Usporedba rasta bakterije Lactobacillus amylovorus na novodizajniranoj (sMRS) i standardnoj (MRS) podlozi

Paić, Antonia

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:577556

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij

Biotehnologija

Antonia Paić
7078/BT

USPOREDBA RASTA BAKTERIJE *Lactobacillus amylovorus* NA NOVODIZAJNIRANOJ (sMRS) I STANDARDNOJ (MRS) PODLOZI

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Genetičko inženjerstvo

Mentor: Prof. dr. sc. Ivan-Krešimir Svetec

Zagreb, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Usporedba rasta bakterije *Lactobacillus amylovorus* na novodizajniranoj (sMRS) i standardnoj (MRS) podlozi

Antonia Paić, 0058206861

Sažetak: Cilj ovog rada bio je istražiti je li novodizajnirana sMRS podloga pogodna za uzgoj bakterije *Lactobacillus amylovorus*. Zbog toga su uspoređene krivulje rasta ove bakterije u sMRS podlozi i u standardnoj podlozi MRS koja se koristi za uzgoj svih bakterija mliječne kiseline. Dobiveni rezultati pokazali su da kontakt bakterijske kulture sa zrakom tijekom opetovanog izuzimanja uzoraka ima jak negativan utjecaj na rast bakterije *Lactobacillus amylovorus*, te je izraženiji u sMRS nego u MRS podlozi. Međutim, ako se minimizira kontakt bakterijske kulture sa zrakom, bakterija *Lactobacillus amylovorus* podjednako dobro raste u obje podloge i nešto ranije dostiže stacionarnu fazu rasta u sMRS podlozi. Budući da podloga sMRS sadrži samo 5 sastojaka (od kojih je samo pepton kompleksan), a MRS čak 10 sastojaka (od kojih su pepton, kvaščev ekstrakt i mesni ekstrakt kompleksni) može se zaključiti da je podloga sMRS bolji i ekonomičniji izbor za uzgoj bakterije *L. amylovorus*.

Ključne riječi: bakterije mliječne kiseline, krivulja rasta, *Lactobacillus amylovorus*, MRS podloga, sMRS podloga
Rad sadrži: 26 stranica, 9 slika, 4 tablice, 13 literaturnih navoda
Jezik izvornika: hrvatski
Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb
Mentor: prof. dr. sc. Ivan-Krešimir Svetec
Pomoć pri izradi: dr. sc. Bojan Žunar

Datum obrane: 19. rujna 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Biology and Microbial Genetics

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Growth comparison of *Lactobacillus amylovorus* on newly-designed (sMRS) and standard (MRS) medium

Antonia Paić, 0058206861

Abstract: The aim of this study was to investigate whether the newly-designed sMRS medium is suitable for the cultivation of *Lactobacillus amylovorus*. Therefore, the growth curves of this bacterium in sMRS and MRS medium (standard medium for cultivation of all lactic acid bacteria) were compared. The results showed that the contact of bacterial culture with air during repeated sampling has a strong negative effect on the growth of *L. amylovorus* which is more pronounced in sMRS than in MRS medium. However, when the contact of bacterial culture with air was minimised, *L. amylovorus* grew equally well in both media, and stationary growth phase was reached earlier in sMRS medium. Since the sMRS medium contains only 5 ingredients (only peptone is complex) and MRS contains 10 ingredients (peptone, yeast extract, and beef extract are complex), the obtained results suggest that the sMRS medium is more economical choice for cultivation of *L. amylovorus*.

Keywords: growth curve, lactic acid bacteria, *Lactobacillus amylovorus*, MRS medium, sMRS medium
Thesis contains: 26 pages, 9 figures, 4 tables, 13 references
Original in: Croatian
Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb
Mentor: Ivan-Krešimir Svetec, PhD. Full Professor
Technical support and assistance: Bojan Žunar, PhD
Defence date: 19th September, 2018.

Sadržaj

1. Uvod 1
2. Teorijski dio 2
2.1. Podjela bakterija mliječne kiseline 3
2.2. Rod *Lactobacillus* 4
2.3. *Lactobacillus amylovorus* 5
2.4. Evolucija bakterija mliječne kiseline 6
2.4.1. Razvoj novih hranjivih podloga 6
3. Materijali i metode 8
3.1. Materijali 8
3.1.1. Mikroorganizam 8
3.1.2. Hranjive podloge 8
3.1.3. Kemikalije 9
3.2. Metode 9
3.2.1. Mjerenje optičke gustoće 9
3.2.2. Izrada krivulje rasta 9
4. Rezultati i rasprava 11
4.1. Baždarna krivulja ovisnosti optičke gustoće o koncentraciji bakterijske suspenzije 11
4.2. Krivulja rasta izrađena uobičajenim postupkom 15
4.3. Krivulja rasta izrađena uz minimiziranje dotoka zraka 17
4.4. Ovisnost optičke gustoće o koncentraciji bakterijske kulture 20
4.5. Utjecaj zraka na rast *Lactobacillus amylovorus* 22
5. Zaključak 24
6. Literatura 25

1. Uvod

Bakterije mliječne kiseline imaju važnu ulogu u prehrambenoj industriji. Koriste se u proizvodnji jogurta, sireva, fermentiranih suhomesnatih proizvoda i fermentiranog povrća. Proizvodima daju karakterističan i poželjan miris, okus, teksturu i boju. Njihovo važno svojstvo koje je korisno u prehrambenoj industriji je očuvanje prehrambenih proizvoda i produljenje vijeka trajanja. Nusprodukti koji nastaju fermentacijom inhibiraju rast patogenih bakterija. Jedan od najzastupljenijih produkata je mliječna kiselina čija prisutnost u hrani snižava pH, a takvi ekstremni uvjeti nisu povoljni za rast drugih, nepoželjnih bakterija (Carr i sur., 2002.).

Neka od nalazišta bakterija mliječne kiseline uključuju gastrointestinalne, genitalne i dišne puteve ljudi, tlo, kanalizaciju i razne biljne materijale (Liu i sur., 2014.). Evolucija na takvim staništima bogatim s mnogo različitih hranjivih tvari (posebice ugljikohidratima) dovela je do gubitka gena za određene biosintetske puteve. Zbog toga je uzgoj pripadnika bakterija mliječne kiseline u laboratorijskim uvjetima bio izazov. Bilo je potrebno osmisliti podlogu koja zadovoljava sve uvjete za rast većine bakterija ove skupine. J. C. de Man, M. Rogosa i M. Elisabeth Sharpe (1960.) su osmislili MRS podlogu koja sadrži 10 sastojaka od kojih su tri kompleksna.

Lactobacillus amylovorus je termofilna bakterija mliječne kiseline, koja je prvi put izolirana iz fermentiranih kukuruznih ostataka. Prema načinu proizvodnje mliječne kiseline pripada skupini obligatnih homofermentativnih laktobacila, te ima sposobnost sinteze amilolitičkih enzima po čemu je i dobila naziv (Nakamura, 1981.). U prethodnim istraživanjima Žunar i suradnici (neobjavljeni rezultati) ustanovili su da *Lactobacillus amylovorus* loše raste na MRS podlozi, koja je standardna podloga za uzgoj bakterija mliječne kiseline. Zaključeno je da MRS podloga nije optimalna za uzgoj bakterije *Lactobacillus amylovorus*, te da je moguće da neke komponente MRS podloge inhibiraju njen rast. Iz tog razloga razvijena je sMRS podloga („simplified" MRS, pojednostavljeni MRS) koja sadrži pet sastojaka od kojih je samo pepton kompleksan sastojak. Preliminarnim eksperimentima ustanovljeno je da *Lactobacillus amylovorus* bolje raste i dulje preživljava na krutoj sMRS podlozi nego na krutoj MRS podlozi (Žunar i sur., neobjavljeni rezultati).

Cilj ovog rada bio je usporediti rast bakterije *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T izradom krivulje rasta u tekućoj, novodizajniranoj sMRS i standardnoj MRS podlozi. Na temelju dobivenih rezultata zaključeno je da *Lactobacillus amylovorus* podjednako raste u obje tekuće podloge, a uočen je i negativan efekt zraka koji u doticaju s bakterijskom kulturom utječe na njen rast.

2. Teorijski dio

Bakterije mliječne kiseline pripadaju koljenima *Firmicutes* i *Actinobacteria.* Rodovi koji pripadaju *Firmicutes* koljenu su *Aerococcus, Alloicoccus, Carnobacterium, Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Oenococcus, Pediococcus, Streptococcus, Symbiobacterium, Tetragenococcus,Vagococcus* i *Weisella.* Jedini rod koljena *Actinobacteria* koji pripada bakterijama mliječne kiseline jest *Bifidobacterium* (Mayo i sur., 2008.).

Mnoge vrste bakterija mliječne kiseline moguće je pronaći u okolišu bogatom ugljikohidratima, kao što su tlo, biljni materijali, kanalizacija, usne šupljine, respiratorni putevi, tanko i debelo crijevo ljudi i životinja. Većina vrsta iz roda *Lactobacillus* izolirano je iz ljudskih i životinjskih crijeva, kao i izmeta. Bakterije rodova *Enterococcus* i *Bifidobacterium* uglavnom su pronađene u probavnim traktovima, koži ljudi i životinja, te izmetu. *Leuconostoc* je moguće naći u životinjskom mesu, biljnim materijalima, fermentiranim mliječnim proizvodima i vinima. Rod *Pediococcus* je povezan s kvarenjem piva zbog visoke količine proizvedenog diacetila tijekom fermentacije (Liu i sur., 2014.).

Zajedničke karakteristike bakterija mliječne kiseline su asporogenost i odsutnost oksidazne, katalazne i želatinazne aktivnosti (Carr i sur., 2002.). Svi pripadnici ove skupine bakterija su anaerobi, ali mogu rasti i uz prisutnost kisika kao mikroaerofili. Navedeno svojstvo je razlog njihove proizvodnje mliječne kiseline. Budući da nisu aerobni organizmi, regeneriraju NADH u NAD^+ pomoću enzima laktat dehidrogenaze koji prevodi piruvat u laktat.

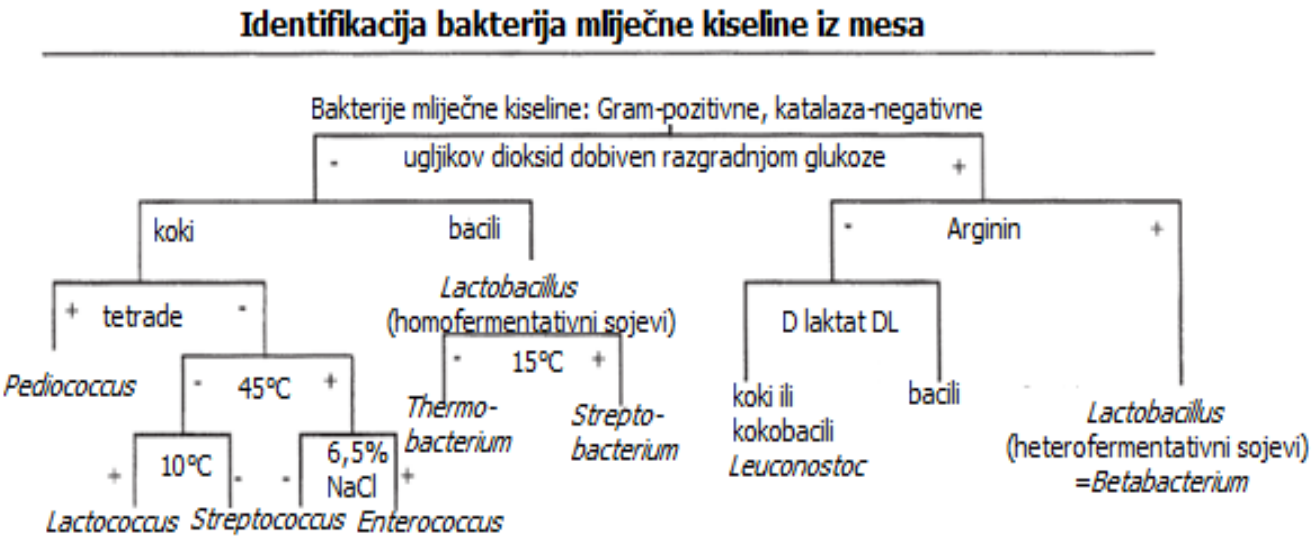
Produkti metabolizma bakterija mliječne kiseline mogu biti različite vrste organskih kiselina, diacetil, amonijak, ugljikov dioksid, vodikov peroksid i mnogi drugi. S obzirom na količinu i vrstu produkata metabolizma mogu se podijeliti na homofermentativne i heterofermentativne bakterije. Homofermentativne bakterije mliječne kiseline prevode heksoze pomoću Embden-Meyerhof-Parnas puta do mliječne kiseline koja je najzastupljeniji produkt metabolizma. Osim mliječne kiseline, heterofermentativne bakterije prevode heksoze preko pentoza fosfatnog puta do više vrsta produkata, kao što su ugljikov dioksid, octena kiselina i etanol (Makarova i sur., 2006.).

U povijesti su se bakterije mliječne kiseline zvale bakterijama kiseljenja mlijeka, te su često bile povezane uz negativne efekte na hranu (Liu i sur., 2014.). Kasnijim istraživanjima otkriveni su pozitivni učinci ovih mikroorganizama na zdravlje čovjeka i njihova korist u prehrambenoj industriji. Najznačajnija uporaba bakterija mliječne kiseline je u proizvodnji mliječnih proizvoda, sireva, alkoholnih pića, povrća i mesa kao starter kultura. Zbog njihove

sposobnosti proizvodnje aromatičnih komponenti bakterije mliječne kiseline su cijenjene u prehrambenoj industriji.

2.1. Podjela bakterija mliječne kiseline

Velik broj rodova pripada grupi bakterija mliječne kiseline, za koju se može napraviti podjela na homofermentativne i heterofermentativne bakterije (Slika 1). Za razliku od heterofermentativnih bakterija, homofermentativne bakterije posjeduju enzim aldolazu koji im omogućuje razgradnju glukoze direktno do mliječne kiseline. Zahvaljujući pentoza monofosfatnom putu, heterofermentativne bakterije prevode heksoze u pentoze pomoću enzima fosfoketolaze. Produkti metabolizma heterofermentativnih bakterija uz mliječnu kiselinu su aldehidi, diacetili, alkoholi, ugljikov dioksid, octenu kiselinu. Aldehidi i diacetili su aromatične tvari i pojačivači okusa (Carr i sur., 2002.).



Slika 1 Podjela bakterija mliječne kiseline (prema Carr i sur., 2002.). Prikazana je podjela bakterija mliječne kiseline prema fenotipskim svojstvima.

Pod homofermentativne bakterije spadaju rodovi *Streptococcus* te *Pediococcus*, a u heterofermentativne rod *Leuconostoc* i *Lactobacillus* (grupa *Betabacteria*). Bakterije mliječne kiseline imaju praktičnu primjenu i to najviše u prehrambenoj industriji. Imaju GRAS („Generally Regarded As Safe", općenito prihvaćene kao sigurne) status, te se najviše koriste u proizvodnji fermentiranih mliječnih i suhomesnatih proizvoda. Nisu sve bakterije mliječne kiseline povezane s fermentiranim prehrambenim proizvodima. Ove bakterije sudjeluju u stimulaciji pojedinih aktivnosti imunosnog sustava domaćina jer primjerice sprječavaju dijareje nakon tretmana antibioticima, proizvode vitamine i snižavaju koncentraciju kolesterola u krvi (Mayo i sur., 2008.). Zbog navedenih osobina neke vrste bakterija mliječne kiseline su probiotici.

Uloge bakterija mliječne kiseline u proizvodnji prehrambenih proizvoda su pozitivno djelovanje na teksturu, miris, okus i boju hrane. Značajne uloge uz poboljšanje organoleptičkih svojstava hrane su produljenje vijeka trajanja i inhibicija rasta mogućih patogena zbog proizvodnje etanola, peroksida, diacetila, reuterina i bakteriocina (Mayo i sur., 2008.). Starter kulture bakterija mliječne kiseline stvaraju nepovoljan okoliš za nepoželjne bakterije (koje uzrokuju kvarenje) jer snižavaju pH zbog fermentacije hranjivih tvari u prehrambenom proizvodu, a nizak pH omogućuje dulji vijek trajanja proizvoda.

2.2. Rod *Lactobacillus*

Rod *Lactobacillus* pripada koljenu *Firmicutes*, razredu *Bacilli*, redu *Lactobacilliales*, porodici *Lactobacilliaceae*, a rod koji mu je najsrodniji je *Pediococcus*. Ovaj rod čine vrste bakterija koje su nesporogene i Gram-pozitivne. S obzirom na oblik mogu biti bacili ili kokobacili (Felis i Dellaglio, 2007.). Ovaj rod je mikroaerofilan, kemo-organotrofan, te zahtjeva podloge u kojima su kompleksni sastojci. Temperature rasta variraju u rasponu od 2 °C do 53 °C, a pH raspon rasta je između 3 i 8. Vrste roda *Lactobacillus* nalaze se na mjestima gdje su lako dostupni ugljikohidrati. To se odnosi na hranu (mliječni proizvodi, fermentirani proizvodi, voće, povrće), te dišni, gastrointestinalni i genitalni putevi ljudi i životinja, kao i kanalizacija (Salvetti i sur., 2012.). Prema tome, za rast u laboratorijskim uvjetima potrebne su im podloge koje sadrže aminokiseline, peptide, vitamine, soli, masne kiseline i ugljikohidrate.

Taksonomija ovog roda godinama je temeljena na fenotipskim svojstvima kao što su razgradnja ugljikohidrata, tolerancija na različite koncentracije NaCl i rezistencija na antibiotike. Prvotno je podjela temeljena na temperaturi rasta i fermentaciji heksoza, odnosno prema njihovom homofermentativnom ili heterofermentativnom potencijalu (Salvetti i sur., 2012.). Prema Sigurdu Orla-Jensenu (1919.) rod *Lactobacillus* podijeljen je na tri grupe: *Thermobacteria, Streptobacteria* i *Betabacteria*. Ove tri grupe odnose se na sposobnost rasta na određenoj temperaturi, sposobnosti fermentiranja pentoza, na sposobnosti proizvodnje ugljikovog dioksida iz glukoze, zahtjevima za tiaminom i proizvodnji mliječne kiseline kao glavnog produkta metabolizma. Pripadnici grupa *Betabacteria* i *Streptobacteria* fermentiraju pentoze, ali kod pripadnika grupe *Thermobacteria* to nije slučaj. Grupa *Thermobacteria* je termofilna i homofermentativna, ne proizvodi ugljikov dioksid i ne raste pri 15 °C (Carr i sur., 2002.). Najveća razlika grupe *Thermobacteria* od *Betabacteria* i *Streptobacteria* je rast na 45 °C, nemogućnost fermentiranja riboze te nemogućnost rasta na 15 °C. Bakterije koje predstavljaju skupinu *Betabacteria* rastu na pri 15 °C, te su za razliku od *Streptobacteria* i *Thermobacteria* heterofermentativne. Grupa *Streptobacteria* fermentira pentoze do ugljikovog

dioksida, ali ne i glukozu. *Betabacteria* su heterofermentativne jer proizvode ugljikov dioksid iz glukoze (Carr i sur., 2002.).

Danas je prihvaćena podjela prema Hammes i Vogel (1995.) koja dijeli rod *Lactobacillus* na obligatne homofermentativne, fakultativne heterofermentativne i obligatne heterofermentativne mikroorganizme. Podjela je temeljena prema vrsti šećera i njegovom načinu razgradnje. Obligatno homofermentativni i fakultativno heterofermentativni laktobacili se koriste u proizvodnji prehrambenih proizvoda, dok se obligatno heterofermentativna skupina odnosi uglavnom na one bakterije koje uzrokuju kvarenje hrane. Obligatni homofermentativni laktobacili fermentiraju heksoze Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) putem do mliječne kiseline čiji je udio u produktima >85%, dok preostalih 15% čine etanol ili octena kiselina i ugljikov dioksid, ali ne fermentiraju pentoze i glukonate. Fakultativno heterofermentativni laktobacili fermentiraju heksoze do mliječne kiseline preko EMP puta, te mogu razgraditi pentoze i glukonat pomoću aldolaze i fosfoketolaze (enzima pentoza fosfatnog puta). Krajnji produkti su octena kiselina, etanol i mravlja kiselina. Obligatni heterofermentativni laktobacili nemaju fosfoketolazu već fruktoza-1,6-bisfosfat aldolazu, te ova skupina metabolizira pentoze i heksoze samo preko fosfoglukonatnog puta, a proizvode mliječnu ili octenu kiselinu i ugljikov dioksid (Salvetti i sur., 2012.). 1991. godine laktobacili su podijeljeni u tri filogenetska klastera – *Lactobacillus delbrueckii, Lactobacillus casei-Pediococcus* i *Leuconostoc. Lactobacillus delbrueckii* klaster je 1995. preimenovan u *Lactobacillus acidophilus* jer prvi naziv nije dobro opisivao prvu grupu. Druga skupina (*Lactobacillus casei-Pediococcus*) podijeljena je u više podgrupa (Felis i Dellaglio, 2007.). Glavni nedostatak u taksonomskoj podijeli roda *Lactobacillus* je nepovezanost između filogenetičke podijele i metaboličkih svojstava.

2.3. *Lactobacillus amylovorus*

L. K. Nakamura (1981.) prvi je izolirao bakteriju *Lactobacillus amylovorus* iz fermentiranih kukuruznih ostataka, te je opisao njenu morfologiju i fiziologiju. Ovaj mikroorganizam pripada skupini fakultativnih anaeroba, a kao i ostale bakterije mliječne kiseline je Gram-pozitivan, asporogen, ima oblik štapića, proizvodi velike količine mliječne kiseline i male količine octene kiseline. Prema udjelu mliječne kiseline u produktima, *Lactobacillus amylovorus* pripada skupini obligatnih homofermentativnih laktobacila. Nema katalaznu, oksidaznu niti nitrat reducirajuću aktivnost. Ako je izvor ugljika glukoza ili glukonat ne proizvodi ugljikov dioksid. Mliječnu kiselinu proizvodi kao L(+) i D(-) stereoizomere. Njen rast je moguć na temperaturi pri 45 °C ali ne i na 15 °C (Nakamura, 1981.). Prema tome je zaključeno da je ona termofilna bakterija i pripada grupi *Thermobacteria*.

Naziv *Lactobacillus amylovorus* (Grč. n. *amulon*, škrob; Lat. v. *vorare*, proždrijeti) označava sposobnost vrste da proizvodi amilolitičke enzime i tako razgrađuje škrob. Također ima sposobnost fermentacije celobioze, fruktoze, galaktoze, glukoze, maltoze, manoze, saharoze i trehaloze. Metabolički putevi razgradnje škroba slični su onima u *L. acidophilus, L. leichmanii* i *L. jensenii* (Nakamura, 1981.).

2.4. Evolucija bakterija mliječne kiseline

Rastom u okolišu bogatom hranjivim tvarima i faktorima rasta bakterije mliječne kiseline izgubile su gene određenih biosintetskih puteva (Schroeter i Klaenhammer, 2008.). Budući da je njihov okoliš bio visoko hranjiv bakterije nisu sintetizirale određene tvari jer su im bile dostupne u njihovim staništima. Mutacijama u genomu određeni geni potrebni za biosintezu postali su nefunkcionalni, ali kako njihova ekspresija nije bila izražena te promjene prenosile su se iz generacije u generaciju. Gubitak pojedinih sintetskih puteva rezultirao je auksotrofijom bakterija mliječne kiseline. S druge strane, mnogi geni dobiveni su horizontalnim transferom gena.

Horizontalni transfer gena transdukcijom (bakteriofagi) ili konjugacijom (preko pilusa) u redu *Lactobacilliales* bio je važan za prilagodbe u različitim uvjetima rasta. Tako je i u ljudskom i životinjskom probavnom traktu moguć horizontalni transfer gena između laktokoka i enterobakterija. Pojava gubitka gena zbog prilagodbe na različite vrste okoliša sličan je i u bakterijama mliječne kiseline koje su taksonomski udaljene (Makarova i sur., 2006.).

Geni mnogih biosintetskih puteva inaktivirani su točkastim mutacijama. Selekcijski pritisak i kompeticija usmjeravali su evoluciju bakterija mliječne kiseline u različitim okruženjima bogatim hranjivim tvarima. S obzirom na rast u različitim ekološkim nišama različite vrste imaju određene metaboličke puteve koji im pomažu u preživljavanju na njihovim staništima (Mayo i sur., 2008.).

2.4.1. Razvoj novih hranjivih podloga

Zbog rasta u okolišu bogatom hranjivim tvarima, koje je nemoguće kemijski odrediti, bilo je potrebno osmisliti hranjivu podlogu za uzgoj u laboratoriju. Bakterije mliječne kiseline žive u različitim staništima koja se razlikuju u izvorima hranjivih tvari. Medij za rast trebao je sadržavati sve sastojke potrebne za rast bakterija mliječne kiseline. J. C. de Man i suradnici (1960.) su osmislili MRS podlogu koja bi omogućila njihov rast, posebice bakterija roda *Lactobacillus* koje do tad nisu zadovoljavajuće rasle u postojećim podlogama.

MRS hranjiva podloga sastoji se od 10 sastojaka od kojih su tri kompleksna. Kompleksni sastojci podloge su oni sastojci kojima sastav nije do kraja definiran, odnosno nisu poznati točni

udijeli određenih tvari koje ulaze u sastav sastojka podloge. U MRS podlozi ti sastojci su pepton, mesni ekstrakt i kvaščev ekstrakt. Ostali sastojci koji ulaze u sastav MRS hranjive podloge su glukoza, Tween 80, kalijev hidrogenfosfat, natrijev acetat trihidrat, triamonijev citrat, magnezijev sulfat heptahidrat i manganov sulfat tetrahidrat (de Man i sur., 1960.).

U MRS podlozi glavni izvor ugljika je glukoza. Pepton je sastojak podloge koji sadrži faktore rasta proteine, peptide, aminokiseline, dušik i fosfor. Ovaj kompleksni sastojak podloge često se dobiva enzimskom digestijom ili kiselinskom hidrolizom životinjskih tkiva, mlijeka ili biljaka. Mesni ekstrakt je jedan od izvora ugljika, aminokiselina, dušika i vitamina. Kvaščev ekstrakt izvor je vitamina B i drugih faktora rasta. Natrijev acetat služi kao pufer, ali i kao prekursor za sintezu lipida. Citrat inhibira rast ako je dodan u velikim količinama, ali efekt inhibicije citratom može se smanjiti dodatkom mangana i magnezija. Tween 80 je izvor masnih kiselina neophodnih za metabolizam vrste *Lactobacillus*. Magnezijev i manganov sulfat izvori su iona. Uloga fosfata u podlozi je održavanje vrijednosti pH, razine elektrolita i osmotske ravnoteže (MacLeod i Snell, 1947.).

U sklopu istraživanja *Lactobacillus amylovorus* Žunar i suradnici (neobjavljeni rezultati) pokazali su da MRS nije optimalna podloga za ovaj mikroorganizam. Naime, MRS hranjiva podloga dizajnirana je tako da bi na njoj mogle rasti sve bakterije mliječne kiseline, iako se pripadnici ove skupine međusobno značajno razlikuju u nutritivnim potrebama. Pojedini sastojci koji su određenoj vrsti potrebni za rast mogu štetiti drugoj vrsti. Za *Lactobacillus amylovorus* dokazan je bolji rast i dulje preživljavanje na sMRS podlozi nego na MRS podlozi. Novodizajnirana sMRS podloga je zapravo MRS podloga iz koje je izostavljeno pet sastojaka: kvaščev ekstrakt, mesni ekstrakt, kalijev hidrogenfosfat, amonijev citrat i manganov sulfat (Žunar i sur., neobjavljeni rezultati).

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

3.1.1. Mikroorganizam

Za rad je korišten mikroorganizam *Lactobacillus amylovorus* soj DSM 20531^T.

3.1.2. Hranjive podloge

Podloga MRS (*Biolife*) – sastav naveden od proizvođača

pepton	10 g/L
mesni ekstrakt	10 g/L
kvaščev ekstrakt	5 g/L
glukoza	20 g/L
kalijev hidrogenfosfat	2 g/L
natrijev acetat	5 g/L
amonijev citrat	2 g/L
magnezijev sulfat	0,2 g/L
manganov sulfat	0,05 g/L
Tween 80	mL 1
agar (za krutu podlogu)	15 g/L

Sastav sMRS hranjive podloge

Bactopepton	20 g/L
glukoza	20 g/L
Tween 80	1 mL/L
natrijev acetat	5 g/L
magnezijev sulfat	0,2 g/L
agar (za krutu podlogu)	15 g/L

Podloga sMRS pripremljena je otapanjem svih navedenih sastojaka u demineraliziranoj vodi. MRS podloga napravljena je prema uputama proizvođača. Podloge su sterilizirane u autoklavu na 120 °C 15 minuta.

3.1.3. Kemikalije

MRS hranjiva podloga	*Biolife*, Milano, Italija
Bactopepton	*Biolife*, Milano, Italija
Agar	*Liofilchem*, Roseto degli Abruzzi, Italija
Tween 80	*Fischer Scientific*, Hampton, New Hampshire, SAD
D(+)-glukoza monohidrat	T. T. T., Sveta Nedelja, Hrvatska
Natrijev acetat	*Kemika*, Zagreb, Hrvatska
Magnezijev sulfat heptahdrat	*Merck*, Damstadt, Njemačka

3.2. Metode

3.2.1. Mjerenje optičke gustoće

Mjerenje optičke gustoće bakterijske suspenzije provedeno je na spektrofotometru 2000 Series Operators pri valnoj duljini od 600 nm. Odgovarajuća hranjiva podloga uzima se kao slijepa proba. Srednja vrijednost optičke gustoće dobivena je na temelju rezultata tri paralelna mjerenja.

3.2.2. Izrada krivulje rasta

Krivulja rasta rađena je na uobičajeni način (poglavlje 3.2.2.1) i tako da se minimizira kontakt bakterijske kulture sa zrakom (poglavlje 3.2.2.2.). U oba slučaja bakterijske kulture su uzgajane pri 37 °C bez aeracije, a uzorci su uzimani prije početka i svakih 60 minuta tijekom uzgoja za mjerenje optičke gustoće (pri 600 nm) i određivanje broja živih bakterija u određenom volumenu bakterijske suspenzije (određivanjem CFU, „Colony Forming Units"). Srednja vrijednost CFU određena je na temelju tri paralelna nacjepljivanja. Kao slijepa proba za izradu baždarne krivulje korištena je čista nenacjepljena hranjiva podloga (OD_{600}=0).

3.2.2.1. Uobičajeni način izrade krivulje rasta

Uzorci se uzimaju kroz period od 16 sati iz jedne zajedničke bakterijske kulture. Pri ovakvom postupku izrade krivulje preživljenja bakterijska kultura se blago aerira (dolazi u kontakt sa zrakom) tijekom svakog izuzimanja uzorka.

3.2.2.2. Izrada krivulje rasta uz minimiziranje kontakta sa zrakom

Tijekom izrade krivulje rasta provedeno je 25 mjerenja tijekom 24 sata, te je zato priređeno 50 bakterijskih suspenzija za obje podloge u hermetički zatvorenim Falcon kivetama. U svaku Falcon kivetu od 15 mL otpipetirano je 10 mL podloge i nacijepljen je mikroorganizam *Lactobacillus amylovorus*. Nacijepljene tekuće podloge stavljene su u termostat na 37 °C. Odabrana decimalna razrjeđenja nacijepljena su na 300 krutih hranjivih podloga. Krute nacijepljene podloge stavljene su u termostat na 37 °C, a inkubirane su 48 sati. Po dvije bakterijske kulture izuzimane su u određenim vremenskim intervalima kao paralele (opisano u

poglavlju 3.2.2.) za mjerenje optičke gustoće i određivanje broja živih stanica. Na ovaj način minimizira se kontakt bakterijske kulture sa zrakom jer se iz svake kulture (odnosno Falcon kivete) uzorak izuzima samo jednom.

4. Rezultati i rasprava

Cilj rada bio je usporediti rast bakterije *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T na dvije hranjive podloge (standardnoj MRS podlozi i novoj sMRS podlozi, opisane u poglavljima 2.4.1. i 3.1.2.). U tu svrhu su izrađene krivulje rasta u tekućim hranjivim podlogama, a prije toga je bilo neophodno izraditi odgovarajuće baždarne krivulje (poglavlje 4.1.). Krivulje rasta izrađene su uobičajenim postupkom (poglavlje 4.2.) i postupkom koji minimizira kontakt bakterijske kulture sa zrakom (poglavlje 4.3.), a ovisnost optičke gustoće o koncentraciji bakterijske kulture i utjecaju zraka na krivulju rasta bakterija *Lactobacillus amylovorus* diskutirani su u poglavlju 4.4.

4.1. Baždarna krivulja ovisnosti optičke gustoće o koncentraciji bakterijske suspenzije

Baždarnu krivulju bilo je potrebno izraditi da bi se odredilo područje linearne ovisnosti optičke gustoće o koncentraciji bakterijske suspenzije, odnosno broju stanica u određenom volumenu bakterijske suspenzije. Broj stanica u pojedinim razrjeđenjima procijenjen je nakon 24 sata uzgoja na temelju poznatog broja stanica u nerazrijeđenoj bakterijskoj suspenziji. Postupak izrade baždarne krivulje i mjerenje optičke gustoće opisani su u poglavlju 3.2.1., a dobiveni rezultati prikazani su u Tablicama 1 i 2, te slici 2.

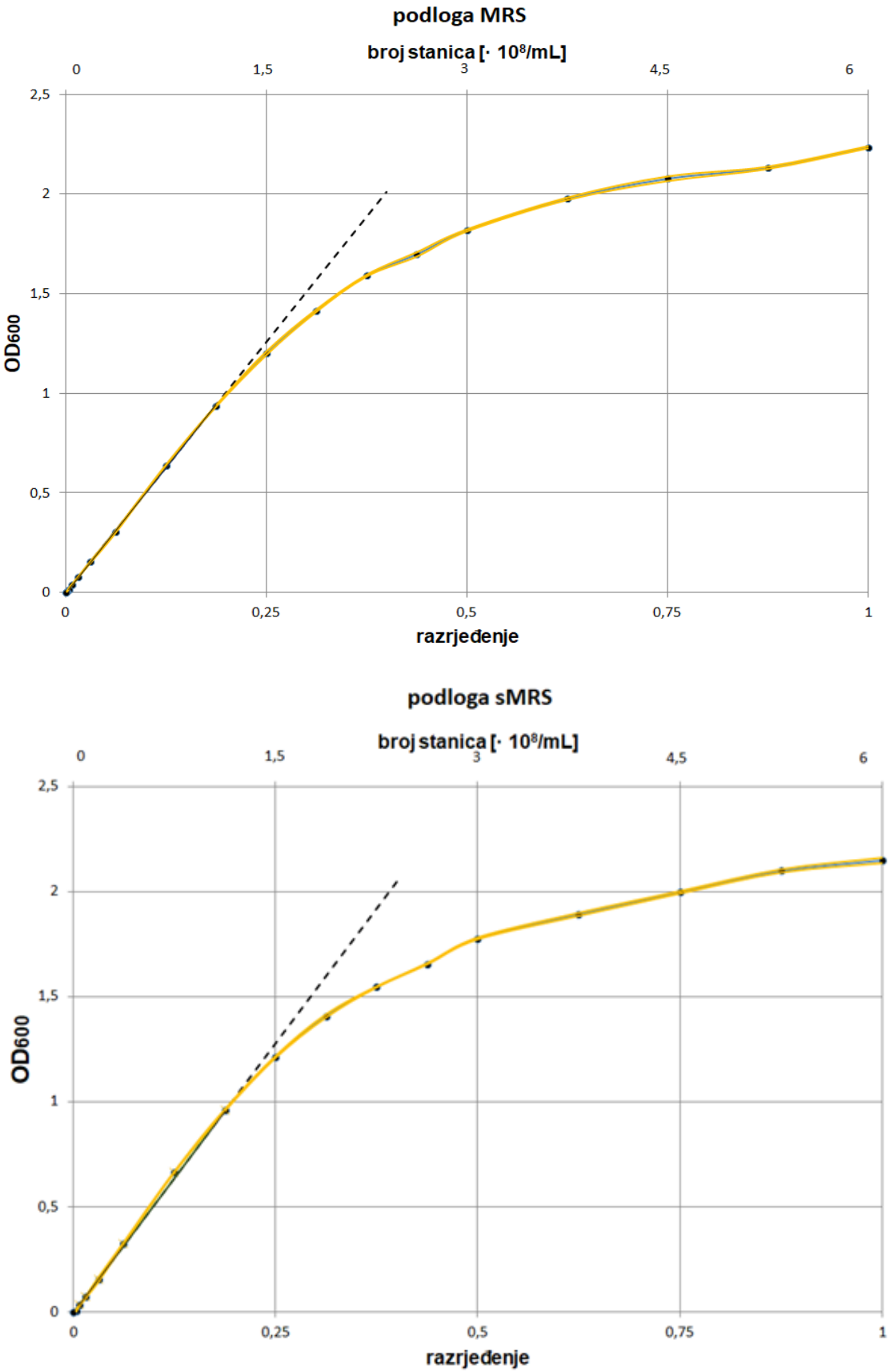
Tablica 1. Rezultati mjerenja dobiveni pri izradi baždarne krivulje ovisnosti optičke gustoće (OD_{600}) o koncentraciji bakterijske suspenzije *Lactobacillus amylovorus* u podlozi MRS. Prikazana su korištena razrjeđenja dobivena razrjeđivanjem bakterijske kulture nakon 24 sata uzgoja. Masnim slovima otisnuta je koncentracija bakterijske suspenzije koja je u linearnoj ovisnosti s optičkom gustoćom.

razrjeđenje	**OD_{600}**				**koncentracija bakterijske kulture [$\cdot 10^6$/mL]**
	1	**2**	**3**	**srednja vrijednost**	
1,000	2,240	2,230	2,235	2,235	446
0,875	2,135	2,125	2,135	2,132	390
0,750	2,070	2,090	2,070	2,044	335
0,625	1,976	1,970	1,982	1,976	279
0,500	1,812	1,818	1,822	1,817	223
0,438	1,686	1,696	1,708	1,697	195
0,375	1,594	1,586	1,590	1,590	167
0,313	1,408	1,418	1,418	1,415	139
0,250	1,206	1,204	1,190	1,200	112
0,188	0,932	0,936	0,939	0,936	**83,6**
0,125	0,636	0,637	0,640	0,638	**55,8**
0,063	0,310	0,300	0,308	0,306	**27,8**
0,031	0,158	0,150	0,154	0,154	**13,9**
0,016	0,079	0,076	0,074	0,076	**6,97**
0,008	0,038	0,035	0,040	0,038	**3,48**
0,004	0,015	0,018	0,020	0,018	**1,74**
0,002	0,007	0,006	0,006	0,006	0,87

Tablica 2. Rezultati mjerenja dobiveni pri izradi baždarne krivulje ovisnosti gustoće (OD_{600}) o koncentraciji stanica *Lactobacillus amylovorus* u sMRS podlozi. Prikazana su korištena razrjeđenja bakterijske kulture nakon 24 sata uzgoja. Masnim slovima otisnuta je koncentracija bakterijske suspenzije koja je u linearnoj ovisnosti sa optičkom gustoćom.

razrjeđenje	**OD_{600}**				**koncentracija bakterijske kulture [$\cdot 10^6$/mL]**
	1	**2**	**3**	**srednja vrijednost**	
1,000	2,150	2,135	2,160	2,148	484
0,875	2,090	2,100	2,105	2,098	424
0,75	2,000	1,990	2,000	1,997	363
0,625	1,900	1,886	1,890	1,892	303
0,500	1,782	1,776	1,774	1,778	242
0,438	1,656	1,654	1,660	1,657	212
0,375	1,548	1,548	1,544	1,547	182
0,313	1,412	1,414	1,400	1,409	151
0,250	1,208	1,216	1,216	1,213	121
0,188	0,964	0,955	0,962	0,960	**90,8**
0,125	0,668	0,662	0,666	0,665	**60,5**
0,063	0,331	0,322	0,329	0,327	**30,3**
0,031	0,164	0,158	0,143	0,155	**15,1**
0,017	0,076	0,070	0,068	0,071	**7,56**
0,008	0,035	0,030	0,033	0,033	**3,78**
0,004	0,004	0,007	0,007	0,005	1,89

Iz baždarnih krivulja (Slika 2) vidi se da je područje linearne ovisnosti optičke gustoće o koncentraciji bakterijske suspenzije u rasponu od $3 \cdot 10^6$ do $90 \cdot 10^6$ stanica po mililitru i u podlozi MRS i u podlozi sMRS kao što je označeno u Tablicama 1 i 2. Između optičke gustoće i visoke koncentracije stanica u podlozi ne postoji linearna ovisnost jer se svjetlost reflektira o stanice, te detektor ne očitava valjanu promjenu koncentracije stanica. Zbog toga je potrebno odrediti područje linearne ovisnosti optičke gustoće o koncentraciji bakterijske suspenzije da bi se za izradu krivulje preživljenja koristila odgovarajuća razrjeđenja bakterijske kulture.



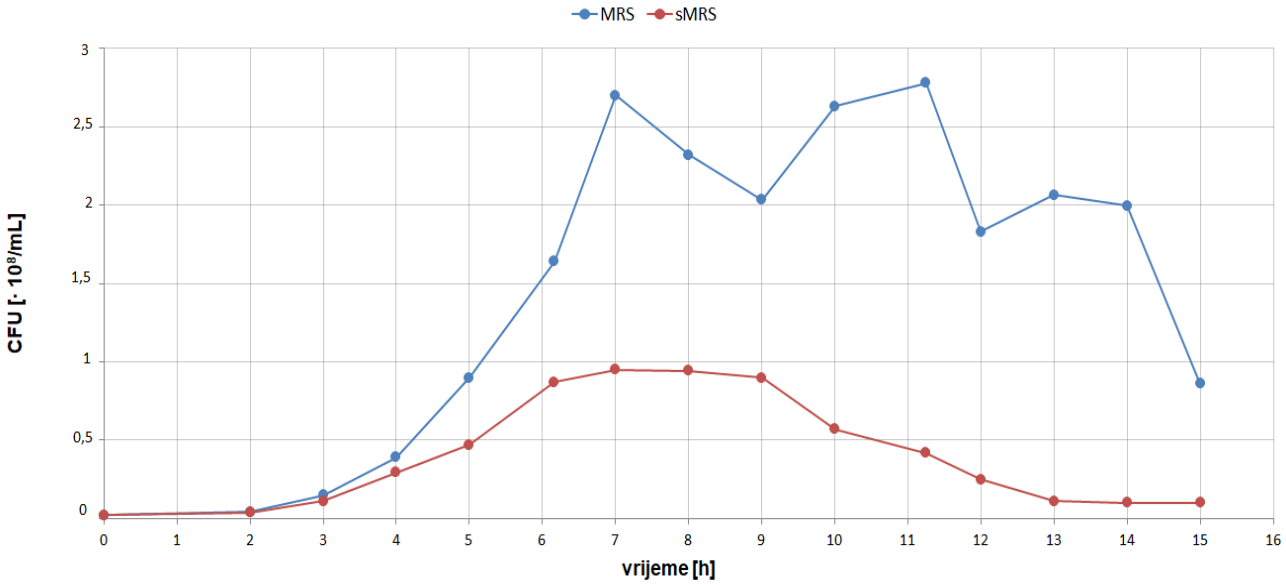
Slika 2 Baždarni dijagrami ovisnosti optičke gustoće o koncentraciji bakterijske suspenzije *Lactobacillus amylovorus* u tekućim MRS i sMRS podlogama.

4.2. Krivulja rasta izrađena uobičajenim postupkom

Postupak izrade krivulje rasta opisan je u poglavlju 3.2.2.1., a rezultati su prikazani u Tablici 3 i na Slici 3.

Tablica 3 Rezultati mjerenja dobiveni pri izradi krivulje rasta bakterije *Lactobacillus amylovorus* u podlozi MRS i sMRS. U tablici su prikazana vremena izuzimanja uzoraka i srednje vrijednosti optičke gustoće tri nezavisna mjerenja te koncentracije živih stanica (CFU) u bakterijskoj suspenziji (opisano u poglavljima 3.2.1. i 3.2.2.)

sMRS podloga			**MRS podloga**		
vrijeme [h]	**CFU [· 10^6/mL]**	**OD_{600}**	**vrijeme [h]**	**CFU [· 10^6/mL]**	**OD_{600}**
0	2,08	0,057	0	2,16	0,044
2	3,90	0,080	2	4,32	0,064
3	11,2	0,108	3	15,0	0,093
4	29,3	0,165	4	39,2	0,153
5	46,9	0,261	5	90,0	0,287
6,16	87,0	0,428	6,16	164,0	0,539
7	95,0	0,633	7	270,0	0,854
8	94,5	0,860	8	232,0	1,407
9	90,0	1,308	9	204,0	1,961
10	57,0	1,592	10	263,0	3,133
11,25	42,0	2,237	11,25	278,0	4,030
12	25,0	2,350	12	183,0	4,417
13	11,0	2,620	13	207,0	4,803
14	10,0	2,763	14	200,0	5,280
15	10,0	2,830	15	86,0	5,620



Slika 3 Krivulje rasta *Lactobacillus amylovorus* u podlozi MRS i sMRS izrađene uobičajenom metodom.

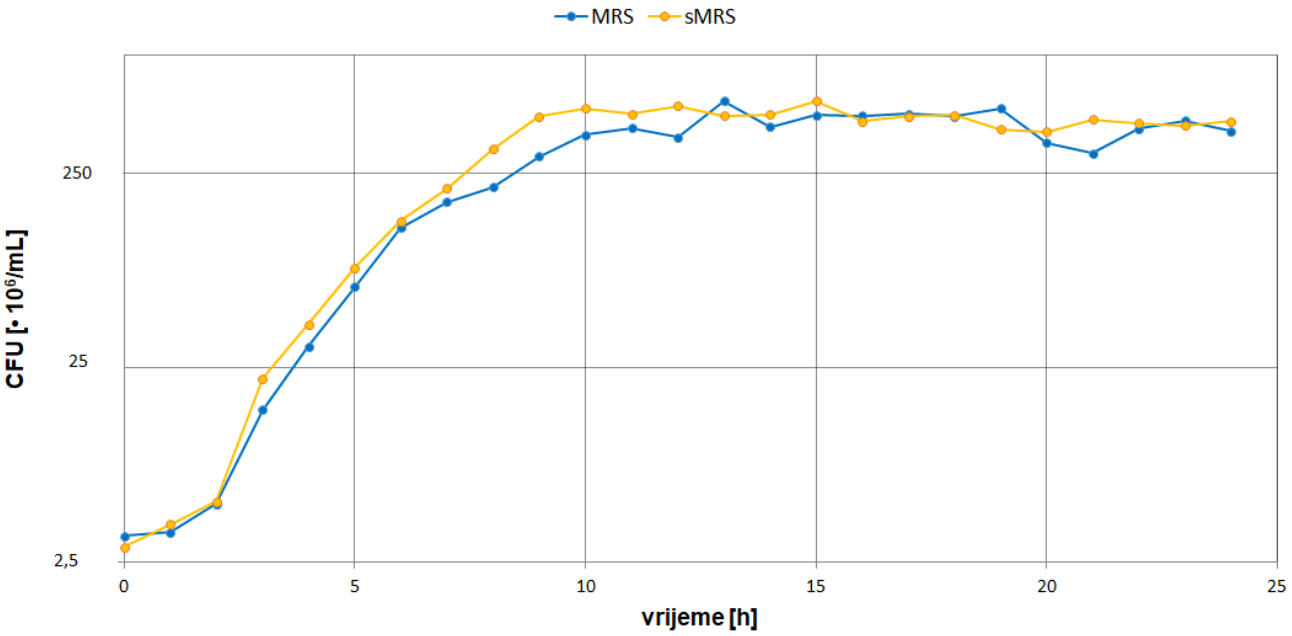
Na Slici 3 vidljiva je velika razlika između krivulja rasta dobivenih uzgojem *Lactobacillus amylovorus* u MRS i sMRS podlozi. Mikroorganizam rastom u MRS podlozi postiže oko 2,5 puta veću koncentraciju nego rastom u sMRS podlozi. Najviša postignuta koncentracija stanica u MRS podlozi iznosi $2,7 \cdot 10^8$ CFU/mL, a u sMRS podlozi iznosi $8,7 \cdot 10^7$ CFU/mL. Stacionarna faza kod MRS je možda nešto duža. Uz to što se rastom u sMRS podlozi postiže manja koncentracija stanica, stacionarna faza traje kraće. U skladu s literaturnim podacima i preliminarnim neobjavljenim rezultatima (Žunar i sur.) neobičan izgled krivulje može biti posljedica kontakta s kisikom. Zbog toga su krivulje rasta bakterije *Lactobacillus amylovorus* u MRS i sMRS podlozi određene postupkom uz minimiziranje zraka (poglavlje 3.2.2.2.).

4.3. Krivulja rasta izrađena uz minimiziranje dotoka zraka

Postupak izrade krivulje rasta uz minimiziranje dotoka zraka opisan je u poglavlju 3.2.2.2., a rezultati su prikazani u Tablici 4, te na Slikama 4 i 5.

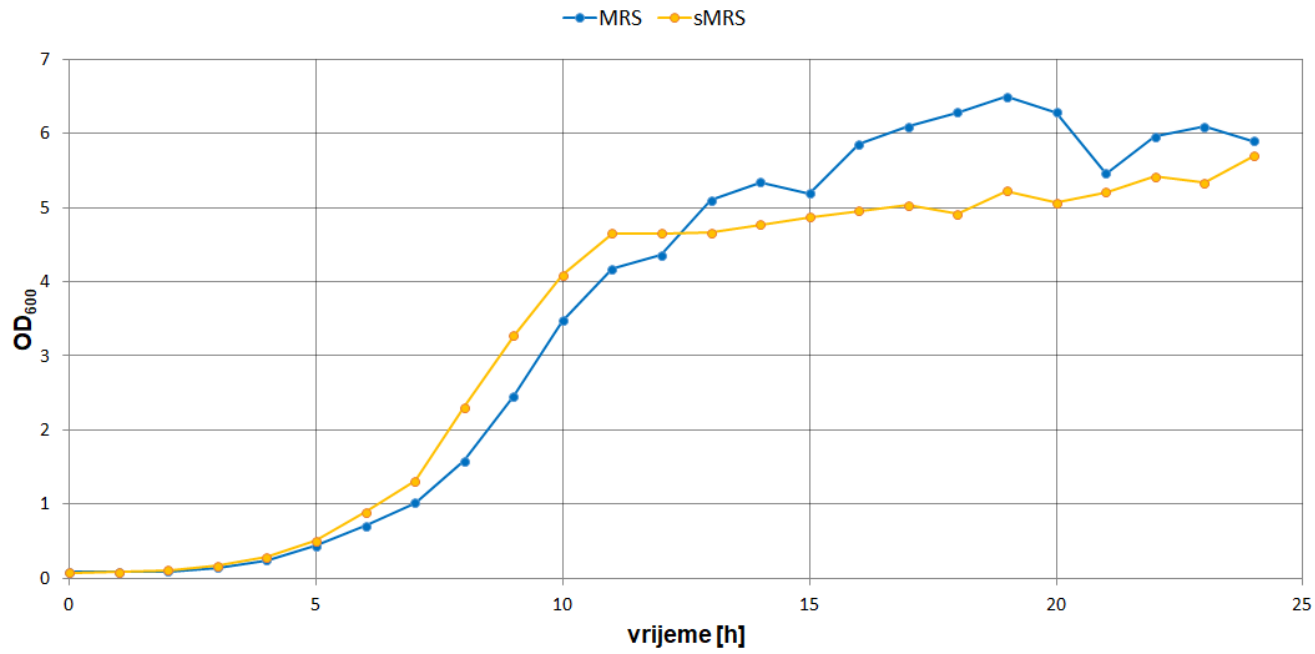
Tablica 4 Rezultati mjerenja dobiveni pri izradi krivulje rasta uzgojem bakterije *Lactobacillus amylovorus* u standardnoj MRS i novoj sMRS podlozi. U Tablici je prikazano vrijeme izuzimanja uzoraka te su prikazane srednje vrijednosti OD_{600} i CFU/mL za obje podloge koje su dobivene na isti način kao i kod mjerenja u poglavlju 4.2.

MRS podloga			**sMRS podloga**		
vrijeme [h]	**OD_{600}**	**CFU [$\cdot 10^6$/mL]**	**vrijeme [h]**	**OD_{600}**	**CFU [$\cdot 10^6$/mL]**
0	0,081	3,40	0	0,069	2,97
1	0,079	3,55	1	0,082	3,90
2	0,087	4,97	2	0,107	5,09
3	0,136	15,1	3	0,169	21,9
4	0,241	32,0	4	0,282	41,7
5	0,431	64,8	5	0,505	81,3
6	0,702	131	6	0,888	141
7	1,013	178	7	1,312	208
8	1,577	211	8	2,303	331
9	2,457	304	9	3,277	490
10	3,477	392	10	4,093	538
11	4,173	426	11	4,657	502
12	4,358	380	12	4,657	554
13	5,100	584	13	4,663	491
14	5,347	431	14	4,773	498
15	5,197	495	15	4,877	586
16	5,860	490	16	4,953	461
17	6,097	504	17	5,033	487
18	6,287	487	18	4,917	494
19	6,500	536	19	5,223	420
20	6,287	358	20	5,070	407
21	5,463	316	21	5,210	470
22	5,960	423	22	5,423	450
23	6,090	465	23	5,333	438
24	5,900	410	24	5,700	460



Slika 4 Krivulja rasta bakterije *Lactobacillus amylovorus* u podlogama MRS i sMRS uz minimiziranje dotoka zraka.

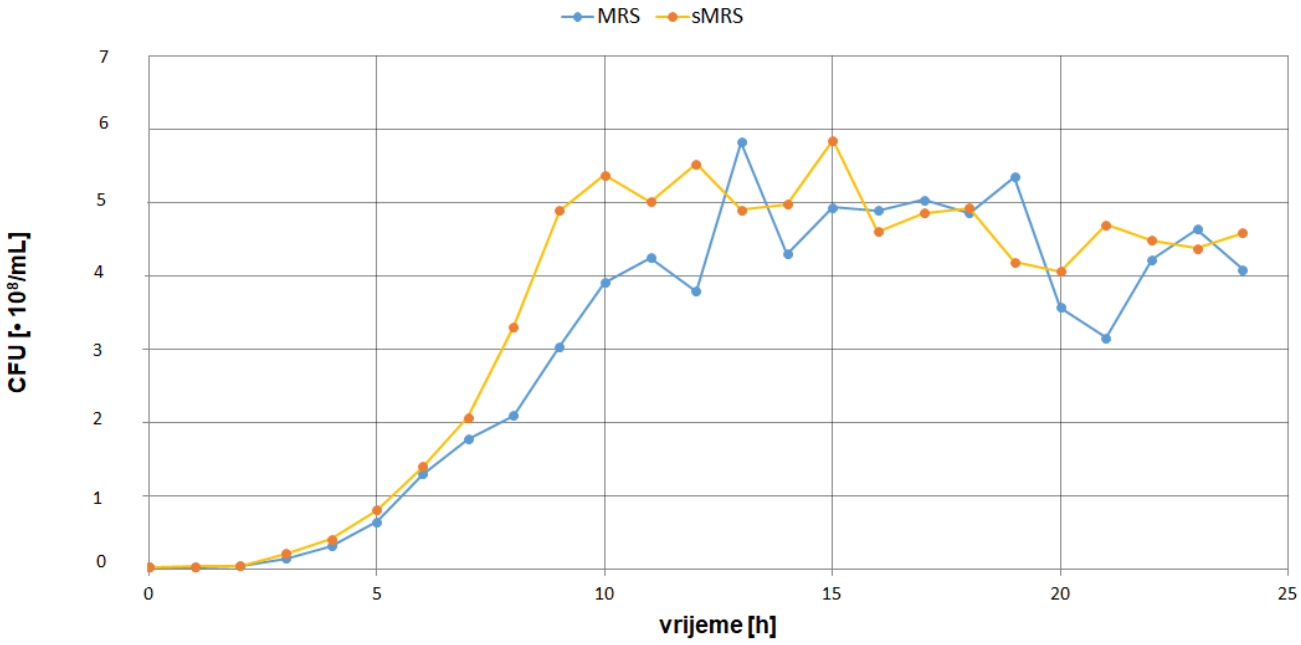
Za razliku od krivulja dobivenih uobičajenom metodom, krivulje dobivene postupkom uz minimiziranje zraka imaju približno sličan i uobičajen izgled. Lag faza traje jednako dugo, brzina rasta je jednaka za obje krivulje, a dostignute koncentracije stanica prema CFU su podjednake. Rezultati dobiveni mjerenjem na oba načina sugeriraju negativni efekt dotoka zraka.



Slika 5 Ovisnost optičke gustoće o koncentraciji bakterijske kulture *Lactobacillus amylovorus* u podlogama MRS i sMRS.

Usporedbom krivulja rasta dobivenih određivanjem broja živih bakterija (CFU) i mjerenjem optičke gustoće, vidi se da OD_{600} vrijednosti pokazuju stalan rast u obje podloge, ali prema rezultatima CFU *Lactobacillus amylovorus* uzgojen u obje podloge stagnira. Također, prema rezultatima izmjerene optičke gustoće, na MRS podlozi postiže se veća koncentracija stanica, ali rezultati CFU pokazuju približno iste vrijednosti za uzgoj u obje podloge. Veći OD_{600} za MRS podlogu mogao bi ukazivati na to da je volumen pojedinačnih stanica u toj podlozi bio veći od stanica u sMRS podlozi.

Ako se rezultati prikažu bez logaritamske skale (kao na Slici 6), na krivulji rasta dobivenoj uzgojem u sMRS podlozi uz minimiziranje dotoka zraka vidi se da bakterije *Lactobacillus amylovorus* prije ulaze u stacionarnu fazu nego na podlozi MRS. Pomak krivulje rasta („diauxic shift") dobivene uzgojem na MRS podlozi (odnosno kasniji ulazak u stacionarnu fazu) mogla bi objasniti prilagodba bakterijskih stanica na novi izvor hranijvih tvari. Podloga sMRS sadrži samo 1 kompleksan sastojak, te zato bakterijske stanice *Lactobacillus amylovorus* prije narastu do konačne koncentracije jer nema procesa prilagodbe (lag faze) na drugi izvor hranijvih tvari.

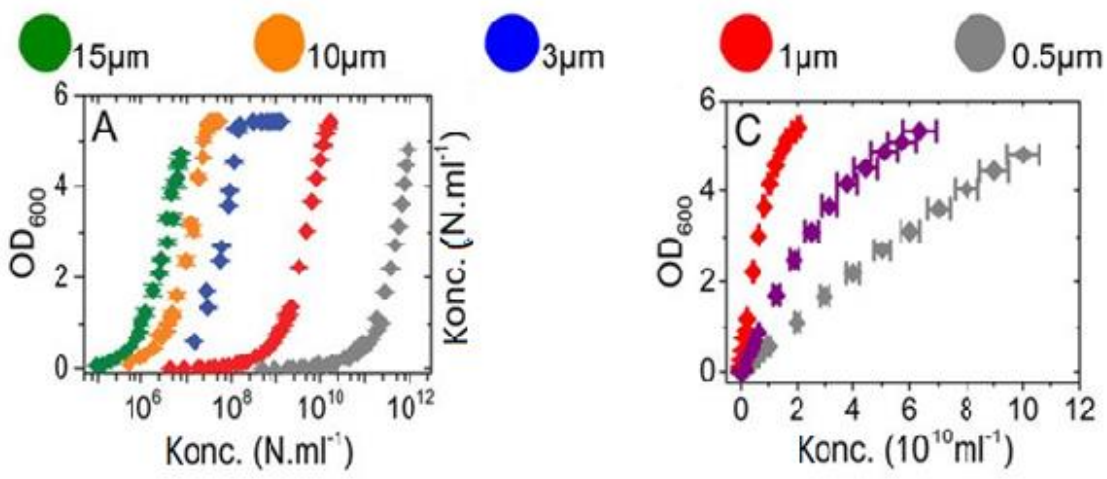


Slika 6 Prikaz krivulje rasta na kojoj se vidi „diauxic shift" (objašnjenje se nalazi u tekstu). Krivulje rasta prikazane su tako da vrijednost CFU nije prikazana u logaritamskoj skali.

4.4. Ovisnost optičke gustoće o koncentraciji bakterijske kulture

U prethodnom poglavlju je na krivuljama rasta (Slika 5) vidljiv stalan porast OD_{600} u stacionarnoj fazi što bi trebalo ukazivati na to da se i koncentracija stanica mijenja, ali CFU ne potvrđuje rast jer broj stanica stagnira (Slika 4). Odstupanja između CFU i OD_{600} rezultata mogla bi se objasniti na temelju promjene volumena bakterijskih stanica.

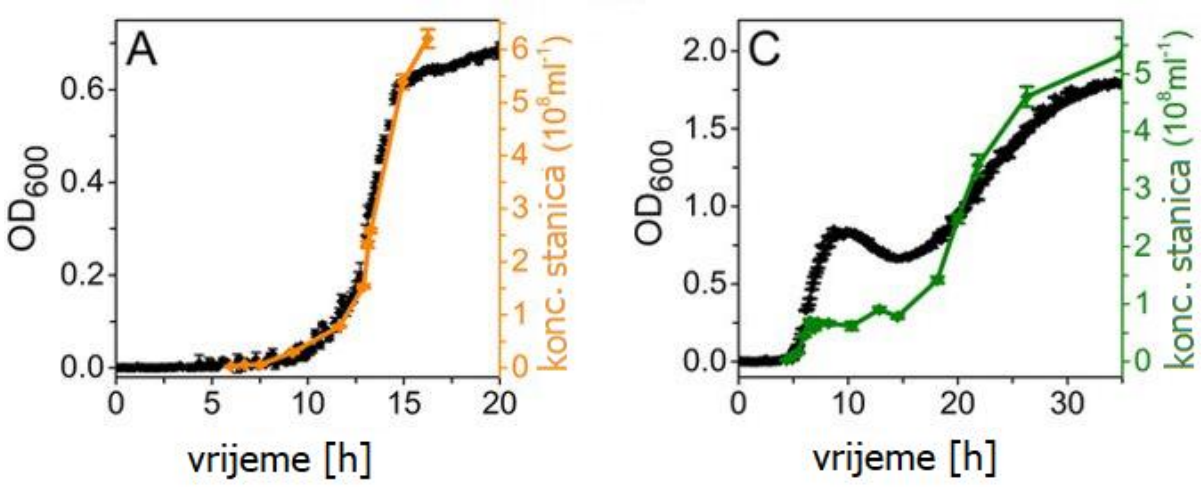
Prema istraživanju kojeg su proveli Stevenson i suradnici (2016.) parametri koji utječu na OD_{600} vrijednosti su veličina i oblik stanica. U istraživanju je mjerena optička gustoća suspenzija polistirenskih kuglica različitih veličina.



Slika 7 Ovisnost optičke gustoće suspenzije polistirenskih kuglica o njihovom promjeru jednake veličine (A) i miješanjem kuglica različite veličine (C) (Stevenson i sur., 2016.). Boje označavaju promjere kuglica. Ljubičasta boja označava krivulju dobivenu mjerenjem optičke gustoće suspenzije dobivene miješanjem kuglica promjera 3 µm i 1 µm.

Iz Slike 7 A vidljivo je da se krivulje ovisnosti optičke gustoće o koncentraciji polistirenskih kuglica razlikuju, a jedna vrijednost OD_{600} označava različite koncentracije za različite veličine kuglica. Ako se kuglice različitih promjera pomiješaju (Slika 7 C), njihova krivulja ovisnosti optičke gustoće o koncentraciji kuglica neće biti slična krivuljama koje su napravljene za jednu vrijednost promjera.

Mjerenjem optičke gustoće bakterijske suspenzije u kojoj je *Escherichia coli* Stevenson i suradnici (2016.) dobili su slične rezultate kao i kod mjerenja optičke gustoće polistirenskih kuglica.



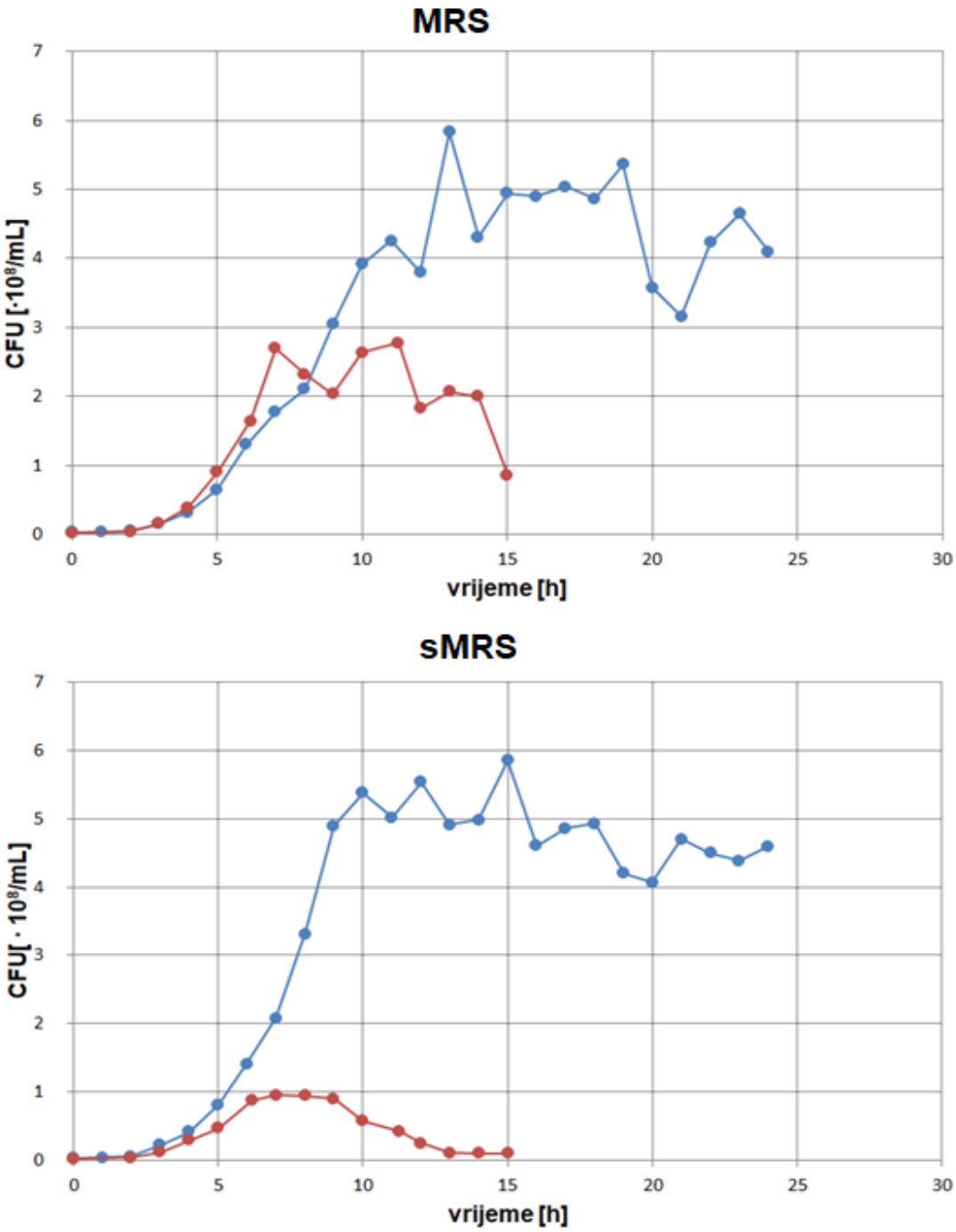
Slika 8 Krivulje rasta napravljene mjerenjem optičke gustoće suspenzije za *E. Coli* uzgojenu u podlozi u kojoj je jedini izvor ugljika glukoza (A) i u podlozi koja sadrži subletalnu koncentraciju ampicilina (C) (Stevenson i sur., 2016.).

U istraživanju su napravljene dvije krivulje rasta za bakteriju *E. coli.* U prvom slučaju je u podlozi kao izvor ugljika bila samo glukoza, te je na krivulji rasta vidljivo odstupanje optičke gustoće od koncentracije u stacionarnoj fazi jer se bakterijskim stanicama smanjio volumen (Slika 8 A). U drugom eksperimentu bakterija *E. coli* uzgojena je u mediju sa subletalnom koncentracijom ampicilina, ali do odstupanja dolazi u eksponencijalnoj fazi jer se povećava masa bakterijskih stanica (Slika 8 C) (Stevenson i sur., 2016.).

Rast OD_{600} vrijednosti bakterijske suspenzije *Lactobacillus amylovorus* pri izradi krivulje rasta uz minimiziranje zraka (Slika 5) mogao bi se objasniti na temelju prethodno opisanog istraživanja, odnosno uzrok povećanja koncentracije stanica prema rezultatima optičke gustoće samo je prividan zbog povećanja volumena bakterijskih stanica.

4.5. Utjecaj zraka na rast *Lactobacillus amylovorus*

Na temelju rezultata u Tablicama 3 i 4 u ovom poglavlju (Slika 9) prikazane su krivulje rasta za *Lactobacillus amylovorus* u podlozi MRS i u podlozi sMRS uz konakt sa zrakom (uobičajeni postupak izrade krivulje rasta poglavlje 4.2.), i uz minimiziranje dotoka zraka (poglavlje 4.3.).



Slika 9 Krivulja rasta bakterije *Lactobacillus amylovorus* u MRS i sMRS podlogama izrađene uobičajenom metodom i uz minimizaciju dotoka zraka. Crvena boja označava krivulje izrađene na uobičajen način, a plava boja označava krivulje izrađene uz minimizaciju kontakta sa zrakom.

Prema navedenim rezultatima vidljivo je da u oba slučaja kontakt sa zrakom (minimalna aeracija do koje dolazi pri uzimanju uzoraka) ima jak negativan utjecaj, jer na MRS podlozi dolazi do faze odumiranja u 13. satu, a na sMRS podlozi u 10. satu.

Rastom bakterija u MRS podlozi s minimiziranim kontaktom sa zrakom koncentracija stanica oko 2 puta je veća od one dostignute uzgojem na uobičajeni način. Također, vidljiv je raniji početak stacionarne faze rasta (7. sat) u MRS podlozi koja je bila u kontaktu sa zrakom nego u MRS podlozi gdje je bio minimiziran dotok zraka (11. sat). Na krivulji rasta dobivenoj izradom bakterije *Lactobacillus amylovorus* u sMRS podlozi uz minimiziran kontakt sa zrakom dostignuta koncentracija stanica 6 puta je veća od one dobivene na uobičajen način. Uz raniji početak (6. sat) vidljivo je i kraće trajanje (3 sata) stacionarne faze na krivulji rasta dobivenoj klasičnim postupkom, jer krivulja rasta dobivena uzgojem uz minimizaciju zraka ima početak u 10. satu i traje dulje.

5. Zaključak

Na temelju rezultata i rasprave može se zaključiti:

1. Linearno područje ovisnosti optičke gustoće (OD_{600}) o koncentraciji stanica za bakteriju *Lactobacillus amylovorus* nalazi se u rasponu od 1,74 · 10^6 st/mL do 83,6 · 10^6 st/mL (MRS podloga) i od 3,78 · 10^6 st/mL do 90,8 · 10^6 st/mL (sMRS podloga).

2. Kontakt bakterijske kulture sa zrakom ima značajan negativan utjecaj na rast bakterije *Lactobacillus amylovorus*, a izraženiji je u podlozi sMRS nego u podlozi MRS. Uzgojem uz minimizaciju dotoka zraka krivulje rasta su jednake na MRS i sMRS podlozi, stoga je pri uzgoju bakterije *Lactobacillus amylovorus* potrebno minimizirati kontakt bakterijske kulture sa zrakom.

3. Budući da je sMRS podloga jeftinija i jednostavnija za pripremu ona je bolji izbor za uzgoj *Lactobacillus amylovorus* od do sada korištene standardne podloge MRS.

6. Literatura

Carr, F. J., Chill, D., Maida, N. (2002) The Lactic Baceria: A Literature Survey. *Critical Reviews in Microbiology* 28:4 str. 281 – 370.

De Man, J. C.,Rogosa, M., Sharpe, M. E. (1960) A Medium for the Cultivation of *Lactobacilli. The Journal of applied bacteriology* 23 (1), str. 130 – 135.

Felis, G. E., Dellaglio F. (2007) Taxonomy od Lactobacilli and Bifidobacteria. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 8:2 str. 44 – 61.

Hammes, W. P., Vogel, R. F. (1995) The Genera of Lactic Acid Bacteria. U: The Genera of Lactic Acid Bacteria, Wood, B. J. B., Holzhapfel, W. H., Blacki Academic & Professional, 2: str. 19 – 54.

Liu, W., Pang, H., Zhang, H., Cai, Y. (2014) Biodiversity of Lactic Acid Bacteria. U: Lactic Acid Bacteria, Springer, str. 103 – 203.

MacLeod, R. A., Snell, E. E. (1947) Some Mineral Requirements of the Lactic Acid Bacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 170: 351 – 365.

Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov,A., Pavlova N., Karamychev, V., Polouchine N., Shakhova, V., Grigoriev, I., Lou, Y., Rohksar, D., Lucas, S., Huang, K., Goodstein, D. M., Hawkins, T., Plengvidhya V., Welker, D., Hughes, J., Goh, Y., Benson, A., Baldwin, K., Lee, J.-H., Díaz-Muñiz, I., Dosti, B., Smeianov, V., Wechter, W., Barabote, R., Lorca, G., Altermann, E., Barrangou, R., Ganesan, B., Xie, Y., Rawsthorne, H., Tamir, D., Parker, C., Breidt, F., Broadbent, J., Hutkins, R., O'Sullivan, D., Steele, J., Unlu, G., Saier, M., Klaenhammer, T., Richardson, P., Kozyavkin, S., Weimer, B., Mills, D. (2006) Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103:42 str. 15611-15616.

Mayo, B., van Sinderen, D., Ventura, M. (2008). Genome Analysis of Food Grade Lactic Acid-Producing Bacteria: From Basics to Applications. *Current Genomics*, 9:3, str. 169–183.

Nakamura, I. K. (1981) *Lactobacillus amylovorus*, a New Starch-Hydrolyzing Species from Cattle Waste-Corn Fermentations. *Journal of Systematic Bacteriology* 31:1, str. 56 – 63.

Orla-Jensen, S. (1919) The lactic acid bacteria. *Andr*. *Fred*. *Høst* & *Søn*.

Salvetti, E., Torriani, S., Felis, G. E. (2012) The Genus *Lactobacillus*: A Taxonomic update. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 4:4 str. 217 – 226.

Schroeter, J., Klaenhammer, T. (2008) Genomics of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 292:1 str. 1 – 6.

Stevenson, K., McVey, A. F., Ivan, B., Clark, I. B. N., Swain, P. S., Pilizota, T. (2016) General callibration of microbial growth in microplate readers. U: Scientific Reports <https://www.nature.com/articles/srep38828> Pristupljeno 10. kolovoza 2018.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Antonia Palć