



**KONKURENČNOST PROBIOTIČNIH SEVOV
RODU *Bacillus* NA PATOGENO ČREVESNO
BAKTERIJO *Escherichia coli***

RAZISKOVALNA NALOGA- Druga področja

Avtorice: Nika DRINOVEC, Maruša GODLER, Lara ROPIČ BIZJAK

Program: Strokovna gimnazija

Mentorica: mag. Marjetka KASTELIC ŠVAB

Strahinj, april 2020

I. KAZALO

Vsebina

POVZETEK	1
ABSTRACT	2
ZAHVALA.....	3
1. UVOD	4
2. DELOVNE HIPOTEZE.....	6
3. TEORETIČNI DEL.....	7
3.1 Bakterije rodu <i>Bacillus</i> kot probiotiki	7
3.1.1 <i>Bacillus subtilis</i> HU58	8
3.1.2 <i>Bacillus coagulans</i>	9
3.1.3 <i>Bacillus linceniformis</i>	9
3.2 <i>Escherichia coli</i>	9
4. EKSPERIMENTALNI DEL	11
4.1 PRIPRAVA GOJIŠČ	11
4.1.1 Obogateno gojišče – krvni agar.....	11
4.1.2 CBL gojišče – Chinablau lactose agar	12
4.1.3 EMB gojišče.....	12
4.1.4 SS gojišče	13
4.1.5 Brilliant zeleni bujon	13
4.2 RAZISKOVANJE SKUPNEGA GOJIŠČA ZA DOKAZOVANJE KONKURENČNOSTI.....	15
4.2.1 Gojišče s krvnim agarjem, EMB agarjem in CBL agarjem	15
4.2.2 Gojišče z EMB agarjem in CBL agarjem.....	16
4.3 IZOLACIJA BAKTERIJ	16
4.3.1 Izolacija bakterij iz hlevskega gnoja	16
4.3.2 Izolacija bakterij iz šolskega akvarija	17
4.3.3 Izolacija bakterij iz MegaSporeprobiotics kapsule	17
4.4 DIFERENCIALNO BARVANJE.....	18
4.5 KATALAZNI TEST.....	18
4.6 TESTI IMViC.....	19
4.6.1 Test na indol s Kovačevim reagentom	19
4.6.2 Test z metilrdečim MR.....	20
4.6.3 Voges- Proskauer test (VP).....	20

4.7	HEMOLIZNI TEST	21
4.8	NEUBAUERJEVA ŠTEVNA KOMORA	22
5.	REZULTATI.....	23
5.1	Rezultati izolacije koliformnih bakterij vzorcev hlevskega gnoja	23
5.2	Rezultati morfoloških značilnosti izolirane bakterijske kulture akvarija želv in rib.	23
5.3	Rezultati morfoloških značilnosti izolirane bakterijske kulture hlevskega gnoja	24
5.4	Rezultat izolacije čiste kulture rodu <i>Bacillus</i>	25
5.5	Rezultat barvanja po Gramu	26
5.6	Rezultat katalaznega testa pri bakteriji <i>E.coli</i> in bakteriji rodu <i>Bacillus</i>	26
5.7	Rezultati IMViC testa za identifikacijo bakterij	27
5.7.1	Test na indol s Kovačevim reagentom	27
5.7.2	Test z metil rdečim MR.....	27
5.7.3	Voges-Proskauer test VP	28
5.8	Rezultat hemolize pri bakterijah rodu <i>Bacillus</i>	28
5.9	Rezultati štetja bakterijskih celic po Neubauerjevi števni komori	29
5.9.1	Določanje števila celic bakterij <i>E. coli</i> pod mikroskopom.....	29
5.9.2	Določanje števila celic bakterij rodu <i>Bacillus</i> pod mikroskopom.....	30
5.10	Rezultati izolacije bakterij do čistih kultur na krvnem agarju z eozinom.....	31
5.11	Rezultati konkurenčnosti bakterij <i>E.coli</i> in <i>Bacillus</i> po inkubaciji na skupnem mešanem gojišču (krvni agar + CBL + EMB agar)	31
5.12	Rezultati konkurenčnosti bakterij <i>E.coli</i> in <i>Bacillus</i> po inkubaciji na skupnem mešanem gojišču (EMB agar + CBL agar)	33
5.12.1	Inkubacija na 37 °C po 48 urah (4. 3. 2020)	33
5.12.2	Inkubacija na 37 °C po 72 urah (5. 3. 2020)	34
5.12.3	Inkubacija na 37 °C po 96 urah (6. 3. 2020)	35
5.13	Predstavitev rezultatov preraščene površine konkurenčnih bakterij v veliki petrijevki 1 z grafom	336
6	RAZPRAVA	367
7	ZAKLJUČEK.....	40
8	VIRI IN LITERATURA	422
8.2	Viri.....	422
8.3	Viri slik.....	Napaka! Zaznamek ni definiran. 3

II. KAZALO PREGLEDNIC

Tabela 1: Morfološke značilnosti bakterij na SS gojišču	24
Tabela 2: Morfološke značilnosti E. coli na EMB gojišču	24
Tabela 3: Morfološke značilnosti probiotikov na CBL gojišč	25

III. KAZALO GRAFOV

Graf 1: Grafična predstavitev deleža preraščene površine E. coli in probiotikov.....	24
--	----

IV. KAZALO SLIK

Slika 1: Površina bacila. C = kapsula; S = S-sloj; P = peptidoglikan	7
Slika 2: Bakterije <i>Bacillus subtilis</i> med sporulacijo (spore so modre barve).....	7
Slika 3: <i>B. coagulans</i> z vidnimi flageli (Todar, 2014)	8
Slika 4: <i>Bacillus Subtilis</i>	89
Slika 5: <i>E. coli</i> pod mikroskopom	100
Slika 6: Priprava PCA gojišča	111
Slika 7: Dodajanje 5 % defibrinogenizirane ovčje krvi	12
Slika 8: SS gojišče	13
Slika 9: Pipetiranje zelenega bujona v epruvete	144
Slika 10: Baza za krvni agar z eozinom	154
Slika 11: Eozin v prahu	155
Slika 12: Vzorci hlevskega gnoja in brilliant zeleni bujon	16
Slika 13: Odvzem vzorca z želv	17
Slika 14: Prerez kapsule s probiotiki	17
Slika 15: Barvanje po Gramu	18
Slika 16: Reakcija vodikovega peroksida z bakterijsko kulturo	19
Slika 17: Reagent metil rdeče	20
Slika 18: 40 % kalijev hidroksid in 5 % α -naftol	211
Slika 19: Mrežica Neubauerjeve števnice	22
Slika 20: Negativen test dokazovanja prisotnosti koliformnih bakterij (levo) in pozitiven test dokazovanja prisotnosti koliformnih bakterij (desno)	233
Slika 21: Bris iz akvarija na SS agarju po inkubaciji	243
Slika 22: Enojni cik cak bakterije <i>E. coli</i>	244
Slika 23: Kovinsko zeleni sijaj kolonij <i>E. coli</i>	254
Slika 24: Probiotik <i>Bacillus</i> na CBL gojišču	255
Slika 25: <i>Bacillus</i> na CBL gojišču- bližje, vidimo ravne, resaste in valovite robove	255
Slika 26: Rezultat katalaznega testa na <i>E. coli</i>	26
Slika 27: Pozitiven rezultat testa na indol (<i>E. coli</i>)	27
Slika 28: Negativen rezultat testa na indol (<i>Bacillus</i>)	27
Slika 29: Test z metil rdečim	27
Slika 30: Negativen rezultat VP testa (<i>E. coli</i>)	28
Slika 31: Alfa hemoliza (<i>Bacillus</i>)	28
Slika 32: Štetje celic pod mikroskopom	29
Slika 33: <i>E. coli</i> pod mikroskopom, ena bakterija je velika približno 4 μ m	29
Slika 34: Mreža pod mikroskopom	30
Slika 35: <i>E. coli</i> na krvnem agarju z eozinom	311
Slika 36: <i>Bacillus</i> na krvnem agarju z eozinom	311
Slika 37: <i>E. coli</i> in <i>Bacillus</i> na skupnem gojišču (CBL, EMB in krvni agar) 10. 2. 2020 (petrijevka A)	32
Slika 38: <i>E. coli</i> in <i>Bacillus</i> na skupnem gojišču (petrijevka B)	322
Slika 39: <i>E. coli</i> in <i>Bacillus</i> na skupnem gojišču (petrijevki C in D)	322
Slika 40: Domnevno kolonija <i>Bacillus</i> probiotikov ki zavira rast <i>E. coli</i> (petrijevka B)	332
Slika 41: Zeleno kovinski sijaj <i>E. coli</i> v veliki petrijevki 2 (4. 3.)	333
Slika 42: <i>E. coli</i> in <i>Bacillus</i> na skupnem gojišču - petrijevka mala 1 (4. 3.)	343
Slika 43: <i>E. coli</i> in <i>Bacillus</i> na skupnem gojišču - petrijevka mala 2 (4. 3.)	343

Slika 44: E. coli in Bacillus na skupnem gojišču - petrijevka velika 1 (4. 3.) **Napaka!**

Zaznamek ni definiran.⁴

Slika 45: E. coli in Bacillus na skupnem gojišču - petrijevka velika 2 (4. 3.) **Napaka!**

Zaznamek ni definiran.⁴

Slika 46: E. coli in Bacillus na skupnem gojišču - petrijevka mala 1 (5. 3.) 344

Slika 47: E. coli in Bacillus na skupnem gojišču - petrijevka mala 2 (5. 3.) 344

Slika 48: E. coli in Bacillus na skupnem gojišču - petrijevka velika 1 (5. 3.) 355

Slika 49: E. coli in Bacillus na skupnem gojišču - petrijevka mala 2 (6. 3.) 355

Slika 50: E. coli in Bacillus na skupnem gojišču - petrijevka velika 1 (6. 3.) 355

POVZETEK

V našem črevesju najdemo raznovrstno mikrofloro, ugodne kot škodljive mikroorganizme. Med ugodnimi bakterijami spadajo tudi probiotiki oziroma probiotične bakterije, ki našim prebavilom pomagajo pri presnavljanju hrane, sintetizirajo vitamine, aminokislino in maščobne kisline, skrbijo za peristaltiko in preprečujejo naselitev patogenim mikroorganizmom v črevesju. Poleg našega črevesja, jih najdemo v mlečnih izdelkih, prehranskih dodatkih, v še večjih količinah pa skoncentrirane v probiotičnih zdravilih. Probiotiki podpirajo razvoj in delovanje našega imunskega sistema. Sintetizirajo protimikrobne snovi, ki ovirajo preživetje in razvoj škodljivih bakterij. V raziskovalni nalogi smo preučevali ali bi lahko probiotike uporabljali kot vzporednica antibiotikom, v smislu zaviranja rasti in razmnoževanja patogenih mikroorganizmov kot sta lahko *Escherichia coli* (*E. coli*) in *Salmonella typhi*. To vprašanje je bilo povod naši raziskovalni nalogi. Najprej smo izolirali *E. coli* iz hlevskega gnoja (bakterije rodu *Salmonella* nam ni uspelo izolirati) in jo namnožili na optimalnem gojišču za rast – EMB gojišču. Probiotične seve *Bacillus* smo pridobili iz kapsul MegaSporeBiotic. V raziskovanju smo se posvetili iskanju in pripravi pravega, najugodnejšega gojišča za ugotavljanje konkurenčnosti, na katerem uspevajo tako bakterije *E. coli* kot probiotični rod *Bacillus* (*Bacillus licheniformis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus indicus* HU36, *Bacillus subtilis* HU58, *Bacillus clausii*). Ugotovili smo, da z mešanjem EMB in CBL gojišč, dobimo zelo ugodne razmere za rast in razmnoževanje obeh vrst kultur. Kulture smo po uspešni izolaciji do čistih kultur, aseptično prenesli na gojišča paralelno v približno enakem razmerju, kot jih najdemo v naravnem okolju. V času inkubacije smo na dva dni opazovali razrast obeh kultur. Ugotovili smo, da probiotiki rodu *Bacillus* lahko delujejo zaviralno na *E. coli*, torej inhibirajo rast le teh v ugodnih razmerah patogenih bakterij in s tem preprečujejo njihovo večjo razrast in posledično povzročanje bolezni.

Ključne besede: probiotične bakterije, *Escherichia coli*, antibiotik, *Bacillus*

ABSTRACT

We can find a very diverse microflora in our body, specifically in our intestines. From good microorganisms to harmful ones. Good bacteria include probiotics that is also known as probiotic bacteria which help us process food, synthesize vitamins, amino acids and fatty acids, they take care of our peristalsis etc. Beside in our intestines, we can also find them in dairy products, nutritional supplements, and in even greater quantities in probiotic medicines. Probiotics also support development in our immune systems and its activity. More specifically they synthesize antimicrobials that obstruct the survival and the development of harmful bacteria. We were wondering if probiotics could be used as antibiotics to decelerate the growth and reproduction of pathogenic bacteria such as *Escherichia coli* in *Salmonella typhi*. This question became the basis of our research.

We first isolated *E. coli* from manure (we could not isolate the bacteria *Salmonella*) and multiplied it on the most favorable medium - EMB medium. Probiotics were obtained from MegaSporeBiotic capsules. We sought a common medium for successful growth of both *E. coli* and *Bacillus* (our probiotics; *Bacillus licheniformis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus indicus* HU36, *Bacillus subtilis* HU58, *Bacillus clausli*). We have found that by mixing EMB in CBL mediums, you get a very favorable growth environment for the propagation of those two cultures. The cultures were aseptically transferred to the medium in an approximate ratio as found in the natural environment and incubated. We observed the numbers of colonies of both cultures every second day since the incubation.

We have come to the conclusion that probiotics can be used as inhibitors and inhibit the growth of pathogenic bacteria, thereby preventing their infections.

Keywords: probiotic bacteria, *Escherichia coli*, antibiotics, *Bacillus*

Nika Drinovec, Maruša Godler, Lara Ropič Bizjak. Konkurenčnost probiotičnih sevov rodu *Bacillus* na patogeno črevesno bakterijo *Escherichia coli*. Biotehniški center Naklo – Srednja šola, 2020

ZAHVALA

Predvsem bi se rade zahvalile naši mentorici Marjetki Kastelic Švab. Skozi celoten proces raziskovanja nas je spodbujala, nam svetovala in nudila strokovno pomoč ter nas usmerjala na pravo pot.

Posebej bi se rade zahvalile tudi laborantkama Ivani Grošelj in Maši Škrlep, ki sta nas oskrbovali z vsem potrebnim materialom in dovolili uporabo laboratorija v vseh urah dneva.

1. UVOD

Probiotične bakterije ali probiotiki so živi mikroorganizmi, ki imajo blagodejen učinek na gostitelja, če jih ta zaužije v zadostni količini. V našem telesu predstavljajo naravno črevesno floro– mikrobioto prebavil. Tam sodelujejo pri zapletenih presnovnih procesih in preprečujejo razrast patogenih ali oportunističnih bakterij v črevesju. Pomagajo pri vzdrževanju naravnega ravnovesja črevesne mikrobiote. Najbolj znani predstavniki probiotičnih bakterij so iz rodu *Lactobacillus* (mlečnokislinske bakterije) in rodu *Bifidobacterium*. Znotraj obeh rodov pa so številne vrste bakterij in njihovi sevi.

Glavni namen naše raziskovalne naloge je bilo dokazati, da probiotične bakterije lahko delujejo antibiotično in zavirajo rast in razmnoževanje patogenih mikroorganizmov. Za predstavnike patogenih mikroorganizmov smo izbrali bakterije vrste *E. coli*.

V teoretičnem delu raziskovalne naloge smo predstavili različne seve probiotičnih bakterij iz rodu *Bacillus* in *E. coli*.

V eksperimentalnem delu smo najprej odvzeli vzorce hlevskega gnoja in akvarijske vode habitata želv, da bi izolirali zelene patogene bakterije. Iz kapsul prehranskega dodatka MegaSporeBiotic smo izolirali probiotike rodu *Bacillus*. Pripravili smo različna gojišča in poiskali takega, ki zagotavlja optimalne pogoje za rast probiotičnih kot črevesnih enterobakterij. Izvedli smo različne mikrobiološke teste identifikacije mikroorganizmov kot so: katalazni test, test IMViC, test z metilrdečim in diferencialno barvanje. Ko smo se prepričali, da imamo zaželeno kulturo, smo jih inkubirali na skupnem gojišču in opazovali njihovo razrast. Ob tem smo ugotavljali njihovo medsebojno delovanje oziroma konkurenčnost. V naravi nastane konkurenca, če imajo organizmi podobno ekološko nišo oz. svoj življenjski prostor za uspešno rast in razmnoževanje.

Duc in sodelavci (2004) razlagajo, da imajo zaužiti probiotiki pozitiven učinek na gostitelja upoštevajoč tri osnovne mehanizme:

- imunomodulacija (stimulacija limfnega tkiva v črevesju),
- kompetitivna izključitev patogenov v prebavilih (tekmovanje za vezavna mesta),
- izločanje protimikrobnih substanc, ki preprečijo rast škodljivih bakterij.

Zanimivo je, da Združenje evropskih proizvajalcev kvasa navaja, da je do sedaj kot probiotik dokumentirana celo ena kultura kvasovk *Saccharomyces cerevisiae boulardii*, ki se uporablja za zdravljenje driske. Ob tem se moramo zavedati, da to vrsto pekovskih kvasovk res lahko uporabljamo za peko kruha, vendar s temperaturno obdelavo izničimo njihovo probiotičnost, ker niso več žive in tako posledično v telesu človeka nimajo nobenega probiotičnega delovanja (<https://www.cofalec.com/the-world-of-yeast/yeast-characteristics/>, 30.3.2020).

V kmetijstvu uporabljamo probiotike kot krmne dodatke. Ti dodatki ugodno vplivajo na gostitelja s tem, da izboljšajo mikrobno ravnovesje v njegovem prebavnem traktu. Proizvode, ki vsebujejo endospore rodu *Bacillus*, lahko hranimo v sušeni obliki za nedoločen čas, za razliko od drugih nesporogenih bakterij (Dular, 2010).

Encimi teh probiotičnih bakterij lahko izboljšajo prebavljivost hrane in tako gostitelju omogočijo razgradnjo snovi, katere gostitelj s svojim naborom encimov ne bi mogel razgraditi, mikrobna biomasa pa je pomemben vir proteinov za gostitelja. Pri dolgotrajnem uživanju večjih količin spor probiotičnih bakterij iz rodu *Bacillus* se pojavi vprašanje, kaj se zgodi s sporami v prebavnem traktu. Ker ni znanih dokazov o kolonizaciji je možno, da spore integrirajo z limfnim tkivom v prebavnem traktu. Študije so pokazale, da spore *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) kalijo v tankem črevesju. Spore najverjetneje niso samo prehodni obiskovalci črevesja. Če pa morda so, imajo verjetno bližnjo interakcijo s celicami gostitelja ali mikrofloro, ki lahko poveča njihov potencialni probiotični učinek (Dular, 2010).

Nekatere študije so pokazale neposreden probiotičen efekt spor *Bacillus*. Na primer preliminarne študije s perutnino so pokazale, da obstaja kompetitivna izključitev sevov bakterije *E. coli* (*E. coli*) z bakterijo *B. subtilis* (Duc in sod., 2004).

V številnih študijah je bilo ovrednoteno protimikrobno delovanje bakteriocina proizvedenega iz *Bacillus coagulans* (*B. coagulans*). Abada (2008) poroča, da ima bakteriocin *B. coagulans* zaviralno delovanje proti *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* in *Staphylococcus aureus*. Navedeno je, da ima *Bacillus cereus* zaviralni učinek na patogene, ki se prenašajo s hrano. Probiotične bakterije *B. coagulans* se uporabljajo tudi kot zaščita pred boleznimi v ribogojstvu ter kot krmni dodatek, ki preprečuje okužbo z *E. coli* in stafilokoki v prebavilih in posledično izboljša razvoj živali.

Vlogo *B. coagulans* so preučili tudi Lin in sod. (2011). Poročajo, da so dokazali znatno povečanje populacije bakterij *Lactobacillus* in zmanjšanje števila *E. coli*, pri zdravljenju s prehrano, ki je vsebovala *B. coagulans*.

2. DELOVNE HIPOTEZE

Z raziskovalno nalogo smo postavili naslednje hipoteze:

- Na osnovi prebrane literature domnevamo, da probiotični sevi *Bacillus* zavirajo rast enteropatogenih bakterij in s tem pripomorejo k boljšemu zdravju.
- *E. coli* je paličasta, gram negativna, fakultativno anaerobna bakterija s katalazno aktivnostjo.
- Domnevamo, da je krvni agar najbolj primerno gojišče za kultivacijo probiotičnih kot tudi patogenih črevesnih bakterij.
- Domnevamo, da bomo iz vzorca hlevskega gnoja uspeli izolirati in dokazati bakterijo *E. coli*.
- Domnevamo, da bomo iz vzorca šolskega akvarija uspeli izolirati in dokazati bakterijo rodu *Salmonella*.
- Domnevamo, da bomo iz kapsule MegaSporeProbiotics uspeli izolirati več vrst bakterij rodu *Bacillus*, ki nam pri raziskovanju predstavljajo probiotike.
- Pričakujemo, da bodo različni sevi bakterij rodu *Bacillus* zavirali rast *E. coli* in *Salmonelle* na izbranem gojišču, na katerem bomo preizkušali konkurenčnost probiotičnih in črevesnih bakterij.

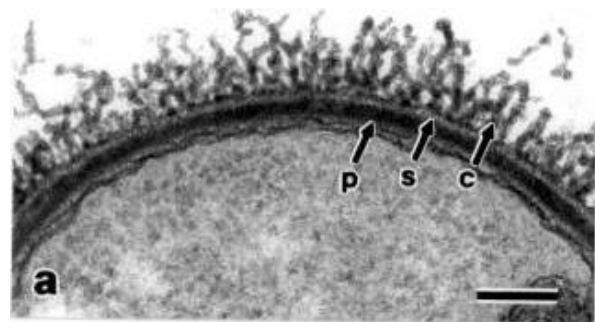
3. TEORETIČNI DEL

3.1 Bakterije rodu *Bacillus* kot probiotiki

Probiotiki so živi mikroorganizmi, ki koristijo zdravju, če jih uživamo v ustreznih količinah. Spore, različnih sevov *Bacillus*, vsebujejo tudi prehranske kapsule MegaSporebiotic. Bakterijske spore preživijo pogoje in procese, ki potekajo v sklopu celotnega želodčnega sistema. Z uživanjem tega prehranskega dopolnila telesu zagotovimo pet probiotičnih sevov: *Bacillus licheniformis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus indicus* HU36, *Bacillus subtilis* HU58 ter *Bacillus clausii*.

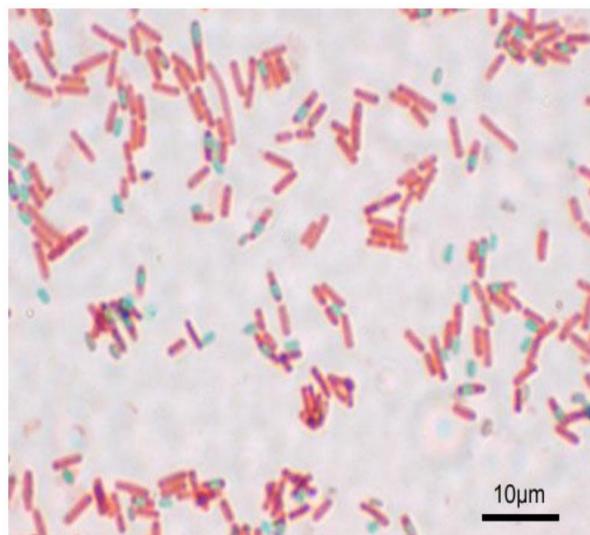
Kot večina gram pozitivnih bakterij je tudi bacilna oblika kompleksna in povezana z njihovimi lastnostmi oprijema, odpornosti in taktičnih odzivov (Todar, 2014).

Površina vegetativne celice je laminarna struktura, ki jo sestavljajo kapsula, beljakovinski površinski sloj (S- sloj), več plasti peptidoglikanskih slojev in beljakovine na zunanji površini membrane (slika 1) (Todar, 2014).



Slika 1: Površina bacila. C = kapsula; S = S-sloj; P = peptidoglikan

Večina bakterij iz rodu *Bacillus* je mezofilnih, s temperaturnim optimumom med 30 in 45 °C, lahko so tudi termofilni s temperaturnim optimumom do 65 °C ali celo psihrofilni, sposobni rasti in sporulirati pod 0 °C. So nevtrofilni, vendar lahko rastejo na širokem območju pH vrednosti od 2 do 11. Sposobni so tvorbe trpežne endospore (slika 2), katere naloga je zaščita pred negativnimi okoljskimi vplivi, kot so npr. toplota, kislost, slanost, pomanjkanje hranil. Spore lahko preživijo v neugodnih razmerah zelo dolgo. Tvorijo se v obdobju stresa zaradi neugodnih življenjskih pogojev. Tako je bakteriji omogočen obstoj. Dokler se okoljske razmere ne izboljšajo (lahko tudi vrsto let) se ob ugodnih razmerah začnejo hitro razmnoževati s cepitvijo (Todar, 2014).



Slika 2: Bakterije *Bacillus subtilis* med sporulacijo (spore obarvane modro)

V obliki spor lahko preživijo tudi do 235 °C do 8 minut.

(<https://www.synergialifesciences.com/bacillus-indicus-strain-spore-probiotic-HU36.html>)

Nika Drinovec, Maruša Godler, Lara Ropič Bizjak. Konkurenčnost probiotičnih sevov rodu *Bacillus* na patogeno črevesno bakterijo *Escherichia coli*. Biotehniški center Naklo – Srednja šola, 2020

Probiotiki so definirani kot nepatogeni mikroorganizmi, ki ob zaužitju ugodno vplivajo na zdravje ali fiziologijo gostitelja. Sestavljajo jih glive ali bakterije, še posebej mlečnokislinske bakterije. Njihova usoda in učinki se razlikujejo med sevi (Martenau in sod., 2001).

Obstajata dva mehanizma delovanja probiotikov:

- Vnos koristne mikroflore v prebavila:
 - sinteza encimov (razgradnja neželenih snovi),
 - presnovni produkti (stimulacija zorenja črevesnih resic, tvorba vitaminov).
- Zaviranje neželenih bakterij v prebavilih:
 - tekmovanje za hranila,
 - konkurenca za prostor,
 - sinteza baktericidnih/bakteriostatičnih snovi (Avguštin, 2006).

Večina aerobnih sporogenih bakterij je gibljivih s pomočjo peritrihnih flagelov- bički razporejeni po celotni površini celice (slika 3) (Todar, 2014).



Slika 3: *B. coagulans* z vidnimi flageli (Todar, 2014)

3.1.1 *Bacillus subtilis* HU58

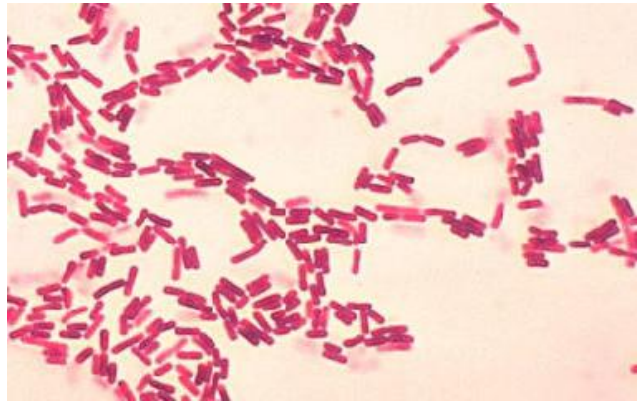
Bakterije vrste *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) spadajo med splošno nepatogene, po Gramu pozitivne bacile, ki merijo v dolžino od 0,5 do 1 μm . So aerobi oz. fakultativni anaerobi, katere pogosto najdemo v zemlji in prebavilih prežvekovalcev in ljudi. So paličaste bakterije, ki so katalazno pozitivne, v neugodnih razmerah tvorijo centralne spore. Prvotno so bile znane kot *Vibrio subtilis*.

B. subtilis se pogosto uporablja kot dodatek zemlji za bujnejšo rast rastlin. Proizvaja tudi številne encime, zato ga uporabljamo kot dodatek v pralnih praških. V kmetijstvu ga uporabljamo kot dodatek h krmi živali, saj imajo izbrani sevi probiotične značilnosti. Prav tako ga uporabljajo v alternativni medicini kot imuno- stimulativno sredstvo pri boleznih prebavil in sečil (povzeto po Dular, 2010).

3.1.2 *Bacillus coagulans*

Prvotno je bil poimenovan kot *Lactobacillus sporogenes*. Je gram pozitiven, katalazno pozitiven, fakultativno anaeroben in nepatogen mikroorganizem, ki v neugodnih razmerah tvori terminalne spore (slika 4).

Struktura celične stene bakterij, ki tvorijo endospore, je skladna s strukturo gram pozitivnih bakterij, za katere je značilno, da imajo debelejšo celično steno. Vendar mnoge sporogene bakterije lahko pod mikroskopom opazimo kot gram negativne, ko vstopijo v stacionarno fazo rasti (Todar, 2014).



Slika 4: *Bacillus coagulans* obarvan po Gramu

Odporen je na vročino, optimalna temperatura rasti pa je od 35 do 50 °C. Optimalen pH je najugodnejši v intervalu 5,5 do 6,5 (Özusağlam, 2010). *B. coagulans* je uporaben v industrijski proizvodnji mlečne kisline zaradi svoje sposobnosti fermentacije glukoze in ksiloze (lesni sladkor) v mlečno kislino v anaerobnih pogojih pri temperaturah pod 50°C. Nekateri sevi poleg mlečne kisline proizvajajo tudi termostabilno alfa amilazo (Jiang T. in sod., 2016).

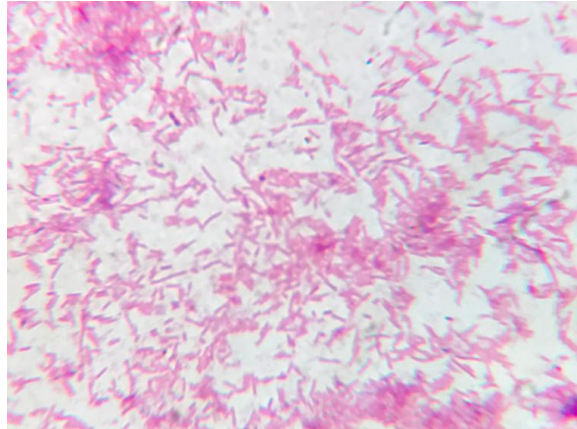
3.1.3 *Bacillus licheniformis*

Bacillus licheniformis proizvaja enako vrsto kapsule poli-D-glutamat kot *B. anthracis*. Številni sevi proizvajajo rdeči pigment. Spore se pojavljajo v tleh in na ptičjem perju. Optimalna temperatura rasti je med 30 in 50 °C. Med drugim je tudi industrijski vir bakitracina, medicinsko uporabnega antibiotika (Todar, 2014).

3.2 *Escherichia coli*

Bakterija *E. coli* je po gramu negativen (slika 5), slabo gibljiv bacil, velik od 1- 6 µm, ki ima fimbrije. Nekateri sevi imajo kapsulo. Uspeva pri temperaturah od 0 do 45 °C in je za gojenje nezahtevna bakterija. Pri ljudeh in živalih povzroča okužbe prebavil in zunajčrevesne okužbe. Bakterija je tudi predstavnik normalne flore v črevesju, pomaga pri prebavi, ovira gnitje in sodeluje pri nastanku vitaminov K in B kompleksa. Najdemo jo povsod, kjer gre za onesnaženje z iztrebki (Orožen Adamič 2015).

Bakterija spada v družino *Enterobacteriaceae* in znotraj nje v skupino koliformnih bakterij, ki jih lahko dokazujemo z briljant zelenim laktoznim bujonom z žolčem (BGLBB) z vstavljenimi Durchamovimi cevkami. Bakterija *E. coli* živi v vodi, zemlji ter črevesju ljudi in živali in je indikator sveže fekalne kontaminacije vode in hrane. Njena prisotnost v živilih, ki so pripravljena za uživanje, kaže na nezadostno osebno higieno, nezadostno vzdrževanje higiene v obratih za proizvodnjo in promet z živili. Razgrajuje glukozo in druge ogljikove hidrate ob tvorbi plina, aminokislino triptofan pa razgrajuje v indol. Pri 44 °C razgrajuje laktozo (Bajt, 2013).



Slika 5: *E. coli* pod mikroskopom

Ko *E. coli* propade se lahko izloči endotoksin, nekatere bakterije izdelujejo tudi enterotoksine, ki delujejo citotoksično. *E. coli* je patogena predvsem, kadar se naseli v drugih delih telesa, izven črevesja. Nekateri sevi povzročajo driske, večino pa povzročajo okužbe sečil, tudi sepsa pri bolnikih v bolnišnicah, kjer se bakterije največkrat razširijo iz sečil v kri. Pride lahko do vnetja trebušne mrene, žolčnika, slepiča, pljučnice, okužb kirurških ran (Orožen Adamič, 2015).

E. coli je vedno prisotna v velikem številu v človeškem in živalskem blatu, posledično v odplakah in vodah, ki so onesnažene s fekalijami (človeka, domačih in divjih živali, uporaba v poljedelstvu). Prisotnost *E. coli* v pitni vodi zanesljivo dokazuje, da je bila voda fekalno onesnažena. Po pravilniku o pitni vodi (UL RS, št. 19/04, 35/04) so bakterije *E. coli* uvrščene v Prilogo I, del A, med mikrobiološke parametre. Mejna vrednost za *E. coli* v pitni vodi je 0/100 mL vzorca vode, kar pomeni, da v 100 mL pitne vode ne sme biti niti ene bakterije *E. coli*, sicer je voda mikrobiološko oporečna.

4. EKSPERIMENTALNI DEL

Za izvedbo eksperimentalnega dela smo najprej pripravili 5 različnih vrst gojišč: briliant zeleni bujon za dokazovanje koliformnih bakterij, selektivni gojišči EMB in SS agar za izolacijo bakterij rodu *Escherichia* in *Salmonella* ter CBL agar za rast probiotičnih bakterij rodu *Bacillus*. Pripravili smo tudi obogateno gojišče krvni agar, ki daje možnost razrasti obema vrstama kultur, tako probiotikom kot enterobakterijam. Krvni agar ima veliko skupnih karakteristik po vsebnosti hranilnih snovi kot so v našem telesu oz. v naši krvi.

4.1 PRIPRAVA GOJIŠČ

Gojišča so substrati za gojenje mikroorganizmov v umetnih, *in vitro* pogojih oziroma v laboratorijskih razmerah. Vsebujejo različne hranilne snovi, ki omogočajo optimalno rast in razmnoževanje kulture. Poznamo različne vrste gojišč (tako po konzistenci kot po načinu delovanja in namenu uporabe), kjer lahko gojimo določene vrste mikroorganizmov.

4.1.1 Obogateno gojišče – krvni agar

Krvni agar je obogateno gojišče, ki omogoča hitro razrast bakterijam kot so bakterije rodu *Staphylococcus*. Obogatena gojišča so osnovna gojišča, ki jim primešamo različne dodatke in s tem lažje izoliramo in gojimo zahtevnejše biokulture.

Material:

- 500 ml PCA gojišča
- 25 ml defibrinogenizirane krvi
- magnetno mešalo
- sterilne petrijeve plošče

Postopek dela:

Najprej pripravimo in steriliziramo osnovno PCA gojišče (slika 6), kateremu dodamo 5 % defibrinogenizirane ovčje krvi (slika 7). Kri vedno dodajamo agarju ohlajenemu na 40- 42 °C, saj bi pri toplejšem lahko prišlo do koagulacije krvnih beljakovin. Krvni agar nato aseptično prelijemo v sterilne petrijeve plošče.



Slika 6: Priprava PCA gojišča



Slika 7: Dodajanje 5 % defibrinogenizirane ovčje krvi

4.1.2 CBL gojišče – Chinablau lactose agar

CBL je selektivno trdno gojišče s kitajskim modrilom in laktozo, namenjeno tistim mikroorganizmom, ki s svojim metabolizmom iz laktoze sintetizirajo kislino.

Sestava CBL gojišča:

- 3 g mesnega ekstrakta
- 5 g peptona in kazeina
- 5 g natrijevega klorida NaCl
- 10 g laktoze
- 0,375 g kitajskega modrila
- 10-15 g agar-agarja
- 1000 ml destilirane vode

Postopek dela:

Sestavine suspendiramo v vodi in s segrevanjem popolnoma raztopimo. Gojišče prelijemo v erlenmajerice in steriliziramo 15 minut pri 121 °C (avtoklaviranje). Gojišče ohladimo in ga prelijemo v petrijevke.

4.1.3 EMB gojišče

EMB je selektivno trdno gojišče z eozinom in metilenskim modrilom. Z njim smo izolirali kulturo *E. coli*, ki na gojišču tvori kolonije premera 2-3 mm, ki kovinsko zeleno fluorescirajo in imajo vijoličasto središče.

Sestava EMB gojišča:

- 10 g peptona
- 10 g laktoze $C_{12}H_{22}O_{11}$
- 2 g dikalijevega hidrogenfosfata K_2HPO_4

- 0,4 g eozin y
- 0,065 g metilenskega modrila
- 12-18 g agar- agarja
- 1000 ml destilirane vode

Postopek dela:

Vse sestavine raztopimo v destilirani vodi in uravnamo pH vrednost na 7- 6,8. Raztopljeno gojišče razlijemo v več erlenmajeric po 100 do 150 ml in avtoklaviramo 15 minut pri 121 °C. Ohladimo na 60 °C, dobro premešamo in gojišče prelijemo v sterilizirane petrijevke.

4.1.4 SS gojišče

Je trdno selektivno in diferencialno gojišče, ki omogoča večinoma razrast mikroorganizmom rodu *Salmonella* in *Shigella* (slika 8). Na SS agarju tvori salmonela prozorne, sluzaste kolonije s temnim črnim centrom ali brez njega.

Sestava gojišča:

- 10 g peptona
- 10g laktoze
- 8,5 g žolčne soli
- 10 g natrijevega citrata
- 1 g amonijevega Fe(III) citrata
- 0,0003 g briljantno zelenega
- 0,025 g nevtral rdečega
- 12 g agarja



Slika 8: SS gojišče

Postopek dela:

60 g sestavljenega gojišča suspendiramo v 1000 ml destilirane vode, uravnamo pH vrednost na 6,8- 7 in prelijemo v petrijeve posode. Gojišča ne avtoklaviramo.

4.1.5 Brilliant zeleni bujon

To je tekoče gojišče za dokazovanje prisotnosti koliformnih mikroorganizmov, ki fermentirajo laktozo in povzročajo spremembo barve gojišča iz zelene v rumeno.

Sestava gojišča:

- 10 g peptona
- 10 g laktoze
- 20 g dehidriranega žolča
- 0,0133 g briljantnega zelenila
- 1000 ml destilirane vode

Postopek dela:

V destilirani vodi raztopimo vse sestavine in nazadnje še dodamo 13,3 ml 0,1 % vodne raztopine briljantnega zelenila in naravnamo pH vrednost gojišča na 6,8- 7. Po 10 ml gojišča odpipetiramo v epruvete z narobe obrnjenimi Durchamovimi cevkami (slika 9) in jih 15 minut steriliziramo v avtoklavu na 121°C. Po sterilizaciji ne sme biti v cevkah mehurčkov.



Slika 9: Pipetiranje zelenega bujona v epruvete

4.2 RAZISKOVANJE SKUPNEGA GOJIŠČA ZA DOKAZOVANJE KONKURENČNOSTI

Pri dokazovanju konkurenčnosti bakterij iz rodu *Bacillus* napram enterobakterijam na skupnem gojišču, moramo obema vrstama zagotoviti optimalne pogoje ter se približati pogojem v človeškem črevesju (inkubacija na 37 °C). Ker za dokazovanje konkurenčnosti nismo našli enega ugodnega skupnega gojišča, smo se odločili zmešati več različnih gojišč skupaj, saj smo želeli imeti lastnosti EMB gojišča (selektivnega gojišča za *E. coli*, rod *Salmonella* nismo uspeli izolirati iz narave) in hkrati zagotoviti dobre pogoje s hranili tudi za rast probiotičnim bakterijam rodu *Bacillus*.

Želeli smo doseči, da bo na skupnem gojišču opazna razlika v morfoloških lastnostih kolonij, barvi bakterijskih kolonij. Predvidevali smo, da bo snov eozin, ki je prisoten v EMB gojišču, dal kovinsko zeleno barvo kolonij *E. coli*, zato smo zmešali krvni agar z eozinom (0,04g v 100 ml) (slika 10, 11), vendar se zeleno kovinski sijaj ni pojavil.



Slika 10: Baza za krvni agar z eozinom

Naprej smo poskušali doseči hkratno ugodno rast preučevanih bakterij (rod *Bacillus*, *E. coli*) na gojišču, kjer smo zmešali gojišča v razmerju 1:1:1 krvni agar, CBL gojišče in EMB gojišče. Vendar tudi na tem gojišču ni bilo vidnih morfoloških razlik med kolonijami npr. razlik v barvi kolonij.

Zato smo pripravili še tretjo vrsto gojišča, kjer smo zmešali skupaj le CBL in EMB gojišče. Tu smo uspešno dosegli vidno precejšnjo razliko v barvi med kolonijami bakterij. Kolonije *E. coli* so imele značilen kovinski sijaj, zato so tudi bili rezultati konkurenčnosti najboljše vidni na tem skupnem gojišču.



Slika 11: Eozin v prahu

4.2.1 Gojišče s krvnim agarjem, EMB agarjem in CBL agarjem

Material:

- velike sterilne petrijevke (premer 20 cm)
- sterilne petrijevke
- hokejka
- avtomatska pipeta

Nika Drinovec, Maruša Godler, Lara Ropič Bizjak. Konkurenčnost probiotičnih sevov rodu *Bacillus* na patogeno črevesno bakterijo *Escherichia coli*. Biotehniški center Naklo – Srednja šola, 2020

- gorilnik
- pripravljena gojišča (EMB, CBL, krvni agar)

Postopek dela:

Pripravljena gojišča (EMB, CBL, krvni agar) smo aseptično zmešali v razmerju 1: 1: 1. To skupno gojišče smo nato prelili v velike sterilne petrijevke in na vsako veliko petrijevko (v1 in v2) odpipetirali po 3 ml mešanice bakterij v fiziološki raztopini v razmerju koncentracije *E. coli: Bacillus*, 1: 1. Enako smo odpipetirali po 1 ml mešanice bakterij v fiziološki raztopini v razmerju koncentracije *E. coli: Bacillus*, 1: 1 še v manjše petrijevke (m1 in m2). Nato smo naredili razmaz “spread plate” po petrijevih ploščah s sterilno hokejko. Gojišča z inokulumom smo inkubirali na 37 °C za 24 ur.

4.2.2 Gojišče z EMB agarjem in CBL agarjem

Material:

- velike sterilne petrijevke (premer 20 cm)
- sterilne petrijevke
- hokejka
- avtomatska pipeta
- gorilnik
- pripravljena gojišča (EMB, CBL)

Postopek dela:

Pripravljene gojišči (EMB, CBL) smo sterilno zmešali v razmerju 1: 1. Prelili smo jih v velike sterilne petrijevke ter nato na vsako veliko petrijevko (v1 in v2) odpipetirali po 3 ml mešanice bakterij v fiziološki raztopini neznane koncentracije, saj nam zaradi neznanih razlogov motnosti mešanice bakterij v fiziološki raztopini ni uspelo prešteti bakterij *Bacillus* in *E. coli* pod mikroskopom v Neubauerjevi števni komori. Nato smo prelili mešano gojišče še v manjše petrijevke (m1 in m2) in dodali po 1 ml pripravljenega bakterijskega vcepka. Nato smo še bakterije enakomerno razporedili po gojišču petrijeve plošče s sterilno hokejko. Gojišča s kulturami smo inkubirali na 37 °C do 96 ur in opazovali rast kolonij po 48 urah, 72 urah in 96 urah.

4.3 IZOLACIJA BAKTERIJ

4.3.1 Izolacija bakterij iz hlevskega gnoja

Material:

- 9 vatiranih palčk za odvzem vzorca
- 9 epruvet



Slika 12: Vzorci hlevskega gnoja in briliant zeleni bujon

- avtomatska pipeta
- gorilnik
- gojišče briliant zeleni bujon z Durchamovimi cevkami

Postopek dela:

Vzorec hlevskega gnoja smo dobili na šolskem posestvu. Z vatiranimi palčkami smo odvzeli vzorce ter jih nato v območju gorilnika sterilno prenesli v briliant zeleni bujon (slika 12). Zeleni bujon smo že prej odpipetirali z avtomatsko pipeto po 10 ml v vsako epruveto ter dodali Durchamove cevke. Nato smo inkubirali za 24 ur na 37 °C . Po inkubaciji se ob prisotnosti koliformnih bakterij v cevke ujame plin.

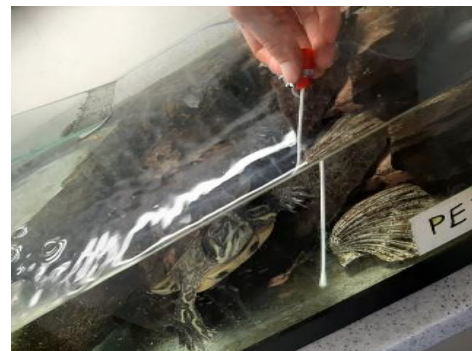
4.3.2 Izolacija bakterij iz šolskega akvarija

Material:

- vatirane palčke
- zaščitne rokavice

Postopek dela:

Vzorec smo odvzeli v šolskem akvariju tako, da smo z vatiranimi palčkami odvzeli bris želv (slika 13) in vode njihovega okolja. Vzoredno smo odvzeli vzorce tudi iz akvarija z ribami. Nato smo vzorce aseptično prenesli na selektivno gojišče za *Salmonello* in *Shigello* - SS agar, katere smo inkubirali na 37 °C za 24 ur.



Slika 13: Odvzem vzorca z želv

4.3.3 Izolacija bakterij iz MegaSporeprobiotics kapsule

Material:

- gorilnik
- skalpel
- sterilne epruvete s fiziološko raztopino
- pinceta
- kapsula MegaSpor probiotics probiotika



Slika 14: Prerez kapsule s probiotiki

Postopek dela:

S sterilnim skalpelom smo v bližini ognja prerezali ovoj kapsule (slika 14) ter vsebino (spore rodu *Bacillus*) steresli v epruveto s sterilno fiziološko raztopino. Nato smo po 1 ml suspenzije prenesli na petrijevke s CBL gojiščem ter inkubirali na 37 °C za 24 ur.

4.4 DIFERENCIALNO BARVANJE

Najbolj razširjeno in najbolj uporabno za identifikacijo bakterij po obliki in zgradbi celične stene je diferencialno barvanje po Gramu. Način barvanja je odvisen od prepustnosti celične stene, velikosti por in debeline celične stene (peptidoglikanski sloj), ki je pri Gram pozitivnih bakterijah debelejša kot pri Gram negativnih. Za barvanje uporabimo dve kontrastni barvi, modro in rdečo. Gram pozitivne bakterije ohranijo barvo prvega topila, ki je modro vijolična, rožno rdeče pa se obarvajo Gram negativne bakterije, ko jih z alkoholom speremo in obarvamo z drugim barvilom.

Material:

- objektno steklo
- gorilnik
- čista kultura
- cepilna zanka
- destilirana voda
- lugolova raztopina
- raztopina kristal vijoličnega barvila
- etanol
- raztopina safranina
- imerzijsko olje
- mikroskop



Slika 15: Barvanje po Gramu

Najprej pripravimo preparat tako, da s cepilno zanko odvezamemo vzorec čiste kulture in ga prevažamo po objektnem steklu. Nato ga fiksiramo nad ognjem in počakamo, da se posuši. Nad posodico ga prelijemo z raztopino kristal vijoličnega in pustimo 2 minuti (slika 15). Raztopino odlijemo in ga prelijemo z Lugolovo raztopino. Po 1 minuti speremo z vodo in dodatno prelijemo z etanolom za 30 sekund. Preparat speremo z vodo in prelijemo z raztopino safranina. Počakamo 30 sekund in zopet speremo z vodo ter posušimo. Preparat je pripravljen za mikroskopiranje.

4.5 KATALAZNI TEST

Eden od osnovnih biokemijskih testov za identifikacijo bakterij je katalazni test - test ugotavljanja prisotnosti encima katalaze v bakterijskih celicah. Encim katalaza razgrajuje

vodikov peroksid (toksičen produkt metabolizma), ki nastane kot stranski produkt v procesu celičnega dihanja.

Material:

- epruveta
- cepilna zanka
- 3 % vodikov peroksid
- čista kultura



Slika 16: Reakcija vodikovega peroksida z bakterijsko kulturo

Postopek dela:

Eno kolonijo izolirane kulture smo nanegli na petrijevko in nanjo kapnili vodikov peroksid. Reakcija je potekla takoj. Dokaz katalazne reakcije je sproščanje kisika kot stranskega produkta (se vidi kot penjenje kulture) (slika 16), ki potrjuje, da bakterija sintetizira encim katalazo za razgradnjo vodikovega peroksida na vodo in kisik. Po poskusu lahko sklepamo, da delamo z aerobnimi oziroma fakultativno anaerobnimi bakterijami.

4.6 TESTI IMViC

Test IMViC je skupina testov za identifikacijo in ločevanje posameznih koliformnih skupin bakterij (test na indol, metilrdeče, Voges-Proskauer, citrat). S temi testi smo želeli ugotoviti prisotnost bakterije *E. coli* v vzorcih in kakšne so njene biokemijske lastnosti.

4.6.1 Test na indol s Kovačevim reagentom

Pomembna lastnost bakterij je tvorba indola. Vse bakterije iz rodu *Escherichia* razgrajujejo beljakovine do aminokislin, aminokislino triptofan pa do vode in indola, ki ga dokazujemo s tem testom.

Material:

- bakterijska kultura
- Kovačev reagent
- peptonska voda za indol

Postopek dela:

V epruvete s peptonsko vodo prenesemo po eno kolonijo *E. coli* z gojišča in inkubiramo 24 ur na 37 °C. Po inkubaciji dodamo 0,2 ml Kovačevega reagenta ter dobro premešamo. Če je *E.*

coli prisotna, se na površini gojišča pojavi rdeče obarvan obroč. Negativen rezultat predstavlja rahlo rumenkasta barva reagenta (primer za rod *Bacillus*).

4.6.2 Test z metilrdečim MR

Pri razgradnji glukoze nekateri mikroorganizmi tvorijo organske kisline (mlečno, očetno kislino in druge kisline) in tako znižajo pH gojišča tudi do vrednosti 4,5. Zaradi tega se indikator MR obarva rdeče in s tem potrdi prisotnost *E. coli*.

Material:

- gojišče z indikatorjem metilrdeče
- čista kultura
- reagent metil rdeče (slika 18)



Slika 17: Reagent metil rdeče

Postopek dela:

Kulturo nacepimo na gojišče v epruveh in inkubiramo 24- 48 ur na temperaturi 37 °C. Po inkubaciji dodamo 5- 6 kapljic reagenta metil rdeče na 10 ml gojišča (slika 17). Poskus je pozitiven, če se ob dodajanju reagenta gojišče popolnoma obarva rdeče. To pomeni, da se je vrednost pH gojišča zmanjšala, zaradi metabolnega celičnega procesa razgradnje glukoze v kislino. Pri negativnem testu se gojišče obarva rumeno oz. oranžno.

4.6.3 Voges- Proskauer test (VP)

Ob presnavljanju enakih ogljikovih hidratov mnoge bakterije tvorijo različne končne produkte. S testom preverjamo ali je pri razgradnji glukoze končni produkt acetoin, ki ga dokazujemo z nekaj kapljicami 5 % α -naftola. *E. coli* kaže pri tem testu negativno reakcijo.

Material:

- 5 % α -naftola
- 40 % kalijevega hidroksida KOH (slika 19)
- gojišče s čisto kulturo

Postopek dela:

Gojišče pripravimo enako kot pri MR testu in ga skupaj s čisto kulturo inkubiramo 48 ur na 37 °C. Nato na gojišče dodamo 0,6 ml 5 % α -naftola in 0,2 ml 40 % kalijevega hidroksida na 1 ml gojišča ter dobro pretresemo z vibromiksom. Na rezultate moramo počakati najmanj

1 uro. Če se gojišče zgoraj obarva rdeče, je VP-test pozitiven. *E. coli* naj bi pri tem testu pokazala negativno reakcijo brez obarvanja.



Slika 18: 40 % kalijev hidroksid in 5 % α -naftol

4.7 HEMOLIZNI TEST

Nekatere bakterije izločajo encime, ki uničujejo (lizirajo) eritrocite v krvi. Poznamo tri vrste hemolize: alfa, beta ter gama hemolizo. Pri alfa hemolizi pride do nepopolnega uničenja eritrocitov, kar opazimo kot rjavo območje okoli kolonij na gojišču. Pri beta hemolizi pride do popolnega uničenja eritrocitov, kar vidimo kot zbistritev gojišča okoli kolonije. Gama hemoliza pa je pojav, pri katerem do hemolize sploh ne pride in krvni agar ostaja rdeče barve. V raziskovanju nas je zanimalo ali so bakterije rodu *Bacillus* hemolitične, kar bi nam omogočalo lažje ločevanje z *E. coli* na skupnem gojišču ugotavljanja konkurenčnosti.

Material:

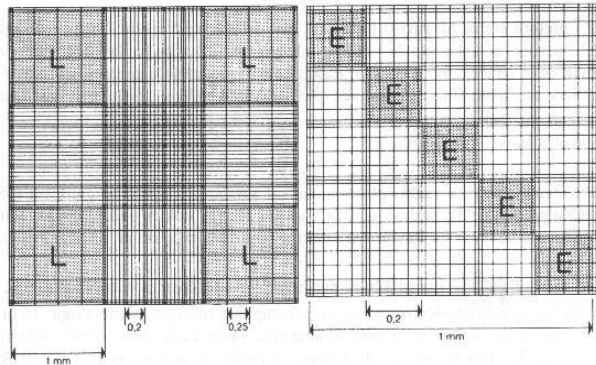
- krvni agar
- čista kultura
- cepilna zanka
- gorilnik
- fiziološka raztopina

Postopek dela:

S cepilno zanko aseptično prenesemo kulturo *Bacillus* na krvni agar in po inkubaciji opazujemo spremembo barve gojišča.

4.8 NEUBAUERJEVA ŠTEVNA KOMORA

Skupno število mikroorganizmov v tekočem vzorcu lahko ocenimo z direktnim štetjem celic v števeni komori. Tipična števena komora je npr. hemocitometer. To je steklena ploščica z 2 osrednjima ploščama, ki sta natančno 0,1 mm pod nivojem ravnine stranskih grebenov. Vsaka sredinska ploščad ima natančno vgravirano mrežico s standardizirano velikostjo kvadratkov (slika 19).



Slika 19: Mrežica Neubauerjeve števene komorice

Števno komoro pripravimo tako, da najprej rahlo navlažimo stranske grebene, nanju pritisnemo poseben krovnik, da pokrijemo obe mreži. Vzorec za štetje odpipetiramo ob krovnik in kapilarni tok sam potegne vsebino v števeni prostor. Celice štejemo pod 400 kratno povečavo. Preštejemo celice v 5 E kvadratih in izračunamo povprečje X za 1 E kvadratak. 1 E kvadratak ima površino $0,04 \text{ mm}^2$. Pravilo štetja je, da vključimo tiste, ki so na zgornjem ali levem robu in izključimo tiste, ki so na desnem in spodnjem robu. Rob kvadratka je označen s tremi črtami. Zanesljive rezultate dobimo, če imamo v 1 E kvadratu od 5 do 15 celic, drugače si pripravimo ustrezne razredčitve. Nato število celic na mL izračunamo po formuli $N = X \cdot 25 \cdot 10^4$. Število N , ki dobimo, nam pove število celic na ml vzorca.

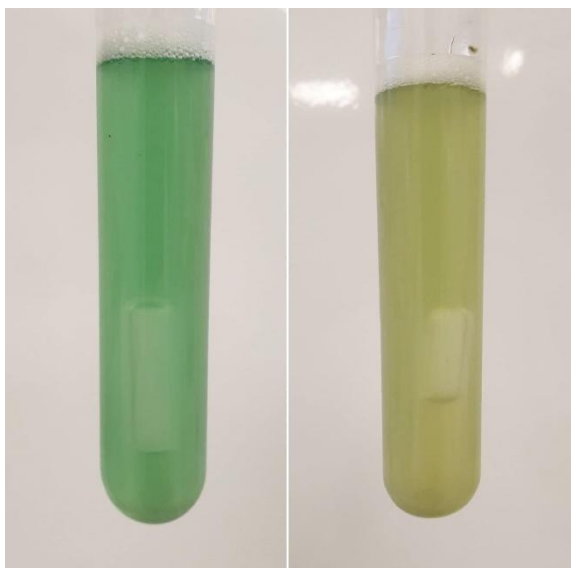
Vzorci suspenzij *E. coli* in probiotikov smo pripravili tako, da smo z ezo iz kolonije odvzeli nekaj kulture in jo prenesli v epruveto z 10 ml fiziološke raztopine.

Cilj štetja bakterij je, da bi dobili enako koncentracijo *Bacillus* probiotikov ter *E. coli*, zmes teh pa bi nato nanесли na pripravljeno skupno gojišče v velikih petrijevkah in po 48 urni inkubaciji opazovali konkurenčnost teh bakterij.

5. REZULTATI

5.1 Rezultati izolacije koliformnih bakterij vzorcev hlevskega gnoja

V skladu s postavljeno hipotezo smo odvzeli vzorce hlevskega gnoja s sterilnimi vatiranimi palčkami in vzorce prenesli v briliant zeleni bujon, gojišče za dokazovanje koliformnih bakterij. Pri štirih epruvetah je bil rezultat negativen (slika 20), pri petih epruvetah pa je bil rezultat pozitiven, prišlo je do razbarvanja in motnosti gojišča in ujetja plinov v Durchamovih cevkah. Prav tako se je pokazala razbarvanost tekočega gojišča iz zelene v rumeno (slika 20). Nato smo pozitivne vzorce precepili naprej na selektivno gojišče EMB za dokazovanje prisotnosti *E. coli*.



Slika 20: Negativen test dokazovanja prisotnosti koliformnih bakterij (levo) in pozitiven test dokazovanja prisotnosti koliformnih bakterij (desno)

5.2 Rezultati morfoloških značilnosti izolirane bakterijske kulture akvarija želv in rib

Odvzeli smo tudi vzorec iz akvarija in ga prenesli na selektivno gojišče za rod bakterij *Salmonella in Shigella* - SS agar, vendar na gojišču ni bilo opaznih nobenih poraslih kolonij, ki so značilne za rod *Salmonella*. Tako v nadaljevanju raziskovanja nismo imeli raziskovali z bakterijami rodu *Salmonella*.

Po inkubaciji brisa na gojišču SS agar smo razraslo bakterijsko kolonijo opisali po protokolu za določanje kultur na podlagi morfoloških značilnosti (tabela 1).

MORFOLOŠKA ZNAČILNOST	kolonija
VELIKOST	premer 3 mm
OBLIKA	nepravilna
BARVA	rumena
ROBOVI	valoviti in resasti
STRUKTURA	zrnasta
PROFIL	konveksna
PROSOJNOST	neprosojna

Tabela 1: Morfološke značilnosti bakterij na SS gojišču



Slika 21: Bris iz akvarija na SS agarju po inkubaciji

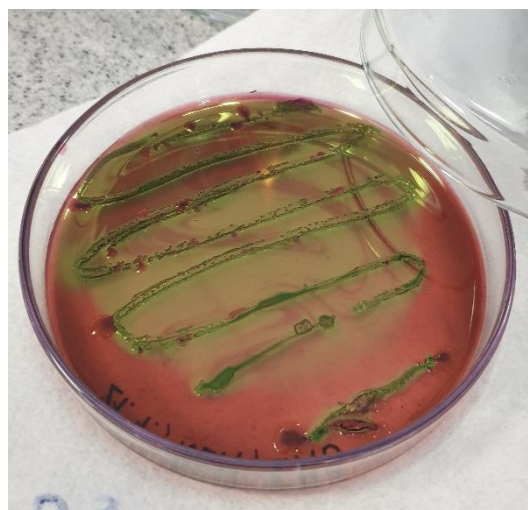
Predvidevamo, da smo dobili *Shigello* (slika 21), saj kolonija ni značilna za *Salmonello* (ni temnih okroglih kolonij), gojišče pa je selektivno za *Salmonello* in *Shigello*.

5.3 Rezultati morfoloških značilnosti izolirane bakterijske kulture hlevskega gnoja

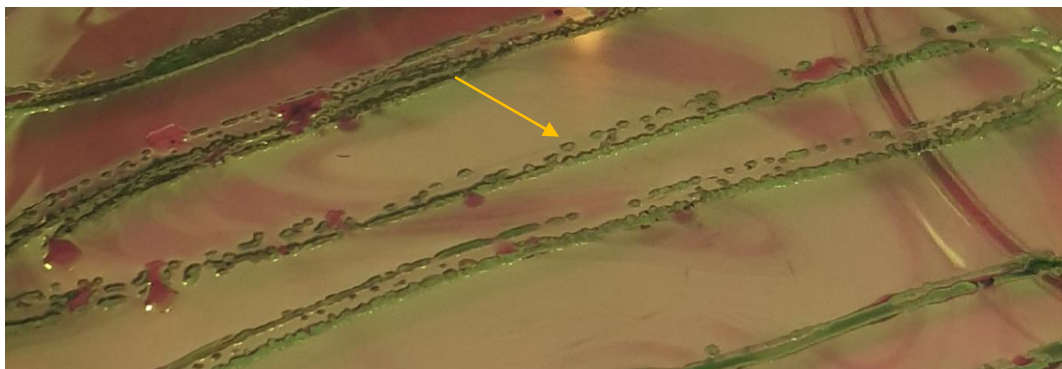
Po inkubaciji brisa na gojišču EMB smo razraslo bakterijsko kolonijo opisali po protokolu za določanje kultur na podlagi morfoloških značilnosti (tabela 2).

MORFOLOŠKA ZNAČILNOST	kolonija
VELIKOST	premer 1 mm
OBLIKA	kroglasta
BARVA	kovinsko zeleni sijaj
ROBOVI	ravni
STRUKTURA	enotna
PROFIL	konveksna
PROSOJNOST	neprosojna

Tabela 2: Morfološke značilnosti *E. coli* na EMB gojišču



Slika 22: Enojni cik cak bakterije *E. coli*



Slika 23: Kovinsko zeleni sijaj kolonij *E. coli*

Na EMB gojišču smo uspešno izolirali bakterijo *E. coli* po značilnem kovinsko zelenem sijaju kolonij. Izolacijo do čiste kulture *E. coli* prikazujeta sliki 22 in 23.

5.4 Rezultat izolacije čiste kulture rodu *Bacillus*

Po inkubaciji vsebine kapsule na gojišču CBL smo razrasle bakterijske kolonije (slika 25) opisali po protokolu za določanje kultur na podlagi morfoloških značilnosti (tabela 3).

MORFOLOŠKA ZNAČILNOST	Kolonija 1
VELIKOST	premer 1-3 mm
OBLIKA	kroglasta in nepravilna
BARVA	umazano bela
ROBOVI	ravni, resasti in valoviti
STRUKTURA	enotna in zabrisana
PROFIL	konveksna
PROSOJNOST	prosojna

Tabela 3: Morfološke značilnosti probiotikov na CBL gojišč



Slika 24: Probiotik *Bacillus* na CBL gojišču



Slika 25: *Bacillus* na CBL gojišču - bližje, vidimo ravne, resaste in valovite robove.

5.5 Rezultat barvanja po Gramu

Barvanje po Gramu je metoda identifikacije bakterij glede na zgradbo celične stene. Gram pozitivne bakterije, ki imajo debelo plast peptidoglikana se obarvajo modro oziroma vijolično. Gram negativne bakterije pa so tiste, ki imajo tanjšo celično steno ter zunanjo membrano iz fosfolipidov in se obarvajo rožnato oz. rdeče.

Rezultati barvanja po Gramu s pomočjo mikroskopiranja so potrdili, da je bakterija *E. coli* paličasta in po Gramu negativna (rdeče obarvane celice), kar pomeni, da ima tanjšo celično steno s slojem fosfolipidov. Po Gramu pozitivni pa so se izkazali probiotiki, ki imajo tako debelo celično steno. Po obliki so paličaste bakterije in spadajo v rod *Bacillus*.

5.6 Rezultat katalaznega testa pri bakteriji *E.coli* in bakteriji rodu *Bacillus*

S katalaznim testom dokazujemo prisotnost encima katalaze, ki v bakteriji razgrajuje strupeni vodikov peroksid, ki nastaja kot stranski produkt aerobnega metabolizma (celično dihanje). Bakterije so lahko:

- katalazno negativne - ne pride do sprememb ob stiku z vodikovim peroksidom na površini kulture,
- katalazno pozitivne - ob stiku z vodikovim peroksidom se na površini kulture pojavi pena, ki nastane, ko se vodikov peroksid razgradi na vodo in kisik ob prisotnosti encima katalaze.

Za bakterije rodu *Bacillus* je značilno, da so pozitivne na katalaznem testu. Ko smo na izolirano bakterijo nanесли vodikov peroksid, so nastali mehurčki. Test je bil pozitiven in lahko smo potrdili, da je to, sodeč po tem testu, *Bacillus*.

Za rod *Escherichia* je prav tako značilno, da so bakterije katalazno pozitivne. Ob stiku z vodikovim peroksidom se je kolonija močno spenila (slika 26). Dokazali smo, da je kultura *E. coli*.



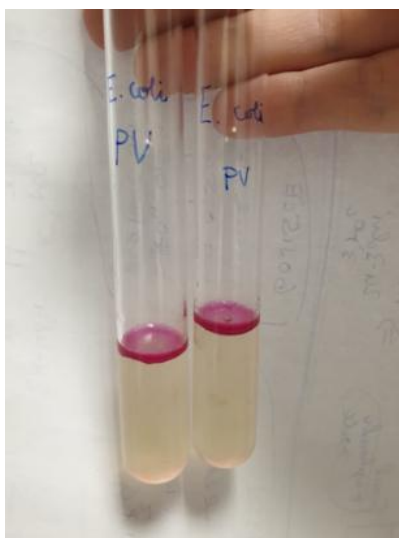
Slika 26: Rezultat katalaznega testa na *E. coli*

5.7 Rezultati IMViC testa za identifikacijo bakterij

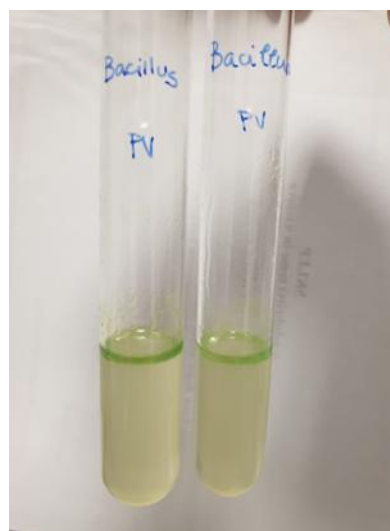
5.7.1 Test na indol s Kovačevim reagentom

Pomembna lastnost bakterij je tvorba indola. Vse bakterije iz rodu *Escherichia* razgrajujejo beljakovine do aminokislin, aminokislino triptofan pa do vode in indola, ki ga dokazujemo s tem testom. Če je *E. coli* prisotna, se na površini gojišča pojavi rdeče obarvan obroč. Negativen rezultat predstavlja rahlo rumenkasta barva reagenta.

V epruveti z *E. coli* se je pojavil rdeč obroč (slika 27), v epruveti s probiotiki pa ni prišlo do spremembe (slika 28). Še dodatno smo potrdili prisotnost seva *E. coli* in hkrati dokazali biokemijsko metabolno značilnost teh bakterij, sposobnost razgradnje aminokislina triptofana do indola.



Slika 27: Pozitiven rezultat testa na indol (*E. coli*)

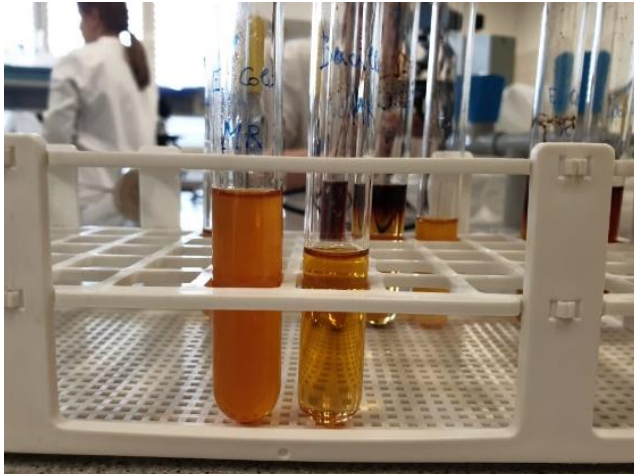


Slika 28: Negativen rezultat testa na indol (*Bacillus*)

5.7.2 Test z metil rdečim MR

Pri razgradnji glukoze nekateri mikroorganizmi tvorijo organske kisline (mlečno ali očetno kislino) in znižajo pH gojišča tudi do 4,5. Zaradi tega se indikator MR obarva rdeče in s tem potrdi prisotnost *E. coli*. Poskus je pozitiven, če se ob dodajanju reagenta gojišče popolnoma obarva rdeče. Negativen poskus pokažeta rumena in oranžna barva gojišča.

V naših vzorcih ni prišlo do sprememb (slika 29). Tudi ob dodajanju več kapljic, se vzorec ni obarval, zato sodeč po tem testu ne moremo potrditi prisotnosti *E. coli*. Zakaj nam poskus ni uspel bi lahko argumentirali s tem, da so bile celice v fazi umiranja ali mrtve, možno je tudi, da smo imeli sev *E. coli*, ki ne proizvaja stabilnih kislin pri fermentaciji glukoze oz. ni pojava mešanokislinske fermentacije.

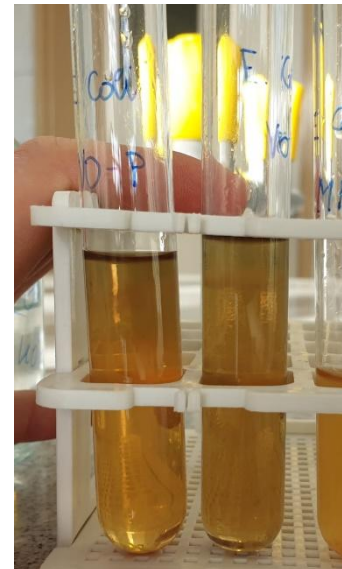


Slika 29: Test z metil rdečim

5.7.3 Voges-Proskauer test VP

Ob presnavljanju enakih ogljikovih hidratov mnoge bakterije tvorijo različne končne produkte. S testom preverjamo ali je pri razgradnji glukoze končni produkt acetoin, ki ga dokazujemo z nekaj kapljicami 5 % α -naftola. Če je acetoin prisoten, je reakcija pozitivna. *E. coli* kaže pri tem testu negativno reakcijo.

V naših vzorcih ni prišlo do sprememb, zato lahko potrdimo, da gre za bakterijo *E. coli* (slika 30).



Slika 30: Negativen rezultat VP testa (*E. coli*)

5.8 Rezultat hemolize pri bakterijah rodu *Bacillus*

Po inkubiranju bakterij rodu *Bacillus* na krvnem agarju so bili na gojišču vidni znaki razbarvanja (slika 31), kar nakazuje na alfa hemolizo. S tem lahko potrdimo tudi vrsto bakterijske kolonije, saj je alfa hemoliza značilna za rod *Bacillus*.



Slika 31: Alfa hemoliza (*Bacillus*)

5.9 Rezultati štetja bakterijskih celic po Neubauerjevi števni komori

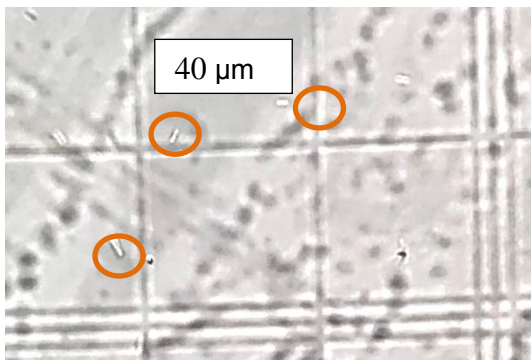
5.9.1 Določanje števila celic bakterij *E. coli* pod mikroskopom

Namen metode štetja celic pod mikroskopom je, da bi lahko določili razmerje med probiotičnimi celicami rodu *Bacillus* ter *E. coli*., saj bi teko lažje določile rezultate, ali so probiotiki in *E. coli* res med seboj konkurenčni.

Material:

- Neubauerjeva števna komora
- mikropipeta
- gorilnik
- epruvete s fiziološko raztopino
- avtomatska pipeta

Pri štetju bakterij *E. coli* smo dobili povprečje števila bakterij v kvadratih $X=16,8$, število $N = X \cdot 25 \cdot 10^4$ pa $4200 \cdot 10^3$

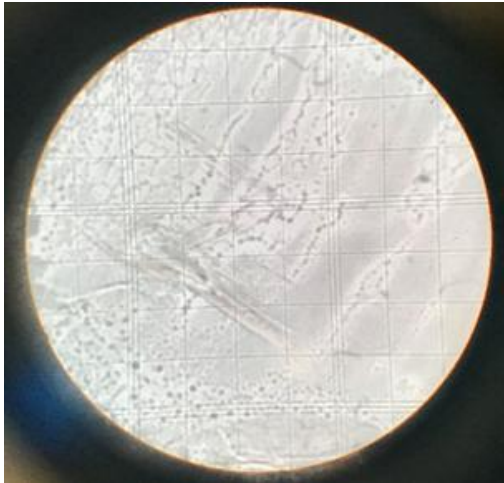


Slika 33: *E. coli* pod mikroskopom, ena bakterija je velika približno 4 µm.



Slika 32: Štetje celic pod mikroskopom





Slika 34: Mreža pod mikroskopom

5.9.2 Določanje števila celic bakterij rodu *Bacillus* pod mikroskopom

Namen metode štetja celic pod mikroskopom je, da bi lahko določili razmerje med probiotičnimi celicami rodu *Bacillus* ter *E. coli*, saj bi tako lažje določili rezultate, ali so probiotiki in bakterije *E. coli* res med seboj konkurenčni.

Material:

- Neubauerjeva števna komora
- mikropipeta
- gorilnik
- epruvete s fiziološko raztopino
- avtomatska pipeta

Pri štetju bakterij *Bacillus* smo dobili povprečje števila bakterij v kvadratih

$X = 10,8$, število $N = X \cdot 25 \cdot 10^4$ pa $N = 2700 \cdot 10^3$ v ml.

Torej je enaka koncentracija teh v 1 ml suspenzije *Bacillus* ($2700 \cdot 10^3$ na ml) ter v 0,643 ml suspenzije *E. coli*.

Suspenziji smo dobro pretresli na vibromiksu ter nato odpipetirali 0,643 ml suspenzije *E. coli* v suspenzijo *Bacillus*. Nato smo ponovno pretresli na vibromiksu in skupno suspenzijo aseptično prenesli na skupno gojišče (EMB in CBL in krvni agar, 1:1:1) na velike petrijevke.

V prvem preizkusu konkurenčnosti smo primerjali bakterijske celice v razmerju koncentracij 1:1.

Za naprej pa smo ugotovili, da je v našem črevesju stalno prisotnih 100 milijard *E. coli*, dnevna priporočena količina vnosa probiotikov rodu *Bacillus* pa je dve kapsuli, v katerih je 4 bilijone CFU *Bacillus*.

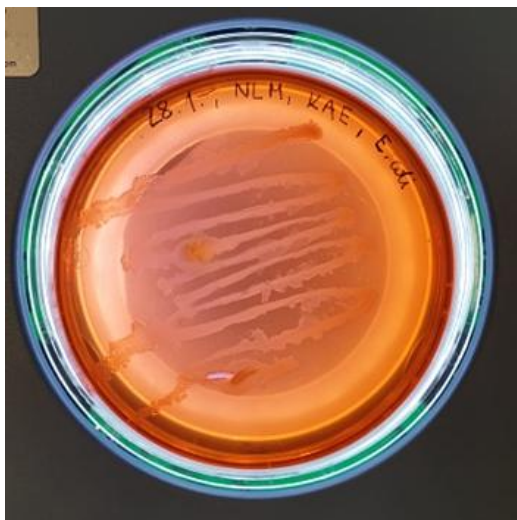
To je $4 \cdot 10^{12}$ *Bacillus* probiotičnih bakterij proti $100 \cdot 10^9$ *E. coli*.

Bacillus : *E. coli*, $4 \cdot 10^{12} : 10^{11} = 40 : 1$.

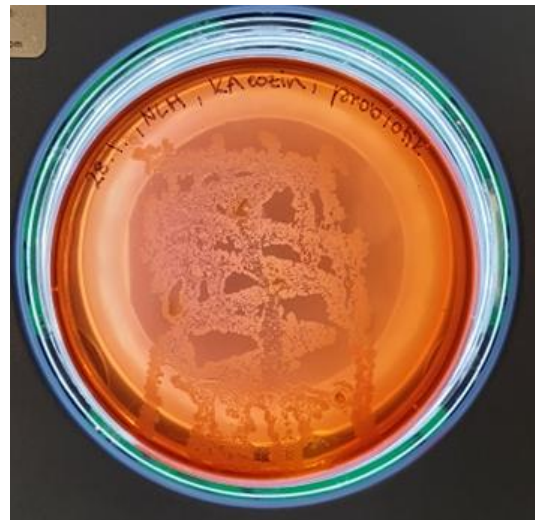
To razmerje smo želeli uporabiti v nadaljnjih poskusih. Vendar nam v naslednjih poskusih štetja ni uspelo prešteti celic zaradi motnosti suspenzije, zato smo se odločili zmešati eno kolonijo *E. coli*, redčeno na 10^{-1} ter štiri kolonije *Bacillus* za zadostno konfluentno poselitev na gojišču. To zmes smo nato prenesli s pipeto na skupno gojišče EMB in CBL.

5.10 Rezultati izolacije bakterij do čistih kultur na krvnem agarju z eozinom

Posebej na krvnem agarju z eozinom smo inkubirali (24 ur na 37°C) *E. coli* in *Bacillus*, vendar razlike v barvi kolonij med njima niso bile vidne (slika 35, 36). Kolonije *E. coli* niso imele zeleno kovinskega sijaja, zato tega gojišča nismo uporabili nadalje pri raziskovanju dokazovanja konkurenčnosti med probiotičnimi (rod *Bacillus*) in potencialno patogenimi črevesnimi bakterijami (*E. coli*).



Slika 35: *E. coli* na krvnem agarju z eozinom

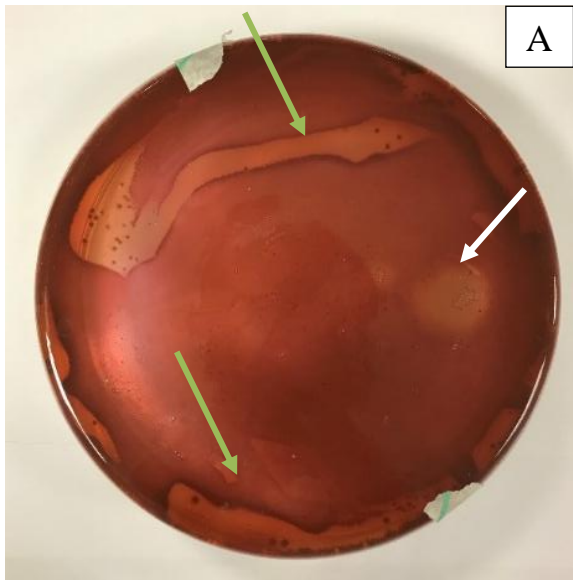


Slika 36: *Bacillus* na krvnem agarju z eozinom

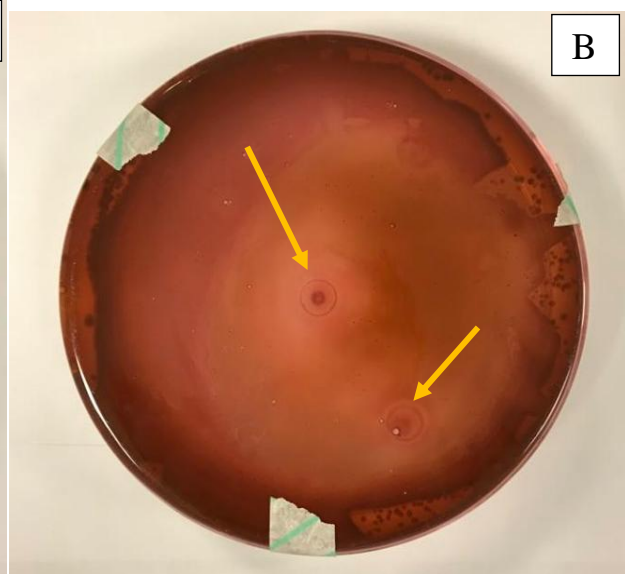
5.11 Rezultati konkurenčnosti bakterij *E.coli* in *Bacillus* po inkubaciji na skupnem mešanem gojišču (krvni agar + CBL + EMB agar)

V tem primeru smo mešanico probiotičnih (*Bacillus*) in črevesnih bakterij (*E. coli*) inkubirali pri 37°C za 24 ur na skupnem mešanem gojišču (krvni agar, CBL, EMB) in opazili, da na gojišču ni bilo pričakovanega kovinsko zelene barve kolonij bakterije *E. coli*, zato se je opazovanje konkurenčnosti bakterij izkazalo za težje kot smo mislili. V petrijevki A (slika 37) je bilo razvidno poraščeno skoraj celotno območje z *E. coli*, razen tam, kjer ni bilo rasti z nobeno bakterijo (zeleno puščica). Predvidevamo, da s hokejko nismo dobro razmazali po celotnem območju gojišča. Opazno je bilo tudi manjše območje, kjer je možno, da je zrasel

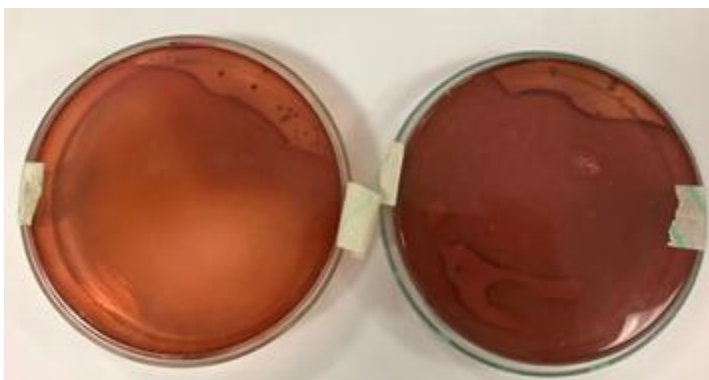
Bacillus probiotik (bela puščica). Na petrijevki B (paralelka) pa sta vidni dve koloniji (slika 38, rumena puščica), kjer je po vsej verjetnosti zrasel *Bacillus* (slika 40), temnejše območje na robu petrijevke pa predvidevamo, da so bakterije *E. coli*. Slika 39 pa prikazuje, da je v petrijevki C tudi vidno več svetlejšega območja kot temnejšega kar pomeni, da je verjetno tam razraščan *Bacillus* probiotik, v petrijevki D pa je vse poraščeno območje temno vijolične barve in predvidevamo, da je na tem območju *E. coli* razen tam, kjer ni rasti nobenih bakterij zaradi nenatančnega razmaza s hokejko. Nenatančen razmaz po gojišču je možen, zaradi velikega premera petrijevke (20 cm) in majhne hokejke.



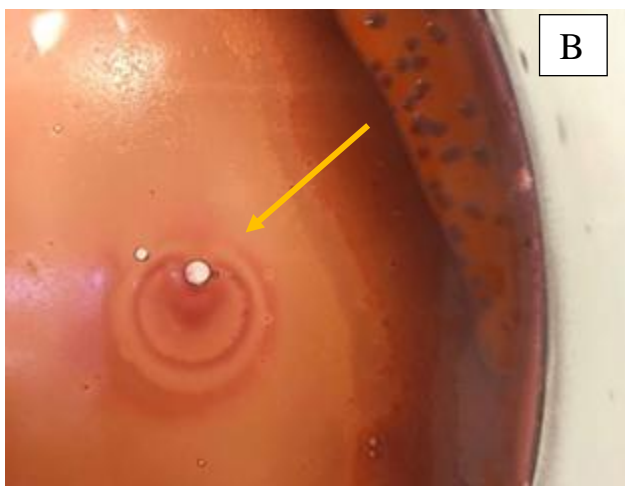
Slika 37: *E. coli* in *Bacillus* na skupnem gojišču (CBL, EMB in krvni agar) 10. 2. 2020 (petrijevka A)



Slika 38: *E. coli* in *Bacillus* na skupnem gojišču (petrijevka B)



Slika 39: *E. coli* in *Bacillus* na skupnem gojišču, petrijevki C (levo) in D (desno)



Slika 40: Domnevno kolonija *Bacillus* probiotikov ki zavira rast *E. coli* (petrijevka B)

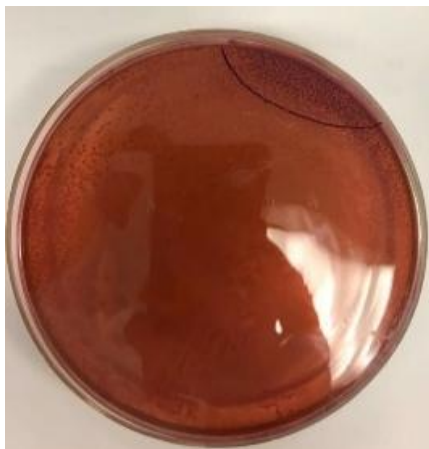
5.12 Rezultati konkurenčnosti bakterij *E.coli* in *Bacillus* po inkubaciji na skupnem mešanem gojišču (EMB agar + CBL agar)

5.12.1 Inkubacija na 37 °C po 48 urah (4. 3. 2020)

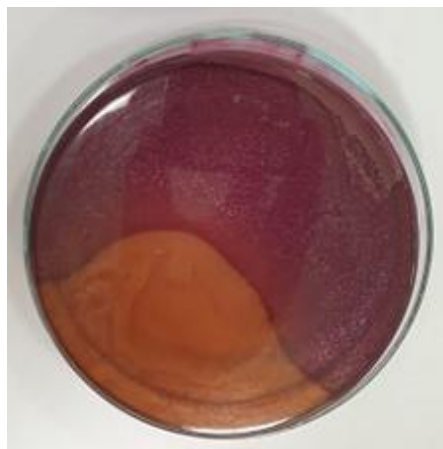
Po prenosu suspenzije probiotikov rodu *Bacillus* in *E. coli* na mešano gojišče (EMB agar + CBL agar) smo petrijevke inkubirali za 48 ur in nato opazili naslednje rezultate. Pri petrijevki m1 (slika 42) je bil čez skoraj celotno površino razraščan probiotik, na robu petrijevke pa je opazna manjša razrast *E. coli*. Pri petrijevki m2 (slika 43) je kultura *Bacillus* prerasla manj kot polovico območja, *E. coli* pa je bila vidna na preostalem območju. Prepoznali smo jo po zeleno kovinskem sijaju. Na petrijevki v1 (slika 44) je bilo vidno območje *Bacillus* čez večino območja gojišča, a tudi *E. coli* je zasedala širok pas ob robu petrijevke. Na teh petrijevkah smo mejo območja označili s flumastrom, da bi v naslednjih dneh lahko opazili premik meje razrasti. Pri petrijevki v2 (slika 45) se je *E. coli* razrasla čez celotno območje petrijevke. To gojišče smo zato zavrgli (avtoklavirali) in naprej inkubirali le petrijevke m1, m2 in v1.



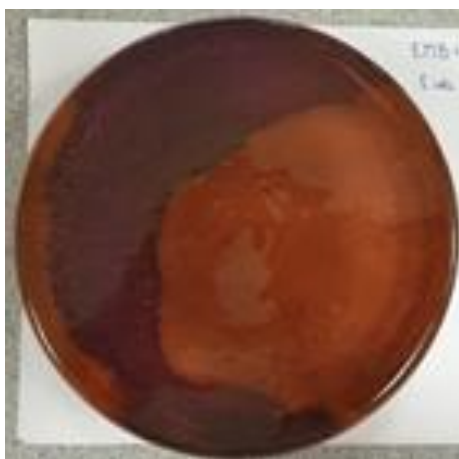
Slika 41: Zeleno kovinski sijaj *E. coli* v veliki petrijevki 2 (4. 3. 2020)



Slika 42: *E. coli* in *Bacillus* na skupnem gojišču - petrijevka mala 1 (4. 3. 2020)

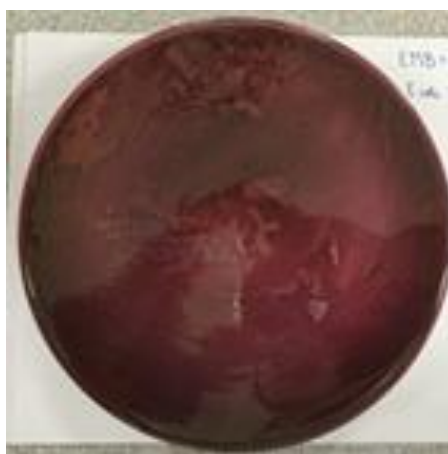


Slika 43: *E. coli* in *Bacillus* na skupnem gojišču - petrijevka mala 2 (4. 3. 2020)



Slika 44: *E. coli* in *Bacillus* na skupnem gojišču - petrijevka velika 1 (4. 3. 2020)

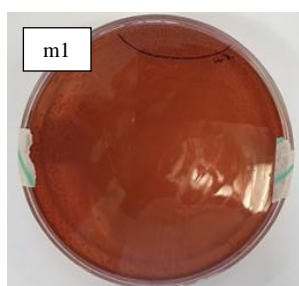
v1



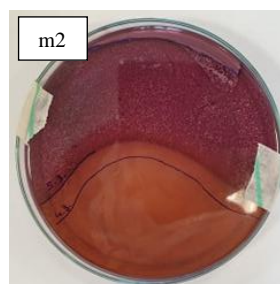
Slika 45: *E. coli* in *Bacillus* na skupnem gojišču - petrijevka velika 2 (4. 3. 2020)

5.12.2 Inkubacija na 37 °C po 72 urah (5. 3. 2020)

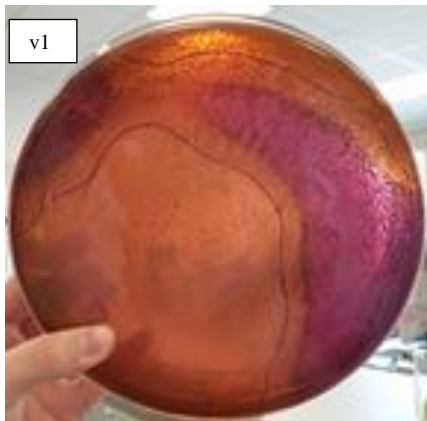
Naslednji dan so bile na vseh petrijevkah opazne spremembe na gojišču in sicer bakterije rodu *Bacillus* so na vseh petrijevkah počasi zavirale rast *E. coli*, kar je bilo vidno po premiku meje za 7- 13 mm proti območju rasti *E. coli* (slika 46, 47, in 48). V petrijevki m1 *E. coli* skoraj ni bila več opazna, v petrijevki m2 se je območje premaknilo proti *E. coli* v korist večje konkurenčnosti bakterij rodu *Bacillus*, v petrijevki v1 prav tako. Ponovno smo označili meje med obema vrstama bakterij (*Bacillus*, *E. coli*).



Slika 46: *E. coli* in *Bacillus* na skupnem gojišču - petrijevka mala 1 (5. 3. 2020)



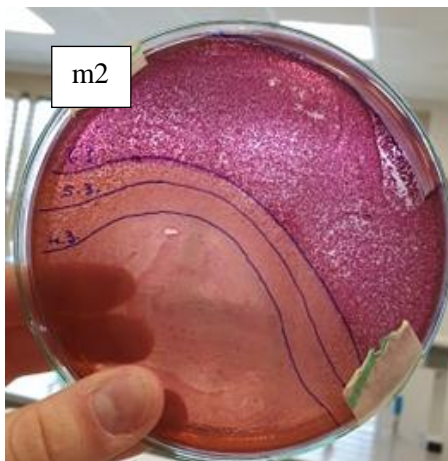
Slika 47: *E. coli* in *Bacillus* na skupnem gojišču - petrijevka mala 2 (5. 3. 2020)



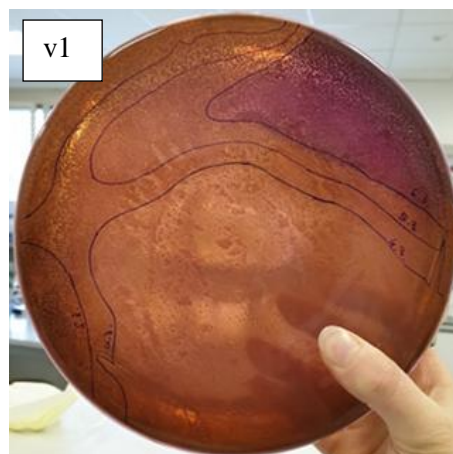
Slika 48: *E. coli* in *Bacillus* na skupnem gojišču - petrijevka velika 1 (5. 3. 2020)

5.12.3 Inkubacija na 37 °C po 96 urah (6. 3. 2020)

Tudi po štirih dneh je bila še kar opazna konkurenčnost med bakterijama rodu *Bacillus* in *E. coli* (slika 49 in 50) in enako kot prejšnji dan je *Bacillus* zaviral rast *E. coli* in opazen je bil premik meje med bakterijama še bolj v območje *E. coli*. Iz tega lahko sklepamo, da probiotiki rodu *Bacillus* zavirajo oziroma omejujejo rast *E. coli* v večini primerov paralelk na skupnem gojišču in s tem lahko predvidevamo, da je tako tudi v naravi oz. v našem črevesju.

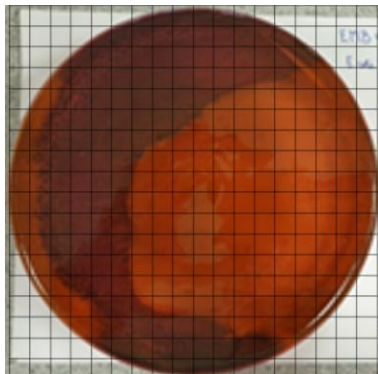


Slika 50: *E. coli* in *Bacillus* na skupnem gojišču - petrijevka mala 2 (6. 3. 2020)

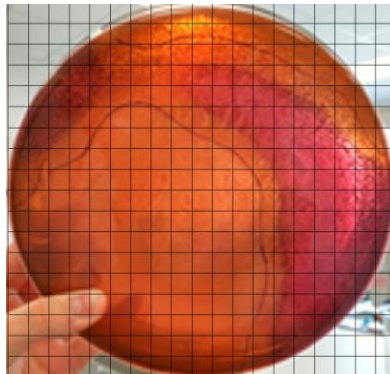


Slika 49: *E. coli* in *Bacillus* na skupnem gojišču - petrijevka velika 1 (6. 3. 2020)

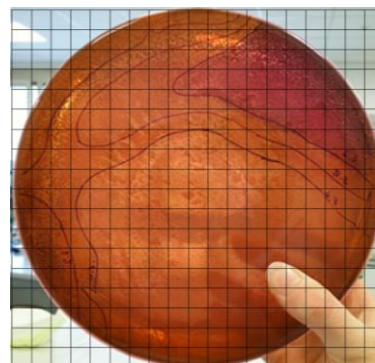
5.13 Predstavitev rezultatov preraščene površine konkurenčnih bakterij v veliki petrijevki 1 z grafom



Slika 51: *E. coli* in *Bacillus* na skupnem gojišču - petrijevka velika 1 (4. 3.) Probiotiki zasedajo 56 % površine petrijevke, *E. coli* pa 44 %.



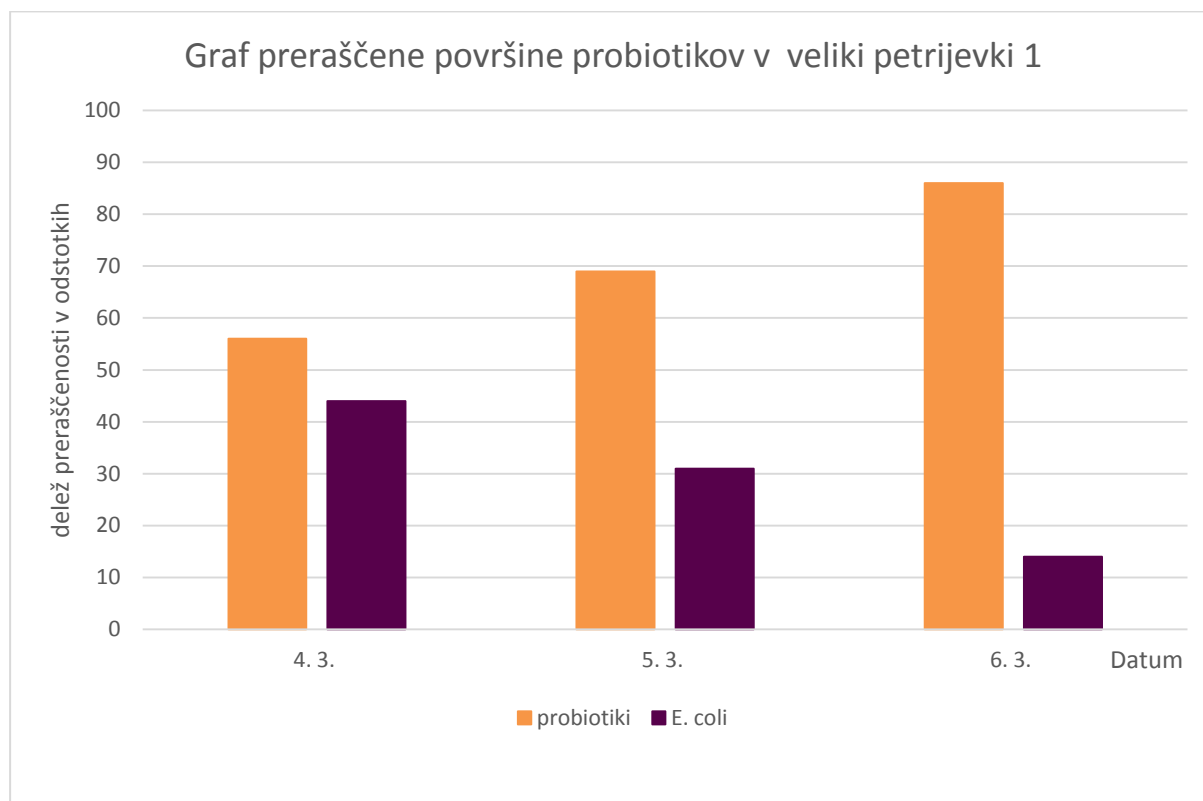
Slika 48: *E. coli* in *Bacillus* na skupnem gojišču - petrijevka velika 1 (5. 3.) Probiotiki zasedajo 69 % površine petrijevke, *E. coli* pa 31 %.



Slika 50: *E. coli* in *Bacillus* na skupnem gojišču - petrijevka velika 1 (6. 3.) Probiotiki zasedajo 86 % površine petrijevke, *E. coli* pa 14 %.

Pri določanju preraščenosti konkurenčnih bakterij smo si pomagali z mrežo in štetjem kvadratkov, iz tega smo izračunali deleže preraščenosti *E. coli* in probiotikov. Rezultate smo prikazali v grafu.

Graf 1: Prikaz deleža preraščene površine bakterij *E. coli* in probiotikov prvi (4.3.2020), drugi (5.3.2020) in tretji dan (6.3.2020) inkubacije



6. RAZPRAVA

Cilj naše raziskovalne naloge je bil preveriti konkurenčnost probiotikov *Bacillus* na patogeni črevesni bakteriji *Escherichia coli* in *Salmonella typhi*. Probiotiki podpirajo razvoj in delovanje našega imunskega sistema. To počnejo tako, da sintetizirajo protimikrobne snovi, ki ovirajo preživetje in razvoj škodljivih bakterij, hkrati tudi zasedajo mesta v črevesju, kamor bi se drugače pripenjali patogeni. Predvsem nas je zanimalo ali bi lahko probiotike uporabljali kot antibiotike oziroma kot zaviralce rasti in razmnoževanja patogenih mikroorganizmov.

Najprej smo želeli dobiti čiste kulture probiotikov in črevesnih bakterij za nadaljne končno raziskovanje konkurenčnosti. Do sem smo morali opraviti tudi veliko mikrobioloških metod raziskovanja in zagotavljanja primernih kultur in gojišč za celoten potek raziskovalne naloge.

Po odvzemu vzorcev (hlevski gnoj, akvarijska voda) smo poskušali kulture tudi identificirati z določenimi identifikacijskimi testi, da smo se prepričali s kakšnimi vrstami bakterij imamo opravka. S pomočjo identifikacijskih testov in metod kultivacije bakterij, smo uspeli izolirati le enterobakterijo *E. coli* in probiotike rodu *Bacillus*. S temi kulturami smo nadaljevali z delom naprej. Iz naše raziskave smo izločili druge enterobakterije (*Salmonella*, *Shigella*), ker za njih nismo bili sigurni, če smo jih uspeli izolirati do čistih kultur. Identifikacija pri njih se nam je izkazala za dosti težjo kot pri *E. coli*. Vir *E. coli* je bil uspešno izoliran iz vzorca hlevskega gnoja. Bakterije rodu *Salmonella* pa smo pričakovali, da bomo lahko izolirali z oklepa želv in akvarija rib s pomočjo selektivnega gojišča SS agar, a izolacija ni bila uspešna.

Vir bakterije *E. coli* se je tako brez težav izkazal hlevski gnoj krav s šolskega posestva. Za to bakterijo je značilno, da se nahaja v iztrebkih, saj je del tudi našega črevesja, patogena pa postane le v primernih pogojih večje razrasti (oportunizem). Najprej smo jo potrdili z briliant zelenim bujonom (selektivnim gojiščem za koliformne bakterije), nato pa še z barvanjem po Gramu, ki nam je potrdil, da je *E. coli* gram negativna bakterija. S katalaznim testom in testi IMViC smo nadalje še dodatno preverili ali zares delamo z *E. coli*. Test z metil rdečim ni pokazal pozitivne potrditve na *E. coli*, vendar domnevamo, da je bilo mogoče za to kriv pretekli rok kemikalije za ta test ali pa je bilo v vzorcu premalo celic oziroma kisline za obarvanje.

Probiotike smo uspešno izolirali iz kapsul MegaSporebiotics (vir iz mikrobiološke banke) in jih inkubirali na za njih ugodnem gojišču Chinablau Lactose agar. Zrasle so kolonije z morfološki značilnostmi bakterij rodu *Bacillus*. Najprej smo preverili ali so gram pozitivne. Ko smo lahko potrdili, da so po Gramu pozitivne, smo jih uporabile kot konkurenčni bakterijski vzorec skupaj z vzorci *E. coli*. Ker v šolskem laboratoriju nimamo pogojev bolj natančnih analiz identifikacije med posameznimi vrstami oziroma sevi bakterij rodu *Bacillus* (npr. restrikcijska analiza DNA), smo se odločili, da iščemo konkurenčnost rodu *Bacillus* z že definirani sevi in vrstami *B. licheniformis*, *B. coagulans*, *B. indicus* HU36, *B. subtilis* HU58 in *B. clausli*.

Ko smo uspeli izolirati in identificirati rod obeh kultur, smo preverili še njuno skupno rast na krvnem agarju, saj smo želeli pogoje gojišča čim bolj približati pogojem rasti v našem črevesju. Pri izdelavi krvnega agarja smo naleteli tudi na težave. Pri prelivanju gojišča v prazne sterilne petrijevke, kjer so se nam pojavile grudice. Sklepamo, da je bil razlog v

temperaturni razliki med mrzlo krvjo iz hladilnika, ki smo jo dodajali v toplo bazo za krvni agar. Naredili smo več primerov prelitih petrijevok z gojiščem in uporabili le najbolj bistra gojišča.

Po inkubaciji obeh kultur skupaj (rod *Bacillus* in *E. coli*) na krvnem agarju smo ugotovili, da jih na tem gojišču ne moremo pri kvalitativnem opazovanju ločiti po morfoloških značilnosti (barva kolonij), zato smo podrobneje pogledali sestavine EMB gojišča in se spraševali, kaj spodbudi *E. coli* k ustvarjanju kovinsko zelenega sijaja. Predvidevali smo, da je to eozin. Dodali smo ga v krvni agar in nanj v ločeni petrijevki nacepili mešanico bakterij *E. coli* in bakterij rodu *Bacillus*. Rezultati so pokazali, da eozin ni snov, ki povzroči kovinsko zeleno bravo, kajti kulturi sta bili po morfoloških značilnostih enaki kot na krvnem agarju brez eozina.

Kulturi smo lahko ločili le na posameznih EMB in CBL gojiščih, zato smo se odločili, da ju zmešamo skupaj. Mešanico agarjev (EMB in CBL) smo prelili v prazne petrijevke in ločeno nanесли vzorce bakterij *E. coli* in *Bacillus* posebej na to mešano gojišče. Nad rezultati smo bili navdušeni, kajti obe kulturi sta zrasli na tem mešanem gojišču z značilnimi morfološkimi lastnostmi razrasti kulture. Kolonije *E. coli* so obdržale svojo kovinsko zeleno barvo, kolonije bakterij rodu *Bacillus* pa svojo belo, rahlo pahljačasto razrast. Tako smo uspeli odkriti novo skupno gojišče (EMB in CBL), ki je ustrezalo za rast obema kulturama in na katerih smo kolonije lahko s prostim očesom tudi ločili med seboj. To smo si zadali med drugim kot pogoj za nadaljne raziskovanje konkurenčnosti.

Preden smo kulturi zmešali skupaj smo izračunali v kakšnem razmerju bosta rasli skupaj in koliko mešanice bomo nanašali na gojišča. *E. coli* smo lahko brez težav prešteli na Neubauerjevi števeni komori. Težave smo imeli pri preštevanju probiotikov *Bacillus*, ki jih nismo mogli prešteti. Mreže pod mikroskopom nismo videli zaradi motne suspenzije, kljub visoko redčenemu vzorcu. Tako smo sklepali, da je v suspenziji probiotičnih bakterij *Bacillus* dosti večja koncentracija celic kot pri celični suspenziji bakterij *E. coli*. Tako smo se odločili, da pripravimo skupno mešanico celičnih suspenzij obeh vrst bakterij v razmerju 40:1.

Zaradi možnega življenjskega prostora obeh vrst bakteriji (*Bacillus* in *E. coli*) v našem črevesju, smo gojišču (EMB agar + CBL agar) dodali še defibrinogenizirano ovčjo kri. Na velike petrijevke smo kar takoj skupaj nanесли mešanico obeh bakterijskih kultur *E. coli* in *Bacillus* ter vse skupaj inkubirali na 37 °C za 24 ur. Na gojiščih je bila opazna razrast kolonij, vendar ju zopet nismo mogli ločiti med seboj. Petrijevke smo pustili v inkubatorju še za nadaljnih 24 ur in opazili smo, da so tako rezultati bolj vidni. Kljub razrastu, smo lahko le predvideli delovanje probiotika *Bacillus* tam, kjer je bilo območje svetlejše kakor drugje po gojišču. Ugotovili smo tudi, da moramo s hokejko delati bolj natančno in razmazati vzorec po celotnem gojišču ter, da se rezultati bolje pokažejo po 48 urah inkubacije.

Bakterijske kulture probiotičnih bakterij rodu *Bacillus* in entrobakterij *E. coli* smo najbolj uspeli ločiti na mešanem gojišču (EMB + CBL) brez dodane krvi. Zanimala nas je konkurenčnost med bakterijami, oziroma zanimalo nas je ali lahko probiotiki delujejo kot zaviralci rasti črevesnih bakterij. To smo dosegli z opazovanjem konkurenčnosti obeh vrst kultur (*Bacillus* in *E. coli*) na izbranem gojišču. Za boljšo preglednost razrasti obeh vrst kolonij bakterij na skupni površini gojišča, smo izbrali za rast tudi velike petrijevke (premer 20 cm), s katerimi smo dosegli večjo površino in enako ugodne pogoje prostora rasti za obe kulturi hkrati. Na mešanem gojišču (EMB + CBL) smo po nanosu mešanice obeh kultur in po

inkubaciji ugotovili, da probiotične bakterije zavirajo rast enterobakterije *E. coli*. Rezultati uspešne konkurenčnosti probiotičnih bakterij *Bacillus* nad enterobakterijami *E. coli*, so pokazali, da se konkurenčnost veča s časom oz. dnevi kultivacije. Predvidevamo, da rod bakterij *Bacillus* izloča zaviralce rasti, mogoče antibiotike, za druge vrste bakterij. Antibiotične učinkovine so produkt sekundarnega metabolizma pri bakterijah, ki nastajajo v večjih količinah kot posledica manj ugodnih pogojev rasti. Rast probiotičnih bakterij rodu *Bacillus* je še bolj napredovala ravno v času rasti tretjega dne inkubacije, kjer je na gojišču že skoraj povsem izrinila bakterijo *E. coli*.

Na podlagi rezultatov lahko sklepamo, da bakterije rodu *Bacillus* uspešno konkurirajo bakteriji *E. coli* in na njo v rasti delujejo zaviralno, kar pomeni, da probiotične bakterije rodu *Bacillus* delujejo antibiotično na patogeno črevesno bakterijo *E. coli*.

Pri delu v šolskem mikrobiološkem laboratoriju smo morali tekom celega časa raziskovanja poskrbeti za našo varnost in varnost drugih v laboratoriju, kajti srečevali smo se tudi z možnim biološkim tveganjem z okužbami. Nujno smo morali nositi zaščitne halje, zaščitne maske, rokavice in zaščito za lase. Pred in po delu smo si roke vedno temeljito umili in dezinficirali. Prav tako je sledila dezinfikacija delovnih površin pred vsakim začetkom dela in po končanem delu. Mikrobiološko delo vedno tudi zahteva aseptično delo poleg gorilnika ali v laminariju. Zaradi možnosti okužbe smo se morali ravnati po številnih pravilnikih in standardih dela v laboratoriju. Izjemnega pomena je bilo tudi ravnanje z odpadnim materialom, ki je zajemal odrabljene in stare kulture mikroorganizmov, ter okuženim laboratorijskim priborom. Vse kovinske laboratorijske predmete, ki so prišli v stik s kužnim materialom smo ožigali v plamenu in porasla gojišča vedno avtoklavirali in odvrgli v zato primerna odlagališča v laboratoriju. Laboratorijsko steklovino smo primerno vedno sterilizirali v sterilizatorju na 180 °C za 1 uro.

7. ZAKLJUČEK

Pred samim začetkom praktičnega dela v laboratoriju smo si postavile vrsto hipotez. Sklepale smo, da probiotični sevi *Bacillus* zavirajo rast enteropatogenih bakterij, kar lahko zagotovo potrdimo. Obe kulturi (tako rod *Bacillus* kot *Escherichia coli*) smo inkubirale na skupnem gojišču in v določenih časovnih intervalih opazovale njuno razrast. Ker smo prej vsako kulturo posebej na tem gojišču vzgojile, smo ju lahko preprosto z očesom ločili med seboj ko smo ju vzgojili na tem istem gojišču skupaj. Tako smo lahko opazile, kako je vedno manjši delež *E. coli* rasel na gojišču, medtem ko so probiotične bakterije rodu *Bacillus* uspešno rasle in se delile in hkrati zavirale rast konkurenčnim patogenim mikroorganizmom *E. coli*.

Naša naslednja domneva je bila, da lahko iz hevskega gnoja izoliramo bakterije vrste *E. coli*. Najprej smo dokazali prisotnost koliformnih bakterij, ki smo jih inkubirali na selektivnem gojišču namenjenem ravno izolaciji teh patogenih mikroorganizmov. S pomočjo tega podatka se nam je zdelo, da nam je uspelo pridobiti zeleno kulturo, a smo to raje še preverili z biokemijskimi testi kot so katalazni test, IMViC testi in hemolizni test. Vsi testi so bili uspešni in na osnovi vseh rezultatov, smo našo hipotezo lahko potrdile.

Sklepale smo, da je *E. coli* paličasta, gram- negativna, fakultativna anaerobna bakterija s katalazno aktivnostjo. Hipotezo lahko v celoti potrdimo. Bakterijo smo pobarvale po Gramu in potrdili, da je gram negativna, saj je pod mikroskopom vidi rdeče obarvane celice. Hkrati smo pod mikroskopom opazovale njihovo obliko, ki je bila bolj paličasta. Pri identifikaciji kulture smo opravile katalazni test, ki se je izkazal za pozitiven. S tem smo dokazale, da je *E. coli* gram negativna, paličasta in katalazno pozitivna bakterija.

Domnevali smo tudi, da bomo lahko iz vzorca šolskega akvarija in brisa želv uspeli izolirati bakterijski rod *Salmonella* vendar nam tega ni uspelo, zato je bila ta hipoteza ovržena. Po inkubaciji brisa na gojišču SS agar (selektiven agar za vrste *Salmonella* in *Shigella*) smo namreč razraslo kulturo opisale bolj zanačino za rod *Shigella*, saj kolonija ni bila po morfoloških lastnostih značilna za *Salmonello* (ni temnih okroglih kolonij).

Hipotezo, da bomo lahko iz kapsul MegaSporebiotics uspešno izolirali vrste *Bacillus* probiotikov lahko potrdimo. Iz kapsul smo izolirale bakterije na gojišču.

S samim teoretičnem delom raziskovanja nismo naleteli na kakšne posebne težave. Med preučevanjem literature smo si zadali kar nekaj ciljev, ki pa se pri praktičnem delu niso izkazali za tako preproste, kot smo mislili. Na žalost nam ni uspelo izolirati druge patogene mikroorganizme. Še posebej smo želeli preizkusiti konkurenčnost probiotikov na bakterije rodu *Salmonella*. Vendar z vsako težavo s katero smo se soočili, smo aktivno iskali nove rešitve. Nekateri rezultati so nas presenetili in nas silili k novim idejam, za rešitev problema. Tako smo vzeli nov pristop v laboratoriju in prvič v našem času šolanja, skupaj zmešali gojišča, da smo lahko dobili optimalne pogoje rasti za naše kulture.

Končnih rezultatov naše raziskovalne naloge Konkurenčnost probiotičnih sevov rodu *Bacillus* na patogeno črevesno bakterijo *Escherichia coli* smo se močno razveselili, saj so potrdili mnoge naše domneve in nas navdali z novo zagnanostjo za dokončanje naloge. Ob analizi našega dela smo ugotovili, da bi lahko opravile še nekaj novih raziskav, ki bi močno prispevali ugotovitvam uporabe probiotičnih izdelkov. Prišle smo do spoznanja, da bi bilo

dobro če bi lahko testirale še druge vrste probiotikov, kot so npr. probiotiki rodu *Bifidobacterium* ter *Lactobacillus* in ugotavljale kateri je najbolj učinkovit pri zaviranju škodljivih mikroorganizmov. Poleg tega pa bi nalogo lahko nadgradili in preizkusili učinkovitost protimikrobnih vplivov probiotičnih bakterij na druge črevesne enteropatogene bakterije. Ideja za nadaljne raziskovanje pa je tudi, da bi lahko raziskali še vpil prebiotikov oz. prehranskih vlaknin na boljšo rast probiotikov. Te bi kot dodatek za boljšo rast dodali v skupno gojišče in se s tem še bolj približali razmeram v našem črevesju.

Če bi imeli dostop do boljše opremljenega laboratorija in znanje o uporabi genskih analiz mikroorganizmov, bil lahko testirali točno kateri sevi probiotikov so bili najbolj učinkoviti v boju proti *E. coli*. Zanimivo bi bilo tudi vedeti točno kateri sev *E. coli* smo izolirali iz hlevskega gnoja, saj vemo, da vsi sevi niso nujno škodljivi za naše zdravje. Z zagotovostjo tudi ne moremo vedeti ali so probiotiki proti *E. coli* zares konkurirali zaradi izločanja protimikrobnih substanc, ali je bil propad *E. coli* posledica pomanjkanja zanj primernih hranil v gojišču. To bi lahko analizirali s koromatografskimi metodami npr. z napravo HPLC bi lahko preverili še prisotnost oz. količino in vrsto protimikrobnih snovi v naši petrijevki, kot so antibiotiki, bakteriocini oz. bakterostatiki, ki naj bi jih izločali probiotiki rodu *Bacillus* in naj bi zavirali rast *E. coli*. Vendar pa smo se pri izbiri gojišč potrudili da smo zagotovili optimalne pogoje in hranila obema kulturama, zato predvidevamo, da do tega verjetno ni prišlo.

Seveda ne moremo 100 % zagotoviti uspešnost poskusa, zato bi naš predlog bil, da v prihodnosti naredimo še več raziskav in res zagotovimo najboljšo kombinacijo učinkovitih probiotičnih izdelkov. Za bolj relevantne rezultate bi v prohodnje poskus večkrat ponovile in se tako prepričale o učinkovitosti probiotikov oz. ponovljivosti poskusa.

Pri različnih okužbah je seveda dobro jemati antibiotike oziroma zdravila, ki nam jih predpiše zdravnik. Vendar se lahko že prej preventivno spopademo z najrazličnejšimi patogenimi mikroorganizmi z uporabo probiotikov. Čeprav so probiotiki bakterije, ki naj ne bi bile agresivne, smo dokazali da se v tem primeru učinkovito spopadejo z *E. coli*. Z našo raziskovalno nalogo smo dokazali, da probiotične bakterije zavirajo rast *Escherichia coli*.

Čeprav so probiotične bakterije del naše prebavne mikrobiote sčasoma zaradi okoljskih dejavnikov opešajo in jih moramo zato redno uživati s hrano ali prehranskimi dopolnili. Tudi če z antibiotiki zdravimo bolezen, se moramo zavedati, da nam ti zrušijo naravno ravnovesje v črevesju, ki si ga moramo z uporabo probiotikov povrniti, da te preprečijo razrast drugih škodljivih mikroorganizmov. Predlagana uporaba probiotikov je vsaj tri mesece po zaužitju antibiotikov.

8 VIRI IN LITERATURA

8.1 Viri

- Abada, E. A. E. (2008). Izolacija in karakterizacija protimikrobne spojine iz bakterije *Bacillus coagulans*. *Anima. Celice Syst.*, 12, 41–46.
- Aşan Özusağlam, M. (2010). Pomen bakterije *Bacillus coagulans* kot probiotika v prehrani živali. *Ziraat Fak. Derg.* 5, 50–57.
- Avguštin, G. (2006). *Manipulacija mikrobnega metabolizma v prebavilih*. Ljubljana: Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko.
- Bajt, N. (2013). *Mikrobiološke preiskave živil*. Ljubljana: DZS. Str. 70, 71, 124–135.
- Duc Le, H., Hong, H. A., Barbosa, T. M., Henriques, A. O. in Cutting, S. M. (2004). Characterization of *Bacillus* Probiotics available for human use. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 2161–2171.
- Dular, A. (2010). *Označevalni geni probiotičnega seva bakterije Bacillus subtilis KBL-001 - orodje za zagotavljanje kakovosti ter zaščito industrijske lastnine (Diplomsko delo)*. Pridobljeno 10. marca 2020 s http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/dn_dular_anja.pdf.
- Fact sheet: *Bacillus Subtilis*. (b. d.). Pridobljeno 10. marca 2020 s <https://wickhamlabs.co.uk/technical-resource-centre/fact-sheet-bacillus-subtilis/>.
- Gözde, K. in Zerrin, E. S. (b. d.). *Potencialna uporaba bakterij Bacillus coagulans v prehranski industriji (Potential Use of Bacillus coagulans in the Food Industry)*. Pridobljeno 17. marca 2020 s <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6025323/#B17-foods-07-00092>.
- *HU36® (Bacillus indicus)*. (b. d.). Pridobljeno 17. marca 2020 s <https://www.synergialifesciences.com/bacillus-indicus-strain-spore-probiotic-HU36.html>.
- Jiang, T., Qiao, H., Zheng, Z., Chu, Q., Li, X., Yong, Q. in Ouyang, J. (2016). Proizvodnja mlečne kisline iz predhodno obdelanih hidrolizatov koruznega zbiralnika s strani na novo razvitega seva *Bacillus coagulans*. *PLoS One*, 11(2).
- Lin, S. Y., Hung, A. T. Y. in Lu, J. J. (b. d.). *Učinki dopolnila z različnimi stopnjami bakterij Bacillus coagulans kot probiotika na rast in črevesno mikrofloro populacije piščančjih piščancev*. Pridobljeno 17. marca 2020 s <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4782696/#B13>.

Nika Drinovec, Maruša Godler, Lara Ropič Bizjak. Konkurenčnost probiotičnih sevov rodu *Bacillus* na patogeno črevesno bakterijo *Escherichia coli*. Biotehniški center Naklo – Srednja šola, 2020

- Marteau, P. R., de Verse, M., Cellier, C. J. in Schrezenmeir, J. (2001). Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *American Journal of Clinical Nutrition*, 7, str. 430–436.
- Orožen Adamič, A. in Sernec, K. (2015). *Mikrobiologija. Učbenik za farmacevtske in kozmetične tehnike*. Ljubljana: DZS. Str. 174–180.
- Todar, K. (2014). *Online Textbook of Bacteriology (chapter: The Genus Bacillus)*. Pridobljeno 10. marca 2020 s http://textbookofbacteriology.net/ken_todar.html.
- *Yeast characteristics*. (b. d.). Pridobljeno 30. marca 2020 s <https://www.cofalec.com/the-world-of-yeast/yeast-characteristics/>.

8.2 Viri slik

- Slika 1: <http://textbookofbacteriology.net/B.anthraxis.surface.EM.PI.jpeg> (dostopno 10. 03. 2020)
- Slika 2: http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/dn_dular_anja.pdf (dostopno 10. 03. 2020)
- Slika 3: <http://textbookofbacteriology.net/Bac.agar.panel.jpeg> (dostopno 10. 03. 2020)
- Slika 4: <http://textbookofbacteriology.net/B.coagulans.jpeg> (dostopno 10. 03. 2020)
- Slika 5: foto: Lara Ropič Bizjak (05. 02. 2020)
- Slika 6: foto: Lara Ropič Bizjak (15. 01. 2020)
- Slika 7: foto: Nika Drinovec (21. 1. 2020)
- Slika 8: foto: Nika Drinovec (22. 1. 2020)
- Slika 9: foto: Nika Drinovec (15. 1. 2020)
- Slika 10: foto: Lara Ropič Bizjak (27. 1. 2020)
- Slika 11: foto: Nika Drinovec (27. 1. 2020)
- Slika 12: foto: Lara Ropič Bizjak (21. 1. 2020)
- Slika 13: foto: Maruša Godler (21. 1. 2020)
- Slika 14: foto: Nika Drinovec (21. 1. 2020)
- Slika 15: foto: Maruša Godler (5. 2. 2020)
- Slika 16: foto: Nika Drinovec (3. 2. 2020)
- Slika 17: foto: Nika Drinovec (26. 2. 2020)
- Slika 18: foto: Nika Drinovec (26. 2. 2020)
- Slika 19: foto: <https://docplayer.gr/85343567-Fiziologija-mikrobov-laboratorijske-vaje-david-stopar-polonca-cadez-in-ivan-mahne.html> (dostopno 19. 3. 2020)
- Slika 20: foto: Nika Drinovec (22. 1. 2020)
- Slika 21: foto: Nika Drinovec (22. 1. 2020)
- Slika 22: foto: Nika Drinovec (23. 1. 2020)
- Slika 23: foto: Nika Drinovec (23. 1. 2020)
- Slika 24: foto: Maruša Godler (22. 1. 2020)
- Slika 25: foto: Maruša Godler (22. 1. 2020)
- Slika 26: foto: Nika Drinovec (3. 2. 2020)

Nika Drinovec, Maruša Godler, Lara Ropič Bizjak. Konkurenčnost probiotičnih sevov rodu *Bacillus* na patogeno črevesno bakterijo *Escherichia coli*. Biotehniški center Naklo – Srednja šola, 2020

- Slika 27: foto: Nika Drinovec (2. 3. 2020)
- Slika 28: foto: Nika Drinovec (2. 3. 2020)
- Slika 29: foto: Nika Drinovec (2. 3. 2020)
- Slika 30: foto: Nika Drinovec (2. 3. 2020)
- Slika 31: foto: Nika Drinovec (29. 1. 2020)
- Slika 32: foto: Lara Ropič Bizjak (10. 2. 2020)
- Slika 33: foto: Lara Ropič Bizjak (10. 2. 2020)
- Slika 34: foto: Lara Ropič Bizjak (10. 2. 2020)
- Slika 35: foto: Nika Drinovec (3. 2. 2020)
- Slika 36: foto: Nika Drinovec (3. 2. 2020)
- Slika 37: foto: Lara Ropič Bizjak (12. 2. 2020)
- Slika 38: foto: Lara Ropič Bizjak (12. 2. 2020)
- Slika 39: foto: Lara Ropič Bizjak (12. 2. 2020)
- Slika 40: foto: Lara Ropič Bizjak (12. 2. 2020)
- Slika 41: foto: Nika Drinovec (4. 3. 2020)
- Slika 42: foto: Nika Drinovec (4. 3. 2020)
- Slika 43: foto: Nika Drinovec (4. 3. 2020)
- Slika 44: foto: Nika Drinovec (4. 3. 2020)
- Slika 45: foto: Nika Drinovec (4. 3. 2020)
- Slika 46: foto: Nika Drinovec (5. 3. 2020)
- Slika 47: foto: Nika Drinovec (5. 3. 2020)
- Slika 48: foto: Nika Drinovec (5. 3. 2020)
- Slika 49: foto: Nika Drinovec (6. 3. 2020)
- Slika 50: foto: Nika Drinovec (6. 3. 2020)