

Antimikrobno djelovanje bakterijskih sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka

Leko, Lucija

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:684102>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-12**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Lucija Leko

0058214683

**ANTIMIKROBNO DJELOVANJE BAKTERIJSKIH SOJEVA
IZOLIRANIH IZ MAJČINOG MLIJEKA**

ZAVRŠNI RAD

Naziv znanstveno-istraživačkog projekta ili stručnog projekta: Ovaj završni rad izrađen je u sklopu projekta kojeg financira Hrvatska zaklada za znanost „Potencijalne terapijske biomolekule druge generacije probiotika“ (IP-2019-04-2237; 2019.-2023.)

Mentor: prof. dr. sc. Jagoda Šušković

Zagreb, 2021.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura

Znanstveno područje: Biotehnološke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Antimikrobno djelovanje bakterijskih sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka

Lucija Leko, 0058214683

Sažetak: Mnogi sojevi bakterija mliječne kiseline pokazuju antimikrobno djelovanje pa pronalaze potencijal kao starter kulture, biokonzervansi, probiotici ili kao zamjena antibioticima. Cilj ovog rada bio je ispitati antimikrobno djelovanje sojeva *Lactobacillus plantarum* KR19 i *Lactobacillus plantarum* MC19 izoliranih iz majčinog mlijeka prema srodnim bakterijama mliječne kiseline i prema patogenim bakterijama te njihovu kompetitivnu ekskluziju prema bakteriji *E. coli* 3014. Ispitivanje antimikrobnog djelovanja provedeno je trima metodama: metodom s rupama u agaru, metodom s dvostrukim slojem agara i turbidimetrijskom metodom. Rezultati pokazuju snažno inhibicijsko djelovanje oba soja prema patogenim bakterijama. Kompetitivna ekskluzija ispitana je pomoću Caco-2 stanične linije pri čemu su oba soja pokazala uspješnu inhibiciju adhezije *E. coli*, pri čemu je soj *Lactobacillus plantarum* MC19 imao jače djelovanje. Dobiveni rezultati ukazuju na potencijal primjene sojeva *Lb. plantarum* KR19 i *Lb. plantarum* MC19 kao probiotika.

Ključne riječi: antimikrobno djelovanje, bakterije mliječne kiseline, bakteriocini

Rad sadrži: 33 stranice, 17 slika, 6 tablica, 35 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Jagoda Šušković

Pomoć pri izradi: Martina Banić, mag. ing. biotechn.,
Nina Čuljak, mag. ing. biotechn.

Datum obrane: 9. srpnja 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor Thesis

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

Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Antibiotic, Enzyme, Probiotic and Starter Cultures Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Antimicrobial activity of bacterial strains isolated from breast milk

Lucija Leko, 0058214683

Abstract: Many strains of lactic acid bacteria exhibit antimicrobial activity, so they have potential as starter cultures, biopreservatives, probiotics or as a substitute for antibiotics. The aim of this research was to examine the antimicrobial activity of *Lactobacillus plantarum* KR19 and *Lactobacillus plantarum* MC19, strains isolated from breast milk, against related lactic acid bacteria and against pathogenic bacteria as well as competitive exclusion of *E. coli* 3014. Antimicrobial activity assay was carried out by three methods: agar well diffusion method, agar spot test method and broth microdilution assay. The results show a strong inhibition effect of both strains towards pathogenic bacteria. Competitive exclusion was tested using Caco-2 cell line, with both strains showing successful inhibition of *E. coli* adhesion, with the *Lactobacillus plantarum* MC19 strain having a stronger effect. The obtained results indicate potential for application of *Lb. plantarum* KR19 and *Lb. plantarum* MC19 strains as probiotics.

Keywords: antimicrobial activity, bacteriocins, lactic acid bacteria

Thesis contains: 33 pages, 17 figures, 6 tables, 35 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: PhD Jagoda Šušković, Full professor

Technical support and assistance: Martina Banić, mag. ing. biotechn.
Nina Čuljak, mag. ing. biotechn.

Defence date: July 9th 2021

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Jagode Šušković, a uz pomoć Martine Banić, mag. ing. biotechn. i Nine Čuljak, mag. ing. biotechn. Rad je izrađen u okviru projekta kojeg financira Hrvatska zaklada za znanost „Potencijalne terapijske biomolekule druge generacije probiotika“ (IP-2019-04-2237; 2019.-2023.) kojeg je voditeljica prof. dr. sc. Blaženka Kos.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Bakterije mliječne kiseline	2
2.2. Antimikrobni učinak bakterija mliječne kiseline	3
2.3. Bakteriocini	4
2.3.1. Bakteriocini prve skupine - lantibiotici.....	5
2.3.2. Bakteriocini druge skupine – nelantibiotici.....	6
2.3.3. Bakteriocini treće skupine – bakteriolizini.....	7
2.3.4. Biosinteza bakteriocina.....	7
2.3.5. Mehanizam djelovanja	8
2.4. Primjena bakterija mliječne kiseline i bakteriocina	9
3. MATERIJALI I METODE	11
3.1. MATERIJALI	11
3.1.1. Radni mikroorganizmi	11
3.1.2. Hranjive podloge	12
3.1.3. Kemikalije	12
3.1.4. Aparatura i pribor	13
3.2. METODE	13
3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama i staničnih linija	14
3.2.2. Metoda s dvostrukim slojem agara (<i>engl.</i> agar spot-test method)	14
3.2.3. Metoda difuzije s rupama u agaru (<i>engl.</i> agar well-diffusion method).....	15
3.2.4. Turbidimetrijska metoda određivanja antibakterijske aktivnosti.....	15
3.2.5. Ispitivanje kompetitivne ekskluzije patogenih bakterija sa sojevima BMK primjenom Caco-2 stanične linije.....	16
4. REZULTATI I RASPRAVA	18
4.1. Antimikrobno djelovanje sojeva <i>Lb. plantarum</i> KR19 i <i>Lb. plantarum</i> MC19.....	18
4.2. Kompetitivne ekskluzije patogenih bakterija sa sojevima BMK.....	27
5. ZAKLJUČCI.....	29
6. LITERATURA	30

1. UVOD

Bakterije mliječne kiseline (BMK) su skupina nepatogenih, Gram-pozitivnih mikroorganizama koji proizvode mliječnu kiselinu kao glavni produkt fermentacije, a mogu se naći u gastrointestinalnom i urogenitalnom traktu te majčinom mlijeku ljudi i životinja. Većina BMK sadrži GRAS (Generally Regarded As Safe) status zbog čega imaju veliki biotehnološki potencijal u prehrambenoj industriji kao biokonzervansi u svrhu zaštite hrane, a primjenu pronalaze i kao probiotici (Alvarez-Sieiro i sur., 2016).

Probiotici se definiraju kao živi mikroorganizmi koji, primijenjeni u dovoljnoj količini, djeluju korisno na domaćina. Održavaju ravnotežu mikroflore probavnog sustava, sprečavaju invaziju patogena i aktiviraju imunološki sustav (Jiang i sur., 2016). U majčinom mlijeku se pronalaze razni probiotički sojevi BMK iz rodova *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* i *Lactobacillus*. Majčino mlijeko je dobar izvor korisnih molekula poput imunoglobulina, laktoferina, lizozima, masnih kiselina, antimikrobnih peptida i probiotičkih mikroba čime može utjecati na metaboličke i funkcionalne aktivnosti gastrointestinalnog sustava novorođenčadi i odraslih (Mohammadi i sur., 2018). Potencijalni probiotici moraju zadovoljiti nekoliko zahtjeva kao što su nepatogenost, funkcionalnost odnosno preživljavanje u gastrointestinalnom traktu i svojstvo adhezije na crijevni epitel, proizvodnja mliječne kiseline i bakteriocina te antagonističko djelovanje prema patogenima (Pinto i sur., 2020). Od raznih antimikrobnih tvari koje proizvode BMK, bakteriocini (ribosomski sintetizirani peptidi) privlače najveću pažnju zbog svoje velike raznolikosti čime pokazuju antimikrobno djelovanje prema širokom spektru bakterija što ih čini potencijalnom zamjenom za antibiotike (Simons i sur., 2020).

U ovom radu je ispitano antimikrobno djelovanje BMK *Lactobacillus plantarum* KR19 i *Lactobacillus plantarum* MC19, izoliranih iz majčinog mlijeka, prema odabranim patogenim mikroorganizmima te prema odabranim srodnim BMK. Za ispitivanje su primijenjene metoda s dvostrukim slojem agara, metoda difuzije s rupama u agaru i turbidimetrijska metoda. Osim toga, ispitana je i kompetitivna ekskluzija navedenih sojeva, kao potencijalnih probiotičkih sojeva, prema bakteriji *E. coli* 3014 primjenom Caco-2 stanične linije.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Bakterije mliječne kiseline

Bakterije mliječne kiseline su heterogena skupina bakterija koja je ime dobila prema glavnom proizvodu fermentacije, mliječnoj kiselini. Važna su skupina industrijskih mikroorganizama čija tržišna vrijednost iznosi više milijardi američkih dolara (Hatti-Kaul i sur., 2018). Imaju ulogu u proizvodnji i očuvanju fermentirane hrane, a mnoge imaju status probiotika, odnosno održavaju i promoviraju zdravlje potrošača. Fermentacija šećera, povećanje kiselosti i proizvodnja sekundarnih metabolita razlozi su što se BMK od davnina koriste kao starter kulture radi poboljšanja teksture, okusa i trajnosti fermentirane hrane i hrane za životinje (Arena i sur., 2018).

To su Gram-pozitivne, nesporigene, anaerobne, većinom nepokretne bakterije, štapičaste (bacili) i okruglaste (koki) morfologije s niskim G+C (guanidin + citozin) DNK udjelom. Optimum rasta im je pri pH vrijednostima 5,5 – 5,8 te zahtijevaju kompleksne hranjive podloge sa specifičnim nutrijentima poput raznih aminokiselina, vitamina, minerala i sl. (Daba i Elkhateeb, 2020; Ringø i sur., 2018). Taksonomski pripadaju koljenu Firmicutes, razredu Bacili i redu Lactobacillales. Uključuju više porodica poput *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* i *Streptococcaceae*, preko 30 rodova i više od 300 vrsta. Rod *Bifidobacterium* (porodica *Bifidobacteriaceae*) se također ubraja u BMK iako pripada koljenu Actinobacteria (Mora-Villalobos i sur., 2020).

BMK ne posjeduju funkcionalni respiratorni sustav pa energiju dobivaju fosforilacijom na razini supstrata koristeći jedan od dva metabolička puta fermentacije šećera, homofermentativni i heterofermentativni put (Mora-Villalobos i sur., 2020). Mliječna kiselina je glavni produkt fermentacije homofermentativnih BMK (rodovi *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* *Pediococcus* te određene vrste roda *Lactobacillus*), poznat kao Embden-Meyerhof put koji daje 2 mola mliječne kiseline po molu glukoze. Homofermentativne bakterije se prebacuju na fermentaciju smjese kiselina u uvjetima ograničenja ugljika i niskih stopa rasta. Povećanje aktivnosti NADH oksidaze, u prisutnosti kisika, dovodi do natjecanja za slobodni NADH, a time i promjene metabolizma dajući smjesu produkata kao rezultat razgradnje šećera. Heterofermentativne bakterije (rodovi *Leuconostoc* i *Weissella* te određene vrste roda *Lactobacillus*) putem pentozna fosfata osim mliječne kiseline proizvode ugljikov dioksid i etanol ili octenu kiselinu (Hatti-Kaul i sur., 2018).

Uzrok velikog interesa i potencijala BMK i njihovih metabolita je GRAS status što ih čini sigurnima za ljudsku upotrebu. Bakteriocini koje proizvode su aktivni u širokom rasponu pH, a

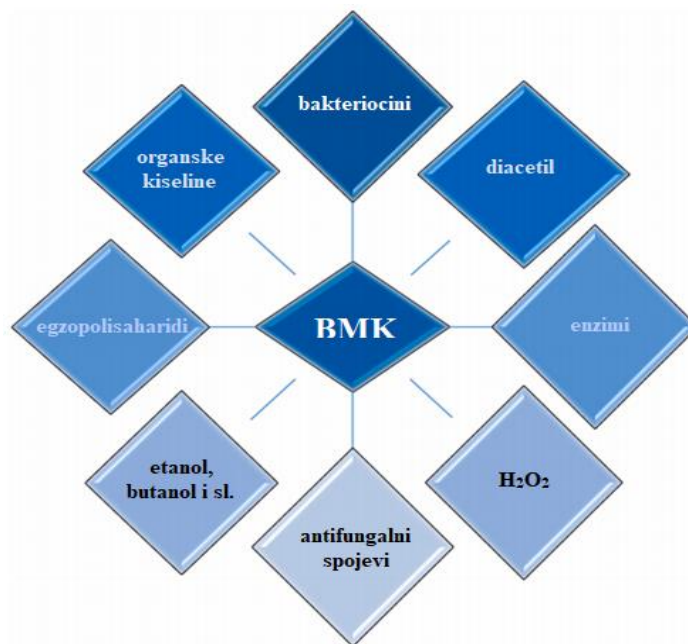
uz to su metaboliti bez boje, okusa i mirisa što ih čini prihvatljivim dodacima hrani (Ringø i sur., 2018). Metabolizam BMK ima povoljan utjecaj na teksturu i okus fermentirane hrane. Spojevi poput diacetila, etanola i dr. poboljšavaju okus, a proizvedeni polisaharidi poboljšavaju viskoznost i teksturu fermentiranih mliječnih proizvoda. Osim toga, mnoge BMK proizvode spojeve koji imaju nutritivnu vrijednost za ljude, uključujući neke B vitamine (Hati i sur., 2013). BMK pokazuju svojstvo kompetitivne ekskluzije dodatkom u gastrointestinalni trakt životinja što rezultira smanjenjem broja patogena, izravnom ili neizravnom kompeticijom prema nutrijentima i prijanjanjem na mjesta vezanja u crijevima. Ti probiotički sojevi mogu stvarati biofilmove i komunicirati kroz *quorum sensing* proizvodnjom i otpuštanjem autoinduktora što onemogućava patogenim bakterijama prijanjanje na crijevnu sluznicu i širenje patogene populacije (Vieco-Saiz i sur., 2019).

Genom im je male veličine u rasponu od 1,23 Mb (*Lactobacillus sanfranciscensis*) do 4,91 Mb (*Lactobacillus parakefiri*). Posjeduju bogat skup genetskih elemenata poput plazmida i konjugacijskih transpozona koji kodiraju razne funkcije poput metabolizma laktoze i citrata, rezistencije na bakteriofage, proizvodnje bakteriocina i proteolize. Osim toga, CRISPR i pridruženi *cas* geni su rašireni u genomima brojnih BMK te pružaju adaptivni imunitet protiv potencijalno štetne strane DNK, na primjer, iz bakteriofaga i plazmida prisutnih u okruženju koje naseljavaju (Hatti-Kaul i sur., 2018).

2.2. Antimikrobno djelovanje bakterija mliječne kiseline

Bakterije mliječne kiseline proizvode različite vrijedne proizvode kao što su bakteriocini, enzimi, organske kiseline, etanol, butanol, egzopolisaharidi i diacetil (slika 1) (Daba i Elkhateeb, 2020). Antimikrobne tvari se mogu podijeliti u dvije glavne skupine: niskomolekulske tvari s molekulskom masom <1000 Da i visokomolekulske tvari s molekulskom masom >1000 Da, poput bakteriocina (Šušković i sur., 2010).

Antimikrobno djelovanje BMK uglavnom je posljedica proizvodnje mliječne kiseline što rezultira sniženjem pH okoliša. Organske kiseline koje su u nedisociranom obliku mogu difundirati kroz staničnu membranu iskorištavajući nastali kemijski gradijent uzrokovan različitim pH vrijednostima citosola i okoliša te unutar bakterijske stanice mogu ometati metaboličke funkcije (Arena i sur., 2018). Ostali antimikrobni metaboliti pokazuju različita djelovanja, na primjer, etanol utječe na fluidnost i cjelovitost membrane, diacetil ometa uporabu arginina reagirajući s proteinom koji veže arginin Gram-negativnih bakterija, a ugljikov dioksid stvara anaerobno okruženje u kojem aerobne bakterije ne mogu rasti, no osim mliječne kiseline najznačajnima se smatraju bakteriocini (Vieco-Saiz i sur., 2019).



Slika 1. Važni antimikrobni metaboliti bakterija mliječne kiseline (prema Daba i Elkhateeb, 2020)

2.3. Bakteriocini

Bakteriocini su ribosomski sintetizirani, toplinski stabilni antimikrobni peptidi. Proizvode ih Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije koje ih izvanstanično oslobađaju u kasnim eksponencijalnim do ranim stacionarnim fazama rasta. Pokazuju antimikrobno djelovanje prema različitim bakterijama, fungima, parazitima, virusima te čak i prema prirodno rezistentnim strukturama poput bakterijskih biofilмова (Hernández-González i sur., 2021).

Iako bakteriocine proizvode i Gram-negativne bakterije, oni koje proizvode BMK su od posebnog interesa za brojne industrije iz više razloga. BMK imaju GRAS status, njihovi bakteriocini su izrazito djelotvorni protiv brojnih mikroba koji uzrokuju kvarenje hrane pokazujući aktivnost već u nanomolarnom području, ne ometaju osjetilnu kvalitetu hrane te omogućuju znatno lakšu manipulaciju strukturnim genima od drugih antimikrobnih spojeva (Field i sur., 2018).

Bakterije mliječne kiseline proizvode razne bakteriocine različitih veličina, struktura, fizikalno-kemijskih svojstava i inhibicijskog spektra djelovanja. Zbog njihove raznolikosti, a i zbog kontinuiranog rasta broja identificiranjem novih bakteriocina, postoji nekoliko klasifikacija, koja se često mijenjaju i nadopunjuju, posebice u slučaju bakteriocina Gram-pozitivnih bakterija. Uobičajena podjela je na tri (ponekad četiri) skupine (tablica 1). Prvu

skupinu čine modificirani peptidi, drugu skupinu nemodificirani peptidi, a treću veliki peptidi koji su termički nestabilni (Yang i sur., 2014).

Tablica 1. Klasifikacijska shema za bakteriocine gram pozitivnih bakterija (Yang i sur., 2014)

Klasifikacija / karakteristike	Bakteriocini	Molekulska masa (Da)	Mikroorganizam producent
Skupina 1			
Bakteriocini su posttranslacijski modificirani, linearni ili globularni proteini koji sadrže lantionin, β -metillantionin i dehidrirane aminokiseline	Nisin A	3352	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
	Nisin U	3029	<i>Streptococcus uberis</i>
	Nisin Z	3493	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
	Mersacidin	1824	<i>Bacillus</i> sp. Y85,54728
	Labirintopeptid A2	1922	<i>Actinomadura</i> sp.
	Subtilosin A	3399	<i>Bacillus subtilis</i> 168
Skupina 2			
Termički stabilni, nemodificirani, nelantibiotski baktericini, heterogena skupina malih peptida			
Podgrupa IIa (bakteriocini slični pediocinu)	pediocin PA-1	4629	<i>Pediococcus acidilactici</i> PAC-1.0
	Karnobakteriocin X	3602	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> C2
Podgrupa IIb (sastavljeni od dva peptida)	Laktacin F	4755	<i>Lactobacillus</i> spp.
	ABP-118	4096	<i>Lactobacillus salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i> UCC118
Podgrupa IIc (kružni peptidi)	Carnociklin A	5862	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> UAL307
	Enterocin AS-48	7149	<i>Enterococcus faecalis</i>
Podgrupa IIId (linerni, pojedinačni peptidi)	Epidermicin NI01	6074	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
	Laktokocin A	5778	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
Skupina 3			
Veliki, toplinski nestabilni proteini	Kazeicin 80	~42000	<i>Lactobacillus casei</i> B80
	Enterolizin A	34501	<i>Enterococcus faecalis</i> LMG 2333
	Helveticin J	37511	<i>Lactobacillus helveticus</i> 481

2.3.1. Bakteriocini prve skupine - lantibiotici

Bakteriocini prve skupine još se nazivaju i lantibiotici. Među prvim otkrivenim i okarakteriziranim bakteriocinima bio je lantibiotik nisin. Prvi put je identificiran 1920-ih, a primarna struktura mu je određena 1944. godine (Nes i sur., 2011). Lantibiotici su toplinski stabilni peptidi niske molekulske mase manje od 5 kDa, podvrgnuti post-translacijskim modifikacijama što rezultira neuobičajenim aminokiselinama lantionin i metillantionin koje strukturi bakteriocina daju krutost i otpornost na djelovanje proteaza (Zimina i sur., 2020). Sama posttranslacijska modifikacija lantibiotika se vrši tako da se prvo genski kodirani serin i treonin podvrgnu enzimskoj dehidrataciji kako bi dobili dehidroalanin (Dha) i dehidrobutirin (Dhb). Tiolne skupine iz susjednih cisteina zatim napadaju dvostruku vezu Dha i Dhb dajući

lantionin i metillantionin. Kondenzacija između dva susjedna ostatka rezultira stvaranjem kovalentno zatvorenih prstenova unutar prethodno linearnog peptida (Zacharof i Lovitt, 2012).

Bakteriocini prve skupine se dijele na tri podgrupe. Podgrupa Ia obuhvaća izdužene, fleksibilne, hidrofobne i pozitivno nabijene peptide koji stvaraju pore u bakterijskim membranama, a glavni predstavnik je nisin. Podgrupu Ib čine globularni i nefleksibilni bakteriocini koji imaju neto neutralan ili negativan naboj. Ti peptidi mogu inhibirati katalitičke enzime neophodne za preživljavanje bakterija (Hernández-González i sur., 2021). Saktibiotici su novoformirana, rastuća skupina bakteriocina koja se svrstava kao podgrupa Ic lantibiotika. Za njih je karakteristična prisutnost sumpora na α -ugljiku, a tu modifikaciju vrše radikalni S-adenozilmetionin proteini (Collins i sur., 2017). U skupinu jedan neki ubrajaju i tiopeptide koji imaju snažno antibakterijsko, antivirusno i imunosupresivno djelovanje. Aktivni su u nanomolarnom području, ali zbog slabe topljivosti u vodi i niske biorasploživosti otežana im je upotreba u kliničkim uvjetima. Derivat tiopeptida GE2270A trenutno je jedini bakteriocin ove vrste koji prolazi klinička ispitivanja u liječenju gastrointestinalnih infekcija uzrokovanih *Clostridium difficile* (Zimina i sur., 2020).

2.3.2. Bakteriocini druge skupine – nelantibiotici

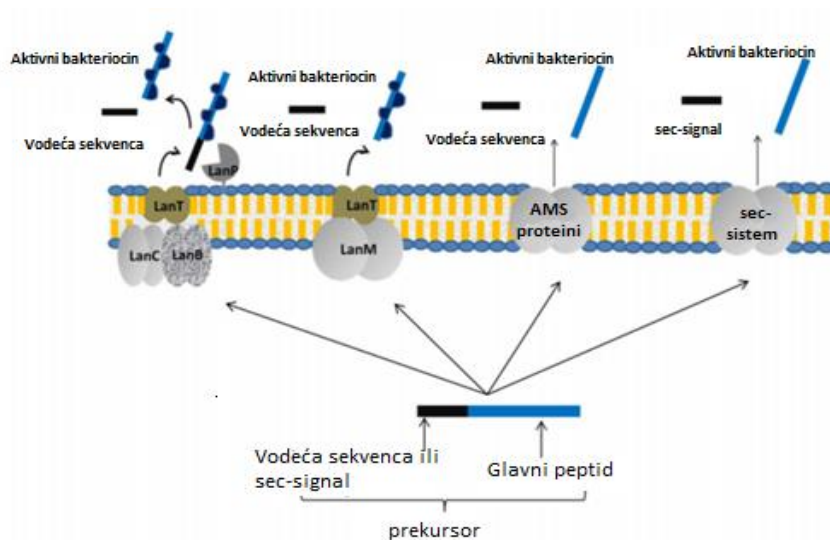
Bakteriocini skupine dva ili nelantibiotici u sebi ne sadrže neuobičajene aminokiseline, a posttranslacijska modifikacija je ograničena na stvaranje disulfidnih mostova u samo nekim članovima (poput pediocina PA-1). Poput skupine 1, to su termostabilni peptidi male molekulske mase (<10 kDa). Mogu se podijeliti na četiri podgrupe (Simons i sur., 2020). Podgrupa IIa obuhvaća pediocinu slične bakteriocine koji pokazuju uzak spektar antimikrobnog djelovanja, primarno pokazujući snažnu inhibiciju *Listeria* vrste. Sadrže visoko konzervirani motiv Y-G-N-G-V na N-terminalnom kraju praćen ostacima cisteina koji mogu tvoriti disulfidni most, C-terminalni kraj je manje očuvan i vjerojatno uključen u stvaranje pora (Collins i sur., 2017). Bakteriocini podgrupe IIb se sastoje od dva vrlo različita, nemodificirana peptida, a za potpunu aktivnost potrebna je prisutnost oba peptida u približno jednakim količinama. U tu skupinu se ubrajaju lakticin F i ABP-118 (Alvarez i sur., 2016). Podgrupa IIc poznata je kao kružni bakteriocini zbog kovalentne veze između C i N terminalnih krajeva. Kompaktna kružna struktura ovih bakteriocina pridonosi njihovoj temperaturnoj i pH stabilnosti (Gabrielsen i sur., 2014). Podgrupa IID je heterogena skupina nepovezanih pojedinačnih linearnih peptidnih bakteriocina s različitim strukturama i načinima djelovanja kao što su laktokocin 972, laktokocin A i enterocin B (Alvarez-Sieiro i sur., 2016).

2.3.3. Bakteriocini treće skupine – bakteriolizini

Suprotno prvim dvjema skupinama, bakteriocini treće skupine su veliki (>30 kDa), toplinski nestabilni, litički ili ne-litički peptidi. U ovu su skupinu uključeni bakteriocini poput lizotafina, helviticina J i V te zoocina A. Antibakterijsko djelovanje im je rezultat enzimske aktivnosti koja dovodi do poremećaja u staničnoj stijenci bakterija (Simons i sur., 2020). Zoocin A, D-alanil-L-alanin endopeptidaza, jedan je od najbolje okarakteriziranih bakteriolizina koji proizvode BMK te pokazuje antimikrobno djelovanje na streptokoke cijepanjem peptidoglikanskih križnih veza stanične stijenke (Alvarez-Sieiro i sur., 2016).

2.3.4. Biosinteza bakteriocina

Geni koji kodiraju za proizvodnju i imunost bakteriocina su uglavnom organizirani u klasterima operona i nalaze se u prstenastim kromosomima, plazmidima ili drugim pokretnim genetskim elementima. Te genetske skupine su obično inducibilne i zahtijevaju sekreciju i izvanstanično nakupljanje peptida za indukciju (Zimina i sur., 2020). Primarno se sintetiziraju kao inaktivni prepeptidi sastavljeni od N-terminalnog vodećeg peptida i C-terminalnog propeptida. Vodeći peptid održava bakteriocin inaktivnim sve dok se ne izluči iz stanice što može služiti kao zaštita soju producentu od vlastitih bakteriocina (slika 2). Što se tiče bakteriocina prve skupine, propeptid je podvrgnut posttranslacijskim modifikacijama nakon čega se prenosi ABC transporterom u izvanstanični prostor gdje serinska proteaza reže vodeći peptid i oslobađa zreli lantibiotik. U nekim slučajevima transport formiranog propeptida i cijepanje vodećeg peptida je istodobno izvedeno jednim proteolitičkim enzimom koji pripada skupini ABC transportera (Simons i sur., 2020). Neki bakteriocini druge skupine sadrže sec-ovisan N-terminalni vodeći peptid koji je neophodan za transport općim sekretornim sec-putem ili pak mogu koristiti specijalizirane proteine za sazrijevanje i sekreciju (AMS proteini) koji istodobno transportiraju i cijepaju vodeći peptid (Nishie i sur., 2012).



Slika 2. Transportni mehanizmi bakteriocina (Simons i sur., 2020)

2.3.5. Mehanizam djelovanja

Bakterije mliječne kiseline proizvode bakteriocine koji mogu biti širokog ili uskog spektra djelovanja, ali općenito su aktivni prema drugim Gram-pozitivnim bakterijama i blisko srodnim mikroorganizama. S obzirom na svojstva, bakteriocini poput nisina i pediocina se koriste kao konzervansi u prehrambenim proizvodima inhibirajući rast patogenih mikroorganizama. Uz to, smatra se da bakteriocini pridonose konkurentnosti stanica producenta što je važno svojstvo BMK koje se koriste kao starter kulture (Mora-Villalobos i sur., 2020).

Antimikrobno djelovanje je obično povezano s poremećajem integriteta bakterijske membrane što dovodi do stanične smrti. Postoji više mehanizama djelovanja kao što su izravna interakcija s lipid II komponentom bakterijske membrane i sustav manozna fosfotransferaze (Man-PTS) (Simons i sur., 2020). Lantibiotici (npr. nisin) stvaraju pore u negativno nabijenim membranama bakterijskih stanica što rezultira izljevom malih metabolita iz podložnih stanica. Neki lantibiotici, kao što je nisin Z, djeluje tako što se veže za određenu ciljnu molekulu, lipid II (Meade i sur., 2020). To dovodi do povećanja propusnosti membrane, a time i njezine smrti. Slično je utvrđeno i za druge lantibiotike poput epidermina i galidermina. S druge strane, lakticin 3147, dvopeptidni lantibiotik (LtnA1 i LtnA2), djeluje tako da LtnA1 peptid prvo stupa u interakciju s lipidom II, zatim lipid II – LtnA1 kompleks na sebe može vezati i LtnA2 peptid te u konačnici takav tročlani kompleks inhibira biosintezu stanične stijenke i stvara pore (Nishie i sur., 2012).

Neki bakteriocini druge skupine (npr. pediocin PA-1, laktokocin A) se vežu na podjedinice MptC i MptD manozna fosfotransferaza permeaza sustava (Man-PTS), transportni sustav koji služi za unos i fosforilaciju šećera. Interakcija bakteriocina i Man-PTS rezultira

ireverzibilnim otvaranjem unutarnjeg kanala. Dolazi do nekontrolirane difuzije iona i drugih unutarstaničnih molekula kroz membranu, pucanja membrane što konačno rezultira smrću ciljane stanice (Hernández-González i sur., 2021). Membranska permeabilizacija još omogućuje i translokaciju toksičnih peptida u citoplazmu gdje mogu ciljati stanične organele i utjecati na integritet RNA/DNA, sintezu proteina, aktivnost enzima i sintezu stanične stijenke. Vanjska membrana Gram-negativnih bakterija štiti ih od bakteriocina koje proizvode Gram-pozitivne bakterije. Međutim, pod stresnim uvjetima, poput temperaturnih varijacija, niskog pH, prisutnosti kelatora i odsutnosti metalnih iona, neke Gram-negativne vrste, uključujući rodove *Escherichia* i *Salmonella*, postaju osjetljive na Gram-pozitivne bakteriocine (Meade i sur., 2020).

2.4. Primjena bakterija mliječne kiseline i bakteriocina

Izrazito raširena i prekomjerna upotreba antibiotika u liječenju infekcija rezultirala je povećanim brojem bakterija otpornih na antibiotike i manjom učinkovitošću antibiotika. Primjena probiotika i njihovih antimikrobnih metabolita kao što su bakteriocini je alternativna antibakterijska strategija u liječenju i prevenciji gastrointestinalnih infekcija (Šušković i sur., 2010). Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) definira probiotike kao žive mikroorganizme koji, kada se daju u odgovarajućim količinama, domaćinu donose zdravstvenu korist. Probiotici trebaju biti sojevi korisni za domaćina koji mogu preživjeti i imati metaboličku aktivnost u crijevnom okruženju, trebaju biti nepatogeni i netoksični te ostati stabilni i održivi tijekom dužeg razdoblja skladištenja (Yang i sur., 2014). Bakterije mliječne kiseline su važni probiotički mikroorganizmi jer se prirodno nalaze u gastrointestinalnom traktu zdravih ljudi. Najvažniji probiotički sojevi su iz rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* (Pinto i sur., 2020).

In vitro i *in vivo* studije su pokazale da inhibitorni učinci probiotičkih bakterija mogu biti rezultat njihovog ometanja prijanjanja gastrointestinalnih patogena ili interferencije s toksinima koje proizvode patogeni mikroorganizmi. Korisni učinak probiotika dokazan je i u kliničkim studijama, a neki od učinaka su prevencija patogene kolonizacije, stimulacija imunološkog sustava, smanjenje alergija, poboljšanje intolerancije na laktozu, snižavanje kolesterola i dr. Adhezija na crijevne epitelne stanice je važan preduvjet za kolonizaciju probiotičkih sojeva u gastrointestinalnom traktu. To ostvaruju nespecifično, fizikalno – kemijskim čimbenicima poput hidrofobnosti, ili specifično, adhezijskim, bakterijskim površinskim molekulama i molekulama epitelnih receptora (poput S-sloja) (Khaleghi i Kasra, 2012).

Bakteriocini BMK pokazuju zaštitno djelovanje na gastrointestinalni trakt, isključujući patogene i promičući kolonizaciju crijeva. Na primjer, Abp 118 iz *Lactobacillus salivarius*

UCC118 štiti miševu od infekcije patogenom *L. monocytogenes*, a soj *S. mutans* BCS3-L1 sposoban je zamijeniti postojeće populacije *S. mutans* i opstati u usnoj šupljini zahvaljujući svojem bakteriocinu, mutacin 1140 (Alvarez-Sieiro i sur., 2016). Upravo bakteriocini predstavljaju potencijalno rješenje za smanjenje razvoja bakterijske rezistencije. Bakteriocini se potencijalno mogu genetički modificirati i konstruirati tako da se vežu bilo gdje na vanjskoj staničnoj membrani jer nemaju određeni receptor, a probiotici ih mogu proizvesti *in situ*, dajući im tako prednost nad antibioticima (Benitez-Chao i sur., 2021).

Bakteriocini su obično aktivni u velikom rasponu pH vrijednosti, otporni na visoke temperature i djeluju prema niz patogenih bakterija u hrani (Silva i sur., 2018). Posjeduju antivirusna, spermicidna i antikancerogena svojstva te pojačavaju pozitivan učinak probiotičkih bakterija (Lopetuso i sur., 2019). Upotrebljavaju se u prehrambenoj industriji, posebno na mliječnim proizvodima te proizvodima od jaja, mesa i povrća. Lantibiotici nisin A i njegova prirodna varijanta nisin Z su dokazano vrlo učinkoviti protiv mikrobnih sredstava koja uzrokuju trovanje hranom i kvaranje. Nisin je također i dalje jedini bakteriocin kojem je uporaba u prehrambenoj industriji službeno odobrena u cijelom svijetu (Zacharof i Lovitt, 2012). Korištenje starter kultura koje proizvode bakteriocine ne zahtjeva odobrenje regulatornih ustanova ili izjavu na deklaraciji proizvoda zbog čega se smatra dobrim načinom ugradnje bakteriocina u hranu (Arquez i sur., 2015).

Neki lantibiotici poput nisina, mersacidina, mutacina 1140 i lakticina 3147 su aktivni protiv patogena otpornih na lijekove kao što su MRSA i VRE što ih čini privlačnim potencijalnim terapijskim sredstvima. Nisin F je bio unesen u miša inficiranog sa *S. aureus* te je bio u stanju kontrolirati rast *S. aureus* barem 15 minuta *in vivo*. Uz primjenu bakteriocina kao novih antibakterijskih spojeva u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, lantibiotici još privlače pažnju i u peptidnom inženjerstvu. Lantibiotici su genetski kodirani te kao takvi mogu jednostavno biti manipulirani metodama genetičkog inženjerstva. Unošenje neuobičajenih aminokiselina lantibiotika u nelantibiotičke peptide je snažan, potencijalni alat za unaprjeđenje stabilnosti željenih peptida (Nishie i sur., 2012).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Radni mikroorganizmi

U ovom radu korištene su bakterije *Lactobacillus plantarum* KR19 i *Lactobacillus plantarum* MC19, prethodno izolirane iz majčinog mlijeka i identificirane 16S sekvenciranjem te srodne bakterije mliječne kiseline (BMK) i test-mikroorganizmi prikazani u tablici 2. Sojevi su dio Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Tablica 2. Bakterijski sojevi iz Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura korišteni u ovom radu

Bakterijski sojevi	Oznaka soja	Hranjive podloge i uvjeti rasta
<i>Lactobacillus plantarum</i>	KR19	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Lactobacillus plantarum</i>	MC19	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Staphylococcus aureus</i>	3048	BHI, 37 °C, aerobno
<i>Staphylococcus aureus</i>	K-144	BHI, 37 °C, aerobno
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	FP1	BHI, 37 °C, aerobno
<i>Bacillus cereus</i>	TM2	BHI, 37 °C, aerobno
<i>Escherichia coli</i>	3014	BHI, 37 °C, aerobno
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	BHI, 37 °C, aerobno
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19111	BHI, 37 °C, aerobno
<i>Lactobacillus helveticus</i>	M92	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC 9430	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	LMG 9450	MRS, 30 °C, anaerobno
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	LMG 7954	MRS, 30 °C, anaerobno

3.1.2. Hranjive podloge

U radu su korištene sljedeće hranjive podloge:

a) hranjive podloge za održavanje i uzgoj bakterija mliječne kiseline

- MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) agar, sastava (g L⁻¹ destilirane vode): pepton 10,0; mesni ekstrakt 10,0; kvašćev ekstrakt 5,0; glukoza 20,0; Tween 80 1,0; MgSO₄ x 7H₂O 0,1; MnSO₄ x 7H₂O 0,05; natrijev-acetat 5,0; agar 20,0. pH vrijednost podloge iznosi 6,5, a sterilizacija se provodi pri 121 °C tijekom 15 minuta.
- MRS bujon istog je sastava kao podloga MRS agar, ali bez dodatka agara.
- MRS „soft-agar“ jednakog je sastava kao MRS bujon, ali uz dodatak 0,8 % agara.

b) hranjive podloge za održavanje i uzgoj patogenih test-mikroorganizama

- BHI (Brain Heart Infusion) agar, sastava (g L⁻¹ destilirane vode): infuzije telećeg mozga i goveđeg srca i peptoni 27,7; glukoza 2; NaCl 5; puferi 2,5; agar 13. pH podloge je 7,4, a sterilizacija se provodi pri 121 °C tijekom 15 minuta.
- BHI bujon istog je sastava kao podloga BHI agar, ali bez dodatka agara.
- BHI „soft-agar“ jednakog je sastava kao BHI bujon, ali uz dodatak 0,7 % agara.

c) selektivna hranjiva podloga za izolaciju bakterije *Escherichia coli*

- Rapid *E. coli* 2 agar, sastava (g L⁻¹ destilirane vode): mesni pepton 5; želatin pepton 5; NaCl 5; kvašćev ekstrakt 3; selektivni kromogeni supstrat 6; agar 13.

d) hranjiva podloga za kultivaciju staničnih linija

- Reduced Serum Medium 1x (MEM) medij za kultivaciju Caco-2 stanične linije (Gibco)

3.1.3. Kemikalije

- destilirana voda, PBF
- etanol 70 %, „Kemika“, Hrvatska
- etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA), „Sigma-Aldrich, SAD
- fosfatni pufer „Kemika“, Hrvatska
- glicerol, „Kemika“, Hrvatska
- izopropanol, „Kemika“, Hrvatska

- *nuclease-free water*, „Takara“, Japan
- RNase A, „Qiagen“, Španjolska
- Triton X, „AppliChem“, Njemačka

3.1.4. Aparatura i pribor

- celulozna vata, „Lola Ribar“, Hrvatska
- autoklav, „Sutjeska“, Hrvatska
- automatske pipete (1000, 200, 20 i 2,5 μ l), „Eppendorf“, SAD
- BioSpec-nano, „Shimatzu“, Japan
- Bunsenov plamenik, „OMM Laboratory Equipment“, Italija
- bušači čepova (d: 5-11,5 mm), „OMM Laboratory Equipment“, Italija
- centrifuga Centric 160, „Tehtnica“, Slovenija
- centrifuga s hlađenjem 5804R, „Eppendorf“, SAD
- čitač mikrotitarskih ploča Infinite F Plex, „Tecan“, Švicarska
- plastične tubice od 1,5 i 2 ml, „Eppendorf“, SAD
- hladnjak, „Gorenje“, Slovenija
- kivete za centrifugiranje (15 i 50 mL), „Falcon“, Engleska
- nastavci za automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- mikrobiološke ušice, „Syntesys“, Italija
- mikrotitarske pločice (24 i 96 jažica), „Falcon“, Engleska
- membranski filteri Millex-GV, promjera pora 0,22 μ , „Merck“, Njemačka
- Petrijeve zdjelice, „Golias“, Slovenija
- šprice, „Becton Dickinson“, SAD
- staklene epruvete (16x160 mm), „Scherf Präzision Europe GmbH“, Njemačka
- stalci za epruvete, „neoLab“, Njemačka
- stalci za tubice, „neoLab“, Njemačka
- termostat, „Instrumentarija“, Hrvatska
- vibro-mješač EV-100, „Kartell“, Italija
- vodena kupelj, „Sutjeska“, Jugoslavija
- zamrzivač (-80 °C), „Eppendorf“, SAD

3.2. METODE

3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama i staničnih linija

Sojevi bakterija mliječne kiseline čuvani su na -80 °C u MRS tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 15 % (v/v) glicerola, a patogeni test-mikroorganizmi su čuvani na -80 °C u hranjivom bujonu uz dodatak 15 % (v/v) glicerola. Dan prije eksperimenta, sojevi su inokulirani u odgovarajuću svježu hranjivu podlogu te inkubirani u optimalnim uvjetima rasta navedenim u tablici 2.

Stanice Caco-2 stanične linije čuvane su u MEM mediju pri 37 °C u 5 %-tnoj atmosferi CO₂ u minimalnom esencijalnom mediju te s dodatkom 10 % (v/v) toplinom inaktiviranog fetalnog goveđeg seruma.

3.2.2. Metoda s dvostrukim slojem agara (*engl.* agar spot-test method)

Metodom s dvostrukim slojem agara se, prema Kos i sur. (2011), ispituje antimikrobno djelovanje odabranih izolata BMK prema potencijalno patogenim test-mikroorganizmima (*Staphylococcus aureus* 3048, *Staphylococcus aureus* K-144, *Escherichia coli* 3014, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FP1, *Bacillus cereus* TM2, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 i *Listeria monocytogenes* ATCC 19111) i prema srodnim BMK (*Lactobacillus helveticus* M92, *Enterococcus faecium* ATCC 9430, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LMG 9450 i *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954).

Bakterijska kultura čije se antimikrobno djelovanje ispituje naciepljena je u obliku kapi od 5 µL na MRS podlogu. Nakon prekonoćne inkubacije pri 37 °C, preko poraslih kolonija preliveno je 10 ml BHI „soft“ agara, prethodno otopljenog i ohlađenog na 50 °C i inokuliranog sa 100 µL suspenzije test-mikroorganizama *Staphylococcus aureus* 3048, *Staphylococcus aureus* K-144, *Escherichia coli* 3014, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FP1, *Bacillus cereus* TM2, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ili *Listeria monocytogenes* ATCC 19111, odnosno 10 mL MRS „soft“ agara, prethodno otopljenog i ohlađenog na 50 °C, inokuliranog sa 100 µL suspenzije test-mikroorganizma *Lactobacillus helveticus* M92, *Enterococcus faecium* ATCC 9430, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LMG 9450 ili *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954. Ploče su stavljene na prekonoćnu inkubaciju pri optimalnim temperaturama (Šušković i Kos, 2007), nakon koje je slijedilo mjerenje bistrih zona inhibicije. Izmjereni su promjeri porasle kulture (*engl.* Culture Diameter, CD) i promjeri zone inhibicije (*engl.* Inhibition Diameter, ID)

te je izračunat efektivni inhibicijski odnos (*engl.* Effective Inhibition Ratio, EIR) prema slijedećem izrazu:

$$\text{EIR} = \frac{(\text{ID} - \text{CD})}{\text{CD}}$$

Rezultati se interpretiraju prema Coeuret i sur. (2004):

EIR < 0,5 → slaba inhibicija

0,5 < EIR < 1,5 → srednja inhibicija

EIR > 1,5 → jaka inhibicija

3.2.3. Metoda difuzije s rupama u agaru (*engl.* agar well-diffusion method)

Antimikrobno djelovanje odabranih sojeva BMK prema patogenim test-mikroorganizmima (*Staphylococcus aureus* 3048, *Staphylococcus aureus* K-144, *Escherichia coli* 3014, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FP1, *Bacillus cereus* TM2, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 i *Listeria monocytogenes* ATCC 19111) ispitano je metodom difuzije u agar na krutim hranjivim podlogama prema Šušković i Kos (2007). Prekonoćne bakterijske kulture test-mikroorganizama (100 µL) su nacijepljene u 12 mL BHI agara koji je prethodno otopljen i ohlađen na 50 °C. Tako inokulirane podloge su izlivenne u Petrijeve zdjelice. Nakon što su se hranjive podloge skrutnule, sterilnim bušačem promjera 7 mm su izbušene „rupe“ u agaru te su sterilnom mikrobiološkom ušicom uklonjeni agarni diskovi, a u nastalu rupu je nanešeno 50 µL supernatanta kulture ispitivane BMK.

Tako pripremljene Petrijeve zdjelice su stavljene u hladnjak na 4 °C tijekom 3 h, kako bi se omogućila difuzija supernatanta u agarnu podlogu prije početka rasta bakterijskih kultura. Nakon toga je slijedila inkubacija pri 37 °C preko noći te mjerenje promjera zona inhibicije (Šušković i Kos, 2007).

3.2.4. Turbidimetrijska metoda određivanja antibakterijske aktivnosti

3.2.4.1. Priprava supernatanata kultura za određivanje antimikrobne aktivnosti turbidimetrijskom metodom i metodom difuzije s rupama u agaru

Prekonoćne kulture bakterija čija se antimikrobna aktivnosti ispituje, centrifugirane su 5 min pri 4200 o min⁻¹, nakon čega je supernatant prikupljen centrifugiranjem filtriran kroz filter veličine pora 0,22 µm.

3.2.4.2. Turbidimetrijska metoda određivanja antibakterijske aktivnosti

Turbidimetrijskom metodom je ispitano antimikrobno djelovanje supernatanta odabranih sojeva BMK izoliranih iz majčinog mlijeka prema patogenim test-mikroorganizmima i srodnim BMK. U jažice mikrotitarske pločice dodano je 190 μL supernatanta ispitivanih bakterijskih kultura i 10 μL patogenih test-mikroorganizama prethodno uzgojenih u BHI bujonu, odnosno 10 μL srodnih BMK prethodno uzgojenih u MRS bujonu. Antimikrobno djelovanje ispitivanih sojeva BMK tijekom 27 h uzgoja test-mikroorganizama i BMK pri optimalnim temperaturama određivano je spektrofotometrijski mjerenjem prividne apsorbancije pri valnoj duljini 620 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica. Razlika u prividnoj apsorbanciji kontrole (nacijepljen BHI bujon ili MRS bujon bez dodanog supernatanta BMK čije se antimikrobno djelovanje ispituje) i uzoraka s dodanim supernatantom mjera je inhibicije rasta test-mikroorganizama. Kao slijepa proba je korištena neinokulirana hranjiva podloga (Šušković i Kos, 2007).

3.2.5. Ispitivanje kompetitivne ekskluzije patogenih bakterija sa sojevima BMK primjenom Caco-2 stanične linije

Provedeno je *in vitro* ispitivanje kompetitivne ekskluzije patogene bakterije *Escherichia coli* 3014 sa sojevima *Lactobacillus plantarum* KR19 i MC19 izoliranim iz majčinog mlijeka, za koje je dokazano da proizvode bakteriocine, primjenom Caco-2 stanične linije.

Stanice Caco-2 stanične linije uzgojene su u minimalnom esencijalnom mediju (*engl.* Minimum Essential Medium, MEM) u T-boci volumena 25 cm^3 i održavane pri 37 °C i u 5 %-tnoj atmosferi CO_2 u minimalnom esencijalnom mediju s dodatkom 10 % (v/v) toplinom inaktiviranog fetalnog govedjeg seruma (56 °C tijekom 30 min), uz izmjenu medija svaka 2 dana. Za ispitivanje kompetitivne ekskluzije, Caco-2 crijevne epitelne stanice su inokulirane u plastične pločice s 24 jažice u koncentraciji od 1×10^5 stanica mL^{-1} i inkubirane tjedan dana uz izmjenu medija svaka 2 dana. Prije primjene, Caco-2 stanice su isprane 3 puta fosfatnim puferom.

Prekonoćne kulture odabranih sojeva BMK uzgojene anaerobno pri 37 °C u MRS bujonu su centrifugirane pri 4200 min^{-1} tijekom 10 min s ciljem uklanjanja viška hranjive podloge da se spriječi mogući negativni učinak niskih pH vrijednosti ili izvanstaničnih proteina u supernatantu kulture. Stanice *E. coli* 3014 su uzgojene preko noći u BHI bujonu pri 37 °C i aerobnim uvjetima i prikupljene centrifugiranjem. Biomasa stanica patogenih bakterija i BMK je resuspendirana u fiziološkoj otopini te je izmjerena optička gustoća tako priređene

suspenzije pri A_{620} u mikrotitarskoj pločici. Talog stanica je zatim resuspendiran u odgovarajućim volumenima medija kako bi se dobio $OD=1$.

Ispitan je utjecaj predinkubacije BMK na adheziju *E. coli* 3014 na Caco-2 stanice. Caco-2 epitelne stanice su isprane 3 puta u fosfatnom puferu ($pH = 7,4$) te je u jažicu dodano 1 mL suspenzije BMK, a stanice se inkubiraju 30 min pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nakon inkubacije, Caco-2 stanice su ispirane fosfatnim puferom te je u jažice dodano 1 mL suspenzije patogenih bakterija i nastavljena je inkubacija pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ kroz 30 min. Prije dodatka suspenzije bakterijskih stanica na Caco-2 stanice, provjeren je početan broj stanica (CFU mL^{-1}) u suspenziji indirektnom metodom, tj. nacjepljivanjem priređenih decimalnih razrjeđenja u Petrijevim zdjelicama s optimalnim hranjivim podlogama. Jažice su nakon inkubacije ispirane 3 puta s 1 mL PBS-a kako bi se uklonile bakterijske stanice koje se nisu adhezirale te su inkubirane 10 min u 0,05 % (v/v) u otopini Triton X-100. Sadržaj svake jažice je prebačen u tubicu i centrifugiran 5 min pri 13000 o min^{-1} . Potom je talog stanica resuspendiran u 1 mL fosfatnog pufera, a broj adheziranih stanica je određen indirektnom metodom, nacjepljivanjem decimalnih razrjeđenja suspenzije bakterijskih stanica na odgovarajuću podlogu u obliku kapi ($10\text{ }\mu\text{L}$) u dvije paralele. Za određivanje broja bakterija *E. coli* prije i nakon adhezije korištena je selektivna podloga Rapid agar. Nakon 48 sati anaerobne inkubacije pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, izbrojane su izrasle kolonije i rezultat je izražen kao CFU mL^{-1} .

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Antimikrobno djelovanje sojeva *Lb. plantarum* KR19 i *Lb. plantarum* MC19

Sojevi bakterija mliječne kiseline *Lactobacillus plantarum* KR19 i *Lactobacillus plantarum* MC19, čija se antimikrobna aktivnost ispitivala u ovom radu, izolirani su iz majčinog mlijeka. Navedenim sojevima je ispitana antimikrobna aktivnost prema odabranim test-mikroorganizmima (*Staphylococcus aureus* 3048, *Staphylococcus aureus* K-144, *Escherichia coli* 3014, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FP1, *Bacillus cereus* TM2, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 i *Listeria monocytogenes* ATCC 19111) i prema srodnim BMK (*Lactobacillus helveticus* M92, *Enterococcus faecium* ATCC 9430, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LMG 9450 i *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954). Za određivanje antimikrobne aktivnosti su korištene tri metode: metoda s dvostrukim slojem agara, metoda difuzije s rupama u agaru i turbidimetrijska metoda.

Rezultati metode s dvostrukim sojem agara su izraženi pomoću efektivnog inhibicijskog omjera koji je računski dobiven kako je opisano u poglavlju 3.2.2., a prikazani su u tablicama 3 i 4. Gledajući antimikrobno djelovanje na patogene mikroorganizme, oba soja imaju jako inhibicijsko djelovanje ($EIR > 1,5$) na sve ispitane test-mikroorganizme. Od toga, oba soja najslabije djeluju na *Staphylococcus aureus* 3048 (slika 3). Soj KR19 najjače inhibira *Bacillus subtilis* ATCC 6633, a soj MC19 pak *Bacillus cereus* TM2. Uspoređujući same sojeve KR19 i MC19, za bakterije *Staphylococcus aureus* K-144, *Bacillus cereus* TM2 i *Listeria monocytogenes* ATCC 19111, oba soja pokazuju podjednaku inhibiciju dok soj KR19 ima jače djelovanje prema *Staphylococcus aureus* 3048, *Salmonella enterica* serotip Typhimurium FP1 i *Bacillus subtilis* ATCC 6633, a soj MC19 prema bakteriji *Escherichia coli* 3014. Antimikrobno djelovanje na srodne sojeve BMK je nešto slabije te se kreće od srednje do jake inhibicije. Soj KR19 pokazuje jako djelovanje samo prema bakteriji *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LMG 9450, dok soj MC19 uz nju još jako djeluje i na *Enterococcus faecium* ATCC 9430 prema kojoj pokazuje najjaču inhibiciju od srodnih bakterija. MC19 pokazuje jače inhibicijsko djelovanje od KR19 prema svim ispitanim srodnim bakterijama osim prema *Lactobacillus helveticus* M92 iako je i za bakteriju *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 (slika 4) mala razlika u inhibicijskom djelovanju između dva soja.

U istraživanju od Anas i sur. (2019) metodom s dvostrukim slojem agara ispitano je antimikrobno djelovanje bakterije *Lb. plantarum* 58 izolirane iz kozjeg mlijeka prema patogenim bakterijama *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25921, *Bacillus cereus*, *Listeria ivanovii* ATCC 19119 i *Salmonella* Typhimurium. Bakterija je inhibirala

sve patogene, a najbolje djelovanje je pokazala prema *S. aureus*, zatim *E. coli*, a najslabije prema *S. Typhimurium*. Usporedbom naših rezultata i rezultata koje su dobili Anas i sur. (2019), može se uočiti da sojevi bakterije *Lactobacillus plantarum* uspješno inhibiraju test-mikroorganizme koji su česti patogeni u prehrambenoj industriji, a intenzitet te inhibicije je moguće ispitati metodom s dvostrukim sojem agara.

Tablica 3. Antagonističko djelovanje sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka prema test-mikroorganizmima *S. aureus* 3048, *S. aureus* K-144, *E. coli* 3014, *S. enterica* serotip Typhimurium FP1, *B. cereus* TM2, *B. subtilis* ATCC 6633 i *L. monocytogenes* ATCC 19111™ izraženo kao efektivni inhibicijski odnos (EIR) određen metodom s dvostrukim slojem agara

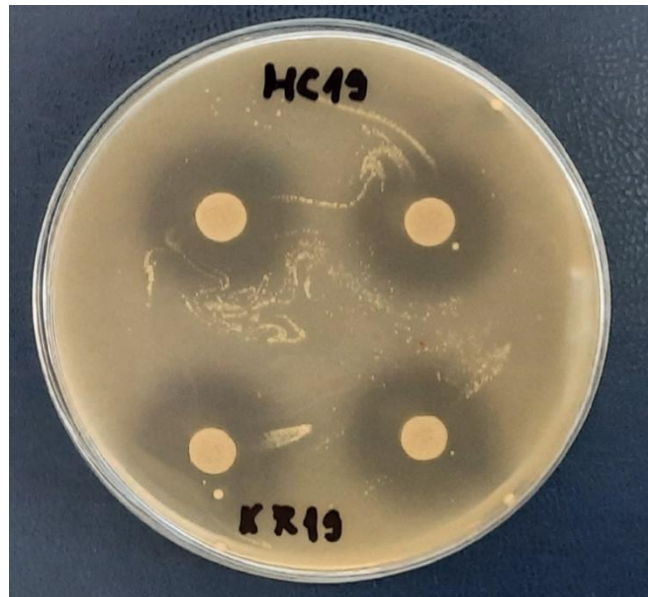
Soj	KR19			MC19		
	CD (mm)	ID (mm)	EIR	CD (mm)	ID (mm)	EIR
3048	7,0	20,0	1,85714	8,0	20,5	1,5625
K-144	7,0	27,5	2,9286	8,0	30,5	2,8125
3014	8,0	27,5	2,4375	7,5	30,5	3,06667
FP1	7,5	28,0	2,73333	7,5	25,5	2,4
TM2	7,0	30,0	3,28571	7,0	30,5	3,35714
6633	6,5	29,0	3,46154	7,5	30,0	3,0
19111	7,5	30,5	3,06667	7,5	21,5	2,93333

Jako inhibicijsko djelovanje označeno je žutom bojom.

Tablica 4. Antagonističko djelovanje sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka prema srodnim BMK *L. helveticus* M92, *E. faecium* ATCC 9430, *L. lactis* subsp. *lactis* LMG 9450 i *L. mesenteroides* LMG 7954, izraženo kao efektivni inhibicijski odnos (EIR) određen metodom s dvostrukim slojem agara

Soj	KR19			MC19		
	CD (mm)	ID (mm)	EIR	CD (mm)	ID (mm)	EIR
M92	6,5	11,5	0,76923	7,5	12,5	0,66667
9430	8,0	13,0	0,625	7,5	27,5	2,66667
9450	7,5	20,5	1,73333	7,0	22,5	2,21429
7954	7,0	11,5	0,64286	7,0	12,0	0,71429

Srednje jako inhibicijsko djelovanje označeno je plavno, a jako žutom bojom.



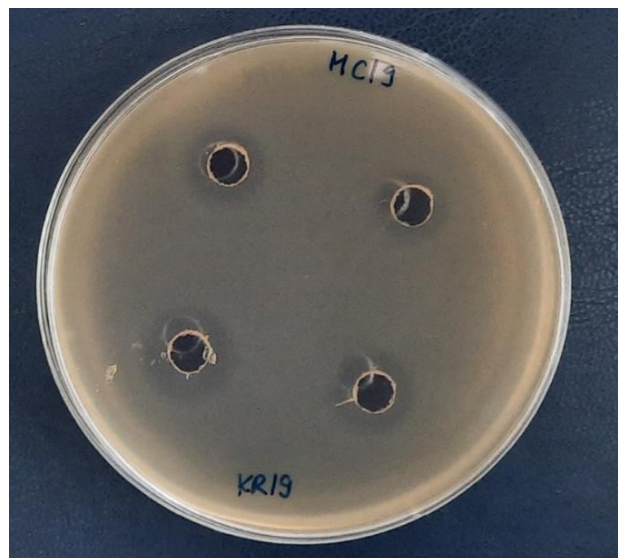
Slika 3. Inhibicijski učinak sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka na test-mikroorganizam *Staphylococcus aureus* 3048 ispitano metodom difuzije s dvostrukim slojem agara



Slika 4. Inhibicijski učinak sojeva izoliran ih majčinog mlijeka na srodnu BMK *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 ispitano metodom difuzije s dvostrukim slojem agara

Metodom difuzije s rupama u agaru antimikrobne supstance koje proizvedu sojevi BMK difundiraju u podlogu s test-mikroorganizmom pri čemu dolazi do inhibicije njihovog rasta i nastanka prozirnih zona inhibicije (kao što je prikazano na slici 5). Rezultati inhibicije patogenih test-mikroorganizama su prikazani u tablici 5. Oba soja BMK su inhibirala sve ispitane test-mikroorganizme. Radijusi zona inhibicije se kreću u rasponu od 10 mm (*Staphylococcus aureus* K-144 inhibiran sojem MC19) do 16 mm (*Bacillus subtilis* ATCC 6633 inhibiran sojem KR19). Soj KR19 za većinu mikroorganizama pokazuje jaču inhibiciju od soja MC19, iako ona u nijednom slučaju nije značajno veća te najveća razlika iznosi samo 2 mm za *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

Dobiveni rezultati metode s rupama u agaru se mogu usporediti s rezultatima koje su dobili Hu i sur. (2019) ispitujući antimikrobnu aktivnost osam različitih sojeva *Lb. plantarum* na tri patogena mikroorganizma (*Staphylococcus aureus* ATCC12600, *Escherichia coli* ATCC35128 i *Salmonella* Typhimurium ASI.1174) istom metodom. Radijusi zona inhibicije su se kretali između 10 i 20 mm, osim za bakteriju iz roda *Salmonella*, gdje su svi sojevi pokazali slabiju inhibiciju s radijusima do 7,5 mm. Usporedbom rezultata vidljivo je da svi sojevi *Lb. plantarum* dobro inhibiraju *E. coli* i *S. aureus*, dok jačina inhibicije bakterija iz roda *Salmonella* varira ovisno o pojedinačnom soju.



Slika 5. Inhibicijski učinak sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka na test-mikroorganizam *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FP1 ispitano metodom difuzije s rupama u agaru

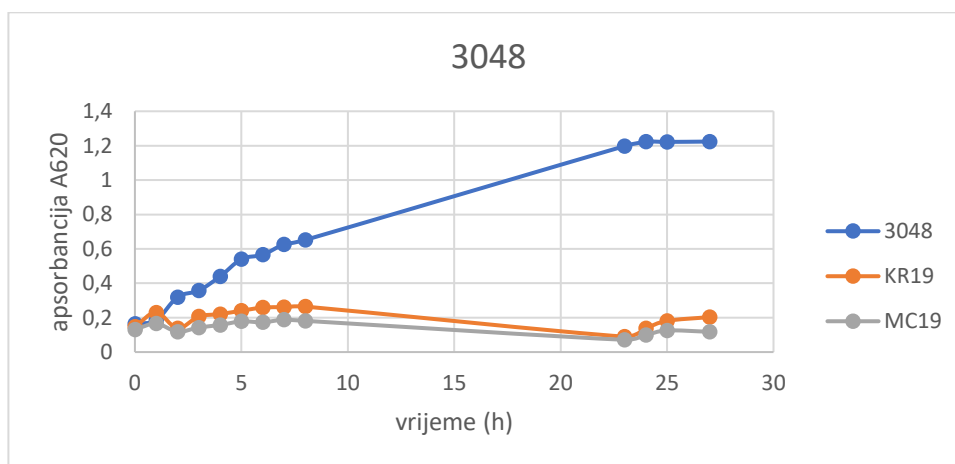
Tablica 5. Promjeri zona inhibicije rasta test-mikroorganizama *Staphylococcus aureus* 3048, *Staphylococcus aureus* K-144, *Escherichia coli* 3014, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FP1, *Bacillus cereus* TM2, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 i *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 dobiveni sa supernatantima kultura bakterija izoliranih iz majčinog mlijeka metodom difuzije s rupama u agaru

Soj	KR19	MC19
	Zone inhibicije (mm)	
3048	15,0	14,5
K-144	11,5	10,0
3014	14,0	14,5
FP1	12,5	11,5
TM2	12,5	13,0
6633	16,0	14,0
19111	15,5	14,0

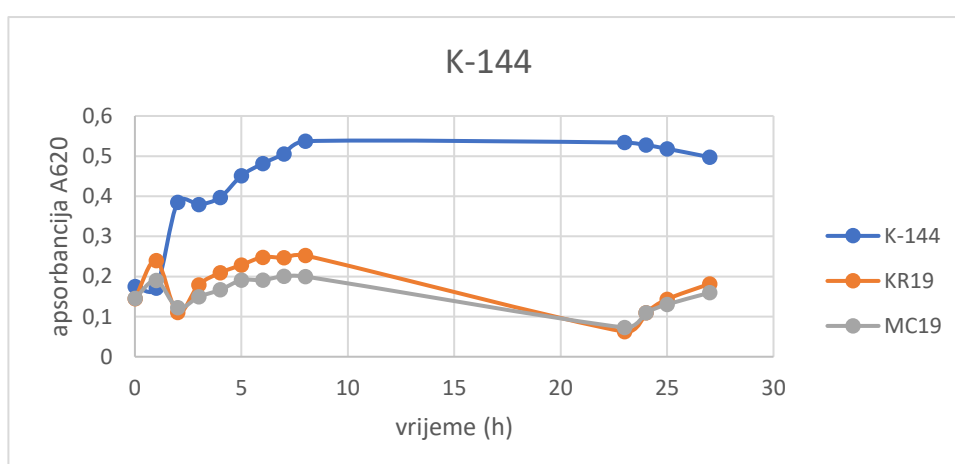
Kao treća metoda za ispitivanje antimikrobne aktivnosti korištena je turbidimetrijska metoda. Antimikrobno djelovanje je određeno spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri 620 nm tijekom uzgoja, a rezultati mjerenja su prikazani grafički kao ovisnost apsorbancije pojedinog mikroorganizma u vremenu. Turbidimetrija ima veću osjetljivost od agarnih metoda. Oba soja BMK su pokazala značajnu inhibiciju prema ispitanim patogenim bakterijama tijekom 27 h uzgoja (slike 6-12). Većinu bakterija su oba soja podjednako dobro inhibirala dok je *Staphylococcus aureus* 3048 i *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FP1 bolje inhibirao soj MC19. Gledajući rezultate djelovanja na srodne sojeve, MC19 i KR19 su značajno inhibirali *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 i *Lactobacillus helveticus* M92 (slike 13 i 14), dok za sojeve *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LMG 9450 i *Enterococcus faecium* ATCC 9430 pokazuju slabu ili nikakvu inhibiciju (slike 15 i 16). Dobiveni rezultati za patogene bakterije se slažu s rezultatima koje su dobili Danilova i sur. (2019), turbidimetrijski ispitujući antimikrobnu aktivnost soja *L. plantarum* prema patogenim bakterijama *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes* i *Staphylococcus aureus*. U tom istraživanju BMK je također uspješno inhibirala rast svih patogenih mikroorganizama.

Rezultati metode difuzije s rupama u agaru i metode s dvostrukim slojem agara daju iste informacije; sojevi *Lactobacillus plantarum* KR19 i MC19 su snažni inhibitori patogenih bakterija. Soj KR19 bolje inhibira *Staphylococcus aureus* 3048, *Staphylococcus aureus* K-144,

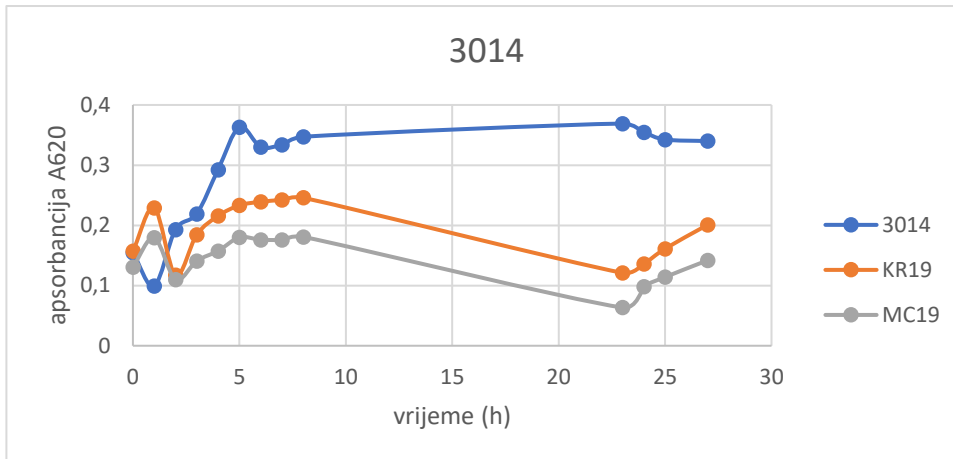
Salmonella enterica serovar Typhimurium FP1, *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 i *Bacillus subtilis* ATCC 6633 za kojeg je najznačajnija razlika u inhibiciji, a MC19 bolje inhibira *Escherichia coli* 3014 i *Bacillus cereus* TM2. Turbidimetrijskom metodom je ispitano djelovanje supernatantne kulture BMK kako bi se vidjelo dolazi li do razlike u rezultatima u tekućem, umjesto agarom mediju. Patogene bakterije su i dalje dobro inhibirane, ali se razlika uočava za srodne sojeve. Turbidimetrijskim mjerenjem KR19 i MC19 jako inhibiraju *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 i *Lactobacillus helveticus* M92 dok metodom sa dvostrukim slojem agara jako inhibiraju *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LMG 9450.



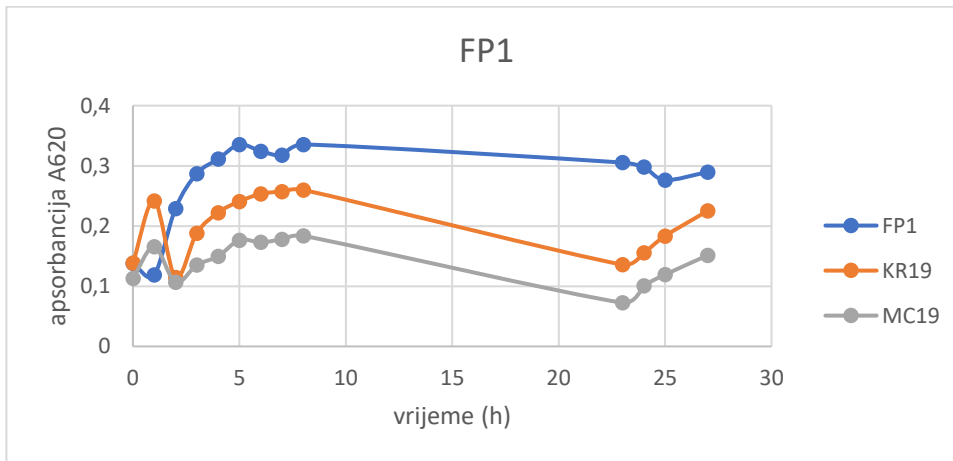
Slika 6. Antimikrobno djelovanje sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka prema test-mikroorganizmu *Staphylococcus aureus* 3048 ispitano turbidimetrijskom metodom



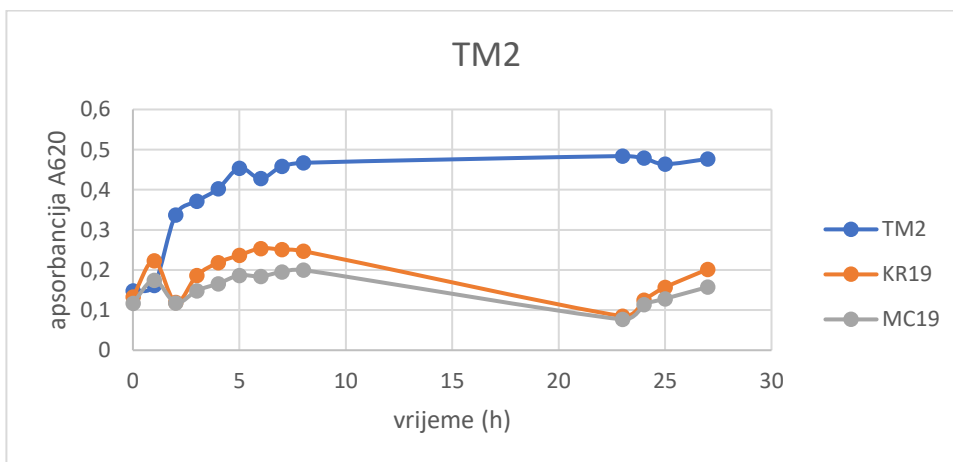
Slika 7. Antimikrobno djelovanje sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka prema test-mikroorganizmu *Staphylococcus aureus* K-144 ispitano turbidimetrijskom metodom



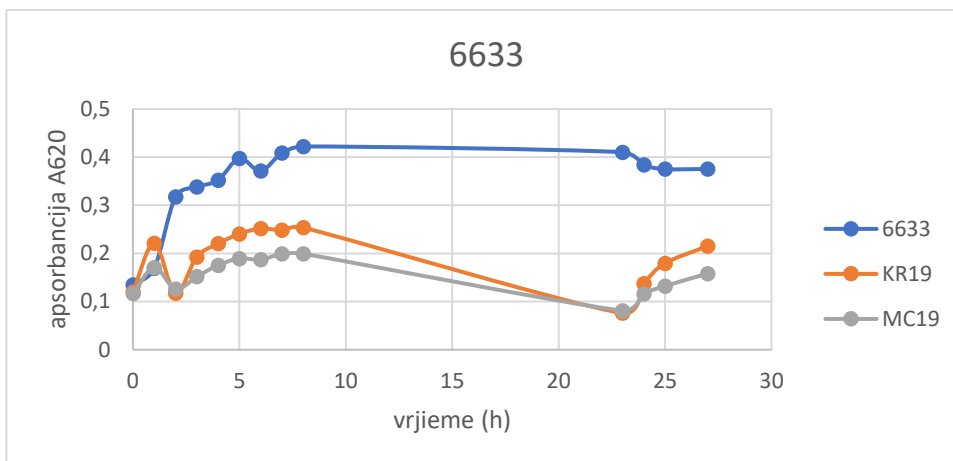
Slika 8. Antimikrobno djelovanje sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka prema test-mikroorganizmu *Escherichia coli* 3014 ispitano turbidimetrijskom metodom



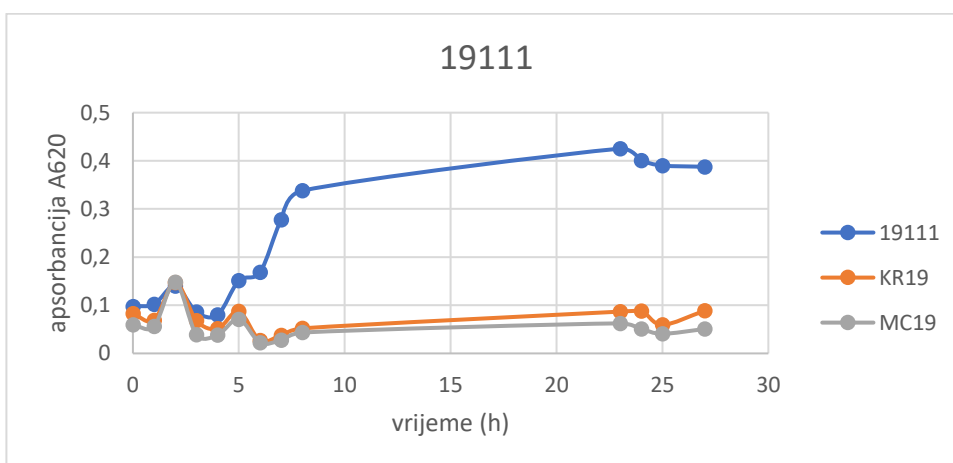
Slika 9. Antimikrobno djelovanje sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka prema test-mikroorganizmu *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FP1 ispitano turbidimetrijskom metodom



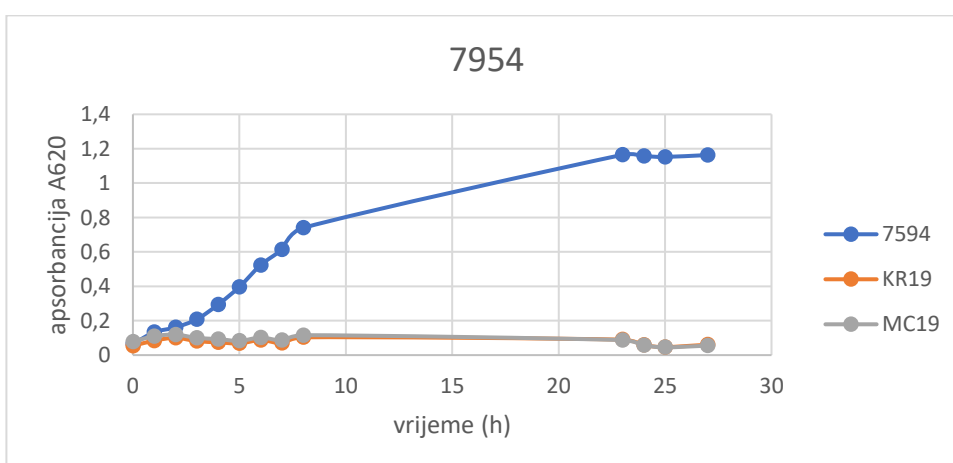
Slika 10. Antimikrobno djelovanje sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka prema test-mikroorganizmu *Bacillus cereus* TM2 ispitano turbidimetrijskom metodom



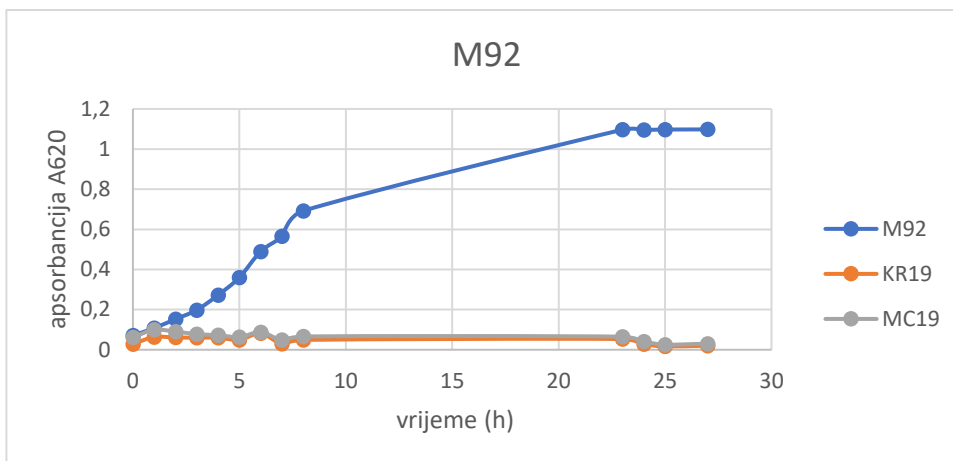
Slika 11. Antimikrobno djelovanje sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka prema test-mikroorganizmu *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ispitano turbidimetrijskom metodom



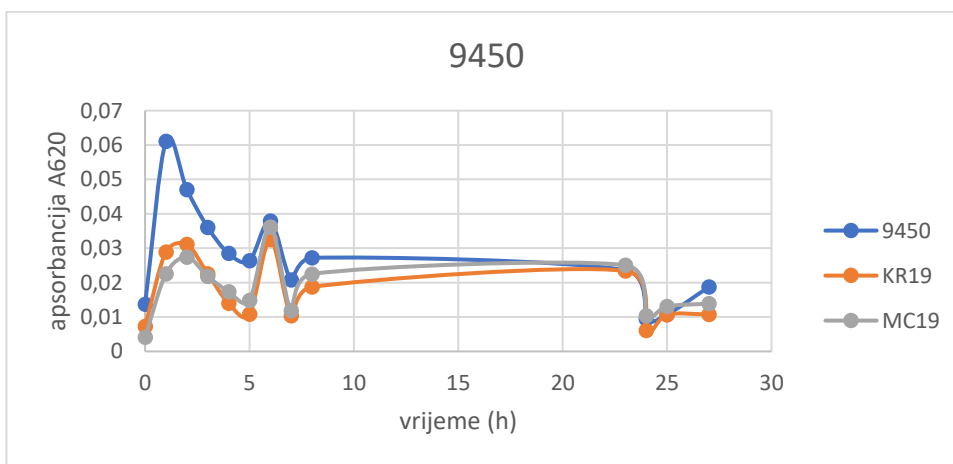
Slika 12. Antimikrobno djelovanje sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka prema test-mikroorganizmu *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 ispitano turbidimetrijskom metodom



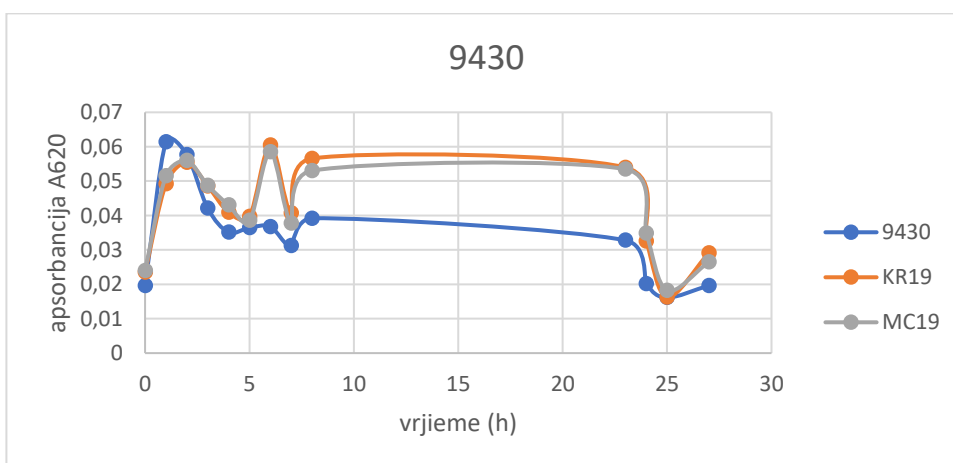
Slika 13. Antimikrobno djelovanje sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka prema srodnom soju BMK *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 ispitano turbidimetrijskom metodom



Slika 14. Antimikrobno djelovanje sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka prema srodnom soju BMK *Lactobacillus helveticus* M92 ispitano turbidimetrijskom metodom



Slika 15. Antimikrobno djelovanje sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka prema srodnom soju BMK *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LMG 9450 ispitano turbidimetrijskom metodom



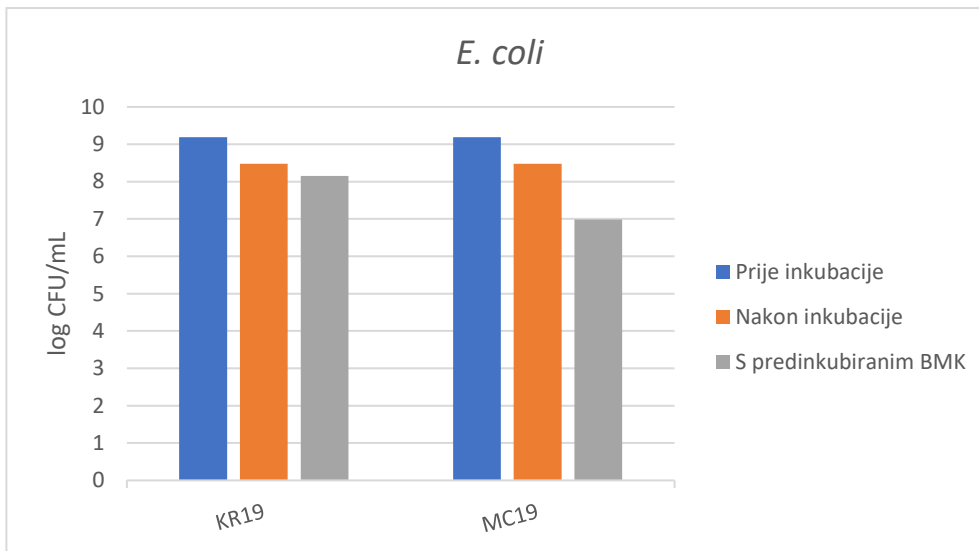
Slika 16. Antimikrobno djelovanje sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka prema srodnom soju BMK *Enterococcus faecium* ATCC 9430 ispitano turbidimetrijskom metodom

4.2. Kompetitivna ekskluzija patogenih bakterija sa sojevima BMK

Crijevne infekcije nastaju prijanjanjem patogenih bakterija na mukoznu površinu gastrointestinalnog trakta. Adhezija patogenih bakterija se može inhibirati blokiranjem receptora na crijevnim stanicama, a jedan od načina je upotreba probiotičkih sojeva koji prijanjaju na receptore i blokiraju ih patogenima (Behbahani i sur., 2019). Adhezija je važno svojstvo pojedinog mikroorganizma da bi se mogao smatrati probiotikom. Za ispitivanja adhezijske sposobnosti nekog mikroorganizma često se koriste Caco-2 stanice.

Ispitana je kompetitivna ekskluzija sojeva *L. plantarum* KR19 i *L. plantarum* MC19 prema patogenoj bakteriji *E. coli* 3014. Rezultati su prikazani na slici 17, izraženi kao log(CFU ml⁻¹) *E. coli* adheziranih na Caco-2 stanica sa i bez prethodne inkubacije Caco-2 stanica sa sojevima BMK. Iz rezultata se vidi da se i bez BMK broj adheziranih stanica *E. coli* razlikuje za jednu logaritamsku jedinicu u odnosu na početni broj stanica (10^8 u odnosu na 10^9) što znači da se adheziralo otprilike 20 % stanica *E. coli*. Taj broj se još više smanjio kao rezultat kompetitivne ekskluzije BMK. Na slici 17 se može vidjeti da je soj MC19 pokazao jaču kompetitivnu ekskluziju od soja KR19 i to se opet broj poraslih stanica međusobno razlikovao za jednu logaritamsku jedinicu (10^7 u odnosu na 10^8), a u usporedbi s početnim brojem stanica *E. coli* može se uočiti da oba soja BMK vrlo dobro inhibiraju adheziju stanica *E. coli* na Caco-2 stanice.

Dobiveni rezultati mogu se usporediti s rezultatima koje su dobili Jiang i sur. (2016). U tom istraživanju ispitana je kompetitivna ekskluzija soja *L. plantarum* WLPL04 izoliranog iz majčinog mlijeka na patogenu bakteriju *E. coli*. Rezultat su izrazili kao postotak inhibicije izračunat kao omjer adheziranih stanica *E. coli* u prisutnosti i odsutnosti soja WLPL04, a iznosio je 59,81 %, odnosno soj WLPL04 uspio je inhibirati vezanje ~60 % stanica *E. coli* na Caco-2 stanice. Računajući istom metodom za kompetitivnu ekskluziju sojeva KR19 i MC19, dobije se da KR19 nešto slabije inhibira vezanje od WLPL04 s rezultatom ~50 %, dok MC19 vrlo dobro inhibira vezanje *E. coli*'s postotkom inhibicije ~90 %, što ukazuje da različiti sojevi *L. plantarum* uspješno vrše kompetitivnu ekskluziju *E. coli*.



Slika 17. Rezultati kompetitivne ekskluzije sojeva KR19 i MC19 prema *E. coli*

5. ZAKLJUČCI

1. Bakterijski sojevi *Lactobacillus plantarum* KR19 i *Lactobacillus plantarum* MC19, izolirani iz majčinog mlijeka, imaju jako antimikrobno djelovanje prema patogenim bakterijama *Staphylococcus aureus* 3048, *Staphylococcus aureus* K-144, *Escherichia coli* 3014, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FP1, *Bacillus cereus* TM2, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 i *Listeria monocytogenes* ATCC 19111.
2. Metodom s dvostrukim slojem agara i turbidimetrijskom metodom je dokazano da sojevi *Lactobacillus plantarum* KR19 i *Lactobacillus plantarum* MC19, izolirani iz majčinog mlijeka, pokazuju antimikrobno djelovanje prema srodnim bakterijama mliječne kiseline *Lactobacillus helveticus* M92, *Enterococcus faecium* ATCC 9430, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LMG 9450 i *Leuconostoc mesenteroides* LMG 795.
3. *Lactobacillus plantarum* KR19 i *Lactobacillus plantarum* MC19 pokazuju kompetitivnu ekskluziju prema bakteriji *Escherichia coli* 3014, pri čemu soj MC19 pokazuje bolju inhibiciju adhezije patogene bakterije na Caco-2 stanice.

6. LITERATURA

Alvarez-Sieiro P., Montalbán-López M., Mu D., Kuipers O. P. (2016) Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Applied microbiology and biotechnology* **100**(7): 2939–2951.

Anas M., Ahmed K., Mebrouk K. (2014) Study of the Antimicrobial and Probiotic Effect of *Lactobacillus Plantarum* Isolated from Raw Goat's Milk from the Region of Western Algeria. *International Journal of Sciences: Basic and Applied Research* **13**: 18-27.

Arena M. P., Capozzi V., Russo P., Drider D., Spano G., Fiocco, D. (2018) Immunobiosis and probiosis: antimicrobial activity of lactic acid bacteria with a focus on their antiviral and antifungal properties. *Applied microbiology and biotechnology* **102**(23): 9949–9958.

Arqués J. L., Rodríguez E., Langa S., Landete J. M., Medina, M. (2015) Antimicrobial activity of lactic acid bacteria in dairy products and gut: effect on pathogens. *BioMed research international* **2015**(22): 1-9.

Behbahani B., Noshad M., Falah F. (2019) Inhibition of *Escherichia coli* adhesion to human intestinal Caco-2 cells by probiotic candidate *Lactobacillus plantarum* strain L15. *Microbial pathogenesis* **136**: 103677.

Benítez-Chao D. F., León-Buitimea A., Lerma-Escalera J. A., Morones-Ramírez J. R. (2021) Bacteriocins: An overview of antimicrobial, toxicity, and biosafety assessment by *in vivo* models. *Frontiers in microbiology* **12**: 630695.

Collins F. W. J., O'Connor P. M., O'Sullivan O., Gómez-Sala B., Rea M. C., Hill C., Ross R. P. (2017) Bacteriocin Gene-Trait matching across the complete *Lactobacillus* Pan-genome. *Scientific reports* **7**(1): 3481.

Coeuret V., Gueguen M., Vernoux J. P. (2004) *In vitro* screening of potential probiotic activities of selected lactobacilli isolated from unpasteurized milk products for incorporation into soft cheese. *Journal of Dairy Research* **71**: 451-460.

Daba G. M., Elkhateeb, W. A. (2020) Bacteriocins of lactic acid bacteria as biotechnological tools in food and pharmaceuticals: Current applications and future prospects. *Biocatalysis and agricultural biotechnology* **28**(101750).

- Danilova T. A., Adzhieva A. A., Danilina G. A., Polyakov N. B., Soloviev A. I., Zhukhovitsky V. G. (2019) Antimicrobial Activity of Supernatant of *Lactobacillus plantarum* against Pathogenic Microorganisms. Bulletin of experimental biology and medicine **167**(6): 751–754.
- Field D., Ross R. P., Hill C. (2018) Developing bacteriocins of lactic acid bacteria into next generation biopreservatives. Current opinion in food science **20**: 1–6.
- Gabrielsen C., Brede D. A., Nes I. F., Diep, D. B. (2014) Circular Bacteriocins: Biosynthesis and Mode of Action. Applied and Environmental Microbiology **80**(22): 6854–6862.
- Hati S., Mandal S., Prajapati, J. (2013) Novel starters for value added fermented dairy products. Current Research in Nutrition and Food Science Journal **1**(1): 83–91.
- Hatti-Kaul R., Chen L., Dishisha T., Enshasy H. E. (2018) Lactic acid bacteria: from starter cultures to producers of chemicals. FEMS microbiology letters **365**(20).
- Hernández-González J. C., Martínez-Tapia A., Lazcano-Hernández G., García-Pérez B. E., Castrejón-Jiménez N. S. (2021) Bacteriocins from lactic acid bacteria. A powerful alternative as antimicrobials, probiotics, and immunomodulators in veterinary medicine. Animals: an open access journal from MDPI **11**(4): 979.
- Hu C.-H., Ren L.-Q., Zhou Y., Ye B.-C. (2019) Characterization of antimicrobial activity of three *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Chinese traditional dairy food. Food science & nutrition **7**(6): 1997–2005.
- Jiang M., Zhang F., Wan C., Xiong Y., Shah N. P., Wei H., Tao X. (2016) Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* WLPL04 isolated from human breast milk. Journal of dairy science **99**(3): 1736–1746.
- Khaleghi M., Kasra R. (2012) Effect of environmental stresses on S-layer production in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. U: Advances in Applied Biotechnology, InTech. str. 210-224.
- Kos B., Beganović J., Jurašić L., Švađumović M., Leboš Pavunc A., Uroić K., Šušković J. (2011) Coculture-inducible bacteriocin biosynthesis of different probiotic strains by dairy starter culture *Lactococcus lactis*. Mljekarstvo **61** (4): 273-282.

Lopetuso L. R., Giorgio M. E., Saviano A., Scaldaferrì F., Gasbarrini A., Cammarota G. (2019) Bacteriocins and bacteriophages: Therapeutic weapons for gastrointestinal diseases. *International journal of molecular sciences* **20**(1): 183.

Meade E., Slattery M. A., Garvey, M. (2020) Bacteriocins, potent antimicrobial peptides and the fight against multi drug resistant species: Resistance is futile? *Antibiotics* (Basel, Switzerland) **9**(1): 32.

Mohammadi F., Eshaghi M., Razavi S., Sarokhalil D. D., Talebi M., Pourshafie M. R. (2018) Characterization of bacteriocin production in *Lactobacillus* spp. isolated from mother's milk. *Microbial Pathogenesis* **118**: 242–246.

Mora-Villalobos J. A., Montero-Zamora J., Barboza N., Rojas-Garbanzo C., Usaga J., Redondo-Solano M., Schroedter L., Olszewska-Widdrat A., López-Gómez, J. P. (2020) Multi-product lactic acid bacteria fermentations: A review. *Fermentation* **6**(1): 23.

Nes I. F., Kjos M., Dzung B. D. (2011) Antimicrobial components of lactic acid bacteria. U: *Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects*, 4. izd., Lahtinen S., Ouwehand A. C., Salminen S., Von Wright A., ur., Taylor & Francis Group LLC, CRC Press, Boca Raton. str. 285-330.

Nishie M., Nagao J.-I., Sonomoto K. (2012) Antibacterial peptides 'bacteriocins': An overview of their diverse characteristics and applications. *Biocontrol science* **17**(1): 1–16.

Pinto A., Barbosa J., Albano H., Isidro J., Teixeira P. (2020) Screening of bacteriocinogenic lactic acid bacteria and their characterization as potential probiotics. *Microorganisms* **8**(3): 393.

Ringø E., Hoseinifar S. H., Ghosh K., Van Doan H., Beck B. R., Song, S. K. (2018) Lactic acid bacteria in finfish-an update. *Frontiers in microbiology* **9**: 1818.

Silva C. C. G., Silva S. P. M., Ribeiro, S. C. (2018) Application of bacteriocins and protective cultures in dairy food preservation. *Frontiers in microbiology* **9**: 594.

Simons A., Alhanout K., Duval R. E. (2020) Bacteriocins, antimicrobial peptides from bacterial origin: Overview of their biology and their impact against multidrug-resistant bacteria. *Microorganisms* **8**(5): 639.

Šušković J., Kos B. (2007) Mikrobiološke metode i antibiotici. U: Metode u molekularnoj biologiji, Ambriović Ristov A. i sur. (ur.), Institut "Ruđer Bošković", Zagreb, str. 949-963.

Šušković, J., Kos, B., Beganović, J., Leboš Pavunc, A., Habjanič, K., Matošić, S. (2010) Antimicrobial Activity – The Most Important Property of Probiotic and Starter Lactic Acid Bacteria. *Food Technology and Biotechnology* **48** (3): 296-307

Vieco-Saiz N., Belguesmia Y., Raspoet R., Auclair E., Gancel F., Kempf I., Drider D. (2019) Benefits and inputs from lactic acid bacteria and their bacteriocins as alternatives to antibiotic growth promoters during food-animal production. *Frontiers in microbiology* **10**: 57.

Yang S.-C., Lin C.-H., Sung C. T., Fang J.-Y. (2014) Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Frontiers in microbiology* **5**: 241.

Zacharof M. P., Lovitt R. W. (2012) Bacteriocins produced by lactic acid bacteria a review article. *APCBEE Procedia* **2**: 50–56.

Zimina M., Babich O., Prosekov A., Sukhikh S., Ivanova S., Shevchenko M., Noskova S. (2020) Overview of global trends in classification, methods of preparation and application of bacteriocins. *Antibiotics (Basel, Switzerland)* **9**(9): 553.

Izjava o izvornosti

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

Luiza Det

ime i prezime studenta