

Analiza in vitro preživljavanja odabranih probiotičkih sojeva u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta dojenčeta

Zovko, Maja

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:159:710513>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-13**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac, 2024.

Maja Zovko

**ANALIZA IN VITRO PREŽIVLJAVANJA
ODABRANIH PROBIOTIČKIH SOJEVA U
SIMULIRANIM UVJETIMA
GASTROINTESTINALNOG TRAKTA
DOJENČETA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta pod mentorstvom prof. dr. sc. Jasne Novak.

Najprije se želim zahvaliti prof. dr. sc. Jasni Novak na prenesenom znanju, susretljivosti, strpljenju i stručnom vodstvu tijekom izrade diplomskog rada.

Zahvaljujem i svojim prijateljima, koji su mi uljepšali studentske dane i dijelili sa mnom svaki uspjeh i izazov.

Veliko hvala mojoj obitelji, tati Predragu, mami Mariji i bratu Domagoju. Bili ste moj oslonac tijekom cijelog studiranja. Hvala na svakoj molitvi, brizi i ljubavi koju ste mi dali. Vaša nesebična podrška omogućile su mi da ostvarim svoje ciljeve.

Posebnu zahvalnost dugujem svojoj sestri blizanki Ivi. Ive, od prvog dana si mi najveći prijatelj. Hvala ti na beskrajnoj ljubavi i razumijevanju. Sve radosti i brige studiranja s tobom nikada neću zaboraviti.

Na kraju, hvala mom Nikoli. Hvala ti na ljubavi, neiscrpoj podršci i smijehu sve ove godine. Nikola, moj si odmor i snaga. Radujem se svemu što nas čeka u budućnosti.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Nutricionizam

Diplomski sveučilišni studij: Nutricionizam

Analiza *in vitro* preživljavanja odabranih probiotičkih sojeva u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta dojenčeta

Maja Zovko, univ. bacc. nutr. 0058215404

Sažetak:

Preživljavanje nepovoljnih uvjeta gastrointestinalnog trakta (GIT) jedan je od ključnih kriterija pri odabiru probiotičkih sojeva, jer je GIT ciljno mjesto njihovog djelovanja. Stoga je cilj ovog rada bio odrediti *in vitro* preživljavanje sojeva *Levilactobacillus brevis brevis* i *Limosilactobacillus fermentum*, prethodno izoliranih iz mikrobiote majčinog mlijeka, te procijeniti zaštitni učinak dojenačke formule prilikom tranzita analiziranih sojeva u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta. Preliminarno je određena tolerancija analiziranih sojeva na koncentracije žučnih soli, što je pokazatelj procjene potencijala probiotičkih bakterija da prežive *in vivo* u intestinalnom sustavu. Oba soja pokazuju relativno visoku otpornost na žučne soli. Prema rezultatima analizirani sojevi preživljavaju u značajno većem broju probiotičkih stanica od propisanih 10×10^6 CFU/m. Usporedna analiza preživljavanja sojeva potvrdila je učinkovito adaptiranje na simulirane uvjete želučanog sok i soka tankog crijeva, pri čemu *Levilactobacillus brevis* u usporedbi s *Limosilactobacillus fermentum* pokazuje pojačanu učinkovitosti. Pretpostavlja se pojačana otpornost analiziranih sojeva uslijed zaštitnog učinaka dojenačke formule u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta.

Ključne riječi: probiotik, *Lactobacillus*, simulirani uvjeti gastrointestinalnog trakta

Rad sadrži: 43 stranicu, 13 slika, 8 tablica, 55 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: prof. dr. sc. Jasna Novak

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Blaženka Kos (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Jasna Novak (mentor)
3. prof. dr. sc. Ksenija Markov (član)
4. prof. dr. sc. Jasna Mrvčić (zamjenski član)

Datum obrane: 19. prosinca 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of biochemical engineering
Laboratory for technology of antibiotics, enzymes, probiotics and starter cultures

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Nutrition

Graduate university study programme: Nutrition

In vitro survival analysis of selected probiotic strains in simulated conditions of the infant gastrointestinal tract

Maja Zovko, univ. bacc. nutr.
0058215404

Abstract:

Survival of adverse conditions of the gastrointestinal tract (GIT) is one of the key criteria when selecting probiotic strains, because the GIT is the target site of their action. Therefore, the aim of this study was to determine the *in vitro* survival of *Levilactobacillus brevis* and *Limosilactobacillus fermentum* strains, previously isolated from the microbiota of human milk, and to assess the protective effect of infant formula during the transit of the analyzed strains in simulated gastrointestinal tract conditions. The tolerance of the analyzed strains to bile salts was preliminarily determined, which is an indicator of the assessment of the potential of probiotic bacteria to survive *in vivo* in the intestinal system. Both strains show relatively high resistance to bile salts. According to the results, the analyzed strains survive in a significantly higher number of probiotic cells than the prescribed 10×10^6 CFU/m. A comparative analysis of the survival of the strains confirmed the effective adaptation to simulated conditions of gastric juice and small intestinal juice, with *Levilactobacillus brevis* showing increased efficiency compared to *Limosilactobacillus fermentum*. It is assumed that the increased resistance of the analyzed strains is due to the protective effect of infant formula in simulated gastrointestinal tract conditions.

Keywords: *probiotics, Lactobacillus, simulated gastrointestinal tract conditions*

Thesis contains: 43 pages, 13 figures, 8 tables, 55 references, 0 supplements

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in the Library of the University of Zagreb Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: Jasna, Novak, PhD, Full professor

Reviewers:

1. Blaženka Kos, PhD, Full professor (president)
2. Jasna Novak, PhD, Full professor (mentor)
3. Ksenija Markov, PhD, Full professor (member)
4. Jasna Mrvčić, PhD, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: December, 19th, 2024

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. CRIJEVNA MIKROBIOTA NOVOROĐENČADI - ULOGA I METABOLIČKA AKTIVNOST	2
2.2. PROBAVA HRANE U GASTROINTESTINALNOM TRAKTU DOJENČADI	4
2.2.1. Bakterijske vrste u gastrointestinalnom traktu dojenčadi	4
2.3. MEHANIZMI ADAPTACIJE STANICE <i>LACTOBACILLUS</i> NA UVJETE GASTROINTESTINALNOG TRAKTA	6
2.3.1. Adaptacija na uvjete visokih koncentracija kiselina i žučni stres	6
2.3.2. Adaptacija na oksidativni i osmotski stres	8
2.3.3. Adaptacija na uvjete nedostatka hranjivih tvari	8
2.5. MEHANIZMI ADHEZIJE BAKTERIJA <i>LACTOBACILLUS</i> U GASTROINTESTINALNOM TRAKTU	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO	12
3.1. MATERIJALI	12
3.1.1. Bakterijski sojevi	12
3.1.2. Laboratorijski uređaji	12
3.1.3. Laboratorijski pribor	13
3.1.4. Kemikalije	13
3.2. METODE	14
3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama	14
3.2.2. Inokulacija i kultivacija bakterijskih sojeva	14
3.2.3. Određivanje broja živih mikroorganizama indirektnom metodom	14
3.2.4. Procjena preživljavanja bakterijskih sojeva u simuliranom probavnom traktu dojenčadi	15
3.2.5. Praćenje preživljavanja bakterijskih kultura u 0,3% otopini žučnih soli	17
4. REZULTATI I RASPRAVA	20
4.1. ANALIZA BAKTERIJSKOG RASTA <i>LEVILACTOBACILLUS BREVIS</i> MB13 i <i>LIMOSILACTOBACILLUS FERMENTUM</i> MC1	20
4.2. PREŽIVLJAVANJE <i>LACTOBACILLUS</i> SOJEVA U SIMULIRANIM UVJETIMA GASTROINTESTINALNOG TRAKTA	23
4.2.1. Preživljavanje <i>Lactobacillus</i> sojeva u 0,3 % otopini žučnih soli	32
5. ZAKLJUČCI	37
6. LITERATURA	38

1. UVOD

Dugo se vremena smatralo da je majčino mlijeko sterilno, a pretpostavljalo se da je prisutnost bakterija rezultat kontaminacije. Smatralo se da mikroorganizmi u mlijeku potječu od trudnica s mastitisom, iz kože, vagine, crijeva ili usne šupljine. Prvi opisi bakterijske raznolikosti humanog mlijeka zdravih žena 2003. godine temeljili su se na *in vitro* metodama uzgoja (Heikkilä i Saris, 2003). Od tada su objavljene mnoge studije o bakterijskim zajednicama humanog mlijeka, koje koriste metode ovisne o kulturi i neovisne o kulturi (Kozak i sur., 2015; Ruiz i sur., 2019).

Autohtono prisutne bakterije u humanom mlijeku pripadaju većinom sojevima *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, koje su korisne bakterije, te se istražuju kao kandidati za probiotike (Ruiz i sur., 2019). Mikrobiom majčinog mlijeka izvor je sojeva za formiranje intestinalne mikrobiote novorođenčeta.

Upravo *Lactobacillus* bakterije, imaju kapacitet preživljavanja nepovoljnih uvjeta gastrointestinalnog trakta, kao što su kiseli pH, žučne soli, oksidativni i osmotski stres. Također se prilagođavaju uvjetima izgladnjivanja pri iscrpljenosti odgovarajućih supstrata, te se specifičnim staničnim mehanizmima adaptiraju na različite stresne uvjete.

Banić i suradnici (2022) su potvrdili prisutnost *Levilactobacillus brevis* i *Limosilactobacillus fermentum* sojeva u humanom mlijeku, koji su identificirani pristupima sljedeće generacije sekvenciranja. Primjer su korisnih bakterija koje se izolirane iz mikrobiote majčinog mlijeka te se pretpostavlja njihova funkcionalna uloga u zdravlju dojenčeta (Banić i sur., 2022).

Cilj ovog rada bio je odrediti *in vitro* preživljavanje sojeva *Lactobacillus brevis* i *Limosilactobacillus fermentum*, prethodno izoliranih iz mikrobiote majčinog mlijeka, te procijeniti zaštitni učinak dojenačke formule prilikom tranzita analiziranih sojeva u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta. Da bi korisne bakterije pozitivno djelovale na organizam domaćina, važno je da prežive prolazak kroz gastrointestinalni trakt, te je za ispitivanje korišten gastrointestinalni model. Dodatno je analizirana tolerancija sojeva na žučne soli. To je čimbenik koji smanjuje količinu preživjelih bakterija nakon *in vitro* simulacije gastrointestinalnog trakta, te pomaže predvidjeti potencijal bakterija da prežive specifičnije uvjete *in vivo*. Zato je u svrhu daljnje karakterizacije odabranih sojeva, ispitano preživljavanje sojeva pri specifičnoj koncentraciji žučnih soli primjenom *in vitro* metodologija (Charteris i sur., 2000).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. CRIJEVNA MIKROBIOTA NOVOROĐENČADI - ULOGA I METABOLIČKA AKTIVNOST

Majčino mlijeko je optimalan izvor nutrijenata i biološki aktivnih tvari potrebnih za prehranu, rast i razvoj novorođenčeta. Sastoji se od točne količine hranjivih tvari i bioaktivnih spojeva kako bi se osigurala potpuna prehrana za dojenče u razvoju, kao i od korisnih bakterija koje štite osjetljivi imunološki sustav od bolesti (slika 1) (Lyons i sur., 2020). Unatoč tome što se dugo vremena smatralo sterilnom tekućinom, istraživanja su pokazala da majčino mlijeko sadrži niz korisnih bakterija, tj. vlastiti mikrobiom (Hennet T i Borsig, 2016). Mikroorganizmi su važne bioaktivne komponente ljudskog mlijeka i postoji sve veći interes za istraživanje učinka ljudskog mlijeka na zdravlje majke i djeteta. Prirodno prisutne bakterije u ljudskom mlijeku imaju GRAS (engl. *Generally recognized as safe*) status i potencijalno probiotičko djelovanje. (Ruiz i sur., 2019). Mikrobiom majčinog mlijeka važan je za ranu kolonizaciju gastrointestinalnog sustava dojenčeta korisnim bakterijama. Kada majčino mlijeko nije opcija, dojenačka nadomjesna formula primjenjuje se kao alternativna prehrana za opskrbu djeteta osnovnim hranjivim tvarima. Dodavanje probiotika u formulu koristi se za poticanje rasta bakterija u crijevima.

Prema definiciji probiotički sojevi su živi mikroorganizmi koji primijenjeni u dovoljno visokoj koncentraciji mikrobnih stanica doprinose zdravlju domaćina (Kaur Sarao i Arora, 2017; FAO/WHO, 2002). Većina probiotičkih bakterija su sojevi iz rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* (Guarner i sur., 2005; Sanders, 2003; Salminen i von Wright, 1998). Da bi se pojedini soj smatrao probiotikom mora ispuniti stroge kriterije, kao što su otpornost na nepoželjne uvjete gastrointestinalnog trakta (otpornost na želučanu kiselinu i žučne soli), ne smiju biti toksični, ne smiju imati prenosive gene odgovorne za antibiotsku rezistenciju tj. sigurni su za humanu upotrebu. Uz to, odabrani sojevi moraju pokazati sposobnost adhezije i kolonizacije u gastrointestinalnom traktu (GIT) (Kaur Sarao i Arora, 2017; Guarner i sur., 2005; Morelli, 2000).

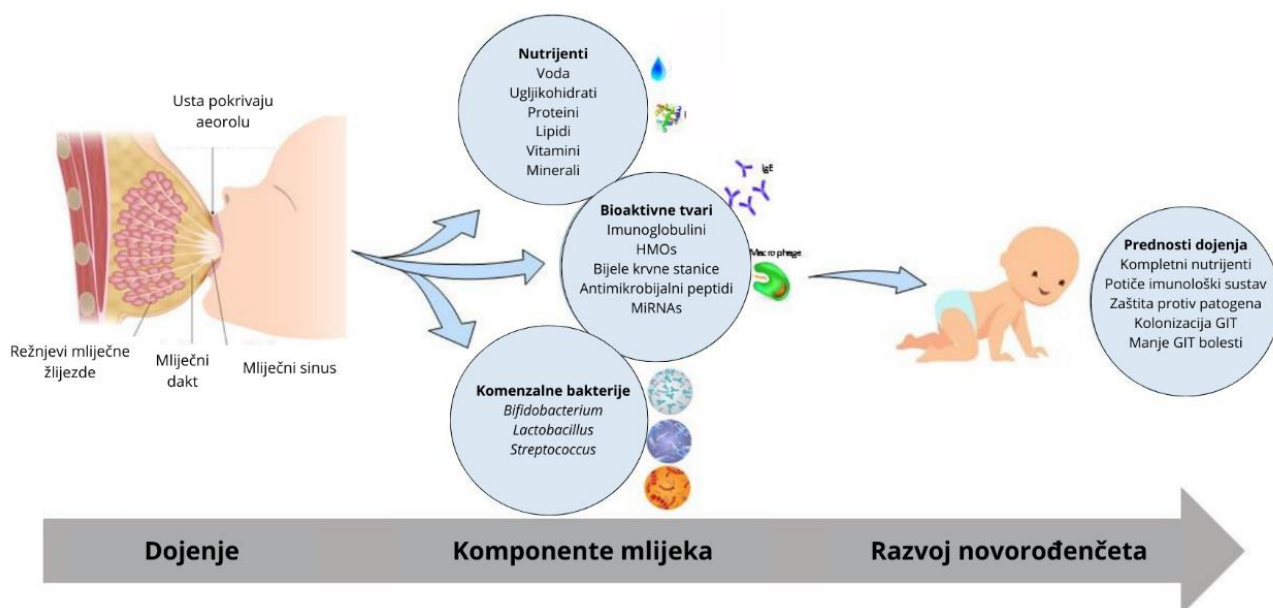
Uspostavljeni intestinalni mikrobiom ima ključnu ulogu u održavanju cjelokupnog zdravlja djeteta, te sudjeluje u raznim metaboličkim aktivnostima koje značajno utječu na tjelesne funkcije (Lyons i sur., 2020).

Prvenstveno, jedna od ključnih uloga mikrobioma je pomoć u probavi i apsorpciji hranjivih tvari. Mikrobiom je uključen u sintezu i apsorpciju esencijalnih vitamina i povećava njihovu bioraspoloživost, te je važan za razgradnju lijekova i toksina. Bakterije u majčinom mlijeku doprinose probavi dojenčadi razgradnjom šećera i proteina. Ta je mogućnost posebno važna, jer je prolazak hrane kroz gastrointestinalni trakt kod dojenčadi kraći nego kod odraslih, te je pH želuca dojenčeta viši nego kod odrasle osobe. Zbog toga se u crijevima dojenčadi sojevi

Lactobacillus iz ljudskog mlijeka smatraju metabolički aktivnima i povećavaju proizvodnju funkcionalnih metabolita. Kao rezultat toga, oni poboljšavaju rad crijeva i povećavaju učestalost i volumen stolice. (Fernandez i sur., 2013.)

Osim što je važan za razvoj gastrointestinalnog sustava, mikrobiom ima zaštitnu ulogu i sudjeluje u razvoju i modulaciju imunološkog sustava djeteta. Njihova interakcija pomaže imunološkom sustavu dojenčeta razlikovati štetne patogene od vlastitih stanica ili korisnih bakterija. Time se smanjuje rizik od pretjeranih reakcija poput alergija, infekcija i autoimunih bolesti. Uz to, mikrobiom proizvodi metaboličke nusprodukte koji utječu na imunološku aktivnost, što pomaže regulirati ravnotežu između proupalnih i protuupalnih signala. To je bitno za održavanje zdravog imunološkog sustava i zaštitu od bolesti (Yang i sur., 2016).

Potpuna kolonizacija crijeva događa se unutar otprilike 3 godine života, kada se postiže homeostaza. Brojna istraživanja su pokazala da je rani razvoj zdravog crijevnog mikrobioma i održavanje homeostaze povezano s dugoročnim zdravstvenim prednostima, kao što su smanjeni rizik od pretilosti, dijabetesa i drugih metaboličkih poremećaja kasnije u životu (Cabrera-Rubio i sur., 2012).



Slika 1. Sastav majčinog mlijeka i povezane dobrobiti (prema Lyons i sur., 2020)

2.2. PROBAVA HRANE U GASTROINTESTINALNOM TRAKTU DOJENČADI

Gastrointestinalni trakt (GIT) čovjeka najveća je dinamička barijera tijela s okolinom koja sadrži složenu mikrobnu zajednicu. Crijevni epitel omogućuje unos hranjivih tvari, luči vodu i elektrolite, a istovremeno djeluje kao barijera za patogene i toksine (Sengupta i sur., 2013). Zdrava probava je ključna jer razgrađuje hranu na hranjive tvari koje tijelo treba za energiju i rast. Omogućuje apsorpciju vitamina, minerala i drugih vitalnih tvari uz eliminaciju otpada. Pravilna probava također podupire imunološki sustav, održava zdravlje crijeva i osigurava opću dobrobit (Botes, 2008).

Probava počinje u ustima, gdje slina sadrži enzim amilazu za razgradnju škroba i mucin za podmazivanje hrane. Hrana se gutanjem pomiče kroz jednjak u želudac, pomoću valovitih mišićnih pokreta (peristaltika). Na kraju jednjaka, hrana se prazni u gornji dio želuca: korpus i fundus. Želudac miješa hranu sa želučanim sokovima, pri čemu se stvara smjesa polutekućeg sadržaja, himus. Sokovi sadrže klorovodičnu kiselinu, pepsinogen (za razgradnju proteina) i hormone poput gastrina koji reguliraju probavni proces (Guyton, 1991). Pri donjem dijelu želuca ili pilorusa, mišićni ventil kontrolira otpuštanje himusa u prvi dio tankog crijeva koji se naziva dvanaesnik. Duodenum je dugačak samo 25 cm, ali najveći dio probave odvija se u ovom području. Himus se u dvanaesniku miješa s enzimima iz gušterače i žuči, omogućujući razgradnju ugljikohidrata, masti i proteina.

Apsorpcija hranjivih tvari odvija se u crijevima. Sluznica crijeva ima mnogo nabora (*Kerckringovi* nabori) koji povećavaju površinu sluznice približno tri puta. Ti se nabori protežu kružno duž većeg dijela crijeva i dobro su razvijeni u duodenumu i jejunumu. Male resice pokrivaju cijelu površinu tankog crijeva (*Kerckringovi* nabori). Resice i mikrovilli povećavaju apsorpcijsku površinu sluznice do 600 puta.

Neprobavljeni sadržaj dopijeva peristaltikom u debelo crijevo gdje je prisutna visoka koncentracija mikrobne, pretežito bakterijske populacije, crijevne mikrobiote. Bakterije fermentiraju dio neprobavljenog materijala, proizvodeći kratkolančane masne kiseline. Kratko lančane masne kiseline koriste se kao izvor energije za bakterije i stanice koje oblažu debelo crijevo. Na kraju, preostali dio sadržaja eliminira se fecesom (Botes, 2008).

2.2.1. Bakterijske vrste u gastrointestinalnom traktu dojenčadi

Ljudski gastrointestinalni trakt, kao jedan od najsloženijih ekosustava u tijelu, sadrži između 500 i 1000 različitih vrsta bakterija (filotipova) te čak do 7000 različitih bakterijskih sojeva. Ove bakterije neprestano međusobno djeluju i komuniciraju s domaćinom. Takva interakcija rezultira stvaranjem raznolike i dinamične mikrobiote, čiji se sastav stalno prilagođava različitim unutarnjim i vanjskim čimbenicima. Važno je napomenuti da je svaka osoba jedinstvena po sastavu svoje crijevne mikrobiote, što ovisi o nizu faktora poput genetskih

karakteristika, prehrambenih navika, te općeg zdravstvenog i fiziološkog stanja. Osim toga, urođena i stečena obilježja imunološkog sustava također imaju ključnu ulogu u oblikovanju mikrobiote (Pelaseyed i sur., 2014).

Iako se bakterije smatraju dominantnim stanovnicima gastrointestinalnog trakta, ovaj ekosustav uključuje i druge vrste mikroorganizama. Uz bakterije, u probavnom traktu mogu se naći i eukariotski virusi, bakterijski virusi poznati kao bakteriofagi, gljive te arheje, što dodatno doprinosi složenosti ovog mikrobioma (Lim i sur., 2015).

Bakterijske vrste koje su izolirane iz ljudskog gastrointestinalnog trakta mogu se grupirati u tri osnovne skupine prema njihovoj prisutnosti i funkciji u mikrobioti:

1. Autohtona ili rezidentna flora – Ovo su mikroorganizmi koji su gotovo uvijek prisutni u velikom broju u probavnom sustavu i predstavljaju stabilan, dugotrajan dio mikrobiote. Primjeri takvih bakterija uključuju rodove *Bacteroides*, *Bifidobacterium* i druge slične mikroorganizme koji igraju ključnu ulogu u održavanju zdravlja probavnog sustava.
2. Rezidentna flora prisutna u manjim ili umjerenim količinama – Ova skupina uključuje bakterije koje su prisutne u normalnoj mikrobioti, ali u značajno manjim brojevima. To su, primjerice, članovi obitelji *Enterobacteriaceae*, te rodovi poput *Streptococcus* i *Lactobacillus*, koji i dalje pridonose ravnoteži mikrobiote.
3. Prolazna flora – Mikroorganizmi iz ove skupine povremeno su prisutni u probavnom sustavu, ali ne tvore stabilni dio mikrobiote. Oni obično dolaze iz vanjskih izvora, poput okoliša ili drugih dijelova tijela, i uključuju rodove kao što su *Staphylococcus*, *Haemophilus*, *Bacillus* i *Corynebacterium* (Mitsuoka, 1992).

Razvoj crijevne mikrobiote započinje odmah nakon rođenja i podložan je brojnim promjenama tijekom prvih mjeseci i godina života. Do kraja prve godine života, u crijevima dojenčadi dominiraju bakterije iz rodova *Bacteroidetes* i *Firmicutes*. Na redoslijed kolonizacije bakterija uvelike utječu čimbenici poput načina poroda, prehrane dojenčeta i primjene antibiotika. Primjerice, vaginalni porod omogućuje kolonizaciju crijeva bakterijama iz vaginalnog trakta majke, poput rodova *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Prevotella*, *Escherichia* i *Streptococcus*. S druge strane, djeca rođena carskim rezom često imaju mikrobiotu sličniju kožnoj mikrobioti majke, s povećanom prisutnošću bakterija poput *Staphylococcus* te smanjenim udjelom *Bifidobacterium* i *Bacteroides* (Biasucci i sur., 2010; Dominguez-Bello i sur., 2010).

Prehrana ima ključnu ulogu u oblikovanju crijevne mikrobiote tijekom ranih faza života. Majčino mlijeko, kao prvi i prirodni izvor prehrane za novorođenčad, pruža jedinstvene sastojke koji potiču rast korisnih bakterija. Među njima su oligosaharidi, složeni šećeri koji hrane korisne bakterije, zatim lizozimi i laktoferin, koji imaju antimikrobna svojstva i štite od štetnih mikroorganizama, te antitijela i citokini koji jačaju imunološki sustav. Zajedno, ovi spojevi

stvaraju optimalne uvjete za rast bakterija kao što su *Bacteroides*, *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*, koje su poznate po svom pozitivnom učinku na zdravlje (Bertelsen i sur., 2016).

Iako se pokazalo kako dojenje ima koristan učinak na razvoj i sazrijevanje crijevne mikrobiote dojenčadi, već je poznato kako postoje situacije u kojima ono nije uvijek moguće. U takvim slučajevima se koriste adaptirane dječje formule koje nastoje biti što sličnije majčinom mlijeku. Međutim, crijevna mikrobiota dojenčadi hranjene majčinim mlijekom razlikuje od crijevne mikrobiote dojenčadi koja je hranjena adaptiranim dječjim formulama. Dječjim formulama često nedostaju različite bakterijske zajednice prirodno prisutne u majčinom mlijeku. Kako bi se nadomjestile, dodavanje prebiotika u nadomjesnu formulu uobičajena je praksa za poticanje rasta korisnih bakterija i podržavanje razvoja neonatalne mikrobiote (Lyons i sur., 2020).

2.3. MEHANIZMI ADAPTACIJE STANICE *LACTOBACILLUS* NA UVJETE GASTROINTESTINALNOG TRAKTA

U majčinom mlijeku postoji više od 200 sojeva bakterija, uključujući i *Lactobacillus* bakterije. Njihova prisutnost je iznimno vrijedna u oblikovanju pravilne mikrobiote djeteta. Probiotički potencijal *Lactobacillus* sojeva dobivenih iz majčinog mlijeka sličan je potencijalu sojeva koji se koriste u komercijalnim probiotičkim proizvodima. Imaju sposobnost prianjanja i interakcije s epitelom i slojevima sluznice, dok preživljavaju neprijateljske uvjete gastrointestinalnog trakta i konkurentsku mikrobiotu. Također, cijeni se njihova sigurnost zbog prirodnog podrijetla, antiinfektivnih i imunomodulacijskih svojstava. (Łubiech i Twarużek, 2020).

Tijekom svog prolaska kroz gastrointestinalni trakt, stanice laktobacili izloženi su čimbenicima stresa iz okoliša kao što su nizak pH, žučne soli, oksidativni i osmotski stres, nedostatak nutrijenata. *Lactobacillus* bakterije su razvile strategije za preživljavanje stresnih uvjeta, tako da se oslanjaju na koordiniranu ekspresiju ili potiskivanje određenih gena. Takva prilagodba na stres može promijeniti stanične procese poput stanične diobe, sastava membrane, transportnih sustava i metabolizma DNA. Regulaciju ovih gena provode čimbenici, poput proteina, koji mogu kontrolirati više gena odjednom. Način na koji *Lactobacillus* reagiraju na stres ovisi o specifičnom soju ili vrsti bakterije i vrsti stresa s kojim se suočavaju (Sengupta i sur., 2013).

2.3.1. Adaptacija na uvjete visokih koncentracija kiselina i žučni stres

Preživljavanje kiselih uvjeta želuca *Lactobacillus* vrste postižu prilagodbom na niski pH putem mehanizma koji se naziva reakcije tolerancije na kiselinu (engl. *acid tolerance response* , ATR). Studije s varijantama *L. acidophilus* otpornim na kiselinu i žuč sugeriraju da

dva sustava rade zajedno kako bi pružila zaštitu od kiselog stresa. Jedan od njih je već postojeći sustav prisutan u bakterijama i aktivira se kao odgovor na kiselinu, te drugi *De novo* mehanizam sinteze proteina, gdje se proizvode novi proteini koji pomažu bakterijama da se prilagode kiselj sredini (Sengupta i sur., 2013).

Jedan od ključnih mehanizama za toleranciju žuči kod vrsta *Lactobacillus* je proizvodnja enzima hidrolaze žučnih soli. Žučne kiseline su konjugirane s glicinom ili taurinom u jetri i ulaze u crijeva, gdje ih enzimi mogu hidrolizirati u slobodne žučne kiseline, smanjujući njihova svojstva slična deterdžentu i sprječavajući oštećenje stanične membrane bakterija (Sengupta i sur., 2013).

Tijekom prilagodbe bakterijskih stanica na žučni i kiselj stres uključeni su mnogi mehanizmi rezistencije koji rezultiraju promjenom površinskih struktura stanica laktobacila. Makromolekule koje sačinjavaju staničnu stijenku i membranu bakterijske stanice pridonose održavanju cjelovitosti stanice u ovim stresnim situacijama. *Lactobacillus* bakterije modificiraju sastav masnih kiselina svoje stanične membrane kao odgovor na nizak pH i žučne soli, te tako održavaju integritet i funkcionalnost stanice pod stresom. Pokazalo se da žučne soli i kolesterol izazivaju promjene u lipidnoj staničnoj membrani *L. reuteri*, dok nizak pH uzrokuje promjene u sastavu masnih kiselina oralnog soja *L. casei* (Fozo i sur., 2004.).

Također, istraživanja odgovora na kiselinu i žučne soli u različitim vrstama *Lactobacillus* identificirali su gene uključene u biosintezu peptidoglikana (PG) i drugih funkcija stanične ovojnice. Peptidoglikan (PG) je kritična komponenta bakterijske stanične stijenke koja pruža strukturnu potporu i pomaže u zaštiti stanice od stresa iz okoliša. Kada su bakterije *Lactobacillus* izložene kiselini ili žuči, one reguliraju gene koji pomažu ojačati njihove stanične stijenke, čineći ih otpornijim na uvjete. Analiza ekspresije gena *L. acidophilus* identificirala je velik broj gena uključenih u biosintezu PG i proteina na površini stanice koji se različito eksprimiraju nakon izlaganja žuči. SrtA (engl. *Sortase A*) je protein koji pomaže pričvrstiti određene površinske proteine na staničnu stijenku, te ima ulogu u interakciji bakterije s okolinom i tako pomaže održati integritet stanice (Sengupta, 2013).

Za druge strukture stanične površine, kao što su lipoteihonska kiselina (engl. *Lipoteichoic acids*, LTA), teihonske kiseline stanične stijenke (engl. *Wall teichoic acids*, WTA) i egzopolisaharidi (engl. *Exopolysaccharides*, EPS), također se pretpostavlja da imaju ulogu u pravilnom funkcioniranju integriteta stanice u kiselim uvjetima i u prisutnosti žuči. To su molekule koje su dio bakterijske stanične stijenke i uključene su u održavanje staničnog oblika, stabilnosti i sposobnosti prianjanja na površine (Sengupta, 2013).

2.3.2. Adaptacija na oksidativni i osmotski stres

Uz kiselinski i žučni stres, važna je sposobnost preživljavanja laktobacila u oksidativnom i osmotskom stresu u gastrointestinalnom traktu. Oksidativni stres uzrokovan je izlaganjem stanice reaktivnim metabolitima kisika (engl. *reactive oxydative species*, ROS), te može nepovoljno utjecati na staničnu funkciju. Reaktivni metaboliti kisika nastaju kao rezultat djelomične redukcije kisika na superoksidne anionske radikale (O_2^-), hidroksilne radikale (OH^-) i vodikov peroksid (H_2O_2). Višestruko nezasićene masne kiseline, u staničnoj membrani, osjetljive su na izlaganje ROS-u, što dovodi do procesa koji se naziva peroksidacija membranskih lipida i do promjene proteina. Peroksidacija membranskih lipida i promjene proteina mogu utjecati na propusnost stanične membrane i osmoregulaciju (Miyoshi i sur., 2003).

Kako bi se smanjila šteta uzrokovana ROS-om, laktobacili se suprotstavljaju stvaranju ROS-a uz pomoć enzima kao što su katalaza, NADH oksidaza/peroksidaza i superoksid dismutaza (SOD) ili uz pomoć neenzimskih spojeva kao što su askorbat, glutation i Mn^{2+} . Otpornost na oksidativni stres uvelike varira između vrsta i sojeva. Mehanizmi upravljanja stresom kreću se od sprječavanja stvaranja ROS-a, eliminacije ROS-a i obrane od oksidativnog oštećenja do popravka oksidativnog oštećenja (Guchte i sur., 2002).

Laktobacili su često izloženi promjenama u osmolarnosti u svojoj okolini, što može ugroziti bitne stanične funkcije. Promjene u koncentraciji otopljenih tvari u okolišu uzrokuju promjene u staničnom turgorskom tlaku, što dovodi do promjena u staničnom volumenu. Kako bi održali tlak turgora i zadržali vodu u stanici, laktobacili u hiperosmotskim uvjetima, kada okolina ima višu koncentraciju otopljenih tvari nego unutrašnjost stanice, nakupljaju kompatibilne otopljene tvari. Nasuprot tome, u hipoosmotskim uvjetima, kada okolina ima manju koncentraciju otopljenih tvari nego unutar stanice, laktobacili oslobađaju kompatibilne otopljene tvari (Sengupta, 2013).

2.3.3. Adaptacija na uvjete nedostatka hranjivih tvari

Izgladnjivanje, tj. nedostatak hranjivih tvari je jedan od najčešćih vrsta stresa s kojima se suočavaju laktobacili. Sposobnost prilagodbe specifičnoj prehrambenoj okolini važna je za laktobacile i osigurava im vrijeme zadržavanja i preživljavanje u gastrointestinalnom traktu. Nestašica hranjivih tvari kod laktobacila uglavnom je proučavana ograničavanjem opskrbe ugljikohidratima, fosfatima i dušikom. Laktobacili se prilagođavaju ovim nutritivnim nedostacima regulacijom sinteze nukleinskih kiselina i proteina i/ili razgradnjom već postojećih proteina i sintezom aminokiselina (Chatterji i Kumar, 2001).

Uvjeti ekstremnog stresa u okolišu mogu neizravno izazvati gladovanje smanjenjem aktivnosti prijenosnika, proteina koji pomažu bakterijama da apsorbiraju hranjive tvari iz svoje okoline (Konings i sur., 1997). Nestašica hranjivih tvari dovodi do zaustavljanja rasta. Kada

uđu u stacionarnu fazu, stadij ciklusa rasta u kojem se prestaju dijeliti zbog nedostatka hranjivih tvari, mogu smanjiti veličinu svoje stanice kako bi smanjili potrebe za energijom i resursima. Ova promjena stanične morfologije i diobe pomaže bakterijama u očuvanju resursa i omogućuje dulje preživljavanje u stresnim uvjetima. Također, poznato je da kada bakterije uđu u stacionarnu fazu općenito postaju otpornije na razne stresore, kao što su toplina, kiselost i oksidativni stres (Guchte i sur., 2002.).

Iako neki proteini mogu biti inducirani višestrukim stresnim uvjetima, samo nekoliko njih je zajedničko svim vrstama stresa. Ovo sugerira da iako bakterije imaju specifične odgovore na pojedinačne stresove, one također dijele neke opće mehanizme koji im pomažu da se nose s različitim izazovima okoliša (Sengupta, 2013).

2.5. MEHANIZMI ADHEZIJE BAKTERIJA *LACTOBACILLUS* U GASTROINTESTINALNOM TRAKTU

Prianjanje bakterija na sluznicu gastrointestinalnog trakta važan je čimbenik za kolonizaciju i boravak u crijevima. Njihovo prianjanje za sluznicu GIT-a dovodi do izravnih interakcija s domaćinom, što može rezultirati kompetitivnim isključivanjem patogena i modulacijom imunološkog odgovora domaćina (tablica 1).

Tablica 1 . Čimbenici stanične površine laktobacila uključeni u interakcije mikroba i domaćina (prema Sengupta, 2013).

<i>Lactobacillus</i> soj	Mehanizam i učinak	Čimbenici stanične površine	Ciljne stanice ili čimbenici domaćina	Referenca
<i>Levilactobacillus brevis</i>	Adherencija, zaštita od stresora i poboljšanje funkcije barijere	proteini S-sloja	Intestinalne epitelne stanice	Åvall-Jääskeläinen i sur., 2003; Garcia-Lafuente i sur., 2001
<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	Adherencija	Sluz koja veže protein	sluz	Macías-Rodríguez i sur., 2009

Adhezivni mehanizmi humanih patogenih bakterija opsežno su proučavani upotrebom *in vitro* modela sustava. Međutim, znanje o specifičnim molekulama stanične površine koje omogućuju *Lactobacillus* da se zalijepi za sluznicu crijeva još uvijek je ograničeno. Istraživanja su otkrila nekoliko proteina na površini bakterijske stanice koji se vežu na sluz i crijevne stanice. *Lactobacillus* adhezini su molekule na površini bakterija koje im pomažu da se pričvrste na sluznicu crijeva. Oni su grupirani u nekoliko kategorija na temelju svojih funkcija: proteini koji vežu sluz; proteini ovisni o sortazi; proteini S-sloja; proteini koji posreduju pri adheziji na komponente izvanstaničnog matriksa (engl. *extracellular matrix*, ECM) i neproteinski adhezini (LTA i EPS) (Sengupta i sur., 2013).

Epitelne stanice crijeva čine barijeru između domaćina i sadržaja lumena i prekrivene su zaštitnim slojem sluzi. Sloj sluzi se dinamično proizvodi, razgrađuje i erodira. Dinamičnost omogućuje bakterijama samo kratko vrijeme zadržavanja u GIT-u nakon adhezije, čime štiti domaćina od patogena i nepoželjne bakterijske kolonizacije. Međutim, sloj sluzi također predstavlja stanište za komenzalne bakterije, kao što su laktobacili (MacKenzie i sur., 2010).

Adhezija *Lactobacillus* na sluz uključuje proteine koji vežu sluz (engl. *Mucus binding proteins*, Mubs). Studije s *L. fermentum* pomogle su identificirati i karakterizirati protein koji veže sluz (32-mMubp) za koji se pretpostavlja da posreduje pri adheziji na sluz (MacKenzie i sur., 2010).

Neki laktobacili imaju fimbrije, također zvane pili, koje navodno poboljšavaju adheziju na glikoproteine sluzi stanica domaćina što poboljšava naknadnu kolonizaciju GIT-a (Kankainen i sur., 2009). Studije s *L. rhamnosus* GG pokazale su faktor vezanja sluzi (engl. *Mucus binding factor*, MBF). Smatra se da MBF djeluje uz fimbrije, povećavajući sposobnost bakterija da se pričvrste za sluznicu crijeva (Ossowski i sur., 2011).

Također, u laktobacila, na površini bakterije postoje proteini ovisni o sortazi koji igraju ulogu u adheziji i interakciji s okolinom domaćina. Iako mnoge proteine ovisne o sortazi kodiraju laktobacili, većina nema dodijelenu funkciju. Neki od poznatih proteina ovisnih o sortazi, a koji imaju ulogu u prijanjanju na sluz uključuju: Mub u *Lactobacillus reuteri* i *Lactobacillus acidophilus*, Msa u *Lactobacillus plantarum* i LspA u *Lactobacillus salivarius* (Canchaya i sur., 2006).

U različitim vrstama laktobacila, proteini S-sloja tvore krajnju vanjsku površinu za interakciju. Pokazalo se da djeluju kao adhezini na epitelne stanice i komponente poput sluzi i proteina izvanstaničnog matriksa.

Osim proteina koji pomažu pri prijanjanju, vrste *Lactobacillus* također koriste neproteinske komponente poput LTA i EPS za prijanjanje na stanice u gastrointestinalnom traktu (Sengupta i sur., 2013).

Opisani mehanizmi omogućuju *Lactobacillus* bakterijama da stvore fizičku barijeru koja

sprječava kolonizaciju patogenih bakterija i doprinosi održavanju zdravlja domaćina. Iako su mnogi proteini koji sudjeluju u adheziji identificirani, njihova točna funkcija i način djelovanja često ostaju nedovoljno istraženi i zahtijevaju daljnja istraživanja.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

U eksperimentalnom dijelu provedeno je ispitivanje tolerancije odabranih bakterijskih sojeva na uvjete u gastrointestinalnom traktu dojenčeta. Postupak je obuhvaćao:

1. Inokulacija i kultivacija bakterijskih sojeva
2. Određivanje broja živih mikroorganizama indirektnom metodom
3. Procjena preživljavanja bakterijskih sojeva *in vitro* u simuliranom probavnom traktu dojenčadi
4. Praćenje preživljavanja u 0,3 % otopini žučnih soli u MRS-u
5. Obrada podataka

3.1. MATERIJALI

U ovom poglavlju navedeni su korišteni bakterijski sojevi kojima je određeno preživljavanje u simuliranom probavnom traktu, te koji su materijali korišteni u provođenju eksperimenta.

3.1.1. Bakterijski sojevi

U ovom radu korištene su čiste bakterijske kulture izolirane iz majčinog mlijeka: *Limosilactobacillus fermentum* MC1 i *Levilactobacillus brevis* MB13 prikazane u tablici 2. Čuvane su u 15 % (v/v) glicerolu u hladnjaku Eppendorf Cyrocube F101h pri -80 °C.

Tablica 2. Bakterijski sojevi korišteni u ovom radu i uvjeti rasta

Naziv i oznaka soja	Hranjive podloge i uvjeti rasta
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> MC1	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Levilactobacillus brevis</i> MB13	MRS, 37 °C, anaerobno

3.1.2. Laboratorijski uređaji

- Analitička vaga, Sartorius, Hrvatska
- Vaga, Tehnica, Slovenija
- Termostat, Instrumentarija, Hrvatska
- Anaerobni sistem inkubacije – anaerobna komora sa atmosferom koja sadrži oko 5 % ugljikovog dioksida
- Centrifuga, Digitor21R, OrtoAlerisa, Španjolska)
- Zamrzivač (-80 °C), Eppendorf Cyrocube F101h, SAD
- Brojač kolonija BZG30, Colony Counter, WTW, Njemačka
- Bunsenov plamenik, OMM Laboratory Equipment, Italija
- Spektrofotometar, BioSpec-nano, Shimadzu, Japan
- Hladnjak, Gorenje, Slovenija

- pH metar, Metrohm, Švicarska

3.1.3 Laboratorijski pribor

- Automatske pipete (500 – 5000 µL), Eppendorf, SAD
- Eppendorf Epruvete, Eppendorf, SAD (1,5 mL; 2 mL; 5 mL)
- Petrijeve zdjelice, Golias, Slovenija
- Epruveta za centrifugu tipa Falcon, neoLab, Njemačka (50 mL)
- staklene epruvete, Scherf Präzision Europe GmbH, Njemačka
- stalci za mikroeprevete, neoLab, Njemačka
- stalci za epruvete, neoLab, Njemačka
- ploča za ispitivanje kulture tkiva 96F, TPP, Švicarska, Europa
- Staklene čaše
- Erlenmeyerova tikvica

3.1.4. Kemikalije

- MRS (Man, Rogosa i Sharpe) agar, sastava (g/L destilirane vode): pepton 10; mesni ekstrakt 10; kvašćev ekstrakt 5; glukoza 20; Tween 80; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2; $\text{MnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05; Na-acetat 5; agar 13. pH vrijednost podloge je 6,5; sterilizacija je provedena u autoklavu pri 121 C/15min.
- MRS (Man, Rogosa i Sharpe) bujon je istog sastava kao MRS-agar, samo bez dodanog agara.
- Anaerocult® reagens za stvaranje anaerobnog medija u anaerobnim posudama, Merck KGaA, Njemačka
- etanol, Kemika, Hrvatska
- Fiziološka otopina, 0,9 % otopina natrijeva klorida
- Klorovodična kiselina, Sigma-Aldrich, SAD
- Natrijeva lužina, Kemika, Hrvatska
- 0,5 % otopina natrijeva klorida, Kemika, Hrvatska
- M17 agar
- Pepsin, Sigma, SAD
- Pankreatin, Fluka, Švicarska
- Žučne soli goveđe žuči, Difco, SAD
- Aptamil Pronutra 1, Nutricia Milupa GmbH, Frankfurt, Njemačka

3.2. METODE

3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama

Svi korišteni probiotički sojevi su čuvani pri -80 °C u MRS odgovarajućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 15 % (v/v) glicerola. Dan prije ekperimenta probiotički sojevi su inokulirani u svježju optimalnu hranjivu podlogu te inkubirani pri optimalnoj temperaturi rasta prema uvjetima navedenim u tablici 2.

3.2.2. Inokulacija i kultivacija bakterijskih sojeva

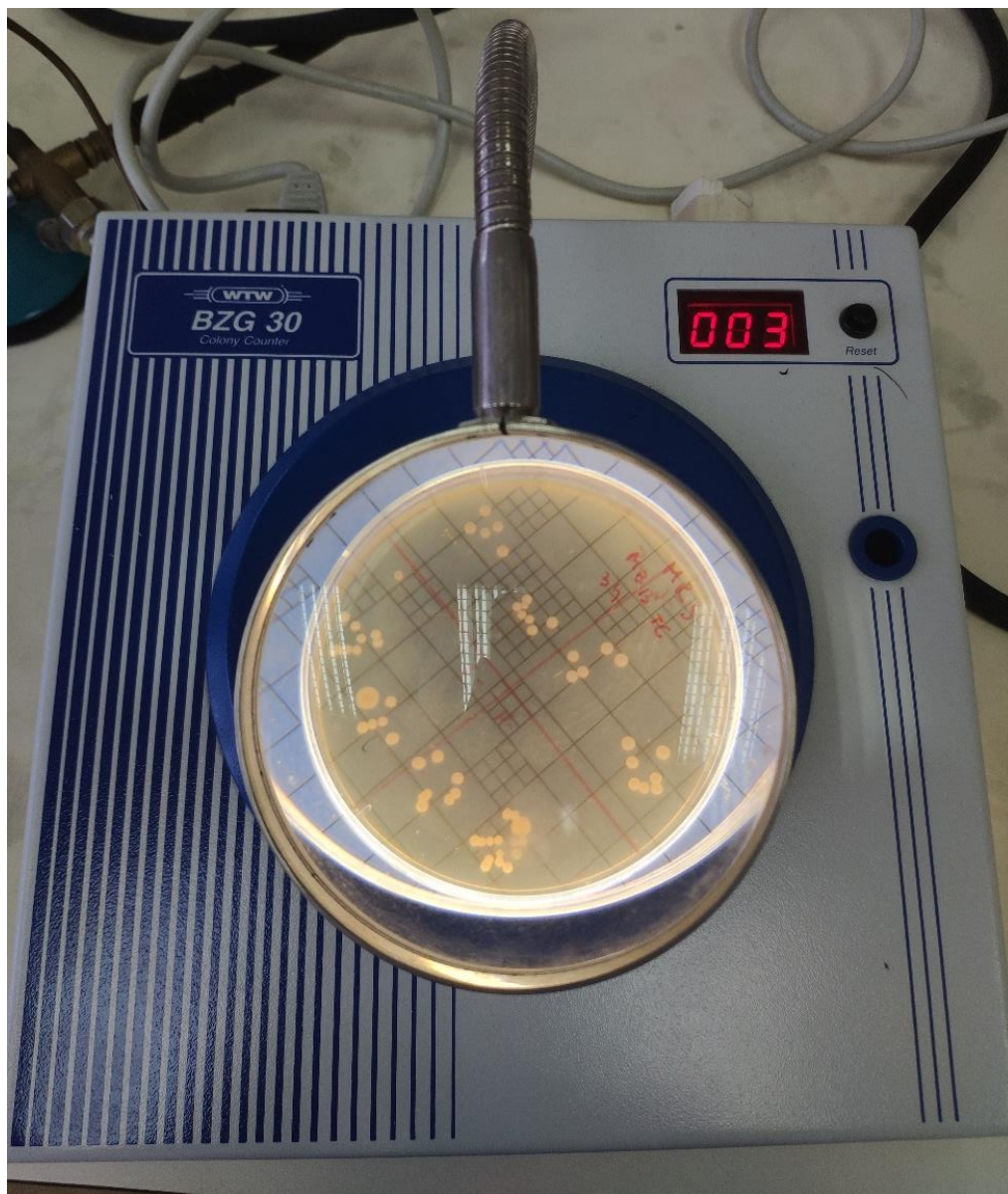
Čiste, smrznuto čuvane, bakterijske kulture *L. fermentum* MC1 i *L. brevis* MB13 inokulirane su u 5 mL MRS tekuće hranjive podloge optimalne za rast *Lactobacillus* pri strogo sterilnim uvjetima.

Inokulacija je provedena tako da se s vrhom sterilne pipete zagrade smrznute kulture i nacijspe se 2x svaka u 5 mL MRS-brotha. Tekući MRS s bakterijskim kulturama je stavljen na inkubaciju na 37°C u anaerobnim uvjetima uz dodan Anaerokult, na 48 sati.

Zatim su napravljena decimalna razrjeđenja kultura MC1 i MB13, miješanjem 100 µl kulture s 900 µl fiziološke otopine. Pripremljeno je zatim 9 decimalnih razrjeđenja inokuliranih na MRS agar u rasponu od -4 do -9 u obliku kapi (10 µL) u dvije paralele za svaku kulturu. Ploče su inkubirane anaerobno na 37 °C, 48 ili 72 sata.

3.2.3. Određivanje broja živih mikroorganizama indirektnom metodom

Nacijepljena decimalna razrjeđenja korištena su za određivanje broja živih bakterija (engl. *Colony-forming units*, CFU) po mililitru uzorka. Nakon 48 h inkubacije pri 37 °C izbrojane su porasle kolonije. Brojanje bakterijskih kolonija potvrđeno je korištenjem brojača kolonija (BZG30 *Colony Counter*, WTW) prikazanog na slici 2. Za izračun konačnog CFU, izbrojane kolonije pomnožene su s faktorom razrjeđenja i izračunat je prosjek između ponavljanja.



Slika 2. Brojanje poraslih bakterijskih kolonija nakon 48h inkubacije pri 37 °C korištenjem brojača kolonija (BZG30 *Colony Counter*, WTW)

3.2.4 Procjena preživljavanja bakterijskih sojeva u simuliranom probavnom traktu dojenčadi

Ispitivanje preživljavanja bakterijskih sojeva MC1 i MB13 u simuliranim uvjetima GIT provedeno je prema protokolu Charteris i sur. (1998) uz manje izmjene. Pripremljene su probavne tekućine: želučani sok i sok tankog crijeva za simulaciju uvjeta probavnog trakta.

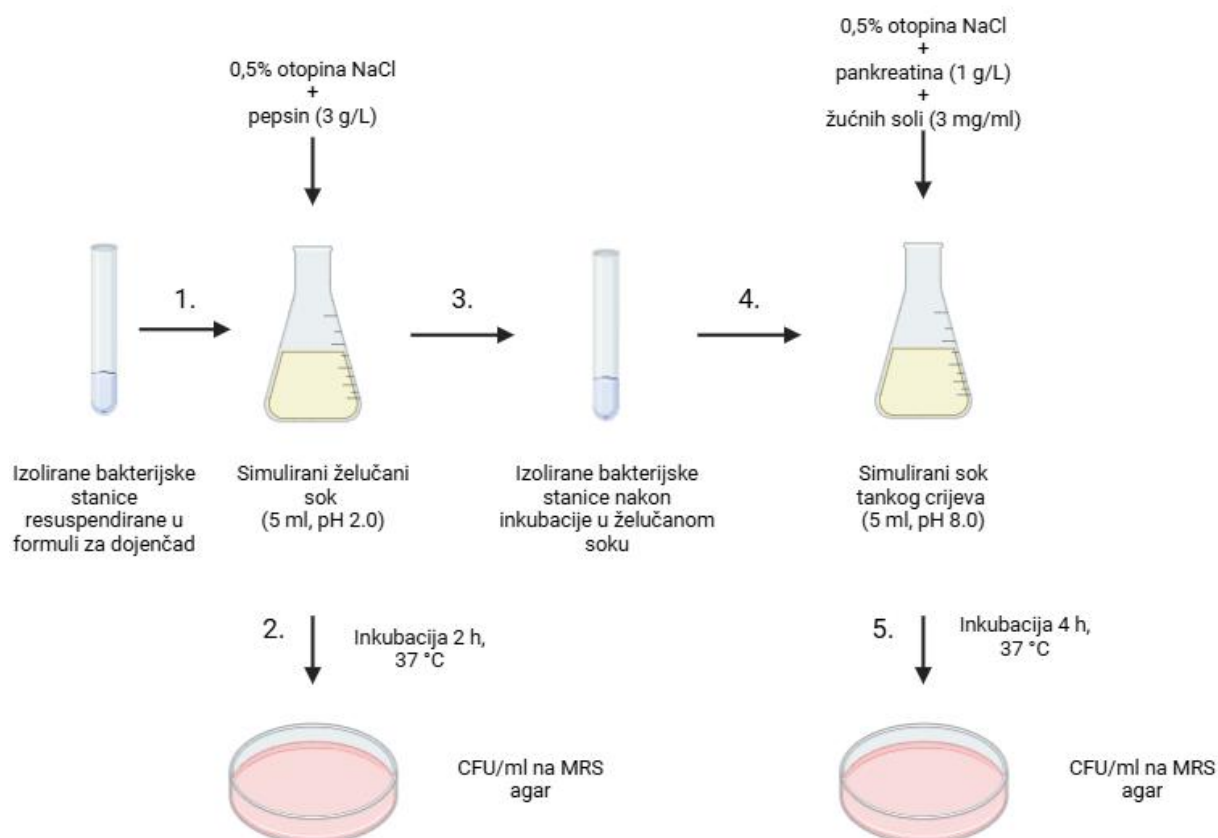
Simulirani želučani sok pripremljen je suspendiranjem pepsina (3 g/L) (Sigma, SAD) u 0,5 %-tnoj otopini natrijeva klorida (Kemika, Hrvatska), te je pH vrijednost podešena na 2,0 dodavanjem 50 µl koncentrirane klorovodične kiseline (Sigma-Aldrich, SAD).

Simulirani sok tankog crijeva pripremljen je suspendiranjem pankreatina (1 g/L) (Fluka, Švicarska) i žučnih soli (3 mg/mL) (Difco, SAD) u 0,5 %-tnoj otopini natrijeva klorida, te je pH

vrijednost podešena na 8,0 dodavanjem par kapi natrijeve lužine (Kemika, Hrvatska).

Čiste kulture pojedinačnih sojeva su inokulirani u 5 mL MRS tekuće hranjive podloge i inkubirane pri 37°C tijekom 18 sati. Prekonoćne bakterijske kulture su centrifugirane na 5 min pri 3500 okretaja. Nakon ispiranja bakterijskih stanica s 1 mL sterilne fiziološke otopine, resuspendirane su u formuli za dojenčad, a zatim u 5 mL simuliranog želučanog soka. Bakterijske stanice inkubirane su u želučanoj tekućini na 37 °C. Alikvoti (100 µL) su uzeti nakon 0., 1., 2. sata te su nacijepljeni na MRS agar za određivanje broja poraslih kolonija. Stavljeni su na inkubaciju pri 37 °C, 48 h.

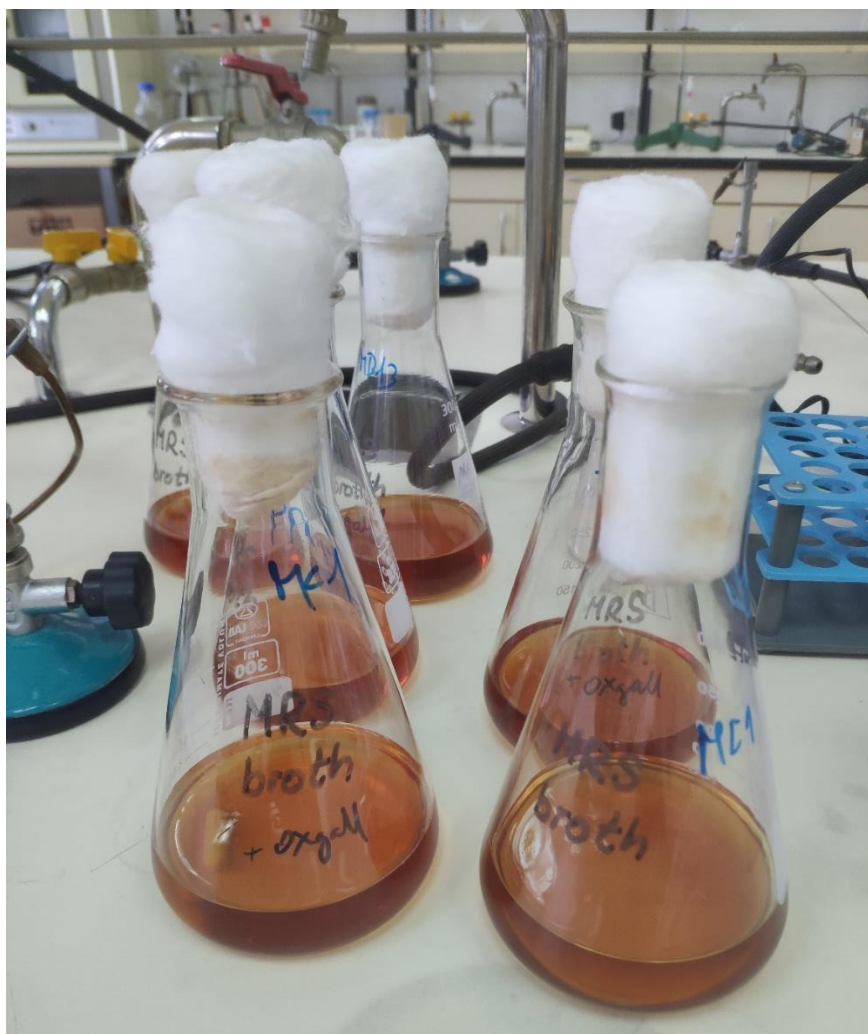
Nakon 2h inkubacije u želučanom soku, bakterijske stanice su izdvojene centrifugiranjem (3500 okretaja na 5 min), i prebačene u 5 mL soka tankog crijeva. Inkubirane su pri 37 °C na 4h. Alikvoti (100 µL) bakterijske suspenzije uzeti su nakon 1., 2., 3. i 4. sata te nacijepljeni na ploče s MRS agarom i stavljeni na inkubaciju pri 37 °C, 48 h. Nakon toga su korišteni za brojanje preživjelih bakterijskih kolonija (Slika 3). Pokus je izveden u nekoliko ponavljanja. Broj preživjelih stanica određen je indirektnom metodom brojanja, te je izračunat broj poraslih kolonija (CFU) po mL uzorka.



Slika 3. Slikovni prikaz provedbe ekperimenta procjene preživljavanja bakterijskih sojeva u simuliranom probavnom traktu dojenčadi

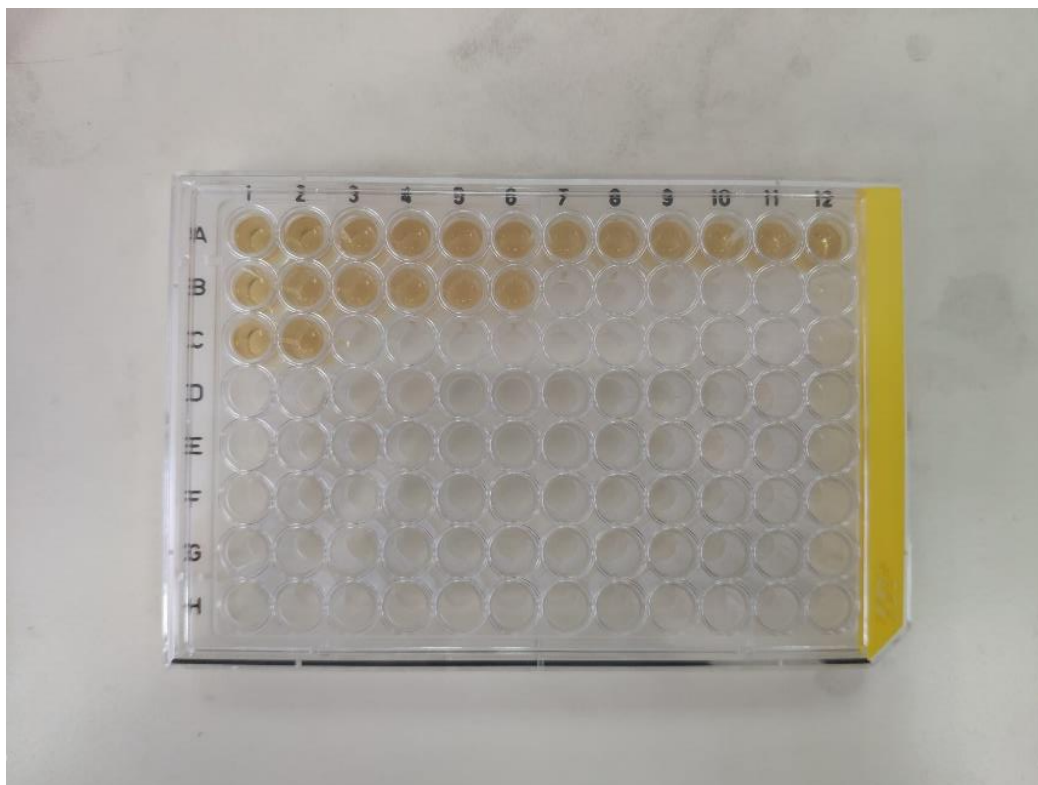
3.2.5. Praćenje preživljavanja bakterijskih kultura u 0,3% otopini žučnih soli

Praćenje preživljavanja bakterijskih kultura u otopini žučnih soli provedeno je prema *in vitro* metodologiji Charteris i sur (1998). Prekonoćne bakterijske kulture, inokulirane MRS bujonu, centrifugirane su i isprane 2 puta s 1 mL fiziološke otopine. Zatim je priređena 0,3 %-tna otopina žučnih soli dodavanjem 0,3 g žučnih soli u 100 mL MRS bujona. Oba soja su inokulirana u otopinu žučnih soli, te su pripremljene i kontrole koje su sadržavale bakterijsku kulturu i MRS bujon (slika 4).



Slika 4. Pripremljene otopine žučnih soli u MRS bujonu s bakterijskim kulturama MC1 i MB13 (lijevo), te pripremljene kontrole MRS bujon s bakterijskim kulturama (desno)

Dodano je 250 μ L svake otopine u mikrotitarsku pločicu (slika 5). Očitane su vrijednosti apsorbancije pri 620 nm nakon čega su pločice s uzorcima inkubirane na 37 °C, a vrijednosti apsorbancije očitavane su u intervalima od sat vremena tijekom 7 sati.



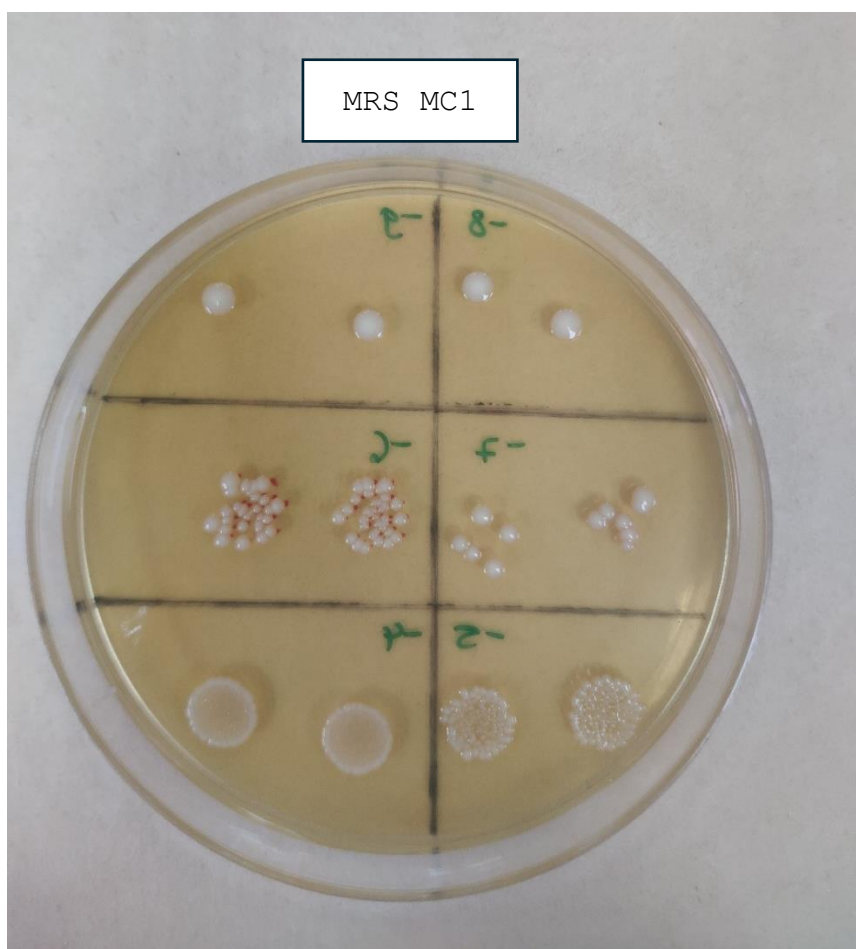
Slika 5. Sojevi MB13 i MC1 inokulirani u MRS tekuću hranjivu podlogu s 0,3% žučnih soli i kontrolni rast u mikrotitarskoj pločici 96F

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. ANALIZA BAKTERIJSKOG RASTA *LEVILACTOBACILLUS BREVIS* MB13 I *LIMOSILACTOBACILLUS FERMENTUM* MC1

Glavni cilj bio je odrediti ukupan broj poraslih kolonija iz bakterijskih sojeva MB13 i MC1, kako bi se omogućila njihova daljnja analiza preživljavanja bakterijskih stanica u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta *in vitro*. Za ovu analizu korištena je MRS hranjiva podloga, koja se pokazala idealnom za poticanje rasta bakterija roda *Lactobacillus*. Ova hranjiva podloga pruža potrebne nutrijente i uvjete koji podržavaju rast ovih probiotičkih bakterija (Davis, 2014).

Nakon inkubacije bakterijskih sojeva u optimalnim uvjetima za rast roda *Lactobacillus*, točnije bez prisutnosti kisika (anaerobni uvjeti) i na optimalnoj temperaturi rasta od 37 °C rezultati su pokazali značajan rast bakterija. Koncentracija bakterija u uzorcima dosegla je vrijednosti više od 10^{11} CFU/mL, a primjer je prikazan na slici 6.



Slika 6. Porasle pojedinačne bakterijske kolonije MC1 kultivirane na MRS agaru za uzgoj velikog broja bakterijskih stanica (engl. *colony forming units* CFU/mL) nakon anaerobne inkubacije 48 h pri 37 °C

Rezultati poraslih kolonija potencijalnih probiotika MB13 i MC1 na MRS agaru prikazani su u tablicama 3 i 4.

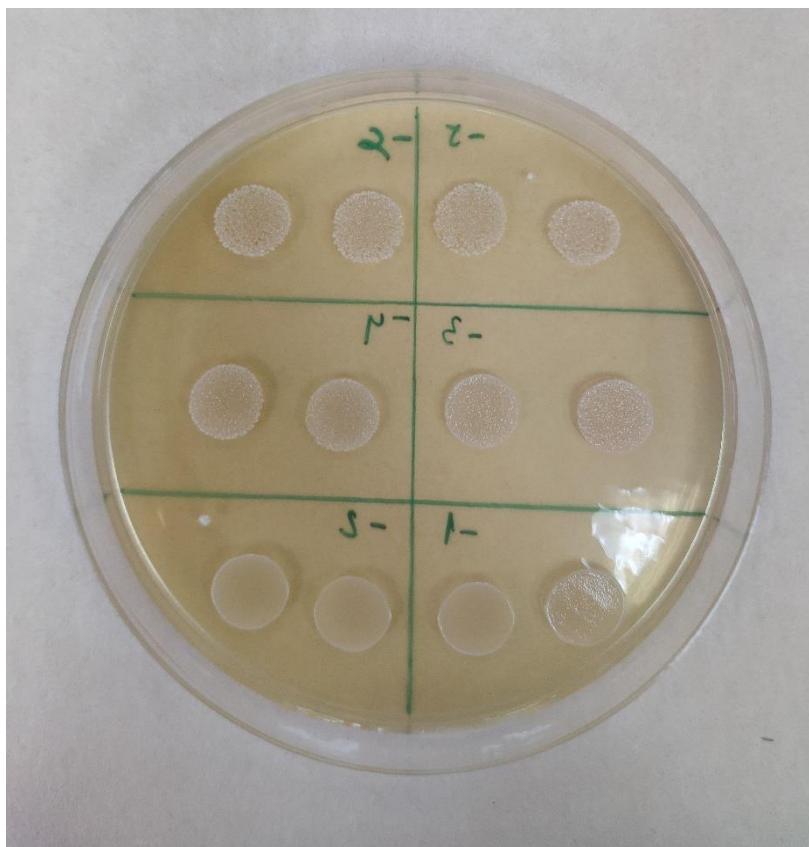
Tablica 3. Analiza broja poraslih kolonija bakterijskog soja **MC1** na MRS agaru nakon anaerobne inkubacije pri 37 °C

Razrjeđenje	CFU/mL (I. ponavljanje)	CFU/mL (II. ponavljanje)	Log (CFU/mL) (I. ponavljanje)	Log (CFU/mL) (II. ponavljanje)	Prosječna vrijednost
-9	1×10^{11}	1×10^{11}	11	11	11
-8	1×10^{10}	1×10^{10}	10	10	10
-7	$5,5 \times 10^9$	$7,5 \times 10^9$	9,740	9,875	9,808
-6	$2,6 \times 10^9$	$2,4 \times 10^9$	9,415	9,380	9,632

Tablica 4. Analiza broja poraslih kolonija bakterijskog soja **MB13** na MRS agaru nakon anaerobne inkubacije pri 37 °C

Razrjeđenje	CFU/mL (I. ponavljanje)	CFU/mL (II. ponavljanje)	Log (CFU/mL) (I. ponavljanje)	Log (CFU/mL) (II. ponavljanje)	Prosječna vrijednost
-9	9×10^{12}	$9,1 \times 10^{12}$	12,954	12,959	12,957

Prilikom brojanja kolonija na mediju, neke vrijednosti nije bilo moguće zabilježiti jer je prekomjerni rast kolonija onemogućio razlikovanje pojedinačnih kolonija, te su priređena razrjeđenja suspenzije stanica kojima je procijenjen broj kolonija (slika 7).



Slika 7. Porasle pojedinačne bakterijske kolonije MB13 porasle na MRS agaru nakon anaerobne inkubacije 48 h pri 37 °C

Kvantifikacija bakterija postignuta je brojanjem ukupnog broja jedinica koje stvaraju kolonije (CFU) na MRS agaru, koristeći serijska razrjeđenja. Rezultat se izražava kao CFU/mL, što predstavlja procjenu broja bakterijskih stanica na temelju interpretacije broja kolonija na ploči. Ova metoda daje samo procjenu, jer se broje samo stanice koje mogu formirati kolonije u specifičnim uvjetima eksperimenta kao što su medij za inkubaciju, temperatura, prisutnost kisika. U ovom slučaju to su MRS agar, pri 37 °C i anaerobnim uvjetima (Davis, 2014).

Rezultati pokazuju jasan trend smanjenja broja bakterija (CFU/mL) kako se faktor razrjeđenja povećava. To je očekivano jer serijska razrjeđenja postupno smanjuju koncentraciju bakterija u uzorku. Rezultati ponavljanja vrlo su bliski jedni drugima, što ukazuje na visoku ponovljivost i pouzdanost eksperimentalnih postupaka.

Primjenom neizravne metode brojanja bakterijskih kolonija utvrđeno je da izolirane bakterijske kulture sadrže više od 10^6 CFU/mL, što je prema FAO/WHO (2002) minimalna koncentracija bakterijskih stanica po gramu ili mililitru, kako bi se pokazalo njihovo probiotičko djelovanje. Ukupan broj poraslih kolonija koristi se za kasniju analizu preživljavanja bakterijskih stanica u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta.

4.2. PREŽIVLJAVANJE *LACTOBACILLUS* SOJEVA U SIMULIRANIM UVJETIMA GASTROINTESTINALNOG TRAKTA

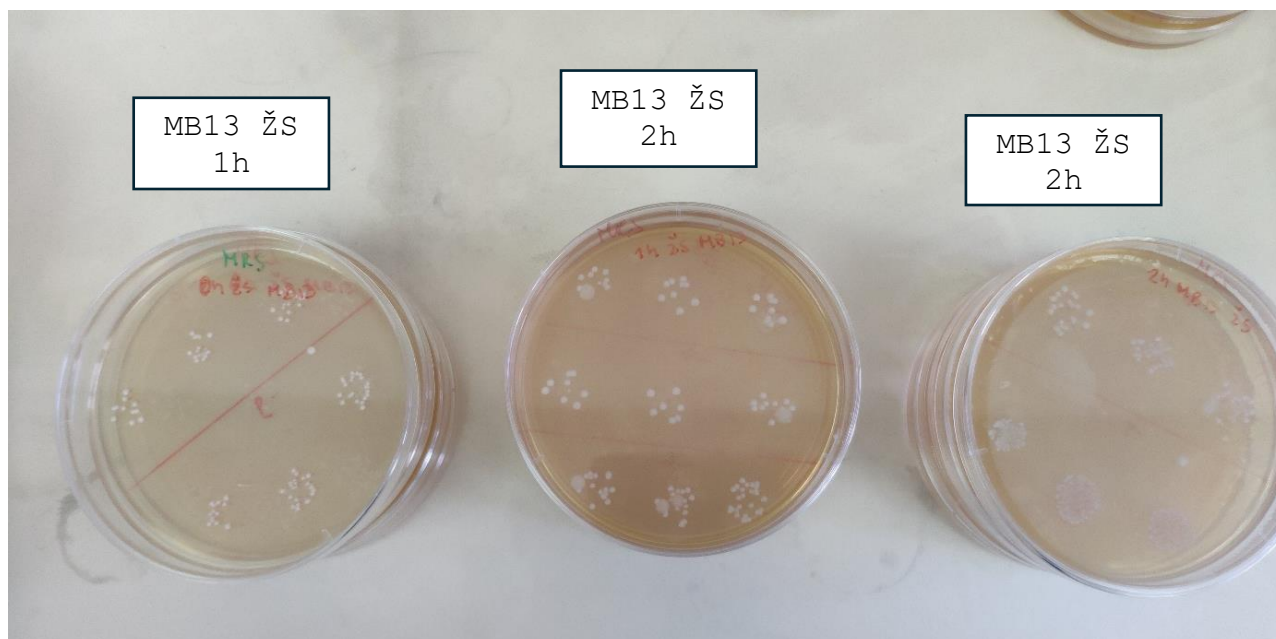
Mikrobna populacija u ljudskom intestinalnom traktu iznimno je kompleksna i raznolika, te je crijevna mikrobiota danas priznata kao važan metabolički organ koji igra ključnu ulogu u zdravlju domaćina (Martin i sur., 2009). Mikroorganizmi koji obitavaju u crijevima, poznati kao intestinalna mikrobiota, koriste razne izvore hranjivih tvari, uključujući složene ugljikohidrate, proteine i masti, kao i komponente koje dolaze iz sekreta domaćina i epitelnih stanica, kao izvor ugljika i energije potrebnog za njihov rast i preživljavanje (Walsh i sur., 2014).

Iako se najveća količina nutrijenata nalazi u želucu i tankom crijevu, ti dijelovi intestinalnog trakta sadržavaju relativno mali broj mikroorganizama. Ovaj ograničeni broj mikroorganizama posljedica je nepovoljnih uvjeta, kao što su niska pH vrijednost u želucu, prisutnost žučnih soli i relativno brz protok sadržaja kroz probavni sustav tijekom procesa probave (Walsh i sur., 2014).

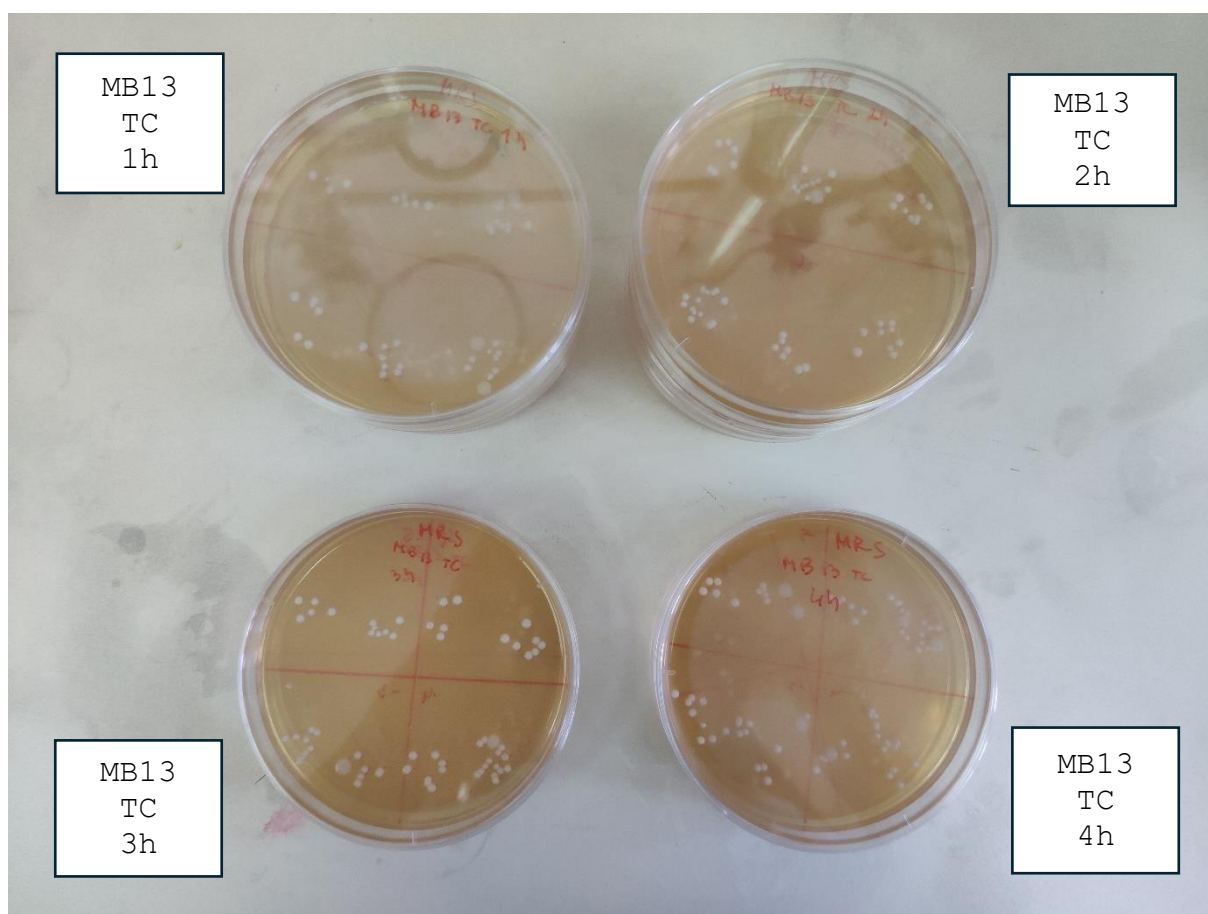
Probiotičke bakterije roda *Lactobacillus*, koje imaju ciljano mjesto djelovanja na crijevnom epitelu domaćina, trebaju preživjeti ove nepovoljne uvjete u gastrointestinalnom traktu kako bi ostvarile pozitivne učinke na zdravlje domaćina. Nakon oralnog unosa probiotičkih bakterija, njihovo preživljavanje ovisi o tome hoće li u dovoljno visokom broju živih stanica prebroditi štetne faktore kao što su kiselo okruženje želuca i djelovanje žučnih soli.

U ovome radu korišteni su *Levilactobacillus brevis* MB13 i *Limosilactobacillus fermentum* MC1 te je ispitano njihovo preživljavanje u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta novorođenčeta s ciljem njihove karakterizacije kao potencijalnih probiotika. Praćeno je preživljavanje prilikom direktnog prijelaza iz simuliranog želučanog soka, kojemu je pH iznosio 2,0, u simulirani sok tankog crijeva, čiji je pH bi 8,0. Vrijeme zadržavanja u simuliranom želučanom soku iznosilo je 2 sata, dok je u simuliranom soku tankog crijeva iznosilo 4 sata. Sojevima je dodano 1 mL formule za dojenčad Aptamil Pronutra 1, pripremljene prema uputama proizvođača.

Na slikama 8 i 9 prikazane su porasle kolonije MB13 na MRS agaru nakon izlaganja simuliranom želučanom soku i soku tankog crijeva i inkubacije 48 h pri 37 °C.



Slika 8. Porasle bakterijske kolonije MB13 na MRS agaru nakon 1h (lijevo), 2h (sredina) i 3h (desno) izlaganja simuliranom želučanom soku i inkubacije 48 h pri 37 °C



Slika 9. Porasle bakterijske kolonije MB13 na MRS agaru nakon 1h (gore, lijevo), 2h (gore, desno), 3h (dolje, lijevo) i 4h (dolje, desno) izlaganja simuliranom soku tankog crijeva i inkubacije 48 h pri 37 °C

Učinak simuliranih uvjeta gastrointestinalnog trakta na održivost i preživljavanje odabranih sojeva prikazan je u tablicama 5, 6, 7 i 8.

Tablica 5. Analiza preživljenja bakterijskog soja MB13 (uz dodatak formule za dojenčad) nakon inkubacije u simuliranom želučanom soku, izražena kao broj poraslih kolonija na MRS agaru nakon inkubacije 48 h pri 37 °C

Vrijeme inkubacije	I. Ponavljanje CFU/mL	II. Ponavljanje CFU/mL	III. Ponavljanje CFU/mL	Prosječna vrijednost CFU/mL	SD (standardna devijacija)
0h	$7,855 \times 10^{11}$	$3,471 \times 10^{12}$	$3,105 \times 10^{12}$	$2,453 \times 10^{12}$	0,147
1h	$7,500 \times 10^9$	$1,481 \times 10^{12}$	$1,098 \times 10^{12}$	$8,622 \times 10^{11}$	0,701
2h	$6,862 \times 10^{10}$	$1,719 \times 10^{10}$	$1,679 \times 10^{10}$	$3,420 \times 10^{10}$	0,086

*analize su provedene kao tri biološka neovisna eksperimenta s kulturama sojeva inokulirani u različitim danima

Tablica 6. Analiza preživljenja bakterijskog soja MB13 (uz dodatak formule za dojenčad) nakon inkubacije u simuliranom soku tankog crijeva, izražena kao broj poraslih kolonija na MRS agaru nakon inkubacije 48 h pri 37 °C

Vrijeme inkubacije	I. Ponavljanje CFU/mL	II. Ponavljanje CFU/mL	III. Ponavljanje CFU/mL	Prosječna vrijednost CFU/mL	SD (standardna devijacija)
1h	$2,212 \times 10^9$	$2,187 \times 10^9$	$1,234 \times 10^9$	$1,878 \times 10^9$	0,092
2h	$1,781 \times 10^9$	$1,807 \times 10^9$	$2,702 \times 10^9$	$2,097 \times 10^9$	0,047
3h	$1,708 \times 10^8$	$1,685 \times 10^8$	$1,912 \times 10^8$	$1,768 \times 10^8$	0,058
4h	$1,109 \times 10^8$	$1,086 \times 10^8$	$2,178 \times 10^8$	$1,458 \times 10^8$	0,047

*analize su provedene kao tri biološka neovisna eksperimenta s kulturama sojeva inokulirani u različitim danima

Tablica 7. Analiza preživljenja bakterijskog soja MC1 (uz dodatak formule za dojenčad) nakon inkubacije u simuliranom želučanom soku, izražena kao broj poraslih kolonija na MRS agaru nakon inkubacije 48 h pri 37 °C

Vrijeme inkubacije	I. Ponavljanje CFU/mL	II. Ponavljanje CFU/mL	III. Ponavljanje CFU/mL	Prosječna vrijednost CFU/mL	SD (standardna devijacija)
0h	$9,381 \times 10^{11}$	$2,007 \times 10^{12}$	$4,291 \times 10^{11}$	$1,125 \times 10^{12}$	0,124
1h	$2,567 \times 10^{10}$	$8,436 \times 10^{11}$	$7,496 \times 10^{11}$	$5,396 \times 10^{11}$	0,627
2h	$2,490 \times 10^{10}$	$2,209 \times 10^{10}$	$1,942 \times 10^{10}$	$2,214 \times 10^{10}$	0,029

*analize su provedene kao tri biološka neovisna eksperimenta s kulturama sojeva inokulirani u različitim danima

Tablica 8. Analiza preživljenja bakterijskog soja MC1 (uz dodatak formule za dojenčad) nakon inkubacije u simuliranom soku tankog crijeva, izražena kao broj poraslih kolonija na MRS agaru nakon inkubacije 48 h pri 37 °C

Vrijeme inkubacije	I. Ponavljanje CFU/mL	II. Ponavljanje CFU/mL	III. Ponavljanje CFU/mL	Prosječna vrijednost CFU/mL	SD (standardna devijacija)
1h	5,648x10 ⁸	1,667x10 ⁹	1,458x10 ⁹	1,229x10 ⁹	0,116
2h	3,292x10 ⁸	1,435x10 ⁹	1,183x10 ⁹	0,982x10 ⁹	0,371
3h	4,495x10 ⁸	1,748x10 ⁸	1,620x10 ⁸	2,621x10 ⁸	0,170
4h	1,179x10 ⁸	1,324x10 ⁸	2,272x10 ⁸	1,592x10 ⁸	0,013

*analize su provedene kao tri biološka neovisna eksperimenta s kulturama sojeva inokulirani u različitim danima

U tablici 5 prikazano je da populacija bakterija MB13 pokazuje stalan pad tijekom vremena provedenog u simuliranom želučanom soku, što ukazuje na osjetljivost ovih bakterija na kiselo okruženje. Međutim, primijećeno je da je pad broja živih bakterijskih stanica izraženiji tijekom prvog sata izlaganja simuliranom želučanom soku, što sugerira da upravo početno izlaganje kiselim uvjetima predstavlja najveći stres za bakterijsku populaciju.

Nakon proteka 1 sata, stopa preživljavanja bakterija postaje nešto stabilnija, što implicira da su bakterijske stanice, koje prežive inicijalni stres otpornije, na dugotrajnije izlaganje kiselim uvjetima. U ovoj fazi dolazi do usporavanja pada broja bakterijskih stanica, čime se može zaključiti da preostala populacija ima veću sposobnost prilagodbe nepovoljnim uvjetima.

Najveća varijabilnost između uzoraka primijećena je nakon 1 sata inkubacije, kada standardna devijacija (SD) iznosi 0,701. Ova vrijednost sugerira da uvjeti u simuliranom želučanom soku u tom vremenskom trenutku induciraju izrazito heterogene odgovore među bakterijskim stanicama, pri čemu neke stanice pokazuju veću otpornost od drugih.

U tablici 6 prikazano je da bakterijska populacija MB13 pokazuje minimalan pad tijekom prvog i drugog sata inkubacije u simuliranim uvjetima tankog crijeva, što upućuje na njihovu sposobnost prilagodbe i visoku otpornost na uvjete u ovom dijelu gastrointestinalnog trakta. Štoviše, nakon dva sata opažen je čak i blagi porast broja bakterija, što sugerira da je ovaj soj dobro prilagođen ranim fazama tranzita kroz crijeva te da uspijeva održati visoku razinu vitalnosti unatoč potencijalno nepovoljnim uvjetima.

Nakon dva sata, primjećuje se stabilno smanjenje rasta bakterijske populacije, što ukazuje na to da produljena izloženost simuliranim uvjetima tankog crijeva ipak uzrokuje stres kod bakterija i dovodi do postepenog smanjenja njihovog preživljavanja. Ipak, pad broja živih bakterija nakon dva sata ostaje umjeren, što ukazuje na iznimnu sposobnost ovog soja da se prilagodi i preživi u nepovoljnim uvjetima.

Standardna devijacija (SD) za rezultate u ovoj tablici je niska, što pokazuje da su mjerenja vrlo pouzdana i da se rezultati mogu smatrati ponovljivima. Sposobnost *Lactobacillus brevis* MB13 da održi vitalnost čak četiri sata u simuliranim uvjetima tankog crijeva predstavlja obećavajuću karakteristiku ovog soja, jer sugerira da značajan dio početne bakterijske populacije može preživjeti i potencijalno kolonizirati crijeva domaćina.

Stabilnost broja poraslih bakterija tijekom ranih faza ukazuje na to da je soj MB13 iznimno dobro prilagođen da izdrži uvjete simuliranog gastrointestinalnog trakta. Međutim, uzimajući u obzir opaženi postepeni pad broja živih stanica nakon dva sata, preporuča se da probiotičke formulacije koje sadrže ovaj soj uključuju veće početne doze kako bi se osigurala dostatna količina živih bakterija koja će stići do crijeva.

Otpornost soja MB13 na nepovoljne uvjete u želučanom i crijevnom okruženju čini ga posebno pogodnim za primjenu kod dojenčadi. Probavni sustav dojenčadi karakterizira manja kiselost i općenito manje grubi uvjeti u usporedbi s probavnim sustavom odraslih osoba, što dodatno povećava potencijal ovog soja kao učinkovitog probiotika za ovu dobnu skupinu. Na temelju dobivenih rezultata, *Levilactobacillus brevis* MB13 pokazuje potencijal da bude učinkovit probiotik za dojenčad, pružajući pozitivne zdravstvene učinke putem kolonizacije crijeva i održavanja ravnoteže mikrobiote.

U tablici 7 prikazano je da bakterijski soj *Limosilactobacillus fermentum* MC1 pokazuje stalan pad preživljavanja tijekom vremena provedenog u simuliranom želučanom soku, pri čemu se najznačajniji gubitak broja živih bakterijskih stanica javlja u prvom satu inkubacije. Ovaj inicijalni pad sugerira da početna izloženost kiselim uvjetima želuca predstavlja najintenzivniji stres za bakterijsku populaciju. Unatoč ovom gubitku, bakterije MC1 i dalje pokazuju samo umjerenu osjetljivost na želučane uvjete.

Na početku eksperimenta, standardna devijacija (SD) iznosi 0,124, dok je nakon 2 sata smanjena na 0,029, što ukazuje na vrlo visoku razinu dosljednosti u eksperimentu. S druge strane, nakon 1 sata izlaganja simuliranom želučanom soku, standardna devijacija iznosi 0,627, što ukazuje na veću varijabilnost između uzoraka. Ovaj povećani SD nakon 1 sata sugerira da bi ovo vremensko razdoblje moglo predstavljati prijelaznu fazu u kojoj se bakterijska populacija prilagođava stresu uzrokovanom kiselim uvjetima želuca, što dovodi do heterogenijih odgovora među pojedinačnim bakterijskim stanicama.

Unatoč stalnom smanjenju broja živih stanica, bakterijski soj MC1 pokazuje dobro preživljavanje nakon 2 sata izlaganja simuliranim želučanim uvjetima, pri čemu zadržava značajan dio svoje početne populacije. Ovo preživljavanje, unatoč produženoj izloženosti kiselom okruženju, ukazuje na sposobnost ovog soja da tolerira nepovoljne uvjete i očuva svoju vitalnost. Razina tolerancije na kiseline koju pokazuje *Limosilactobacillus fermentum* MC1 predstavlja ključnu karakteristiku za učinkovit probiotik. Ova otpornost omogućava bakterijama da prežive prijelaz kroz želudac i potencijalno ostvare svoje probiotičke učinke u

crijevima domaćina.

U tablici 8 prikazano je da bakterijski soj MC1 pokazuje postupni pad preživljavanja tijekom četiri sata izloženosti simuliranom soku tankog crijeva. Tijekom ovog razdoblja, najizraženiji pad broja živih stanica događa se između prvog i trećeg sata, što ukazuje na to da produljena izloženost uvjetima simuliranog tankog crijeva predstavlja izazov za preživljavanje bakterija. Međutim, između trećeg i četvrtog sata stopa smanjenja preživljavanja usporava, što sugerira da se preostala bakterijska populacija uspijeva bolje prilagoditi tim uvjetima.

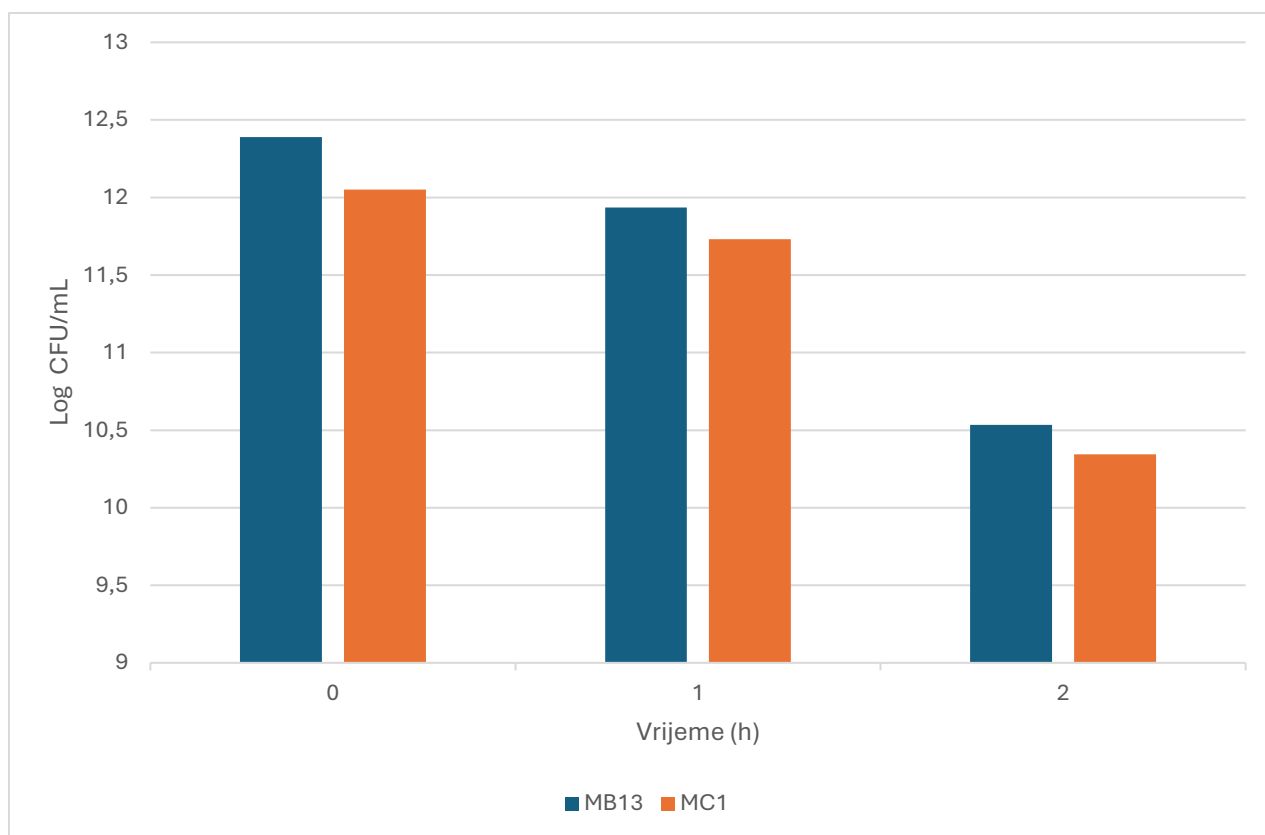
Općenito, bakterijski soj MC1 pokazuje snažnu sposobnost preživljavanja tijekom cijelog trajanja eksperimenta, zadržavajući značajan dio svoje početne populacije čak i nakon četiri sata izloženosti simuliranom intestinalnom okruženju. Ova karakteristika ukazuje na to da MC1 ima velik potencijal za uspješno preživljavanje u probavnom traktu.

Na temelju tih rezultata, čini se da je bakterijski soj MC1 vrlo prikladan za uključivanje u mliječne formule za dojenčad. Njegova sposobnost da preživi u značajnom broju osigurava prisutnost živih probiotika, koji mogu pružiti korisne učinke na zdravlje crijeva dojenčadi.

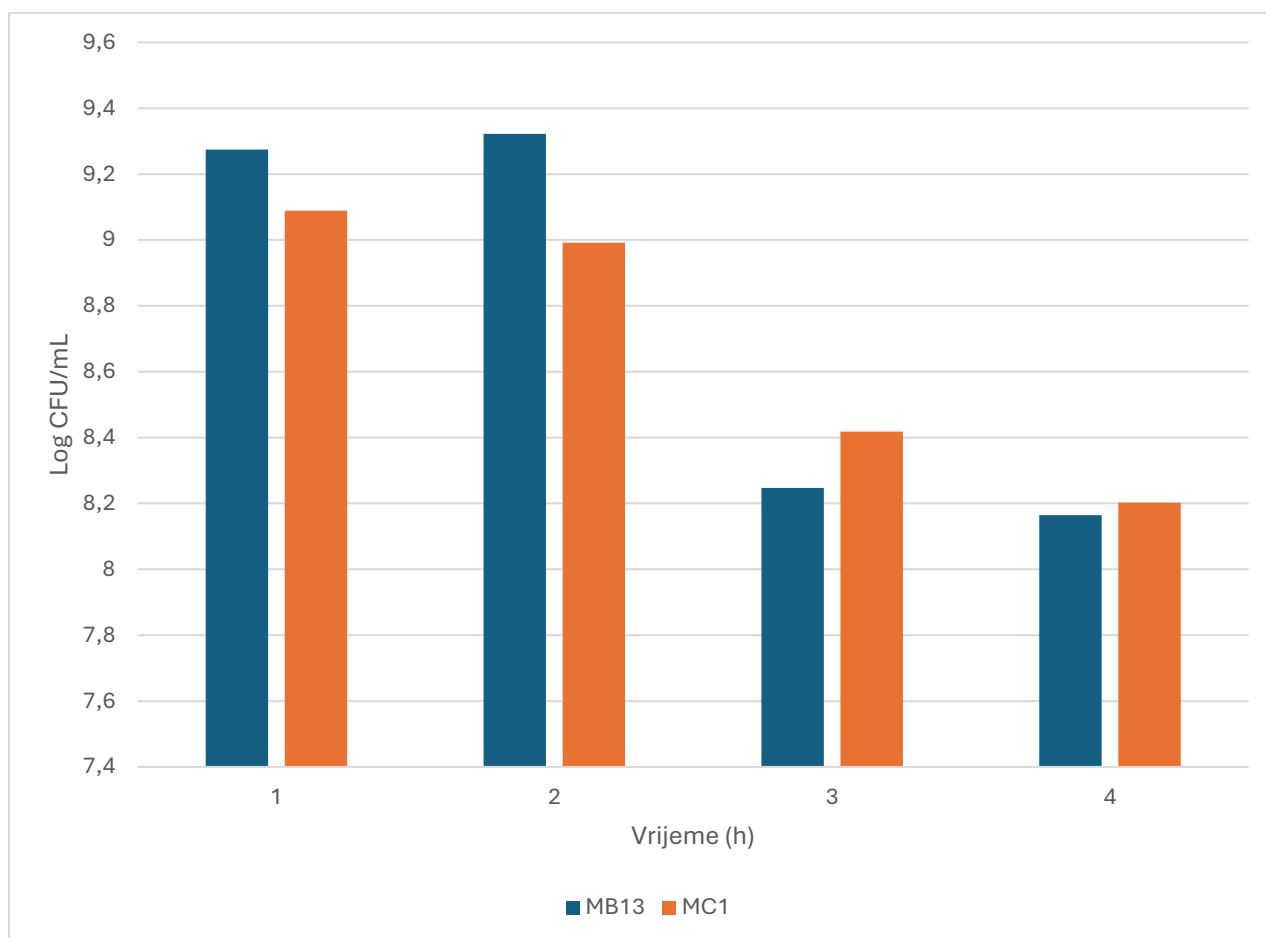
Usporedbom ovih podataka s ranijim rezultatima o preživljavanju bakterija MC1 u simuliranom želučanom soku, vidljivo je da ovaj soj zadržava nešto veću vitalnost u simuliranom soku tankog crijeva. To sugerira da je MC1 još otporniji na uvjete tankog crijeva, što je ključna prednost za probiotik.

Niske vrijednosti standardne devijacije (SD) dobivene tijekom eksperimenta ukazuju na visoku razinu dosljednosti i ponovljivosti rezultata. Ovo dodatno potvrđuje pouzdanost podataka o sposobnosti preživljavanja soja *Limosilactobacillus fermentum* MC1 u uvjetima simuliranog soka tankog crijeva.

Slike 10 i 11 prikazuju ovisnost preživljavanja MB13 i MC1 (prosječna vrijednost log CFU/mL) u simuliranom želučanom soku i simuliranom soku tankog crijeva (uz dodatak formule za dojenčad) o vremenu.



Slika 10. Ovisnost preživljavanja probiotičkih sojeva MB13 i MC1 , u simuliranom želučanom soku (uz dodatak formule za dojenčad) o vremenu.



Slika 11. Ovisnost preživljavanja probiotičkih sojeva MB13 i MC1 u simuliranom soku tankog crijeva (uz dodatak formule za dojenčad) o vremenu.

Uspješnim preživljavanjem probiotičkih sojeva u simuliranim uvjetima GIT-a smatra se preživljavanje iznad 10^6 CFU/mL (log CFU/mL=6). To je minimalan broj bakterija za postizanje funkcionalnih probiotičkih učinaka *in vivo*. Prema rezultatima, broj poraslih bakterijskih kolonija nakon inkubacije u uvjetima GIT-a *in vitro*, za oba bakterijska soja, bio je iznad navedene vrijednosti.

Soj *L. brevis* MB13 je bolje preživio simulirane uvjete gastrointestinalnog trakta od *L. fermentum* MC1. Unatoč tome što grafovi prikazuju pad rasta, prema rezultatima, broj poraslih bakterijskih kolonija nakon inkubacije u uvjetima GIT-a *in vitro*, za oba bakterijska soja, bio je iznad navedene vrijednosti. Oba soja pokazuju visoke razine preživljavanja u simuliranom želučanom soku, čak i nakon 2 sata. Ovo ukazuje na to da sojevi *Lactobacillus* imaju dobru toleranciju na kisele želučane uvjet. Preživljavanje MB13 nadmašuje MC1, što sugerira da bi mogao biti malo bolji kandidat za probiotičke primjene. Također, oba soja pokazuju otpornost u okruženju simuliranog soka tankog crijeva, čak i nakon 4 sata. Općenito soj *L. brevis* MB13 je bolje preživio simulirane uvjete gastrointestinalnog trakta od *L. fermentum* MC1.

Rezultati istraživanja su podržani istraživanjem kojeg su proveli Soltan Dallal i sur. (2021).

Ispitali su sposobnost preživljavanja 122 bakterijska soja vrste *Lactobacillus* izoliranih iz uzoraka majčinog mlijeka u GIT uvjetima *in vitro*. Od toga, 19 izolata: sojevi *L. casei*, *L. brevis*, *L. rhamnosus*, *L. fermentum*, *L. actobacillus*, *L. fermentum* i *L. paracasei*, uspješno su preživjeli simulirane uvjete.

Istraživanje Horackova i sur. (2011) ispitalo je stabilnost odabranih *Lactobacillus* sojeva (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus* i *L. fermentum*) u simuliranim GIT uvjetima. Svi sojevi su uspješno preživjeli uvjete osim *L. rhamnosus*. Međutim, dobili su bolje rezultate kada su bakterijske stanice zajedno s fermentiranim mlijekom podložili uvjetima gastrointestinalnog trakta. Ovi rezultati pokazuju da je mlijeko imalo snažan zaštitni učinak protiv stresnih stanja probavnog trakta.

Nasuprot tome, istraživanje Charteris i sur. (1998) je pokazala kako je većina (14 od 15) izolata *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* izgubila više od 90 % vitalnosti tijekom simuliranog želučanog tranzita. Samo je *L. fermentum* pokazao je značajnu razinu preživljavanja (oko 30 % početnog broja) i smatra se intrinzično tolerantnim na želučani tranzit. *Lactobacillus casei* i *Lact. rhamnosus* GC zadržali su vitalnost tijekom simuliranog prolaska kroz tanko crijevo do 4 sata i smatraju se tolerantnim. Međutim, u istom istraživanju je općenito, dodatak mliječnih proteina poboljšao toleranciju simuliranog želučanog tranzita. Neki sojevi *L. casei* te *B. bifidum* pokazali su jako dobro preživljavanje tijekom simuliranog želučanog tranzita u prisutnosti natrijeva kazeinata, izolata proteina sirutke. Pretpostavlja se kako proteini mlijeka imaju zaštitni učinak, mogu djelovati kao puferska sredstva i inhibitori aktivnosti probavne proteaze *in vivo*, čime se štite uneseni bakterijski sojevi tijekom gornjeg gastrointestinalnog prolaska. (Charteris i sur., 1998).

Dok rezultati ne uspoređuju izravno preživljavanje bez formule za dojenčad, relativno visoko preživljavanje oba soja sugerira da ima zaštitne učinke, potencijalno puferiranjem kiselih uvjeta ili osiguravanjem hranjivih tvari, podržavajući preživljavanje bakterija. Uspješno preživljavanje ispitivanih sojeva potvrđuje da njihov unos, putem majčinog mlijeka ili dodatkom u formulu za dojenčad, omogućava njihovu kolonizaciju GIT-a novorođenčeta, gdje mogu iskazati probiotička svojstva. (Jost i sur., 2014).

U istraživanju Fernandes i sur. (2003) *Lactobacillus acidophilus* i *Lact. gasser*, bile su otporne na gastrointestinalne uvjete (na pH 2 i 3 i na prisutnost pepsina, pankreatina ili žučnih soli). Njihova otpornost je također bila pojačana u prisutnosti obranog mlijeka. Botes (2008) smatra da ovi *in vitro* testovi oduzimaju puno vremena i nisu pravi prikaz stanja *in vivo*. Prednost *in vitro* modela leži u procjeni svih komponenti u jednom sustavu.

Slični rezultati opisani su i za vrste *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* i *L. plantarum*. Postotak preživljavanja spomenutih sojeva bila je oko 50 % nakon 120 min kontakta sa simuliranim želučanim sokom pri pH 2 (Ashraf i Smith, 2016). Isti su autori izvijestili da je pri pH 3 postotak preživljavanja bio značajno veći, čak i nakon 120 min. Stoga su zaključili da neki od testiranih

Lactobacillus sojeva imaju potencijal preživjeti u stvarnim želučanim uvjetima. U istom istraživanju simulacija uvjeta koji odgovaraju onima u tankom crijevu učinjena je inkubacijom sojeva u otopini pankreatina čiji je pH iznosio 8,0. Broj preživjelih stanica određen je nakon 1 i 240 minuta. Sojevi su bili manje osjetljivi u tim uvjetima nego u uvjetima simuliranog želučanog soka. Bakterijske stanice pokazale su bolju otpornost i smanjile su se za oko 2 — 5 % od početnog broja. Na kraju proučavanog razdoblja postotak preživjelih stanica smanjio se na oko 30%.

Jensen i sur. proveli su sličan eksperiment, također pokazujući da su sojevi koje su koristili znatno otporniji na pankreatin nego na pepsin. Prema njima, neki od sojeva *L. plantarum*, *L. sakei* i *L. reuteri* čak ostaju nepromijenjeni tijekom 240-minutnog razdoblja kontakta sa simuliranim sokom tankog crijeva ili nakon 240 minuta pokazuju smanjenje postotka broja živih bakterija 10 do 20 %.

Međutim, prema istraživanju Marinove i sur. (2019), testirani *Lactobacillus* sojevi pokazali su nisku toleranciju na uvjete simuliranog želučanog soka (pH 2,0). Većina stanica je izumrla nakon 90 minuta inkubacije. Samo su sojevi *Lactobacillus bulgaricus*, *L. acidophilus* N2, *L. acidophilus* 64 i *L. plantarum* 84 mogli preživjeti 90 min u simuliranoj želučanoj otopini pepsina, ali se broj stanica smanjio u usporedbi s kontrolom. Nijedan od sojeva nije preživio nakon 180 minuta inkubacije. Testirani sojevi bili su tolerantniji na simulirani sok tankog crijeva (pH 8,0).

Međutim, istraživanje Marinove i sur. (2019) imao je preniski početni broj bakterijskih stanica u probiotičkim suplementima ispitivanim u radu. Također, izravno su dodali stanice u simulirani sok tankog crijeva. Nasuprot tome, u ovom istraživanju stanice su prvo izložene simuliranom želučanom soku, a zatim simuliranom soku tankog crijeva, što potencijalno objašnjava razliku između rezultata istraživanja.

4.2.1. Preživljavanje *Lactobacillus* sojeva u 0,3 % otopini žučnih soli

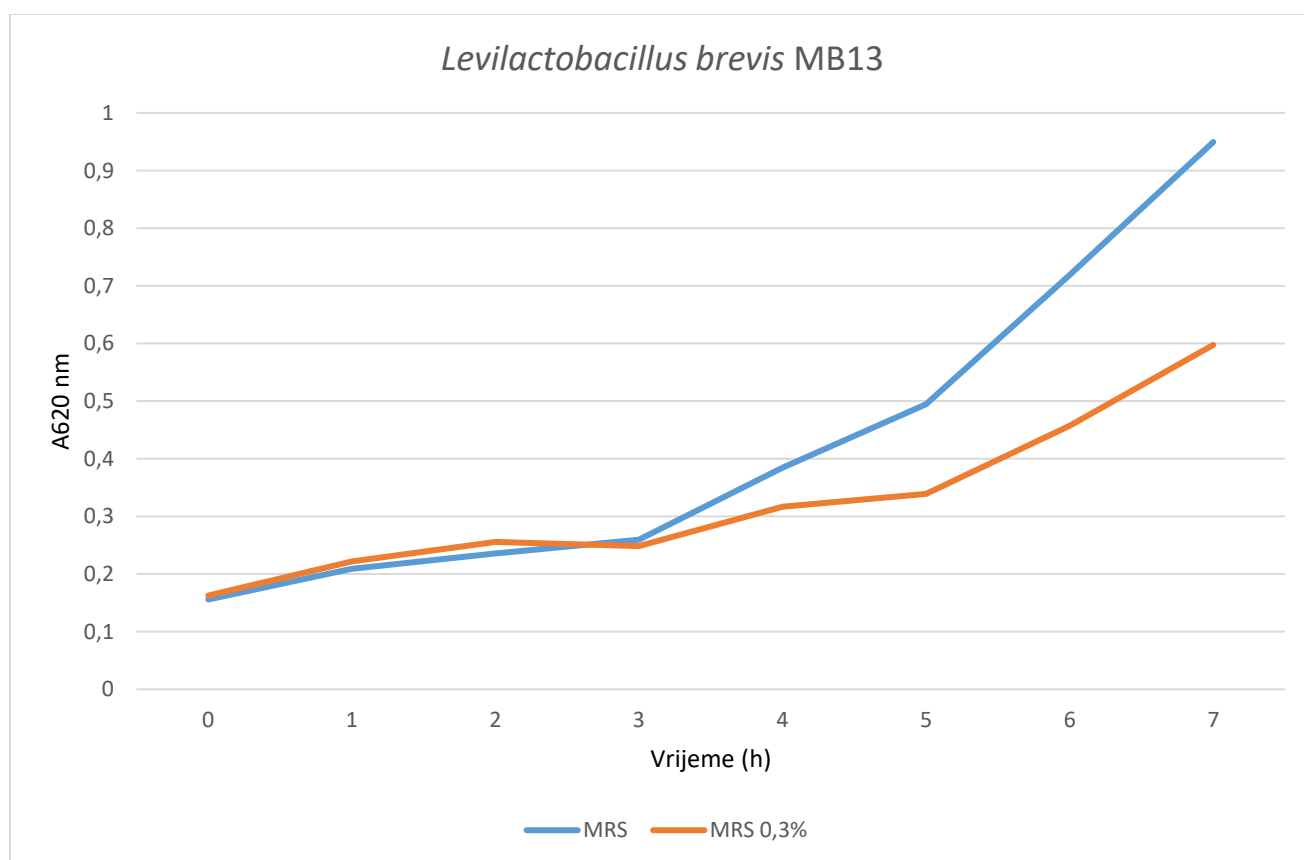
Žuč je žuto-zelena otopina koju proizvodi jetra, a zatim se izlučuje u gornji dio tankog crijeva putem žučnog kanala. Žučne soli su natrijeve ili kalijeve soli konjugirane s glicinskim ili taurinskim ostacima i žučnim kiselinama, te sudjeluju u procesima probave i apsorpcije masti. Glavni organski sastojci žuči su žučne soli i, u manjoj mjeri, kolesterol, fosfolipidi i pigment biliverdin. Žuč predstavlja značajan izazov za bakterije koje prolaze kroz probavni trakt (Jesus i sur., 2005). Žučne soli su amfipatske molekule i jedna su od glavnih komponenti žuči. Žuč ima antimikrobno djelovanje protiv brojnih mikroorganizama, uglavnom putem razgradnje njihovih staničnih ovojnica. Koncentracija žučnih soli u tankom crijevu može se kretati u rasponu od približno 0,2 % do čak 2 %, a ta koncentracija ovisi o različitim čimbenicima, uključujući individualne karakteristike pojedinca, vrstu unesene hrane i količinu obroka (Begley i sur., 2005).

Jednom kada bakterije dospiju u crijevni trakt, njihova sposobnost preživljavanja uvelike

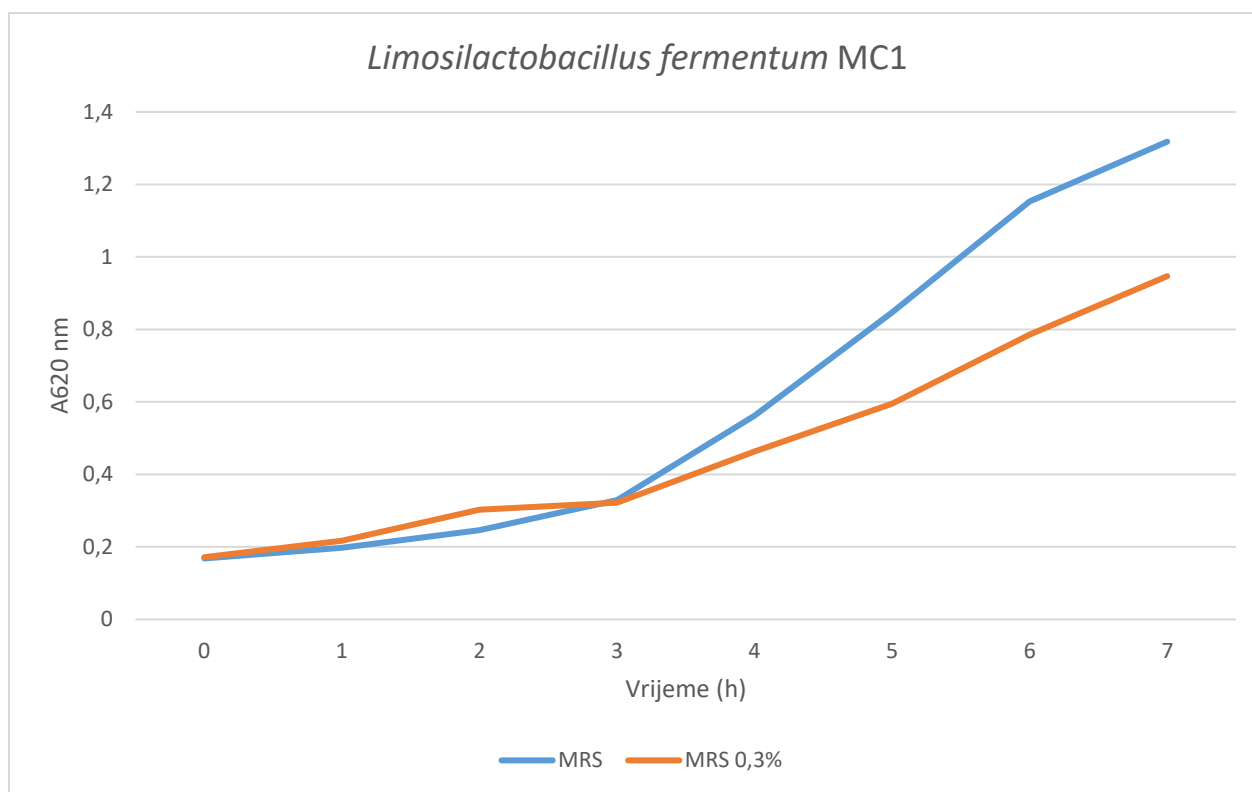
ovisi o njihovoj otpornosti na prisutnost žučnih soli. To potvrđuju istraživanja koja su pokazala da izloženost žuči koja ulazi u duodenalni dio tankog crijeva znatno smanjuje preživljavanje bakterija. Smatra se da je taj učinak povezan s činjenicom da bakterijske stanične membrane, koje se sastoje od lipida i masnih kiselina, vrlo osjetljivo reagiraju na djelovanje žučnih soli. Žučne soli djeluju kao deterdženti, narušavajući lipidnu strukturu membrana, što rezultira oštećenjem stanica i smanjenjem njihove vitalnosti (Begley i sur., 2005).

Kako bi se bolje razumjela otpornost probiotičkih bakterijskih sojeva na žučne soli, provedeno je ispitivanje preživljavanja sojeva MB13 i MC1 u prisutnosti 0,3 % žučnih soli u MRS hranjivoj podlozi.

Rezultati ispitivanja tolerancije bakterijskih sojeva na žučne soli prikazani su na slikama 12 i 13. Preživljavanje potencijalnih probiotičkih bakterija u otopini žučnih soli, praćeno je mjerenjem apsorbancije uzoraka svakih sat vremena tijekom 7 sati.



Slika 12. Vrijednosti apsorbancije (620 nm) uzorka *Levilactobacillus brevis* MB13 u MRS te u MRS + 0,3 %-tnoj otopini žučnih soli (MRS 0,3 %), u ovisnosti o vremenu inkubacije



Slika 13. Vrijednosti apsorbancije (620 nm) uzorka *Limosilactobacillus fermentum* MC1 u MRS te u MRS + 0,3 %-tnoj otopini žučnih soli (MRS 0,3 %), u ovisnosti o vremenu inkubacije.

Početna faza (0-1 sat):

Raspon izmjerene apsorbancije na 620 nm za uzorak s MC1 tijekom perioda inkubacije, od trenutka inokulacije (0. sat) do završetka u 7. satu, iznosio je od 0,2 do 1,0, a za MB13 iznosio je od 0,2 do 0,6.

Unatoč činjenici da je rast bakterija bio veći u kontrolnim uzorcima, rezultati ispitivanja jasno su pokazali relativno visoku stopu preživljavanja bakterijskih sojeva *Limosilactobacillus fermentum* i *Levilactobacillus brevis*. Rezultati su također pokazali da je *Limosilactobacillus fermentum* pokazao višu razinu rezistencije tijekom izlaganja 0,3 %-tnoj otopini žučnih soli u usporedbi sa sojem *Levilactobacillus brevis*, što ga čini otpornijim na stresne uvjete izazvane prisutnošću žučnih soli.

Na slici 12. na samom početku eksperimenta, može se primijetiti kako vrijednosti apsorbancije u oba medija ostaju niske, uz vrlo malu i zanemarivu razliku između njih. Ova početna sličnost u rastu upućuje na to da prisutnost žučnih soli u mediju ne uzrokuje neposrednu štetu bakterijskim stanicama, niti značajno utječe na njihovu početnu metaboličku aktivnost MB13.

Međutim, nakon prvog sata inkubacije, bakterijski rast u MRS mediju s dodatkom žučnih soli (prikazan narančastom linijom) postaje znatno sporiji u usporedbi s rastom u standardnom MRS agaru. Ova razlika ukazuje na to da žučne soli postupno stvaraju stresne uvjete za bakterijske stanice.

Smanjena apsorbancija pokazuje da žučne soli ograničavaju rast bakterija ili zahtijevaju od bakterija da troše dodatnu energiju na mehanizme preživljavanja, a ne na rast. Iako prisutnost žučnih soli usporava bakterijski rast, činjenica da MB13 ipak nastavlja rasti u ovim nepovoljnim uvjetima jasno pokazuje njegovu otpornost na žučne soli, što je ključna osobina za probiotike.

Na slici 13. prikazana je početna apsorbancija uzorka MC1 u standardnom MRS mediju, koji se koristi kao kontrolni medij, te uzorka MC1 u MRS-u koji sadrži 0,3 %-tnu otopinu žučnih soli. Iz prikazanih podataka jasno je vidljivo da su početne vrijednosti apsorbancije u oba uzorka vrlo slične. To upućuje na činjenicu da prisutnost žučnih soli neposredno nakon izlaganja ne uzrokuje inhibiciju bakterijskog rasta. To sugerira da bakterije u početnoj fazi nisu odmah podložne štetnim učincima koje prisutnost žučnih soli može izazvati. Umjesto toga, bakterije prolaze kroz određeno razdoblje prilagodbe prije nego što se manifestiraju bilo kakvi negativni učinci. Ova sposobnost prilagodbe može igrati ključnu ulogu u preživljavanju bakterijskih sojeva u izazovnim uvjetima.

Nakon početnog razdoblja prilagodbe, bakterije u standardnom MRS agaru, što je prikazano plavom linijom, pokazuju značajno brži i intenzivniji rast u usporedbi s bakterijama u MRS-u s dodatkom žučnih soli, što je prikazano narančastom linijom. Ova razlika u brzini i intenzitetu rasta jasno ukazuje na to da prisutnost žučnih soli stvara stresno stanje za bakterije. Stres izazvan žučnim solima potencijalno uzrokuje oštećenja staničnih membrana bakterijskih stanica, što može narušiti njihovu strukturalnu stabilnost. Uz to, ovakvo stanje može ometati normalan unos esencijalnih hranjivih tvari potrebnih za rast i metabolizam bakterija, dodatno otežavajući njihovo preživljavanje.

Ipak, unatoč činjenici da je rast bio smanjen u MRS-u koji sadrži žučne soli, bakterije su i dalje nastavile rasti, što sugerira da soj MC1 posjeduje specifične mehanizme prilagodbe za toleriranje prisutnosti žučnih soli. Ovi mehanizmi omogućuju preživljavanje i rast unatoč nepovoljnim uvjetima. Sposobnost *Limosilactobacillus fermentum* MC1 da raste u prisutnosti žučnih soli, prirodnoj komponenti gastrointestinalnog trakta, je ključna za preživljavanje i kolonizaciju.

Ovi rezultati potvrđuju sposobnost ovih sojeva da prežive i djelomično se prilagode nepovoljnim uvjetima koji nalikuju onima u probavnom sustavu.

Dobiveni rezultati u skladu su s istraživanjem Jin i sur. (1998) koji su ispitivali toleranciju 12 izoliranih *Lactobacillus* sojeva u 0,3 %-tnoj otopini žučnih soli. Njihova detaljna usporedba stope rasta sojeva *Lactobacillus* u kontrolnim i 0,3% žučnim kulturama tijekom 6 sati, također

je otkrila da je žuč imala samo blagi inhibitorni učinak. Rezultati tog istraživanja pokazuju da je žuč imala najmanji učinak na dva soja: *Levilactobacillus brevis* (I23) i *Limosilactobacillus fermentum* (I24).

Cilj istraživanja Fuochi i sur. (2015), bila je procjena rezistencije sedam nasumično odabranih *Lactobacillus* sojeva izoliranih iz ljudskih fekalnih i oralnih uzoraka, uključujući *L. jensenii*, *L. gasseri*, *L. salivarius*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus*, *L. crispatus* i *L. delbrueckii*. Njihov učinak uspoređivan je s komercijalnim probiotičkim proizvodom. Rezultati istraživanja također su pokazali da se 7 *Lactobacillus* sojeva uspjelo razmnožavati čak i u prisutnosti najveće koncentracije žučnih soli (0,5 %, 0,25 % i 0,12 %). *L. fermentum* i *L. gasseri* pokazali su najveću otpornost na tretman pri niskom pH 3,0, ali su svi ostali sojevi pokazali podnošljivost.

Istraživanje Zoumpopoulou i sur., 2007, proučavalo je *Limosilactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* zbog njihovog probiotičkog potencijala. Dobivena je značajna razlika u vrijednostima ovih sojeva prilikom analize preživljavanja uz dodatak žučnih soli. *L. plantarum* zadržao je svoju vitalnost do 1 h, a 3,8 % bakterija preživjelo je nakon 3 h. Nasuprot ovom radu, broj bakterijskih stanica *L. fermentum* opala je nakon 1 h, dosegnuvši postotak živih bakterija od 0,0057 % preživljavanja i 0,0007 % preživljenja nakon 2 i 3 sata. Stoga se može procijeniti da je izlaganje probiotičkih stanica sojeva *Levilactobacillus brevis* MB13 i *Limosilactobacillus fermentum* MC1, koncentracijama žučnih soli prisutnih prema procjeni u probavnom sustavu utjecalo je na smrtnost određenog postotka bakterijskih stanica, no još uvijek je postotak preživjelih stanica visok, te pretpostavlja učinkovite stanične mehanizme adaptacije odabranih sojeva na visoke koncentracije žučnih soli *in vivo*. Mehanizmi tolerancije bakterija mliječne kiseline pripisuju se enzimskoj aktivnosti hidrolaze žučnih soli koja konvertira toksične primarne žučne soli u manje štetne sekundarne žučne soli, što može biti čimbenik preživljavanja probiotičkih stanica. Opisani su i *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* sojevi koji eksprimiraju enzim žučnu liazu (Liu i sur., 2020).

5. ZAKLJUČCI

1. Izlaganje probiotičkih stanica sojeva *Levilactobacillus brevis* MB13 i *Limosilactobacillus fermentum* MC1, koncentracijama žučnih soli u probavnom sustavu, utjecalo je na smrtnost određenog postotka bakterijskih stanica, no rezultati potvrđuju da je postotak preživjelih stanica visok, te pretpostavlja učinkovite stanične mehanizme adaptacije odabranih sojeva na visoke koncentracije žučnih soli *in vivo*.

2. Sojevi *Levilactobacillus brevis* MB13 i *Limosilactobacillus fermentum* MC1, izolirani iz mikrobiote majčinog mlijeka, preživljavaju učinkovito uvjete GIT, te se pretpostavlja pojačana otpornost analiziranih sojeva uslijed zaštitnog učinaka dojenačke formule u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta.

6. LITERATURA

Ashraf R, Smith SC (2016) Commercial lactic acid bacteria and probiotic strains – tolerance to bile, pepsin and antibiotics. *Int Food Res J.* **23**, 777–789.

Åvall-Jääskeläinen S, Lindholm A, Palva A (2003) Surface display of the receptor-binding region of the *Lactobacillus brevis* S-layer protein in *Lactococcus lactis* provides nonadhesive lactococci with the ability to adhere to intestinal epithelial cells, *Appl. Environ. Microbiol.* **69(4)**, 2230–2236. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.4.2230-2236.2003>.

Banić M, Butorac K, Čuljak N, Leboš Pavunc A, Novak J, Bellich B i sur. (2022) The human milk microbiota produces potential therapeutic biomolecules and shapes the intestinal microbiota of infants. *Int. J. Mol. Sci.* **23(22)**, 14382; <https://doi.org/10.3390/ijms232214382>

Bertelsen RJ, Jensen ET, Ringel-Kulka T (2016) Use of probiotics and prebiotics in infant feeding. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* **30(1)**, 39-48. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpg.2016.01.001>

Begley M, Gahan CG, Hill C (2005) The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol Rev.* **29**, 625–651. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.09.003>

Biasucci G, Rubini M, Riboni S, Morelli L, Bessi E, Retetangos C (2010) Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut. *Early Hum Dev.* **86**, 1:13-5. [10.1016/j.earlhumdev.2010.01.004](https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2010.01.004)

Botes M (2008) Survival of probiotic lactic acid bacteria in the intestinal tract, their adhesion to epithelial cells and their ability to compete with pathogenic microorganisms. Doctoral dissertation, Stellenbosch University, Stellenbosch.

Cabrera-Rubio R, Mira A, Isolauri E, Laitinen K, Salminen S, Collado MC (2012) The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *Am. J. Clin. Nutr.* **96**, 544–551. <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.037382>

Canchaya C, Claesson MJ, Fitzgerald GF, D. van Sinderen, O'Toole PW (2006) Diversity of the genus *Lactobacillus* revealed by comparative genomics of five species. *Microbiology*, **152(11)**, 3185–3196. <https://doi.org/10.1099/mic.0.29140-0>

Conway PL, Gorbach SL, Goldin BR (1987) Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cell. *JDS* **70**, 1-12. 10.3168/jds.S0022-0302(87)79974-3

Charteris WP, PM Kelly, Morelli L, JK Collins (1998) Development and application of an *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract *J. Appl. Microbiol.* **84**, 759-768. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00407.x>

Charteris WP, PM Kelly, L Morelli, JK Collins (2000) Effect of conjugated oxgall salts on antibiotic susceptibility of oxgall salt-tolerant *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* isolates. *J. Food Prot.* **63**, 1369-1376. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-63.10.1369>

Chatterji D i Kumar Ojha A (2001) Revisiting the stringent response, ppGpp and starvation signaling, *COMICR.* **4(2)**, 160–165 [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(00\)00182-X](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(00)00182-X).

Davis C (2014) Enumeration of probiotic strains: Review of culture-dependent and alternative techniques to quantify viable bacteria. *J Microbiol Methods.* **103**, 9-17. 10.1016/j.mimet.2014.04.012 <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.04.012>

Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N i sur. (2010) Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **107(26)**:11971-5. 10.1073/pnas.1002601107

FAO/WHO (2002) Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization, London, Ontario.

Fernández MF, Boris S, Barbés C (2003) Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastro-intestinal tract. *J. Appl. Microbiol.* **94**, 449-455. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01850.x>

Fozo M, Kajfasz JK, Quivey Jr. RG (2004) Low pH induced membrane fatty acid alterations in oral bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, **238 (2)**, 291–295. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09769.x>

Fuochi V, Petronio GP, Lissandrello E, Furneri PM (2015) Evaluation of resistance to low pH and bile salts of human *Lactobacillus* spp. isolates. *Int J Immunopathol Pharmacol* **28(3)**, 426-

433. <https://doi.org/10.1177/039463201559094>

Garcia-Lafuente A, Antolin M, Guarner F, Crespo E, Malagelada JR (2001) Modulation of colonic barrier function by the composition of the commensal flora in the rat. *Gut*. **48(4)**, 503–507. <https://doi.org/10.1136/gut.48.4.503>.

Garmasheva IL, Kovalenko NK, (2005) Adhesive properties of lactic acid bacteria and methods of their investigation. *Mikrobiologichnyi Zhurnal*, **67(4)**, 68–84. 16250239

Gilliland SE, Staley TE, Bush LJ (1984). Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. *JDS*, **67(12)**, 3045-3051. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(84\)81670-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81670-7)

Guarner F, Perdigon G, Corthier G, Salminen S, Koletzko B, Morelli L (2005) Should yogurt cultures be considered probiotic? *Br. J. Nutr.* **93**, 783–78 doi:10.1079/BJN20051428

Guchte van de M, Serror P, Chervaux C, Smokvina T, Ehrlich ST, Maguin E, (2002) Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, **82 (1–4)**, 187– 216. https://doi.org/10.1007/978-94-017-2029-8_12

Guyton AC (1991) Transport and mixing of food in the alimentary tract; Secretory functions of the alimentary tract. *Textbook of medical physiology, 9th edn. WB Saunders Company*. Philadelphia, 803-813.

Heikkilä MP i Saris PEJ (2003) Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *J. Appl. Microbiol.*, **95(3)**, 471–478. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02002.x>

Hennet T i Borsig L (2016). Breastfed at tiffany's. *Trends Biochem. Sci.* **41**, 508–518. 10.1016/j.tibs.2016.02.008

Horácková Š, Žaludová K, Plocková M (2011) Stability of selected lactobacilli in the conditions simulating those in the gastrointestinal tract. *Czech J. Food Sci.* **29** (Special Issue), S30–S35.

Ingemar von O, Reetta S, Justus R, Sarah L, Sigrd CJ De Keersmaecker, JV, Willem M de Vos, Airi P (2011) Functional characterization of a mucus-specific LPXTG surface adhesin from probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Appl. Environ. Microbiol.* **77(13)**, 4465–4472.

Jensen H, Grimmer S, Naterstad K, Axelsson H (2012) In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol.* **153**, 216–222. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.020>

Jesus MC, Urban AA, Marasigan ME, Barnett Foster DE (2005) Acid and bile-salt stress of enteropathogenic *Escherichia coli* enhances adhesion to epithelial cells and alters glycolipid receptor binding specificity. *J. Infect. Dis.* **192**, 1430-1440. <https://doi.org/10.1086/462422>

Jin LZ, Ho YW, Abdullah N, Jalaludin S (1998). Acid and bile tolerance of *Lactobacillus* isolated from chicken intestine. *Lett Appl Microbiol*, **27(3)**, 183-185. 10.1046/j.1472-765x.1998.00405.x

Jost T, Lacroix C, Braegger CP, Rochat F, Chassard C (2014) Vertical mother-neonate transfer of maternal gut bacteria via breastfeeding. *Environ. Microbiol.* **16**, 2891-2904. 10.1111/1462-2920.12238

Kankainen M, Paulin L, Tynkkynen S, von Ossowski I, Reunanen J, Pasi P i sur. (2009) Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals pili containing a human-mucus binding protein *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106(40)**, 7193–17198. 10.1073/pnas.0908876106

Konings WN, Lolkema JS, Bolhuis H, Van Veen HW, Poolman B, Driessen AJM (1997) The role of transport processes in survival of lactic acid bacteria. Energy transduction and multidrug resistance, *Antonie van Leeuwenhoek.* **71(1-2)**, 117–128. <https://doi.org/10.1023/A:1000143525601>.

Lim ES, Zhou Y, Zhao G, Bauer IK, Droit L, Ndao IM i sur. (2015) Early life dynamics of the human gut virome and bacterial microbiome in infants. *Nat Med.* **1(10)**, 1228-34. 10.1038/nm.3950

Lin WH, Hwang CF, Chen LW, Tsen HY (2006) Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products. *Food Microbiol.* **23**, 74-81. 10.1016/j.fm.2005.01.013

Liu Y, Chen K, Li F, Gu Z, Liu Q, He L i sur. (2020) Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG Prevents Liver Fibrosis Through Inhibiting Hepatic Bile Acid Synthesis and Enhancing Bile

Acid Excretion in Mice. *Hepatology*. **71(6)**, 2050-2066. 10.1002/hep.30975.

Łubiech K, Twarużek M (2020) Lactobacillus bacteria in breast milk. *Nutrients*, **12(12)**, 3783. 10.3390/nu12123783

Lyons KE, Ryan CA, Dempsey EM, Ross RP, Stanton C (2020) Breast Milk, a Source of Beneficial Microbes and Associated Benefits for Infant Health. *Nutrients*. **12(4)**, 1039. 10.3390/nu12041039.

Macías-Rodríguez ME, Zagorec M, Ascencio F, Vázquez-Juárez R, Rojas M (2009) *Lactobacillus fermentum* BCS87 expresses mucus- and mucin-binding proteins on the cell surface, *J. Appl. Microbiol.* **107(6)**, 1866–1874. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04368.x>.

Martin FP, Sprenger N, Yap IH, Wang Y, Babiloni R, Rochat F i sur. (2009) Panorganismal gut microbe – host metabolic crosstalk. *J. Proteome Res.* **8**, 2090 – 2015. 10.1021/pr801068x

Mitsuoka T (1992) The Human Gastrointestinal Tract. 1. izd, The Lactic Acid Bacteria., Springer, Boston, str. 69-114.

Morelli L (2000) In vitro selection of probiotic Lactobacilli: A critical appraisal. *Curr. Iss. Intest. Microbiol.* **1**, 59–6

Miyoshi A, Rochat T, Gratadoux JJ, Le Loir Y, Oliveira SC., Langella P, Azevedo V (2003) Oxidative stress in *Lactococcus lactis*, *GMR.* **2(4)**, 348–359, 2-s2.0-2542454740.

Pelaseyed T, Bergström JH, Gustafsson JK, Ermund A, Birchenough GM, Schütte A, i sur. (2014) The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunol Rev* **260(1)**, 31 8-20. <https://doi.org/10.1111/imr.12182>

Pijkeren van JP, Canchaya C, Ryan KA, Li Y, Claesson MJ, Sheil B i sur. (2006) Comparative and functional analysis of sortase-dependent proteins in the predicted secretome of *Lactobacillus salivarius* UCC118, *Appl. Environ. Microbiol* **72(6)**, 4143–4153. <https://doi.org/10.1128/AEM.03023-05>

Pinto MG, Franz MAP, Schillinger U, Holzapfel WH (2006) *Lactobacillus* spp. with *in vitro*

probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. *Int J Food Microbiol* **109**, 205-214. 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.029

Ruiz L, García-Carral C, Rodriguez JM (2019) Unfolding the human milk microbiome landscape in the omics era. *Front. Microbiol.* **10**, 1378. 10.3389/fmicb.2019.01378

Salminen S, von Wright A. (1998) Current probiotics-safety assured? *Microb. Ecol. Health D.* **10**, 68–77. <https://doi.org/10.1080/089106098435287>

Sanders, M. E. (2003) Probiotics: Considerations for human health. *Nutr. Rev.* **61(3)**, 91–99. <https://doi.org/10.1301/nr.2003.marr.91-99>

Sarao LK i M Arora (2016) Probiotics, prebiotics, and microencapsulation: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **57 (2)**, 344-371. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.887055>

Sengupta R, Altermann E, Anderson RC, McNabb WC, Moughan PJ, Roy NC (2013) The role of cell surface architecture of lactobacilli in host-microbe interactions in the gastrointestinal tract. *Mediators Inflamm.* **1**, 237921. 10.1155/2013/237921

Soltan Dallal MM, Maragheh N, Rajabi Z, Hosseini MB, Papizadeh M, Hassanpour G i sur. (2021) Probiotic properties of Lactobacilli isolated from human milk and their inhibitory effect on gastrointestinal pathogenic bacteria. *Afr. J. Microbiol.* **11**, 318-324. 10.1016/j.anaerobe.2011.07.008

Walsh CJ, Guinane CM, O'Toole PW, Cotter PD (2014) Beneficial modulation of the gut microbiota. *EBS Letters.* **588 (22)**, 4120-4130. 10.1016/j.febslet.2014.03.035

Zoumpopoulou G, Foligne B, Christodoulou K, Grangette C, Pot B, Tsakalidou, E (2007) *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 displays probiotic potential *in vitro* and protects against trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis and *Salmonella* infection in murine models. *Int. J. Food Microbiol.* **121(1)**, 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.10.013>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Ime i Prezime izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

_____Maja Zovko_____

Vlastoručni potpis