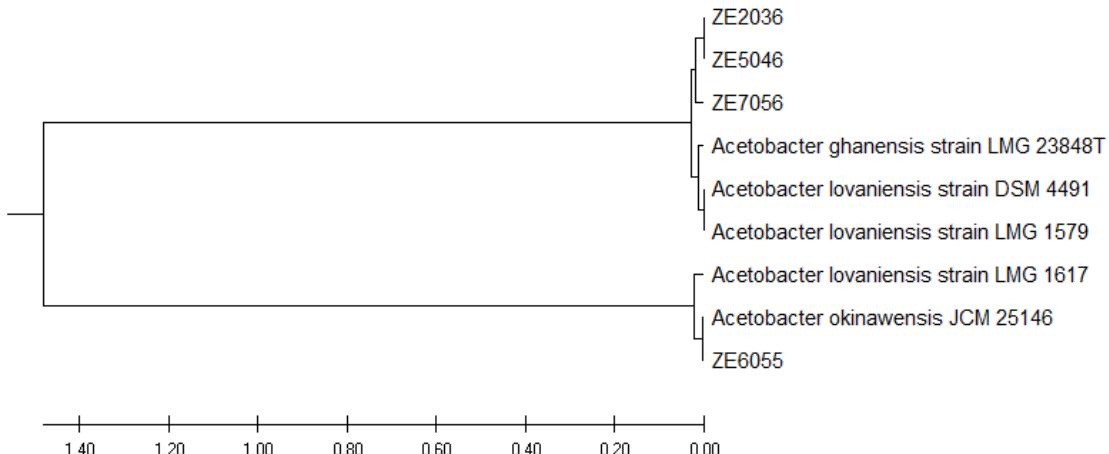
Tabela 12: Odstotki podobnosti medgenske regije 16S-23S že popisanih vrst bakterij v literaturi v primerjavi s sekvenciranimi zaporedji izolatov, ki spadajo med acetokislinske bakterije. Vsi rezultati so podani v odstotkih (%). Oznaka D predstavlja dolžino prileganja v odstotkih (angl.=query cover). Oznaka P predstavlja odstotek podobnosti (angl. percent identity).

	ZE2036		ZE5046		ZE6055		ZE7056	
	D	P	D	P	D	P	D	P
<i>Acetobacter ghanensis</i> LMG 23848 <sup>T</sup>	98	95,96	95	95,84	90	95,75	89	95,52
<i>Acetobacter lovaniensis</i> LMG 1617	98	96,36	98	96,26	95	96,26	89	95,96
<i>Acetobacter lovaniensis</i> DSM 4491	98	96,04	97	96,01	97	95,47	96	95,97
<i>Acetobacter lovaniensis</i> LMG 1579	100	96,21	100	96,21	95	95,01	94	95,96
<i>Acetobacter okinawensis</i> JCM 25146	98	96,89	95	96,80	90	99,56	89	96,55

Tabela 13: Odstotki podobnosti regije 16S rDNA že popisanih vrst bakterij v literaturi v primerjavi s sekvenciranimi zaporedji izolatov ZE2036 in ZE5046. Za ta dva izolata smo izvedli dodatno pomnoževanje regije 16S rRNA zaradi nejasne uvrstitve. Vsi rezultati so podani v odstotkih (%). Oznaka D predstavlja dolžino prileganja v odstotkih (angl.=query cover). Oznaka P predstavlja odstotek podobnosti (angl. percent identity).

	ZE2036		ZE5046	
	D	P	D	P
<i>Acetobacter ghanensis</i>	90	99,31	95	99,27
<i>Acetobacter lovaniensis</i>	89	99,08	95	98,98
<i>Acetobacter okinawensis</i>	91	99,62	97	99,56

## 5.6 Filogenetsko drevo



Slika 11: Filogenetsko drevo izolatov OKB iz kombuče v primerjavi z najsorodnejšimi opisanimi bakterijskimi vrstami. Za sestavo drevesa je bil uporabljen program za risanje filogenetskih dravov MEGAX (algoritem UPGMA). Enote na osi predstavljajo število substitucij v nukleotidnem zaporedju na določenem odseku sekvence.

## 6. Razprava in zaključki

S to raziskovalno nalogo smo se želeli seznaniti, kako se izvede izolacija ter okarakterizacija prisotnih izolatov mikrobne združbe, ki se nahajajo v kombuči. Ker smo se želeli usmeriti predvsem na ocetnokislinske bakterije, smo v nalogi uporabili mikrobiološka gojišča, ki spodbujajo predvsem rast OKB in ne toliko drugih simbiontov, ki se tudi lahko nahajajo v kombuči.

Raziskovanja smo se lotili tako, da smo pridobili vzorec kombuče iz fermentacijske brozge iz kombučarne BeLife v Kamniku. Tekom naloge smo pridobili skupno 14 izolatov na dveh različnih gojiščih. Na gojišču MYP, kjer smo uporabili antibiotik cikloheksamid, ki preprečuje rast evkariontom (in s tem kvasnim celicam), smo pridobili 7 izolatov; ki smo jih poimenovali ZE8047, ZE9046, ZE10044, ZE11044, ZE12046, ZE13056 in ZE14056. Glede na morfološke lastnosti posameznih kolonij (opis rasti na trdnem gojišču, opis rasti v tekočem gojišču) ter barvanju po Gramu, predvidevamo, da izolati pripadajo ocetnokislinskim bakterijam.

Uporabili smo tudi drugo mikrobiološko gojišče, imenovano RAE 0,5. Običajno se uporablja takšno gojišče z 1 % ocetne kisline in 1 % etanola, ki daje prednost ocetnokislinskim bakterijam pred drugimi mikroorganizmi, ki niso tolerantni na prisotnost ali ocetne kisline in/ali etanola. V naši nalogi smo prilagodili vsebnost etanola in ocetne kisline, saj smo pregledali objave in

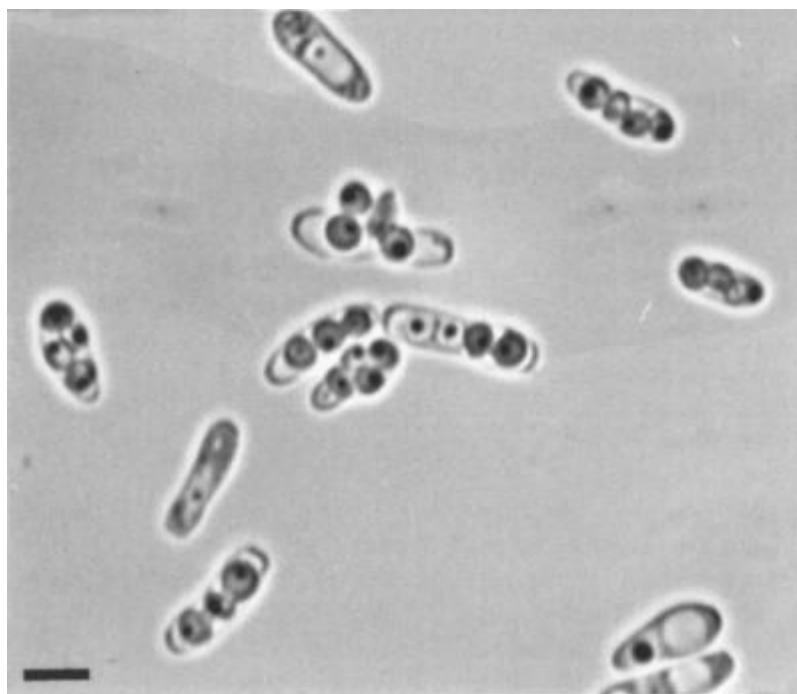
ugotovili, da se običajno v kombuči ne nahaja več kot 0,5 % etanola in tudi ne tako visoka koncentracija ocetne kisline, kot je običajna v jabolčnih ali vinskih kisih. Zato smo znižali vsebnost etanola in ocetne kisline na 0,5 %, da bi se z mikrobiološkimi gojišči približali naravnim pogojem kombuče. Na tem gojišču RAE 0,5 smo izbrali 7 dobro ločenih kolonij, ki smo jih nato z večkratnim precepljanjem do posameznih kolonij pridobili v čisti kulturi in jih trajno shranili pod oznakami ZE1016, ZE2036, ZE3036, ZE4046, ZE5046, ZE6055 in ZE7056.

Pri morfološkem opisu rasti na poltrdnem gojišču RAE 0,5 smo opazili, da je pri izolatu z oznako ZE1016 opazna hitra rast velikih debelih izbočenih kolonij, kar je nakazovalo na prisotnost kvasne vrste. To ni bilo nič nepričakovanega, saj je v kombuči več različnih mikroorganizmov, ki smo jih lahko zajeli v naš vzorec, prav tako pa to gojišče ni vsebovalo protimikrobne učinkovine, ki bi preprečevala rast evkariontom in s tem kvasovkam (kot v primeru uporabe gojišča MYP, kjer so kolonije rastle opazno počasneje. Zaradi počasnejše rasti smo nato posledično opravili manj cepitev na nova gojišča).

Fenotipska okarakterizacija, kot smo jo izvedli v laboratoriju, ne omogoča določitve (bakterijske ali kvasne) vrste, zato smo z izbranimi izolati naredili še genotipsko določitev vrste. Odločili smo se, da v nadalnjem delu poskusimo določiti vrsto verjetno kvasnem izolatu (ZE1016) ter še 5 izolatom od šestih, ki smo jih izolirali do čiste kulture na gojišču RAE 0,5. Iz nadalnjih raziskav smo izključili zelo počasi rastoč izolat ZE4046. Izbranim izolatom smo izolirali genomsko DNA in tako pripravili matrično DNA za verižno reakcijo z DNA-polimerazo. Za pomnoževanje smo uporabili par začetnih oligonukleotidov, ki omogočajo pomnožitev medgenske regije 16S-23S rDNA. V primeru uporabe začetnih nukleotidov za medgensko regijo 16S-23S rRNA smo pridobili 5 pomnožkov ustrezne velikosti (Slika 10), in sicer za genomsko DNA izolatov ZE2036, ZE3036, ZE5046, ZE6055 in ZE7056. Pomnožka nismo pridobili za izolat ZE1016 s temi začetnimi oligonukleotidi. Za ta izolat smo uporabili par začetnih oligonukleotidov za določevanje ITS1-5.8S rDNA-ITS2 pri kvasovkah, kjer smo pridobili PCR-pomnožek ustrezne velikosti. Vse ustrezne PCR-pomnožke smo poslali na sekvenciranje po metodi Sanger v podjetje Microsynth, Dunaj, Avstrija. Po obdelavi prejetih rezultatov sekvenciranja smo identificirali vseh šest izolatov (5 OKB s pomočjo sekvenciranja medgenske regije 16S-23S rRNA in 1 kvasovko s pomočjo sekvenciranja ITS1-5.8S rDNA-ITS2 regije).

Rezultati sekvenciranja teh regij so pokazali, da je izolat ZE1016 kvasovka *Pichia membranifaciens*, izolat ZE6055 je ocetnokislinska bakterija vrste *Acetobacter okinawensis*, pri preostalih štirih izolatih (ZE2036, ZE3036, ZE5046 in ZE7056) pa je prišlo do nejasne uvrstitve med ocetnokislinskima vrsta znotraj rodu *Acetobacter*, in sicer med vrstama *Acetobacter lovaniensis* in/ali *Acetobacter ghanensis*. Za izolata ZE2036 in ZE5046 smo uporabili še začetne nukleotide za pridobitev PCR-pomnožka 16S regije, kjer smo ponovno prišli do nejasne uvrstitve med več vrstami (Tabela 14).

Po vrstni identifikaciji naših izolatov smo pregledali literaturo, ki opisuje te vrste. Tako smo za kvasovko *Pichia membranifaciens* zasledili, da jo lahko najdemo v različnih okoljih. Medtem ko je vrsta najbolj znana po ustvarjanju biofilmov na različnih alkoholnih izdelkih, jih lahko najdemo tudi v lupinah sadja, siru, oljčnih slanicah in pekovskih izdelkih (Masih, 2001). Odporna je na prisotnost etanola (tudi do koncentracije 11 %) in jo tako pogosto najdemo v alkoholnih destilarnah, kjer je vključena v vse faze procesa fermentacije (Lachance, 1995). Glede na dejstvo, da se ta kvasovka običajno nahaja v zunanjih okoljih, je mezotermofil, ki ima optimalno temperaturo rasti pri 20 °C. Vrsta je dobro znan halotolerantni mikroorganizem, saj ima optimalno rast pri 3M NaCl. Kvasovka je osmotolerantna in acidofilna, pri čemer so njeni optimalni pH pogoji okoli 4,0 (Aguiar, Lucas, 2000). Dokazano je tudi, da je ta vrsta sposobna rasti v prisotnosti običajnih zaviralcev rasti, kot je acetat (Oliveira, Brito, Catulo, 2004). V raziskavah, ki so vključevale tudi identifikacijo vrst v kombuči (Coton, 2017), so ugotovili, da na prisotnost določenih vrst kvasovk, med njimi tudi *Pichia membranifaciens*, vpliva vrsta uporabljenega čaja, medtem ko na raznolikost in dinamiko drugih, prevladujočih vrst, ta faktor ni bistveno vplival. Navajajo tudi, da zaradi občasne prisotnosti in nizke številčnosti ta vrsta nima ključne vloge med fermentacijo. Identifikacije te kvasne vrste v naši kombuči tako ni posebno presenečenje, saj so jo že opisali na takšnem substratu.



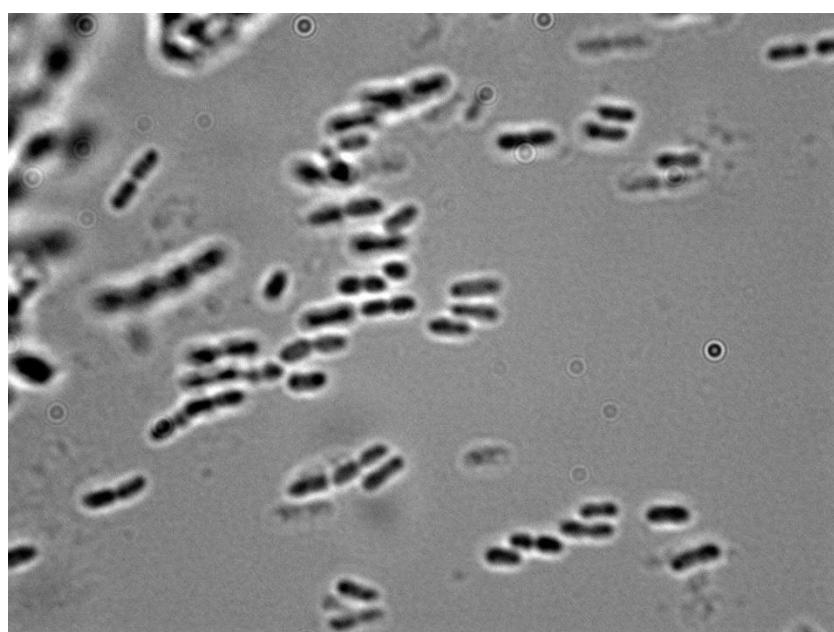
Slika 12: *Pichia membranifaciens* (Kurtzman, 2011)

Za preostale identificirane izolate smo potrdili, da pripadajo ocetnokislinskim bakterijam rodu *Acetobacter*. Za ocetnokislinske bakterije je na splošno značilna sposobnost pretvorbe etanola v ocetno kislino v prisotnosti kisika, medtem ko se rod *Acetobacter* odlikuje po sposobnosti oksidacije laktata in acetata v ogljikov dioksid in vodo. Bakterije iz rodu *Acetobacter* so bile izolirane iz industrijskih procesov fermentacije kisa in se pogosto uporabljajo kot začetne kulture za fermentacijo (Sokollek, Hammes, 1998). Pri bakterijskih vrstah, ki pripadajo rodu *Acetobacter* so identificirali ob ocetni kislini še stranski produkt glukonsko kislino, ki učinkovita zavirata rast nekaterih pogostih patogenih bakterij, ki lahko povzročijo želodčne motnje, slabost in drisko. V kombuči so te bakterije tega rodu že prepoznane in pomembne, saj so to lastnosti probiotikov z dokazanimi zdravstvenimi koristmi, ki vključujejo različne mehanizme za zaviranje rasti patogenih bakterij v prebavilih človeka (Kashyap, 2021).

Izolat ZE6055 pripada vrsti *Acetobacter okinawensis*. V literaturi smo zasledili, da vrsto *A. okinawensis* opisujejo kot po Gramu negativne paličke, aerobno, gibljivi in nesporogeno vrsto, kar smo potrdili tudi v naši raziskavi. Raziskave (Iino, Suzuki, Kosako, 2012) opisujejo vrsto, ki na trdnem mikrobiološkem gojišču GYP tvorijo kolonije s celim robom ter so gladke, maslene in kremaste. Nekateri sevi te vrste rastejo na manitolu, ne pa tudi na glutamatu. Oksidirajo acetat, laktat in etanol, ne proizvajajo pa celuloze iz D-glukoze oz. dihidroksiacetona.

iz glicerola. Bakterije rastejo pri temperaturi od 10 do 37 °C, z optimalno rastjo pri 30 °C. Vrednost pH za rast je primerna med 3,0 in 8,5.

Pri preostalih štirih izolatih (ZE2036, ZE3036, ZE5046 in ZE7056) pa je prišlo do nejasne uvrstitve med ocetnokislinskima vrsta znotraj rodu *Acetobacter*, in sicer med vrstama *Acetobacter lovaniensis* in/ali *Acetobacter ghanensis*. V literaturi smo zasledili za OKB vrsto *A. lovaniensis*, da brez kisika lahko preživi omejen čas, vendar je za presnovno aktivnost obvezna prisotnost kisika. Oksidira acetat, laktozo, etanol in/ali glukozo v glukonat. Ne proizvaja kisline iz fruktoze, L-sorboze, manitola, sorbitola, glicerola, saharoze ali lakoze. Proizvodnja kisline iz manoze, galaktoze, arabinoze in ksiloze je odvisna od seva. Vrsto *A. lovaniensis* običajno najdemo na sadju, cvetju, kisu ter v fermentirani hrani in pički. Optimalna vrednost pH za rast je med 4,0 in 6,0, temperaturni optimum pa imajo bakterije te vrste pri 30 °C. Iz raziskav (Cleenwerck, 2007 in Moens, 2014) pa izvemo, da je vrsta OKB *A. ghanensis* striktno aerobna, oksidira etanol, mlečno kislino, glukozo in/ali fruktozo v acetoin, ocetno kislino, ogljikov dioksid in/ali glukonat. Raste lahko na etanolu in mlečni kislini, ne raste pa na glukozi, fruktozi in citronski kislini. Etanol ji ne zadošča kot edini vir ogljika, amonijak pa kot edini vir dušika. Optimalna vrednost pH je med 5 in 6,5, raste pa lahko tudi do vrednosti 3,5.



Slika 13: *Acetobacter lovaniensis* (König, Unden, Fröhlich, 2009)

Po identifikaciji izolatov, ki smo jih pridobili tekom raziskave, nismo našli kakšne še neopisane vrste, a smo vseeno potrdili, da so v kombuči raznoliki mikroorganizmi, tako kvasovke kot tudi ocetnokislinske bakterije. Preostalih morebitnih mikroorganizmov (npr. laktobacilov) glede na izbiro pogojev in gojišč nismo pričakovali med izolati. V nalogi smo se tako omejili predvsem na izolate ocetnokislinskih bakterij. Iz narejenega filogenetskega drevesa (Slika 11) za OKB izolate lahko razberemo, da je največja genetska razlika med bakterijskima vrstama *A. okinawensis* sev JCM 25146 in *A. lovaniensis* sev LGM 1617 in našim izolatom ZE6055 na eni strani in vrstami *A. lovaniensis* sev LMG 1579, *A. lovaniensis* sev DSM 4491, *A. ghanensis* sev LMG 23848<sup>T</sup> in našimi izolati ZE2036, ZE5046 in ZE7056 na drugi strani. Slednja skupina se razdeli dalje na seve ZE2036, ZE5046 in ZE7056, kjer sta si ZE2036 in ZE5046 bolj sorodna ter na preostale vrste, kjer sta si bolj sorodna seva DSM 4491 in LMG1517 vrste *Acetobacter lovaniensis*.

Pri raziskovalni nalogi smo uporabili preverjene in zanesljive znanstvene metode za identifikacijo sevov. Imeli smo dostop do dobre opreme, vsekakor pa bi za še bolj natančno določitev pripadnosti določenim vrstam lahko uporabili dražje metode določevanja vrst, kot je sekvenciranje druge generacije (NGS, angl. next generation sequencing), ki omogoča določanje nukleotidnega zaporedja več milijonov fragmentov DNA hkrati, običajno kar celotnega bakterijskega/kvasnega genoma. Tako bi v prihodnje lahko v primeru izolatov ZE2036, ZE3036, ZE5046 in ZE7056 podrobnejše ločili med dvema vrstama, kot smo jih identificirali tekom te raziskave.

Ta raziskava pa s pridobitvijo novih izolatov čistih kultur ocetnokislinskih bakterij predstavlja odlično izhodišče za preučevanje njihovih zanimivih lastnosti. Glede na prvoten poskus produkcije biofilma resda ne zaznamo produkcije bakterijske celuloze pri teh OKB izolatih, vendar so lahko dobra izhodiščna podlaga za raziskovanje vodotopnih polisaharidov, saj smo tekom prvotnih raziskav opazili povečano viskoznost gojišč določenih čistih kultur. Tako lahko morda govorimo o producentih levana ali acetana ali acetonu podobnih heteropolisaharidov, za katere si obetamo možnost raznolike (bio)tehnološke uporabe.

## 7. Viri in literatura

- Aguiar, C. A., & Lucas, C. (2000). Yeasts Killer/Sensitivity Phenotypes and Halotolerance. *Food Technology and Biotechnology*.
- Arendt, E. K., Daenen, L., Wilkinson, S., Zannini, E., & Lynch, K. (2019). Physiology of Acetic Acid Bacteria and Their Role in Vinegar and Fermented Beverages. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*.
- Baldwin, B. G., Sanderson, M., Porter, J., Wojciechowski, M., Campbell, C., Donoghue, M., & Porter, M. (2010). The its Region of Nuclear Ribosomal DNA: A Valuable Source of Evidence on Angiosperm Phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden*.
- Borges, M. d., Gomes, R. J., Rosa, M. d., Castro-Gómez, R. J., & Spínosa, W. A. (2018). Acetic Acid Bacteria in the Food Industry: Systematics, Characteristics and Applications. *Food technology and biotechnology*.
- Cepec, E. (2021). *Vpliv sestave gojišča na odpornost ocetnokislinskih bakterij proti antibiotikom*. Maribor: Univerza v Mariboru, Fakulteta za naravoslovje in matematiko.
- Cleenwerck, I., & De Vos, P. (2008). Polyphasic taxonomy of acetic acid bacteria: An overview of the currently applied methodology. *International Journal of Food Microbiology*.
- Coton, M., Pawłowski, A., Taminiau, B., Burgaud, G., Deniel, F., Coulloumme-Labarthe, L., . . . Coton, E. (2017). Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. *FEMS Microbiology Ecology*.
- De Vero, L., Gullo, M., Zanichelli, G., & La China, S. (2018). Oxidative fermentations and exopolysaccharides production by acetic acid bacteria: a mini review. *Biotechnol Lett*.
- Ehrenreich, A., & Deppenmeier, U. (2009). Physiology of Acetic Acid Bacteria in Light of the Genome Sequence of *Gluconobacter oxydans*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*.
- Ercolini, D., Vitaglione, P., Troise, A. D., & De Filippis, F. (2018). Different temperatures select distinctive acetic acid bacteria species and promotes organic acids production during Kombucha tea fermentation. *Food Microbiology*.
- Escalante-Aburto, A., Oros, J. H., Jayabalan, R., Suárez, L. V., & Leal, J. M. (2018). A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. *CyTA - Journal of Food*.

- Iino, T., Suzuki, R., Tanaka, N., Kosako, Y., Ohkuma, M., Komagata, K., & Uchimura, T. (2012). *Gluconacetobacter kakiaceti* sp. nov., an acetic acid bacterium isolated from a traditional Japanese fruit vinegar. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.
- Jančič, N. (2019). *Sestava in viskoelastične lastnosti zunajceličnih polisaharidov pri izbranih sevih ocetnokislinskih bakterij*. Maribor: Univerza v Mariboru, Fakulteta za naravoslovje in matematiko.
- Kashyap, S., Pal, S., Chandan, G., Saini, V., Chakrabarti, S., Saini, N. K., . . . Saini, R. V. (2021). Understanding the cross-talk between human microbiota and gastrointestinal cancer for developing potential diagnostic and prognostic biomarkers. *Seminars in Cancer Biology*.
- Kim, M., & Chun, J. (2014). 16S rRNA Gene-Based Identification of Bacteria and Archaea using the EzTaxon Server. *Methods in Microbiology*.
- König, H., Unden, G., & Fröhlich, J. (2017). *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Mainz: Springer International Publishing AG.
- Kurzman, C., Fell, J. W., & Boekhout, T. (2011). The Yeasts: a taxonomic study definition, classification and nomenclature of the yeasts. *The Yeasts a Taxonomic Study*.
- Lachance, M.-A. (1995). Yeast communities in natural tequila fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek*.
- Marič, L. (2020). *Taksonomska opredelitev ocetnokislinskih bakterij Komagataeibacter sp. AV382, Komagataeibacter sp. AV436 in Komagataeibacter sp. AV429*. Maribor: Univerza v Mariboru, Fakulteta za naravoslovje in matematiko.
- Marsh, A. J., O'Sullivan, O., Hill, C., Ross, R. P., & Cotter, P. D. (2014). Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. *Food Microbiology*.
- Masih, E. I., Slezack-Deschaumes, S., Marmaras, I., Barka, E., Vernet, G., Charpentier, C., . . . Paul, B. (2001). Characterisation of the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible use in the biological control of *Botrytis cinerea*, causing the grey mould disease of grapevine. *FEMS Microbiology Letters*.
- Moens, F., Lefeber, T., & De Vuyst, L. (2014). Oxidation of Metabolites Highlights the Microbial Interactions and Role of *Acetobacter pasteurianus* during Cocoa Bean Fermentation. *Appl Environ Microbiol*.

- Mori Štornik, A. (2015). *Identifikacija ocetnokislinskih bakterij iz industrijske proizvodnje jabolčnega kisa na osnovi medgenske regije 16S-23S rDNA*. Maribor: Univerza v Mariboru, Fakulteta za naravoslovje in matematiko.
- Oliveira, M., Catulo, L., Leitão, F., Gomes, L., Silva, S., Vilas-Boas, L., . . . Peres, C. (2004). Biotechnology of olive fermentation of 'Galega' Portuguese variety. *Grasas y Aceites*.
- Park, J. K., Jung, J., & Khan, T. (2009). *Handbook of Hydrocolloids (Second Edition)*. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition.
- Park, J., & Khan, T. (2009). *Handbook of Hydrocolloids (Second Edition)*. Woodhead Publishing.
- Phung, A. C. (2015). *Kombucha Brewing: The Process*. Pridobljeno iz Discover: <https://www.discovermagazine.com/technology/kombucha-brewing-the-process>
- Singh, S., & Jindal, R. (2013). Evaluating the buffering capacity of various soft drinks, fruit juices and tea. *Journal of Conservative Dentistry*.
- Sokollek, S. J., Hammes, W. P., & Hertel, C. (1998). Description of *Acetobacter oboediens* sp. nov. and *Acetobacter pomorum* sp. nov., two new species isolated from industrial vinegar fermentations. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.
- Trček, J., & Janežič, S. (2013). *Mikrobiologija in genetika prokariontov: skripta z navodili za vaje za študijski program Biologija*. Maribor: Fakulteta za naravoslovje in matematiko.
- Uffindell, C. (2022). *Homemade Kombucha 101*. Pridobljeno iz Plum Deluxe: <https://www.plumdeluxe.com/homemade-kombucha-101>
- Wahid, F., Huang, L.-H., Zhao, X.-Q., Li, W.-C., Wang, Y.-Y., Jia, S.-R., & Zhong, C. (2021). Bacterial cellulose and its potential for biomedical applications. *Biotechnology Advances*.