

**58. srečanje mladih raziskovalcev Slovenije 2024**

**VPLIV RAZLIČNIH OKOLIJ NA (PROBIOTIČNO) BAKTERIJSKO  
SINTEZO VITAMINA B12**

Raziskovalna naloga

Raziskovalno področje: INTERDISCIPLINARNO – Biologija/Zdravstvo

Avtorja: Brina Homšak

Nuša Šen Bubnjevič

Mentorica: Vesna Hojnik

Somentorica: Barbara Janžič dr. med.



Maribor, april 2024

## Kazalo Vsebin

POVZETEK.....	V
ZAHVALA.....	VI
1 UVOD.....	1
1.1 Namen dela.....	2
1.2 Raziskovalno vprašanje.....	2
1.3 Hipoteza naloge.....	2
2 TEORETIČNI DEL.....	4
2.1 Vitamin B12.....	4
2.2 Probiotiki.....	6
2.2.1 Probiotična zdravila Linex, Prolife, PB Assist + in WAYA.....	7
2.3 Mikroorganizmi.....	8
2.3.1 Rod <i>Lactobacillus</i> .....	8
2.3.2 Rod <i>Bacillus</i> .....	9
2.3.3 Rod <i>Bifidobacterium</i> .....	10
2.4 Bakterijska proizvodnja vitamina B12.....	11
3 KEMIKALIJE, MIKROORGANIZMI IN PRIPOMOČKI.....	12
3.1 Delovni mikroorganizmi.....	12
3.2 Zaščitna oprema.....	12
3.3 Kemikalije, reagenti in zdravila.....	12
3.4 Laboratorijski pripomočki.....	12
4 METODE.....	14
4.1 Identifikacije bakterij.....	14
4.2 Določitev koncentracije vitamina B12.....	14
4.3 Preverjanje sinteze vitamina B12 pri probiotičnih zdravilih Linex, Prolife, WAYA in PB Assist +.....	15
4.4 Raziskovanje vplivov na sintezo vitamina B12.....	17

5	REZULTATI.....	19
5.1	Rezultati 1. faze: Proučevanje sinteze-določitev koncentracije vitamina B12 v probiotičnih zdravilih in izoliranih bakterijah .....	19
5.1.1	Sinteza vitamina B12 v vzorcih izoliranih bakterij iz proučevanih probiotičnih zdravil	20
5.1.2	Sinteza vitamina B12 v vzorcih suspenzij bakterij proučevanih probiotičnih zdravil	20
5.2	Rezultati 2.faze: Vpliv dodanih bakterij na sintezo vitamina B12.....	21
5.3	Rezultati 3. faza: Vpliv temperature .....	22
5.4	Rezultati 4. faze: Vpliv etanola .....	24
5.5	Rezultati 5. faze: Vpliv pH.....	25
6	RAZPRAVA.....	26
7	DRUŽBENA ODGOVORNOST .....	32
8	ZAKLJUČEK IN SKLEPI.....	33
9	VIRI IN LITERATURA .....	36

## Kazalo Slik

Slika 1: Kemijska struktura vitamina B12 in podobnih struktur. ( <a href="https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29216732/">https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29216732/</a> [24. 5. 2023]).....	4
Slika 2: Dvostopenjski imunokemijski kemoluminiscentni test z mikrodenci. Princip določanja koncentracije vitamina B12. (Abbott Diagnostics. [4. 7. 2023]).....	15

## Kazalo Grafov

Graf 1: Vpliv temperature gojišča na sintezo vitamina B12 v PB Assist +.....	24
Graf 2: Vpliv različnih dejavnikov (temperatute -zeleno; dodatka etanola-rumeno in znižanega pH-rdeče) na produkcijo vitamina B12 v gojišču s suspenzijo probiotika PB Assist+. ....	25

## Kazalo Tabel

Tabela 1: Priporočen dnevni vnos vitamina B12 glede na starost ( <a href="https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminB12-HealthProfessional/">https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminB12-HealthProfessional/</a> [24. 5. 2023]).....	5
Tabela 2: Koncentracija sintetiziranega vitamina B12 (na desni) v vzorcih po izolaciji kolonij različnih bakterij iz proučevanih probiotičnih zdravil in v vzorcih posameznih proučevanih bakterij (na levi).....	20
Tabela 3: Količina sintetiziranega vitamina B12 (na desni) pri določenih probiotikih in bakterijah (na levi). Z zeleno je označena zadovoljiva količina vitamina, z rdečo pa količina, ki je premajhna, da bi nam povedala, če je gojišče sploh vsebovalo kaj vitamina oz. je ta bila premajhna, da bi bila pravilno zaznana. Kontrola je gojišče brez dodane bakterijske suspenzije ali probiotika. ....	21
Tabela 4: Koncentracija sintetiziranega vitamina B12 (na desni) pri kombinacijah dveh izoliranih bakterij iz različnih gojišč (na levi). Z rdečo je označena nezadovoljiva koncentracija sintetiziranega vitamina B12, saj z njo ne moremo vedeti, če je gojišče sploh vsebivalo kaj vitamina oz. je bila ta premajhna, da bi bila pravilno zaznana. ....	21
Tabela 5: Koncentracija sintetiziranega vitamina B12 (na desni) pri kombinacijah treh izoliranih bakterij iz različnih gojišč (na levi). Z rdečo je označena nezadovoljiva koncentracija sintetiziranega vitamina B12, saj z njo ne moremo dokazati kakršnokoli proizvodnjo vitamina oz. je ta bila premajhna, da bi bila pravilno zaznana. ....	22

Tabela 6: Izmerjena koncentracija sintetiziranega vitamina B12 (na desni) iz kontrolnih gojišč, ki so bila inkubirana <b>pri 36 °C</b> (na levi). Z zeleno je označeno povprečje dveh merjenj dveh različnih gojišč (1, 2). .....	22
Tabela 7: Izmerjena koncentracija sintetiziranega vitamina B12 (na desni) iz gojišč, ki so bila hlajena <b>pri 4°C</b> (na levi). Z zeleno je označeno povprečje dveh merjenj dveh različnih gojišč (1, 2).....	23
Tabela 8: Izmerjena koncentracija sintetiziranega vitamina B12 (na desni) iz gojišč, ki so bila inkubirana <b>pri 40 °C</b> (na levi). Z zeleno je označeno povprečje dveh merjenj dveh različnih gojišč (1, 2). .....	23
Tabela 9: Izmerjena koncentracija sintetiziranega vitamina B12 (na desni) iz gojišč, ki so bila postavljena na <b>sobno temperaturo 23,5 °C</b> (na levi). Z zeleno je označeno povprečje dveh merjenj dveh različnih gojišč (1, 2). .....	23
Tabela 10: Izmerjena koncentracija sintetiziranega vitamina B12 (na desni) iz gojišč, ki so vsebovala dodatek <b>4mL etanola</b> (na levi). Z zeleno je označeno povprečje dveh merjenj dveh različnih gojišč (1, 2). .....	24
Tabela 11: Izmerjena koncentracija sintetiziranega vitamina B12 (na desni) iz gojišč TIO z <b>nižjim pH - 6,4 ± 0,2</b> (na levi). Z zeleno je označeno povprečje dveh merjenj dveh različnih gojišč (1, 2). .....	25

## POVZETEK

Cilj raziskovalne naloge je bil ugotoviti, ali bakterije, prisotne v probiotičnih zdravilih, proizvajajo vitamin B12, in vplive na njegovo sintezo. Vitamin B12 je pomemben za bakterijsko delovanje, saj je potreben za delovanje številnih encimov v bakterijskem metabolizmu in bi zato lahko tudi imel pomembno vlogo v človeški mikrobioti. V raziskavi smo proučevali ali izbrane vrste bakterij proizvajajo vitamin B12, ali ga proizvajajo bakterije izolirane iz probiotičnih zdravil ter kakšen vpliv imajo na proizvodnjo temperatura, pH in v gojišče dodan etanol. V raziskavi smo uporabili zdravila Linex, Prolife, PB Assist + in Waya Biotic. Večje količine vitamina B12 smo zaznali samo pri suspenzijah zdravil Prolife in PB Assist +. Izolirane bakterije vitamina B12 niso proizvajale v količinah/koncentracijah, ki bi jih lahko zaznali z uporabljenimi metodami merjenja. Želeli smo preveriti, ali različne vrste bakterij med sabo spodbujajo sintezo vitamina B12, če jih inkubiramo v istem gojišču. Uporabili smo bakterije, izolirane iz zdravila PB Assist +, vendar vitamina B12 nismo zaznali. Temperaturni vplivi so na suspenziji zdravil Prolife in PB Assist + delovali različno, produkcija vitamina je bila pri zdravilu PB Assist + najuspešnejša pri 40 °C, pri zdravilu Prolife pa pri 4 °C. Produkcija vitamina je bila pri optimalnem pH (7,2) večja kot pri nižjem (6,4) ter večja v gojišču, ki ni imel dodanega etanola.

**Ključne besede:** Vitamin B12, sinteza, probiotična zdravila, mikrobiota, bakterije, vpliv temperature, vpliv pH, vpliv etanola.

## ZAHVALA

Da nama je bilo omogočeno raziskovalno delo, bi se radi zahvalili Nacionalnemu laboratoriju za zdravje, okolje in hrano (NLZOH), da sva lahko raziskovali v njihovem laboratoriju ter se zahvaljujemo celotni pomoči specialistov klinične mikrobiologije. Prav tako se zahvaljujemo Univerzitetnemu kliničnemu centru Maribor, Oddelku za laboratorijsko diagnostiko, ki nama je omogočil merjenje koncentracij vitamina B12. Še posebej pa sva hvaležni za pomoč mentorice iz NLZOH, ki naju je skozi raziskovalno delo usmerjala in nama pomagala priti do rezultatov.

Radi bi se tudi zahvalili mentorici iz najine izobraževalne ustanove za usmeritev najinih idej na pravo pot, ko se je najina ideja še samo razvijala ter podporo v raziskavi.

Najlepša hvala tudi družinskim članom, ki so naju podpirali ob vsakem koraku, pa čeprav je bil včasih kakšen napačen.

Brez vaše pomoči nama ne bi uspelo. Hvala.

# 1 UVOD

Vitamin B12 je za naše telo pomemben vitamin, saj vpliva na ustrezno delovanje našega živčevja, prav tako pa je pomemben dejavnik pri tvorbi rdečih krvničk in sintezi deoksiribonukelinske kisline (DNK) (National Institutes of Health, 2022). Ljudje vitamina B12 ne morejo proizvesti sami in ga zato morajo pridobiti od drugih organizmov, ki ga lahko (Q. Gu, P. Li, 2016). Proizvajajo ga lahko nekatere bakterije, prisotne v človeški mikrobioti, ki so prisotne v debelem črevesu, kjer organizem vitamina ne more absorbirati in zato bakterijsko sintetiziranega vitamina ne uporablja (D. Nohr, H.K. Biesalski, 2016).

Vitamin B12 bi lahko bil pomemben dejavnik, ki bi zagotavljal zdravo človeško mikrobioto, saj ga bakterije, prisotne v črevesju, sintetizirajo in ga tudi uporabljajo. Potreben je za delovanje številnih encimov v bakterijskem metabolizmu. Izsledki laboratorijskih študij kažejo na to, da je lahko vitamin B12 povezan s spremembami v številčnosti in raznolikosti bakterij, vendar to variira glede na obliko kobalamina ali dejavnike gostitelja (M. Heather, Guetterman in drugi, 2021). Pomen slednjega je prisotnost vitamina B12 v probiotičnih zdravilih, kjer bi lahko na črevesno mikrobioto vplival z dodatnim pozitivnim učinkom.

Naravni obliki vitamina B12, metilkobalamin (MeCbl) in adozilkobalamin (AdoCbl), sintetizirajo samo prokarionti preko aerobnih ali anaerobnih poti (Balabanova, 2021). Vitamin je produkt, ki nastane z zamenjavo adozila in metila s ciano skupino med postopkom ekstrakcije, da se zagotovi stabilnost spojine (Y. Mohammed, B. Lee, Z. Kang, D. Guocheng, 2014).

Bakterije, prisotne v naši mikrobioti, prav tako proizvajajo ta vitamin (H. M. Guetterman, S. L. Huey, R. Knight in drugi, 2022). Podobno bi ga zato lahko proizvajali bakterijski sevi, prisotni v probiotičnih zdravilih. Rodovi, kot so *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* in *Bacillus*, so znani po tem, da njihove vrste proizvajajo vitamin B12 (M. J. Morowitz, E. Carlisle, J. C. Alverdy, 2011) in so tudi prisotni v probiotičnih zdravilih PB Assist +, Prolife, Linex in Waya.



## **1.1 Namen dela**

Ker je vitamin B12 pomemben za bakterijsko delovanje in je njegova prisotnost potrebna v človeški mikrobioti, smo želeli ugotoviti, ali bakterije v probiotičnih zdravilih proizvajajo vitamin B12 in kaj bi lahko vplivalo na njegovo proizvodnjo.

## **1.2 Raziskovalno vprašanje**

V1: Kateri rodovi bakterij bodo sintetizirali vitamin B12?

V2: Ali bodo bakterijske vrste, prisotne v probiotičnih zdravilih Linex, Prolife, PB Assist + in Waya, proizvajale vitamin B12?

V3: Kakšne koncentracije vitamina B12 bomo zaznali pri suspenziji probiotičnega zdravila PB Assist +?

V4: Kako se bodo bakterije v probiotičnih zdravilih Prolife in PB Assist + odzvale pri inkubaciji pri 4 °C, 23,5 °C in 40 °C. Ali se bodo pojavile razlike v koncentracijah sintetiziranega vitamina B12?

V5: Ali bo dodan etanol pomagal ali škodoval procesu sintetiziranja vitamina B12 pri bakterijah probiotičnih zdravil Prolife in PB Assist +?

V6: Kako bo sprememba pH vplivala na bakterijsko sposobnost proizvodnje vitamina B12?

## **1.3 Hipoteza naloge**

Pred začetkom dela za raziskovalno nalogo smo se skupaj odločili o zaključkih, ki smo jih med in ob koncu dela pričakovali.

H1: Glede na prejšnje raziskave predvidevamo, da bodo izbrane izolirane bakterije *Bacillus coagulans*, *Lactobacillus ramnosous*, *Lactobacillus plantarum* sintetizirale vitamin B12.

H2: Bakterijske vrste, prisotne v probiotičnih zdravilih Linex, Prolife, PB Assist + in Waya, bodo proizvajale vitamin B12.

H3: Pri suspenziji celotnega probiotičnega zdravila PB Assist + smo zaznali večjo koncentracijo vitamina B12 kot pri posameznih izoliranih bakterijah. Ker se bakterije v tem probiotičnem zdravilu pojavljajo v kombinaciji, smo predvidevali, da bodo kombinacije izoliranih bakterij iz probiotičnega zdravila PB Assist + proizvedle več vitamina B12.

H4: Bakterije v probiotičnih zdravilih Prolife in PB Assist + bodo pri inkubaciji pri 4 °C proizvedle manj vitamina kot pri sobni temperaturi (23,5 °C), optimalni temperaturi za gojenje bakterij (36 °C) in pri 40 °C, zaradi manjše kinetične energije reagentov, vključenih v sintezo vitamina B12 in zaradi manjše rasti bakterij.

H5: Pri 40 °C bodo bakterije v probiotičnih zdravilih Prolife in PB Assist + proizvedle večjo koncentracijo vitamina B12 kot pri optimalni temperaturi za rast bakterij (36 °C), zaradi večje kinetične energije reagentov, vključenih v sintezo vitamina B12.

H6: Zasledili smo, da so v posameznih raziskavah gojiščem za vzpodboditev sinteze vitamina B12 dodali raztopino etanola, zato predvidevamo, da bodo bakterije v probiotičnih zdravilih Prolife in PB Assist + v gojiščih z dodanim etanolom proizvedle več vitamina B12.

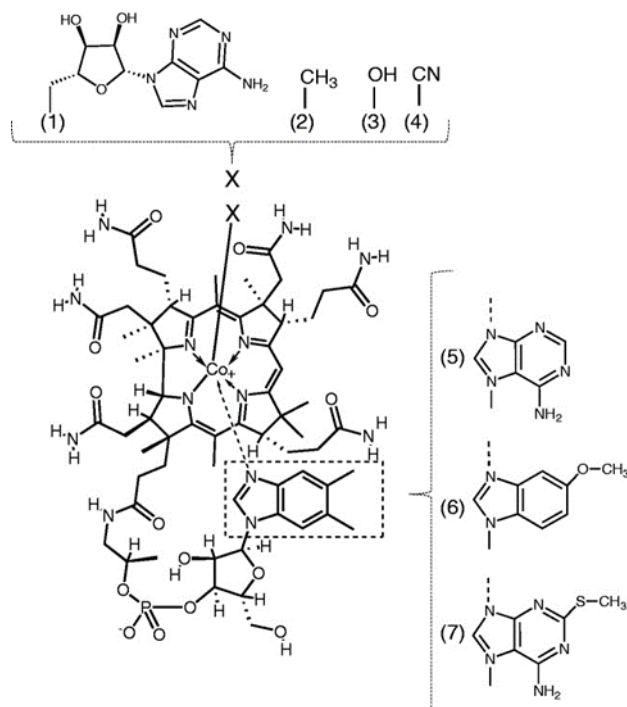
H7: V gojišču z nižjim pH ( $6,4 \pm 0,2$ ) bo proizvedeno manj vitamina B12 kot v gojišču z optimalnim pH ( $7,1 \pm 0,2$ ), saj je v optimalnem gojišču rast bakterij večja.

## 2 TEORETIČNI DEL

### 2.1 Vitamin B12

Vitamin B12 je vodotopen vitamin, ki je sestavljen iz kobalaminov (vsebuje kovinski ion kobalt) v kompleksne strukture (Slika 1) in je ekstremno pomemben za razvoj in obstoj našega telesa. Je kofaktor dveh encimov: metionin sintaze in encima L-metilmalonil-CoA mutaze. Omogoča dobro delovanje našega živčevja in je povzročitelj mielinizacije le tega, prav tako pa je pomemben dejavnik, ki sodeluje pri nastajanju rdečih krvničk - eritrocitov in DNK sintezi. To je še posebej pomembno v tkivih, kjer se celice delijo hitro, npr. v kostnem mozgu, kjer nastajajo eritrociti.

Vitamina B12 živali in rastline ne morejo proizvajati, proizvajajo ga lahko le določene bakterije. Rastlinojede živali so zato odvisne od absorpcije vitamina B12, ki ga proizvajajo bakterije v njihovem črevesju. Mesojede živali in tudi človek pa zagotavljajo potrebe po vitaminu B12 z zaužitjem hrane živalskega izvora, saj so v evoluciji izgubile sposobnost zadostne proizvodnje v črevesju.



Slika 1: Kemijska struktura vitamina B12 in podobnih struktur.

(<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29216732/> [24. 5. 2023])

Če želimo vitamin B12 redno uživati, moramo imeti raznoliko in redno prehrano. V to vključujemo tudi različne vrste mesa in mesnih ter mlečnih izdelkov, ki vsebujejo ta vitamin. To so ribe, perutnina, mleko, jajca ipd. Še posebej veliko ga vsebujejo školjke, goveja jetra in rdeče meso. Presenetljivo pa vitamin B12 vsebujejo tudi preprosti kosmiči in prehranske kvasovke, ki so neškodljive za naše telo, saj se v telesu ne morejo razvijati in rasti. Te so velikokrat uporabljene v vedno bolj priljubljeni pijači, kombuču.

Priporočena dnevna količina zaužitega vitamina B12 se glede na starost posameznika razlikuje. V Tabeli 1 lahko opazimo tudi, kako nosečnost in dojenje vplivata na potrebo po vitaminu, saj je ta zelo pomemben za razvoj živčevja pri zarodku.

Starost	Moški	Ženske	Nosečnost	Dojenje
Rojstvo do 6 mesecev	0.4 mcg	0.4 mcg		
7-12 mesecev	0.5 mcg	0.5 mcg		
1-3 leta	0.9 mcg	0.9 mcg		
4-8 let	1.2 mcg	1.2 mcg		
9-13 let	1.8 mcg	1.8 mcg		
14-18 let	2.4 mcg	2.4 mcg	2.6 mcg	2.8 mcg
19+ let	2.4 mcg	2.4 mcg	2.6 mcg	2.8 mcg

Tabela 1: Priporočen dnevni vnos vitamina B12 glede na starost (<https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminB12-HealthProfessional/> [24. 5. 2023])

Ljudje, ki ne zaužijejo potrebnih količin vitamina zaradi raznolikih diet (vegetarijanci, vegani) ali zdravstvenih stanj (perniciозна anemija), morajo tega pridobiti na drugačne načine. Eden od teh so prehranski dodatki, ki so običajno v obliki hidroskobalamina, ki se sicer uporablja v zdravstvene namene pri zastrupitvi s cianidom. Poznamo jih tudi v obliki metilkobalamina, hidroskobalamina in adenožil kobalamina, vendar ni dokazano, kateri prehranski dodatek je najučinkovitejši (National Institutes of Health, 2022).

Tako z rednim uživanjem vitamina B12 preprečimo nastanek megaloblastne anemije, ki povzroči kronično utrujenost in občutek nemoči (National Institutes of Health, 2022). Megaloblastna anemija, je vrsta makrocitne anemije, kjer zaradi pomanjkanja vitamina B12 pride do zavrte sinteze DNK v rdečih krvničkah oz. te postanejo nenormalno velike in tako

hitreje razpadejo. Poleg kroničnega slabega počutja lahko pod simptome te anemije vključimo tudi parestezijo, težave z ravnotežjem, periferno nevropatijo, psihološke težave, motnje prebavil ipd. Do pomanjkanja vitamina B12 v našem telesu lahko pride tudi zaradi slabše absorpcije – zavrto nastajanje intrinzičnega faktorja v želodčni kislini, ki sicer omogoča vezavo vitamina B12 in njegovo absorpcijo v črevesju, alkoholizma, nosečnosti, kroničnega obolenja jeter itd. (Cleveland Clinic, 2022).

Bakterije v mikrobioti človeških prebavil (črevesja) sintetizirajo vitamin B12 in neabsorbirani vitamin gostitelja tudi uporabljajo. Vitamin se pri človeku aktivno absorbira proti koncu tankega črevesa v ileumu s pomočjo intrinzičnega faktorja (iz želodca) in se transportira čez celične membrane v krvni obtok, ki omogoča prenos do vsake celice v telesu. Ljudje absorbirajo približno 50 % vitamina B12 pri peroralnem odmerku 1 µg, preostanek vitamina, ki pa doseže debelo črevo pa ga približno 80 % črevesne bakterije presnavljajo in pretvarjajo v analoge vitamina B12 (Heights, 2022. in H. M. Guetterman, S. L. Huey, R. Knight in drugi, 2022). Ker se bakterije, ki sintetizirajo vitamin nahajajo v debelem črevesu, kjer organizem vitamina ne more prevzeti več, je količina bakterijsko sintetiziranega vitamina, ki se absorbira zanemarljiva oz. nezadostna (D. Nohr, H.K. Biesalski, 2016).

## **2.2 Probiotiki**

Probiotiki so živi organizmi, ki imajo ob zaužitju v zadostnih količinah ugoden učinek na zdravje gostitelja (Kaj so probiotiki?).

Človeško črevesje je kompleksen ekosistem, v katerem mikrobiota, hrana in gostujoče celice med seboj sodelujejo. Pri tem je mikrobiota ključen del črevesja, saj ima vlogo pri metabolizmu, učinku pregrade in trofični funkciji. Bakterijsko neravnovesje lahko povzroči različne bolezni, zato je prisotno zanimanje v povezavi s pozitivnim preoblikovanjem mikrobiote s pomočjo živih bakterij oz. probiotikov.

Eden izmed pozitivnih učinkov probiotikov je učinek »pregrade« ali preprečitev kolonizacije patogenih bakterij oz. njeno omejitev. To bi lahko bila posledica proizvodnje širokega spektra inhibicijskih bakteriocinov, metabolitov kot so kratko verižne maščobne kisline, ki povzročajo

znižanje pH, ki je manj ugoden za rast bakterij ali biosurfaktantov s protimikrobnim delovanjem.

Drugi način delovanja probiotikov na mikrobioto se nanaša na izboljšanje pregradne funkcije črevesne sluznice. Probiotiki lahko delujejo na ravni signalnih poti, tako da povzročijo povečano proizvodnjo črevesne sluzi, delujejo tudi na beljakovine, ki omogočajo tesni stik med črevesnimi epitelnimi celicami, tako da izboljšajo njihove fiziološke pregradne funkcije.

Tretji način delovanja je učinek na imunski sistem, saj se več kot 70 % imunskih celic nahaja v črevesju, še posebej v tankem. Učinki probiotičnih bakterij so lahko lokalni in omejeni samo na stimulacijo črevesne imunosti ali sistemski.

Probiotični sevi imajo lahko tudi neposredno koristne učinke z zagotavljanjem encimov, ki izboljšajo prebavne simptome bolnikov (M. J. Butel, 2014).

### **2.2.1 Probiotična zdravila Linex, Prolife, PB Assist + in WAYA**

Linex vsebuje tri vrste živih liofiliziranih (tj. osušene pri nizki temperaturi) mlečnokislinskih bakterij (probiotikov): *Lactobacillus acidophilus* (vrste *L. gasseri*), *Bifidobacterium infantis*, *Enterococcus faecium*.

Ena trda kapsula vsebuje: *Lactobacillus acidophilus* (*L. gasseri*) (najmanj 4.500.000 kolonijskih enot), *Bifidobacterium infantis* (najmanj 3.000.000 kolonijskih enot), *Enterococcus faecium* (najmanj 4.500.000 kolonijskih enot) (Linex, trde kapsule).

Prolife kapsule vsebujejo bakterije *Bacillus coagulans* MTCC 5260 (*Lactobacillus sporogenes*), vlaknine in vitamine B skupine (Prolife, 20 kapsul).

PB Assist + kapsule vsebujejo probiotične bakterije: *Lactobacillus acidophilus*, *L. salivarius*, in *L. casei*, *Bifidobacterium lactis*, *B. bifidum*, in *B. longum* ter kratka verižna prebiotična vlakna – fruktooligosaharidi, ki jih najdemo v sadju in zelenjavi in vzpodbujajo rast bakterij (PB Assist).

Kapsule zdravila Waya Biotic Forte vsebujejo hidroksipropilmetil celulozo (E464), *Lactobacillus ramnosus* GG (ATCC 53103) ter maltodekstrine (Waya Forte Biotic mikroorganizmi).

## 2.3 Mikroorganizmi

Samo določeni mikroorganizmi sintetizirajo vitamin B12 in le nekaj jih uspešno živi tudi v našem telesu – črevesna mikrobiota.

Za našo raziskavo smo se omejili na rodove *Lactobacillus*, *Bacillus* in *Bifidobacterium*, saj so bili v večini prisotni v izbranih probiotičnih zdravilih in so znani kot glavni mikroorganizmi, ki sintetizirajo vitamin B12. Vitamin B12 sintetizirajo tudi različni rodovi *Enterococcus*, *Salmonella* in *Bacteroides* (M. J. Morowitz, E. Carlisle, J. C. Alverdy, 2011).

### 2.3.1 Rod *Lactobacillus*

Ves rod še ni natančno raziskan, vendar je veliko pripadnikov znanih po zmožnosti sintetiziranja vitamina B12; *Lactobacillus plantarum*, *L. reuteri*, *L. rossiae*, *L. acidophilus*, *L. salivarius*, *L. casei*, *L. sporogenes* ipd. Nekatere od teh smo tudi skozi samo raziskavo identificirali in tako lahko sklepali, da sintetizirajo določen vitamin.

Ti mikroorganizmi se v zdravstvu in prehrani uporabljajo že več let in se tako njihova uporaba še povečuje. Največkrat so zaznani kot probiotični mikroorganizmi, ki lahko doprinesejo veliko pozitivnih učinkov, kot so moduliranje imunosti, nižanje holesterola, zdravljenje revmatoidnega artritisa in tudi preprečevanje nastanka raka. Izboljšali naj bi tudi intoleranco na laktozo in zmanjšali učinke atopičnega dermatitisa ter Crohnove bolezni (kronična vnetna bolezen, ki prizadene dele prebavnega trakta). Največkrat se uporabljajo za zmanjšanje driske (tudi pri uporabi antibiotikov), zaprtja, ustavitve kandidoze in preprečevanje okužbe sečil (UTI).

V vlogi probiotikov imajo sposobnost oprijemanja na celice, izključitev patogenov – proizvajajo kisline, vodikov peroksid in bakteriocine, ki ustavljajo rast tujkov. Prav tako pa vzdržujejo odpornost proti vaginalnim mikrobicidom (zato so zelo množično prisotni v sluznici

nožnice) in vzdržujejo ter tvorijo normalno, uravnoteženo mikrobioto, saj so sami neinvazivni in varni za naše telo (G. Reid, 1999).

### 2.3.2 Rod *Bacillus*

Pri nas je bila v večini prisotna bakterija *Bacillus cereus* (čeprav naj bi Prolife kapsula vsebovala samo *Bacillus coagulans*, je bakterija *B. cereus* vseeno zrastle na trdnih gojiščih, na katero je bila nanešena kapsula), ki je znana kot fakultativna anaerobna bakterija, ki jo lahko najdemo v hrani, zemlji in vegetaciji. Ob vstopu v naše telo lahko povzroči blage simptome kot so driska, bruhanje, slabost ipd. Vendar jo v večih primerih lahko povežemo tudi z resnimi okužbami pri imunsko oslabljenih gostiteljih in tako lahko povzroči težka bolezenska stanja. Primer tega je sepsa, ki lahko vodi do septičnega šoka, kar je smrtno nevarno. Drugi primer hude okužbe je endoftalmitis, ki zaradi množičnega razmnoževanja bakterij kot je *Bacillus cereus*, povzroči vnetje notranjih plasti oči, kar lahko vodi tudi izgube vida (R. H. McDowell, E. M. Sands, H. Friedman, 2023).

Že prej omenjena bakterija *Bacillus coagulans* je znana po svojih probiotičnih sposobnostih. Najdemo jo v naši črevesni mikrobioti, kjer producira mlečno kislino. S svojim probiotičnim učinkom nam tako lahko pomaga pri različnih boleznih, ki povzročijo npr. drisko, in hkrati pomaga brez nevarnosti razširitve odpornosti na antibiotike. Zraven lahkih, vsakodnevnih boleznih pa lahko ima pozitiven vpliv na vnetne črevesne bolezni (IBD): ulcerozni kolitis in Crohnovo bolezen, sindrom razdražljivega črevesja (IBS) in pavčitis. Veliko študij je namreč dokazalo, da je za bolnike z IBS-om redno jemanje probiotikov s to določeno bakterijo izboljšalo njihovo kakovost življenja, čeprav je večina testirancev bilo odraslih in starejših. Vseeno pa takšnih študij ne smemo zanemariti, saj IBS samemu posamezniku vseeno otežuje življenje s stalnimi krči, zaprtostjo, drisko, bolečino v predelu trebuha ipd. Enako lahko rečemo za pavčitis (vnetje predela, kjer se črevo dvakrat zavije, preden se poveže z analnim kanalom – to se zgodi pri pacientih z odstranjenim debelim črevesjem), ki povzroča močne bolečine v spodnjem delu trebuha, konstantno potrebo po uriniranju in včasih tudi krvav urin. Prav tako je uživanje probiotikov s to bakterijo izboljšalo kakovost življenja bolnikom z ulceroznim kolitisom, ki je avtoimunska bolezen in sodi v skupino IBD, s prizadeto sluznico danke in debelega črevesja (J. Cao, Z. Yu, W. Liu in drugi, 2020).



### 2.3.3 Rod *Bifidobacterium*

Ta rod je eden glavnih sestavnih delov črevesne mikrobiote in deluje zelo pozitivno na telo njihovih gostiteljev. Iz tega razloga so te bakterije velikokrat dodane kot aktivne sestavine v številnih funkcionalnih živilih. Velikokrat so zato imenovane kot probiotične bakterije, saj imajo probiotične učinke kot je zaščita gostitelja pred patogeni s konkurenčno izključitvijo, modulacijo imunskega sistema in zagotavljanje hranil s pomočjo razgradnje neprebavljivih prehranskih ogljikovih hidratov. Vseeno pa so močno povezane z boleznimi, ki nastanejo zaradi spremembe mikrobiote v gastrointestinalnem traktu, to sta npr. vnetna črevesna bolezen in nekrotizirajoči enterokolitis, ki predstavlja vnetje črevesja, v večini prisoten pri nedonošenčkih. Same po sebi so zelo kompetitivne, zato v vsakem okolju, v katerem se naselijo, prevladajo. To jim omogočajo mnoge presnovne sposobnosti, izogibanje prilagodljivemu imunskemu sistemu gostitelja in kolonizacija gostitelja preko specifičnih dodatkov ipd. (A. O'Callaghan, Sinderen van D., 2016)

V naši raziskavi so se pojavili različni sevi, vendar smo največkrat izolirali *Bifidobacterium bifidum* in *B. animalis* oz. podvrsto, znano kot *B. lactis*. Ta je dobila ime po svoji anaerobni sposobnosti proizvodnje mlečne kisline. Ob prvi izolaciji bakterije je ta bila identificirana kot *Bifidobacterium bifidum*, nato je bila po novi klasifikaciji prerazvrščena v *B. animalis* in na koncu le v novo vrsto, kot se imenuje zdaj. Glede na dodatne študije pa se je ugotovilo, da ne zadustuje kriterijem nove vrste, zato je bila označena kot podvrsta: *Bifidobacterium animalis subs. lactis*. (M. Jungerson, A. Wind, E. Johansen in drugi, 2014)

## 2.4 Bakterijska proizvodnja vitamina B12

Vitamin B12 obsega dve pomembni obliki koencimov: metilkobalamin in adenzilkobalamin. Vitamin je produkt, ki nastane z zamenjavo adenzila in metila s ciano skupino med postopkom ekstrakcije, da se zagotovi stabilnost spojine.

Industrijska mikrobna fermentacija se uporablja kot alternativna metoda za kemično sintezo vitamina B12, ki zahteva vsaj 60 korakov.

Naraven način pridobivanja vitamina B12 je sinteza, razdeljena na približno 30 encimsko posredovanih korakov aerobno ali anaerobno. Aerobna sinteza vitamina je bila na primer beležena pri bakteriji *Pseudomonas denitrificans*, anaerobna pa je značilna za *Bacillus megaterium*, *Propionibacterium shermanii*, *Salmonella enterica serovar Typhimurium* in *Lactobacillus reuteri* (Y. Mohammed, B. Lee, Z. Kang, D. Guocheng, 2014).

Pri aerobnih in anaerobnih organizmih se način, na katerega je sintetiziran vitamin B12, razlikuje po mehanizmih krčenja obročev. Aerobni proces uporablja dva encima in je odvisen od molekularnega kisika, v popolnem nasprotju z anaerobnim mehanizmom, ki ga nadzira kobalt in zahteva samo en encim (C. A. Roessner, P. J. Santander, A. I. Scott, 2001).

### **3 KEMIKALIJE, MIKROORGANIZMI IN PRIPOMOČKI**

#### **3.1 Delovni mikroorganizmi**

- Sev bakterije *Bacillus coagulans*,
- Sev bakterije *Lactobacillus ramosous*,
- Sev bakterije *Lactobacillus plantarum*

#### **3.2 Zaščitna oprema**

- Zaščitne rokavice za enkratno uporabo
- Zaščitna halja

#### **3.3 Kemikalije, reagenti in zdravila**

- Prolife
- PB Assist + (proizvajalec)
- Linex (proizvajalec)
- Waya Biotic (proizvajalec)
- Etanol
- Diagnostični komplet - reagent za določitev vitamina B12 (Abbot diagnostics)

#### **3.4 Laboratorijski pripomočki**

- Cepilne zanke
- Sterilne epruvete
- Stojalo za epruvete
- Sterilna pinceta
- Sterilne škarje
- Sterilne pipete

- Stresalnik (vorteks mešalo)
- Aerobni inkubator
- Anaerobni inkubator
- Gojišča krvnega agarja
- Gojišča COH agarja (Columbia agar s 5% konjsko krvjo)
- Injekcijska brizga
- Sterilni filter, ki prepušča 0.20  $\mu\text{m}$
- Tekoča gojišča MRS
- Tekoča tioglikolatna gojišča (TIO)
- Tekoča tioglikoltna gojišča z nižjim pH ( $6,4 \pm 0,2$ )
- Analizator Abbott Alinity i.

### **3.5 Laboratorijske naprave**

- MALDI Biotyper® sirius
- klinični analizator Alinity i, proizvajalca Abbott Diagnostics

## 4 METODE

### 4.1 Identifikacije bakterij

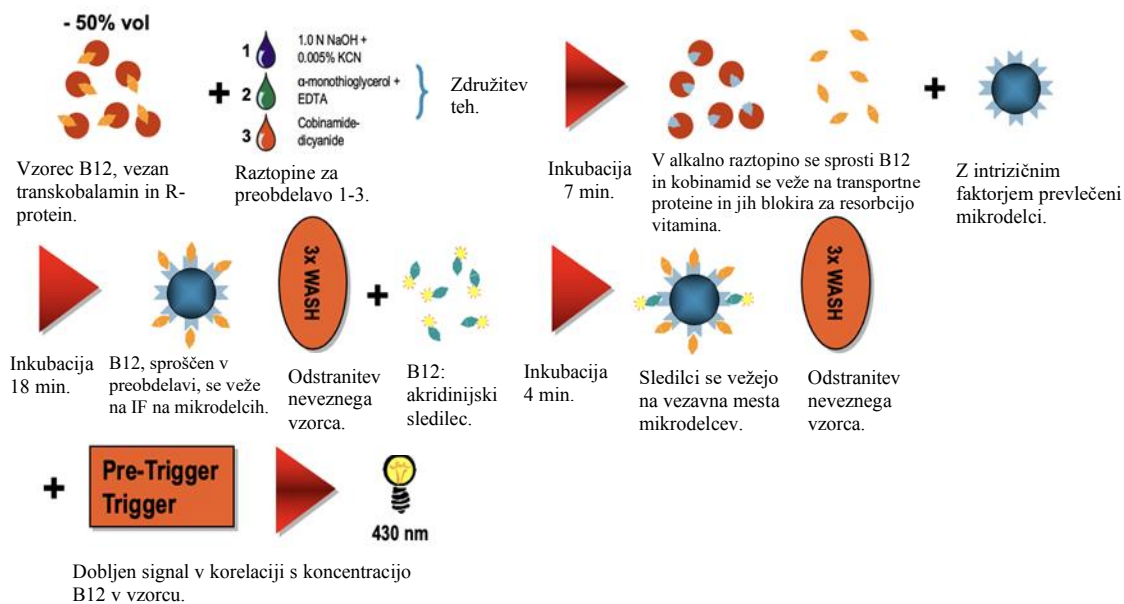
Bakterije, ki smo jih precepili na trdna gojišča, smo identificirali z Brukerjevim MALDI Biotyper® sirius, gre za tehnologijo MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight). Ta deluje tako, da primerja masni spekter neznanega organizma z zabeleženim masnim spektrom znanega organizma (MALDI Biotyper® Library).

Iz trdnega gojišča smo prenesli izbrane kolonije izoliranih bakterij na tarčno ploščo in dodali mravljinčno kislino in nato matriks. Nato smo tarčno ploščo vstavili v MALDI Biotyper®, ki avtomatsko opravi analizo vzorcev (The MALDI Biotyper® System).

### 4.2 Določitev koncentracije vitamina B12

Za določitev koncentracije vitamina B12 smo uporabili klinični analizator Alinity i, proizvajalca Abbott Diagnostics. Ta nam je lahko izmeril koncentracije, višje od 109 pmol/L. Določitev temelji na dvostopenjskem imunokemijskem kemoluminiscenčnem testu z uporabo mikrodlecev – CMIA (Chemiluminescent Microparticle Immunoassay).

Za določitev potrebujemo vsaj 700 µl vzorca, ki ga s pomočjo pipete odpipetiramo v namensko stojalo, ki jih vstavimo v analizator. V reakcijskih posodah se vzorec najprej zmeša z reagentom za odcepitev B12 od proteinskih molekul v vzorcu. Prosti vitamin B12 iz vzorca se v drugi stopnji veže z intrinzičnim faktorjem, ki je kot vezavno mesto nanešen in obdaja paramagnetne mikrodlece v reagentu. Paramagnetni delci predstavljajo osnovo, na kateri poteka reakcija vezave vitamina in konjugata. Po inkubaciji in spiranju se dodajo z akridinijem označena detekcijska protitelesa (konjugat) vitamina B12, ki se vežejo na preostala prosta vezavna mesta (na intrinzični faktor) na paramagnetnih mikrodlecih. S pomočjo vodikovega peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) v raztopini analizator odcepi vezana protitelesa, dodatek natrijevega hidroksida (NaOH) pa sproži razvoj kemiluminiscence akridinija. Izmerjena kemiluminiscenca je obratno sorazmerna koncentraciji vitamina B12 v vzorcu (Slika 2) (Abbott Diagnostics, 2017).



Slika 2: Dvostopenjski imunokemijski kemoluminiscentni test z mikrodelci. Princip določanja koncentracije vitamina B12. (Abbott Diagnostics. [4. 7. 2023])

### 4.3 Preverjanje sinteze vitamina B12 pri probiotičnih zdravilih Linex, Prolife, WAYA in PB Assist +

#### 1.1 faza: Proučevanje sinteze-določitev koncentracije vitamina B12 v bakterijah probiotičnih zdravilih in izoliranih bakterijah

V prvi fazi smo želeli preveriti ali izbrane izolirane bakterije *Bacillus coagulans*, *Lactobacillus ramosus*, *Lactobacillus plantarum* proizvajajo vitamin B12 in če je vitamin B12 prisoten po gojenju suspenzije probiotičnih zdravil Prolife, PB Assist +, Linex in Waya.

Vsebine tablete vsakega zdravila smo suspendirali v tri vrste tekočih gojišč: MRS bujon, tioglikolatni bujon (TIO) ter tioglikolatni bujon z nižjim pH ( $6,4 \pm 0,2$ ), ki smo jih z vorteksom premešali in nato gojišča inkubirali 48 h pri  $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Po inkubaciji smo bakterije iz vsakega tekočega gojišča precepili na trdna gojišča; na plošče krvnega agarja, ki smo jih enako inkubirali 48 h pri  $36\text{ }^{\circ}\text{C}$  in plošče COH (Columbia agar s 5 % konjsko krvjo) agarja, ki smo jih inkubirali anaerobno 48 h pri  $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ . To smo storili tako, da smo sterilno ezo pomočili v tekoče gojišče, da se je nanjo ujela kapljica, ki smo jo prenesli na gojišče. Suspenzijo smo po gojišču razmazali v skladu s tehniko štirih kvadrantov.

Po razrastu bakterij smo iz vsake plošče izolirali različne kolonije na gojišča krvnega agarja in ta ponovno inkubirali 24 h pri 36 °C. Izolirane bakterije smo identificirali z masno spektrometrijo. S trdnih gojišč smo bakterije z ezo prenesli v tekoča TIO gojišča, da smo lahko izvedli analizo koncentracije prostega vitamina B12. Ta smo inkubirali 48 h pri 36 °C. Po inkubaciji smo gojišča filtrirali, tako da je ostala samo tekočina brez bakterij. To smo storili tako, da smo del gojišča s pipeto prenesli v manjšo epruveto, iz katere smo lahko tekočino prenesli z injekcijsko brizgo. Z brizgo smo potisnili tekočino skozi sterilni filter, ki prepušča 0,20 µm. Prefiltrirali smo približno 2 ml tekočine. Prefiltrirali smo tudi gojišča, iz katerih nismo izolirali bakterij. Nato smo izvedli analizo koncentracij vitamina B12 v prefiltriranih vzorcih.

Celoten postopek smo še enkrat ponovili. Pri tem smo bakterije dvakrat precepili na različna trdna gojišča in še enkrat izvedli analizo koncentracije vitamina B12. Naši rezultati so se pri obeh ponovitvah ujemali (Tabela 2).

Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano je v namene raziskave podelil bakterije *Bacillus coagulans*, *Lactobacillus ramosus*, *Lactobacillus plantarum*, da smo preverili njihovo sposobnost proizvodnje vitamina B12. Posamezne kolonije bakterij smo iz gojišč z ezo prenesli v tekoča gojišča MRS, TIO in TIO z nižjim pH, ki smo jih nato inkubirali 48 h pri 36 °C. Po inkubaciji smo gojišča prefiltrirali enako kot je že navedeno zgoraj in izvedli analizo koncentracije vitamina B12.

## **1.2 faza: Proučevanje sinteze-določitev koncentracije vitamina B12 v probiotičnih zdravilih in izoliranih bakterij**

Zaradi neželjenih rezultatov smo prvo fazo ponovili še enkrat, le da smo metodo spremenili – posplošili. Ponovno smo preučevali koncentracijo sintetiziranega vitamina B12 pri probiotičnih zdravilih WAYA, ProLife, PB Assist +, Linex in suspenzijah bakterij *Bacillus coagulans*, *Lactobacillus ramosus* in *Lactobacillus plantarum*.

Pri bakterijah smo postopek ponovili popolnoma enako kot prej, tako da smo ob koncu s pomočjo sterilne eze bakterije nanесли v tekoča gojišča in jih pustili inkubirati 48h pri 36 °C. Iz probiotičnih zdravil tokrat nismo izolirali posamičnih bakterij in jih inkubirali na trdnih gojiščih, vendar smo vsebino vsake kapsule samo stopili v tekočih gojiščih in te pustili inkubirati 48h pri 36 °C. Po zaključenem inkubacijskem času smo vsa tekoča gojišča prefiltrirali s pomočjo sterilnega filtra in dobili prib. 2 mL tekočine iz vsakega gojišča. Postopek smo

zaključili z analizo koncentracije vitamina B12, kjer smo zaznali razlikovanje rezultatov. Zaradi pozitivnih rezultatov pri določenih probiotičnih zdravilih smo se odločili za ta tip metode.

#### **4.4 Raziskovanje vplivov na sintezo vitamina B12**

##### **2. faza: Vpliv dodanih bakterij**

Želeli smo preveriti ali različne vrste bakterij med sabo spodbujajo sintezo vitamina B12, če jih inkubiramo v istem gojišču. Ker smo v 1.fazi poskusa vitamin B12 zaznali samo pri zdravilih Prolife in PB Assist +, smo raziskavo nadaljevali samo s tema zdraviloma. Pri čemer smo za to fazo izbrali samo zdravilo PB Assist +, saj smo želeli čim legitimnejše rezultate poskusa. Namreč Prolife ima v zdravilu že dodano koncentracijo vitamina B12, kar bi otežilo proučevanje sinteze samega vitamina. Vsebino zdravila PB Assist + smo tako ponovno suspendirali v tri vrste tekočih gojišč (MRS bujon, TIO in TIO z nižjim pH), ki smo jih inkubirali 48 h pri 36 °C. Nato smo bakterije iz vsakega tekočega gojišča izolirali po prej opisanem postopku. Izolirane bakterije smo identificirali.

Ker je bil namen preveriti ali različne vrste bakterij med sabo spodbujajo sintezo vitamina B12, če jih inkubiramo v istem gojišču, smo zato v naslednjem koraku različne vrste izoliranih bakterij prenesli v eno tekoče gojišče. Vzorce smo inkubirali 48 h pri 36 °C in jih po inkubaciji filtrirali. Nato smo v vseh vzorcih izvedli analizo vitamina B12 (Tabela 3 in 4).

##### **3. faza: Vpliv temperature**

V četrti fazi smo preverjali vpliv temperature na sintezo vitamina B12. Vsako zdravilo smo precepili v štiri tioglikolatna gojišča, ki smo jih inkubirali pri različnih temperaturah. Inkubirali smo jih 48 h. Kontrolno gojišče smo inkubirali pri 36 °C, ostala gojišča pa pri 4 °C, pri sobni temperaturi (23.5 °C) ter pri 40 °C. Po inkubaciji smo gojišča prefiltrirali in analizirali koncentracijo sintetiziranega vitamina B12.

##### **4. faza: Vpliv etanola**

V tej fazi smo želeli proučiti vpliv dodatka etanola na sintezo vitamina B12. Kot že rečeno, ker smo v 1.fazi zaznali koncentracijo vitamina B12 samo pri vzorcih s suspenzijo zdravil Prolife



in PB Assist +, smo tudi v tej fazi raziskovali vpliv etanola na koncentracijo B12 pri teh dveh zdravilih. Želeli smo tudi ugotoviti ali je zaznana večja koncentracija vitamina B12 v gojiščih Prolife posledica že dodanega vitamina B12 ali ga bakterije proizvajajo tudi same.

Za vsako od zdravil smo pripravili tri tekoča tioglikolatna gojišča: kontrolno gojišče, gojišče z dodanimi 4 ml etanola in gojišče brez dodatkov, ki smo ga kasneje inkubirali pri sobni temperaturi. Kontrolno gojišče in gojišče z dodanim etanolom smo inkubirali 48 h pri 36 °C. Po inkubaciji smo gojišča filtrirali in analizirali koncentracijo sintetiziranega vitamina B12.

### **5. faza: Vpliv pH**

V peti fazi smo preverjali vpliv pH na sintezo vitamina B12. Za vsako zdravilo smo pripravili dve tioglikolatni gojišči: eno gojišče z normalnim  $7,1 \pm 0,2$  pH (kontrola) in drugo z znižanim  $6,4 \pm 0,2$  pH. Nato smo gojišča inkubirali 48 h pri 36 °C. Po inkubaciji smo gojišča filtrirali in analizirali koncentracijo sintetiziranega vitamina B12.

## **5 REZULTATI**

Rezultati so dobljeni na osnovi meritev koncentracije vitamina B12 v različnih vzorcih proučevanih probiotičnih zdravil, s vsebovanimi različnimi bakterijami ter v vzorcih proučevanih bakterij v različnih gojiščih, ki so bili tekom raziskave izpostavljeni različnim vplivom. Ker smo vsak proučevani vpliv in meritev izvajali v dvojniku, so dobljeni rezultati izračunano povprečje dveh ponovitev.

### **5.1 Rezultati 1. faze: Proučevanje sinteze-določitev koncentracije vitamina B12 v probiotičnih zdravilih in izoliranih bakterijah**

Sintezo vitamina B12 v vzorcih proučevanih zdravilih in bakterij smo proučevali na dva načina; s predhodno izolacijo posameznih kolonij bakterij, ki so prisotne v posameznih zdravilih in brez izolacije, v suspenziji raztopljenega zdravila. Ob tem smo dobili različne rezultate.

### 5.1.1 Sinteza vitamina B12 v vzorcih izoliranih bakterij iz proučevanih probiotičnih zdravil

V proučevanih vzorcih gojišč različnih probiotičnih zdravil, kjer so bile vsebujoče bakterije predhodno izolirane, kot v vzorcih gojišč posameznih proučevanih bakterij nismo zaznali in izmerili vrednosti vitamina B12, ki bi bile večje od meje zaznavnosti (109 pmol/L) z uporabljenim merilno metodo.

Gojišča	Vsebnost Vitamina B12 [pmol/L]
Kontrola	< 109
Prolife	< 109
PB Assist +	< 109
Linex	< 109
WAYA	< 109
<i>Bacillus coagulans</i>	< 109
<i>Lactobacillus ramosous</i>	< 109
<i>Lactobacillus plantarum</i>	< 109

Tabela 2: Koncentracija sintetiziranega vitamina B12 (na desni) v vzorcih po izolaciji kolonij različnih bakterij iz proučevanih probiotičnih zdravil in v vzorcih posameznih proučevanih bakterij (na levi).

### 5.1.2 Sinteza vitamina B12 v vzorcih suspenzij bakterij proučevanih probiotičnih zdravil

Sintezo vitamina B12 v proučevanih gojiščih smo zaznali in izmerili vrednosti, ki so bile večje od meje zaznavnosti (> 109 pmol/L) pri dveh od štirih proučevanih probiotičnih zdravil: Profile in PB Assist + (Tabela 3). pri čemer je v gojišču posameznega probiotičnega zdravila bila prisotna suspenzija vsebujočih bakterij.

Gojišča	Vsebnost vitamina B12 (pmol/L)
Kontrola	< 109
Prolife	> 1476
PB Assist +	1158
Linex	< 109
WAYA	< 109
<i>Bacillus coagulans</i>	< 109
<i>Lactobacillus ramosous</i>	< 109
<i>Lactobacillus plantarum</i>	< 109

Tabela 3: Količina sintetiziranega vitamina B12 (na desni) pri določenih probiotikih in bakterijah (na levi). Z zeleno je označena zadovoljiva količina vitamina, z rdečo pa količina, ki je premajhna, da bi nam povedala, če je gojišče sploh vsebovalo kaj vitamina oz. je ta bila premajhna, da bi bila pravilno zaznana. Kontrola je gojišče brez dodane bakterijske suspenzije ali probiotika.

## 5.2 Rezultati 2.faze: Vpliv dodanih bakterij na sintezo vitamina B12

Rezultati izmerjenih koncentracij vitamina B12 v različnih kombinacijah izoliranih bakterij so podani v tabeli 4 in 5. V vseh možnih kombinacijah nismo uspeli zaznati sinteze vitamina B12, v koncentracijah, večjih od 109 pmol/L.

Kombinacija dveh raznolikih izoliranih bakterij iz različnih gojišč		Koncentracija sintetiziranega Vitamina B12 [pmol/L]
MRS PB Assist + (1)	TIO ↓ PB Assist + (1)	< 109
MRS PB Assist + (1)	MRS PB Assist + (3)	< 109
MRS PB Assist + (1)	TIO PB Assist + (1)	< 109
TIO ↓ PB Assist + (1)	MRS PB Assist + (3)	< 109
TIO ↓ PB Assist + (1)	TIO PB Assist + (1)	< 109
MRS PB Assist + (3)	TIO PB Assist + (1)	< 109

Tabela 4: Koncentracija sintetiziranega vitamina B12 (na desni) pri kombinacijah dveh izoliranih bakterij iz različnih gojišč (na levi). Z rdečo je označena nezadovoljiva koncentracija sintetiziranega vitamina B12, saj z njo ne moremo vedeti, če je gojišče sploh vsebovalo kaj vitamina oz. je bila ta premajhna, da bi bila pravilno zaznana.

Kombinacija treh raznolikih izoliranih bakterij iz različnih gojišč			Koncentracija sintetiziranega Vitamina B12 [pmol/L]
MRS PB Assist + (1)	TIO ↓ PB Assist + (1)	MRS PB Assist + (3)	< 109
MRS PB Assist + (1)	TIO ↓ PB Assist + (1)	TIO PB Assist + (1)	< 109
TIO ↓ PB Assist + (1)	MRS PB Assist + (3)	TIO PB Assist + (1)	< 109

Tabela 5: Koncentracija sintetiziranega vitamina B12 (na desni) pri kombinacijah treh izoliranih bakterij iz različnih gojišč (na levi). Z rdečo je označena nezadovoljiva koncentracija sintetiziranega vitamina B12, saj z njo ne moremo dokazati kakršnokoli proizvodnje vitamina oz. je ta bila premajhna, da bi bila pravilno zaznana.

### 5.3 Rezultati 3. faza: Vpliv temperature

Naša kontrolna skupina je bila koncentracija vitamina B12 iz gojišča, ki je bil postavljen pod najbolj optimalne pogoje (36 °C, tema) (Tabela 6). Koncentracije, ki so bile izmerjene iz filtriranih gojišč, ki so imela spremenjeno temperaturo (4°C, 23. 5°C, 40°C), so podane v tabelah 7 do 9. S tem smo zagotovili, da je spremenjena T vplivala na mikroorganizme in posledično na proizvodnjo vitamina B12 v probiotični suspenziji zdravila PB Assist+(Graf 1).

Kontrolna gojišča	Koncentracija sintetiziranega Vitamina B12 [pmol/L]
PB Assist + (1)	1960,00
PB Assist + (2)	943,50
PB Assist +	1447,25
Prolife (1)	55 200,00
Prolife (2)	>4427,00
Prolife	>4427,00

Tabela 6: Izmerjena koncentracija sintetiziranega vitamina B12 (na desni) iz kontrolnih gojišč, ki so bila inkubirana pri 36 °C (na levi). Z zeleno je označeno povprečje dveh merjenj dveh različnih gojišč (1, 2).

Gojišča pri 4 °C	Koncentracija sintetiziranega Vitamina B12 [pmol/L]
PB Assist + (1)	1225
PB Assist + (2)	507
PB Assist +	866
Prolife (1)	81 400
Prolife (2)	86 300
Prolife	83 850

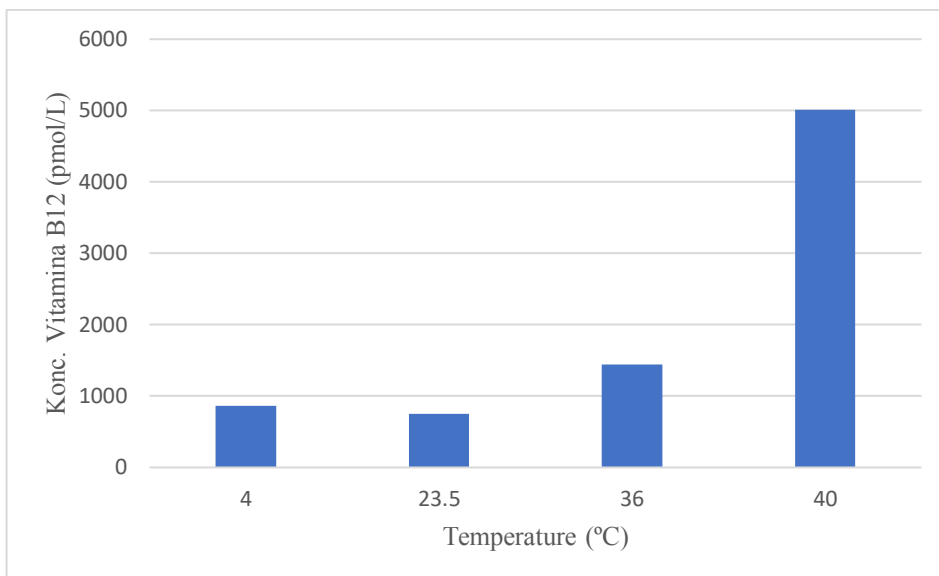
Tabela 7: Izmerjena koncentracija sintetiziranega vitamina B12 (na desni) iz gojišč, ki so bila hlajena **pri 4°C** (na levi). Z zeleno je označeno povprečje dveh merjenj dveh različnih gojišč (1, 2).

Gojišča pri 40°C	Koncentracija sintetiziranega Vitamina B12 [pmol/L]
PB Assist + (1)	3910
PB Assist + (2)	6110
PB Assist +	5010
Prolife (1)	55 300
Prolife (2)	54 300
Prolife	54 800

Tabela 8: Izmerjena koncentracija sintetiziranega vitamina B12 (na desni) iz gojišč, ki so bila inkubirana **pri 40 °C** (na levi). Z zeleno je označeno povprečje dveh merjenj dveh različnih gojišč (1, 2).

Gojišča pri sobni temp. (23,5 °C)	Koncentracija sintetiziranega Vitamina B12 [pmol/L]
PB Assist + (1)	788
PB Assist + (2)	716
PB Assist +	752
Prolife (1)	>4427
Prolife (2)	>1476
Prolife	>1476

Tabela 9: Izmerjena koncentracija sintetiziranega vitamina B12 (na desni) iz gojišč, ki so bila postavljena na **sobno temperaturo 23,5 °C** (na levi). Z zeleno je označeno povprečje dveh merjenj dveh različnih gojišč (1, 2).



Graf 1: Vpliv temperature gojišča na sintezo vitamina B12 v PB Assist +.

#### 5.4 Rezultati 4. faze: Vpliv etanola

Glede na izmerjene vrednosti vitamina B12 v kontrolni skupini (Tabela 6), je pod vprivom etanola prišlo do zmanjšane produkcije vitamina B12 v gojišču s PB Assist+ (Tabela 10). Vrednosti, izmerjene v gojišču s Prolife so bile nad zgornjo mejo merilnega območja.

Gojišča z dodanim etanolom	Koncentracija sintetiziranega Vitamina B12 [pmol/L]
PB Assist + (1)	668
PB Assist + (2)	592
PB Assist +	630
Prolife (1)	> 4427
Prolife (2)	> 1476
Prolife	> 1476

Tabela 10: Izmerjena koncentracija sintetiziranega vitamina B12 (na desni) iz gojišč, ki so vsebovala dodatek **4mL etanola** (na levi). Z zeleno je označeno povprečje dveh merjenj dveh različnih gojišč (1, 2).

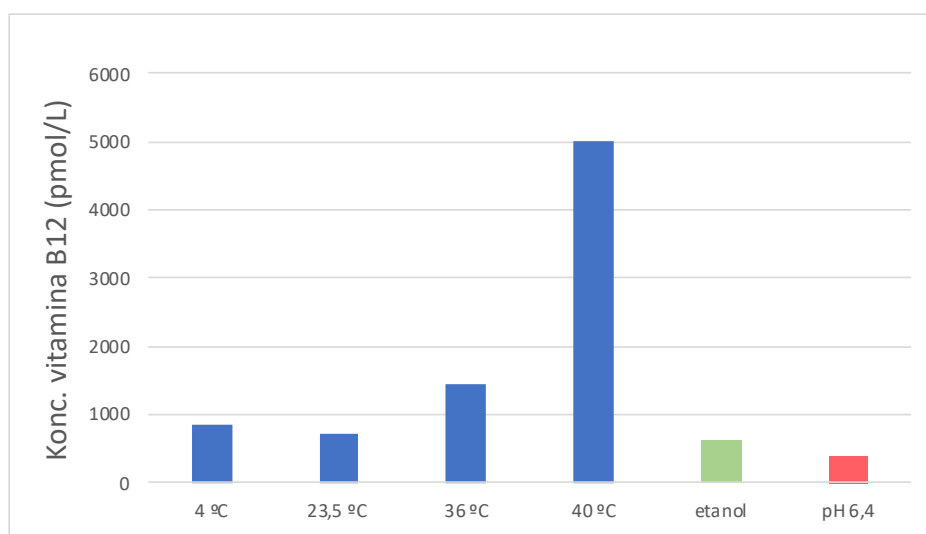
## 5.5 Rezultati 5. faze: Vpliv pH

Glede na izmerjene vrednosti vitamina B12 v kontrolni skupini s pH 7,1(Tabela 6), je pod vplivom znižanega pH (6,4) prišlo do zmanjšane produkcije vitamina B12 tako v gojišču s PB Assist+, kot v gojišču s Prolife (Tabela 11).

Gojišča z nižjim pH	Koncentracija sintetiziranega Vitamina B12 [pmol/L]
PB Assist + (1)	447,0
PB Assist + (2)	302,0
PB Assist +	374,5
Prolife (1)	991,0
Prolife (2)	871,0
Prolife	931,0

Tabela 11: Izmerjena koncentracija sintetiziranega vitamina B12 (na desni) iz gojišč TIO z nižjim pH - 6,4 ± 0,2 (na levi). Z zeleno je označeno povprečje dveh merjenj dveh različnih gojišč (1, 2).

Posamezni vplivi (temperatura, dodatek etanola in pH) na sintezo vitamina B12 v gojišču s probiotikom PB Assist + so ponazarjeni v Grafu 2.



Graf 2: Vpliv različnih dejavnikov (temperatute -zeleno; dodatka etanola-rumeno in znižanega pH-rdeče) na produkcijo vitamina B12 v gojišču s suspenzijo probiotika PB Assist+.



## 6 RAZPRAVA

Namen naše raziskave je bil ugotoviti ali bakterije v probiotičnih zdravilih proizvajajo vitamin B12 in kaj bi lahko vplivalo na njegovo proizvodnjo. Raziskavo smo zato začeli s tem, da smo preverili ali posamezne bakterijske vrste prisotne v probiotičnih zdravilih proizvajajo vitamin v zastavljenih gojiščih (MRS, TIO, TIO z nižjim pH) in če vitamin zaznamo v gojiščih s suspenzijo probiotičnih zdravil. Nato smo želeli ugotoviti ali različne vrste bakterij, ki jih inkubiramo v skupnem gojišču med seboj spodbujajo sintezo vitamina. Vplive na proizvodnjo vitamina B12 smo preverili z inkubiranjem gojišč pri različnih temperaturah (4 °C, 23.5 °C, 36 °C, 40 °C), z dodatkom etanola v gojišče ter s spremembo pH (bakterije smo gojili v gojiščih s pH  $7.1 \pm 0.2$  in  $6.4 \pm 0.2$ ).

Vitamina B12 v gojiščih posameznih izoliranih vrst bakterij ni bilo mogoče zaznati z uporabljeno metodo merjenja, v koncentracijah nad 109/pmol/L. Zato lahko prvo hipotezo, da bodo izbrane izolirane bakterije *Bacillus coagulans*, *Lactobacillus ramnosus*, *Lactobacillus plantarum* sintetizirale vitamin B12, ovržemo. Prav tako vitamina nismo zaznali pri probiotičnih zdravilih Linex in Waya, povečane koncentracije pa so bile prisotne pri zdravilih Prolife, ki ima že prvotno dodan vitamin in zato nismo mogli biti prepričani ali so ga bakterije sintetizirale same, in pri zdravilu PB Assist +. Iz teh zdravil smo bakterije tudi izolirali in preverili, če vitamin sintetizirajo izolirane vrste. Vitamina v vzorcih posameznih izoliranih bakterij nismo zaznali. To delno ovrže hipotezo dva, da bodo bakterijske vrste, prisotne v probiotičnih zdravilih Linex, Prolife, PB Assist + in Waya, proizvajale vitamin B12, saj smo zaznali, da je zanesljivo bakterijsko sintetiziran vitamin B12 prisoten le pri suspenziji zdravila PB Assist +. Glede na že znane raziskave (J. Stewart leta 2020) smo domnevali, da bi bakterije med seboj lahko spodbujale sintezo in smo zato različne vrste izoliranih bakterij inkubirali v skupnem gojišču. Vitamina bakterije niso sintetizirale, kar zavrača hipotezo tri, da bodo kombinacije izoliranih bakterij iz probiotičnega zdravila PB Assist + proizvedle več vitamina B12. Hipotezi štiri; da bodo bakterije v probiotičnih zdravilih Prolife in PB Assist + pri inkubaciji pri 4 °C proizvedle manj vitamina kot pri sobni temperaturi (23,5 °C), optimalni temperaturi za gojenje bakterij (36 °C) ter 40 °C zaradi manjše kinetične energije reagentov, vključenih v sintezo vitamina B12 in zaradi manjše rasti bakterij, in hipotezo pet; da bodo bakterije v probiotičnih zdravilih Prolife in PB Assist + pri 40 °C proizvedle večjo koncentracijo vitamina B12 kot pri optimalni temperaturi za rast bakterij (36 °C), zaradi večje kinetične

energije reagentov, vključenih v sintezo vitamina B12, lahko ovržemo izključno v primeru zdravila Prolife. Največjo koncentracijo vitamina B12 smo pri tem zaznali pri 4 °C, nato smo najmanjšo koncentracijo zaznali pri sobni temperaturi (23, 5 °C) ter optimalni temperaturi za gojenje bakterij (36 °C), nekoliko več vitamina pa spet zaznali pri 40 °C. Hipoteze štiri na prvi pogled ne bi mogli potrditi za probiotično zdravilo PB Assist + , saj najmanjše koncentracije vitamina nismo zaznali pri 4 °C, kjer se je sintetiziralo prib. 866 pmol/L. Smo pa najnižjo vrednost vseeno zaznali pri gojiščih, ki so bila inkubirana pri nižjih temperaturah (v primerjavi z optimalno) – pri sobni temperaturi (23,5 °C), kjer je vrednost povprečne koncentracije sinteze znašala 752 pmol/L. Zaradi majhne razlike v izmerjenih koncentracijah vitamina pri gojiščih inkubiranih pri nižjih stopinjah smo se tako vseeno odločili, da bomo hipotezo delno potrdili. Hipotezo pet smo za zdravilo PB Assist + potrdil, saj smo najvišje koncentracije zaznali pri 40 °C in je povprečna izmerjena vrednost koncentracije bila 5010 pmol/L. Ta je tako bila veliko višja kot povprečna koncentracija vitamina pri gojiščih inkubiranih pri optimalni temperaturi (36 °C), ki je znašala 1447,25 pmol/L. Dodatek etanola je pri suspenzijah obeh zdravil Prolife in PB Assist + zavrl sintezo vitamina, zato lahko hipotezo šest, da bodo bakterije v probiotičnih zdravilih Prolife in PB Assist + v gojiščih z dodanim etanolom proizvedle več vitamina B12, ovržemo. Naše predvidevanje, da bo v gojišču z nižjim pH proizvedeno manj vitamina pa je bilo pravilno in lahko hipotezo sedem, da bo v gojišču z nižjim pH ( $6,4 \pm 0,2$ ) proizvedeno manj vitamina B12 kot v gojišču z optimalnim pH ( $7,1 \pm 0,2$ ), saj je v optimalnem gojišču rast bakterij večja, potrdimo.

Pred začetkom dela smo naredili natančno raziskavo teme, da bi se lahko tudi sami lažje pripravili na celoten potek poskusa. Vendar smo že tukaj prvič naleteli na problem, ki je bil pomanjkljivost virov o vplivu različnih okolij na sintetiziranje tega določenega vitamina ali kakršnekoli podobne študije, ki bi nam lahko razložile, kako bi se lahko raziskovanja sploh lotili. Na koncu smo se odločili, da bomo poskusili metodo, kjer bomo vzeli nekaj posameznih bakterij, ki so znane po zmožnosti sintetiziranja vitamina B12 in nekaj probiotikov, ki so vsebovali probiotične bakterije. Vse bakterije in probiotike smo dali v tekoča gojišča in jih po 48 urah inkubiranja prefiltrirali, da bi lahko pravilno testirali vsebnost preiskovanega vitamina. Zaradi nevariabilnosti rezultatov smo vse rezultate pod 109 pmol/L obravnavali kot nezanesljive, saj nismo mogli zanesljivo določiti, ali se je kaj vitamina B12 sploh sintetiziralo. Ugotovili smo, da posamezne kolonije ene bakterije ne proizvedejo dovolj vitamina, da bi bil

ta zaznan. Do enakih rezultatov smo tako prišli tudi pri večini probiotičnih zdravil razen pri zdravilu PB Assist + in Prolife, ki je imel že prvotno dodan vitamin B12.

Tako smo prešli na drugo fazo raziskovanja, ki je izključevala probiotik Prolife. Še vedno smo želeli dokazati, da same bakterije proizvajajo vitamin B12 v navadenem gojišču, zato smo iz prej uspešnega zdravila PB Assist + izolirali bakterije, ki smo jih prvotno nanegli na mikrotitrne plošče. Vsako od bakterij smo nato identificirali. Pred začetkom te faze pa smo našli več študij, ki so nam dokazovale sodelovanje in celo fizično povezovanje dveh bakterij med seboj. V članku Julie Stewart leta 2020 je povedano, da je univerza v Delawareu v ZDA raziskovala nastanek tako imenovanih "hibridnih" vrst bakterij, kjer se dve bakteriji povežeta preko celične membrane in si delita proteine ter celo nekatere strukture RNA. S tem vsaka od bakterij izgubi svojo identiteto, da lahko skupaj uspešno sodelujeta. V študiji sta preiskovani bakteriji začeli delovati v sintrofiji (syntrophic system) in začeli proizvajati metabolite, ki so koristili obema. Iz teh podatkov smo se odločili poskusiti kombinacije dveh in treh bakterij, ki smo jih izolirali iz gojišč izbranega probiotičnega zdravila, saj smo upali, da bi se le te med seboj spodbudile in učinkovitejše sintetizirale vitamin. Prav tako pa smo si izbrali tri različna gojišča; MRS, TIO in TIO z nižjim pH, da bi lahko čim boljše primerjali rezultate in dobili največ možnosti različnih pogojev za rast bakterij in morebitno njihovo proizvodnjo vitamina B12. Po identifikaciji vseh zrastle mikroorganizmov smo ugotovili, da so se sevi ponavljali, kar nam je skrajšalo potek dela. Na MRS gojišču sta zrastle *Lactobacillus acidophilis* in *Bifidobacterium bifidum*, na gojišču TIO *Lactobacillus casei* in na gojišču TIO z nižjim pH *Lactobacillus salivarius*. Identifikacija nam je prav tako dokazala, da se nobeno od gojišč ni kontaminiralo, saj smo dobili vse bakterije, ki jih je že predhodno vsebovalo izbrano probiotično zdravilo. Vseeno pa ob koncu merjenja vsebnosti vitamina B12 v posameznih gojiščih nismo uspeli zaznati, saj smo tako pri kombinaciji dveh bakterij kot pri kombinaciji treh izmerili vrednost, nižjo od 109 pmol/L. Torej je bila koncentracija premajhna, da bi bila pravilno zaznana oz. se vitamin sploh ni sintetiziral.

Iz tega razloga smo nadaljevali izključno z raziskovanjem celotne suspenzije probiotičnih zdravil – Prolife, PB Assist +. V tretji, četrti in peti fazi smo naredili določene spremembe, ki bi vplivale na rast mikroorganizmov v gojiščih in morda posledično vplivale tudi na samo sintetiziranje vitamina B12. Predvidevanja so se na koncu le izkazala za pravilna, saj smo dobili rezultate, ki so se razlikovali od kontrolne skupine. Če se za začetek osredotočimo na spremembo, ki smo jo naredili pri temperaturi, kjer smo namesto standardne temperature 36 °C

gojišča inkubirali pri 40 °C, 23,5 °C in 4 °C. Prve spremembe, po 48 h inkubaciji, smo opazili že pri filtriranju gojišča skozi sterilni filter, ki prepušča 0,20 µm. Specifično pri gojiščih, ki so bila izpostavljena 40 °C, smo opazili, da se je to težje filtriralo – filter se je pogosto zamašil oz. je filtracija potekala mnogo počasneje kot pri kontrolnem gojišču (izpostavljen 36 °C). To si lahko razložimo s študijo K. Ślizewske in A. Chlebicz-Wójcik leta 2020, ki sta raziskovala kinetiko rasti sevov *Lactobacillus* v alternativnem, stroškovno učinkovitem poltrdem fermentacijskem mediju, ki trdi, da je za te probiotične bakterije najbolj optimalna temperatura za rast med 30 in 40 °C oz. nekateri sevi lahko rastejo tudi pri temperaturah nižjih od 2 °C in visokih do 53 °C. Iz tega lahko sklepamo, da so sevi *Lactobacillus*, v gojiščih izpostavljeni temperaturi 40 °C, zaradi večje kinetične energije rastle hitreje in se morda bolj namnožili kot v kontrolnem gojišču, kar nam posledično lahko razloži večjo gostoto in slabšo filtracijo skozi tako natančen filter. Presenetljivo pa smo enako spremembo opazili tudi pri gojiščih suspenzije zdravila Prolife, hlajenih pri 4 °C. Tega nam omenjena študija ne razloži. Čeprav raziskovalca K. Ślizewske in A. Chlebicz-Wójcik potrjujeta, da bakterije uspejo rasti in se razmnoževati pri tako nizkih temperaturah, pa ne trdita, da takrat mikroorganizmi rastejo hitreje.

Glede na naše predznanje o kinetični energiji, ki bi v tem primeru bila zaradi nižje temperature manjša, bi lahko sklepali, da bi se bakterije množile počasneje. Z raziskavo leta 2016 L. F. Calinoiu, D. C. Vodnar in G. Precup lahko bolje razložimo rast probiotičnih bakterij pri nizkih temperaturah. Ti so namreč preiskovali viabilnost teh pri različnih pogojih. Eden od teh pogojev je bilo hladno okolje – 4 °C. Glede na predhodne študije so ti ugotovili, da probiotične bakterije preživijo presenetljivo dobro pri tako nizkih temperaturah; v jogurtu je pri 2 °C po 20 dneh *L. acidophilus* dosegla najboljšo viabilnost, medtem ko je *Bifidobacterium animalis* subs. *lactis* najbolj ustrezala temperatura 8 °C.

Čeprav to dokazuje uspešnost preživetja pri tako nizkih temperaturah, navedena študija L. F. Calinoiu-ja in sodelavcev vseeno omenja upočasnjen metabolizem, kar so pokazali tudi naši rezultati meritev vitamina B12 pri gojiščih s suspenzijo zdravila PB Assist +. Če primerjamo rezultate naše kontrolne skupine in rezultate gojišča, izpostavljenega nižjim temperaturam, opazimo da so slednji nižji. Opazili smo, da se je pri 4 °C sintetiziralo približno 866 pmol/L vitamina, medtem ko je bilo v kontrolnem gojišču proizvedeno 1447,25 pmol/L vitamina, kar nam pokaže, da nizke temperature delujejo zaviralno na delovanje bakterij. Nižje vrednosti pa

so se pokazale tudi pri gojiščih, ki jim je bil dodan etanol, pri gojiščih z nižjim pH in gojiščih, izpostavljenih sobni temperaturi 23,5 °C. Bakterijska suspenzija iz gojišča z etanolom je producirala 630 pmol/L vitamina in iz gojišča, izpostavljenega sobni temperaturi smo izmerili 752 pmol/L. Pri gojiščih z nižjim pH smo opazili presenetljivo nizke vrednosti, tako kot pri gojišču probiotika PB Assist +, kjer se je sintetiziralo skoraj 374,5 pmol/L, in pri gojišču probiotičnega zdravila Prolife, ki je ne glede na dodan vitamin B12 vsebovalo samo 931 pmol/L. Slednje zdravilo je namreč v kontrolnem gojišču dosegalo vrednosti, višje od 4427 pmol/L. Ob pogledu na te rezultate nismo vedeli ali so nizke vrednosti pH v gojišču vplivale negativno na sam že dodan vitamin B12 ali na bakterije, ki so zato proizvedle manj vitamina. Ob pogledu 2014 raziskave F. Monajjemzadeh, F. Ebrahimi, P. Zakeri-Milani, H. Valizadeha smo hitro lahko izključili eno od predvidevanj. Ti so namreč raziskovali učinke spremenljivk formulacije in pogojev shranjevanja na svetlobno zaščitene parenteralne formulacije vitamina B12. Čeprav raziskava ni neposredno povezana z našo, nam je razjasnila nestabilnost oz. stabilnost vitamina. Ta je namreč zaradi svojih vodotopnih sposobnosti zelo hitro nagnejen k svoji razgradnji v raztopinah, če je izpostavljen svetlobi. Prav tako pa zahteva specifične vrednosti toplote, vlage, oksidantov in baz ter kislin. Iz tega razloga je veliko raziskav proučevalo vplive pH vrednosti na ta vitamin. Izkazalo se je, da je za vitamin najbolj optimalno okolje s pH 4-6,5. Kar nam pove, da vzrok za nizke vrednosti vitamina B12 v poskusnih gojiščih ni bil razpad tega po nastanku, saj je pH gojišča z nižjim pH v naši raziskavi znašal  $6,4 \pm 0,2$ , temveč nekaj drugega. Glede na to, da večina bakterij najboljše raste v nevtralnem okolju – pH 7, lahko predvidevamo, da je nižji pH gojišča zavrl samo rast bakterij in morda tudi metabolne procese ter sintetiziranje vitamina. Prav tako pa smo v študiji C. Ratzke in J. Goreja (2018) našli podatke, da *Lactobacillus plantarum* bolje uspeva v bolj kislem mediju kot nevtralnem, kar bi pomenilo, da bi naši rezultati (koncentracije vitamina B12) morale biti višje ali vsaj enake rezultatom kontrolne skupine. Možna razlaga, zakaj so naši rezultati temu nasprotovali, je, da bakterije ob rasti predhodno pH svojega okolja znižajo ali zvišajo. V raziskavi je omenjeno, da bakterije, ki bolje rastejo v kislem okolju, ob svoji rasti, razmnoževanju, proizvajajo bazično okolje tesno okoli sebe oz. proizvajajo bazične snovi in tako višajo pH gojišča. Vseeno pa to ne drži za vse bakterije. Že prej omenjen *L. plantarum* namreč producira mlečno kislino, ki zunanjo okolje še dodatno pokisli oz. zniža pH. Bakterije namreč ne delujejo tako vedno sebi v prid, ampak si s tem lahko tudi škodujejo. Lahko predvidevamo, da je verjetno nekaj bakterij v

naših gojiščih s svojimi metaboliti imelo negativen vpliv na same sebe in so si tako škodovale, kar bi lahko bil rezultat manjše sposobnosti proizvodnje vitamina B12.

Na žalost je področje, ki smo ga raziskovali, še kar ne raziskano oz. se vsaj mi nismo uspeli dokopati do pravih virov. Iz tega razloga naša metoda ni bila najbolj natančno sestavljena. Za boljše opazovanje sprememb bi tako lahko vključili pH lističe, s katerimi bi natančneje in sprotno preverjali vpliv pH gojišča na sintezo vitamina B12, in kako so bakterije s svojimi metaboliti spremenile pH svojega okolja. Tako bi lahko natančneje poznali okolje in bolje določili, kaj je vplivalo na naše rezultate. Prav tako bi lahko k spremembi temperature, pH in dodatku etanola dodali še spremembo svetlobe in ponovili poskuse pri različnih – tudi bazičnih – gojiščih. Razen etanola, bi lahko preizkusili tudi vpliv drugih snovi na rast mikroorganizmov, kot je na primer glukoza. Etanol smo namreč dodali, saj smo pri več študijah opazili, da so v gojišča dodajali alkohol, nekateri pa tudi glukozo, ki pa bi naj še dodatno spodbudila rast mikroorganizmov. Za doseg natančnejših rezultatov bi morali narediti še več ponovitev, ne samo gojišč, ampak tudi samih merjenj koncentracij vitamina B12, še posebej v primeru zelo visokih vrednosti. V teh primerih smo morali filtrirano gojišče večkrat razredčiti, da smo dobili merljive rezultate. Pri merjenju vitamina B12 smo tako naleteli na oviro v merilnem območju naše uporabljene metode, ki je namenjena za določanje koncentracij v serumu bolnikov. Zaradi omejitve zaznavanja - najnižje izmerjene koncentracije sintetiziranega vitamina, smo pri suspenzijah posameznih izoliranih bakterij dobili samo vrednost, ki je bila označena kot manjša od 109 pmol/L, s čimer nismo mogli potrditi morebitnih nižjih koncentracij sicer prisotnega vitamina B12. V prihodnje bi lahko raziskavo izboljšali tudi z uporabo občutljivejše metode, ki bi bila sposobna zaznati še nižje koncentracije vitamina B12.

## **7 DRUŽBENA ODGOVORNOST**

Tema naše raziskovalne naloge in pridobljeni rezultati se navezujejo na osnovna načela družbene odgovornosti.

Družbeno odgovorno sva se lotili naloge, saj se zavedava pomena, ki ga ima vitamin B12 pri bakterijski presnovi, zaradi česar je ta lahko pomemben faktor pri delovanju človeške mikrobiote. Ker si mnogo ljudi dandanes krepi mikrobioto z različnimi probiotičnimi zdravili sva s tem razlogom z najino raziskovalno nalogo želeli ugotoviti ali probiotična zdravila proizvajajo vitamin B12 in s tem morebiti krepijo delovanje mikrobiote. Področje vpliva vitamina B12 na človeško mikrobioto je dokaj neraziskano, zato upava, da bo najina raziskava služila kot majhen prispevek za nadaljnjo raziskovanje, saj predvidevava, da bi lahko vplivi, ki zavirajo nastanek vitamin B12 nanjo vplivali negativno medtem ko bi pospešena proizvodnja lahko vplivala pozitivno.

## 8 ZAKLJUČEK IN SKLEPI

V naši raziskavi smo si zastavili več ciljev in hipotez, s katerimi smo želeli proučiti sposobnost sinteze vitamina B12, tako v bakterijskih vrstah, ki se nahajajo v črevesni mikrobioti človeka, kot v kombinacijah bakterij, ki so sestavni del probiotičnih zdravil.

V prvem koraku smo želeli ugotoviti, ali bakterijske vrste, ki so znane po proizvodnji vitamina B12 v zastavljenih gojiščih sploh proizvedejo ta vitamin. V večini študij vrsta gojišča in posebni dodatki za stimulacijo vitamina niso bili navedeni, zato smo preizkusili tri vrste gojišč (MRS, TIO in TIO z nižjim pH). Rezultati vseh uporabljenih gojišč niso pokazali zaznave vitamina B12, zaradi česar smo prvo hipotezo, da bodo vrste *Bacillus coagulans*, *Lactobacillus ramnosus*, *Lactobacillus plantarum* proizvedle vitamin B12, ovrgli. Do takšnih rezultatov je lahko prišlo, ker so morda bakterije sintetizirale premalo vitamina za njegovo zaznavo z uporabljenimi metodo ali pa smo za opazovanje uporabili specifičen sev, ki Vitamina ne proizvaja.

Za proučevanje zmožnosti sinteze vitamina B12 bakterij, prisotnih v izbranih probiotičnih zdravilih Waya, Linex, Prolife, PB Assist + smo pripravili gojišča s suspenzijo teh zdravil ter iz vsakega gojišča izolirali posamezne bakterije. Rezultati so pokazali, da je bila večja koncentracija vitamina B12 prisotna samo na gojiščih zdravil Prolife in PB Assist +. Ali so bakterije dodatno proizvedle vitamin B12 v zdravilu Prolife, ne moremo biti prepričani, saj je v zdravilu vitamin že dodan. Izolirane bakterije vitamina B12 niso proizvedle. Tako lahko delno potrdimo drugo hipotezo, da bakterijske vrste, prisotne v probiotičnih zdravilih Waya, Linex, Prolife, PB Assist +, proizvajajo vitamin B12, saj je bila bakterijska sinteza vitamina potrjena le pri suspenziji zdravila PB Assist +.

Iz zaznave povečane koncentracije vitamina B12 pri celotni suspenziji zdravila PB Assist + in tega, da pri posameznih izoliranih bakterijah vitamina nismo zaznali, smo sklepali, da bi lahko različne vrste bakterij med sabo spodbujale sintezo vitamina, če jih inkubiramo v istem gojišču. Rezultati so pokazali, da kombinacije izoliranih bakterij, inkubirane v istem gojišču, niso proizvedle vitamina B12, zato lahko tretjo hipotezo ovržemo.

Kljub temu, da bi lahko bila povečana koncentracija vitamina B12 pri zdravilu Prolife zaznana zaradi že dodanega vitamina B12, smo želeli preveriti, če k temu prispeva bakterijska produkcija. To smo preverili z gojenjem suspenzije zdravila v različnih pogojih. Hkrati smo



preverjali vpliv na sintezo vitamina B12 pri zdravilu PB Assist + v enakih pogojih. Če bi se izkazalo, da so rezultati pri obeh zdravilih podobni, bi lahko sklepali, da bakterije, prisotne v zdravilu Prolife, prav tako dodatno proizvajajo vitamin.

Preverjali smo vpliv temperature, dodanega etanola in pH na sintezo vitamina B12. Hipotezo štiri sprve nismo potrdili za zdravilo PB Assist +, saj najnižje koncentracije vitamina B12 nismo zaznali pri 4 °C, ampak pri sobni temperaturi (23,5 °C). Zaradi zelo majhne razlike v izmerjenih koncentracijah pa smo se le odločili, da bomo hipotezo delno potrdili. Hipotezo številka pet smo za zdravilo PB Assist + potrdili, saj smo največjo koncentracijo vitamina B12 v odvisnosti od temperature zaznali pri gojiščih inkubiranih pri 40 °C. Hipotezi pa ne veljata za zdravilo Prolife, saj smo največjo koncentracijo vitamina B12 zaznali pri 4 °C, nato smo najmanjšo koncentracijo zaznali pri sobni temperaturi (23, 5 °C) ter optimalni temperaturi za gojenje bakterij (36 °C), nekoliko več vitamina smo spet zaznali pri 40 °C. Ob tem je potrebno poudariti, da je bilo natančno merjenje visoke koncentracije v teh primerih omejeno z zgornjo mejo merilnega območja metode, pri čemer je večina vzorcev v primeru Prolife to mejo presegala in jih je bilo potrebno zelo redčiti (1:1000), kar je zmanjšalo točnost rezultatov in pravilnost zaključkov. Dodatek etanola h gojiščem s suspenzijami zdravil ni vplival na koncentracijo zaznanega vitamina B12 pri suspenziji zdravila Prolife, pri zdravilu PB Assist + pa smo zaznali manj vitamina B12 kot pri optimalnih pogojih. To povsem ovrže šesto hipotezo, da bi etanol lahko vzpodbujal sintezo vitamina. V gojiščih z nižjim pH je bilo pri obeh zdravilih zaznana manjša koncentracija vitamina B12, zato lahko hipotezo sedem potrdimo.

Iz rezultatov lahko opazimo, da sinteza vitamina B12 pri zdravilu Prolife, ki že ima dodan vitamin, ne poteka enako kot pri zdravilu PB Assist +. Vendar, da sinteza poteka, vseeno lahko potrdimo, saj so spremembe v koncentracijah vitamina B12 bile prisotne.

Skozi raziskavo pa je še ostalo nekaj neodgovorjenih vprašanj, ki bi lahko bila nadaljnje raziskana. Vitamina pri izoliranem *Bacillus coagulans* nismo zaznali, je pa bil zaznan pri suspenziji celotnega zdravila Prolife, ki poleg te bakterijske vrste vsebuje še dodan vitamin B12. Iz raziskave vplivov lahko kljub temu sklepamo, da je bakterijska sinteza vitamina pripomogla k zaznani koncentraciji. Možna razlaga, da smo vitamin zaznali pri suspenziji zdravila, pri izoliranih bakterijah pa ne, bi lahko bila, da bi že dodan vitamin B12 vzpodbujal lastno sintezo.

Med raziskavo smo prišli tudi do nepričakovanih rezultatov, ki so spremenili naše razumevanje bakterijske sinteze vitamina B12 in predvsem pokazali, da ta ni preprosta. Naša spoznanja bi lahko bila pobuda k natančnejšim raziskavam tega, kaj je najbolj optimalno okolje za naravno produkcijo vitamina in kaj je vplivalo na to, da smo vitamin zaznali le pri celotnih suspenzijah zdravil, pri izoliranih bakterijah pa ne.

## 9 VIRI IN LITERATURA

Vsebine:

1. Abbott Diagnostics. B12 Alinity package insert. (2017). [30. 6. 2023]
2. American Society for Microbiology; Reid G.: The Scientific Basis for Probiotic Strains of *Lactobacillus* (1999). Dostop na: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.65.9.3763-3766.1999> [28. 6. 2023]
3. Calinoiu L. F., Vodnar D. C., Precup G. (2016). The Probiotic Bacteria Viability under Different Conditions. Dostop na: [https://www.researchgate.net/publication/312429299\\_A\\_Review\\_The\\_Probiotic\\_Bacteria\\_Viability\\_under\\_Different\\_Conditions](https://www.researchgate.net/publication/312429299_A_Review_The_Probiotic_Bacteria_Viability_under_Different_Conditions) [2. 7. 2023]
4. Cao J., Yu Z., Liu W., Zhao J., Zhang H., Zhai Q., Chen W. (2020). Probiotic characteristics of *Bacillus coagulans* and associated implications for human health and diseases. Dostop na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464619305675#s0055> [30. 6. 2023]
5. Cleveland Clinic: Megaloblastic Anemia (2022). Dostop na: <https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/23160-megaloblastic-anemia> [24. 5. 2023]
6. D. Nohr, H.K. Biesalski (2016). Vitamin B12. Reference Module in Food Science. Elsevier. Dostopno na: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.01075-1> [8. 4. 2023]
7. Gu Q., Li P. (2016). Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health: Biosynthesis of Vitamins by Probiotic Bacteria. InTech. Dostop na: <https://www.intechopen.com/chapters/50488> [28. 6. 2023]
8. Guetterman, H. M., Huey, S. L., Knight, R., Fox, A. M., Mehta, S., Finkelstein, J. L. (2022). Vitamin B-12 and the Gastrointestinal Microbiome: A Systematic Review. *Advances in nutrition* (Bethesda, Md.), 13(2), str. 530–558. Dostop na: <https://doi.org/10.1093/advances/nmab123> [8. 4. 2023]
9. Heather M., Guetterman in drugi (2021). Vitamin B-12 and the Gastrointestinal Microbiome: A Systematic Review, *Advances in Nutrition*, (2022). 13(2), Str. 530–558, Dostop na: <https://doi.org/10.1093/advances/nmab123> [29. 6. 2023]

10. Heights; Dalziel R.: Deep Dive: How B12 impacts your microbiome (2022). Dostop na: <https://www.yourheights.com/blog/supplements/how-b12-impacts-your-microbiome/#what-is-b12-and-where-does-it-come-from> [24. 5. 2023]
11. Jungerson M., Wind A., Johansen E., Christesen J. E., Stuer-Lauridsen B., Eskesen D. (2014). The Science behind the Probiotic Strain *Bifidobacterium animalis* subs. *lactic* BB-12. Dostop na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5029483/> [30. 6. 2023]
12. Kaj so probiotiki? [Internet]. Dostop na: <https://lek.si/sl/skrb-za-zdravje/neravnovesje-mikrobiote-probiotiki/kaj-so-probiotiki/> [20. 6. 2023]
13. Linex, trde kapsule [Internet]. Dostop na: <https://lek.si/sl/zdravila-izdelki/brez-recepta/linex/> [28. 6. 2023]
14. M. J. Butel. (2014). Probiotics, gut microbiota and health, *Médecine et Maladies Infectieuses*, 44(1), str. 1-8, ISSN 0399-077X, <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2013.10.002>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0399077X13003077>) [23. 6. 2023]
15. MALDI Biotyper® Library [Internet]. Dostop na: <https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/microbiology-and-diagnostics/microbial-identification/maldi-biotyper-library-ruo.html> [29. 4. 2023]
16. McDowell R. H., Sands E. M., Friedman H. (2023). *Bacillus Cereus*. Dostop na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459121/> [30. 6. 2023]
17. Mohammed Y., Lee B., Kang Z., Guocheng D. (2014). Development of a two-step cultivation strategy for the production of vitamin B12 by *Bacillus megaterium*. *Microb Cell Factories* 13, 102. Dostop na: <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0102-7> [29. 6. 2023].
18. Monajjemzadeh F., Ebrahimi F., Zakeri-Milani P., Valizadeh H. (2014). Effects of Formulation Variables and Storage Conditions on Light Protected Vitamin B12 Mixed Parenteral Formulations. Dostop na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4137421/> [3. 7. 2023]
19. Morowitz M. J., Carlisle E., Alverdy J. C. (2011). Contributions of Intestinal Bacteria to Nutrition and Metabolism in the Critically Ill. Dostop na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3144392/> [28. 6. 2023]

20. National Institutes of Health: Vitamin B12 (2022). Dostop na: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminB12-HealthProfessional/> [24. 5. 2023]
21. O'Callaghan A., Sinderen van D. (2016). Bifidobacterium and Their Role as Members of the Human Gut Microbiota. Dostop na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4908950/> [30. 6. 2023]
22. Prolife, 20 kapsul [Internet]. Dostop na: <https://www.lekarnar.com/izdelki/prolife-20-kapsul> [28. 6. 2023]
23. PB Assist [Internet]. Dostop na: <https://www.doterra.com/US/en/p/digestzen-pb-assist> [28. 6. 2023]
24. Ratzke C., Gore J. (2018). Modifying and reacting to the environmental pH can drive bacterial interactions. Dostop na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5868856/> [3. 7. 2023]
25. Roessner C. A., Santander P. J., Scott A. I. (2001). Multiple biosynthetic pathways for vitamin B12: variations on a central theme. *Vitamins and hormones*, 61, str. 267–297. Dostop na: [https://doi.org/10.1016/s0083-6729\(01\)61009-4](https://doi.org/10.1016/s0083-6729(01)61009-4) [30. 6. 2023]
26. Sliziweska K., Chiebicz-Wojcika. (2020). Growth Kinetics of Probiotic *Lactobacillus* Strains in the Alternative, Cost-Efficient Semi-Solid Fermentation Medium. Dostop na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7760101/> [2. 7. 2023]
27. Stewart J. (2020). When Two Bacteria Become One. Universty of Delaware. Dostop na: <https://www.udel.edu/udaily/2020/september/eleftherios-papoutsakis-bacterial-fusion/> [2. 7. 2023]
28. The MALDI Biotyper® System. Bruker Scientific LLC [Internet]. Dostop na: <file:///D:/Users/User/Downloads/1800236-brochure-maldi-biotyper-ruo-gp-bruker-md-09-2022.pdf> [29. 4. 2023]
29. Waya Forte Biotic mikoorgaizmi [Internet]. Dostop na: <https://www.moja-lekarna.com/waya-forte-biotic-mikroorganizmi-10-ali-20-kapsul> [3. 7. 2023]

Slike:

1. Slika 1: Kemijska struktura vitamina B12 in podobnih struktur. Dostop na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29216732/> [24. 5. 2023]
2. Tabela 1: Priporočen dnevni vnos vitamina B12 glede na starost. Dostop na: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminB12-HealthProfessional/> [24. 5. 2023]
3. Slika 2: Dvostopnejski imunokemijski kemoluminiscentni test z mikrodelci. Principi določanja koncentracije vitamina B12. Dostop pridobljen z dovoljenjem Abbott Diagnostics. [4. 7. 2023]