

Karakterizacija probiotičkih svojstava bakterija roda *Lactobacillus* izoliranih iz kiselog kupusa

Bezić, Korina

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:159:306081>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-25**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2024.

Korina Bezić

**KARAKTERIZACIJA PROBIOTIČKIH
SVOJSTAVA BAKTERIJA RODA
Lactobacillus IZOLIRANIH IZ KISELOG
KUPUSA**

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 izv. prof. dr. sc. Andreje Leboš Pavunc te uz pomoć dr. sc. Katarine Butorac.

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: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Upravljanje sigurnošću hrane

KARAKTERIZACIJA PROBIOTIČKIH SVOJSTAVA BAKTERIJA RODA *Lactobacillus* IZOLIRANIH IZ KISELOG KUPUSA

Korina Bezić, univ. bacc. ing. biotechn.
1191244649

Sažetak: Probiotici su živi mikroorganizmi koji, kada se daju u odgovarajućim količinama, imaju zdravstvene dobrobiti za domaćina. Najčešće korišteni mikroorganizmi u probiotičkim proizvodima bakterije su iz obitelji *Lactobacillaceae* pa je tako cilj ovoga rada bio ispitati probiotički potencijal *Lactiplantibacillus plantarum* SF15C te *Levilactobacillus brevis* SF15B, bakterija izoliranih iz kiselog kupusa. Pokazano je kako su sojevi uglavnom osjetljivi na ispitivane antibiotike, dobro preživljavaju u simuliranom želučanom soku i soku tankog crijeva te pri koncentracijama NaCl-a do 6,5 %. Ispitivanjem mikrobne adhezije na otapala ustanovljeno je kako je stanična površina oba soja hidrofobna i pretežito negativno nabijena te imaju vrlo dobru sposobnost koagregacije sa srodnim bakterijama mliječne kiseline i potencijalno patogenim test-mikroorganizmima.

Ključne riječi: *Lactiplantibacillus plantarum*, *Levilactobacillus brevis*, probiotici, bakterije mliječne kiseline

Rad sadrži: 42 stranice, 16 slika, 5 tablica, 67 literaturnih navoda

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: izv. prof. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc

Pomoć pri izradi: dr. sc. Katarina Butorac

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Blaženka Kos
2. izv. prof. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc
3. prof. dr. sc. Ksenija Durgo
4. prof. dr. sc. Ksenija Markov

Datum obrane: 20. prosinca 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Antibiotic, Enzyme, Probiotic And Starter Culture Technologies

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Food Safety Management

CHARACTERIZATION OF PROBIOTIC PROPERTIES OF BACTERIA FROM GENUS *Lactobacillus*
ISOLATED FROM SAUERKRAUT

Korina Bezić, univ. bacc. ing. biotechn.
1191244649

Abstract: Probiotics are live microorganisms that, when administered in appropriate amounts, have health benefits for the host. The most commonly used microorganisms in probiotic products are bacteria from the *Lactobacillaceae* family, and the aim of this graduate thesis was to examine the probiotic potential of *Lactiplantibacillus plantarum* SF15C and *Levilactobacillus brevis* SF15B bacteria isolated from sauerkraut. It was shown that the strains are mostly susceptible to the tested antibiotics, they survive well in simulated gastric juice and small intestine juice and at NaCl concentrations up to 6.5%. By testing microbial adhesion to solvents, it was established that the cell surface of both strains is hydrophobic and predominantly negatively charged, and they have a very good ability to coaggregate with related lactic acid bacteria and potentially pathogenic test-microorganisms.

Keywords: *Lactiplantibacillus plantarum*, *Levilactobacillus brevis*, probiotics, lactic acid bacteria

Thesis contains: 42 pages, 16 figures, 5 tables, 67 references

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: Andreja Leboš Pavunc, PhD, Associate professor

Technical support and assistance: Katarina Butorac, PhD

Reviewers:

1. Blaženka Kos, PhD, Full professor
2. Andreja Leboš Pavunc, PhD, Associate professor
3. Ksenija Durgo, PhD, Full professor
4. Ksenija Markov, PhD, Full professor

Thesis defended: December 20th, 2024

Sadržaj

| | |
|---|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO | 2 |
| 2.1. PROBIOTICI | 2 |
| 2.1.1. Definicija probiotika | 2 |
| 2.1.2. Mehanizam djelovanja..... | 2 |
| 2.1.3. Zdravstveni učinci | 3 |
| 2.1.4. Probiotički preparati | 5 |
| 2.2. PROBIOTIČKI MIKROORGANIZMI | 5 |
| 2.2.1. Bakterije mliječne kiseline | 6 |
| 2.2.1.1. <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> | 7 |
| 2.2.1.2. <i>Levilactobacillus brevis</i> i <i>S-proteini</i> | 8 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 10 |
| 3.1. MATERIJALI | 10 |
| 3.1.1. Mikroorganizmi..... | 10 |
| 3.1.2. Hranjive podloge | 10 |
| 3.1.3. Kemikalije..... | 11 |
| 3.1.4. Aparatura i pribor..... | 12 |
| 3.2. METODE..... | 13 |
| 3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama..... | 13 |
| 3.2.2. Određivanje osjetljivosti bakterija na antibiotike..... | 13 |
| 3.2.3. Karakterizacija svojstava površine bakterijskih stanica - mikrobna adhezija na otapala... 15 | |
| 3.2.4. Ispitivanje preživljavanja bakterija mliječne kiseline u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta | 15 |
| 3.2.5. Ispitivanje autoagregacijskih i koagregacijskih svojstava odabranih bakterija mliječne kiseline..... | 16 |
| 3.2.6. Turbidimetrijsko određivanje brzine rasta kultura odabranih izolata pri različitim koncentracijama NaCl-a: preživljavanje <i>Lactobacillus</i> sojeva pri različitim tehnološkim stresnim uvjetima | 18 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 19 |
| 4.1. Osjetljivost na antibiotike – izrada antibiograma | 19 |
| 4.1.1. Određivanje antibiotske aktivnosti metodom difuzije u agar s filter diskovima..... | 19 |
| 4.1.2. Određivanje minimalne inhibicijske koncentracije antibiotika pomoću E-testa | 20 |
| 4.2. Ispitivanje preživljavanja bakterija mliječne kiseline u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta | 23 |

| | |
|---|----|
| 4.3. Karakterizacija svojstava površine bakterijskih stanica - mikrobna adhezija na otapala..... | 26 |
| 4.4. Ispitivanje autoagregacijskih i koagregacijskih svojstava odabranih bakterija mliječne kiseline..... | 29 |
| 4.5. Preživljavanje <i>Lactobacillus</i> sojeva pri različitim koncentracijama NaCl-a | 32 |
| 5. ZAKLJUČCI | 35 |
| 6. LITERATURA..... | 36 |

1. UVOD

Probiotici, definirani kao živi mikroorganizmi koji u odgovarajućim količinama pozitivno djeluju na zdravlje domaćina, sve su važniji u istraživanjima i industrijskim primjenama (Binda i sur., 2020). Njihov terapijski potencijal proizlazi iz sposobnosti da prežive ekstremne uvjete probavnog sustava, uključujući kiselost želuca i djelovanje probavnih enzima, te da se uspješno koloniziraju u crijevima gdje pozitivno utječu na ravnotežu crijevne mikrobiote.

Probiotici doprinose zdravlju na nekoliko razina: uz jačanje imunološkog sustava, pomažu u smanjenju upalnih procesa i moduliraju alergijske odgovore organizma, potencijalno smanjujući simptome astme, rinitisa i ekcema. Istraživanja također ukazuju na njihov antikancerogeni potencijal, pri čemu specifični sojevi probiotika mogu inhibirati proliferaciju stanica karcinoma i smanjiti rizik od crijevnih i ekstraintestinalnih tumora. Osim toga, probiotici mogu pomoći u snižavanju razine kolesterola, čime pridonose zdravlju kardiovaskularnog sustava (Latif i sur., 2023).

Ovaj rad usmjeren je na ispitivanje probiotičkih svojstava i otpornosti dviju bakterija mliječne kiseline, *Levilactobacillus brevis* SF15B i *Lactiplantibacillus plantarum* SF15C, u uvjetima koji oponašaju gastrointestinalni (GI) trakt i specifične stresne čimbenike relevantne za prehrambenu industriju. Cilj istraživanja jest analizirati kako ovi sojevi reagiraju na različite uvjete poput prisutnosti antibiotika, promjena u koncentraciji NaCl-a i pH vrijednosti, čime se procjenjuje njihova sposobnost preživljavanja i funkcionalnosti u složenim uvjetima probavnog sustava. Istraživanje uključuje i procjenu adhezijskih i agregacijskih svojstava sojeva, što je bitno u procjeni probiotičkog potencijala jer omogućava bolje razumijevanje mehanizama interakcije probiotika s crijevnim epitelom, patogenima i mikrobnom zajednicom probavnog sustava.

U okviru ovih analiza korištene su standardne laboratorijske metode za testiranje otpornosti na antibiotike, praćenje preživljavanja u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta, mjerenje rasta pri različitim koncentracijama NaCl-a, te procjena adhezije na različita otapala, kao i auto- i koagregacijskih sposobnosti. Rezultati dobiveni ovim istraživanjem pružaju uvid u otpornost i prilagodljivost ovih probiotičkih sojeva, čime se potvrđuje njihov potencijal za primjenu u fermentiranim prehrambenim proizvodima i kao dodatak prehrani s mogućim terapijskim prednostima.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. PROBIOTICI

2.1.1. Definicija probiotika

Prema FAO/WHO probiotici su živi mikroorganizmi koji, kada se daju u odgovarajućim količinama, imaju zdravstvene dobrobiti za domaćina. Općenito se klasificiraju kao lijekovi (tj. lijekovi i farmaceutski proizvodi), dodaci prehrani i funkcionalna hrana ovisno o namjeni. Oni uglavnom potječu iz fermentirane hrane ili su sojevi bakterija ili kvasca koji se nalaze prirodno u ljudskom probavnom traktu. Kako bi se određeni soj mikroorganizma mogao smatrati probiotikom, potrebno je da ispuni nekoliko ključnih kriterija: moraju biti dovoljno okarakterizirani; sigurni za namijenjenu upotrebu; mora biti dokazano pozitivno djelovanje na domaćina; moraju preživjeti fiziološke uvjete probavnog sustava i doći do mjesta djelovanja u crijevima, odnosno moraju moći izdržati vrlo kisele uvjete želuca te probavne enzime i žučne soli; moraju ostati stabilni tijekom procesa proizvodnje te tijekom cijelog roka trajanja proizvoda; ne smiju biti patogeni (Binda i sur., 2020; Vitali Čepo i Filipović, 2014).

2.1.2. Mehanizam djelovanja

Probiotici mogu pozitivno djelovati na ljudski organizam kroz nekoliko ključnih mehanizama: kompetitivno isključivanje patogena, jačanje funkcije crijevne barijere, imunomodulacija unutar organizma domaćina te proizvodnja neurotransmitera. Natječući se s patogenima za hranjive tvari i mjesta za vezanje receptora, probiotici otežavaju preživljavanje patogena u crijevima. Također, probiotici djeluju antimikrobno stvaranjem različitih tvari kao što su kratkolančane masne kiseline, organske kiseline, vodikov peroksid i bakteriocini, čime se smanjuje broj patogenih bakterija. Uz to, probiotici poboljšavaju funkciju crijevne barijere stimuliranjem sinteze mucinskih proteina, regulacijom ekspresije proteina uskih spojeva, poput okludina i kladina 1, i moduliranjem imunološkog odgovora u crijevima. Probiotici također reguliraju urođeni i adaptivni imunološki odgovor djelujući na dendritičke stanice, makrofage, te B i T limfocite. Oni potiču proizvodnju protuupalnih citokina kroz interakciju s epitelnim stanicama crijeva, privlačeći makrofage i mononuklearne stanice. Osim toga, probiotici mogu proizvoditi neurotransmitere u crijevima putem crijevno-moždane osi. Određeni sojevi probiotika mogu

utjecati na razine serotonina, gama-aminomaslačne kiseline i dopamina, što može imati učinke na raspoloženje, ponašanje, motilitet crijeva i puteve povezane sa stresom (Latif i sur., 2023).

Prema Oelschlaegeru (2010), učinci probiotika mogu se podijeliti u tri glavna mehanizma djelovanja:

- Probiotici mogu pomoći u modulaciji obrane domaćina utječući na urođeni i stečeni imunološki sustav. Ovaj učinak najvjerojatnije podupire prevenciju i liječenje zaraznih bolesti, kronične upale u gastrointestinalnom traktu i moguće uklanjanje abnormalnih stanica domaćina.
- Probiotici mogu izravno djelovati na druge mikroorganizme, kako komenzalne tako i patogene. Ovaj mehanizam kritičan je za prevenciju infekcija, terapiju i uspostavljanje mikrobne ravnoteže u crijevima.
- Probiotici mogu utjecati na nusproizvode mikroba (poput toksina) ili proizvode domaćina (npr. žučne soli), kao i spojeve dobivene iz hrane. Ove radnje mogu rezultirati neutralizacijom toksina i detoksikacijom unutar crijeva.

Zajedno, ti mehanizmi vrlo vjerojatno doprinose otpornosti na infekcije, prevenciji raka i održavanju ravnoteže domaćina i mikrobiote. Međutim, niti jedan probiotički soj ne pokazuje sva tri mehanizma. Učinkovitost svakog soja ovisi o njegovim specifičnim metaboličkim svojstvima, ekspresiji površinskih molekula i izlučenim komponentama koje određuju njegov terapijski potencijal za različita zdravstvena stanja.

2.1.3. Zdravstveni učinci

Zdravstvene prednosti probiotika povezane su s prevencijom i smanjenjem brojnih bolesti, npr. alergijskih bolesti, raka, hiperkolesterolemije, intolerancije na laktozu, upalne bolesti crijeva, dijareje i sindroma iritabilnog crijeva.

Alergije su reakcije preosjetljivosti tipa 1 imunološkog sustava koje sve više prevladavaju u Europi i Sjevernoj Americi, a obično ih pokreću antigeni iz okoliša, što dovodi do stanja poput astme, rinitisa i ekcema. One su posljedica neravnoteže u imunološkom odgovoru, s imunološkom reakcijom kojom dominiraju T *helper* 2 (Th2) limfociti koji proizvode različite interleukine, stimulirajući imunološke stanice koje podižu razinu IgE i potiču alergijsku upalu. Mikrobiom probavnog sustava predstavlja potencijalnu terapijsku metu za upravljanje alergijskim reakcijama s obzirom na to da probiotici mogu pridonijeti uravnoteženju imunoloških odgovora,

jačanju mukozne barijere, smanjenju propusnosti antigena te povećanju protuupalnih citokina, poput IL-10. Mehanizam antialergijskog učinka probiotika može uključivati povećanje imunološke ravnoteže T *helper* stanica Th1/Th2, djelujući na pomicanje imunološke ravnoteže prema Th1 odgovoru, istovremeno potiskujući Th2 odgovore i podržavajući regulatornu funkciju T stanica (Treg), čime se osigurava kontroliranija imunološka aktivnost (Owaga i sur., 2014). Određeni probiotici, poput *Lactiplantibacillus plantarum* i *Limosilactobacillus reuteri*, pokazali su antialergijska svojstva, smanjujući proupalne markere i potičući tolerogene odgovore u eksperimentalnim modelima što potvrđuje njihovu ulogu u ublažavanju alergijskih simptoma putem modulacije crijevne mikrobiote i imunološke regulacije (Huang i sur., 2017; Lee i sur., 2014).

Probiotici također obećavaju kao adjuvanti u liječenju raka. Oni mogu pomoći u sprječavanju inicijacije tumora, napredovanja i metastaza kod raznih karcinoma, crijevnih i ekstraintestinalnih. Probiotici i njihovi metaboliti, poput bakteriocina i organskih kiselina, utječu na metaboličke puteve poput stanične proliferacije, upale, apoptoze i angiogeneze (Sankarapandian i sur., 2022). Oni inhibiraju karcinogenezu kompetitivnim isključivanjem patogena, proizvodnjom kratkolančanih masnih kiselina, smanjenjem kancerogenih žučnih soli, vezanjem karcinogena i modulacijom gena povezanih s preživljavanjem stanica (Chong, 2014).

Probiotici mogu učinkovito smanjiti razinu kolesterola u krvi kroz izravne i neizravne mehanizme. Izravno inhibiraju sintezu kolesterola pomoću spojeva kao što su mokraćna i orotska kiselina, dok smanjuju apsorpciju kolesterola u crijevima mehanizmima asimilacije, vezanja i razgradnje. Neizravno, probiotici proizvode hidrolazu žučne soli koja dekonjugira žučne soli, ograničavajući njihovu reapsorpciju u crijevima i povećavajući izlučivanje putem fecesa (Thakkar i sur., 2016).

Crijeva su neophodna za apsorpciju hranjivih tvari i održavanje zaštitne mukozne barijere, pod utjecajem raznolike zajednice komenzalnih bakterija. Promjene u crijevnoj mikrobioti, uzrokovane antibioticima, probioticima, prebioticima ili fekalnim transplantacijama, mogu imati značajne posljedice na zdravlje (Cammarota i sur., 2014). Uravnotežen mikrobiom (eubioza) podržava dobrobit, dok poremećaji (disbioze) mogu pridonijeti razvoju stanja poput dijareje povezane s antibioticima, upalnih bolesti crijeva, sindroma iritabilnog crijeva i potencijalno određenih vrsta raka (Gupta i sur., 2022). Obnavljanje zdrave mikrobiote pomoću probiotika može poboljšati mikrobnu raznolikost, proizvodnju enzima, imunološku funkciju i integritet crijevne barijere, čime se nude terapijske prednosti za različite crijevne poremećaje (Gou i sur., 2022).

2.1.4. Probiotički preparati

Probiotici su dostupni u različitim oblicima osim fermentirane hrane, uključujući liofilizirane kapsule za oralnu i vaginalnu upotrebu, oralne kapi i sve više mikrokapsulirane liofilizate. Mikrokapsulacija je osmišljena da poboljša stabilnost probiotika tijekom skladištenja, zaštiti probiotike kroz gornji dio probavnog trakta i omogući ciljano oslobađanje u debelom crijevu za učinkovitu kolonizaciju. Materijali poput alginata, ksantanske gume i celuloze obično se koriste u procesu kapsuliranja. Liofilizirani probiotici također se nalaze u ampulama, bočicama, vrećicama, tabletama, čokoladama, pa čak i lizalicama. Probiotici se također pojavljuju u kozmetici, a najčešći proizvodi ove skupine koji se nalaze na tržištu su kreme, serumi, maske i gelovi, ali i pilinzi, sredstva za čišćenje, puderi, sapuni, losioni, šamponi, paste za zube ili dezodoransi. Oni često sadrže postbiotike - nežive bakterijske komponente ili lizate za koje se vjeruje da poboljšavaju funkciju barijere kože i inhibiraju patogene. Ovi se proizvodi koriste u liječenju akni i atopijskog dermatitisa, iako mnogima nedostaje dodatna znanstvena potvrda. Uporaba probiotika još se istražuje i u proizvodnji zavoja i flastera kako bi spriječili infekcije rana otpuštanjem bakteriocina koji inhibiraju patogene kožne bakterije (Zawistowska-Rojek i sur., 2022a; Khalfallah i sur., 2021; Puebla-Barragan i Reid, 2021).

2.2. PROBIOTIČKI MIKROORGANIZMI

Najčešće korišteni mikroorganizmi u probiotičkim proizvodima bakterije su iz obitelji *Lactobacillaceae*, posebice *L. acidophilus* i *L. rhamnosus*, kao i *L. plantarum*, *L. casei*, *L. paracasei* i *L. Salivarius*. Također, probiotici često sadrže i bakterije iz roda *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Bacillus* ili sojeve *Streptococcus thermophiles*. Sojevi vrsta kvasca, kao što je *Saccharomyces boulardii*, isto tako mogu biti prisutni u ovim pripravcima (Zawistowska-Rojek i sur., 2022a). Budući da su probiotički učinci specifični za svaki soj, identifikacija soja ključna je za određivanje njegove prikladnosti i učinkovitosti za industrijsku upotrebu. To se postiže kombinacijom fenotipskog testiranja i genetske identifikacije pomoću molekularnih metoda kao što su DNA/DNA hibridizacija i 16S rRNA sekvenciranje (Kechagia i sur., 2013). *Lactobacillus* je jedan od najvažnijih rodova uključenih u mikrobiologiju hrane i ljudsku prehranu, zahvaljujući svojoj ulozi u proizvodnji i konzerviranju hrane i hrane za životinje, kao i svojim probiotičkim svojstvima.

2.2.1. Bakterije mliječne kiseline

Bakterije mliječne kiseline (BMK), često zvane „mliječne bakterije“, obuhvaćaju raznoliku skupinu mikroorganizama koji se nalaze u biljkama (kao što su kupus, kukuruz, ječam i silaža), te u mesu i mliječnim proizvodima. Poznate su po svojoj ulozi kao starter kulture u proizvodnji mliječnih proizvoda, uključujući acidofilno mlijeko, jogurt, mlaćenicu, svježi sir i razne tvrde i meke sireve kao što su Cheddar, Provolone, Brie i Camembert. Osim toga, BMK komercijalno su vrijedne u preradi mesa, alkoholnih pića i povrća, odnosno u proizvodnji proizvoda poput kobasica, pršuta, vina, piva, kiselih krastavaca i kiselog kupusa (Carr i sur., 2002). Tipična bakterija mliječne kiseline, kada se uzgaja u standardnim uvjetima (s dovoljno glukoze, potrebnim faktorima rasta i ograničenim kisikom) jest Gram-pozitivna, nesorogena, katalaza-negativna bez porfirinoida, benzidin-negativna, bez citokroma, ne reducira nitrate u nitrit, negativna na želatinazu, aerotolerantna, tolerantna na kiseline, organotrofna, i striktno fermentirajuća bakterija u obliku štapića ili koka. BMK karakterizirane su proizvodnjom mliječne kiseline kao glavnog kataboličkog krajnjeg produkta iz glukoze. Homofermentativne vrste proizvode mliječnu kiselinu kao jedini krajnji proizvod, dok heterofermentativne vrste proizvode mliječnu kiselinu, ugljikov dioksid i etanol ili acetat. Najmanje polovica ugljika krajnjeg proizvoda čini laktat (König i Fröhlich, 2017; Carr i sur., 2002). Tijekom fermentacije, BMK proizvode organske kiseline i druge metabolite koji poboljšavaju okus, sprječavaju kvarenje i podržavaju očuvanje hrane, što ih čini neophodnim u prehrambenoj i mliječnoj industriji. Proizvodnja mliječne kiseline fermentacijom laktoze glavna je uloga mliječnih startera. Ona je odgovorna za razvoj karakterističnog tijela i teksture fermentiranih mliječnih proizvoda, doprinosi ukupnom okusu proizvoda i poboljšava očuvanje. Diacetil, acetaldehid, octena kiselina, koje također proizvode mliječne starter kulture, doprinose okusu i aromi konačnog proizvoda. Ugljični dioksid koji proizvode neke heterofermentativne BMK uključuje vrlo značajnu teksturizaciju u nekim fermentiranim mliječnim proizvodima, tj. stvaranje „oka“ u sirevima. Budući da BMK prirodno proizvode bakteriocine koji pomažu u biokonzerviranju hrane, one funkcioniraju kao antagonistički, inhibitorni i antimikrobni obrambeni sustav koji djeluje protiv patogena i mikroorganizama kvarenja. Osim toga, kao probiotici, BMK jačaju imunološki sustav i povezuju se s prevencijom bolesti, pružajući prehrambene i imunološke prednosti ako se redovito konzumiraju (Ayivi i sur., 2020; Hati i sur., 2013).

2.2.1.1. *Lactiplantibacillus plantarum*

Lactiplantibacillus plantarum, prije poznat kao *Lactobacillus plantarum*, jedna je od vrsta Gram-pozitivnih BMK. Ima visoku ekološku i metaboličku prilagodljivost koja postoji u širokom rasponu staništa uključujući mliječne proizvode, povrće, meso i gastrointestinalni, vaginalni i urogenitalni trakt. Ima veći genom od drugih vrsta BMK s brojnim genima, što ukazuje na njegovu snažnu prilagodljivost, visoku svestranost i raznolikost fenotipskih svojstava, metaboličkog kapaciteta i industrijske primjene. Naširoko se koristi u fermentaciji hrane poput jogurta, sira i kiselog tijesta, poboljšavajući okus, teksturu i rok trajanja zbog proizvodnje bioaktivnih spojeva kao što su egzopolisaharidi, vitamini i bakteriocini. *Lp. plantarum* je općenito priznat kao siguran (engl. *Generally Recognized as Safe*, GRAS) od Europske agencije za sigurnost hrane (engl. *European Food Safety Authority*, EFSA) i ima kvalificiranu pretpostavku sigurnosti (engl. *Qualified Presumption of Safety*, QPS) od američke Uprave za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA), čime se naglašava njegova sigurnost u primjeni u hrani. Metaboliti *Lp. plantarum*, uključujući mliječnu kiselinu, masne kiseline, peptide, fenole, estere, amide i bakteriocine, posjeduju antimikrobna svojstva učinkovita protiv patogena i organizama kvarenja, dok specifični sojevi mogu inhibirati štetne mikotoksine kao što su aflatoksini, okratoksini i zearalenoni. Genomske studije nastavljaju istraživati nove sojeve *Lp. plantarum* s primjenom u sigurnosti i očuvanju hrane, naglašavajući njegov potencijal kao biokonzervansa i nutritivnog pojačivača (Li i sur., 2023; Yilmaz i sur., 2022).

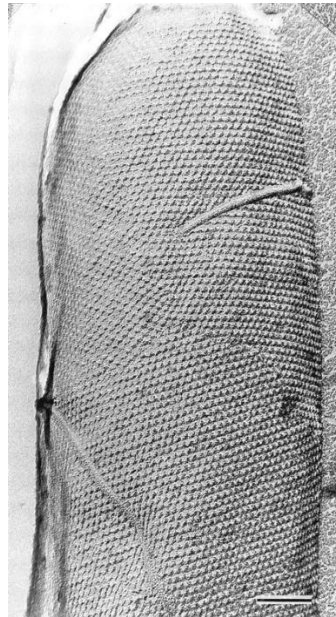
Studije su pokazale da *Lactiplantibacillus plantarum* nudi zdravstvene prednosti izvan svoje funkcionalne primjene u hrani. Probiotički sojevi *Lp. plantarum* mogu poboljšati crijevnu mikrobiotu, podržati imunološku regulaciju, sniziti kolesterol u krvi i potencijalno smanjiti rizik od raka inhibicijom aflatoksina (Abdelazez i sur., 2018). Sojevi poput *Lp. plantarum* UM55 proizvode organske kiseline s antikancerogenim svojstvima, dok drugi sojevi u fermentiranoj hrani poput kefira pojačavaju aktivnost imunoloških stanica protiv tumorskih stanica (Guimarães i sur., 2018; Yamane i sur., 2018). Osim toga, *Lp. plantarum* pokazuje učinke protiv pretilosti, sa sojevima poput LMT1-48 i KLDS1.0344 koji smanjuju lipogene gene, moduliraju crijevnu mikrobiotu i poboljšavaju metabolizam lipida u modelima prehrane s visokim udjelom masti (Choi i sur., 2020; Li i sur., 2020). *Lp. plantarum* također pokazuje obećavajuće rezultate u liječenju upalne bolesti crijeva i može poduprijeti liječenje raka, IBS-a i infekcije *Clostridium difficile* pozitivnim utjecajem na sastav crijevnog mikrobioma i imunološke odgovore (Kaźmierczak-Siedlecka i sur., 2020).

2.2.1.2. *Levilactobacillus brevis* i S-proteini

Levilactobacillus brevis je mikroaerofilna, obligatno heterofermentativna, nesporogena, Gram-pozitivna BMK s optimalnim rastom pri 30 °C i pH 4 – 6. Obično se izolira iz mlijeka, sira, biljaka, otpadnih voda, proizvoda od žitarica, silaže, fermentiranog povrća i mesa, fecesa, usta i crijevnog trakta ljudi i štakora. Kao pripadnik *Lactobacillus* roda i zbog dugotrajne upotrebe u raznim tradicionalno fermentiranim prehrambenim proizvodima, *L. brevis* ima GRAS status. Iako nije uobičajen izbor za probiotičke proizvode, neka istraživanja navela su ga među sojevima koji se koriste u takvim proizvodima i identificirala njegova potencijalna probiotička svojstva. Većina sojeva posjeduje imunološki heterogene površinske (engl. *surface*, S) proteine s molekularnom težinom u rasponu 38 – 55 kDa (Rönkä i sur., 2003; Teixeira, 1999). Unatoč korisnim svojstvima, sojevi *L. brevis* također su prijavljeni kao uzročnici kvarenja hrane i pića, osobito piva. BMK odgovorne su za gotovo 70 % incidenata mikrobnog kvarenja piva, pri čemu je *L. brevis* posebno problematičan. Ti sojevi mogu proizvesti spojeve neugodnog mirisa, povećanu kiselost i zamućenost, što sve negativno utječe na senzorske kvalitete piva. Takvo kvarenje često zahtijeva povlačenje ili opoziv proizvoda, što dovodi do značajnih financijskih gubitaka u pivarskoj industriji (Feyereisen i sur., 2019).

Kao što je već spomenuto, sojevi *Levilactobacillus brevis* često posjeduju S-proteine. Stanične stijenke su važna strukturna komponenta u prokariotskim organizmima, igrajući vitalnu ulogu u različitim aspektima njihova preživljavanja. Različite strukture najudaljenijih graničnih slojeva ukazuju na prilagodbe organizama na različite ekološke i okolišne uvjete. Tijekom istraživanja posljednjih desetljeća, često su zabilježene površinske strukture na arhejama i bakterijama u obliku monomolekularnih kristalnih nizova proteinskih podjedinica nazvanih površinski slojevi ili S-slojevi (vidljivo na slici 1), odnosno S-proteini (Sára i Sleytr, 2000). Ovi uređeni nizovi sastoje se od podjedinica raspoređenih u tetragonalne, heksagonalne ili linearne uzorke na površini stanice. S-proteini tipično se sastoje od jedne vrste proteina ili glikoproteina s molekulskom težinom između 40 i 200 kDa. Općenito, S-proteini čine približno 5 – 10 % ukupnog sadržaja proteina u stanici, iako kod *L. brevis* sojeva oko 20 % ukupnih staničnih proteina proizvodi se i izlučuje u medij kao protein S-sloja. Visoka proizvodnja ovih proteina implicira na njihovu važnu ulogu. Smatra se da S-slojevi funkcioniraju kao zaštitne barijere protiv vanjskih i unutarnjih čimbenika, pružaju strukturnu potporu za održavanje oblika stanice i olakšavaju staničnu adheziju. Istraživanja su pokazala kako su S-proteini, osim kod *L. brevis*, tipična površinska struktura u nekoliko vrsta *Lactobacillus*, poput *L. acidophilus*, *L. helveticus*, *L. buchneri*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. bulgaricus* i *L. plantarum* (Yasui i sur., 1995). Budući da je

prisutnost S-proteina zabilježena u mnogim vrstama probiotičkih laktobacila, upravo se neka probiotička svojstva cijelih bakterija poput adhezije, agregacije ili inhibicije patogena mogu povezati s pojavom određenih vrsta S-proteina. Istraživanja su pokazala kako je uklanjanje S-proteina uzrokovalo promjenu otpornosti mikroorganizama na enzime gastrointestinalnog sustava. Neki su sojevi također većinom izgubili sposobnost agregacije i koagregacije u nedostatku S-proteina, a rezultati su pokazali da S-proteini iako nisu jedine strukture uključene u procese autoagregacije, glavni su posrednici u *Lactobacillus* vrstama. Adhezija na epitelne stanice također se pripisuje S-proteinima što je pokazano ekspresijom receptorske vezne regije S-proteina *L. brevis* u *Lactococcus lactis* koja je omogućila neadhezivnim laktokokima sposobnost prianjanja na staničnu liniju crijevnog epitela čovjeka. Isto tako, kemijsko uklanjanje S-proteina značajno je smanjilo prianjanje *L. brevis* na ljudske intestinalne stanične linije (Alp i sur., 2020; Mobili i sur., 2010).



Slika 1. Elektronska mikrografija stanice s heksagonalno uređenom rešetkom S-sloja (Sára i Sleytr, 2000)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Mikroorganizmi

Tijekom izrade ovog diplomskog rada korištene su, prethodno izolirane iz kiselog kupusa te identificirane, bakterije mliječne kiseline *Levilactobacillus brevis* SF15B i *Lactiplantibacillus plantarum* SF15C te srodne BMK i potencijalno patogeni test-mikroorganizmi. Korišteni sojevi dio su Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta.

Tablica 1. Bakterijski sojevi korišteni u izradi rada

| Bakterijski soj | Oznaka soja | Hranjiva podloga i uvjeti rasta |
|--|-------------|---------------------------------|
| <i>Levilactobacillus brevis</i> | SF15B | MRS, 37 °C, anaerobno |
| <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> | SF15C | MRS, 37 °C, anaerobno |
| <i>Enterococcus faecium</i> | 9430 | M17, 37 °C, aerobno |
| <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> | LMG 9450 | M17, 30 °C, aerobno |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | ATCC29213 | hranjivi bujon, 37 °C, aerobno |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | ATCC19111 | hranjivi bujon, 37 °C, aerobno |
| <i>Escherichia coli</i> | ATCC25922 | hranjivi bujon, 37 °C, aerobno |
| <i>Salmonella enterica</i> s. Typhimurium | FP1 | hranjivi bujon, 37 °C, aerobno |

3.1.2. Hranjive podloge

U radu su korištene sljedeće hranjive podloge:

- a) hranjive podloge za održavanje i uzgoj BMK roda *Lactobacillus*

- MRS (engl. De Man, Rogosa i Sharpe) agar, sastava (g/L destilirane vode) („Biolife“, Italija): pepton 10; mesni ekstrakt 10; kvašćev ekstrakt 5; glukoza 20; Tween 80 1; MgSO₄x7H₂O 0,1; MnSO₄x7H₂O 0,05; natrijev-acetat 5; agar 20. pH vrijednost podloge iznosi 6,5, a sterilizacija se provodi pri 121 °C tijekom 15 min.
 - MRS tekuća podloga je istog sastava kao podloga MRS agar, ali bez dodatka agara.
- b) hranjiva podloga za održavanje i uzgoj BMK roda *Lactococcus* i *Enterococcus*
- M17 bujon sastava (g/L destilirane vode) („Biolife“, Italija): tripsinski hidrolizat kazeina 2,5; pepton 2,5; sojin pepton 5,0; kvašćev ekstrakt 2,5; mesni ekstrakt 5,0; laktoza 5,0; natrijev glicerofosfat 19,0; magnezijev sulfat 0,25; askorbinska kiselina 0,5. pH vrijednost podloge iznosi 7,1.
- c) hranjiva podloga za održavanje i uzgoj test mikroorganizama
- hranjivi bujon („Biolife“, Italija), sastava (g/L destilirane vode): pepton 15; mesni ekstrakt 3; NaCl 5; K-fosfat 0,3. pH podloge je 7,3, a sterilizacija se provodi pri 121 °C tijekom 15 min.

3.1.3. Kemikalije

- destilirana voda, PBF, Hrvatska
- etanol, „Kemika“, Hrvatska
- E-testovi, M.I.C.E. Evaluators™, „Oxoid“, Velika Britanija
- etil-acetat, „Kemika“, Hrvatska
- filter-diskovi s antibioticima, „Oxoid“, Velika Britanija
- fosfatni pufer (engl. *Phosphate-buffered saline*, PBS), „Kemika“, Hrvatska
- glicerol, „Alkaloid“, Makedonija
- goveđa žuč (oxgall), „Difco“, SAD
- heksan, „PanReac Quimica“, Španjolska
- kalijev nitrat, „Kemika“, Hrvatska
- klorovodična kiselina, „Sigma-Aldrich“, SAD
- kloroform, „Carlo Erba“, Njemačka
- natrijev klorid, „Kemika“, Hrvatska

- pankreatin, „AppliChem GmbH“, Njemačka
- pepsin (P-700), „AppliChem GmbH“, Njemačka

3.1.4. Aparatura i pribor

- Anaerocult® A za anaeroban uzgoj, „Merck“, Njemačka
- automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- Bunsenov plamenik, „OMM Laboratory Equipment“, Italija
- centrifuga Centric, „Tehtnica“, Slovenija
- čitač mikrotitarskih pločica Infinite F Plex, „Tecan“, Švicarska
- epruvete 16x160 mm, „Scherf Präzision Europe GmbH“, Njemačka
- hladnjak, „Gorenje“, Slovenija
- kivete za centrifugiranje (15 mL, 50 mL), „Falcon“, Engleska
- marker za pisanje po staklu, „Edding“, Njemačka
- mikrotitarske pločice (96 jažica), „Falcon“, Engleska
- nastavci za automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- penicilinke, „Macherey-Nagel“, Njemačka
- Petrijeve zdjelice, „Golias“, Slovenija
- pincete, „Isolab“, Njemačka
- ravnalo, „Rotring“, njemačka
- stalci za epruvete, „NeoLab“, Njemačka
- termostat, „Instrumentarija“, Hrvatska
- vibro-mješač EV-100, „Kartell“, Italija

3.2. METODE

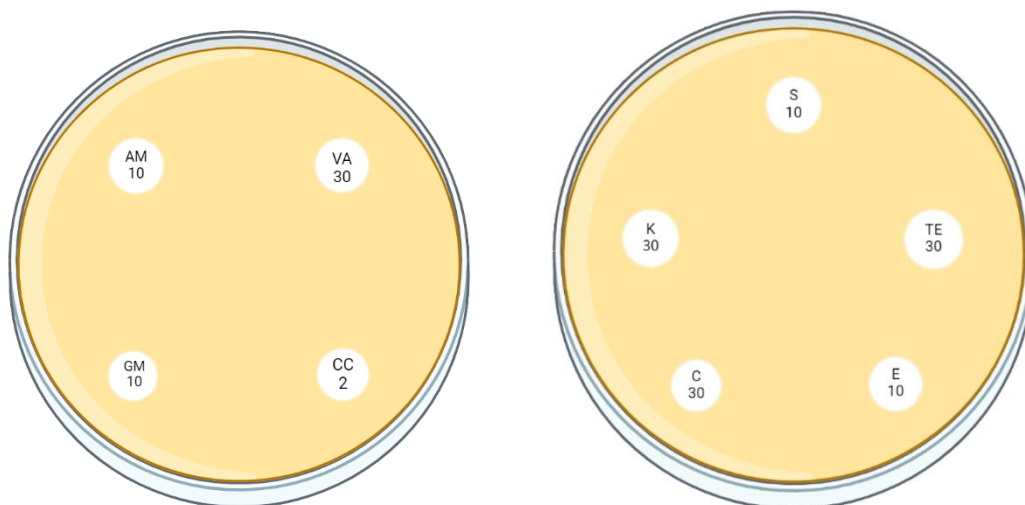
3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama

Sojevi bakterija mliječne kiseline čuvaju se pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ u MRS bujonu uz dodatak 15 % (v/v) glicerola. Dan prije izvođenja pojedinog eksperimenta, smrznute bakterijske kulture nacijspe se u hranjivu podlogu te inkubiraju pri uvjetima navedenima u tablici 1.

3.2.2. Određivanje osjetljivosti bakterija na antibiotike

a) Određivanje antibiotičke aktivnosti metodom difuzije u agar s filter diskovima

Prekonoćna bakterijska kultura (100 μL) *L. brevis* SF15B i *Lp. plantarum* SF15C inokulira se u epruvete koje sadrže 12 mL odgovarajuće krute hranjive podloge (MRS). Navedene krute hranjive podloge potrebno je prethodno otopiti i temperirati pri $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tako inokulirana podloga izlije se u Petrijeve zdjelice na čijem poklopcu je označen naziv bakterije mliječne kiseline (potrebno je prirediti po dvije Petrijeve zdjelice za svaku BMK, ukupno 4 Petrijeve zdjelice). Kad se hranjiva podloga skrutne, sterilnom pincetom nanose se filter-diskovi s antibioticima kao što je prikazano na slici 2. Nanose se sljedeći antibiotici: ampicilin, vankomicin, gentamicin, kanamicin, streptomycin, eritromicin, klindamicin, tetraciklin i kloramfenikol. Pinceta se sterilizira tako da se uroni u etanol i provuče kroz plamen. Sve Petrijeve zdjelice se inkubiraju pri optimalnim uvjetima rasta. Nakon inkubacije slijedi mjerenje promjera zona inhibicije (r), uključujući i promjer diska, koji se izražava u mm.



Slika 2. Primjer nanošenja filter-diskova s određenom koncentracijom pojedinog antibiotika na hranjivu podlogu inokuliranu s bakterijom mliječne kiseline

AM10 – ampicilin; VA30 – vankomicin; S10 – streptomycin; GM10 – gentamicin; K30 – kanamicin; CC2 – klindamicin; C30 – kloramfenikol; TE30 – tetraciklin; E15 – eritromicin

Slika izrađena pomoću BioRender.com

b) Određivanje minimalne inhibicijske koncentracije antibiotika pomoću E-testa

Prekonoćna bakterijska kultura (100 μ L) *L. brevis* SF15B i *Lp. plantarum* SF15C inokulira se u 12 mL krutog hranjivog medija (MRS agar) i razlije u označenu Petrijevu zdjelicu. Nakon što se inokulirana podloga skrutne, E-test koji sadrži gradijent koncentracije određenog antibiotika za kvantitativno očitavanje minimalne inhibicijske koncentracije (engl. *minimal inhibitory concentration*, MIC) antibiotika, položi se pomoću pincete na ohlađenu i skrutnutu hranjivu podlogu. Koriste se E-testovi s antibioticima ampicilin, vankomicin, gentamicin, kanamicin, streptomycin, eritromicin, klindamicin, tetraciklin i kloramfenikol. Petrijeve zdjelice zatim se inkubiraju pri optimalnoj temperaturi rasta ispitivanog mikroorganizma. Stavljaju se po dva E-testa na svaku petrijevu zdjelicu. Potrebno je ukupno 5 petrijevih zdjelica za svaku BMK. Sljedeći dan očitava se MIC vrijednost koja inhibira rast bakterija mliječne kiseline direktno s položene trakice s antibiotikom. Dobivene rezultate treba usporediti s vrijednostima propisanim od strane EFSA-a (2012) te interpretirati bakterijske sojeve kao osjetljive ili rezistentne.

3.2.3. Karakterizacija svojstava površine bakterijskih stanica - mikrobn adhezija na otapala

Sojevi BMK precijepljeni su u 5 mL svježeg MRS bujona i stavljeni na anaerobnu inkubaciju preko noći pri 37 °C. Ukupan volumen prekonocnih kultura prebaci se u Falcon kivete te centrifugira pri 4200 o/min tijekom 5 minuta. Supernatant se odbaci te slijedi ispiranje stanica s 5 mL sterilne destilirane vode. Isprani talog stanica resuspendira se u 9 mL 0,1 M otopine KNO₃ (pH 6,2). Tako pripremljenim suspenzijama određuje se optička gustoća na način da se po 100 µL suspenzija stanica nanese u jažice mikrotitarske pločice, nakon čega se izmjeri apsorbancija pri 620 nm pomoću uređaja Microplate Reader. Dodavanjem proračunatog volumena otopine KNO₃, optička gustoća stanica u suspenziji svake pojedine bakterijske kulture podesi se na 0,7 nakon čega se ponovnim mjerenjem provjeri postignuta optička gustoća. Izmjerena vrijednost optičke gustoće nakon podešavanja predstavlja početnu apsorbanciju (A₀). Po 3 mL tako priređenih suspenzija bakterijskih stanica prebaci se potom u tri penicilinke, dodaje im se po 1 mL pojedinog otapala (kloroform, etil-acetat, heksan) nakon čega se penicilinke miješaju na vibromješaču 90 sekundi. Penicilinke s uzorcima zatim se inkubiraju bez pomicanja pri sobnoj temperaturi tijekom 20 minuta nakon čega se pažljivo uzima 100 µL vodene faze za mjerenje apsorbancije pri 620 nm.

Postotak mikrobn adhezije na pojedino otapalo izračunava se prema formuli:

$$\text{adhezija (\%)} = (1 - A/A_0) * 100 \quad [1]$$

A₀ – početna apsorbancija bakterijske suspenzije

A – apsorbancija bakterijske suspenzije nakon miješanja s otapalom i inkubacije na sobnoj temperaturi

3.2.4. Ispitivanje preživljavanja bakterija mliječne kiseline u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta

a) Priprema suspenzija stanica bakterija mliječne kiseline

5 mL prekonocne kulture sojeva bakterija mliječne kiseline centrifugira se 5 minuta pri 4200 o/min. Bakterijske stanice isperu se s 1 mL sterilne otopine natrijevog klorida (0,5 %). To je potrebno prirediti po dva puta za svaki ispitivani soj.

b) Priprava simuliranoga želučanog soka i simuliranoga soka tankog crijeva

Simulirani želučani sok priprema se suspendiranjem pepsina (3 g/L) u 0,5 % otopini natrijevog klorida kojoj je pH podešen na 2,0 s koncentriranom kloridnom kiselinom. Simulirani sok tankoga crijeva se priprema suspendiranjem pankreatina (1 g/L), i žučnih soli (3,0 mg/mL goveđe žuči) u 0,5 % otopini natrijeva klorida, kojoj je pH podešen na 8,0 s natrijevom lužinom.

c) Preživljavanje izoliranih bakterijskih sojeva u simuliranom želučanom soku i soku tankoga crijeva

Talag bakterijskih stanica suspendira se u 5 mL simuliranog soka želuca. Broj živih stanica određuje se u simuliranom soku želuca tijekom 2 sata indirektnom metodom na način da se svakih sat vremena uzima po 100 µL uzorka, pripreme se odgovarajuća razrjeđenja i nacijepi se na MRS agar (0, 1 i 2 sat). Nakon 2 sata uzorci bakterijskih stanica centrifugiraju se i suspendiraju u 4,7 mL simuliranog soka tankog crijeva. Broj živih stanica u simuliranom soku tankoga crijeva određuje se tijekom 4 sata indirektnom metodom, na način da se svakih sat vremena uzima po 100 µL uzorka, pripreme se odgovarajuća razrjeđenja i nacijepi se na MRS agar (3., 4., 5. i 6. sat). Izračunaju se također i postotci preživljenja prema sljedećim formulama:

$$\% \text{ preživljenja} = ((\log \text{CFUN1})/(\log \text{CFUN0})) * 100 \quad [2]$$

gdje CFUN1 označava broj stanica nakon 2 sata u simuliranom želučanom soku, a CFUN0 broj stanica na samom početku te

$$\% \text{ preživljenja} = ((\log \text{CFUN2})/(\log \text{CFUN1})) * 100 \quad [3]$$

pri čemu CFUN2 označava broj stanica nakon 4 sata u simuliranom soku tankog crijeva.

d) Određivanje broja živih mikroorganizama indirektnom metodom

Iz priređenih uzoraka bakterijskih suspenzija pripreme se odgovarajuća decimalna razrjeđenja u fiziološkoj otopini (100 µL kulture u 900 µL fiziološke otopine). Petrijeve zdjelice s MRS hranjivom podlogom se nacijepe s po 10 µL odgovarajućih razrjeđenja, u dvije paralele. Nakon 48 sati inkubacije pri 37 °C, izbroje se izrasle kolonije i proračuna broj živih stanica po mililitru uzorka.

3.2.5. Ispitivanje autoagregacijskih i koagregacijskih svojstava odabaranih bakterija mliječne kiseline

a) Ispitivanje autoagregacijskih svojstava

Prekonoćne kulture sojeva bakterija mliječne kiseline (*L. brevis* SF15B i *Lp. plantarum* SF15C) uzgoje se u 10 mL MRS bujona pri 37 °C tijekom 18 sati. Stanice se centrifugiraju 5 minuta pri 4200 o/min te isperu suspendiranjem u 1 mL fosfatnog pufera (pH=7,2) i ponovnim centrifugiranjem. Nakon ispiranja stanice se suspendiraju u 20 mL pufera. 4 mL priređene suspenzije odpipetira se u penicilinku i koristi za određivanje autoagregacijskih svojstava, dok se ostatak suspenzije koristi za određivanje koagregacijskih svojstava. Suspenzija bakterijskih stanica izmješa se na vibromješaču, a zatim se određuje bakterijska autoagregacija u nultom satu i tijekom sljedećih 5 sati pri sobnoj temperaturi. Autoagregacija se određuje pipetiranjem 100 µL s vrha suspenzije bakterijskih stanica u mikrotitrsku pločicu te se očita apsorbancija pri 620 nm (kao slijepa proba koristi se 100 µL fosfatnog pufera (pH=7,2)).

Postotak autoagregacije se izračunava prema formuli:

$$\% \text{ agregacije} = (1 - A_t/A_0) * 100 \quad [4]$$

A_t – aposorbancija u vremenu t (t=5)

A_0 – apsorbancija u vremenu t=0

b) Ispitivanje koagregacijskih svojstava

Ispituje se također koagregacija bakterijskih sojeva (*L. brevis* SF15B i *Lp. plantarum* SF15C) sa srodnim bakterijama mliječne kiseline (*Ec. faecium* 9430 i *Lc. lactis* LMG 9450, *L. brevis* SF15B odnosno *L. plantarum* SF15C) te s potencijalno patogenim test-mikroorganizmima (*S. aureus* ATCC29213, *L. monocytogenes* ATCC19111, *E. coli* ATCC25922 i *Salmonella enterica* s. Typhimurium FP1) prema parovima pokazanim u tablici 2. Suspenzije srodnih BMK i test-mikroorganizma potrebno je pripremiti na način opisan za BMK, s time da se konačno resuspendiranje provodi u 10 mL fosfatnog pufera. Od toga, 4 mL suspenzija se koristi za ispitivanje autoagregacije test-mikroorganizama i srodne BMK. Za ispitivanje koagregacije, po 2 mL svakog od para bakterijskih suspenzija (ukupan volumen 4 mL) izmiješa se na vibromješaču, a zatim se određuje bakterijska koagregacija u nultom satu i tijekom sljedećih 5 sati pri sobnoj temperaturi. Uzorci se uzimaju na isti način kao i za određivanje autoagregacije, očita im se apsorbancija pri 620 nm, a postotak koagregacije se izračuna prema formuli:

$$\% \text{ koagregacije} = [(ODx + ODy)/2 - OD(x + y)]/[(ODx + ODy)/2] * 100 \quad [5]$$

gdje su x i y pojedinačne bakterijske suspenzije ispitivanog bakterijskog para, (x + y) predstavlja suspenziju ispitivanog para bakterija, a OD jest oznaka za optičku gustoću (engl. *optical density*).

Tablica 2. Prikaz parova koagregacije

| Koagregacija | |
|-----------------------------|---|
| <i>L. brevis</i> | <i>Ec. faecium</i> |
| | <i>Lc. lactis</i> |
| | <i>L. plantarum</i> |
| | <i>S. aureus</i> |
| | <i>L. monocytogenes</i> |
| | <i>E. coli</i> |
| | <i>Salmonella enterica</i> s. Typhimurium |
| <i>Lp. plantarum</i> | <i>Ec. faecium</i> |
| | <i>Lc. lactis</i> |
| | <i>S. aureus</i> |
| | <i>L. monocytogenes</i> |
| | <i>E. coli</i> |
| | <i>Salmonella enterica</i> s. Typhimurium |

3.2.6. Turbidimetrijsko određivanje brzine rasta kultura odabranih izolata pri različitim koncentracijama NaCl-a: preživljavanje *Lactobacillus* sojeva pri različitim tehnološkim stresnim uvjetima

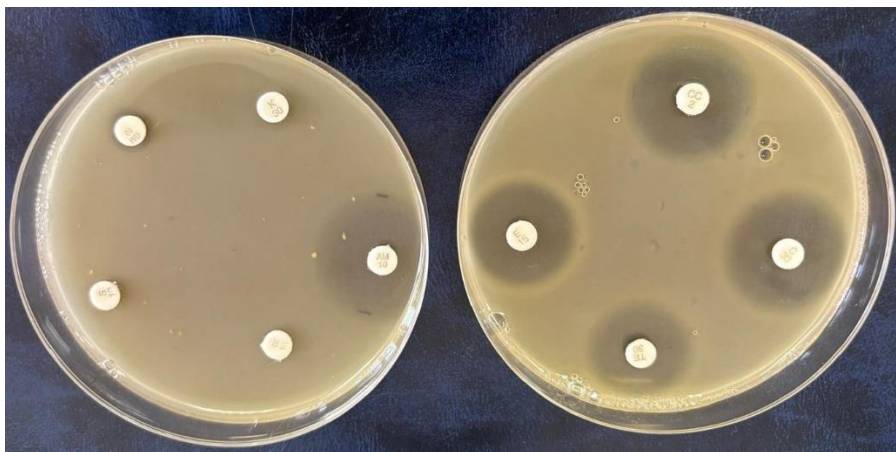
Prati se rast prekonoćnih kultura BMK u mikrotitarskim pločicama uz dodatak određene količine soli (2,5 %, 4,5 % i 6,5 % NaCl). 15 µL prekonoćnih kultura odabranih izolata nanosi se na mikrotitarsku pločicu pri čemu se prati rast BMK pri 37 °C. Kao kontrola korištene su kulture uzgojene u čistom MRS mediju. Kao slijepa proba, korišten je čisti MRS medij i MRS medij uz dodatak različitih koncentracija soli. Na mikrotitarske pločice se nanosi po 235 µL određenog medija te 15 µL prekonoćnih kultura odabranih izolata. Slijepu probu čini 235 µL medija u kojem se ispituje rast i 15 µL medija u kojem je uzgojena kultura (čisti MRS medij). Nakon nanošenja uzoraka, određuje se početna apsorbancija na čitaču mikrotitarskih pločica pri 620 nm i pločice se inkubiraju pri 37 °C. Mjerenje apsorbancije provodi se svaki drugi sat prvih 6 sati kada se bakterijske stanice nalaze u eksponencijalnoj fazi rasta te 22. i 24. sat, kada se već nalaze u stacionarnoj fazi rasta. Svi eksperimenti su ponovljeni tri puta, a na kraju se nacrtava krivulja rasta svakog bakterijskog soja.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Osjetljivost na antibiotike – izrada antibiograma

4.1.1. Određivanje antibiotičke aktivnosti metodom difuzije u agar s filter diskovima

Difuzijske metode karakterizira pasivna difuzija antibiotika u čvrstu hranjivu podlogu inokuliranu kulturom ispitivanog mikroorganizma. Osjetljivost bakterijske kulture na antibiotike koji se ispituju utvrđuje se metodom difuzije u agaru, pri čemu se na površinu agara stavljaju filter diskovi koji sadržavaju određenu koncentraciju antibiotika. Učinkovitost antibiotika kvantificira se mjerenjem promjera zona inhibicije koje okružuju diskove, što odražava stupanj supresije rasta bakterija. Primjeri zona inhibicije mogu se vidjeti na slici 3.



Slika 3. Zone inhibicije nastale difuzijom ispitivanih antibiotika u hranjivu podlogu inokuliranu sojem SF15C (*vlastita fotografija*)

Tablica 3. Rezultati mjerenja promjera zona inhibicije u milimetrima

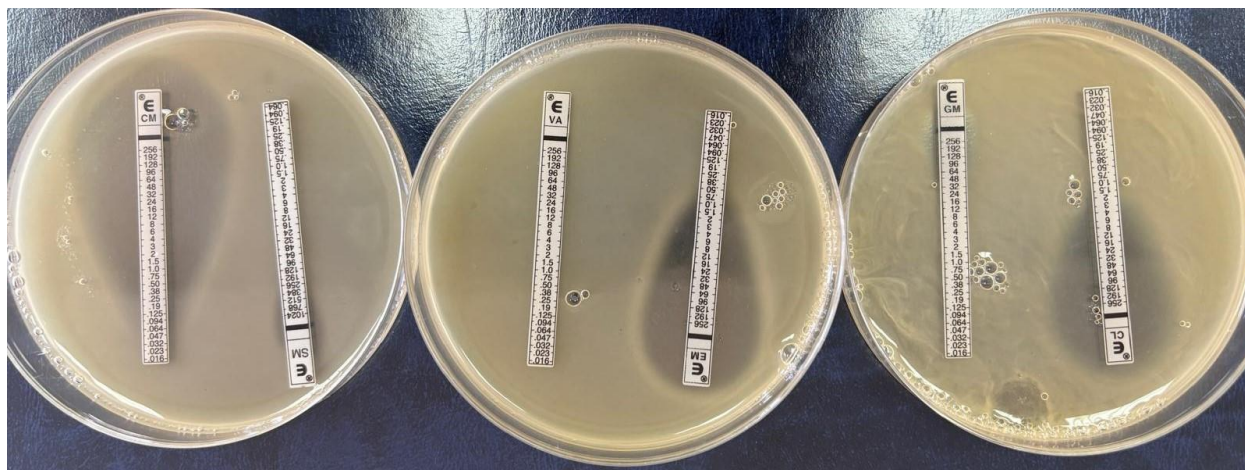
| Soj | Antibiotik | | | | | | | | |
|--------------|------------|------|-----|------|-----|-----|-----|------|-----|
| | AM10 | VA30 | S10 | GM10 | K30 | CC2 | C30 | TE30 | E15 |
| SF15B | 30 | 0 | 0 | 12 | 8 | 25 | 26 | 25 | 25 |
| SF15C | 27 | 0 | 0 | 7 | 0 | 25 | 26 | 20 | 21 |

AM10 – ampicilin; VA30 – vankomicin; S10 – streptomycin; GM10 – gentamicin; K30 – kanamicin; CC2 – klindamicin; C30 – kloramfenikol; TE30 – tetraciklin; E15 – eritromicin

Zone inhibicije predstavljaju područja gdje djelovanje antibiotika suzbija rast bakterija. Veći promjer zone ukazuje na veću osjetljivost bakterija na antibiotik, dok manje zone ukazuju na smanjenu osjetljivost. Na temelju rezultata prema tablici 3, sojevi SF15B i SF15C pokazali su slične obrasce osjetljivosti na testirane antibiotike. Prema standardima Instituta za kliničke i laboratorijske studije (engl. *Clinical Laboratory Standards Institute*, CLSI), bakterijski sojevi smatraju se osjetljivima ako zona inhibicije iznosi 20 mm ili više, umjereno osjetljivima ukoliko je zona inhibicije između 15 i 19 mm, dok se sojevi sa zonama manjim ili jednakim od 14 mm smatraju rezistentnima na antibiotik koji se nalazi na filter disku. Na ampicilin, klindamicin, kloramfenikol, tetraciklin i eritromicin oba soja pokazuju osjetljivost, dok su rezistentni na vankomicin, streptomycin, gentamicin i kanamicin. Istraživanje Anisimove i Yarulline (2019) gdje su ispitivani *L. brevis* i nekoliko sojeva *Lp. plantarum* pokazalo je jednake rezultate.

4.1.2. Određivanje minimalne inhibicijske koncentracije antibiotika pomoću E-testa

Slično kao i u metodi difuzije u agar s filter diskovima, na inokulirane, skrtnute podloge stavljaju se trakice, odnosno E-testovi koji sadrže gradijent koncentracije određenog antibiotika. Pomoću njih određuje se MIC, odnosno najniža koncentracija antibiotika koja inhibira rast bakterija, koja se očitava također pomoću nastalih zona inhibicije prikazanih na slici 4.



Slika 4. Zone inhibicije nastale djelovanjem antibiotika pomoću E-testova na hranjivoj podlozi inokuliranoj sojem SF15C (*vlastita fotografija*)

Tablica 4. Usporedba rezultata dobivenih mjerenjem MIC antibiotika za soj SF15B i graničnih vrijednosti prema EFSA-i (2012)

| Antibiotik | Rezultat (µg/mL) | EFSA (µg/mL) | Osjetljivost |
|------------|------------------|---------------|--------------|
| GM | 12 | 16 | osjetljiv |
| CL | 1,50 | 4 | osjetljiv |
| EM | 0,125 | 1 | osjetljiv |
| VA | nema inhibicije | nema zahtjeva | / |
| CM | 0,016 | 1 | osjetljiv |
| SM | 384 | 64 | otporan |
| AM | 0,032 | 2 | osjetljiv |
| KM | nema inhibicije | 32 | otporan |
| TC | 0,38 | 8 | osjetljiv |

GM – gentamicin; CL – kloramfenikol; EM – eritromicin; VA – vankomicin; CM – klindamicin; SM – streptomycin; AM – ampicilin; KM – kanamicin; TC – tetraciklin

Tablica 5. Usporedba rezultata dobivenih mjerenjem MIC antibiotika za soj SF15C i graničnih vrijednosti prema EFSA-i (2012)

| Antibiotik | Rezultat (µg/mL) | EFSA (µg/mL) | Osjetljivost |
|------------|------------------|---------------|--------------|
| GM | 48 | 16 | otporan |
| CL | 1,50 | 8 | osjetljiv |
| EM | 0,50 | 1 | osjetljiv |
| VA | nema inhibicije | nema zahtjeva | / |
| CM | 0,047 | 2 | osjetljiv |
| SM | 384 | nema zahtjeva | / |
| AM | 0,023 | 2 | osjetljiv |
| KM | nema inhibicije | 64 | otporan |

U svrhu razlikovanja rezistentnih od osjetljivih sojeva, panel za aditive i proizvode ili tvari koje se koriste u hrani za životinje (engl. *The Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed*, FEEDAP) definira mikrobiološke granične vrijednosti. Mikrobiološke granične vrijednosti postavljaju se proučavanjem distribucije MIC-a odabranih antibiotika u bakterijskim populacijama koje pripadaju jednoj taksonomskoj jedinici (vrsti ili rodu). Dio populacije koji jasno odstupa od normalno osjetljive populacije kategorizira se kao rezistentan.

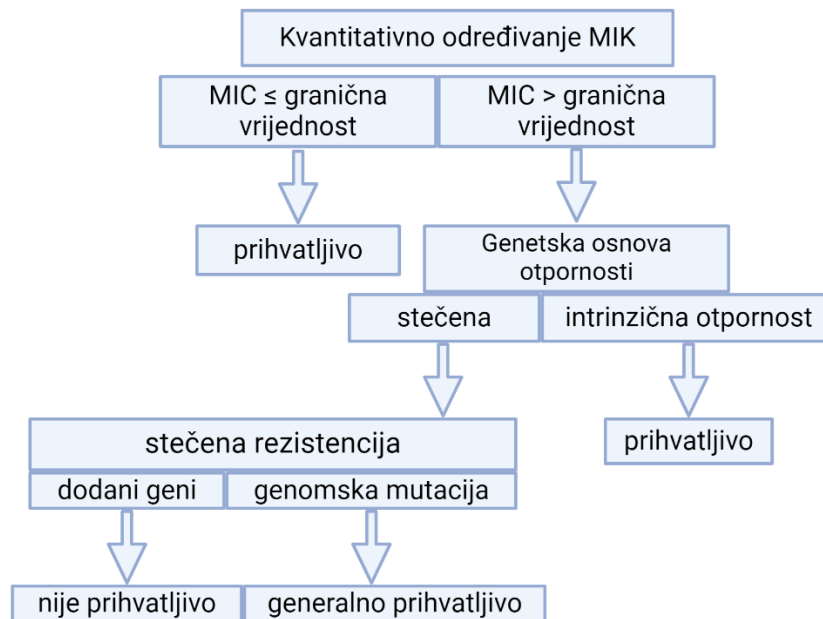
Sukladno tomu prema EFSA-i, sojevi se mogu kategorizirati kao osjetljivi ili otporni na antimikrobna sredstva na sljedeći način:

- osjetljiv (S): bakterijski soj definira se kao osjetljiv kada je inhibiran pri koncentraciji specifičnog antibiotika koja je jednaka ili niža od utvrđene granične vrijednosti ($S \leq x \mu\text{g/mL}$);
- otporan (R): bakterijski soj definiran je kao otporan kada nije inhibiran pri koncentraciji specifičnog antibiotika višoj od utvrđene granične vrijednosti ($R > x \mu\text{g/mL}$).

Prema tablicama 4 i 5 se može zaključiti kako su sojevi uglavnom osjetljivi na ispitivane antibiotike i prikladni za uporabu kao dodaci stočnoj hrani. U slučajevima gdje sojevi pokazuju rezistenciju na određene antibiotike, kao što je slučaj sa streptomycinom i kanamicinom kod soja SF15B te gentamicinom i kanamicinom kod soja SF15C, najprije se mora utvrditi genetska osnova otpornosti (slika 5). FEEDAP panel (EFSA, 2012) nalaže sljedeće:

- bilo koji bakterijski soj koji nosi intrinzičnu otpornost na antimikrobna sredstva predstavlja minimalan potencijal horizontalnog širenja i stoga se može koristiti kao dodatak stočnoj hrani;
- bilo koji bakterijski soj koji nosi stečenu rezistenciju na antimikrobna sredstva za koju se pokazalo da je posljedica kromosomske mutacije ima nizak potencijal horizontalnog širenja i općenito se može koristiti kao dodatak stočnoj hrani;
- bilo koji bakterijski soj koji nosi stečenu rezistenciju na antimikrobna sredstva za koju se pokazalo da je posljedica stjecanja genetske determinante predstavlja najveći potencijal za horizontalno širenje i ne bi se trebao koristiti kao dodatak stočnoj hrani;
- u nedostatku informacija o genetskoj prirodi pokazane otpornosti, soj se ne smije koristiti kao dodatak stočnoj hrani.

Druga istraživanja pokazala su slične rezultate. U istraživanju Kwon i sur. (2021) ispitivani sojevi *Lp. plantarum* pokazali su također osjetljivost na kloramfenikol, eritromicin, klindamicin i ampicilin, ali i na gentamicin te kanamicin. Nadalje, Torres-Maravilla i sur. (2023) testirali su soj *L. brevis* koji je pokazao osjetljivost na gentamicin, kanamicin, streptomycin, eritromicin, klindamicin i tetraciklin, a rezistenciju na ampicilin i kloramfenikol.



Slika 5. Prijedlog sheme za procjenu antimikrobne rezistencije bakterijskog soja koji se koristi kao dodatak stočnoj hrani (prema EFSA, 2012)

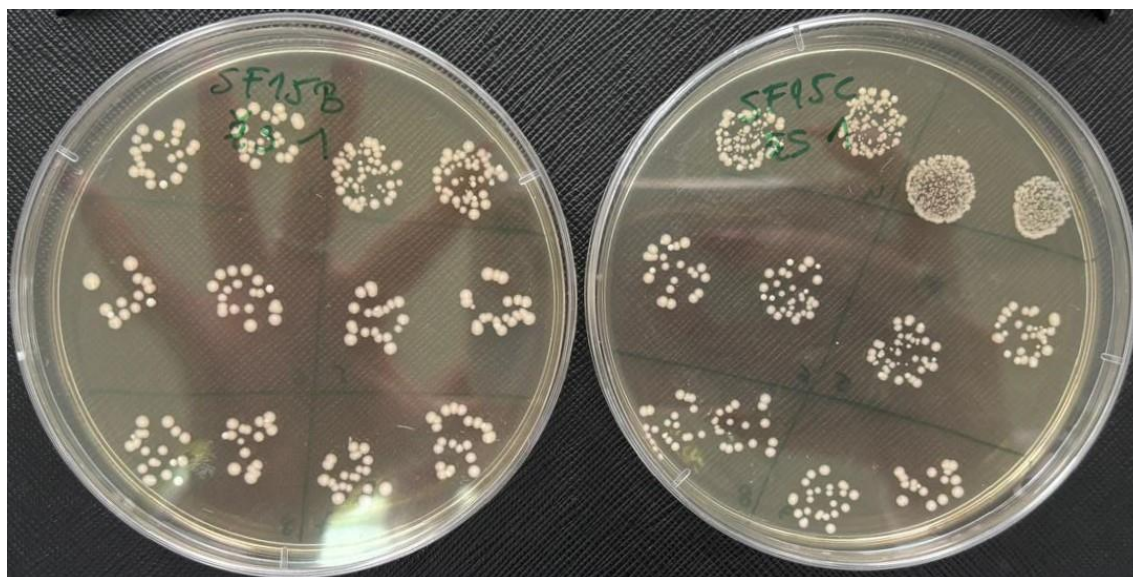
Raširena uporaba antibiotika u terapijske, profilaktičke svrhe i svrhe poticanja rasta u uzgoju stoke značajno je pridonijela širenju otpornosti na antibiotike (Rahman i sur., 2022). Probiotičke bakterije u idealnom bi slučaju trebale biti osjetljive na uobičajeno korištene antibiotike kako bi se smanjio rizik od prijenosa gena za otpornost na antibiotike na patogene bakterije u gastrointestinalnom traktu. Horizontalni prijenos gena, gdje se geni za otpornost na antibiotike prenose između bakterija, mogao bi pogoršati globalno javnozdravstveno pitanje otpornosti na antibiotike (Mathur i Singh, 2005). Testiranje osjetljivosti potencijalnih probiotičkih bakterija na antibiotike ključno je za sprječavanje širenja rezistencije na antibiotike, osiguravanje sigurnosti terapijskih primjena i usklađenost s regulatornim standardima.

4.2. Ispitivanje preživljavanja bakterija mliječne kiseline u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta

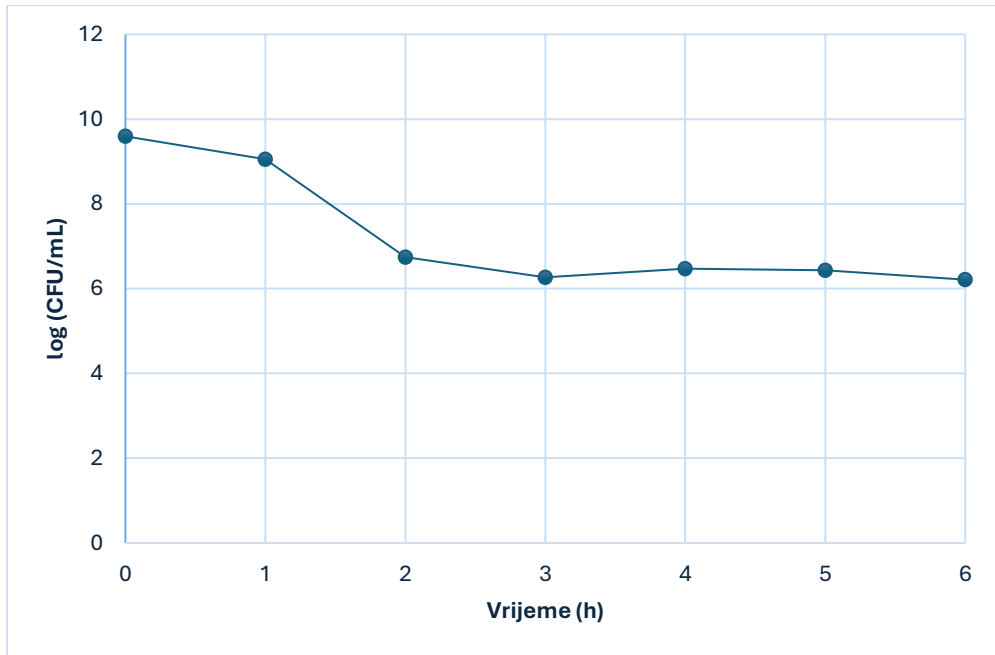
Da bi se kvalificirao kao probiotik, mikroorganizam mora zadovoljiti stroge kriterije specifične za probiotičku funkcionalnost. Primarni zahtjev jest sposobnost preživljavanja prolaska kroz gastrointestinalni (GI) trakt, što je bitno za kasniju adheziju na crijevni epitel, ispoljavanje antimikrobnih učinaka i stimuliranje imunološkog odgovora (Javanshir i sur., 2021). Primarni je

izazov za mikroorganizme u želucu izloženost niskom pH i pepsinu. Uz to, potencijalni probiotički sojevi moraju pokazati sposobnost preživljavanja i proliferacije u prisutnosti 0,15 – 0,30 % žučnih soli, odražavajući koncentracije koje se tipično nalaze u ljudskom dvanaesniku (Ahmad i sur., 2024).

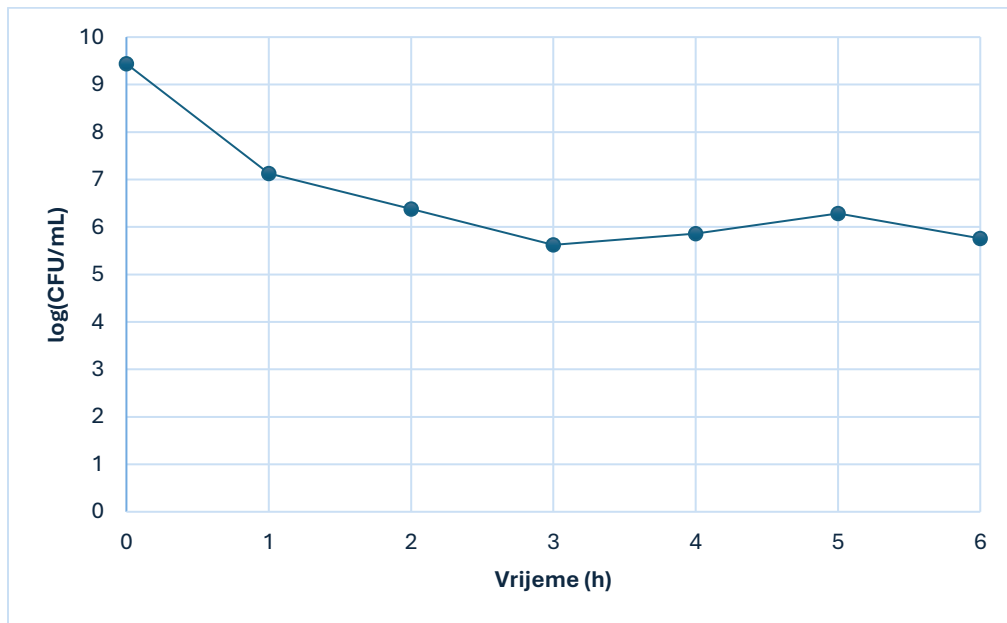
Eksperiment se provodi tijekom 6 sati pri čemu 0., 1. i 2. sat simuliraju preživljavanje u želučanom soku, a 3., 4., 5. i 6. preživljavanje u soku tankog crijeva. Broj živih stanica određuje se indirektnom metodom tako što se priređuju odgovarajuća razrjeđenja i nacjepljuju na MRS agar u dvije paralele te inkubiraju 48 sati. Nakon inkubacije izbroje se izrasle kolonije i proračuna broj živih stanica po mililitru uzorka. Primjer poraslih kolonija vidljiv je na slici 6, a dobiveni rezultati na slikama 7 i 8.



Slika 6. Porasle kolonije sojeva SF15B i SF15C nakon jednog sata u simuliranim uvjetima želučanog soka (*vlastita fotografija*)



Slika 7. Preživljavanje soja SF15C u simuliranim uvjetima želučanog soka i soka tankog crijeva tijekom 6 sati



Slika 8. Preživljavanje soja SF15B u simuliranim uvjetima želučanog soka i soka tankog crijeva tijekom 6 sati

Prema ovom istraživanju, *Lp. plantarum* SF15C pokazuje sposobnost preživljavanja u simuliranom želučanom soku (pH 2,0 3 g/L pepsina tijekom 2 sata) u postotku od 70,29 %, odnosno 92,12 % u simuliranom soku tankog crijeva (pH 8,0 3 g/L Oxygall i 1 g/L pankreatin 4 tijekom 4 sata). Kim i sur. (2021) postigli su rezultate od 97 % preživljenja (pH 2,5 3 g/L pepsina tijekom 3 sata) za simulirani želučani sok, ali 75 % za simulirano tanko crijevo (3 g/L Oxygall tijekom 24 sata). S druge strane, u istraživanju Nguyen i sur. (2020) preživljenje nakon 3 sata u simuliranom želučanom soku (pH 2,0 3 g/L pepsin) bilo je svega 48 %, iako je postotak preživljenja u simuliranom tankom crijevu (pH 7,0 1 g/L pankreatin) bio viši, s postotkom od 96 %.

Preživljenje *L. brevis* SF15B u simuliranom želučanom soku u ovom istraživanju (pH 2,0 3 g/L pepsin tijekom 2 sata) iznosi 67,60 %, odnosno 90,27 % za simulirano tanko crijevo (pH 8,0 3 g/L Oxygall i 1 g/L pankreatin tijekom 4 sata). Istraživanje Kocabay (2023) pokazalo je slične rezultate sa 72 % preživljenja u simuliranom želučanom soku (pH 2,0 3 g/L Oxygall tijekom 5 sati) te 70 % za simulirani sok tankog crijeva (pH 8,0 1 g/L tripsin tijekom 4 sata). Druga istraživanja davala su rezultate u rasponu 94 – 100 % za simulirani želučani sok (pH 2,5 3 g/L pepsin tijekom 3 sata) i 98 – 106 % za simulirano tanko crijevo (3 g/L Oxygall tijekom 24 sata) (Kim i sur., 2021; Yang i sur., 2020).

Prilikom ulaska u želudac probiotičke bakterije izložene su vrlo kiselim uvjetima želučanog soka koji je letalan za većinu bakterija, pogotovo one koje nemaju otpornost na kiselinu. Prolazak kroz želudac može trajati između 5 minuta pa do 2 sata, izlažući probiotike značajnom stresu, uključujući visoku kiselost i ionsku snagu, aktivnim probavnim enzimima poput pepsina i mehaničkom miješanju. U tankom crijevu dolazi do neutralizirajućeg učinka crijevnog soka kojem je pH između 6,0 i 7,5, puno blaži od želučanog soka. Međutim, žučne kiseline te razni probavni enzimi poput lipaze, amilaze i proteaze također mogu utjecati na održivost probiotika (Han i sur., 2021). Ispitivani sojevi u ovom istraživanju pokazali su dobru otpornost na surove uvjete želučanog soka i žuči u GI traktu, međutim kako bi se povećala dodatno tolerancija, probiotici se mogu obložiti dodatnim zaštitnim omotačem, odnosno mikrokapsulirati.

4.3. Karakterizacija svojstava površine bakterijskih stanica - mikrobnna adhezija na otapala

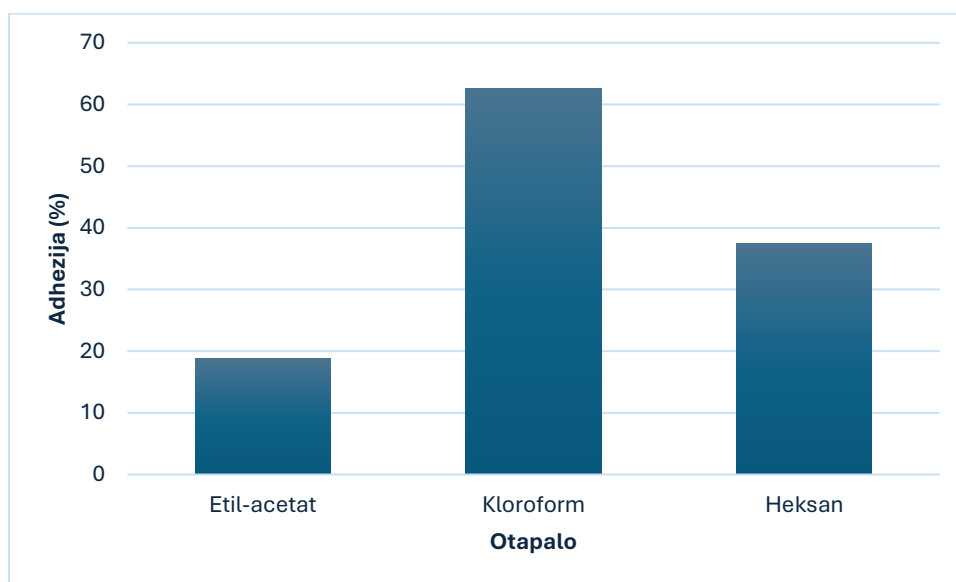
Ispitivanje mikrobne adhezije na otapala (engl. *Microbial adhesion to solvents*, MATS) koristi se za procjenu površinskih svojstava mikrobnih stanica usporedbom njihovog afiniteta za

nepolarna i monopolarna otapala. Ova metoda omogućuje karakterizaciju hidrofobnih, bazičnih (elektron-donorskih) i kiselih (elektron-akceptorskih) svojstava površine mikrobnog stanice. Površinska svojstva stanica igraju ključnu ulogu u interakcijama stanica-okoliš, značajno utječući na potencijal za stvaranje mikrobnog biofilma te sposobnost koloniziranja GI trakta.

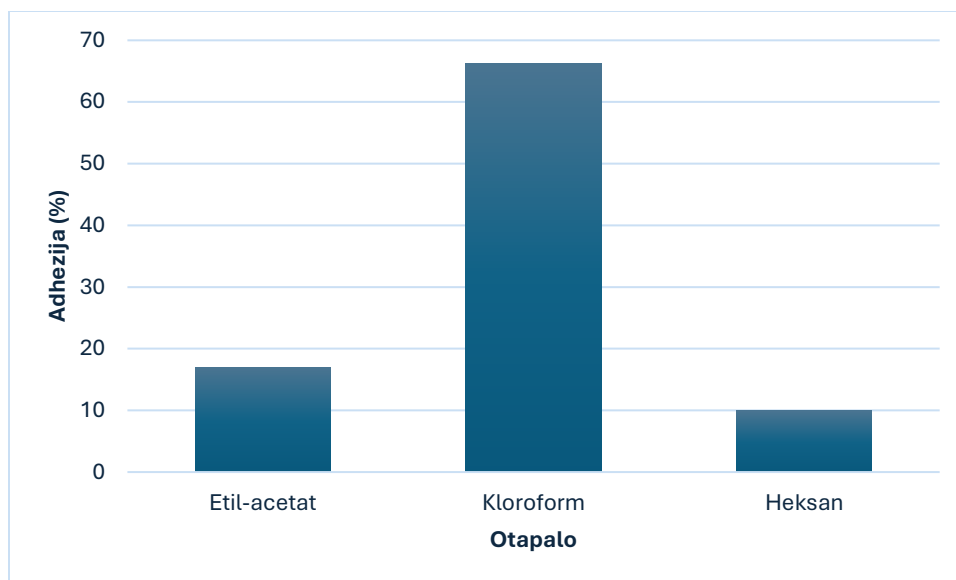
Za određivanje svojstava površine bakterijskih stanica korištena su otapala:

- kloroform – otapalo akceptor elektrona
- etil-acetat – otapalo donor elektrona
- heksan – nepolarno otapalo

Dobiveni rezultati prikazani su grafički na slikama 9 i 10.



Slika 9. Postotak adhezije *L. brevis* SF15B na ispitivana otapala



Slika 10. Postotak adhezije *Lp. plantarum* SF15C na ispitivana otopala

Mikrobna adhezija na heksan kao nepolarno otopalo odraz je hidrofobnosti stanične površine što je poželjno zbog poticanja prijanjanja na hidrofobne površine crijevnog epitela i kolonizacije GI trakta; mikrobna adhezija na kloroform (akceptor elektrona) ukazuje na bazična (elektron-donorska) svojstva, a mikrobna adhezija na etil-acetat (donor elektrona) upućuje na kisela (elektron-akceptorska) svojstva površine ispitivanih bakterijskih stanica.

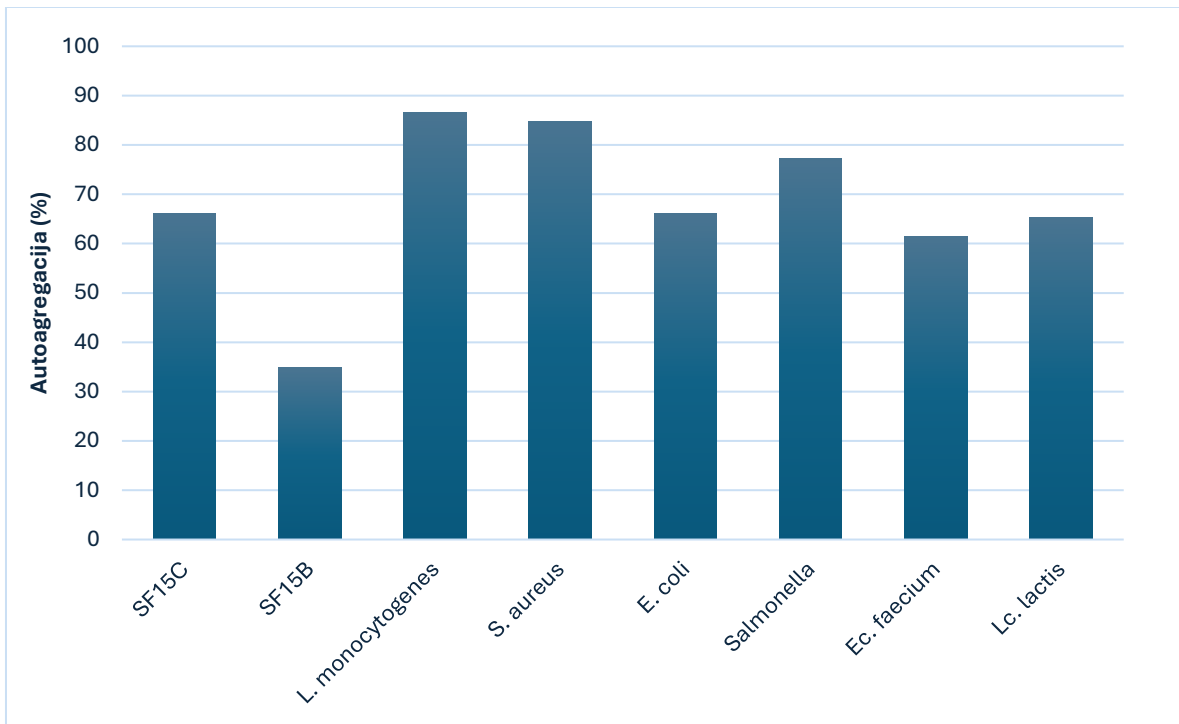
Površina se smatra relativno hidrofobnom kada je postotak veći od 50 %, a relativno hidrofilnom u suprotnom slučaju (Zanane i sur., 2023). Prema tome, obje površine ispitivanih sojeva ne pokazuju hidrofobna svojstva, pri čemu SF15C pokazuje znatno manju hidrofobnost s postotkom adhezije manjim od 10 %, nasuprot SF15B koji posjeduje S-proteine te pokazuje svojstvo adhezije u postotku od 37,43 %. Oba soja pokazuju veliki afinitet prema kloroformu (više od 60 %) što ukazuje na to da su stanične površine negativno nabijene. Sličan su afinitet sojevi pokazali i prema etil-acetatu koji pokazuje prisutnost pozitivnog naboja na površini stanice, 17,01 % za SF15C te 18,74 % za SF15B. Prema tome, može se zaključiti da oba soja imaju hidrofilniju i uglavnom negativno nabijenu površinu. Istraživanje Kocabay (2023) također pokazuje nižu hidrofobnost *L. brevis* s afinitetom prema heksanu nešto većim od 20 %, a prema Wu i sur. (2023) *Lp. plantarum* pokazao je afinitet prema kloroformu 34,48 %, prema etil-acetatu 18,11 % te hidrofobnost u rasponu 4 – 45 % u istraživanju Leska i sur. (2022).

Sojevi identificirani kao probiotici moraju pokazati sposobnost adhezije na epitelne stanice sluznice, stanične linije, a također ih treba karakterizirati sposobnost smanjenja prijanjanja

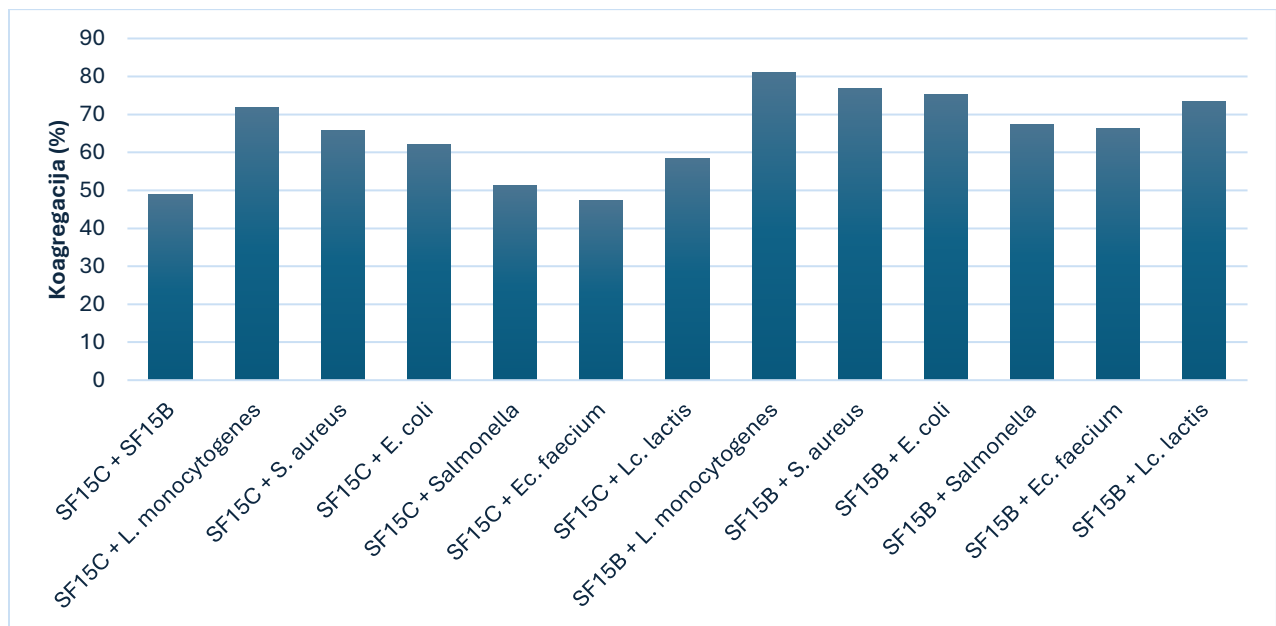
patogenih mikroorganizama na površinu stanice domaćina (FAO/WHO, 2002). Adhezija na crijevne epitelne stanice važan je preduvjet za kolonizaciju probiotičkih sojeva u gastrointestinalnom traktu, sprječavajući njihovu neposrednu eliminaciju peristaltikom i osiguravajući konkurentsku prednost u tom ekosustavu (Kos i sur., 2003). To je složen proces na koji utječu površinska svojstva bakterijske stanice, karakteristike materijala na koji se bakterija veže, kao i faktori iz okoline. U tom procesu sudjeluju različite slabe, nespecifične fizikalno-kemijske interakcije (elektrostatske, van der Waalsove, vodikove i hidrofobne interakcije), ali i specifične interakcije između liganda i receptora (Banić, 2021). Adhezija povećava sposobnost probiotičkih bakterija da koloniziraju crijeva, inhibiraju patogene mikroorganizme, stimuliraju imunološki sustav, stvaraju zaštitne biofilmove i te podržavaju zdravlje crijeva.

4.4. Ispitivanje autoagregacijskih i koagregacijskih svojstava odabaranih bakterija mliječne kiseline

Adhezija na crijevni epitel i kolonizacija gastrointestinalnog trakta ključne su odlike probiotičkih bakterija, uz njihovu sposobnost preživljavanja u teškim uvjetima GI sustava. Početni korak u kolonizaciji uključuje adheziju probiotičkih sojeva na epitelne stanice crijeva. Kolonizacija se postiže kada bakterijska populacija ostaje stalno prisutna u GI traktu bez potrebe za ponovljenom oralnom primjenom, što ukazuje da reprodukcija bakterija odgovara stopi njihovog fizičkog uklanjanja iz sustava (Han i sur., 2021). Obično se smatra da je soj probiotika uspješno kolonizirao GI trakt ako se može izdvojiti iz fekalnih uzoraka sedam dana nakon oralnog uzimanja. Agregacija bakterijskih stanica igra ključnu ulogu u olakšavanju adhezije i kolonizacije. Agregacija se odnosi na reverzibilno grupiranje stanica, što im omogućuje da se nasele u okolnom mediju. Autoagregacija se događa kada se stanice istog bakterijskog soja agregiraju, dok se koagregacija odnosi na grupiranje stanica iz različitih bakterijskih sojeva (Zawistowska-Rojek i sur., 2022b). Dobiveni rezultati auto- i koagregacije vidljivi su na slikama 11 i 12.



Slika 11. Rezultati autoagregacije ispitivanih sojeva



Slika 12. Rezultati koagregacije ispitivanih sojeva

Najveći postotak autoagregacije pokazuju *L. monocytogenes* i *S. aureus* (86,60 % i 84,70 %). Prema ovom radu, *Lp. plantarum* SF15C autoagregira u postotku od 66,09 %, a *L. brevis* SF15B u postotku od 34,85 % što je iznenađujuće s obzirom da je *L. brevis* skloniji posjedovanju S-proteina na površini stanice koji pomažu u autoagregaciji stanica, međutim i ostala istraživanja davala su razne rezultate. *Lp. plantarum* postizao je vrijednosti autoagregacije 8 – 20 % (Zawistowska-Rojek i sur., 2022b), 16 % (Dell'Anno i sur., 2021), te 41 % i 57,5 % (Darmastuti i sur., 2021). S druge strane, prema Hojjati i sur. (2020) *L. brevis* autoagregirao je u postotku od 40 %, 34 % prema Barzegar i sur. (2023) te 99 % prema ben Taheur i sur. (2016).

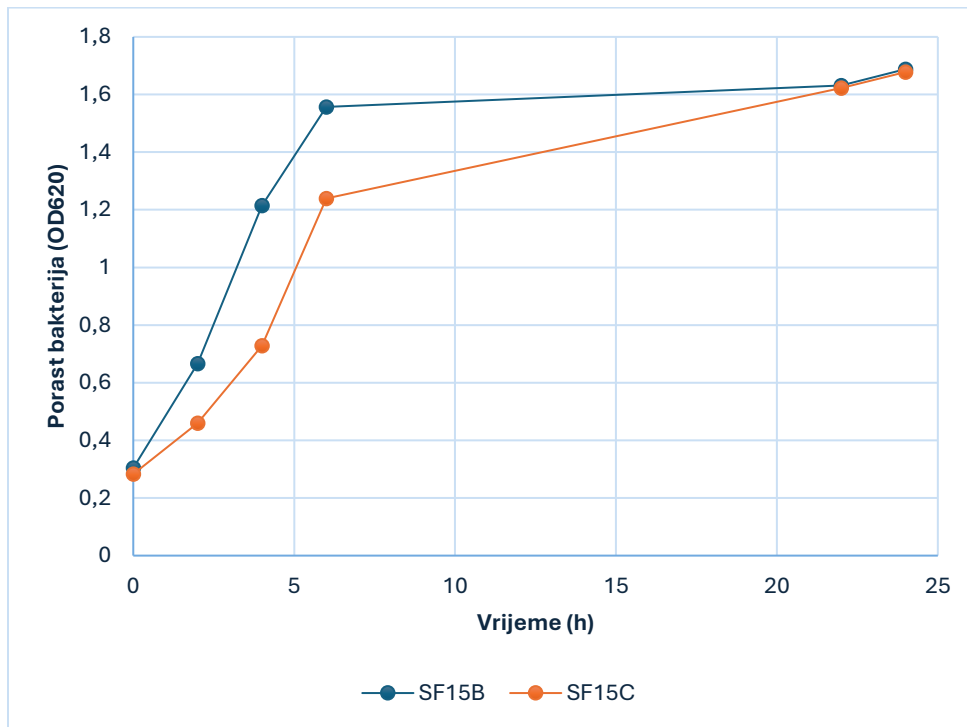
Najbolju koagregaciju pokazali su SF15B i *L. monocytogenes* (80,97 %), najslabiju SF15C i *Ec. faecium* (47,31 %), a potom SF15B i SF15C (48,89 %). Oba soja pokazala su jednake afinitete prema istim testiranim bakterijama. Generalno, SF15B bolje je koagregirao s ispitivanim bakterijama što je moguće upravo zbog postojanja S-proteina, iako su oba soja pokazala visoku koagregaciju što ide u prilog njihovom ispitivanom probiotičkom djelovanju.

Autoagregacija je ključna jer olakšava stvaranje bakterijskih zajednica, uključujući biofilmove, koji služe kao zaštita koja podržava preživljavanje i razmnožavanje bakterija. Unutar ovih biofilmove, probiotičke bakterije dobivaju poboljšanu zaštitu od nepovoljnih uvjeta, kao što je kiseli pH želuca, prisutnost žučnih soli u crijevima i obrambeni mehanizmi imunološkog sustava domaćina. Autoagregirane bakterijske stanice pokazuju poboljšanu adheziju na crijevnu sluznicu, potičući učinkovitiju kolonizaciju gastrointestinalnog trakta i doprinoseći dugoročnoj postojanosti i funkcionalnosti probiotičkih sojeva (Trunk i sur., 2018).

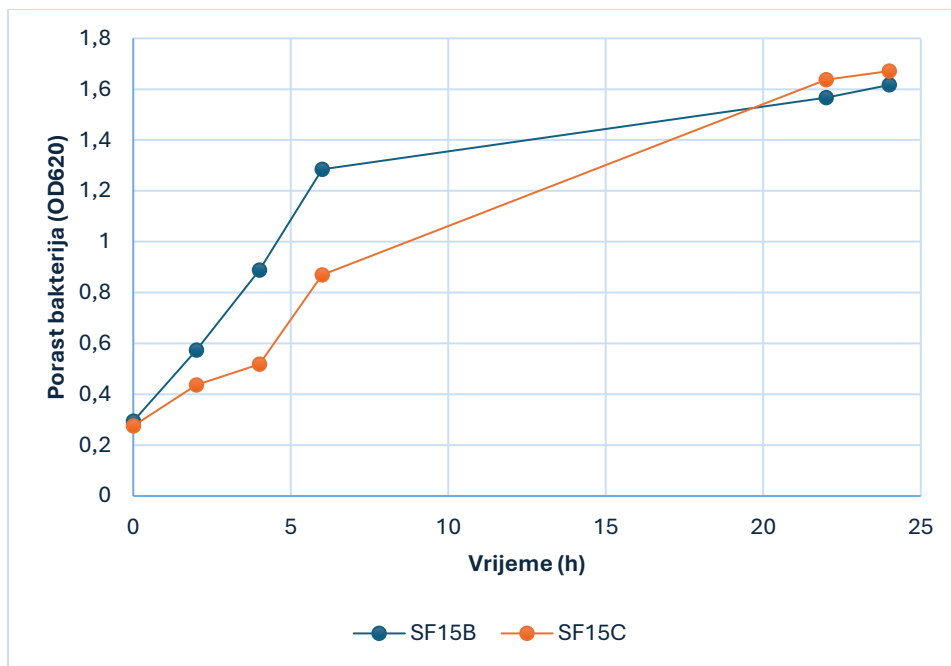
Koagregacija igra ključnu ulogu u kompetitivnim interakcijama između probiotika i patogenih mikroorganizama. Kada probiotičke bakterije agregiraju s patogenima, one sprječavaju sposobnost patogena da prijanjaju na crijevni epitel stvaranjem fizičkih asocijacija. Ovo vezanje učinkovito smanjuje sposobnost patogena da uspostave kolonizaciju unutar GI trakta, čime se ograničava njihova proliferacija i pridonosi prevenciji infekcije. Koagregacija tako pojačava ulogu probiotika u održavanju zdravlja crijeva nadmetanjem štetnih mikroba za mjesta prijanjanja i stvaranjem zaštitne barijere protiv patogene kolonizacije (Collado i sur., 2008).

4.5. Preživljavanje *Lactobacillus* sojeva pri različitim koncentracijama NaCl-a

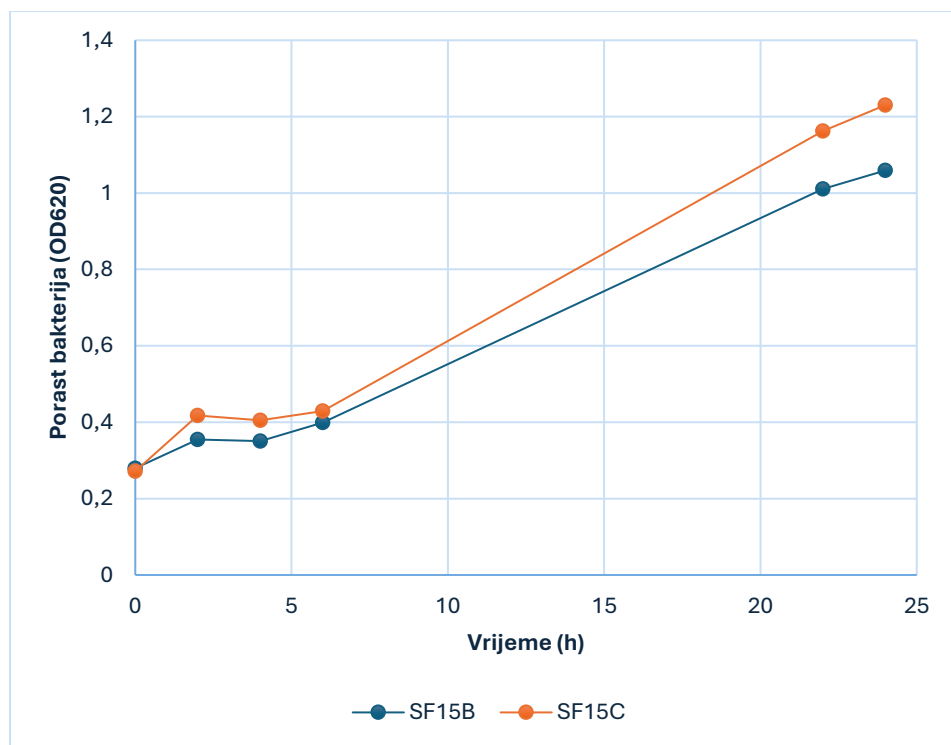
Da bi probiotici bili korisni za ljudsko zdravlje, moraju ostati održivi u velikom broju tijekom daljnje obrade, unutar prehrambenog proizvoda i tijekom prolaska kroz GI trakt, gdje se susreću sa stresnim uvjetima kao što su kiselost, slanoća, osmotski tlak i temperaturne fluktuacije. Sposobnost probiotičkih stanica da izdrže ove okolišne stresore može se poboljšati prilagodbom na uvjete koji nisu optimalni (Bisson i sur., 2021). Procjena krivulje rasta turbidimetrijom predstavlja jednostavnu i brzu metodu za procjenu učinka parametara okoliša na rast mikroorganizama. Dobivene krivulje vidljive su na slikama 13 – 16.



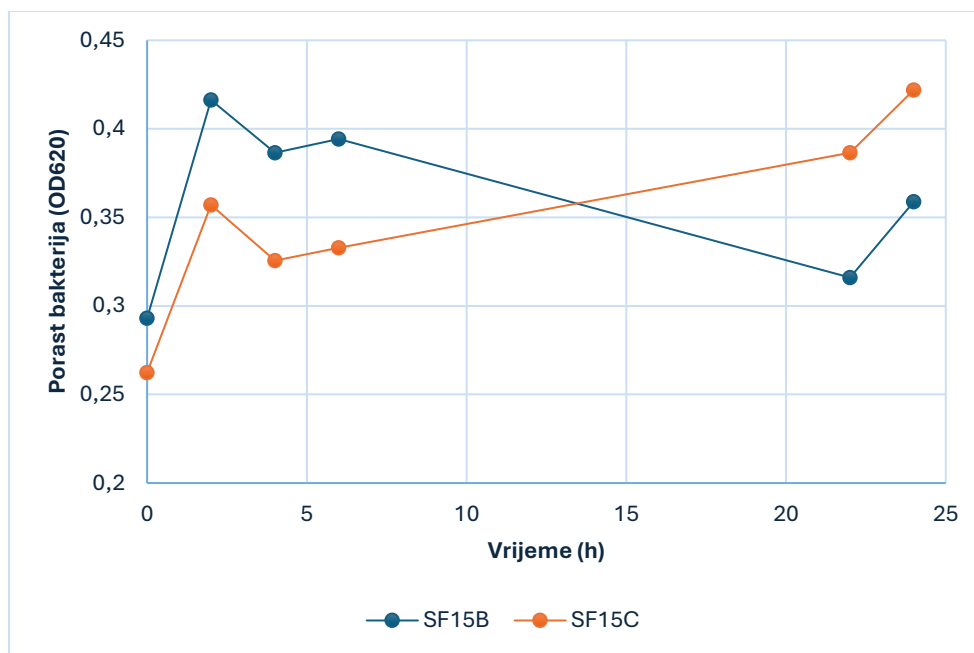
Slika 13. Krivulje rasta sojeva SF15B i SF15C u slijepoj probi (MRS)



Slika 14. Krivulje rasta sojeva SF15B i SF15C uz dodatak 2,5 % NaCl



Slika 15. Krivulje rasta sojeva SF15B i SF15C uz dodatak 4,5 % NaCl



Slika 16. Krivulje rasta sojeva SF15B i SF15C uz dodatak 6,5 % NaCl

Lp. plantarum SF15C i *L. brevis* SF15B pokazuju slične profile rasta u različitim dodanim koncentracijama NaCl-a. U usporedbi sa slijepom probom u MRS-u, koncentracija NaCl-a od 2,5 % zanemarivo je utjecala na rast ispitivanih sojeva s time da je SF15B u prvih 20 sati davao bolje rezultate. Koncentracija od 4,5 % pokazala je vrlo sličan uzorak rasta, pri čemu je SF15C imao nešto veći porast. Znatno slabiji rast zabilježen je dodatkom NaCl-a u koncentraciji od 6,5 % kod oba soja. Sposobnost ovih bakterija mliječne kiseline da izdrže povišene uvjete NaCl-a naglašava njihov potencijal kao starter kultura za proizvodnju fermentiranih proizvoda gdje se takve koncentracije soli često susreću tijekom obrade. U istraživanju Oh i sur. (2020) *Lp. plantarum* pokazao je rast u koncentracijama NaCl-a do 8 %, a *L. brevis* čak i u koncentracijama do 10 % (Singh i sur., 2020).

BMK često se koriste kao starter kulture u fermentiranim proizvodima. U mnogim fermentiranim prehrambenim proizvodima, poput kiselih krastavaca, kiselog kupusa i određenih mliječnih proizvoda, NaCl koristi se za kontrolu rasta mikroba, okusa i teksture. BMK moraju biti u stanju preživjeti i ostati metabolički aktivne u tim okruženjima s visokim sadržajem soli kako bi se izvršila fermentacija (Sionek i sur., 2023). Njihova sposobnost toleriranja različitih koncentracija NaCl-a osigurava dosljednu fermentaciju, što dovodi do proizvodnje željenih okusa, tekstura i inhibicije organizama koji uzrokuju kvarenje.

5. ZAKLJUČCI

1. Sojevi *Levilactobacillus brevis* SF15B i *Lactiplantibacillus plantarum* SF15C pokazali su slične obrasce reakcije prema testiranim antibioticima koristeći filter diskove. Veći promjer zona inhibicije kod ampicilina, klindamicina, kloramfenikola, tetraciklina i eritromicina ukazuje na osjetljivost oba soja na ove antibiotike, dok manje zone ili izostanak inhibicije za vankomicin, streptomycin, gentamicin i kanamicin sugeriraju njihovu otpornost. Koristeći E-test, sojevi SF15B i SF15C pokazali su osjetljivost na većinu ispitivanih antibiotika, međutim otpornost SF15B na streptomycin i kanamicin te SF15C na gentamicin i kanamicin zahtijeva dodatnu provjeru genetske osnove otpornosti.
2. Rezultati istraživanja pokazali su kako sojevi *Lp. plantarum* SF15C i *L. brevis* SF15B imaju dobru sposobnost preživljavanja u simuliranim uvjetima želučanog soka i soka tankog crijeva s time da dodatna zaštita putem mikrokapsulacije može poboljšati njihovu stabilnost i učinkovitost u gastrointestinalnom traktu.
3. Rezultati MATS-a ukazuju na hidrofилne površine kod oba soja, pri čemu SF15C ima značajno nižu hidrofobnost. Oba soja iskazala su snažan afinitet prema kloroformu, što ukazuje na većinski negativan naboj stanične površine, dok slabiji afinitet prema etil-acetatu sugerira prisutnost pozitivnog naboja.
4. *Lp. plantarum* SF15C pokazao je bolje svojstvo autoagregacije nego *L. brevis* SF15B unatoč prisutnosti S-proteina kod SF15B. Oba soja pokazala su značajnu koagregaciju sa srodnim BMK i potencijalno patogenim test-mikroorganizmima, posebno SF15B.
5. Turbidimetrijskim određivanjem brzine rasta, ispitivani sojevi pokazali su sličan rast u prisutnosti različitih koncentracija NaCl-a, uz minimalan utjecaj koncentracije od 2,5 %, nešto slabiji rast pri 4,5 %, a znatno smanjen rast pri 6,5 %.

6. LITERATURA

Abdelazez A, Heba A, Zhu ZT, Fang-Fang J, Sami R, Zhang LJ i sur. (2018) Potential benefits of *Lactobacillus plantarum* as probiotic and its advantages in human health and industrial applications: A review. *Adv Environ Biol* **12**(1). <https://doi.org/10.22587/aeb.2018.12.1.4>

Ahmad I, Rabbi F, Alam F (2024) Metabolic disorders. U: Hammad U, Abdur R, Maria D (ured.) *Nutraceuticals: A Holistic Approach to Disease Prevention*, De Gruyter, Berlin/Boston, str. 167-192. <https://doi.org/10.1515/9783111317601-008>

Alp D, Kuleaşan H, Korkut Altıntaş A (2020) The importance of the S-layer on the adhesion and aggregation ability of Lactic acid bacteria. *Mol Biol Rep* **47**(5), 3449–3457. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05430-6>

Anisimova EA, Yarullina DR (2019) Antibiotic Resistance of *Lactobacillus* Strains. *Curr Microbiol* **76**, 1407–1416. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01769-7>

Ayivi RD, Gyawali R, Krastanov A, Aljaloud SO, Worku M, Tahergorabi R (2020) Lactic Acid Bacteria: Food Safety and Human Health Applications. *Dairy* **1**(3), 202-232. <https://doi.org/10.3390/dairy1030015>

Banić M (2021) Potencijalne terapijske biomolekule probiotičkih sojeva autohtonih bakterija mliječne kiseline (doktorski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Barzegar H, Alizadeh Behbahani B, Mirzaei A, Ghodsi Sheikhjan M (2023) Assessing the protection mechanisms against *Enterobacter aerogenes* by analyzing aggregation, adherence, antagonistic activity, and safety properties of potentially probiotic strain *Lactobacillus brevis* G145. *Microb Pathogenesis* **181**, 106175. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.106175>

ben Taheur F, Kouidhi B, Fdhila K, Elabed H, ben Slama R, Mahdouani K (2016) Anti-bacterial and anti-biofilm activity of probiotic bacteria against oral pathogens. *Microb Pathogenesis* **97**, 213–220. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.06.018>

Binda S, Hill C, Johansen E, Obis D, Pot B, Sanders ME (2020) Criteria to Qualify Microorganisms as “Probiotic” in Foods and Dietary Supplements. *Front Microbiol* **11**. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01662>

Bisson G, Marino M, Poletti D, Innocente N, Maifreni M (2021) Turbidimetric definition of growth limits in probiotic *Lactobacillus* strains from the perspective of an adaptation strategy. *J Dairy Sci* **104**(12), 12236–12248. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20888>

Cammarota G, Ianiro G, Bibbò S, Gasbarrini A (2014) Gut microbiota modulation: probiotics, antibiotics or fecal microbiota transplantation? *Intern Emerg Med* **9**, 365–373. <https://doi.org/10.1007/s11739-014-1069-4>

Carr FJ, Chill D, Maida N (2002) The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. *Crc Cr Rev Microbiol* **28**(4), 281–370. <https://doi.org/10.1080/1040-840291046759>

Choi WJ, Dong HJ, Jeong HU, Ryu DW, Song SM, Kim Yr i sur. (2020) *Lactobacillus plantarum* LMT1-48 exerts anti-obesity effect in high-fat diet-induced obese mice by regulating expression of lipogenic genes. *Sci Rep* **10**(1), 869. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57615-5>

Chong ESL (2014) A potential role of probiotics in colorectal cancer prevention: review of possible mechanisms of action. *World J Microbiol Biotechnol* **30**(2), 351–374. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1499-6>

Collado MC, Meriluoto J, Salminen S (2008) Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *Eur Food Res Technol* **226**, 1065–1073. <https://doi.org/10.1007/s00217-007-0632-x>

Darmastuti A, Hasan PN, Wikandari R, Utami T, Rahayu ES, Suroto DA (2021) Adhesion Properties of *Lactobacillus plantarum* Dad-13 and *Lactobacillus plantarum* Mut-7 on Sprague Dawley Rat Intestine. *Microorganisms* **9**(11), 2336. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112336>

Dell'Anno M, Giromini C, Reggi S, Cavalleri M, Moscatelli A, Onelli E (2021) Evaluation of Adhesive Characteristics of *L. plantarum* and *L. reuteri* Isolated from Weaned Piglets. *Microorganisms* **9**(8), 1587. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081587>

EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) (2012) Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA Journal* **10**(6), 2740. <https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/consultation/120323.pdf> Pristupljeno 24. listopada 2024.

- Feyereisen M, Mahony J, Kelleher P, Roberts RJ, O'Sullivan T, Geertman JMA i sur. (2019) Comparative genome analysis of the *Lactobacillus brevis* species. *BMC Genomics* **20**(1), 416. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5783-1>
- Gou HZ, Zhang YL, Ren LF, Li ZJ, Zhang L (2022) How do intestinal probiotics restore the intestinal barrier? *Fronti Microbiol* **13**. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.929346>
- Guimarães A, Santiago A, Teixeira A, Venâncio A, Abrunhosa L (2018) Anti-aflatoxigenic effect of organic acids produced by *Lactobacillus plantarum*. *Int J Food Microbiol* **264**, 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.025>
- Gupta A, Singh V, Mani I (2022) Dysbiosis of human microbiome and infectious diseases. U: Das B, Singh V (ured.) *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, Academic Press, Cambridge/San Diego/Oxford/London, str. 33–51.
- Han S, Lu Y, Xie J, Fei Y, Zheng G, Wang Z i sur. (2021) Probiotic Gastrointestinal Transit and Colonization After Oral Administration: A Long Journey. *Front Cell Infect Mi* **11**. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.609722>
- Hati S, Mandal S, Prajapati J (2013) Novel Starters for Value Added Fermented Dairy Products. *Curr Res Nutr Food Sci* **1**(1), 83–91. <https://doi.org/10.12944/CRNFSJ.1.1.09>
- Hojjati M, Behabehani BA, Falah F (2020) Aggregation, adherence, anti-adhesion and antagonistic activity properties relating to surface charge of probiotic *Lactobacillus brevis* gp104 against *Staphylococcus aureus*. *Microb Pathogenesis* **147**, 104420. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104420>
- Huang CH, Lin YC, Jan TR (2017) *Lactobacillus reuteri* induces intestinal immune tolerance against food allergy in mice. *J Funct Foods* **31**, 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.01.034>
- Javanshir N, Hosseini GNG, Sadeghi M, Esmaeili R, Satarikia F, Ahmadian G i sur. (2021) Evaluation of the Function of Probiotics, Emphasizing the Role of their Binding to the Intestinal Epithelium in the Stability and their Effects on the Immune System. *Biol Proced Online* **23**, 23. <https://doi.org/10.1186/s12575-021-00160-w>
- Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food (2002) <https://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-11121000-Iyakushokuhinkyoku-Soumuka/0000197343.pdf> Pristupljeno 24. listopada 2024.

- Kaźmierczak-Siedlecka K, Daca A, Folwarski M, Witkowski JM, Bryl E, Makarewicz W (2020) The role of *Lactobacillus plantarum* 299v in supporting treatment of selected diseases. *Cent Eur J Immunol* **45**(4), 488–493. <https://doi.org/10.5114/ceji.2020.101515>
- Kechagia M, Basoulis D, Konstantopoulou S, Dimitriadi D, Gyftopoulou, K, Skarmoutsou N (2013) Health Benefits of Probiotics: A Review. *ISRN Nutrition* **2013**, 1–7. <https://doi.org/10.5402/2013/481651>
- Khalfallah G, Gartzzen R, Möller M, Heine E, Lütticken R (2021) A New Approach to Harness Probiotics Against Common Bacterial Skin Pathogens: Towards Living Antimicrobials. *Probiotics Antimicro* **13**(6), 1557–1571. <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09783-7>
- Kim KT, Yang SJ, Paik HD (2021) Probiotic properties of novel probiotic *Levilactobacillus brevis* KU15147 isolated from radish kimchi and its antioxidant and immune-enhancing activities. *Food Sci Biotechnol* **30**, 257–265. <https://doi.org/10.1007/s10068-020-00853-0>
- Kocabay, S (2023) Evaluation of probiotic properties of *Levilactobacillus brevis* isolated from hawthorn vinegar. *Arch Microbiol* **205**, 258. <https://doi.org/10.1007/s00203-023-03599-5>
- König H, Fröhlich J (2017) Lactic Acid Bacteria. U: König H, Uden G, Fröhlich J (ured.) *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*, 2. izd., Springer, str. 3–41. https://doi.org/10.1007/978-3-319-60021-5_1
- Kos B, Šušković J, Vuković S, Šimpraga M, Frece J, Matošić S (2003) Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J App Microb* **94**(6), 981–987. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01915.x>
- Kwon YJ, Chun BH, Jung HS, Chu J, Joung H, Park SY i sur. (2021) Safety Assessment of *Lactiplantibacillus* (formerly *Lactobacillus*) *plantarum* Q180. *J Microbiol Biotech* **31**(10), 1420–1429. <https://doi.org/10.4014/jmb.2106.06066>
- Latif A, Shehzad A, Niazi S, Zahid A, Ashraf W, Iqbal MW i sur. (2023) Probiotics: mechanism of action, health benefits and their application in food industries. *Front Microbiol* **14**. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1216674>
- Lee NK, Kim SY, Han KJ, Eom SJ, Paik HD (2014) Probiotic potential of *Lactobacillus* strains with anti-allergic effects from kimchi for yogurt starters. *LWT - Food Sci Technol* **58**(1), 130–134. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.02.028>

- Leska A, Nowak A, Czarnecka-Chrebelska KH (2022) Adhesion and Anti-Adhesion Abilities of Potentially Probiotic Lactic Acid Bacteria and Biofilm Eradication of Honeybee (*Apis mellifera* L.) Pathogens. *Molecules* **27**(24), 8945. <https://doi.org/10.3390/molecules27248945>
- Li H, Liu F, Lu J, Shi J, Guan J, Yan F (2020) Probiotic Mixture of *Lactobacillus plantarum* Strains Improves Lipid Metabolism and Gut Microbiota Structure in High Fat Diet-Fed Mice. *Front Microbiol* **11**. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00512>
- Li Q, Zeng X, Fu H, Wang X, Guo X, Wang M (2023) *Lactiplantibacillus plantarum*: A comprehensive review of its antifungal and anti-mycotoxic effects. *Trends Food Sci Tech* **136**, 224–238. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.04.019>
- Mathur S, Singh R (2005) Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. *Int J Food Microb* **105**(3), 281–295. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.008>
- Mobili P, Gerbino E, Tymczyszyn EE, Gómez-Zavaglia A (2010) S-layers in lactobacilli: structural characteristics and putative role in surface and probiotic properties of whole bacteria. *Curr Res Technol Educ Top Appl Microbiol Microb Biotechnol* **22**, 1224-1234.
- Nguyen TH, Kim Y, Kim J-S, Jeong Y, Park HM, Kim JW (2020) Evaluating the Cryoprotective Encapsulation of the Lactic Acid Bacteria in Simulated Gastrointestinal Conditions. *Biotechnol Bioproc E* **25**(2), 287–292. <https://doi.org/10.1007/s12257-019-0406-x>
- Oelschlaeger TA (2010) Mechanisms of probiotic actions – A review. *Int J Med Microbiol* **300**(1), 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2009.08.005>
- Oh YJ, Kim TS, Moon HW, Lee SY, Lee SY, Ji GE i sur. (2020) *Lactobacillus plantarum* PMO 08 as a Probiotic Starter Culture for Plant-Based Fermented Beverages. *Molecules* **25**(21), 5056. <https://doi.org/10.3390/molecules25215056>
- Owaga EE, Elbakkoush AA, Sakhile KS, Lupia R (2014) Antiallergic Effects of Probiotic *Lactobacilli* - Cellular and Molecular Mechanisms. *J Microbiol Res* **4**, 92-97. doi: 10.5923/j.microbiology.20140402.08
- Puebla-Barragan S, Reid, G (2021) Probiotics in Cosmetic and Personal Care Products: Trends and Challenges. *Molecules* **26**(5), 1249. <https://doi.org/10.3390/molecules26051249>
- Rahman M, Fliss I, Biron E (2022) Insights in the Development and Uses of Alternatives to Antibiotic Growth Promoters in Poultry and Swine Production. *Antibiotics* **11**(6), 766. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11060766>

- Rönkä E, Malinen E, Saarela M, Rinta-Koski M, Aarnikunnas J, Palva A (2003) Probiotic and milk technological properties of *Lactobacillus brevis*. *Int J Food Microbiol* **83**(1), 63–74. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00315-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00315-X)
- Sankarapandian V, Venmathi Maran BA, Rajendran RL, Jogalekar MP, Gurunagarajan S, Krishnamoorthy R (2022) An Update on the Effectiveness of Probiotics in the Prevention and Treatment of Cancer. *Life* **12**(1), 59. <https://doi.org/10.3390/life12010059>
- Sára M, Sleytr UB (2000) S-Layer Proteins. *J Bacteriol* **182**(4), 859–868. <https://doi.org/10.1128/JB.182.4.859-868.2000>
- Singh V, Ganger S, Patil S (2020) Characterization of *Lactobacillus brevis* with Potential Probiotic Properties and Biofilm Inhibition against *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings* **66**(1), 14. <https://doi.org/10.3390/proceedings2020066014>
- Sionek B, Szydłowska A, Küçükğöz K, Kołożyn-Krajewska D (2023) Traditional and New Microorganisms in Lactic Acid Fermentation of Food. *Fermentation* **9**(12), 1019. <https://doi.org/10.3390/fermentation9121019>
- Teixeira P (1999) *Lactobacillus: Lactobacillus brevis* U: Robinson RK, Batt CA, Patel PD, (ured.) Encyclopedia of Food Microbiology, Academic Press, London, str. 1136–1144. <https://doi.org/10.1006/rwfm.1999.0900>
- Thakkar PN, Modi HA, Prajapati J (2016) Therapeutic Impacts of Probiotics - as Magic Bullet. *Ame J Biomed Sci* **8**(2), 97–113. <https://doi.org/10.5099/aj160200097>
- Torres-Maravilla E, Boucard A, Al Azzaz J, Gontier S, Kulakauskas S, Langella P i sur. (2023) Assessment of the safety of *Levilactobacillus brevis* CNCM I-5321, a probiotic candidate strain isolated from pulque with anti-proliferative activities. *Benef Microbes* **14**(4), 335-348. <https://doi.org/10.1163/18762891-20230004>
- Trunk T, Khalil HS, Leo JC (2018) Bacterial autoaggregation. *AIMS Microbiology* **4**(1), 140–164. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.1.140>
- Vitali Čepo D, Filipović I (2014) Terapijska primjena i sigurnost probiotika. *Farmaceutski glasnik* **70**(10), 651-668. <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:874289>
- Wu S, Chen Y, Chen Z, Zhou Q, Wei F, Li P i sur. (2023) Antioxidant properties and molecular mechanisms of *Lactiplantibacillus plantarum* ZJ316: A potential probiotic resource. *LWT* **187**, 115269. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115269>

- Yamane T, Sakamoto T, Nakagaki T, Nakano Y (2018) Lactic Acid Bacteria from Kefir Increase Cytotoxicity of Natural Killer Cells to Tumor Cells. *Foods* **7**(4), 48. <https://doi.org/10.3390/foods7040048>
- Yang SJ, Kim K-T, Kim TY, Paik H-D (2020) Probiotic Properties and Antioxidant Activities of *Pediococcus pentosaceus* SC28 and *Levilactobacillus brevis* KU15151 in Fermented Black Gamju. *Foods* **9**(9) 1154. <https://doi.org/10.3390/foods9091154>
- Yasui T, Yoda K, Kamiya T (1995) Analysis of S-layer proteins of *Lactobacillus brevis*. *FEMS Microbiol Lett*, **133**(1–2), 181–186. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07881.x>
- Yilmaz B, Bangar SP, Echegaray N, Suri S, Tomasevic I, Manuel Lorenzo J i sur. (2022) The Impacts of *Lactiplantibacillus plantarum* on the Functional Properties of Fermented Foods: A Review of Current Knowledge. *Microorganisms* **10**(4), 826. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040826>
- Zanane C, Mitro S, Mazigh D, Lekchiri S, Hakim T, el Louali M (2023) Characterization of Streptomyces Cell Surface by the Microbial Adhesion to Solvents Method. *Int J Microbiol* **2023**, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2023/8841509>
- Zawistowska-Rojek A, Kośmider A, Stępień K, Tyski S (2022b) Adhesion and aggregation properties of *Lactobacillaceae* strains as protection ways against enteropathogenic bacteria. *Arch Microbiol* **204**, 285. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-02889-8>
- Zawistowska-Rojek A, Zaręba T, Tyski S (2022a) Microbiological Testing of Probiotic Preparations. *Int J Env Res Pub He* **19**(9), 5701. <https://doi.org/10.3390/ijerph19095701>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Korina Bezić 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.

Vlastoručni potpis