
VILNIAUS UNIVERSITETAS
GAMTOS MOKSLŲ FAKULTETAS
AUGALŲ FIZIOLOGIJOS IR MIKROBIOLOGIJOS KATEDRA



Klaidas Varna

**Pienarūgščių bakterijų paieška ir jų identifikavimas migruojančių
didžiųjų ančių (*Anas platyrhynchos*) žarnyne naudojant dalinių
16S rRNR geno sekų analizę ir kultivavimu paremtus metodus**

Magistro darbas

(Mikrobiologija)

Moksliniai vadovai: Hab. dr. Prof. Aniolas Sruoga
dr. Vesta Skrodenytė-Arbačiauskienė

VILNIUS, 2007

TURINYS

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS	4
ĮVADAS	5
TIKSLAS IR UŽDAVINIAI	6
I. Dalis. Literatūros apžvalga	7
1.1 Žmogaus ir gyvūnų mikrobiota bei jos funkcijos	7
1.2 Pieno rūgšties bakterijos (PRB)	9
1.2.1 Pieno rūgšties bakterijų nauda sveikatai – probiotikai	12
1.2.2 Pieno rūgšties bakterijų produkuojami bakteriocinai	15
1.3 Šiltakraujų gyvūnų pieno rūgšties bakterijų mikroflora	16
1.4 Paukščių pieno rūgšties bakterijų mikroflora	18
1.5 Propioninių bakterijų charakteristika	22
1.6 Didžiųjų ančių (<i>Anas platyrhynchos</i>) charakteristika	24
II. Dalis. Medžiagos ir metodai	25
2.1 Mikroorganizmų išskyrimas iš žarnyno	25
2.1.1 Mėginių sėjimas į agarizuotą MRS terpę	26
2.1.2 Mikroorganizmų kultivavimas	27
2.1.3 Kolonijų skaičiavimas	27
2.1.4 Mikroorganizmų grynų kultūrų išskyrimas	27
2.1.5 Mikroorganizmų grynos kultūros švarumo kontrolė	28
2.2 Bakterijų apibūdinimas	29
2.2.1 Kultūriniai požymiai	29
2.2.2 Mikroorganizmų ląstelių morfologiniai požymiai	29
2.2.3 Mikroorganizmų ląstelių fiziologiniai-biocheminiai požymiai	30
2.3 Molekuliniai mikroorganizmų tyrimai	31
2.3.1 DNR išskyrimas	31
2.3.2 Polimerazės grandininė reakcija (PGR)	31
2.3.2.1 PGR komponentai	32
2.3.2.2 DNR amplifikacija	33
2.3.3 DNR elektroforezė agarozės gelyje	34
2.3.4 Amplifikuotų DNR mėginių paruošimas sekvenavimui	34
2.4 Filogenetinė DNR sekų analizė	34

III. Dalis. Rezultatai ir jų aptarimas	36
IŠVADOS	44
PRIEDĖLIAI	45
LITERATŪRA	47
NUORODOS	51
PADĖKA	53
SANTRAUKA	54
SUMMARY	55

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

BLAST – angl. *Basic Local Alignment Search Tool*;

bp – bazių pora;

DGGE - denatūruojančio gradientinio gelio elektroforezė (angl. *denaturing gradient gel electrophoresis*, DGGE);

DNR – deoksiribonukleorūgštis;

dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) – nukleotidai;

EBI – Europos Bioinformatikos Institutas (angl. *European Bioinformatics Institute*, EBI);

EMBL – Europos Molekulinės Biologijos Laboratorija (angl. *European Molecular Biology Laboratory*, EMBL):

EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis;

FISH – fluorescencinė in situ hibridizacija (angl. *fluorescence in situ hybridisation*, FISH);

Gram+ – Gram-teigiamos bakterijos;

JDDB – Japonijos DNR Duomenų Bankas (angl. *DNA Data Bank of Japan*, DDBJ);

K.F.V./g – kolonijas formuojantys vienetai/viename grame (angl. *colony forming units/g*, c.f.u/g);

MRS – *De Man, Rogosa ir Sharpe* mitybinė terpė;

NBIC – Nacionalinis Biotechnologinės Informacijos Centras (angl. *National Center for Biotechnology Information*, NCBI);

PGR – polimerazės grandininė reakcija (angl. *polymerase chain reaction*, PCR);

RL-PGR – realaus laiko PGR (angl. *real time PCR*, RT-PCR);

PLGE – pulsuojančio lauko gelio elektroforezė (angl. *pulse-field gel electrophoresis*, PFGE);

PRB – pieno rūgšties bakterijos (angl. *lactic acid bacteria*, LAB);

rep-PGR – rep-PGR pirštų atspaudai (angl. *rep-PCR fingerprinting*);

RFIP – restrikcijos fragmentų ilgio polimorfizmai (angl. *restriction fragment length polymorphism*, RFLP);

RNR – ribonukleorūgštis; **rRNR** – ribosominė ribonukleorūgštis;

S_{ab} – genetino panašumo koeficientas;

TAE – tris - acetatinis EDTA buferis;

TGGE – temperatūros gradientinio gelio elektroforezė (angl. *temperature gradient gel electrophoresis*, TGGE);

T_m – pradmens lydimosi temperatūra;

Tris – tris(hidroksimetil)aminometanas;

ĮVADAS

Filogenetinio gyvūnų vystymosi procese, jų virškinimo trakte susiformavo specifinė kiekvienai gyvūnų rūšiai mikroekologinė sistema. Ją sudaro skirtingų rūšių bakterijos, pelėsiniai grybai ir mielės. Dėl koevoliucijos virškinamojo trakto mikroflora tapo neatsiejama viso makroorganizmo dalimi, o makroorganizmo ir mikrofloros santykiai paprastai yra simbiotinio pobūdžio (Skrodenytė-Arbačiauskienė, 2000). Rezidentinė mikroflora, tame tarpe ir laktoflora, atlieka svarbiausią vaidmenį formuojant organizmo neimuninį atsparumą (Jankauskienė, 1996).

Žmogaus ir nemažos dalies šiltakraujų gyvūnų virškinimo trakto laktoflora ištyrinėta gana neblogai. Gerai žinoma, kad pieno rūgšties bakterijos turi didelę reikšmę normalioje minėtų gyvūnų virškinimo trakto mikrofloroje, tačiau tik atskiri, paviršutiniški, dažnai prieštaringi darbai liudija apie pieno rūgšties bakterijų egzistavimą paukščių virškinimo trakte. Be to, nėra daug duomenų apie mikroorganizmų egzistavimą paukščių žarnyno sienelėje ir tuo labiau apie pieno rūgšties bakterijas, kurių išskyrimas iš virškinimo trakto ir padermių nustatymas yra gana ilgas ir sudėtingas procesas.

Šio darbo tyrimų objektas yra pavasarį ir vasarą migruojančių didžiųjų ančių (*Anas platyrhynchos*), priklausančių žąsinių (*Anseriformes*) būriui, plonojo žarnyno laktoflora. Tyrimai, atlikti tarpusavyje derinant klasikinius mikroorganizmų kultivavimu paremtus metodus ir šiuolaikinius DNR analizės metodus, padės lengviau identifikuoti migruojančių didžiųjų ančių plonojo žarnyno laktofloros sudėtį, o taip pat suprasti pieno rūgšties bakterijų reikšmę migruojančių vandens paukščių žarnyno sienelėms bei jų turiniui, viso makroorganizmo sveikatos būklei.

Darbas atliktas: Vilniaus Universiteto Ekologijos Institute, Hidrobiontų Ekologijos ir Fiziologijos Laboratorijoje bei Populiacinės Genetikos Laboratorijoje.

TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

Kadangi migruojančių didžiųjų ančių (*Anas platyrhynchos*) virškinimo trakto pieno rūgšties bakterijos nėra žinomos, buvo suformuluotas pagrindinis šio darbo tikslas:

- Įvertinti migruojančių didžiųjų ančių plonojo žarnyno sienelių ir jų turinio pieno rūgšties bakterijų mikrobinę įvairovę (nustatyti pieno rūgšties bakterijų egzistavimą žarnyno mikrofloroje, radus, ištirti plonojo žarnyno sienelių ir jų turinio laktoflorą bei nustatyti kai kurias biologines atskirų padermių savybes).

I. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Žmogaus ir gyvūnų mikrobiota bei jos funkcijos

Kiekviena žmogaus ir kitų gyvūnų kūno vieta turi tam tikrą mikrobiotą, kurių morfologinės fiziologinės, biocheminės ir genetinės savybės padeda jiems gyventi ir daugintis atskirų kūno vietų būdingomis sąlygomis, sugyventi su kitais mikroorganizmais ar slopinti mikroorganizmus konkurentus. Vidaus organai nuolat kontaktuoja su nesterilia aplinka – burnoje, žarnyne, šlapimo, lytiniuose organuose, kvėpavimo takuose ir kitur esančiais mikroorganizmais. Virškinamojo trakto ertmėje esanti mikrobiota yra kiekvieno gyvūno individualus organas – “mikrobinis organas”, toks pat kaip kepenys, širdis ar plaučiai (Pavilonis *ir kt.*, 2005).

Mikrobiotų sudėtis ir mikroorganizmų skaičius įvairiose kūno vietose yra skirtingi, priklauso nuo gyvūnų amžiaus, lyties, mitybos tipo, aplinkos mikrofloros, klimato, vartojamų vaistų ir kt. Mikrofloros savitumas ypač priklauso nuo ekologinės nišos fiziologinių ir ekologinių sąlygų, kurios atskirose kūno vietose yra skirtingos. Daugelis biocenozės mikroorganizmų turi savitų adhezinių, kuriais tvirtinasi prie audinių ląstelių ir čia gali daugintis. Biocenozės mikroorganizmų skaičius taip pat priklauso nuo tarprūšinės konkurencijos dėl maisto medžiagų, mikrobinės kilmės metabolizmo produktų slopinančio poveikio, antibiotikų ir bakteriocinų gamybos (Pavilonis *ir kt.*, 2005).

Mikroorganizmo ir šeimininko santykiai gali būti:

- Mutualizmas – naudingi šeimininkui,
- Komensalizmas – šeimininko atžvilgiu neutralus¹.

Mikrobiota yra skirstoma į normaliąją (autochtoninę) ir tranzitinę (alochtoninę) mikroflorą. Normaliąją mikroflorą sudaro mikroorganizmai, pastoviai gyvenantys odoje, gleivinėje, ertmėse. Tai saprofitiniai ir sąlygiškai patogeniški mikroorganizmai (antriniai patogenai ir oportunistai), kurių funkcijos įvairios ir kurie gali būti naudingi organizmui. Tranzitinė mikroflora nuolat kinta priklausomai nuo aplinkos ir organizmo būklės. Normaliąją mikroflorą sudaro labai didelis mikrobiinių ląstelių skaičius ir jų biomasė. Išmatų masė net iki 20–30% sudaryta iš mikroorganizmų. Normalioji mikroflora prisijungia prie gleivinių, sudarydama mikrokolonijas, kurios kartu su ląstelių mucinu, bakterijų gaminamais egzopolisacharidais sudaro bioplėveles, kurios kaip ekranas uždengia organizmo receptorių patogeniniams mikroorganizmams. Mikrobiotos bioplėvelės vientisumą žaloja instrumentinės bei chirurginės procedūros, cheminės medžiagos, antibiotikai ir kiti vaistai, pramoniniai teršalai, pesticidai, radiacija, stresas. Galimi disbiotiniai agentai yra visi peroraliniai vaistai, veikiantys žarnyno motoriką bei mucino (gleivių) gamybą, antihistamininiai preparatai,

¹ <http://ausis.gf.vu.lt/pub/kb/Bio%20bio/Referatai%202006/Gnotobiologija%20ir%20gnotobiontai%20%5BGU%5D.doc>

sunkiųjų metalų druskos, antiseptikai, nitratai ir nitritai, maisto priedai, dažai. Badavimas, mitybos raciono kaita, hormonų veiklos sutrikimai taip pat turi įtakos mikrobiotos pokyčiams. Dėl minėtų priežasčių bioplėvelė susidaro iš atsitiktinės mikrofloros, atsparios žalingiems veiksniams, bet neatliekančios organizmui naudingų funkcijų (Pavilonis *ir kt.*, 2005).

Virškinimo trakto mikrobiotos sudėčiai turi įtakos šie veiksniai:

- Maisto medžiagos,
- Virškinimo sulčių sekrecija,
- Virškinimas ir rezorbcija,
- Peristaltika ir pH¹.

Svarbiausios žmogaus ir gyvūnų mikrobiotos funkcijos yra (Pavilonis *ir kt.*, 2005):

- Lemia pastovią žarnyno ir kitų kūno ertmių dujų sudėtį,
- Sintetina fermentus, skaidančius organizmo nesuvirškintas maisto medžiagas, taip gaunami produktai, teikiantys energiją žarnyno gleivinės ląstelėms,
- Sintetina B grupės ir K vitaminus,
- Dalyvauja vandens-druskų apykaitoje, aktyvina Ca, Mg, Fe jonų absorbciją,
- Blokuoja organizmo receptorių patogenų adhezijai stiprindama audinių atsparumą kolonizacijai patogeniškais mikroorganizmais,
- Mikrobiota yra gausus mikroorganizmų antigenų šaltinis, kuris aktyvina imuninę sistemą (fagocitozę, komplemento sistemą, limfocitus, normalius antikūnus),
- Dalyvauja tulžies rūgšties, cholesterolio ir kitų makromolekulių recirkuliacijoje,
- Mažina storosios žarnos turinio pH, slopindama pūvimo ir patogeninių bakterijų dauginimąsi,
- Skaido egzogeninės ir endogeninės kilmės nuodingas medžiagas ir metabolitus,
- Sintetina bakteriocinus ir peroksidus, naikinančius patogenines bakterijas,
- Veikiant mikroorganizmams susidarę metabolitai reguliuoja žarnų peristaltiką².

Organizmo, jo mikrobiotos ir aplinkos dinamiškos pusiausvyros būklė, palankiausia organizmo sveikatai, vadinama eubioze. Kokybiniai ir kiekybiniai organizmo normaliosios mikrobiotos pokyčiai, lydimi įvairių patologinių procesų, vadinami disbioze (Pavilonis *ir kt.*, 2005).

¹ <http://ausis.gf.vu.lt/pub/kb/Bio%20bio/Referatai/Zmogaus%20zarnyno%20bakterioflora/Zarnyno%20bakterioflora.doc>

² <http://www.bifoval.lt/files/Press.doc>

1.2 Pieno rūgšties bakterijos (PRB)

Žmogaus ir gyvūnų virškinimo trakto mikrobiotoje yra labai daug skirtingų mikroorganizmų, kurių daugumą (95-99%) priklauso griežtai fakultatyviniams anaerobams. Viena svarbiausių jos sudėtinių dalių yra pieno rūgšties bakterijos (PRB). Jos rastos visame virškinimo trakto plote: nuo burnos ertmės iki tiesiosios žarnos (Jankauskienė, 1996). Bėgalė darbų nagrinėja jų biologines savybes, taip pat plačiai tiriama ir jų biocheminė veikla.

Toks didelis mokslininkų skiriamas dėmesys šiai mikroorganizmų grupei aiškinamas tuo, kad PRB yra labai svarbios įvairiose gyvenimo srityse. Be to pieno rūgšties bakterijų praktinis pritaikymas žinomas nuo senų laikų. Dar XII a. žymus gydytojas Avicena įvairių lygų gydymui naudojo produktus, pagamintus naudojant pieno rūgšties bakterijas. Daugelis tautų nuo seno vartoja pieno rūgšties produktus nudegimams ir žaizdoms gydyti bei skrandžio-žarnyno ligų gydymui ir profilaktikai (Jankauskienė, 1996).

Pieno rūgšties bakterijų sistematika iki galo nėra baigta. Sunkumai atsiranda, nes auginant jau žinomas padermes ant skirtingų terpių ir skirtingomis sąlygomis, nuolat keičiasi daugelis jų savybių. Pieno rūgšties bakterijoms (PRB) priklauso daug bakterijų rūšių, priskiriamų Firmicutes tipui. Pieno rūgšties bakterijoms priskiriamos gentys pateiktos 1.1. lentelėje¹.

1.1. Lentelė. Pilna pieno rūgšties bakterijų genčių mokslinė klasifikacija¹.

<p>Domenas: Bacteria → Tipas: Firmicutes → Klasė: Bacilli → Būrys: Lactobacillales → Šeima: Carnobacteriaceae → Gentis: Carnobacterium; Lactosphaera → Šeima: Enterococcaceae → Gentis: Enterococcus; Melissococcus; Tetrigenococcus; Vagococcus → Šeima: Lactobacillaceae → Gentis: Lactobacillus; Pediococcus → Šeima: Leuconostocaceae → Gentis: Leuconostoc; Oenococcus; Weissella → Šeima: Streptococcaceae → Gentis: Lactococcus; Streptococcus</p>

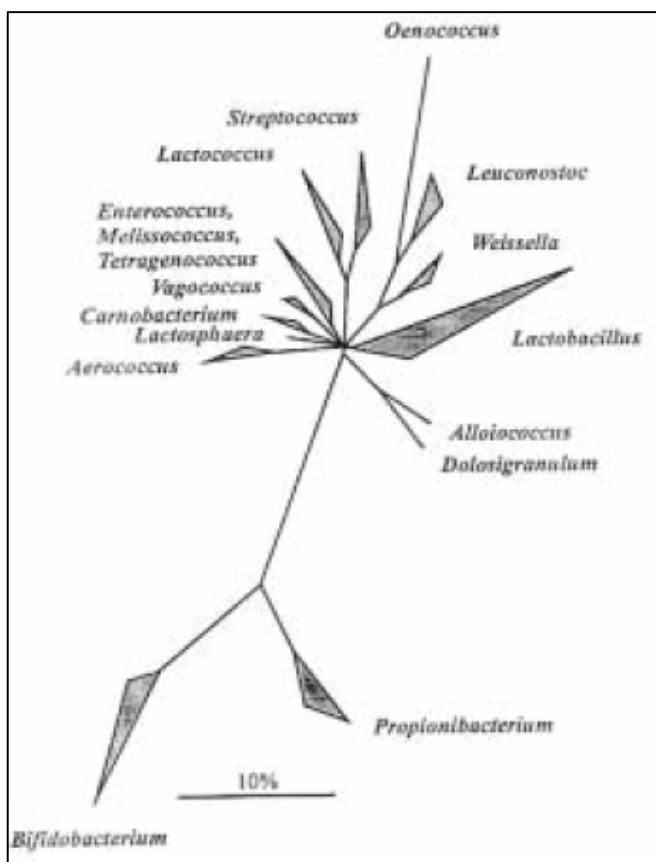
Pagrindinė savybė, kuria remiantis pieno rūgšties bakterijos yra jungiamos į atskirą, plačią mikroorganizmų grupę yra jų gebėjimas kaip pagrindinį fermentacijos produktą gaminti pieno rūgštį². Pieno rūgštį produkuoja visos Gram-teigiamos bakterijos, išskyrus kelis Actinobacteria tipo atstovus: *Aerococcus*, *Microbacterium*, *Propionibacterium* ir *Bifidobacterium*. Priklausomai nuo organizmo, metaboliniai keliai skiriasi kai gliukozė yra pagrindinis anglies (C) šaltinis: homofermentinės bakterijos (*Lactobacillus*, *Streptococcus*) pagamina du laktatus iš vienos gliukozės molekulės (iki 90% pieno rūgšties), tuo tarpu heterofermentinės (*Leuconostoc* ir *Weissella*) transformuoja gliukozės molekulę į laktatą, etanolį ir anglies dioksidą (CO₂) (iki 50% pieno rūgšties) (Beasley, 2004).

¹ <http://species.wikimedia.org/wiki/Lactobacillales>

² <http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/maa/skemi/vk/beasley/isolatio.pdf>

Dauguma iki šiol sukaupytų duomenų apie gyvūnų mikroflorą, buvo gauti naudojant įvairius klasikinius iš virškinamojo trakto išskirtų mikroorganizmų kultivavimo bei analizės metodus: selektyvūs arba neselektyvūs, priklausomi arba nepriklausomi. Tiriant sudėtingas ir be galo skirtingas mikroorganizmų bendruomenes jų natūraliuose ekosistemose, paaiškėjo, kad klasikiniai kultivavimo metodai turi daug trūkumų. Nepaisant trūkumų, klasikiniai metodai yra nepakeičiami nustatinėjant mikroorganizmų morfologinius, fiziologinius ir biocheminius požymius bei tiriant metabolines savybes¹ (O'Sullivan, 2000).

Šiuo metu PRB klasifikacija paremta 16S ribosominės RNR (rRNR) geno sekų analize (1.1.



1.1. Pav. Filogenetinis medis sukonstruotas remiantis palyginamąja 16S rRNA genų analize, vaizduoja pagrindines PRB filogenetines grupes su mažu DNR G+C (%) porų skaičiumi ir nesusijusias taip pat gram+ *Actinobacteria* gentis: *Bifidobacterium*, *Aerococcus* ir *Propionibacterium* (Beasley, 2004).

hibridizacija (FISH) (angl. *fluorescence in situ hybridisation*, FISH) ir realaus laiko PGR (RL-PGR) (angl. *real time PCR*, RT-PCR) (Malinen, 2002). Tačiau kompleksinių ekosistemų tyrimams, būtina derinti ir kultivavimo ir molekulinis metodus.

Pav.). Atskirų padermių charakteristikai ir nustatymui labai svarbūs ir kiti molekuliniai metodai, ypač polimerazės grandininė reakcija (PGR) (angl. *polymerase chain reaction*, PCR) paremti metodai, tokie kaip rep-PGR pirštų atspaudai (angl. *rep-PCR fingerprinting*), restrikcijos fragmentų ilgio polimorfizmai (RFIP) (angl. *restriction fragment length polymorphism*, RFLP), pulsuojančio lauko gelio elektroforezė (PLGE) (angl. *pulse-field gel electrophoresis*, PFGE), denatūruojančio gradientinio gelio elektroforezė (DGGE) (angl. *denaturing gradient gel electrophoresis*, DGGE) ir temperatūros gradientinio gelio elektroforezė (TGGE) (angl. *temperature gradient gel electrophoresis*, TGGE) (Beasley, 2004).

Rečiau naudojami, tačiau nemažiau svarbūs metodai, naudojami atskirų padermių charakteristikai, yra: fluorescencinė in situ

¹ <http://www.open-access-biology.com/probiotics/osullivan/osullivan.html>

Vystantis mokslui, skirtingos kilmės PRB yra nagrinėjamos vis nuodugniau ir įvairiapusiškiau. Nagrinėjama ląstelių morfologija, taip pat jos yra vienas iš genų inžinerijos objektų. Tiriamos laktobacilų teicho rūgštys, kurios su peptidogliukanais turi poveikį organizmo imuninei sistemai. Pieno rūgšties bakterijos yra ir genetinių tyrimų objektas (Jankauskienė, 1996).

Pirmą kartą PRB buvo išskirtos iš pieno ir nuo tada buvo rastos daugybėje fermentuotų maisto produktų: pieno produktuose, mėsoje, daržovėse, gėrimuose ir duonoje. PRB randamos ir natūraliai fermentuotame maiste, jų aptikta ir druskoje, vandenyje, mėšle, nuotekose ir gyvūnuose. Be to keletas PRB yra burnos mikrofloros dalis ir gali būti dantų karieso atsiradimo priežastimi. PRB bakterijos gali sugadinti tokius maisto produktus kaip mėsa, žuvis ar gėrimai. Jos gali būti naudojamos kaip skoninės ir tekstūrinės medžiagos ir konservantai¹. Dalis pieno rūgšties bakterijų (pvz.: *Lactobacillus lactis* ir *Streptococcus thermophilus*) inhibuoja maisto gedimą ir patogenines bakterijas bei ilgiau išsaugo žalių maisto produktų kokybę. Pastaruoju metu konservavimo savybėmis pasižyminčių PRB metabolitų naudojimas pakuojant maisto produktus yra plačiai diskutuojamas. PRB labai svarbios ir apdorojant gyvūnų pašarus. Antimikrobinis efektas labiausiai priklauso nuo pieno ir organinių rūgščių produkcijos, kuri sukelia vidinės terpės pH sumažėjimą. Žemas pH ir rūgštys padidina lipidų tirpumą ir difuziją per ląstelių membraną į citoplazmą. Dar PRB produkuoja acetaldehidą, vandenilio peroksidą (H₂O₂), diacetilą, CO₂, polisacharidus ir bakteriocinus, iš kurių dalis gali veikti antimikrobiškai. (Beasley, 2004).

Pagal lokalizaciją PRB mikroflora skirstoma į sienelės ir turinio. Pagal prisitvirtinimą jos skirstomos į normaliąją ir tranzitinę mikroflorą. Sienelės mikroflora išsidėsčiusi greta epitelinių gleivinės ląstelių arba yra glaudžiai asocijuota tiesiogiai su gleivinės epitelinėmis ląstelėmis. Ji daugiausiai formuojasi iš mikroorganizmų, kurie įeina į sienelės sudėtį ir patenkančių į organus iš išorinės terpės arba kitų organų (Beasley, 2004).

Sienelės mikroflorą daugiausiai sudaro normalioji mikroflora, o turinyje yra ir normaliosios ir tranzitinės mikrofloros. Viena svarbiausių sienelės mikrofloros dalių yra *Lactobacillus*. Ši sienelės mikrofloros dalis svarbi tuo, kad lemia organizmo apsaugines funkcijas (formuoja ekologinį barjerą, kuris ir yra vienas iš rezidentiškumo faktorių) (Jankauskienė, 1996).

Nustatyta, kad žmogaus fekalijose labiausiai paplitusios *Lactobacillus lactis* pieno rūgšties bakterijos. Sveiko žmogaus laktoflorą sudaro įvairių rūšių homo ir heterofermentinės laktobacilos, tačiau dažniausiai sutinkamos 6 rūšių: *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. brevis* ir *L. salivarius*, kurios sudaro visus įmanomus junginius (Jankauskienė, 1996).

¹ <http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/maa/skemi/vk/beasley/isolatio.pdf>

1.2.1 Pieno rūgšties bakterijų nauda sveikatai - probiotikai

PRB yra laikomos natūralia žmogaus ir gyvūnų mikrobiotos dalimi (Jankauskienė, 1996). Pirmosiomis gyvenimo valandomis žmogaus ir gyvūnų žarnyne nėra jokios mikrobiotos. Naujagimiai pirmiausia savo mikrobiotą gauna gimstant ir tik vėliau iš aplinkos. Praėjus 12-16 h po gimimo žarnynas jau nebėra sterilus. Iš pradžių naujagimių mikrobiotoje dominuoja PRB ir bifidobakterijos, ypač kai maitinama natūraliu motinos pienu, kuris ir lemia gerą naujagimių sveikatos būklę (Jankauskienė, 1996). Organizmui augant ir vystantis keičiasi jų rūšinė sudėtis, nors suaugusių gyvūnų mikrobiotos rūšinė sudėtis yra pakankamai stabili ir pasižymi individualiomis savybėmis. Žarnyno bakterijos artimai sąveikauja su savo šeimininku, taip atsiranda sąveika tarp bakterijų ir šeimininko epitelinių ląstelių (Mėgelaitis, 2005).

PRB yra pagrindinė probiotinių bakterijų grupė. Salminen *et al.* (1999) pasiūlė, kad probiotikai yra mikrobinių ląstelių preparatai arba mikrobinių ląstelių komponentai, kurie turi gydomąjį poveikį šeimininko organizmui.

Manoma, kad probiotikai saugo nuo (Pavilonis *ir kt.*, 2005):

- Bakterijų ir virusų sukkelto viduriavimo, nes yra infekcijų sukėlėjų antagonistai,
- Stiprina imunitetą, aktyvindami antikūnų gamybą ir ląstelinį imuninį atsaką,
- Slopina organizmo alergines reakcijas maistui, mažina žarnų pralaidumą alergenams,
- Gerina maisto virškinimą ir jo įsisavinimą, skaido laktozę, kai ji netoleruojama,
- Mažina pilvo pūtimą,
- Skaido kancerogenines medžiagas, saugodami organizmą nuo vėžio.

Gydančiais yra laikomi tik keletas laktobacilų, laktokokų ir bifidobakterijų padermių, be to per mažai yra žinoma apie žarnyno mikrobiotos mechanizmus. PRB sudaro būtiną sveikos virškinimo trakto mikroekologijos dalį ir yra susijusios su šeimininko metabolizmu. PRB fermentuoja įvairius substratus, tokius kaip laktozę, įvairius aminos ir trumpos grandinės sočiąsias rūgštis, kitas organines rūgštis ir dujas. Taip pat sintetina fermentus, vitaminus, antioksidantus ir bakteriocinus. Dėl šių savybių PRB sudaro labai svarbų mechanizmą, kuris metabolizuoja ir detoksikuoja į organizmą patekusias svetimias medžiagas (Pavilonis *ir kt.*, 2005).

Ekspirimentai rodo, kad PRB poveikis imuninei sistemai. Pieno rūgšties bakterijos reguliuoja žarnyno sutrikimus, išskiria į serumą antikūnus IgG, sekretorinius IgA ir IgM, sąlygoja adjuvantinį efektą, stimuliuoja monocitų migraciją, aktyvuoja jų fagocitinį ir fermentacinį aktyvumą, taip sustiprindamos imuninį atsaką. Pieno rūgšties bakterijų poveikį imuninei sistemai pirmiausia reikėtų susieti su jų ląstelių sienelių peptidogliukanais ir teicho rūgštimis. Minėtos aktyviosios medžiagos yra polikloniniai induktoriai ir imunomodulatoriai (Jankauskienė, 1996).

Nustatyta, kad *Lactobacillus bulgaricus* ląstelių sienelių priešvėžinis preparatas blastolizinas, gali nespecifiškai stimuliuoti imunogenezę, taip pat įtakoja lizocimo kiekį kraujo serume. Yra žinoma ir apie priešvėžinį polisacharidą, kurį produkuoja *L. helveticus* porūš. *jogurti*. Minėtasis polisacharidas tiesiogiai veikia navikines ląsteles ir beveik neveikia sveikų šeimininko organizmo ląstelių. Eksperimentuose su gyvūnais nustatyta, kad *L. rhamnosus* GG, *B. lactis* Bb12 ir inulino mišinys slopina žiurkių storosios žarnos vėžines ląsteles ir stiprina gleivinės imunitetą. Tačiau išsamių mokslinių tyrimų apie probiotikų antikancerogeninį poveikį, ypač žmogaus organizme, dar nėra (Jankauskienė, 1996).

Yra publikacijų apie probiotikų naudingumą *Helicobacter pylori* sukeltų infekcijų gydymui ir prevencijai. *H. pylori* sukelia B tipo gastritą ir peptines opas ir yra rizikos veiksnys skrandžio vėžiui atsirasti. Tyrimuose *in vitro* ir su gyvulėliais nustatyta, kad laktobakterijos slopina *H. pylori* augimą ir jos ureazinį aktyvumą, kurio jai reikia išgyventi rūgščioje skrandžio terpėje. Kiti tyrimai rodo, kad probiotikai žmogaus organizme slopina *H. pylori* infekciją ir mažina recidyvų riziką.. Eksperimentai su pelėmis-gnotobiontais parodė, kad *Lactobacillus salivarius* (*L. salivarius*) saugo skrandį nuo *H. pylori* infekcijos ir ją slopina. Tyrimais nustatyta, kad probiotikai yra labai efektyvūs esant laktozės netoleravimu (Pavilonis *ir kt.*, 2005).

Atlikta nemažai tyrimų, gydant probiotikais įvairias žarnyno infekcijas (pvz.: diareja). Yra duomenų apie probiotikų gebėjimą slopinti žarnyno infekcijų sukėlėjų daugimimąsi ir jų adheziją. Eksperimentuose su gyvulėliais nustatyta, kad *Lactobacillus rhamnosus* GR-1, *Lactobacillus fermentum* RC-14 ir *L. rhamnosus* GG didina sekretinio IgA prieš salmonelės gamybą, aktyvina fagocitus ir mažina kepenų ir kitų organų kolonizavimą (Mėgelaitis, 2005).

Morishita *et al.* (1971) nustatė, kad žarnyno PRB „steriliuose“ viščiukuose atsiranda žymiai greičiau ir daugiau nei kitų ne žarnyno PRB padermių. Yra keletas mechanizmų, kurie neleidžia augant žalingoms bakterijoms prisitvirtinti prie žarnyno epitelio, pvz.: antimikrobinių agentų, tokių kaip bakteriocinai, organinės rūgštys gamyba ir sekrecija, konkurencija dėl adhezijos vietų, sterilios kliūtys ir barjerai, konkuruojantis su patogenais ir taip prisidedantis eliminuojant patogenus.

PRB apsauginė funkcija labai priklauso nuo jų kolonizavimosi galimybių. Mechanizmas, kuris dalyvauja formuojantis ir palaikant sienelės mikrofloros pastovumą yra vadinamas adhezija. Būtent ši PRB funkcija ir yra ta, dėl kurios jos gali įeiti į sienelės mikroflorą bei tapti ekologinio barjero dalimi, apsaugančio makroorganizmo ląsteles nuo patogeninių mikrobu prisitvirtinimo prie gleivinės. Žmogaus mikrofloroje stipriausiomis adhezinėmis savybėmis pasižymi šios rūšys: *L. salivarius*, *L. casei* ir *L. plantarum*. *L. acidophilus*, *L. fermentum* ir *L. brevis* paprastai pasižymi silpnomis adhezinėmis savybėmis arba visai praradę šią savybę. Be to padermės su gerai

išreikštomis adhezinėmis savybėmis turi žymiai didesnes antagonistines savybes. Tirinėtojus nuo seno domina antagonistinis pieno rūgšties lazdelių aktyvumas, nes laktobacilose šis aktyvumas gerai pasireiškia *in vitro* (Jankauskienė, 1996). Dauguma mokslininkų mano, kad laktobacilų inhibitorinės savybės pirmiausia yra susijusios su jų produkuojama pieno rūgštimi ir tik po to su antibiotinėmis medžiagomis. Nustatyti laktobacilų bakteriocinai – lektocinai, kurie yra susiję su nagrinėjamų mikroorganizmų kolonizavimosi galimybėmis.

Ne mažiau svarbią reikšmę užtikrinant apsauginį PRB vaidmenį turi ir jų jautrumas kai kuriems makroorganizmo fermentams, tokiems kaip lizocimas. Daugeliu tyrimų įrodyta, kad iš žmogaus mikrofloros laktobacilų tik *L. fermentum* gali produkuoti lizocimą. O juk lizocimas priklauso faktoriams, kurie turi nemažą įtaką apsaugant žmogaus mechanizmus nuo infekcinių agentų. Pavyzdžiui, sekretoriniai antikūnai suriša komplementą ir tampa bakteriocidiniais tik dalyvaujant lizocimui. Be to lizocimas dalyvauja mikrofloros reguliacijoje (Jankauskienė, 1996). Dauguma žmogaus mikrofloroje paplitusių rūšių yra stabilios lizocimui, o rečiau sutinkamos rūšys, tokios kaip *L. leichmanii*, *L. helveticus*, *L. bulgaricus* ir *Lactococcus lactis* – lizocimui jautrios.

Boris *et al.* (1998) nustatė, kad keletas PRB bakterijų egzistuoja ir makštyje, be to, priklausomai nuo padermės, kaip visuma epitelio paviršiuje jos pajėgios apdoroti baltymus ir lipoproteinus. Padermės prikibusios prie makšties epitelinių ląstelių susiduria su kitomis bakterijomis ir koagreguoja *in vitro* su žinomais patogenais. Dėl agregacijų ir adhezijų, palankiai veikiančių makšties epitelį, netrukdomai formuojasi bioplėvelė, prisidedanti prie patogenų šalinimo iš makšties gleivinės. Ouwekand *et al.* (2003) nustatė, kad *L. rhamnosus* GG ir *L. reuteri* ING1 padermėms būdinga specifinė adhezija prie žarnyno audinių. Be to pranešime buvo paskelbta, kad keletas probiotinių bakterijų produkavo bakteriocinus, veikiančius patogenines bakterijas *in vitro*, pvz.: reutericiklinas, produkuojamas *L. reuteri* LTIH2584.

Tačiau probiotikų idėjos pagrįstumas vis dar yra abejotinas. Taip yra todėl, kad nėra pakankamai patikimos informacijos, pagal kurią gydytojai ir vartotojai galėtų įvertinti pardavinėjamų probiotikų efektyvumą ir saugumą. Probiotinių produktų efektyvumo skalė gali būti žymiai mažesnė nei teigia farmacijos pramonė. Be to sunkumai išskylantis darant eksperimentus *in vivo* dar kartą patvirtina ne tokį jau ir didelį teigiamą probiotikų efektą. Dar labai daug turi būti nuveikta norint suprasti visą probiotikų poveikį, atsižvelgiant į žmogaus ir kitų gyvūnų bei su jais sąveikaujančių biologinių sistemų nepaprastą sudėtingumą (Beasley, 2004).

1.2.2 Pieno rūgšties bakterijų produkuojami bakteriocinai

Keletas PRB padermių sintetina antimikrobinius peptidus arba bakteriocinus, inhibuojačius kitas Gram-teigiamas bakterijas (O'Sullivan *et al.*, 2002). Net jeigu antimikrobiniai peptidai ir pasižymi antibiotinėmis savybėmis, bakteriocinai, produkuojami PRB, turi patekti ant kitų Gram-teigiamų bakterijų membranų, prasikverbti pro jas ir indukuoti Gram-teigiamų bakterijų inaktyvaciją kartu su kitais antimikrobinį poveikį sustiprinančiais aplinkos faktoriais, tokiais kaip žema temperatūra, organinės rūgštys ir detergentai.

PRB produkuojami bakteriocinai yra klasifikuojami į tris pagrindines grupes: lantabiotikai (I klasė), nelantabiotikai, maži karščiui stabilūs peptidai (II klasė) ir dideli karščiui labilūs baltymai (III klasė) (O'Sullivan *et al.*, 2002). Lantabiotikai yra labiausiai ištirti ir dažnai naudojami pramonėje. Lantabiotikas nisininas natūraliai produkuojamas *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* pramonėje naudojamas kaip maisto priedas E234. Nisino variantai A ir Z skiriasi tik viena amino rūgštimi. Abu šie variantai yra įstatymais patvirtinti ir leistini naudoti kaip maisto medžiagos tiek JAV tiek ir Europos Sąjungoje. Neseniai buvo rasta nauja nisino forma Q, besiskirianti keturiomis amino rūgštimis (Beasley, 1996). Nisinas Q buvo išskirtas iš *L. lactis* padermių rastų upės vandenyje Japonijoje. Visos nisino formos yra antimikrobiškai aktyvios prieš Gram-teigiamas bakterijas, tokias kaip PRB, *Listeria* sp., *Micrococcus* sp., ir sporas formuojančias bakterijas, tokias kaip *Bacillus* sp. ir *Clostridium* sp. Nisino inhibicinis poveikis pasireiškia veikiant keletą ląstelių augimo fazių. Nisinas kaupiasi ląstelių membranose ir įsiterpia į jas. Susijungus su membrana įgauna vandens prisipildžiusių porų formą. Kitas modelis rodo, kad nisino molekulės prisiriša prie anijoninės membranos paviršiaus pagal elektrostatines sąveikas. Susidaro nuo įtampos priklausančios poros. Nisinas gali inhibuoti peptidogliukano biosintezę sąveikaujant su ląstelės sienelės pirmtakais, lipidu I ir lipidu II. Breunkink *et al.* (2003) padarė išvadą, kad nisino-lipido II sąveika stabilizuoja porų kompleksą. Elektrinis transmembraninis potencialas yra stipriai sumažėjęs esant nisinui ir lipidui II. Be to nisinas neveikia endosporų.

PRB galinčios sekretuoti antimikrobinius peptidus yra naudojamos kaip maisto konservantai ir kaip žmonėms ir gyvūnams sveikatą gerinančios medžiagos. Nisinas naudojamas kaip maisto konservantas prailgina produktų galiojimo laiką (O'Sullivan *et al.*, 2002). PRB turinčiuose natūraliuose maisto produktuose, bakteriocinai gaminami ten pat. Sumažėjus jų kiekiui, atsargos tuojau pat padidinamos. Bakterijos turi savisaugos mechanizmus apribojančius bakteriocinų gamybą. Didžiausia bakteriocinų produkcija yra eksponentinės fazės pabaigoje ir ankstyvojoje stacionarios fazės stadijoje. Bakteriocinų kiekis sumažėja vykstant proteolitinei degradacijai. Keletas bakterijų padermių, tokių kaip *Clostridium butulinum* 169B ir *Streptococcus bovis* JB1 yra

atsparios nisinui. Atsparumą sąlygoja fermentinis nisino skaidymas. Breuer and Radler (1996) parodė, kad atsparumo nisinui skirtumai tarp *Lactobacillus casei* padermių yra susiję su ląstelės sienele sujungtais heteropolisacharidais. Tuo tarpu Mantovani and Russell (2001) nustatė, kad atsparios nisinui *S.bovis* JB1 ląstelės turi daugiau lipoteicho rūgščių negu nisinui jautrios ląstelės.

1.3 Šiltakraujų gyvūnų pieno rūgšties bakterijų mikroflora

Nustatyta, kad PRB yra nuolatinės šiltakraujų gyvūnų, žuvų ir paukščių virškinamojo trakto gyventojos bei įeina į jų organizmų normaliosios mikrofloros sudėtį. Be to, žinduolių, žuvų ir paukščių normali žarnyno mikroflora trukdo patogeninių bakterijų patekimui ir dauginimuisi. Šis fenomenas buvo pavadintas „kolonizaciniu pastovumu“. Yra žinoma, kad mikroorganizmų rūšys, kurios persiduoda iš gyvūnų tėvų – yra specifinės. Tuo atveju jeigu dėl kokių nors aplinkybių nutrūksta kontaktai tarp tėvų ir palikuonių, jauniklio virškinimo traktas kolonizuojamas išorinės terpės mikrofloros, kuri dažnai neturi reikiamų teigiamų savybių (Jankauskienė, 1996).

Pieno rūgšties bakterijos ypač svarbią vietą užima tarp skirtingų mikroorganizmų grupių, kurios gyvena atrajojančiuose gyvūnuose. Tokie mikroorganizmai atlieka labai įvairias funkcijas: celiuliozės, krakmolo, cukrų ir pieno rūgšties virškinimas. PRB metabolizmo produktas pieno rūgštis yra svarbus energijos šaltinis kitoms bakterijoms. Be to, prieskrandžio mikroflora po atrajojimo patenka į rūgštinį skrandį ir tampa baltymų šaltinių. PRB rūšinė sudėtis priklauso nuo gyvūnų amžiaus ir mitybos raciono. Atrajotojų jaunikliai gimsta su morfologiškai ir funkciškai silpnai išsivysčiusiu virškinimo traktu, pašarus jie virškina panašiai kaip gyvūnai su vienkameriniu skrandžiu. Naujagimių atrajotojų didysis prieskrandis, tinklainis ir knygenos per pusę mažesni negu šliužas. Pirmaisiais gyvenimo mėnesiais minėtieji skrandžio skyriai auga greitai. Trijų mėnesių prieauglio jie yra keturis kartus didesni už šliužą. Toks santykis būna ir suaugusių gyvulių. Tik šešių mėnesių prieauglio prieskrandžiai jau būna visiškai išsivystę. Tada ir susiformuoja suaugusiems gyvuliams būdingas virškinimo traktas ir jo mikroflora¹ (Oberauskas *et al.*, 2004; Šimkus, 2004a). Pirmaisiais gyvenimo mėnesiais atrajojančių gyvūnų prieskrandyje dominuoja kokinės PRB formos: *Streptococcus lactis*, *S. faecalis*, *S. faecium*, *S. bovis*. Pirmojo mėnesio pabaigoje prieskrandyje atsiranda lazdelės formos PRB, kurių skaičius augant gyvūnui didėja. Skrandyje buvo aptikta: *L. plantarum*, *L. casei* subsp. *rhamnosus*, *L. casei* subsp. *casei*, *L. fermentum*, *L. buchneri*, *L. brevis*, *L. acidophilus*, *L. cellobiosus* ir *L. casei* subsp. *alactosus* (Jankauskienė, 1996).

Atsižvelgiant į atrajotųjų naujagimių (veršelių) fiziologinius ypatumus, siekiama, kad mikroorganizmai kuo greičiau patektų į didįjį prieskrandį ir visi prieskrandžiai pradėtų virškinti

¹ http://www.lva.lt/vetzoo/old/Nr_25/pdf/oberlauskas.pdf

maisto medžiagas. Šiam tikslui pasiekti galima panaudoti bakterinius preparatus – probiotikus. Probiotikai ne tik skatina maisto medžiagų pasisavinimą ir natūralų rezistentiškumą, bet ir mažina patirtų stresų padarinius (dažniausiai dėl stresų veršeliai suserga virškinimo trakto ligomis). Intensyvus veršelių auginimas sukelia žarnyno mikrofloros disbalansą, nes skrandyje nesivysto tinkama mikroflora, kurios natūraliomis sąlygomis auginami gyvuliai gauna su motinos pienu¹ (Šimkus, 2004a). Dėl įvairių priežasčių pasikeitus plonojo žarnyno sudėčiai, pradeda daugintis žarnyno lazdelės, kurios užima PRB bakterijų vietą. Patogeninių bakterijų sukelta infekcija pažeidžia gleivinę, sumažėja jos apsauginės savybės ir diarėja įgyja kolibakteriozės požymių. Gydymas antibiotikais ne visada veiksmingas, o probiotinės medžiagos gali normalizuoti žarnyno mikroflorą, pagerinti apsaugines gleivinės savybes. Probiotikai pagerina virškinimo trakto mikrobinį balansą (Oberauskas *et al.*, 2004; Šimkus, 2004a).

PRB buvo išskirtos ir iš kiaulių virškinimo trakto. Dažniausiai pasitaikė laktobacilos: *L. delbruckii*, *L. acidophilus* ir *L. fermentum*, taip pat identifikuotos ir kitos anaerobinės bakterijos: streptokokai, eubakterijos, klostridijos ir *Propionibacterium acnes* (Jankauskienė, 1996). Iš 22 ištirtų laktobacilų padermių, 13 pasižymėjo adhezinėmis savybėmis. Adhezijos laipsnis varijavo net tarp tos pačios rūšies skirtingų padermių. Tyrimais su kiaulėmis taip pat buvo nustatyta, kad probiotinės bakterijos sumažina diarėjos paplitimą bei didina kūno masės prieaugį (Jankauskienė, 1996). Mikroorganizmų vaidmuo visose kiaulininkystės veiklos srityse yra labai reikšmingas. Remiantis mėsos fizinių cheminių savybių tyrimais, galima teigti, jog probiotiniai preparatai pagerina mėsos kulinarines savybes ir kitus fizinius-cheminius rodiklius (Šimkus, 2004b).

Kartu su kitais organizmais, PRB rasta pelių bei žiurkių epitelyje ir gleivinėje (Jankauskienė, 1996). Pieno rūgšties bakterijos buvo išskirtos ir iš briedžių, arklių, kačių bei triušių. Tiriant 60 triušių žarnyno mikroflorą, nustatyta, kad jų plonajame žarnyne dominuoja PRB (10^9 k.f.v./g), o storajame – bifidobakterijos (10^{10} k.f.v./g) (Jankauskienė, 1996).

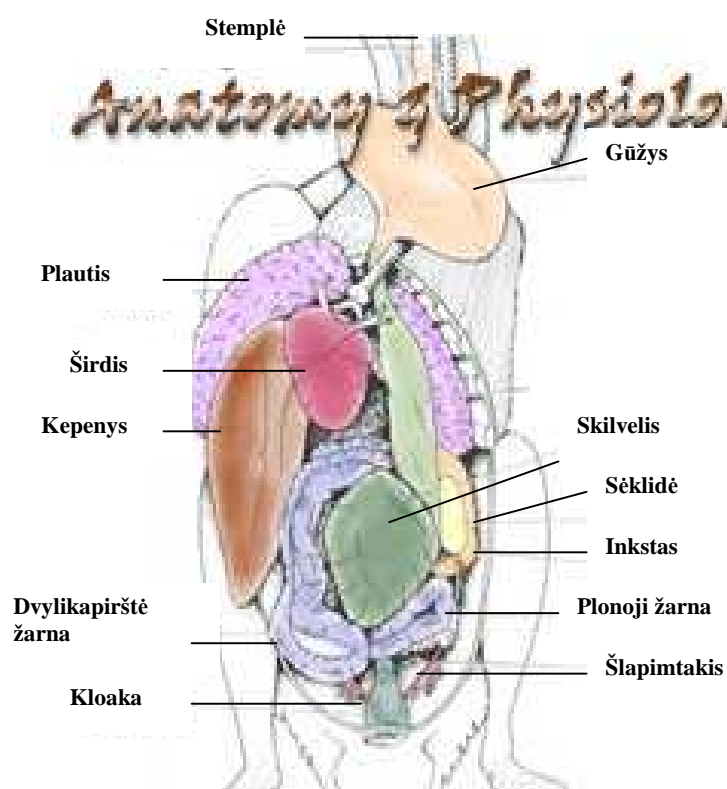
Šunų virškinimo trakte PRB taip pat užima dominuojančią padėtį. Nustatyta, kad PRB ir bifidobakterijų skaičius sergančių šunų išmatų mikrofloroje yra žymiai mažesnis negu sveikų šunų, o kai kuriuose mėginiuose PRB visai nebuvo rasta. Analizuojant trijų skirtingų amžiaus grupių nykštukinių šinšilų mikroflorą, nustatyta, kad kaip ir daugelio kitų homoterminių gyvūnų mikrofloroje, dažniausiai sutinkamos laktobacilos, po to sporinės bakterijos ir stafilokokai. PRB rasta ir marmožečių mikrofloroje. Iš sveikų beždžionių buvo išskirtas didžiulis kiekis laktobacilų ir žymiai mažiau iš sergančių. Jau žinoma gyvūnų mikroflora vis pasipildo naujomis rūšimis (Jankauskienė, 1996).

¹ <http://www.manoukis.lt/index.php?m=1&z=24&s=458>

1.4 Paukščių pieno rūgšties bakterijų mikroflora

Pagrindinis paukščių imuninės sistemos tikslas yra padėti priešintis ligos pradžiai ir žalingam patogenų poveikiui. Paukščių imuninė sistema sudaryta iš limfagyslių ir limfoidinių audinių. Yra du pagrindiniai imuninės sistemos organai, tai: Fabricijaus maišelis (susijęs su B ląstelėmis), dominuojantis pas jaunos paukščius ir išsidėstęs šalia kloakos bei Tymuso liauka (susijusi su T ląstelėmis), išsidėsciusi aplink jungo veną ir aktyviai veikianti visą gyvenimą (1.2. Pav.).

Antriniai limfiniai organai yra blužnis, kaulų čiulpai, limfmazgiai susieti su limfagyslių ir limfinių kapiliarų cirkuliacine sistema, kuri išnešioja limfą po visą kūną (Carpenter, 2004).



1.2. Pav. Paukščių anatinė sandara¹.

Specifinė apsaugos sistema padeda apsaugoti tik nuo tam tikrų svetimkūnių. Kai imuninė sistema pilnai funkcionuoja, ji apsaugo nuo daugumos bakterijų, virusų ir susidėvėjusių ar „sugedusių“ šeiminingo kūno ląstelių. Tai padaroma po visą kūną paskleidžiant daugybę cheminių molekulių ir apsauginių antikūnų molekulių¹.

Plunksnos ir oda sudaro pirminį nespecifinį barjerą, neleidžiantį prasiskverbti žalingiems mikroorganizmams. Kitas be galo svarbus barjeras yra normali mikroflora, randama skrandyje ir visame žarnyne kartu su storu gleivinės sluoksniu. Kai bakterijų populiacija skrandyje ir žarnyne yra

Paukščių imuninė sistema dalijama į specifinį ir nespecifinį (įgimtą ir įgytą) mechanizmus ir turi 3 apsaugos tipus. Nespecifinė apsauga reaguoja tiesiogiai apsaugant paukštį nuo visų svetimų medžiagų. Nespecifinę apsaugą lemia: sveika oda, normali mikroflora, gleivinė, uždegiminis atsakas, baltieji kraujo kūneliai ir didelis skaičius kūno ląstelių produkujamų baltymų. Ši sistema sumažina specifinės sistemos apkrovą taip užkirsdama kelią mikroorganizmų patekimui ir pasklidimui po paukščio kūną (Carpenter, 2004).

¹ <http://www.holisticbirds.com/hbn04/spring04/immunesystem.htm>

pakankamai tanki ir stabili, gleivės padeda užkirsti kelią svetimiems mikroorganizmams, tokiems kaip bakterijos, grybai ir mielės (Barras, 2000). Be to, kvėpavimo trakte yra blakstienėlės, kurios padeda išvalyti patekusias bakterijas ir gražinti jas atgal į išorę. Kai prasiskverbiamą pirmą apsaugos barjerą, nuo svetimkūnių stengiasi apginti antrasis barjeras. Antrasis apsaugos barjeras paremtas įvairių antikūnų ląstelių (fagocitai: makrofagai, monocitai ir neutrofilai) ir cheminių molekulių, cirkuliuojančių kraujyje ir visuose organuose, gamyba (Carpenter, 2004).

Paukščius nuo įvairių patogenų saugo ir aukšta jų kūno temperatūra. Todėl paukščiams nepavojingos galvijų ligos. Jei kūno temperatūra staiga nukrenta, ligos gali pasireikšti (Butcher and Richard, 2003).

Kaip jau buvo minėta normali paukščių mikroflora sudaro labai svarbų nespecifinį apsaugos barjerą prieš neigiamą patogenų poveikį. Mikrobiologiniu požiūriu paukščių žarnyną galima suskirstyti į tris skyrius: 1) dvylikapirštė žarna ir plonoji žarna, kuriose bakterijų skaičius santykinai yra mažas ir nesiekia daugiau nei 10^8 k.f.v./g; 2) akloji žarna, kurioje pastebimas didelis mikrobinis aktyvumas, iki 10^{11} k.f.v./g (šlapio svorio); ir 3) storoji žarna, kuri pas daugelį paukščių yra palyginti trumpa bei atsiveria į kloaką, kuri baigiasi išeinamąja anga¹² (Barnes *et al.*, 1972).

Maisto ir vandens trūkumas, migracija, infekcinės ligos, neteisingas antibiotikų naudojimas, radiacija, įvairūs stresai (inkubavimas, per didelė temperatūra ir kt.) ir su amžiumi silpnėjantis organizmas pakenkia kūno dangalų vientisumui bei mikrofloros balansui ir leidžia patogeniniams mikroorganizmams patekti į paukščio kūną³ (Butcher and Richard, 2003; Barras, 2000).

Dažniausiai paukščius užkrečiantys patogeniniai mikroorganizmai pateikti 1.2. lentelėje⁴:

Atlikta daug tyrimų siekiant nustatyti įvairių paukščių rūšių normalios žarnyno mikrofloros sudėtį, jos įtaką paukščių sveikatos būklei. Jau senai žinoma, kad normalios paukščių virškinimo trakto mikrofloros sudėtyje yra ir pieno rūgšties bakterijų.

Įrodyta, kad PRB egzistuoja pramoniniu būdu auginamų viščių virškinimo trakte. Steriliame viščių žarnyne mikroorganizmai atsiranda jau pirmomis gyvenimo paromis (po 2-3 parų), o dominuoja kokinės PRB formos (vyrauja streptokokai ir enterokokai), enterobakterijos (iki 10^8 k.f.v./g) bei *Clostridium* sp. (dažniausiai *C. perfringens*), kartais išskiriama ir *Bacillus coagulans*. Pirmiasia kolonizuojama viščių akloji žarna (dominuoja *Clostridium paraputrificum* iki 10^8 k.f.v./g) ir tik vėliau likusi žarnyno dalis. Nuo 4-8 paros žarnyne pradeda daugėti laktobacilų (iki 10^9 k.f.v./g), o streptokokų, enterobakterijų ir klostridijų dalis visose žarnyno dalyse ima pastebimai mažėti (Barnes *et al.*, 1972).

¹ <http://www.ajcn.org>

² <http://www.cagenbird.com/probiotics.htm>

³ <http://edis.ifas.ufl.edu/VM016>

⁴ <http://www.micdev.com/pdfs/FlightPath%20Factsheet.pdf>

Dažniausiai pasitaikančios laktobacilų rūšys viščių žarnyne yra *Lactobacillus acidophilus*, *L. salivarius*, *L. crispatus* ir *L. fermentum*, rečiau *L. ruminis*, *L. vitulinus*, *L. delbruckii* ir *L. viridescens*¹ (Paco *et al.*, 2003). Tipiniu atveju viščių dvylikapirštės ir plonosios žarnos mikroflora visiškai susiformuoja jau antrąją savaitę po išsiperėjimo, tuo tarpu aklojoje žarnoje šis procesas gali užsitęsti net iki 6 savaičių²³ (Clench and Mathias, 1995; Lee *et al.*, 2002).

Maisto trūkumas kaip ir amžius gali lemti normalios žarnyno mikrofloros sudėtį. Tokiu atveju žarnyne atsiranda nenormaliai daug *coli-aerogenes*, *Clostridium perfringens* ar enterobakterijų, o PRB labai sumažėja. Dėl to gali atsirasti nekrotinis plonosios žarnos uždegimas, kuris baigiasi greita paukščių mirtimi. Panašų efektą gali sukelti ir netinkamas antibiotikų naudojimas bei stresas migracijos metu (Barnes *et al.*, 1972).

1.2. Lentelė. Dažniausiai paukščius užkrečiantys patogeniniai mikroorganizmai⁴.

Bakterijos:	Virusai:
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Campylobacter</i> spp. ir <i>Chlamydia</i> spp., • <i>Clostridium botulinum</i>, • <i>Clostridium colinum</i>, • <i>Clostridium difficile</i>, • <i>Clostridium perfringens</i> A ir C, • <i>Escherichia coli</i> serovarai O1:K1, O2, • <i>Escherichia coli</i> O157, • <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>, • <i>Haemophilus</i> spp. ir <i>Listeria</i> spp., • <i>Mycobacterium</i> spp., • <i>Mycoplasma gallisepticum</i>, • <i>Mycoplasma synoviae</i>, • <i>Ornithobacterium rhinotracheale</i>, • <i>Pasteurella</i> spp., • <i>Salmonella</i> spp. ir <i>Shigella</i> spp., • <i>Staphylococcus aureus</i>, • <i>Vibrio cholerae</i> ir <i>Yersinia</i> spp. 	<ul style="list-style-type: none"> • Paukščių adenovirusai, • Paukščių encefalito virusas, • Paukščių bronchito virusas, • Paukščių infekcinė bursos liga, • Paukščių gripo virusas: tipas A, • Paukščių limfoidinis leukozės (A ir B), • Paukščių nefrito virusas, • Paukščių reovirusas, • Paukščių retikuloendoteliozė, • Vištų anemija, • Vištų dėdeklių sindromo virusas 76, • Naminių paukščių Poks virusas, • Paukščių laringotracheitis virusas, • Marek's ligos virusas, • Niukaslio ligos virusas, • Rhinotracheitis virusas.

Nustatytas idomus faktas, kad PRB išskirtos iš vištų mikrofloros, turi savybę prisitvirtinti prie viščių gurklio epitelinių ląstelių. Kitų rūšių bakterijos šios savybės neturi. Manoma, kad gurklis labai svarbus reguliuojant viščių virškinimo trakto mikroflorą (Jankauskienė, 1996).

¹ <http://www.scielo.br/pdf/bjm/v34n3/v34n3a10.pdf>

² <http://elibrary.unm.edu/sora/Wilson/v107n01/p0093-p0121.pdf>

³ <http://www.poultry-health.com/fora/inthealth/pdfs/lee02.pdf>

⁴ <http://www.micdev.com/pdfs/FlightPath%20Factsheet.pdf>

Ištirus sveikų kalakutų mikrofloros sudėtį, nustatyta, kad juose dominuoja *L. acidophilus*. Skirtingos PRB rūšys buvo išskirtos ir iš balandžių, žuvėdrų (Jankauskienė, 1996; Barnes *et al.*, 1972) bei grifų žarnynų¹ (Carvalho *et al.*, 2003).

Naminių ančių ir žąsų žarnyne dažniausiai dominuoja *S. faecium*, *S. faecalis*. Laktobacilų randama mažiau ir dažniausiai tai *L. plantarum* ir *L. salivarius*. Dauguma iš paukščių išskirtų pieno rūgšties bakterijų, nepriklausomai nuo jų rūšies, gali augti prie 45-50 °C temperatūros.

Apie probiotikus ir PRB – kaip probiotikų, teigiamą poveikį įvairiems gyvūnams buvo rašyta ankstesniuose skyreliuose. Duomenų apie bandymus su paukščiais, kurių lesaluose buvo panaudoti probiotikai nėra daug, tačiau, Cavazzoni *et al.*, (1998) paskelbė, kad *Bacillus coagulans* buvo probiotinių produktų sudėtyje ir skatino gerą viščiukų augimą. Statistiškai patikimus rezultatus, kad įterpiant į lesalus probiotikų priedą pagerėjo viščiukų broilerių augimo dinamika, taip pat nustatė² Fritts *et al.*, (2000), Gružauskas *ir kt.*, (2004) bei M. Denli *et al.*, (2003). Keletas autorių paskelbė, kad probiotikai nedaro jokie poveikio viščiukų broilerių ar putpelių augimo intensyvumui (Homma and Shinohara, 2004; Waldroup *et al.*, 2003). Kaip jau buvo minėta, naudojant probiotinius preparatus daugiausia tyrimų atlikta analizuojant jų poveikį žinduolių fiziologinei būklei ir žarnyno veiklai. Tuo tarpu duomenų apie jų įtaką viščiukų broilerių ir kitų ekonomiškai naudingų paukščių ir tuo labiau laukinių paukščių organizmui yra mažai, nes jų veikimas priklauso nuo paukščių lyties, amžiaus, laikymo sąlygų ar sveikatingumo.

Paukščių virškinimo, dauginimosi bei šalinimo sistemos anatomiškai skiriasi nuo žinduolių. Todėl ne visi probiotikai tinkantis žinduoliams yra veiksmingi ir paukščių organizmui. Dauguma bakterinių preparatų gauta naudojant žinduolių žarnyno mikrofloros bakterijas, todėl atlikus tokių preparatų bandymus su papūgomis, teigiamo poveikio beveik nepastebėta (Barras, 2000). Pavyzdžiui PRB turintis jogurtai yra gaminami iš pieno ir yra rūšiai-specifiniai žinduoliams, bet ne paukščiams. Rūšiai-nespecifiniai probiotikai negali daugintis visuose organizmuose, prikibti prie žarnyno sienelių ir įsigalėti virškinimo trakte. Jordan and Howard (1992) nustatė, kad kiekvienai gyvūnų rūšiai turi būti kuriami rūšiai specifiniai probiotikai, ypač jei jie naudojami paukščiams.

Taigi PRB užima svarbią vietą homoterminių gyvūnų mikrofloroje. Jos taip pat aptiktos ir poikiloterminių gyvūnų virškinimo trakte. Tačiau klausimas apie vandens paukščių virškinimo trakto laktoflorą vis dar nėra atsakytas, todėl turi būti atliekami tyrimai.

¹ <http://www.scielo.br/pdf/bjm/v34n3/v34n3a07.pdf>

² http://www.lva.lt/vetzoo/old/Nr_28/lt/gruzauskas.pdf

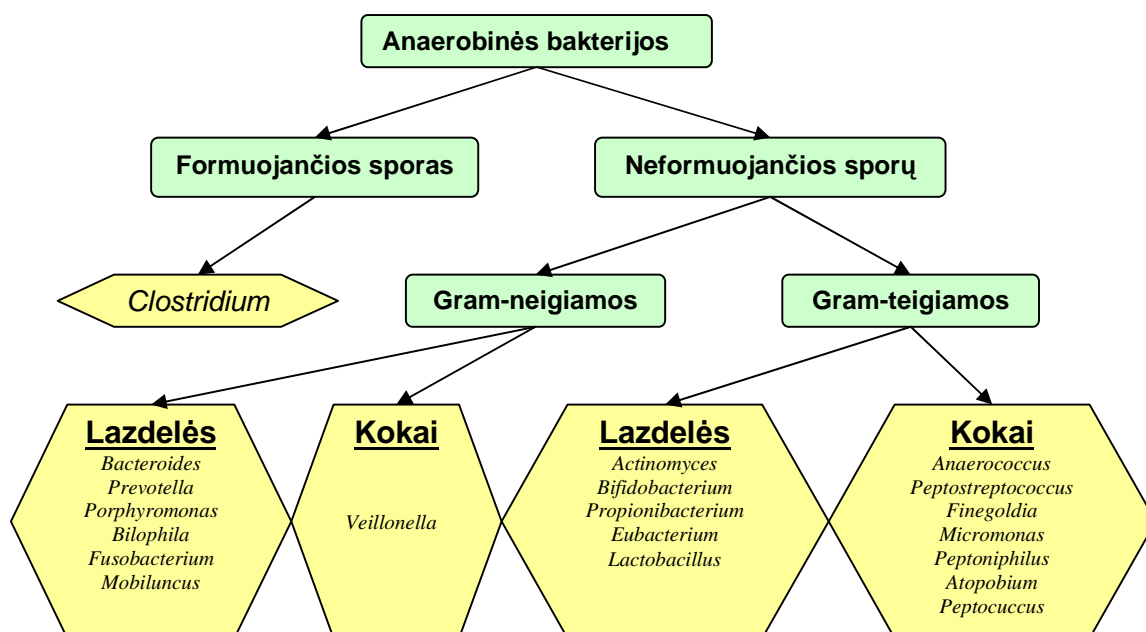
1.5 Propioninių bakterijų charakteristika

Propionibacterium yra lėtai augančių, sporų neformuojančių, Gram-teigiamų, anaerobinių (1.3. Pav.) bakterijų gentis (1.3. Lentelė.)¹, randama kaip saprofitai pas žmones, gyvūnus ir pieno produktuose. Jos gali būti lazdelės formos arba šakotos, gali pasitaikyti pavienės, poromis arba grupelėmis. *Propionibacterium* paprastai auga kaip obligatiniai anaerobai, tačiau keletas padermių yra aerotolerantai, vis dėlto ir jie geriau auga anaerobinėmis sąlygomis². Paprastai šios bakterijos

1.3. Lentelė. Pilna *Propionibacterium* sp. genties mokslinė klasifikacija¹.

Domenas: Bacteria → **Tipas:** Actinobacteria → **Klasė:** Actinobacteria → **Poklasis:** Actinobacteridae → **Būrys:** Actinomycetales → **Pobūrys:** Propionibacterineae → **Šeima:** Propionibacteriaceae → **Gentis:** *Propionibacterium* → **Rūšis:** *P. acidipropionici*; *P. acnes*; *P. australiense*; *P. avidum*; *P. cyclohexanicum*; *P. freudenreichii*; *P. granulosum*; *P. jensenii*; *P. microaerophilum*; *P. propionicum*; *Pr. thoenii*; *P. sp.*

produkuoja pieno ir propioninę rūgštį bei acto rūgštį iš gliukozės. Jos taip pat gali gaminti katalazę kartu su indolu, nitratus arba indolą ir nitratus. *Propionibacterium* morfologiškai panašios į *Corynebacterium*, bet yra netoksinogeniškos. Šiuo metu yra aprašyta 11 *Propionibacterium* rūšių.



1.3. Pav. Anaerobinių bakterijų klasifikacija.

P. acnes sutinkamos ant lytiškai subrendusių gyvūnų, tačiau tikroji kolonizacija praktiškai prasideda likus 1-3 metams iki pilno lytinio subrendimo. Pradžioje bakterijų skaičius būna nedidesnis nei $10^2 - 10^6$ cm² (daugiausia ant veido ir aplinkinėse srityse). *P. granulosum* bei *P.*

¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/>

² http://web.umn.edu/~microbio/BIO221_1998/P_acnes.html

avidum taip pat dažniausiai kolonizuoja tas pačias kūno vietas kaip ir *P. acnes* tačiau jų būna žymiai mažiau ir dažniausiai vertinamos kaip nereikšmingos. *P. acnes*, *P. avidum* ir *P. granulosum* įeina ir į virškinimo trakto normaliąją mikroflorą¹.

Paprastai *Propionibacterium* yra nepatogeniškos, tačiau patekusios į kūno vidų kai kurios *Propionibacterium* rūšys užteršia kraują ir kitus kūno skysčius. Jos gali būti ir infekcijų priežastimi, ypač paplitusi odos liga acne vulgaris, kurią sukelia *Propionibacterium acnes*. *P. acnes* dažniausiai sutinkamos plaukų liaukose ir ant odos. Jos išleidžia lipazes, kurios suvirškina perteklinius į odos paviršių išskiriamus aliejus ir riebalus. Virškinimo sistemos išskiriamos riebiosios rūgštys ir bakteriniai antigenai sukelia stiprius uždegimus, kurie suplėšo plaukų folikulus, o ant odos paviršiaus, pažeidimo vietoje atsiranda pūlinukai. Uždegimai gydomi naudojant lokalius ir oralinius antibiotikus (klindamiciną, eritromiciną ar tetracikliną) arba preparatus, kurie sulėtina odos riebalų gamybą (retinas A ir akutanąs)².

P. acnes labai jautrios įvairioms beta-laktaminėms antimikrobinėms medžiagoms, kaip piperacilinas ir ampicilino-sulbaktainas. Šios bakterijos taip pat labai jautrios penicilinui. *P. acnes* gali sukelti ir kitas infekcijas, tokias kaip ragenų opos, endokarditai, centrinės nervų sistemos šunto infekcijos, be to retkarčiais yra mikštųjų audinių infekcijų priežastis.

P. jensenii ir *L. paracasei* subsp. *paracasei* bakterijos augdamos kartu gali inhibuoti mieles ir kitas bakterijas. Šių bakterijų mišinys efektyvus prieš kelias mielių ir Gram-teigiamų bakterijų rūšis. Testų metu nustatyta, kad *Propionibacterium* sp. inhibicinis aktyvumas belasteliniame supernatante su šių bakterijų fermentacijos produktu organinėmis rūgštimis, nėra toks efektyvus prieš mieles ir kitus mikroorganizmus kaip, kad esant *L. paracasei* subsp. *paracasei* ląstelėms. Taigi galima teigti, kad būtent *P. jensenii* ir *L. paracasei* subsp. *paracasei* sąveika inhibuoja kitus mikrobus kartu išskiriant organines rūgštis. Analogiška sąveika nustatyta tarp *Lactobacillus acidophilus* ir *Propionibacterium shermanii*³ (Liu and Moon, 1982) bei tarp *Lactobacillus rhamnosus* ir *Propionibacterium freudenreichii* bakterijų⁴ (Jatkauskas ir Vrotniakienė, 2006).

Keletas *Propionibacterium* rūšių sutinkamos tokiuose maisto produktuose kaip sūris ir kiti pieno produktai. *P. freudenreichii* yra naudojamos gaminant šveicarišką sūrį, kurios suteikia aštrų skonį ir suformuoja skyles. Skonis atsiranda dėl fermentacijos metu produkuojamos propioninės rūgšties, o skylės susiformuoja dėl išsiskiriančių CO₂ dujų (McCarthy and Courtney, 2004).

¹ <http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Propionibacterium>

² <http://www.geocities.com/mtmccue2000/propionibacterium.html>

³ <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=242081>

⁴ <http://www.lva.lt/vetzoo/data/vols/2006/36/lt/jatkauskas.pdf>

1.6 Didžiųjų ančių (*Anas platyrhynchos*) charakteristika

Didžioji antis (*Anas platyrhynchos*) (1.4. Pav.) priklauso žąsinių (Anseriformes) paukščių būriui¹ (1.4. Lentelė.). Šiam būriui priklauso nedideli, vidutinio dydžio ir dideli vandens paukščiai,



1.4. Pav. Didžiosios antys (*Anas Platyrhynchos*). Kairėje – patelė, dešinėje – patinas¹.

paplitę beveik visame žemės rutulyje. Traukiantys, švelniausiame klimato sėslūs ar klajojantys. Būryje 2 šeimos, 151-154 rūšys, Lietuvoje 35 rūšys (Lietuvos fauna, 1990).

Didžioji antis – perinti, traukianti, žiemojanti rūšis. Ši antis dydžiu ir išvaizda labai panaši į naminę antį. Patinų kūnas stambesnis ir ryškesnių spalvų, patelės kuklesnių spalvų. Paplitusi nuo Šiaurinės Skandinavijos iki Ramiojo vandenyno. Gyvena Šiaurės Amerikoje, daugelyje Atlanto ir Ramiojo

vandenyno salų. Žiemoja pietinėse arealo dalyse. Mėgsta apžėlusius ežerus, upes, pelkes, tvenkinius ir kt. Migracijos metu skrenda ištisą parą. Intensyviausiai pavasarį traukia kovo pabaigoje-balandžio pradžioje, rudenį spalio pabaigoje (Lietuvos fauna, 1990).

1.4. Lentelė. Pilna didžiosios anties (*Anas platyrhynchos*) mokslinė klasifikacija¹.

Domenas: Animalia → **Tipas:** Chordata (Chordiniai) → **Potipis:** Vertebrata (Stuburiniai) → **Klasė:** Aves (Paukščiai) → **Poklasis:** Carinatae → **Būrys:** Anseriformes (Žąsiniai) → **Pobūrys:** Lamelliroctres (Plokštėtasnapiai) → **Šeima:** Anatidae (Antiniai) → **Pošėmis:** Anatinae (Antiniai) → **Būrys:** Anatini → **Gentis:** *Anas* → **Rūšis:** *Anas platyrhynchos*

Aktyvesnės prietemoje. Maitinasi ir dieną, ir naktį. Telkiasi į būrius, grupes. Lytiškai subręsta pirmų metų pabaigoje. Lizdus krauna įvairiose vietose: ežerų, upių pakrantėse, viksvynuose, švendrynuose ir kt. Perėjimo periodas ištemptas. Kiaušinius patelė deda kasdien, po vieną (dažniausiai 8-10 kiaušinių). Kiaušinius peri tik patelė (vidutiniškai 24 dienas).

Minta įvairiu maistu: lesa jaunus augalų daigus, lapus, žiedus, sėklas. Vasarą minta smulkiais vandens gyvūnais: moliuskais, vėžiagyviais, uodų lervomis. Lietuvoje labiausiai paplitusi ančių rūšis, svarbus medžioklės objektas (Lietuvos fauna, 1990).

¹ <http://species.wikimedia.org/wiki/Anas>

II. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1 Mikroorganizmų išskyrimas iš žarnyno

Šiame darbe buvo atliekama pavasarinių ir rudeninių didžiųjų ančių (*Anas platyrhynchos*) patinėlių migrantų plonojo žarnyno sienelės ir jų turinio pieno rūgšties bakterijų mikrobinės įvairovės tyrimas.

Tyrimams panaudoti trys 2005 metų rudenį (iš šiaurės traukianti žiemoti į pietus Nemuno deltos rudeninių migrantų populiacija) ir penki 2006 metų pavasarį (iš pietų traukianti veistis į šiaurę Nemuno deltos populiacija) sumedžiotų didžiųjų ančių patinėlių plonieji žarnynai (2.1. Pav.).

Iš į laboratoriją atgabentų ančių tuojau pat kuo steriliau išimami žarnynai. Iš kiekvieno



2.1. Pav. Tyrimams naudotų didžiųjų ančių populiacijų geografinis išsidėstymas. Remiamasi 2003-2006 m. bakalauro diplome atliktais tyrimais.

paruoštame steriliame fosfatiniame buferyje (pH=6.0) (1 Priedėlis). Plonojo žarnyno sienelės ir jų turinys atskirai yra homogenizuojamos steriliuose grūstuvėliuose, naudojant smulkiai sutrintą stiklą. Trinama iki vientisos konsistencijos masės. Sutrintos sienelės ir jų turinys atskiedžiami 10-tyje ml fosfatinio buferio ir gerai išmaišoma. Iš kiekvieno gauto skiedimo pipete paimama po 1 ml suspencijos (10^1) ir supilama į sterilius endorfo mėgintuvėlius.

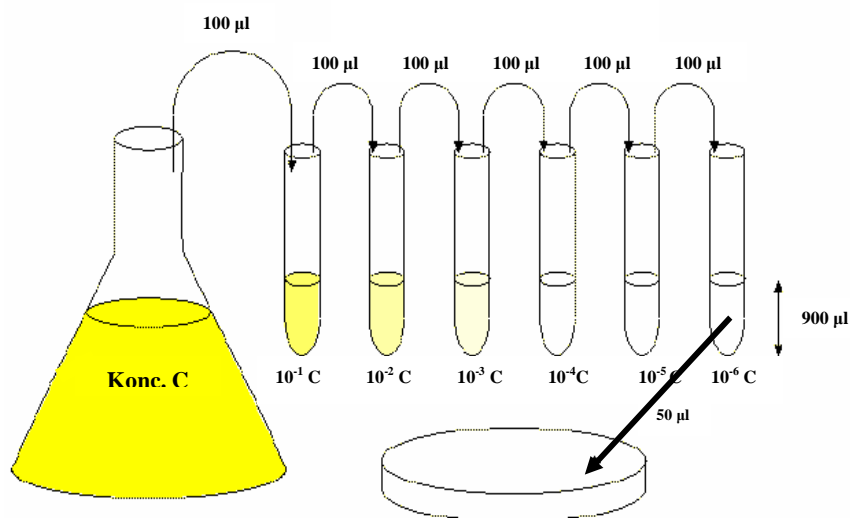
Iš anksto pasiruošiama ir sunumeruojama reikiamas kiekis endorfo mėgintuvėlių skiedimams nuo 10^1 iki 10^6 atlikti. Į mėgintuvėlius sterilia pipete įpilama po 900 μ l fosfatinio buferio. Tuomet iš pirmojo mėgintuvėlio 100 μ l suspencijos perkeliama į antrąjį, pamašius iš jo vėl 100 μ l į trečiąjį ir t.t. Šitaip tiriama medžiaga nuosekliai atskiedžiama santykiu 1:10, 1:100, 1:1000,

1:10000, 1:100000 ir t.t. (Pečiulis, 1994) (2.2. Pav.). Į kiekvieną naują mėgintuvėlį perpilti suspensiją būtina vis nauja sterilia pipete.

1.1.1 Mėginių sėjimas į agarizuotą MRS terpę

Tyrimoji medžiaga gali būti sėjama paviršiniu metodu ant standžios terpės Petri lėkštelės paviršiaus ir giluminiu metodu į visą terpės sluoksnį arba modifikuotais šių metodų variantais.

Tyrimoji medžiaga paviršiniu metodu paskleidžiama ant standžios, pieno rūgšties bakterijoms selektyvios, parūgštintos MRS (Oxoid, UK) (angl. *De Man, Rogosa and Sharpe*, MRS)



2.2. Pav. Serijinio skiedimo technika.

terpės, Petri lėkštelės paviršiuje (2 Priedėlis)¹. Į sterilias Petri lėkšteles išpilstoma po 15-20 cm³ sterilios agarizuotos išlydytos terpės. Kad augančios kolonijos neplaukiotų, agaro paviršių lėkšteles reikia padžiovinti, tada nuo dangtelių nugaruoja kondensacinė drėgmė. Ant lėkštelių dugnelių

užrašomi tiriamosios medžiagos 3 paskutiniai didėjančio skiedimo laipsniai. Sterilia pipete ant agarizuotos MRS terpės Petri lėkštelėse paviršiaus iš kiekvieno ependorf mėgintuvėlio užlašinama po 50 µl tiriamos medžiagos su bakterijomis. Užnešta suspensija glaistikliu tolygiai paskleidžiama visame terpės paviršiuje. Viskas turi būti atliekama steriliame bokse, kiekvienai suspensijai kaskart naudojant naujus sterilius įrankius ir indus. Sėti galima ir ta pačia pipete, tik reikia pradėti nuo didžiausio tiriamosios medžiagos atskiedimo, kiekvieną kartą ją praplaunant steriliu vandeniu (Pečiulis, 1994).

¹ http://www.emdchemicals.com/analytics/Micro_Manual/TEDISdata/prods/1_10661_0500.html

1.1.2 Mikroorganizmų kultivavimas

Migruojančių didžiųjų ančių žarnyno mikrofloroje dominuoja anaerobinės bakterijos. Auginti anaerobinius mikroorganizmus sudėtingiau nei aerobinius, nes pirmuosius reikia saugoti nuo oro deguonies. Anaerobinėms sąlygoms sudaryti indai su pasėliais sudedami į sandarų maišą, iš kurio yra išstumiamas oras prileidžiant į vidų propano dujų ir gerai užrišamas. Apverstos lėkštelės dedamos į termostatą ir 39 °C temperatūroje (paukščių kūno temperatūroje) inkubuojamos 5 paras.

1.1.3 Kolonijų skaičiavimas

Auginant mitybinėse terpėse galima matyti tik gyvų mikroorganizmų ląstelių skaičių populiacijoje. Yra du šio metodo variantai: 1) tiriamos medžiagos sėjimas į standžią mitybinę terpę Petri lėkštelėje ir mikroorganizmų auginimas aerobinėmis arba anaerobinėmis sąlygomis ir 2) sėjimas į skystas mitybines terpes. Kolonijos skaičiuojamos praėjus optimaliam jų formavimosi laikui. Tiriamąją medžiagą užsėjus paviršiniu metodu, skaičiuojamos tik paviršiuje išaugusios kolonijos (Pečiulis, 1994).

Po 5 parų auginimo, atrenkamos tik tų skiedimų lėkštelės, kuriose užaugo ne mažiau kaip 60 ir ne daugiau kaip 300 kolonijų. Jei kolonijų lėkštelėje užaugo mažiau negu 6 ar daugiau nei 300, tai, apskaičiuojant galutinius rezultatus, į tokius skaičius neatsižvelgiama. Mikroorganizmų ląstelių skaičius 1 g žarnyno turinio ar sienelės apskaičiuojamas pagal formulę: $M = a \times 10^n \times b / V$. (kur: M – ląstelių skaičius 1 g, a – vidutinis kolonijų skaičius užsėjus atitinkamą atskiedimą, 10 – atskiedimo koeficientas, n – substrato atskiedimo laipsnis, V – užsėtos suspensijos tūris, μl , b – koeficientas suspensijos tūriui apskaičiuoti 1 cm^3 , jei buvo sėjama mažiau nei 1 cm^3) (Pečiulis, 1994).

1.1.4 Mikroorganizmų grynų kultūrų išskyrimas

Bakterijų grynos kultūros išskiriamos trimis etapais: 1) selektyvinės kultūros gavimas, 2) grynos kultūros išskyrimas ir 3) išskirtos kultūros švarumo kontrolė.

Mikroorganizmų gryna kultūra yra vienos ląstelės palikuonių kolonija arba bendrija standžiam arba skystame substrate. Grynų bakterijų kultūrų išskyrimas yra svarbus etapas tiriant jų ląstelių morfologinius, kultūrinius požymius, fiziologines ir biochemines savybes, kurių visuma remiantis nustatynėjama rūšis. Gryną kultūrą galima išskirti iš diagnostinių pasėlių (Pečiulis, 1994).

Suskaičiavus kolonijų skaičių, atrinktos lėkštelės pieštuku yra padalinamos į 8 trikampių sektorius. Iš kiekvieno sektoriaus sterilia kilpele, nepradraskant agarą, atsitiktinai paimama po 7-8 kolonijas, kurios zigzagais vėl yra persėjamos ant naujų atskirų Petri lėkštelių su MRS terpe.

Lėkštelės su naujais pasėliais terpe apverčiamos žemyn, sudedamos į maišus, kurie pripildomi propano dujų ir vėl termostate (39 °C) anaerobinėmis sąlygomis inkubuojamos 5 paras.

Užaugus naujoms bakterijų kultūroms, iš izoliuotų kolonijų sterilia kilpele paimami mėginiai ir dar kartą persėjami ant naujų Petri lėkštelių su MRS terpe. Pasėliai vėl inkubuojami termostate penkias paras ankščiau aprašytomis sąlygomis (Pečiulis, 1994).

1.1.5 Mikroorganizmų grynos kultūros švarumo kontrolė

Būtinai reikia patikrinti išskirtų bakterijų kultūrų švarumą. Tai atliekama vizualiai ir mikroskopuojant fiksuotus ir dažytus mikroorganizmų preparatus. Vizualiai tikrinamas išgrynintų kultūrų paviršius. Jei kultūra švari, tai jos augimo pobūdis yra vienalytis. Jei užsėjimo brukšny nevienodas, kultūra laikoma užteršta (Pečiulis, 1994).

Vėl praėjus penkioms paroms po persėtų kultūrų auginimo ir gavus vizualiai grynas kultūras daromi fiksuoti ir dažyti mikroorganizmų preparatai. Tokie preparatai reikalingi, ne tik kultūros švarumui nustatyti, bet ir tirti ląstelių išorę ir formą. Preparatų darymas susideda iš tokių etapų: tepinėlio darymo, jų džiovinimo, fiksavimo ir dažymo.

Objektiniai stikleliai tepinėliams daryti yra pamirkomi spirite ir nukaitinami. Nuo mitybinės terpės paviršiaus mikroorganizmų kultūra paimama sterilia kilpele ir suspenduojama “Krano vandens” laše, užlašintame ant objektinio stiklelio, ir plonai išskleidžiama. Plonas tepinėlis išdžiovinamas kambario temperatūros ore arba virš spiritinės lemputės laikant tepinėliu į viršų. Išdžiovinti tepinėliai fiksuojami sausu karščiu, perbraukiant juos 3-4 kartus greitais judesiais per spiritinės lemputės karščiausią vietą. Tepinėliai sausu karščiu fiksuojami norint nustatyti ar yra mikrobu substrate, ląstelių dydį, formą, jų erdvinę agregaciją (Pečiulis, 1994).

Fiksuoti tepinėliai dažomi paprastuoju (dažoma vienu dažu) arba sudėtinguoju (vartojami dveji dažai ir blukinantys chemikalai) būdu. Šiame darbe tepinėliai buvo dažomi sudėtinguoju, Gramo būdu, taip nustatomas svarbus diagnostinis požymis, apibūdinantis bakterijų sistematinę priklausomybę. Dažymo Gramo būdu eiga: ant karščiu fiksuoto tepinėlio užpilama kristalvioleto dažų ir dažoma 1 – 2 min. Nuplovus kristalvioletą dist. H₂O vandeniu, užpilama liugolio, kuris po 1-2 min. Taip pat nuplaunamas vandeniu. Nupylus liugolio tirpalą, tepinėlis 30 – 60 s panardinamas į acetoną. Tada papildoma antruoju dažu (naudojamas safraninas, Gram fuksinas) (3 Priedėlis), praplaunama ir pagal spalvas sprendžiama: gram-teigiamos bakterijos išlaiko pradinio nudažymo spalvas ir neišsivina antrojo dažo, todėl atrodo tamsiai violetinės (Doetsch, 1981; Pečiulis, 1994). Jei bakterijos yra gram-neigiamos, jos bus nusidažę antrąja, rožine spalva¹. Šiame procese

¹ <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/lt/dd/03/15/31993L0085LT.pdf>

svarbiausia, kad gram-teigiamos ir gram-neigiamos bakterijos skirtingai reaguoja į dažus nuplaunantį skystį, nes gram-teigiamas bakterijas dengiančiame peptidoglikano sluoksnyje vyksta dehidratacija ir kristalinis violetas „įstringa“ ląstelėje, kai tuo tarpu gram-neigiamose bakterijose skystis pradžioje ištirpdo riebalų sluoksnį, o plonas toliau sekantis peptidoglikano sluoksnis nėra pajėgus sulaikyti dažus¹.

Taip visos tiriamos bakterijos suskirstomos į gram-teigiamas ir gram-neigiamas. Galiausiai nudažytų bakterijų tepinėlių švarumas įvertinamas mikroskopu. Grynos kultūros ląstelės žiūrint imersiniu objektivu turi būti vienodos, tiktai gali šiek tiek skirtis jų dydis (Pečiulis, 1994). Įvertinus tepinėlius mikroskopu, negrynos kultūros toliau yra gryninamos pagal aukščiau aprašytą metodiką.

2.2 Bakterijų apibūdinimas

Apibūdinant mikroorganizmus atsižvelgiama į kultūrinius, morfologinius ir fiziologinius-biocheminius požymius.

2.2.1 Kultūriniai požymiai

Kultūrinius požymius nusako: 1) augimo pobūdis ir, 2) kolonijų charakteristika.

Visos tyrime ant standžios mitybinės išaugintos kolonijos, tyrinėjamos lupa arba mažuoju optinio mikroskopo padidiniu. Tokie požymiai kaip kolonijų forma, spalva, profilis, kraštas charakteringi vienai ar kitai bakterijų rūšiai (Bluzmanas ir Ragavičius, 1987; Pečiulis, 1994). Tokius skiriamuosius požymius turi ir pieno rūgšties bakterijos.

2.2.2 Mikroorganizmų ląstelių morfologiniai požymiai

Mikroorganizmų ląstelių išorinė ir viduląstelių struktūrų morfologija tiriama įvairiais mikroskopavimo metodais. Mikroskopais tiriamos gyvos ir negyvos, dažytos ir nedažytos ląstelės.

Nudažius ankstesniame skyrelyje aprašytu Gramo dažymo metodu tiriamas anaerobines ančių žarnyno bakterijas ir patikrinus tepinėlių švarumą, pagal tuos pačius tepinėlius mikroskopiškai yra įvertinamos ir morfologinės bakterijų charakteristikos: ląstelių forma ir dydis (lazdelės arba kokai), agregacija (pavienės arba sukibusios lazdelės, pavieniai monokokai arba diplokokai, išsidėstę grandinėle streptokokai arba netaisiklingos stafilokokų krūvelės), judėjimas (jei juda nustatomas žiuželių išsidėstymas ir kiekis), sugebėjimas gaminti endosporas (jei gamina nustatomas jų išsidėstymas) ir kt. Ląstelių formai ir išsidėstymui reikšmės turi kultūros amžius, mitybinės terpės sudėtis ir kultivavimo amžius (Bluzmanas ir Ragavičius, 1987; Pečiulis, 1994).

¹ http://lt.wikipedia.org/wiki/Gramo_da%C5%BEymas

2.2.3 Mikroorganizmų ląstelių fiziologiniai-biocheminiai požymiai

Fiziologinius-biocheminius požymius apibūdina: 1) kvėpavimo būdas, 2) azoto asimiliavimas, 3) anglies junginių asimiliavimas ir fermentavimas, 4) medžiagų apykaitos produktų išskyrimas, 5) patogeninės ir imunologinės savybės (Bluzmanas ir Ragavičius, 1987; Pečiulis, 1994). Tiriant didžiųjų ančių žarnyno mikrofloros fiziologines-biochemines savybes buvo nustatinėjamas kvėpavimo būdas ir anglies junginių fermentavimas.

Pagal kvėpavimo būdą bakterijos skirstomos į 4 grupes: obligatiniai aerobai, mikroaerofilai, fakultatyviniai anaerobai ir obligatiniai anaerobai (Pečiulis, 1994). Mikroorganizmų kvėpavimo būdui nustatyti yra keletas metodų: katalazės ir oksidazės testai bei nitratų redukcijos reakcija.

Nustatinėjant iš didžiųjų ančių plonojo žarnyno išskirtų bakterijų kvėpavimo būdą naudojama katalazės reakcija. Aerobinės ir fakultatyvinės anaerobinės bakterijos, augdamos aerobinėse sąlygose, gamina fermentą katalazę, skaidančią H_2O_2 . Obligatiniai anaerobai ir daugelis mikroaerofilų katalazės negamina. Norint įrodyti katalazės buvimą, vandens laše ant objekcinio stiklelio kilpele tirštai suspenduojama bakterijų kultūra, kuri sumaišoma su 10% H_2O_2 lašu. Ši reakcija atpažįstama iš deguonies burbuliukų ir putų susidarymo. Tokia katalazės reakcija yra teigiama (Pečiulis, 1994).

Iš kokių junginių bakterijos ima anglį aerobinėmis (oksidacijos būdu) ir anaerobinėmis (fermentacijos būdu) sąlygomis atliekami bandymai su gliukoze, laktoze, sacharoze, maltoze, manitu, krakmolu, riebalais ir angliavandeniliais.

Tiriant anaerobines pieno rūgšties bakterijas naudojamas angliavandenių fermentavimo testas. Angliavandenių fermentavimas nustatomas bakterijų kultūras sėjant į skystas, pusskystes ir standžias terpes. Terpės pH 7.1-7.3 (Pečiulis, 1994).

Šiame darbe angliavandenių fermentavimo testui atlikti buvo naudojami du metodai. Atliekant pirmąjį bandymą išaugintos bakterijų kultūros buvo užšėtos į pusskystę Hugh-Leifson (Hugh and Leifson, 1953) mitybinę terpę (4 Priedėlis). Sterili terpė supilstoma į sterilius mėgintuvėlius ir stačiai sustingdoma, o po to dūrio metodu užsėjama tiriama mikrobu kultūra. Kiekvienam angliavandeniui užsėjama po 2 mėgintuvėlius. Pasėjus mikrobus, vieno mėgintuvėlio terpės paviršius yra užliejamas steriliu vazelino aliejumi. Pasėliai kultivuojami 2-7 paras. Mikrobu augimo ir angliavandenių fermentavimo metu stebimas ir pagal indikatoriaus spalvos pasikeitimą registruojamas terpės pH pasikeitimas. Aerobiniai mikroorganizmai angliavandenių nefermentuoja ir dauginasi tik vazelino aliejumi užlietų mėgintuvėlių terpės paviršiuje ir pagamina mažai rūgšties. Jeigu mikrobai skaido peptoną, tai jo metabolizmo produktas neutralizuoja ten esančias rūgštis, ir terpė tampa šarmiška. Kai rūgimo metu išsiskiria dujos, tai jos supleišėja agarą. Jei bakterijos

fermentuoja angliavandenius, jos pagamina daugiau rūgšties, tai matoma iš indikatoriaus spalvos pasikeitimo, tamsiai raudona spalva keičiasi į oranžinę (Pečiulis, 1994).

Galimybė fermentuoti angliavandenius taip pat buvo patikrinta auginant bakterijas MRS sultinyje neturinčiame mėsos ekstrakto ir gliukozės. Į MRS sultinį papildomai įdedama 0.05 % chlorfenolio raudonojo ir filtru sterilizuoto cukraus tirpalo iki galutinės 1 % koncentracijos. Sultinys išautoklavuojamas ir išpilstomas į mėgintuvėlius, o užsėtos kolonijos 7 paras inkubuojamos 37 C^o temperatūros termostate. Praėjus 7 paroms tikrinama ar bakterijos fermentuoja angliavandenius ir gamina rūgštį. Kaip ir ankstesniu atveju, tai matoma iš indikatoriaus spalvos pasikeitimo, geltona spalva keičiasi į raudoną¹.

2.3 Molekuliniai mikroorganizmų tyrimai

Atlikus bakterijų apibūdinimo tyrimus iš grynų kultūrų yra išskiriama DNR.

2.3.1 DNR išskyrimas

Išskiriant tiriamų bakterijų DNR pirmiausia reikia atlikti morfologinį kolonijų apibūdinimą. Jei bakterijos formuoja sporas DNR išskyrimui yra naudojami specialūs reagentų rinkiniai. Tuo tarpu ieškomos pieno rūgšties bakterijos sporų neformuoja. Tokių bakterijų DNR išskiriama žymiai lengviau. Iš kiekvienos Petri lėkštelėje išgrynintos kultūros bakteriologine kilpele paimamas nedidelis kiekis bakterijų biomasės ir suspenduojamas steriliuose, sunumeruotuose ependorf mėgintuvėliuose, kuriuose yra pripilta po 100 µl TE (50 mM Tris-HCl, pH 7.0; 1 mM EDTA)² buferio. Paruošti mėgintuvėliai su TE buferiu ir bakterijų biomase 10 min. palaikomi verdančio vandens vonelėje. Spektrofotometriniu metodu įvertinama visų mėginių DNR kokybė ir patikrinama koncentracija. Saugojimui DNR mėginiai sudedami į šaldiklį prie 20 C^o temperatūros.

2.3.2 Polimerazės grandininė reakcija (PGR)

Polimerazės grandinės reakcija yra metodas, pavadintas pagal DNR polimerazę – fermentą, katalizuojantį DNR replikaciją ląstelėje. PGR yra nukleorūgščių sintezės *in vitro* metodas, kuriuo laboratoriniame mėgintuvėlyje gali būti specifiskai padauginti (amplifikuoti) atskiri DNR fragmentai. PGR metodas yra labai jautrus, todėl padauginta pasirinkta DNR atkarpa gali sudaryti netgi vieną milijoninę genomines DNR dalį. Tai reiškia, kad, naudojant PGR, galima amplifikuoti net ir vienintelę pasirinkto geno kopiją ar jo fragmentą (McPherson and Moller, 2000).

¹ <http://www.bioline.org.br/request?cc05007>

² <http://www.vgtu.lt/leidiniai/elektroniniai/Bioinžinerija/m3-1.pdf>

Tam, kad būtų galima atlikti PGR, reikalinga: DNR, specifiniai pradmenys, deoksiribonukleozidtrifosfatai (dNTP), termostabili *Taq* DNR polimerazė ir magnio jonų (Mg^{2+}) turintis buferis. PGR vykdoma trimis, cikliška besikartojančiais etapais:

- Denatūracija 94 °C – 95 °C temperatūroje,
- Pradmenų hibridizacija - vykdoma 40 °C – 60 °C temperatūroje,
- Naujos DNR grandinės sintezė vyksta 72 °C temperatūroje.

Optimalus PGR ciklų skaičius yra 25 – 35 ir priklauso nuo pradinės – amplifikuojamos DNR koncentracijos, kai kiti rodikliai yra optimalūs (Paulauskas *ir kt.*, 2002).

2.3.2.1 PGR komponentai

DNR. PGR – labai jautrus metodas, sėkmingai atliekamas turint net ir 0,1 – 1 μg DNR. Nuo DNR koncentracijos labai priklauso PGR kokybė ir susintetinto produkto išeiga, todėl, atsižvelgiant į pradinį DNR kiekį, būtina optimaliai parinkti kitų PGR komponentų koncentraciją. Per didelė DNR koncentracija sąlygoja nespecifinių PGR produktų sintezę (Paulauskas *ir kt.*, 2002).

PGR buferis. Standartinio PGR buferio sudėtyje yra KCl, Tris ir $MgCl_2$. Du pagrindiniai komponentai, sąlygojantys kokybiško PGR produkto gavimą, yra KCl ir $MgCl_2$ koncentracija. $MgCl_2$ sudaro tirpius kompleksus su dNTP, kuriuos, kaip substratą, atpažįsta DNR *Taq* polimerazė ir įjungia į sintetinamą DNR grandinę. Per didelė KCl ar $MgCl_2$ koncentracija inhibuoja *Taq* polimerazės aktyvumą, ko pasekoje mažėja PGR produkto išeiga ir didėja nespecifinių produktų gavimo tikimybė.

Esant standartinėms PGR sąlygoms, rekomenduojama $MgCl_2$ koncentracija buferyje yra 1,5 mM, kai kiekvieno dNTP koncentracija yra 200 μM ir reakcija vykdoma 25 μl tūryje. Šios reakcijos išdavoje turėtų būti susintetinta 6 – 6,5 μg DNR (Paulauskas *ir kt.*, 2002).

Deoksiribonukleozidtrifosfatai (dNTP). Deoksiribonukleozidtrifosfatai (dNTP) - tai laisvi substratai, kurie, pradėdami nuo pradmens laisvojo galo, komplementariu būdu jungiasi prie DNR grandinės - matricos ir tokiu būdu sintetina naują DNR grandinę. dNTP koncentracija turi įtakos reakcijos tikslumui. Rekomenduojama kiekvieno iš 4 dNTP (dATP, dCTP, dGTP ir dTTP) koncentracija yra 200 μM, kai $MgCl_2$ koncentracija buferyje yra 1,5 mM ir reakcija vykdoma 25 μl tūryje. Per didelė dNTP koncentracija gali inaktyvuoti PGR ir sąlygoti nespecifinio produkto susidarymą (Paulauskas *ir kt.*, 2002).

Pradmenys. Pradmenims yra keliama daug reikalavimų: pradmenys turi būti nekomplementarus vienas kitam, negali turėti vidinės antrinės struktūros ir polindrominių seku. C ir G nukleotidų kiekis pradmenyse turi siekti 40 - 60 %. Labai svarbu teisingai parinkti pradmenų prisijungimo prie dauginamo DNR fragmento temperatūrą, kurią apsprendžia nukleotidų lydimosi temperatūra (T_m).

Pradmenų prisijungimo prie dauginamo DNR fragmento temperatūra turi būti apie 5 °C žemesnė nei T_m . Rekomenduojama T_m yra 55 – 72 °C. Be to, būtina atkreipti dėmesį į pradmenų koncentraciją. Rekomenduojama kiekvieno pradmens koncentracija yra 0,1 – 0,5 μM. Didesnė pradmenų koncentracija gali lemti klaidingą jų prisijungimą ar nespecifinio PGR produkto gavimą. Jei pradmenų koncentracija per maža, mažėja reakcijos produkto išeiga. Gali būti naudojamos pradmenų parinkimo kompiuterinės programos¹.

DNR Taq polimeraze. DNR *Taq* polimerazė – tai fermentas, atsakingas už naujos DNR grandinės sintezę. Fermentas yra išskirtas iš termofilinių bakterijų (*Thermus aquaticus*), todėl nepraranda aktyvumo aukštesnėje nei 92 °C temperatūroje, kuri reikalinga DNR grandinėms vienai nuo kitos atskirti. DNR *Taq* polimerazės optimali veikimo temperatūra – 72 °C. Fermentas pasižymi ir dideliu specifiškumu, t. y. nekomplementaraus nukleotido įjungimo tikimybė naujai sintetiname DNR grandinėje yra tik 1 iš 9000 nukleotidų. Fermentas yra jautrus pH pokyčiams terpėje. Optimalus pH 8,2 – 9,0. Keičiantis pH reikšmei DNR *Taq* polimerazės aktyvumas mažėja. Rekomenduojama DNR *Taq* polimerazės koncentracija – 2 aktyvumo vienetai, kai reakcijos mišinio tūris yra 25 μl, o kitų reakcijos komponentų koncentracijos yra optimalios (Paulauskas *ir kt.*, 2002).

Be DNR *Taq* polimerazės, PGR dar gali būti naudojamos kitos, aukštai temperatūrai atsparios, DNR polimerazės, išskirtos iš *Thermus thermophilus*, *Bacillus sterothermophilus* ir *Thermococcus litoralis* bakterijų (Paulauskas *ir kt.*, 2002).

2.3.2.2 DNR amplifikacija

Buvo pasirinkti 2 universalūs bakterijoms 16S rDNR pradmenys, amplifikuojantys 700 bp ilgio 16S rDNR fragmentą. Abu naudoti pradmenys yra tinkami pieno rūgšties bakterijų identifikavimui: Naudotų pradmenų nukleotidų sekos w010 ir w007w (Godon *et al.*, 1997):

700 bp **w010** F340 (5'-ACT CCT ACG GGA GGC AGC A-3')

w007 R1100 (5'-CTC GTT GCG GGA CTT AAC-3')

Polimerazės grandinės reakcija atlikta galutiniame 22 μl tūryje, susidedančiam iš 2,5 μl 10x PGR buferio, 2,5 μl 2 mM dNTP, 0,5 μl pradmens (w010 F340), 0,5 μl pradmens (w007 R1100), 1 μl *Taq* polimerazės, 2,5 μl MgCl₂, 2 μl genomines DNR ir likusio kiekio vandens. Amplifikacija atlikta Eppendorf firmos termocikleriu „Mastercycler gradient“ pradant pirmu denatūracijos žingsniu 3 min. 95°C temperatūroje, reakcija toliau buvo vykdoma 39 amplifikacijos ciklus: 95°C (1 min.), keliant pradmenų lydymosi temperatūrą vienu laipsniu nuo 43°C iki 50°C 60 (1 min.) per kiekvieną

¹ <http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3> www.cgi

sekantį ciklą nuo 2-ojo iki 15 ir tęsiant amplifikaciją dar 24 ciklus esant lydymosi temperatūrai 50°C, prailginimo žingsnis 72°C (2 min.) ir viskas buvo užbaigta galutiniu prailginimo žingsniu 72°C (10 min.).

2.3.3 DNR elektroforezė agarozės gelyje

Greta spektrofotometriniu metodu, išskirtos ir amplifikuotos DNR kokybės įvertinimui ir koncentracijos nustatymui panaudota elektroforezė agarozės gelyje. DNR elektroforezė atliekama horizontaliame 0,65 – 3,0 % agarozės gelyje, turinčiam 1µg/ml etidžio bromido. Elektroforezė vykdoma leidžiant elektros srovę per gelį. DNR juda nuo katodo link teigiamo poliaus – anodo. Fragmentų judėjimo greitis gelyje priklauso nuo jų dydžio: mažesni fragmentai juda greičiau, didesni lėčiau. Atsižvelgiant į gelio dydį ir DNR fragmentų molekulinę masę, elektroforezė vykdoma 30 – 60 min., esant 70 – 110 V įtampai (Paulauskas *ir kt.*, 2002).

560 µg agarozės miltelių ištirpinti 1x TAE buferyje (1 Priedėlis) kaitinant ir maišant tol, kol tirpalas pasidaro skaidrus ir vientisos konsistencijos. Pridėti etidžio bromido. Iki 70 – 65°C atvėsinta agarozė supilama į paruoštą formą. Po to į gelį įstatomos "šukutės" ir forma paliekama 30 min. kambario temperatūroje, kad gelis sustingtų. Sustingus geliui ištraukiamos šukutės. Prieš įvedant mėginį į susiformavusius "šulinėlius", gelį įstatyti į elektroforezės vonelę, užpildytą 1x TAE buferiu taip, kad šis apsemtų gelį. Į kiekvieną šulinėlį įvesti po DNR mėginį sumaišytą su bromfenolio mėlio dažais, o į vieną - molekulinės masės žymeklį Gene Ruler™ 50 bp. Po elektroforezės gelis stebimas UV šviesoje, ivertinama DNR koncentracija ir grynumas (Paulauskas *ir kt.*, 2002).

2.3.4 Amplifikuotų DNR mėginių paruošimas sekvenavimui

Amplifikuoti DNR mėginiai, atlikus jų kokybės patikrinimą ir įvertinus DNR koncentraciją, yra paruošiami sekvenavimui. Ruošiant DNR amplifikatus sekvenavimui buvo naudojamas DNA Extraction Kit fermentų rinkinys (Fermentas, Vilnius, Lietuva).

2.4 Filogenetinė DNR sekų analizė

Tyrimo metu buvo analizuojama pavasarinių ir rudeninių didžiųjų ančių (*Anas platyrhynchos*) migrantų patinėlių žarnyno sienelės ir turinio pieno rūgšties bakterijų mikrobinė įvairovė. Viso analizėje panaudoti trys rudeninių ir penki pavasarinių didžiųjų ančių migrantų patinėlių plonieji žarnynai.

Iškeltiems tikslams įgyvendinti buvo atrinkti keturi universalūs bakterijoms 16S rDNR pradmenys (w010, w007), tinkami pieno rūgšties bakterijų identifikavimui.

DNR sekų analizė atlikta ABI Prism model 377 automatizuotu DNR sekvenatoriumi ABI (Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Iš kiekvienos 16S rRNR geno sekos analizuota maždaug 700 bp fragmentas (pozicija 300-1100).

Daugybinis nusekvenuotų sekų palyginimas atliktas naudojantis CLUSTAL¹ ir CLC Free Workbench 2² kompiuterinėmis programomis. Nukleotidinių sekų paieška pagal pavadinimą ar kitus raktinius žodžius atlikta EMBL (EBI)³, GenBank (NBIC)⁴ ir JDDDB⁵ DNR sekų bankuose. Nukleotidinių sekų palyginimas su duomenų bazėse esančiomis žinomomis sekomis, panašumų ir galimų konservatyvių motyvų paieška atlikta naudojantis (NBIC) BLAST^{6,7,8} ir (EBI) FASTA⁹ kompiuterinėmis programomis.

Rezultatai pateikti panašumo koeficientais S_{ab}, kurie kiekybiškai atspindi naujai nustatytų sekų panašumą su sekomis, esančiomis EMBL, GenBank ir JDDDB duomenų bazėje. Jei S_{ab} koeficientas lygus 1.000, tai reiškia, kad lyginama seka yra identiška duomenų bazėje patalpintai sekai arba kelioms sekoms. Kuomet panašumo koeficientas mažesnis už 0.900, tai rodo, kad analizuojamos sekos nėra patikimai artimos žinomoms rūšims (Holben *et al.*, 2002).

Visos į filogenetinį medį įtrauktos sekos buvo analizuojamos naudojant CLC Free Workbench 2 kompiuterinę programą. Palyginimui dalinės 16S rRNR sekos buvo paimtos iš EMBL, GenBank ir JDDDB duomenų bazių. Filogenetinis medis sukonstruotas pagal neighbor-joining grupių analizės algoritmą¹⁰.

¹ <http://www.ebi.ac.uk/clustalw>

² <http://www.clcbio.com/index.php?id=479>

³ <http://www.ebi.ac.uk>

⁴ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/index.html>

⁵ <http://getentry.ddbj.nig.ac.jp/>

⁶ http://www.vgtu.lt/leidiniai/elektroniniai/Bioinzinerija/Eksperimentiniu_tyrimu_pagrindai.pdf

⁷ <http://www.ibt.lt/lithuanian/nuorodos.htm>

⁸ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

⁹ <http://www.ebi.ac.uk/fasta33/>

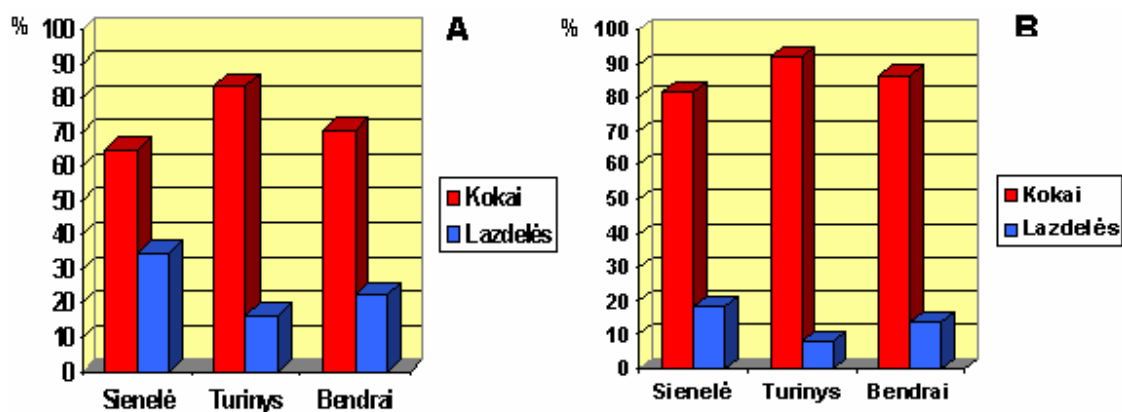
¹⁰ <http://www.icp.ucl.ac.be/~opperd/private/neighbor.html>

I. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Virškinimo traktas į vieną labai sudėtingą ekologinę sistemą apjungia šeimininko ląsteles, maistą ir jo virškinimo produktus, bakterijas, grybus ir virusus. Šiame darbe plonojo žarnyno ekologinė sistema nagrinėjama kaip šeimininko organizmo apsaugos sistema, kurioje pagrindinį vaidmenį atlieka autochtoniniai (normali arba rezidentinė mikroflora) anaerobiniai mikroorganizmai. Svarbiausios iš jų yra pieno rūgšties bakterijos (PRB). Gerai žinoma, kad PRB turi didelę reikšmę normalioje įvairių gyvūnų virškinimo trakto mikrofloroje, tačiau duomenų apie mikroorganizmų egzistavimą migruojančių didžiųjų ančių (*Anas platyrhynchos*) plonojo žarnyno sienelėje bei turinyje ir tuo labiau apie pieno rūgšties bakterijas, kurių išskyrimas iš virškinimo trakto ir padermių nustatymas yra gana ilgas ir sudėtingas procesas, nėra visai.

Norint gerai suprasti pieno rūgšties bakterijų reikšmę migruojančių didžiųjų ančių plonajam žarnynui ir visam organizmui, pirmiausia reikia atkreipti dėmesį į faktorius įtakojančius PRB rūšinę bei kiekybinę sudėtį. Tokiems faktoriams priskiriama maisto sudėtis ir maitinimosi intensyvumas, migracija ir gyvenamoji aplinka.

Migruojančių didžiųjų ančių plonojo žarnyno sienelių ir jų turinio pieno rūgšties bakterijų paieška buvo atlikta pirmą kartą. Naudojant klasikinius mikroorganizmų kultivavimo metodus, iš rudeninės migracijos didžiųjų ančių plonojo žarnyno sienelių buvo išskirta 280 grynų kultūrų bei 120 iš plonojo žarnyno turinio. Iš pavasarinės migracijos didžiųjų ančių plonojo žarnyno sienelių buvo išskirta 115 grynų kultūrų bei 45 iš plonojo žarnyno turinio (3.1. Lentelė).

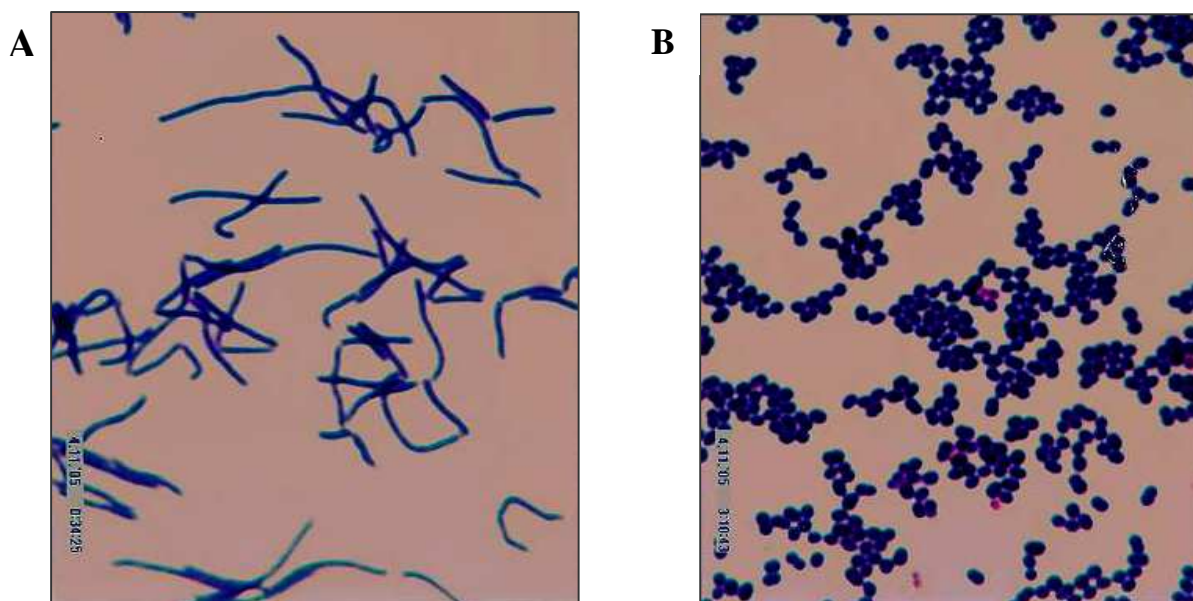


3.1. Pav. Pieno rūgšties bakterijų kokų ir lazdelių santykis migruojančių didžiųjų ančių plonųjų žarnų sienelėse ir jų turinyje: **A** – rudeniniai migrantai; **B** – pavasariniai migrantai.

Išskirtų kolonijų priklausomybė pieno rūgšties bakterijoms buvo nustatyta šviesiniu mikroskopu įvertinus jų morfologines charakteristikas ir atlikus fiziologinių savybių tyrimus.

Atlikti tyrimai parodė, kad visi anksčiau paminėti faktoriai įtakoja PRB rūšinę ir kiekybinę sudėtį. Pagal Barnes *et al.*, (1972) pateiktus duomenis, bakterijų skaičius paukščių plonajame žarnyne santykinai yra mažas ir nesiekia daugiau nei 10^8 k.f.v./g. Gyvybingų bakterijų skaičius (kolonijas formuojantys vienetai, viename grame, k.f.v./g (angl. *colony forming units/g*, c.f.u/g)), Nemuno deltos rudeninių didžiųjų ančių (*Anas platyrhynchos*) migrantų plonojo žarnyno sienelėse svyravo nuo 1.2×10^7 iki 2.1×10^7 k.f.v./g, o plonojo žarnyno turinyje nuo 3.4×10^7 iki 1.1×10^8 k.f.v./g. Tuo tarpu tiriant Nemuno deltos pavasariinių didžiųjų ančių migrantų plonojo žarnyno sienelėse bei turinį, Petri lėkštelėse išaugo tik nedidelis skaičius pavienių kolonijų. Gyvybingų bakterijų skaičius pavasariinių migrantų plonojo žarnyno sienelėse svyravo nuo 3.2×10^6 iki 4.8×10^6 k.f.v./g, o plonojo žarnyno turinyje nuo 1.0×10^7 iki 2.2×10^7 k.f.v./g. Šie rezultatai sutampa su kitų autorių pateiktais faktais, patvirtinančiais, kad intensyviai maitinantis perėjimo laikotarpiu bendras bakterijų skaičius stipriai padidėja, o grįžtant pavasarį iš tolimų žiemojimo vietovių – sumažėja (Barnes *et al.*, 1972).

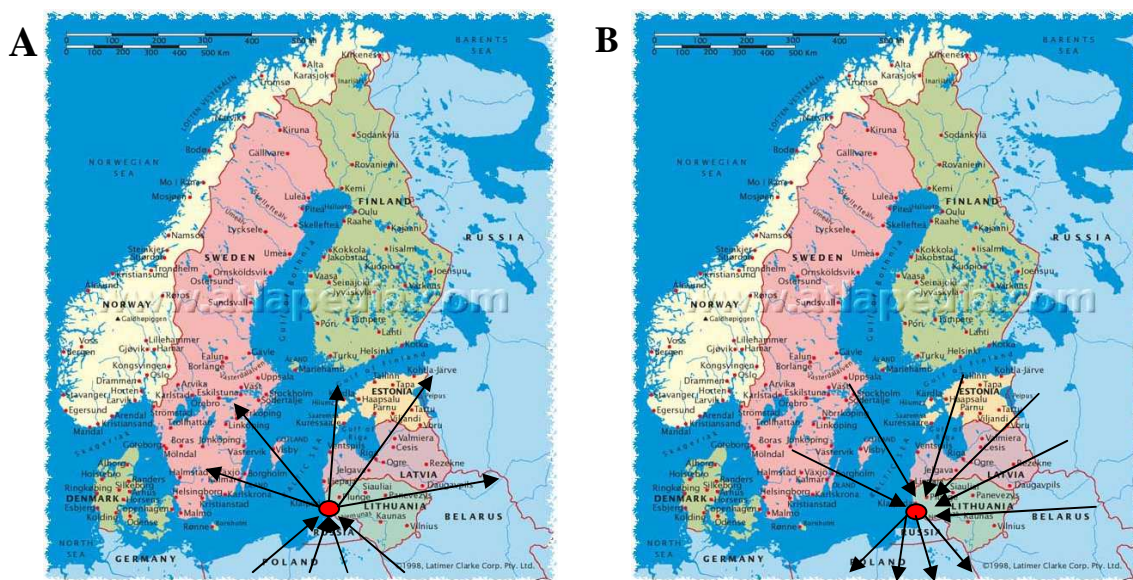
Migracija įtakoja ne tik bendrą bakterijų skaičių didžiųjų ančių plonojo žarnyno sienelėje ir turinyje, bet ir pieno rūgšties bakterijų lazdelių bei kokių morfologinių formų kiekio skirtumus. Pieno rūgšties bakterijų kokių ir lazdelių santykis migruojančių didžiųjų ančių plonojo žarnyno sienelėse ir turinyje pavaizduotas 3.1. paveiksle. Ir rudeninių ir pavasariinių migrantų plonojo žarnyno sienelėje ir turinyje kokių formos bakterijų buvo žymiai daugiau (atitinkamai 65% ir 83.5% bei 81.4% ir 91.6%) lyginant su lazdelės formos bakterijomis (atitinkamai 35% ir 16.5% bei 18.6% ir 8.4%). Pažymėtina, kad kokių ir lazdelių formos (3.2. Pav.) bakterijų kiekio santykinis skirtumas



3.2. Pav. Iš rudeninių didžiųjų ančių migrantų plonųjų žarnų sienelių išskirtų pieno rūgšties bakterijų nuotraukos padarytos šviesiniu fotografuojančiu mikroskopu (Olympus B201): **A** – Gram+ lazdelės; **B** – Gram+ kokai.

rudeninių migrantų plonojo žarnyno sienelėse ir jų turinyje buvo gerokai mažesnis nei pas pavasarinius migrantus.

Tokie PRB morfologinių formų kiekio skirtumai dar kartą patvirtina faktą, kad ilgai trunkanti migracija išsekina paukščių organizmą. Pagal 2003-2006 m. atliekant bakalauro darbą surinktus duomenis apie šiame darbe tiriamų didžiųjų ančių migracijos kryptis, Nemuno delta didžiosioms antims yra tik tarpinė stotelė pasimaitinti, po to perėti jos pasklinda gana nedidelėje teritorijoje po aplinkinius regionus, o žiemoti skrenda toli į pietus, pasiekdamos net Afriką (3.3. Pav.). Pavasariniai migrantai grįžta perėti iš tolimų žiemojimo vietovių nusilpusiu organizmu, o rudeninių migrantų organizmai yra stiprūs, dėl to rudeniniai didžiųjų ančių migrantai ne tik turi didesnę lazdelių formos pieno rūgšties bakterijų skaičių plonojo žarnyno sienelėse ir jų turinyje nei pavasariniai migrantai, bet ir apskritai daugiau abiejų morfologinių formų pieno rūgšties bakterijų.



3.3. Pav. 2003-2006 m. atliekant bakalauro darbą išsiaiškintos šiame darbe tiriamų Nemuno deltos didžiųjų ančių populiacijos aptikrės migracijos kryptys: **A** – skrendant iš pietų į perimvietes šiaurėje; **B** – skrendant žiemoti į pietus iš perimviečių šiaurėje.

Žinoma įtakos jau minėtam skirtingam koku ir lazdelės formos pieno rūgšties bakterijų kiekio santykiui lyginant tarpusavyje pavasarinius ir rudeninius didžiųjų ančių migrantus, turi ir tai, kad vietovėse kuriose tiriamos didžiosios antys žiemoja ir kuriose peri labai skiriasi gyvenamosios aplinkos sąlygos, bendra aplinkos mikroflora bei mityba. Paprastai didžiosios antys lesa jaunus augalų daigus, lapus, žiedus, sėklas. Vasarą minta smulkiais vandens gyvūnais: moliuskais, vėžiagyviais, uodų lervomis (Lietuvos fauna, 1990). O migruojant iš tolimų vietovių į perimvietes net neabejojama, kad didžiųjų ančių organizmas patiria stresą ir dėl staiga pasikeitusių mitybos įpročių pasikeičia viso organizmo fiziologinė būklė.

Kokų ir lazdelių morfologinių formų santykis pavasarinių ir rudeninių didžiųjų ančių migrantų plonajame žarnyne skyrėsi ir priklausomai nuo to iš kur buvo išskirtos bakterijų kolonijos: kokų ir lazdelės formos bakterijų kiekio santykinis skirtumas tiek rudeninių tiek pavasarinių migrantų plonojo žarnyno sienelėse buvo mažesnis nei plonojo žarnyno turinyje (3.2. Pav.). Manoma, kad tokius skirtumus lemia stipresnės lazdelės formos pieno rūgšties bakterijų adhezinės savybės prie žarnyno sienelių. Pastaroji PRB funkcija ir lemia, kad jos gali įeiti į sienelės mikroflorą bei tapti ekologinio barjero dalimi, apsaugančio makroorganizmo ląsteles nuo patogeninių mikrobu prisitvirtinimo prie gleivinės. Be to, PRB su gerai išreikštomis adhezinėmis savybėmis turi žymiai didesnes antagonistines savybes, kurias lemia jų produkuojama pieno rūgštis. Daugelio mokslininkų nuomone būtent lazdelės formos PRB (laktobacilos) ir užtikrina visų šiltakraujų gyvūnų ir žmogaus virškinimo trakto mikrofloros apsauginę funkciją (Jankauskienė, 1996).

3.1. Lentelė. Tiriamų pavasarinių ir rudeninių didžiųjų ančių migrantų plonojo žarnyno sienelių ir jų turinio grynų bakterijų kultūrų morfologinės savybės.

Morfologinės bakterijų savybės	Rudeninė migracija				Pavasarinė migracija			
	Plonojo žarnyno sienelės (n ₁ =280)		Plonojo žarnyno turinys (n ₁ =120)		Plonojo žarnyno sienelės (n ₁ =115)		Plonojo žarnyno turinys (n ₁ =45)	
	Lazdelės (n ₂ =98)	Kokai (n ₂ =182)	Lazdelės (n ₂ =19)	Kokai (n ₂ =100)	Lazdelės (n ₂ =22)	Kokai (n ₂ =93)	Lazdelės (n ₂ =4)	Kokai (n ₂ =41)
Judrumas	-	-	-	-	-	-	-	-
Sporų formavimas	-	-	-	-	-	-	-	-
Tetradų formavimas	-	-	-	-	-	-	-	-
Gram±	Gram+	Gram+	Gram+	Gram+	Gram+	Gram+	Gram+	Gram+

n₁ – bendras grynų kultūrų skaičius išskirtas iš migruojančių didžiųjų ančių plonojo žarnyno sienelių ir jų turinio.

n₂ – kokų ir lazdelių formos bakterijų skaičius plonojo žarnyno sienelėse ir jų turinyje.

Šviesiniu mikroskopu buvo įvertintos ir kitos išskirtų grynų bakterijų kultūrų morfologinės charakteristikos. Nustatyta, kad visos bakterijų kultūros yra nejudrios, neformuoja sporų ir tetradų bei yra Gram-teigiamos. Visos iš pavasarinių ir rudeninių didžiųjų ančių migrantų plonojo žarnyno sienelių ir jų turinio išskirtų grynų bakterijų kultūrų morfologinės charakteristikos pateiktos 3.1. lentelėje.

Fiziologinių savybių tyrimai naudojant klasikinius kultivavimo metodus, taip pat patvirtina iš pavasarinių ir rudeninių didžiųjų ančių migrantų plonojo žarnyno sienelių ir jų turinio išskirtų grynų bakterijų kultūrų priklausomybę pieno rūgšties bakterijoms. Atlikus cukrų fermentacijos testą nustatyta, kad visos tiriamos bakterijos produkuoja pieno rūgštį, iš jų lazdelės formos bakterijos

cukrų fermentacijos metu išskiria anglies dioksidą (CO₂). Visų kultūrų katalazės testas buvo neigiamas, jos augo prie 45 °C temperatūros ir esant terpės pH 5.0. Iš pavasarinių ir rudeninių didžiųjų ančių migrantų plonojo žarnyno sienelių ir jų turinio išskirtų grynų bakterijų kultūrų pieno rūgšties bakterijų fiziologines savybes atspindintys rezultatai pateikti 3.2. lentelėje.

3.2. Lentelė. Tiriamų pavasarinių ir rudeninių didžiųjų ančių migrantų plonojo žarnyno sienelių ir jų turinio grynų bakterijų kultūrų fiziologinės savybės.

Fiziologinės bakterijų savybės	Rudeninė migracija				Pavasarinė migracija			
	Plonojo žarnyno sienelės (n ₁ =280)		Plonojo žarnyno turinys (n ₁ =120)		Plonojo žarnyno sienelės (n ₁ =115)		Plonojo žarnyno turinys (n ₁ =45)	
	Lazdelės (n ₂ =98)	Kokai (n ₂ =182)	Lazdelės (n ₂ =19)	Kokai (n ₂ =100)	Lazdelės (n ₂ =22)	Kokai (n ₂ =93)	Lazdelės (n ₂ =4)	Kokai (n ₂ =41)
CO ₂ iš gliukozės	+	-	+	-	+	-	+	-
Augimas prie 45 °C	+	+	+	+	+	+	+	+
Augimas prie pH 5.0	+	+	+	+	+	+	+	+
Katalazė	-	-	-	-	-	-	-	-
Cukrų fermentacija	+ (D, L, DL)	+ (L)	+ (D, L, DL)	+ (L)	+ (D, L, DL)	+ (L)	+ (D, L, DL)	+ (L)

n₁ – bendras grynų kultūrų skaičius išskirtas iš migruojančių didžiųjų ančių plonojo žarnyno sienelių ir jų turinio.
n₂ – kokių ir lazdelių formos bakterijų skaičius plonojo žarnyno sienelėse ir turinyje.

Lyginant šiame darbe ištirtų pavasarinių ir rudeninių didžiųjų ančių migrantų plonojo žarnyno sienelių ir jų turinio pieno rūgšties bakterijų morfologines ir fiziologines savybes (3.1. ir 3.2. Lentelės) su Stiles and Holzapfel (1997) apibendrintais duomenimis (3.3. Lentelė) aiškiai matoma, kad didžiųjų ančių plonajame žarnyne nustatytos bakterijos panašiausios į *Enterococcus* sp., *Lactococcus* sp., *Lactobacillus* sp., *Pediococcus* sp., *Vagococcus* sp. ir *Streptococcus* sp. pieno rūgšties bakterijų genčių atstovus.

Pažymėtina, kad migruojančių didžiųjų ančių plonajame žarnyne, pirmą kartą buvo identifikuotos ir propioninės bakterijos (*Propionibacterium* sp.). Ištyrus iš didžiųjų ančių plonojo žarnyno sienelių ir jų turinio išskirtų propioninių bakterijų morfologines bei fiziologines savybes nustatyta, kad jos produkuoja propioninę rūgštį, išskiria CO₂, yra Gram-teigiamos, lazdelės formos anaerobinės bakterijos, gaminančios katalazę. Jos taip pat augo prie 45 °C temperatūros ir pH 5.0 (3.4. Lentelė).

3.3. Lentelė. Stiles and Holzapfel (1997) apibendrinti duomenys apie visų pieno rūgšties bakterijų genčių morfologines ir fiziologines savybes.

Pieno rūgšties bakterijų gentys	Morfologinės savybės						Fiziologinės savybės				
	Laz delės	Ko kai	Judrumas	Sporos	Tetrados	Gram±	CO2 iš gliukozės	Augimas prie 45 C°	Augimas prie pH 5.0	Katalazė	Cukrų fermentacija
<i>Carnococcus</i> sp.	-	+	-	-	-	Gram+	-	-	-	-	+ (L)
<i>Aerococcus</i> sp.	-	+	-	-	+	Gram+	-	-	-	-	+ (L)
<i>Enterococcus</i> sp.	-	+	-	-	-	Gram+	-	+	+	-	+ (L)
<i>Lactococcus</i> sp./ <i>Vagococcus</i> sp.	-	+	-	-	-	Gram+	-	-	+/-	-	+ (L)
<i>Lactobacillus</i> sp.	+	-	-	-	-	Gram+	+	+	+	-	+ (D, L, DL)
<i>Pediococcus</i> sp.	-	+	-	-	+	Gram+	-	+/-	+	-	+ (L, DL)
<i>Streptococcus</i> sp.	-	+	-	-	-	Gram+	-	+/-	-	-	+ (L)
<i>Leuconostoc</i> sp./ <i>Oenococcus</i> sp.	-	+	-	-	-	Gram+	+	-	+/-	-	+ (D)
<i>Tetragenococcus</i> sp.	-	+	-	-	+	Gram+	-	-	-	-	+ (L)
<i>Weissella</i> sp.	-	+	-	-	-	Gram+	+	-	+/-	-	+ (D, DL)

3.4. Lentelė. Tiriamų pavasariinių ir rudeninių didžiųjų ančių migrantų plonojo žarnyno sienelių ir jų turinio propioninių bakterijų morfologinės ir fiziologinės savybės.

Propioninės bakterijos	Morfologinės savybės					Fiziologinės savybės				
	Laz delės	Judrumas	Sporos	Tetrados	Gram±	CO2 iš gliukozės	Augimas prie 45 C°	Augimas prie pH 5.0	Katalazė	Cukrų fermentacija
<i>Propionibacterium</i> sp.	+	-	-	-	Gram+	+	+	+	+	+

Kai kurios propioninės bakterijos išskirdamos propioninę rūgštį, komplekse su *Lactobacillus* sp. genties bakterijomis, išskiriančiomis pieno rūgštį, efektyviau inhibuoja patogeninių mikroorganizmų patekimą į gyvūnų kūną ir jų vystymąsi (Liu and Moon, 1982). Taigi *Propionibacterium* sp. genties atstovai įeina į normalios didžiųjų ančių žarnyno mikrofloros sudėtį bei turi teigiamą poveikį sustiprinant neimunitinį organizmo atsparumą.

Filogenetinės analizės rezultatai pateikti panašumo koeficientais S_{ab} (3.5. Lentelė), kurie kiekybiškai atspindi naujai nustatytų sekų panašumą su sekomis, esančiomis EMBL, GenBank ir

JDDDB duomenų bazėse. Jei S_{ab} koeficientas lygus 1.000, tai reiškia, kad lyginama seka yra identiška duomenų bazėje patalpintai sekai arba kelioms sekoms. Kuomet panašumo koeficientas mažesnis už 0.900, tai rodo, kad analizuojamos sekos nėra patikimai artimos žinomoms rūšims (Holben *et al.*, 2002).

Iš visų 10 analizuotų dalinių 16S rRNR geno sekų, dvi buvo identiškos ($S_{ab} = 1.000$) jau žinomų rūšių 16S rRNR geno sekoms (*Propionibacterium* sp., 1.000), keturių sekų S_{ab} koeficientas buvo didesnis nei >0.900 (*Propionibacterium* sp., 0.981, 0.978, 0.995, 0.982). Likusių keturių sekų S_{ab} koeficientas buvo mažesnis nei <0.900 (*Lactobacillus* sp., 0.880, 0.886; *Enterococcus* sp., 0.863), tai rodo jų priklausomybę nurodytai genčiai (3.5. Lentelė).

3.5. Lentelė. Dalinių 16S rRNR geno sekų, išskirtų iš didžiųjų ančių plonojo žarnyno bakterijų S_{ab} koeficientai, kiekybiškai atspindintys naujai nustatytų sekų panašumą su sekomis, esančiomis EMBL, GenBank ir JDDDB duomenų bazėse.

Bakterijų gentys	Nemuno delta (rudeniai ir pavasariniai migrantai)	
	n	S_{ab} koeficientas
<i>Enterococcus</i> sp.	2	0.863 ± 0.000
<i>Propionibacterium</i> sp.	6	0.989 ± 0.011
<i>Lactobacillus</i> sp.	2	0.883 ± 0.003

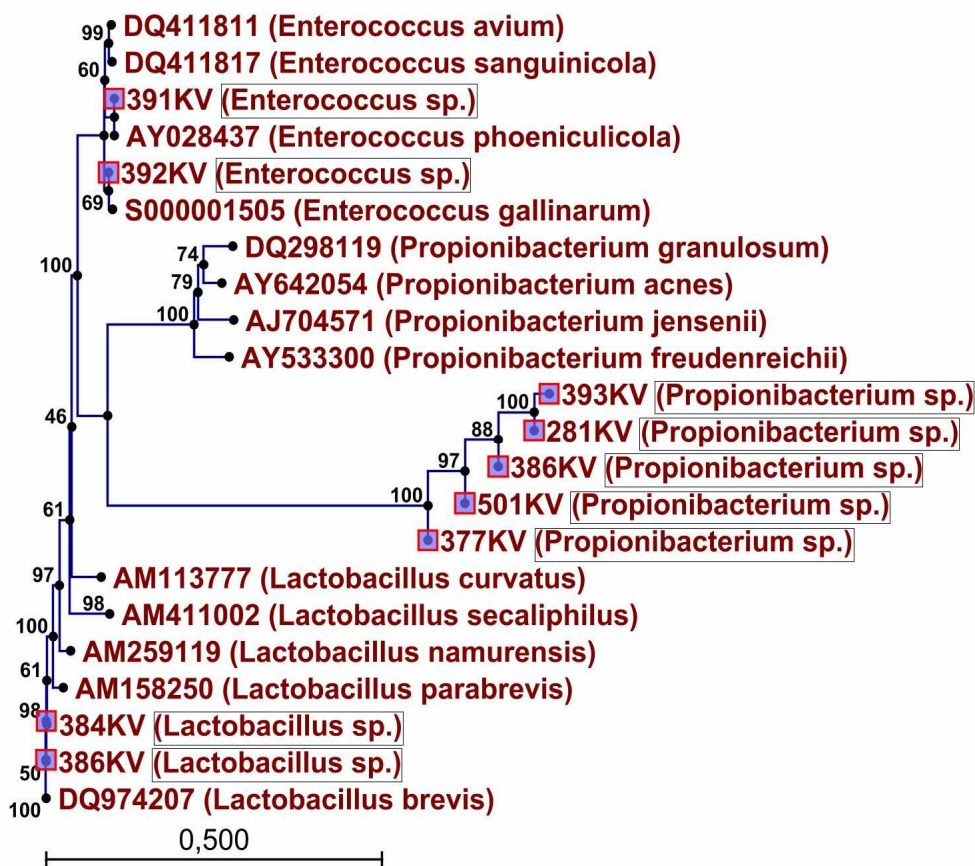
n – nusekvenuotų dalinių 16S rRNR geno sekų skaičius.

Dalinės 16S rRNR geno sekos sekvenavimas įrodo, kad didžiųjų ančių plonajame žarnyne egzistuoja pieno rūgšties bakterijos. Literatūroje yra pateikiama duomenų, apie pieno rūgšties bakterijų egzistavimą naminių didžiųjų ančių virškinamajame trakte (Jankauskienė, 1996), tačiau migruojančių didžiųjų ančių plonajame žarnyne pieno rūgšties bakterijos (*Enterococcus* sp., *Lactobacillus* sp.) buvo nustatytos pirmą kartą (3.5. Lentelė).

Pagal dalinių 16S rRNR geno sekų filogenetinę analizę (3.4. Pav.) 384KV ir 386KV *Lactobacillus* sp. sekos giminingiausios su DQ974207 *Lactobacillus brevis*. 391KV *Enterococcus* sp. seka giminingiausia su AY028437 *Enterococcus phoeniculicola*, o 391KV *Enterococcus* sp. seka su S000001505 *Enterococcus gallinarum*. 393KV, 281KV, 386KV, 501KV, 377KV *Propionibacterium* sp. sekos artimai susijusios su propioninėmis bakterijomis AY533300 *Propionibacterium freudenreichii* ir AY642054 *Propionibacterium acnes*.

Klasikinių mikroorganizmų kultivavimo metodų derinimas su molekuliniais identifikavimo metodais (dalinių 16S rRNR geno sekų analizė) aiškiai parodo pieno rūgšties bakterijų įvairovę didžiųjų ančių (*Anas platyrhynchos*) plonajame žarnyne. Buvo nustatytos *Lactobacillus* sp. ir *Enterococcus* sp. genčių pieno rūgšties bakterijos, priklausančios Firmicutes tipui bei *Propionibacterium* sp. genties propioninės bakterijos, priklausančios Actinobacteria tipui. Remiantis

ištirtų bakterijų kultūrų morfologinėmis ir fiziologinėmis savybėmis padaryta prielaida, kad didžiųjų ančių plonajame žarnyne gali egzistuoti ir keletas kitų genčių pieno rūgšties bakterijų (*Streptococcus* sp., *Pediococcus* sp., *Vagococcus* sp. ar *Lactococcus* sp.). Šio tyrimo rezultatai aiškiai parodo, kad molekuliniai identifikavimo metodai, naudojant universalius bakterijoms 16S rDNR pradmenys ir dalinių 16S rRNR genų sekvenavimas, leidžia nustatyti didžiųjų ančių plonojo žarnyno pieno rūgšties bakterijų ir propioninių bakterijų filogenetinę įvairovę genties arba rūšies lygyje (3.4. Pav.). Be to šių metodų derinimas leidžia nustatyti žarnyno mikrofloros sudėtį priklausomai nuo gyvenamosios aplinkos ir mitybinių sąlygų bei paukščių migracijos.



3.4. Pav. Filogenetinis medis rodantis ištirtų pavasarinių ir rudeninių didžiųjų ančių migrantų plonojo žarnyno sienelių ir jų turinio pieno rūgšties bakterijų dalinių 16S rRNR geno sekų giminingumą (atsitiktinai išskirtų, skirtingų sekų numeriai *** KV) su jau žinomomų bakterijų genčių ir rūšių to paties geno sekomis iš genų banko (nepažymėtos sekos). Skalė rodo genetinę distanciją. Medis sukonstruotas pagal Neighbor-Joining analizę (CLC Free Workbench programa).

Gauti duomenys dar kartą patvirtina ir tai, kad apsauginėse organizmo funkcijose labai svarbią vietą užima jo mikroflora, kurios dalimi yra ir pieno rūgšties bakterijos, galinčios inhibuoti patogeninių mikroorganizmų patekimą į organizmą. Informacija gauta šio tyrimo metu gali būti panaudota išsamesnei pavasarį ir vasarą migruojančių didžiųjų ančių (*Anas platyrhynchos*) virškinimo trakto pieno rūgšties bakterijų analizei.

IŠVADOS

- Pirmą kartą buvo atlikta migruojančių didžiųjų ančių (*Anas platyrhynchos*) pieno rūgšties bakterijų paieška.
- Klasikinių mikroorganizmų kultivavimo metodų derinimas su molekuliniais identifikavimo metodais (t. y. dalinių 16S rRNR geno sekų sekvenavimas) ir filogenetinė analizė parodė, kad tirtos bakterijų kultūros panašiausios į pieno rūgšties (*Lactobacillus* sp., *Enterococcus* sp.) ir propionines (*Propionibacterium* sp.) bakterijas.
- Rudeniniai didžiųjų ančių migrantai tiek plonojo žarnyno sienelėse tiek ir turinyje turi didesnę pieno rūgšties bakterijų skaičių nei pavasariniai migrantai. Tai gali būti siejama su migracijos kryptimis, nes pavasariniai didžiųjų ančių migrantai grįžta perėti iš tolimų žiemojimo vietovių nusilpusiu organizmu, o rudeninių migrantų organizmai yra stiprūs.
- Mažas pieno rūgšties bakterijų skaičius tirtų pavasarinės migracijos didžiųjų ančių plonajame žarnyne rodo paukščių sveikatos būklę ir gali būti siejamas su įvairių ligų pernešimu migruojant iš tolimų žiemojimo vietovių į perimvietes. Mažesnis pieno rūgšties bakterijų skaičius sąlygoja neimuninio atsparumo susilpnėjimą ir patogenų išplitimą.
- Propioninių bakterijų egzistavimas didžiųjų ančių plonajame žarnyne sustiprina neimuninį atsparumą. Egzistuojamos komplekse pieno rūgšties ir propioninės bakterijos produkuoja pieno ir propioninę rūgštis, kurios inhibuoja patogeninius mikroorganizmus.
- Molekuliniai identifikavimo metodai, naudojant universalius 16S rDNR pradmenys ir dalinių 16S rRNR geno sekų sekvenavimas, leidžia nustatyti didžiųjų ančių plonojo žarnyno pieno rūgšties bakterijų ir propioninių bakterijų filogenetinę įvairovę genties arba rūšies lygyje.

PRIEDĒLIAI

1 PRIEDĒLIS:

Buferiniai tirpalai:

Fosfatinio buferio paruošimas (1%, pH 5.0 – 6.0):

Buferis A:

- Dinatrio fosfatas (Na_2HPO_4) 1.4 gm
- Distiliuotas H_2O 100 ml.

Buferis B:

- Natrio dihidrofosfatas (NaH_2PO_4) 1.4 gm
- Distiliuotas H_2O 100 ml.

Sudėtis: įdėti,

- 84.1 ml A buferio,
- 15.9 ml B buferio,
- 8.5 gm NaCl į 1l.

Supilstytas į kolbas buferis autoklavuojamas 30 min. Atvėsintos kolbos saugomos šaldytuve.

50 x TAE buferio ruošimas:

- Ledinė acto rūgštis 57 ml
- Tris 242 g
- 0,5 M EDTA (pH 8,0) 100 ml
- dist. H_2O iki 1000 ml

2 PRIEDĒLIS:

Naudota paruošta MRS mitybinė terpė (Oxoid, UK).

Vienam litrui dist. H_2O atsveriami 62 g sausos MRS terpės ir ištirpinama maišant magnetine maišykle. Terpės yra pH 6.5 +/- 0.2 prie 37 °C. Išmaišius ir pamatavus pH kaitinama kol užvirs. Šiek tiek atvėsusi terpė supilstoma į kolbas po 300 ml. Kolbos uždengiamos kamščiais ir autoklavuojamos 15 – 20 min prie 121 °C temperatūros. Išautoklavuota ir atvėsinta terpė po 15 – 20 cm^3 išpilstoma į Petri lėkšteles ir palaukiama kol sustings.

Sustingusi MRS terpė turi būti saugoma ne aukštesnėje nei 8°C temperatūroje ir nuo šviesos. Dehidratuota MRS terpės saugoma 2 – 25°C temperatūroje.

3 PRIEDĖLIS:

Dažymo Gramo būdu medžiagos (Hukerio modifikacija) (Doetsch, 1981):

Kristalvioleto tirpalas:

- Ištirpinami 2 g kristalvioleto 20 ml 95 % etanolio,
- Ištirpinama 0.8 g amonio oksalato 80 ml distiliuoto vandens,
- Šie du tirpalai sumaišomi.

Liugolio jodas:

- Jodas 1g
- Kalio jodidas 2g
- Distiliuotas vanduo 300 ml
- Kietosios medžiagos kartu sutrinamos grustuve. Supilama į vandenį ir uždaramė inde išmaišoma, kad ištirtų.

Safranino pakartotinio dažymo tirpalas:

Pradinis tirpalas:

- Safraninas O 2.5 g
- 95 % etanolis 100 ml
- Sumaišoma ir laikoma.

Praskiedžiama 1:10 norint gauti darbinį tirpalą.

4 PRIEDĖLIS:

Angliavandenių fermentavimo testas Hugh ir Leifson terpėje (Hugh and Leifson, 1953)¹:

Pagrindinė terpė:

- KCl 0.2 g
- MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g
- NH₄H₂PO₄ 1.0 g
- Difco bacto peptonas 1.0 g
- Difco bacto išgrynintas agaras 3.0 g
- D (+)gliukozė (monohidratas) 10.0 g
- Bromtimolo mėlis 0.03 g
- Distiliuotas vanduo 1 litras

Sumaišoma su 1N KOH ir nustatoma, kad pH būtų apie 6.0. Paruošta terpė išpilstoma į mėgintuvėlius 10 ml. Sterilizuojama autoklave 10 minučių 115 °C temperatūroje.

¹ <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/lt/dd/03/15/31993L0085LT.pdf>

NAUDOTA LITERATŪRA

1. Barnes, E. M., Phil, D., Bad, D. (1972). The avian intestinal flora with particular reference to the possible ecological significance of the cecal anaerobic bacteria. *The American Journal of clinical Nutrition*. Vol. 19. p. 1475-1479.
2. Barras, W. (2000). Understanding probiotics.
3. Beasley, S. (2004). Isolation, identification and exploitation of lactic acid bacteria from human and animal microbiota. Department of Applied Chemistry and Microbiology. Helsinki. *Academic Dissertation in Microbiology*. p. 6-11.
4. Bluzmanas, P., Ragavičius, A. (1987). Mikrobiologija ir virusologijos pagrindai. Leidykla "Mokslas". Vilnius. p. 22-37.
5. Breuer, B., Radler, F. (1996). Inducible resistance against nisin in *Lactobacillus casei*. *Research Microbiology*. Vol. 165. p. 114-118.
6. Breukink, E., van Heusden, H. E., Vollmerhaus, P. J., Swiezewska, E., Brunner, L., Walker, S., Heck, A. J. R., Kruijff, B. (2003). Lipid II is an intrinsic component of the pore induced by nisin in bacterial membranes. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 278. p. 19898-19903.
7. Boris, S., Suarez, J. E., Vazquez, F., Barbes. (1998). Adherence of human vaginal lactobacilli to vaginal epithelial cells and interaction with uropathogens. *Infection and Immunity*. Vol. 66. p. 1985-1989.
8. Butcher, G. D. and Richard, D. M. (2003). The avian immune system. University of Florida. Ifas extension. p. 1-3.
9. Carpenter, S. (2004). Avian Immune System. Volume IV, Devoted to Health and Healing of Avian Mind, Body, Spirit. Spring. Issue 1.
10. Carvalho, L. D., Farias, L. M., Nicolli J. R., Silva, M. C. F, Corsino, A. T. S. M, Lima, L. A., Redondo, R. A. F., Ferreira, P. C. P., Pinto, M. E. B. M. (2003). Dominant culturable bacterial microbiota in the digestive tract of the american black vulture (*Coragyps atratus*) and search for antagonistic substances. *Brazilian Journal of Microbiology*. Vol. 34. p. 218-224.
11. Cavazzoni, V., Adami, A., Castrovilli, C. (1998). Performance of broiler chickens supplemented with *Bacillus coagulans* as probiotic. *Poultry Science*. Vol. 39. p. 526-529.
12. Clench, M. G. and Mathias, J. R. (1995). The avian cecum: A Review. *Wilson Bull*. Vol. 107. p. 93 -121.

-
13. Denli, M., Okan, F., Celik, K. (2003). Effect of dietary probiotic, organic acid and antibiotic supplementation to diets on broiler performance and carcass yield. *Pakistan Journal of Nutrition*. Vol. 2. p. 89–91.
 14. Doetsch, R. N. (1981). Determinative methods of light microscopy. V: Manual of methods for general bacteriology. *American Society for Microbiology*. p. 21–23.
 15. Fritts, C. A., Kersey, J. H., Motl, M. A. et al. (2000). *Bacillus subtilis* C-3102 (Calsporin) improves live performance and microbiological status of broiler chickens. *Journal of Applied Poultry Research*. Vol. 9. p. 149–155.
 16. Godon, J. J., Zumstein, E., Dabert, P., Habouzit, F., Moletta, R. (1997). Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 63. No. 7. p. 2802–2813.
 17. Gružasuskas, R., Lekavičius, R., Racevičiūtė Stulpelienė, A., Šašytė, V., Tėvelis, V., Švirmickas, G. J. (2004). Viščiukų broilerių virškinimo proceso optimizavimas simbiotiniais preparatais. *Veterinarija ir zootechnika*. Nr. 28. p. 50.
 18. Holben, E., Williams, P., Saarinen, W. M., Särkilähti, L. K., Apajalahti, J. H. A. (2002). Phylogenetic analysis of intestinal microflora indicates a novel *Mycoplasma* phylotype in farmed and wild salmon. *Microbial Ecology*. Vol. 44. p. 175–185.
 19. Homma, H., Shinohara, T. (2004). Effects of probiotic *B.cereus toyoi* on abdominal fat accumulation in the Japanese quail (*C. japonica*). *Animal Science Journal*. Vol. 75. p. 37–41.
 20. Hugh, R., and Leifson, F. (1953). The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative bacteria. *The Journal of Bacteriology*. Vol. 66. p. 24 – 26.
 21. Jankauskienė, R. (1996). Lactoflora of carp (*Cyprinus carpio* L.) intestinal tract. Natural sciences: biology (ecology). *Institute of Ecology*. Vilnius. p. 78-83.
 22. Jatkauskas, J. ir Vrotniakienė, V. (2006). Mitybinių medžiagų panaudojimas šeriant melžiamas karves silosu, pagamintu su *Lactobacillus rhamnosus* ir *Propionibacterium freudenreichii* priedu. *Veterinarija ir zootechnika*. Nr. 36. p. 58.
 23. Jordan, R. and Howard, V. (1992). Modern Hand-feeding and Nursery Management, Silvio Mattacchione & Co., Ontario, Canada.
 24. Kuipers, O. P., Buist, G., Kok, J. (2000). Current strategies for improving food bacteria. *Research Microbiology*. Vol. 151. p. 815-822.
 25. Lee, M. D., Lu, J., Idris, U., Harmon, B. (2002). Microbial Dynamics of the Broiler Intestinal Tract. *The Elanco Global Enteritis Symposium*. p. 9-11.

-
26. Lietuvos fauna (1 paukščiai). (1990). Vilnius „Mokslas“. p. 66, 91-95.
27. Liu, J. and Moon, N. J. (1982). Commensalistic Interaction Between *L. acidophilus* and *Propionibacterium shermanii*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 44. N. 3. p. 715.
28. Malinen, B. E. (2002). Molecular methods for detection of probiotics and intestinal microbiota, and evaluation of *Lactobacillus brevis* as a potential probiotic dietary adjunct. Helsinki. *Faculty of Veterinary Medicine*. p. 9-26.
29. Mantovani, H. C., Russell, J. B. (2001). Nisin resistance of *Streptococci bovis*. *Applied Environmental Microbiology*. Vol. 67. p. 808-813.
30. Mėgelaitis, Ž. (2005). Subalansuota žarnyno mikroflora gali apsaugoti nuo daugelio ligų. *Farmacija ir laikas*. Nr. 2. p. 64-66.
31. McCarthy, R. J., and Courtney, P. (2004). Amino acid requirements of dairy *Propionibacterium* strains. Ohio State University.
32. McPherson M. J. and Moller S. G. (2000). *Bios Scientific Publishers Limited*.
33. Morishita, Y., T. Mitsuoka, C. Kaneuchi, S. Yamamoto. (1971). Specific establishment of lactobacilli in the digestive tract of germ-free chickens. *Japanese Microbiology*. Vol. 15. p. 531-538.
34. Oberauskas, V., Sutkevičienė, R., Kantautaitė, J., Sederevičius, A. (2004). *Lactobacillus plantarum* ir *L. fermentum* įtaka bendram naujagymių veršelių laktobacilų ir enterobakterijų kiekiui fekalijose. *Veterinarija ir zootechnika*. Nr. 25. p. 25-28.
35. O'Sullivan, D. J. (2000). Methods for Analysis of the Intestinal Microflora. *Curr. Issues Intestinal Microbiology*. Vol. 1. p. 39-50.
36. O'Sullivan, L., Ross, R. P., Hill, C. (2002). Review: Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie*. Vol. 84. p. 593-604.
37. Ouwehand, A. C., Salminen, S., Roberts, P. J., Ovaska, J., Salminen, E. (2003). Disease-dependent adhesion of lactic acid bacteria to the human intestinal mucosa. *Immunology*. Vol. 10. p. 643-646.
38. Paco, R. S., Leme, I. L., Bottino, J. A., Ferreira, A. J. P. (2003). Identification of *Lactobacillus* sp. From broiler litter in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. Vol. 34. p. 236-237.
39. Paulauskas, A., Miceikienė, I., Grigaliunaitė, L., Malavičiūtė, J., Tubelytė – Kirdienė, V. (2002). Genetikos praktimumas: IV. DNR polimorfizmo tyrimo metodai (Mokymo priemonė). Kaunas: Vytauto Didžiojo universiteto leidykla. p. 17-61.

-
40. Pavilionis, A., Čerkašina-Lasinskaitė, A., Pavilonytė, Ž. (2005). Probiotikų klinikinio vartojimo pagrindumas. Kauno medicinos universitetas Mikrobiologijos katedra. p. 1-11.
 41. Pečiulis, J. (1994). Mikrobiologijos praktikos vadovas. Leidybos centras. Vilnius. p. 41-221.
 42. Salminen, S., A. Ouwehand, Y. Benno, Y.K. Lee. (1999). Probiotics: how should they be defined? *Trends Food Science and Technology*. Vol. 10. p. 107-110.
 43. Salminen, M. K. H., Rautelin, S., Tynkkynen, T., Poussa, M., Saxelin, V., Valtonen, A. Järvinen. (2004). *Lactobacillus* bacteremia, clinical significance and patient outcome, with special focus on probiotic *L. rhamnosus* GG. *Clinical Infectious Diseases*. Vol. 38. p. 62-69.
 44. Skrodenytė-Arbačiauskienė, V. (2000). Proteolytic activity of the roach (*Rutilus rutilus* L.) intestinal microflora. *Acta Zoologica Lituanica*. Vol. 10. p. 69-77.
 45. Stiles, ME and Holzapfel, WH (1997) Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 36. p. 1–29.
 46. Šimkus, Š. (2004a). Normali prieskrandžių mikroflora – sveikesni veršeliai. Lietuvos veterinarijos akademija. *Žurnalas Mano Ūkis*. Nr. 8.
 47. Šimkus, Š. (2004b). Probiotikai naudingi ir žmonėms, ir gyvuliams. Lietuvos veterinarijos akademija. *Žurnalas Mano Ūkis*. Nr. 9.
 48. Varna, K. (2006). Didžiųjų ančių (*Anas platyrhynchos*) sėklių ir migruojančių populiacijų genetinės įvairovės palyginimas naudojant mikrosatelitinius pradmenis. *Magistro darbas*. Vilnius. p. 44-47.
 49. Waldroup, P. W., Fritts, C. A., Yan, F. (2003). Utilization of Bio-Mos Mannanoligo saccharide and Bioplex copper in broiler diets. *Journal of Poultry Science*. Vol. 2. p. 44–52.

NUORODOS

1. <http://www.bifoal.lt/files/Press.doc>
2. <http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/maa/skemi/vk/beasley/isolatio.pdf>
3. <http://ausis.gf.vu.lt/pub/kb/Bio%20bio/Referatai%202006/Gnotobiologija%20ir%20gnotobiontai%20%5BGU%5D.doc>
4. <http://ausis.gf.vu.lt/pub/kb/Bio%20bio/Referatai/Zmogaus%20zarnyno%20bakterioflora/Zarnyno%20bakterioflora.doc>
5. <http://www.open-access-biology.com/probiotics/osullivan/osullivan.html>
6. http://images.katalogas.lt/maleidykla/Zem64/Zem_068_074.pdf
7. <http://www.manoukis.lt/index.php?m=1&z=24&s=458>
8. http://www.lva.lt/vetzoo/old/Nr_25/pdf/oberlauskas.pdf
9. <http://www.manoukis.lt/index.php?m=1&s=432&z=23>
10. <http://www.holisticbirds.com/hbn04/spring04/immunesystem.htm>
11. <http://edis.ifas.ufl.edu/VM016>
12. <http://www.micdev.com/pdfs/FlightPath%20Factsheet.pdf>
13. <http://www.ajcn.org>
14. http://www.lva.lt/vetzoo/old/Nr_28/lt/gruzauskas.pdf
15. <http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/ela/perus/vk/malinen/molecula.pdf>
16. <http://www.poultry-health.com/fora/inthelth/pdfs/lee02.pdf>
17. <http://elibrary.unm.edu/sora/Wilson/v107n01/p0093-p0121.pdf>
18. <http://www.scielo.br/pdf/bjm/v34n3/v34n3a10.pdf>
19. <http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Propionibacterium>
20. <http://www.cagenbird.com/probiotics.htm>
21. <http://www.microbialdevelopments.com>
22. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/>
23. <http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Propionibacterium>
24. http://web.umn.edu/~microbio/BIO221_1998/P_acnes.html
25. <http://www.clcbio.com/index.php?id=479>
26. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
27. http://www.vgtu.lt/leidiniai/elektroniniai/Bioinžinerija/Eksperimentiniutyrimu_pagrindai.pdf
28. <http://www.ibt.lt/lithuanian/nuorodos.htm>
29. <http://www.icp.ucl.ac.be/~opperd/private/neighbor.html>

-
30. <http://www.ebi.ac.uk/clustalw>
 31. <http://www.ebi.ac.uk>
 32. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/index.html>
 33. <http://getentry.ddbj.nig.ac.jp/>
 34. <http://www.ebi.ac.uk/fasta33/>
 35. http://lt.wikipedia.org/wiki/Gramo_da%C5%BEymas
 36. http://www.emdchemicals.com/analytics/Micro_Manual/TEDISdata/prods/1106610500.html
 37. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/lt/dd/03/15/31993L0085LT.pdf>
 38. <http://www.vgtu.lt/leidiniai/elektroniniai/Bioinzinerija/m3-1.pdf>
 39. <http://species.wikimedia.org/wiki/Anas>
 40. <http://www.bioline.org.br/request?cc05007>
 41. <http://species.wikimedia.org/wiki/Lactobacillales>
 42. <http://www.geocities.com/mtmccue2000/propionibacterium.html>
 43. <http://elibrary.unm.edu/sora/Wilson/v107n01/p0093-p0121.pdf>
 44. <http://www.scielo.br/pdf/bjm/v34n3/v34n3a07.pdf>
 45. http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi
 46. <http://www.lva.lt/vetzoo/data/vols/2006/36/lt/jatkauskas.pdf>
 47. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=242081>
 48. <http://www.mansfield.ohio-state.edu/~sabedon/biol4038.htm>

PADĖKA

Dėkoju savo darbo vadovams prof. habil. dr. Aniolui Sruogai ir dr. Vestai Skrodenytei-Arbačiauskienei už suteiktą galimybę atlikti magistro darbą Vilniaus Universiteto Ekologijos Institute, Hidrobiontų Ekologijos ir Fiziologijos Laboratorijoje bei Populiacinės Genetikos Laboratorijoje, už sudarytas geras darbo sąlygas, įgytas žinias, vertingas pastabas bei kantrumą. Ačiū visam kolektyvui už visokeriopą pagalbą.

SANTRAUKA

Pienarūgščių bakterijų paieška ir jų identifikavimas migruojančių didžiųjų ančių (*Anas platyrhynchos*) žarnyne naudojant dalinių 16S rRNR geno sekų analizę ir kultivavimu paremtus metodus

Klaidas VARNA

Vilniaus Universiteto Ekologijos Institutas, Hidrobiontų Ekologijos ir Fiziologijos Laboratorija bei Populiacinės Genetikos Laboratorija, Akademijos-2, Vilnius-21, 08412, Lietuva.

Šiame tyrime pavasariinių ir rudeninių didžiųjų ančių (*Anas platyrhynchos*) migrantų iš Nemuno deltos virškinamojo trakto pieno rūgšties bakterijų įvairovė buvo ištirta naudojant molekulinis metodus (polimerazės grandininės reakcijos amplifikacija ir dalinių 16S rRNR geno sekų sekvenavimas) ir kultivavimu paremtus metodus. Migruojančių didžiųjų ančių (*Anas platyrhynchos*) pieno rūgšties bakterijų paieška buvo atlikta pirmą kartą. Rudeniniai didžiųjų ančių migrantai plonojo žarnyno sienelėse (1.2×10^7 iki 2.1×10^7 k.f.v./g) ir jų turinyje (nuo 3.4×10^7 iki 1.1×10^8 k.f.v./g) turi didesnę pieno rūgšties bakterijų skaičių nei pavasariniai migrantai (atitinkamai nuo 3.2×10^6 iki 4.8×10^6 k.f.v./g ir nuo 1.0×10^7 iki 2.2×10^7 k.f.v./g). Tiek rudeninių tiek ir pavasariinių didžiųjų ančių migrantų plonojo žarnyno sienelėse ir jų turinyje dominavo kokinės pieno rūgšties bakterijų formos (atitinkamai 65% ir 83.5% bei 81.4% ir 91.6%), o lazdelių buvo mažiau (atitinkamai 35% ir 16.5% bei 18.6% ir 8.4%). Manoma, kad minėtus skirtumus įtakoja keli veiksniai: ilgai trunkanti migracija, perėjimo periodas, skirtingas maistas ir aplinkos sąlygos. Didesnis pieno rūgšties bakterijų skaičius migruojančių didžiųjų ančių plonajame žarnyne rodo paukščių sveikatos būklę, sąlygoja neimuninio atsparumo susilpnėjimą ir patogenų išplitimą. Atlikus filogenetinę migruojančių didžiųjų ančių plonojo žarnyno sienelių ir jų turinio pieno rūgšties bakterijų analizę, nustatytos *Enterococcus* sp. (S_{ab} koeficientas 0.863 ± 0.000) ir *Lactobacillus* sp. (S_{ab} koeficientas 0.883 ± 0.003) gentys. Taip pat buvo identifikuota *Propionibacterium* sp. (S_{ab} koeficientas 0.989 ± 0.011) gentis. Informacija gauta šio tyrimo metu rodo, kad šie rezultatai gali būti panaudoti išsamesnei migruojančių didžiųjų ančių virškinimo trakto pieno rūgšties bakterijų analizei.

RAKTAŽODŽIAI: 16S rRNR geno sekvenavimas, žarnyno mikrobiota, didžioji anti.

SUMMARY

Identification of lactic acid bacteria in the migrant mallard ducks *Anas platyrhynchos* intestinal tract by partial 16S rRNA gene sequence analysis and using culture-based techniques

Klaidas VARNA

Institute of Ecology of Vilnius University, Laboratory of Hydrobionts Ecology and Physiology, Laboratory of Population Genetics, Akademijos-2, Vilnius-21, 08412, Lithuania.

In this study the lactic acid bacteria diversity of the intestinal tract content of the vernal and autumnal migrant mallard ducks (*Anas platyrhynchos*) from Nemuno delta has been investigated by molecular methods: polymerase chain reaction amplification and sequencing of partial 16S rRNA genes and using culture-based techniques. The investigation of the lactic acid bacteria of the migrant mallard ducks has been performed the first time. Autumnal migrant mallard ducks in the small intestine walls (from 1.2×10^7 until 2.1×10^7 c.f.u./g) and in their content (from 3.4×10^7 until 1.1×10^8 c.f.u./g) have the greatest number of the lactic acid bacteria then vernal migrants (respectively from 3.2×10^6 until 4.8×10^6 c.f.u./g and from 1.0×10^7 until 2.2×10^7 c.f.u./g). In the small intestine walls and in their content of the autumnal and vernal migrant mallard ducks, dominated cocci-shaped lactic acid bacteria (respectively 65% and 83.5%, 81.4% and 91.6%), whereas rod-shaped was under (respectively 35% and 16.5%, 18.6% and 8.4%). Supposedly, that these differences determine some factors: a long migration, period of incubate, different feeds and environmental conditions. Little number of the lactic acid bacteria in the small intestines of the vernal migrant mallard ducks suggest birds state of health, determine failure of non-immunic resistance and outspread of pathogenic microorganisms. Predominant lactic acid bacteria detected in the small intestine and in their content of the vernal and autumnal migrant mallard ducks by filogenetic analysis were genera of *Enterococcus* sp. (S_{ab} score was 0.863 ± 0.000) and *Lactobacillus* sp. (S_{ab} score was 0.883 ± 0.003) Also has been identified genus of *Propionibacterium* sp. (S_{ab} score was 0.989 ± 0.011). The data obtained in the present work suggest that these results may be used in making more comprehensive analysis of the lactic acid bacteria of the intestinal tract of the migrant mallard ducks (*Anas platyrhynchos*).

KEY WORDS: 16S rRNA gene sequencing, intestinal microbiota, mallard duck.