

Utjecaj S-proteina na potencijalna probiotička svojstva bakterija mliječne kiseline izoliranih iz majčinog mlijeka

Zrinjan, Andrea

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:548720>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-14**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2021.

Andrea Zrinjan

1424/USH

**UTJECAJ S-PROTEINA NA
POTENCIJALNA PROBIOTIČKA
SVOJSTVA BAKTERIJA
MLIJEČNE KISELINE
IZOLIRANIH IZ MAJČINOG
MLIJEKA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Andreje Leboš Pavunc te uz pomoć dr. sc. Martine Banić i Nine Čuljak, mag. ing. biotechn.

Ovaj diplomski rad izrađen je u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost „*Probiotici i starter kulture – površinski proteini i bakteriocini*“ (IP-2014-09-7009) kojeg je voditeljica prof. dr. sc. Blaženka Kos.

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: Prehrambena tehnologija

UTJECAJ S-PROTEINA NA POTENCIJALNA PROBIOTIČKA SVOJSTVA BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE IZOLIRANIH IZ MAJČINOG MLIJEKA

Andrea Zrinjan, 1424/USH

Sažetak: Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj S-proteina, koje eksprimiraju 4 *Lactobacillus brevis* soja (MB1, MB2, MB13 i MB20) izolirana iz majčinog mlijeka, na njihova potencijalna probiotička svojstva. Kompetitivna ekskluzija bakterije *E. coli* 3014 s navedenim sojevima ispitana je in vitro primjenom Caco-2 stanične linije, a svojstvo koagregacije s patogenim bakterijama *Listeria monocytogenes* ATCC 19111, *Staphylococcus aureus* 3048, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FP1 i *E. coli* 3014. Nakon uklanjanja S-proteina sa stanične površine ispitivanih sojeva BMK smanjena je uspješnost kompetitivne ekskluzije patogene bakterije, kao i sposobnost autoagregacije i koagregacije s ispitivanim patogenim bakterijama. Osim navedenog, uklanjanje S-proteina utjecalo je na smanjenu sposobnost preživljavanja *Lactobacillus* sojeva u simuliranim uvjetima želučanog soka i soka tankog crijeva.

Ključne riječi: majčino mlijeko, bakterije mliječne kiseline, probiotici, S-proteini

Rad sadrži: 49 stranica, 12 slika, 7 tablica, 71 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: doc. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc

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

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Jagoda Šušković
2. doc. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc
3. prof. dr. sc. Jasna Mrvčić
4. prof. dr. sc. Ksenija Markov (zamjena)

Datum obrane: rujna 2021.

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 Cultures Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

THE INFLUENCE OF S-LAYER PROTEINS ON POTENTIAL PROBIOTIC PROPERTIES OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM BREAST MILK

Andrea Zrinjan, 1424/USH

Abstract: *The aim of this study was to examine the influence of S-layer proteins from 4 Lactobacillus brevis strains (MB1, MB2, MB13 and MB20) isolated from breast milk on their potential probiotic properties. The competitive exclusion of E. coli 3014 with Lactobacillus strains was examined in vitro on Caco-2 cell line. The coaggregation ability was examined using pathogens Listeria monocytogenes ATCC 19111, Staphylococcus aureus 3048, Salmonella enterica serovar Typhimurium FP1 and E. coli 3014. The competitive exclusion activity of LAB strains was significantly decreased after the removal of S-layer proteins from their cell surface, as well as the autoaggregation and the coaggregation ability with the examined pathogenic bacteria. Also, the removal of S-layer proteins from Lactobacillus strains reduced their viability in simulated gastric and small intestinal juices.*

Keywords: *breast milk, lactic acid bacteria, probiotics, S-layer proteins*

Thesis contains: 49 pages, 12 figures, 7 tables, 71 references

Original in: Croatian

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

Mentor: *PhD. Andreja Leboš Pavunc, Assistant professor*

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

Reviewers:

1. PhD. *Jagoda Šušković*, Full professor
2. PhD. *Andreja Leboš Pavunc*, Assistant professor
2. PhD. *Jasna Mrvčić*, Full professor
4. PhD. *Ksenija Markov*, Full professor (substitute)

Thesis defended: September 2021.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE	2
2.1.1. Taksonomija bakterija mliječne kiseline.....	2
2.1.2. Primjena bakterija mliječne kiseline u industriji	3
2.1.3. Metabolizam bakterija mliječne kiseline	4
2.1.4. Majčino mlijeko kao izvor bakterija mliječne kiseline.....	6
2.2. PROBIOTICI	7
2.2.1. Definicija probiotika	7
2.2.2. Mehanizam djelovanja probiotika	9
2.2.3. Učinak probiotika na ljudsko zdravlje	11
2.3. S-SLOJ	12
2.3.1. Građa S-sloja	12
2.3.2. Funkcije S-sloja	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.1. MATERIJALI	17
3.1.1. Radni mikroorganizmi	17
3.1.2. Stanične linije	17
3.1.3. Hranjive podloge	17
3.1.4. Kemikalije	18
3.1.5. Aparatura i pribor	19
3.2. METODE.....	20
3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama i staničnih linija.....	20
3.2.3. Izolacija genomske DNA	20
3.2.4. Ispitivanje osjetljivosti bakterija izoliranih iz majčinog mlijeka na antibiotike	21
3.2.5. Uklanjanje S-proteina s površine bakterijskih sojeva.....	22
3.2.6. Ispitivanje kompetitivne ekskluzije patogenih bakterija sa sojevima BMK primjenom Caco-2 stanične linije	23
3.2.7. Ispitivanje agregacijskih svojstava BMK izoliranih iz majčinog mlijeka	24
3.2.8. Preživljavanje probiotičkih bakterija u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta (GIT)	25
4. REZULTATI I RASPRAVA	27

4.1. OSJETLJIVOST NA ANTIBIOTIKE BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE IZOLIRANIH IZ MAJČINOG MLIJEKA	27
4.2. UTJECAJ S-PROTEINA NA POTENCIJALNA PROBIOTIČKA SVOJSTVA BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE IZOLIRANIH IZ MAJČINOG MLIJEKA.....	34
5. ZAKLJUČCI	41
6. LITERATURA	42

1. UVOD

Bakterije mliječne kiseline (BMK) su široko rasprostranjena skupina mikroorganizama, koja osim što je prirodno prisutna u okolini i fermentiranoj hrani, stalna su mikroflora probavnog trakta zdravih ljudi i životinja. Zbog specifičnih svojstava koja posjeduju, učestala je primjena BMK kao probiotika, koji kao takvi imaju velik značaj za ljude s obzirom na to da ako se konzumiraju u dovoljnoj koncentraciji imaju blagotvorne učinke na cjelokupno zdravlje ljudi. Kako bi se određeni bakterijski soj mogao koristiti kao potencijalni probiotik mora zadovoljiti strogo definirane kriterije (Šušković i sur., 2001). Jedan od važnijih funkcionalnih kriterija koje probiotički soj mora zadovoljiti kako bi mogao iskazati svoje djelovanje je njegova sposobnost adhezije na epitelne stanice gastrointestinalnog trakta. U brojnim istraživanjima dokazani su različiti mehanizmi djelovanja probiotika. Probiotici mogu djelovati antagonistički prema patogenim mikroorganizmima proizvodnjom antimikrobnih tvari i na taj način mogu spriječiti njihovo vezanost na crijevni epitel (kompetitivna ekskluzija). Za adheziju probiotičkih sojeva na intestinalni trakt važne su različite komponente prisutne na njihovoj staničnoj površini, a u ovom radu naglasak je stavljen na S-proteine. S-proteini osim što imaju ulogu u adheziji bakterijske stanice, pospješuju i sama agregacijska svojstva stanica koje ih ekspimiraju.

Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati da li se određeni sojevi bakterija mliječne kiseline (*Lactobacillus brevis* MB1, *L. brevis* MB2, *L. brevis* MB13, *L. brevis* MB20) izolirani iz majčinog mlijeka mogu koristiti kao potencijalni probiotici. Da bi se određeni bakterijski soj mogao koristiti kao probiotik mora zadovoljiti brojne kriterije. Jedan od njih je ispitati osjetljivost probiotičkog soja na antibiotike i provjeriti da li sadrži gene za rezistenciju na antibiotike zbog moguće opasnosti od horizontalnog prijenosa gena na domaćina. Osjetljivost na antibiotike je ispitana disk-difuzijskom metodom i E-testom, a prisutnost gena za rezistenciju PCR metodom. Osim navedenog, ispitan je i utjecaj S-proteina na probiotička svojstva kompetitivne ekskluzije, autoagregacije i koagregacije izoliranih bakterijskih sojeva. Kompetitivna ekskluzija patogene bakterije *Escherichia coli* 3014 s izoliranim sojevima bakterija mliječne kiseline ispitana je in vitro primjenom Caco-2 stanične linije. Koagregacijska svojstva bakterijskih sojeva ispitana su s patogenim sojevima *Listeria monocytogenes* ATCC 19111, *Staphylococcus aureus* 3048, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FP1 i *Escherichia coli* 3014.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE

Bakterije mliječne kiseline heterogena su skupina mikroorganizama, koja je široko rasprostranjena posvuda u prirodi gdje se nalazi visoka koncentracija ugljikohidrata i malo kisika. Prirodno stanište BMK je tlo, voda, silaža i kanalizacija te su prirodna mikroflora određene hrane kao što je mlijeko, meso, vino, voće i povrće. Osim toga, dio su mikrobiote mukoznih membrana, odnosno nastanjuju usnu šupljinu, gastrointestinalni i genitalni sustav ljudi i životinja (Ayivi i sur., 2020; Samaržija, 2015). Prema općim karakteristikama koje ih povezuju mogu se opisati kao Gram-pozitivne bakterije koje ne tvore spore, a ovisno prema potrebi za kisikom svrstavaju se kao anaerobne, ali i aerobno tolerantne bakterije. Nemaju citokrome s obzirom na to da evolucijski nikad nisu stekle sposobnost za sintezu hemoproteina, koji je ključna komponenta citokroma, a to je uvjetovalo i nepostojanju enzima katalaze, dakle katalaza-negativne su (iako neki sojevi mogu stvarati pseudokatalazu). Zajednička karakteristika svih BMK je da stvaraju mliječnu kiselinu kao krajnji produkt fermentacije ugljikohidrata. Optimalan rast BMK je pri pH u rasponu od 5,5 do 5,8. Rastu samo na kompleksnim podlogama koje obiluju aminokiselinama, peptidima, masnim kiselinama, vitaminima i mineralima te ugljikohidratima. Većina BMK pripada korisnim bakterijama, koje nisu škodljive za ljude, osim nekoliko patogenih vrsta iz roda *Streptococcus* (Samaržija, 2015; Lui i sur., 2014; Khalid, 2011).

2.1.1. Taksonomija bakterija mliječne kiseline

Taksonomsko klasificiranje BMK temelji se na analizi rDNA sekvenci koje kodiraju 16S ili 23S rRNA. Prema toj klasifikaciji Gram-pozitivne bakterije podijeljene su u dvije filogenetske skupine na temelju udjela gvanina i citozina (G+C) u svojim DNA molekulama. Jednu filogenetsku skupinu čine bakterije koje pripadaju rodovima *Atopobium*, *Bifidobacterium*, *Corynebacterium* i *Propionibacterium*. Navedeni rodovi pripadaju bakterijskoj grani *Actinomyces* i imaju viši sadržaj G + C (>50 %). Drugu filogenetsku skupinu čine bakterije koje pripadaju klostridijalnoj grani i koljenu *Firmicutes* te sadrže niži udio G + C u DNA molekuli (<50 %). Toj skupini pripadaju rodovi BMK *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* i *Streptococcus*, čiji se udio G + C kreće u rasponu od 31 do 49 % (Samaržija, 2015; Lui i sur., 2014; Horvath i sur., 2009; Savadogo i sur., 2006).

Klasične metode pomoću kojih se BMK svrstavaju u različite rodove i vrste temelje se na njihovim fenotipskim i biokemijskim karakteristikama. U tu svrhu provode se klasični preliminarni testovi koji uključuju bojanje po Gramu, određivanje morfoloških karakteristika, katalaza test, Vogues Proskauer test, API 50 CH test (fermentacija šećera), zatim rast pri temperaturama od 10, 40 i 45 °C, tolerancija na određene pH vrijednosti i koncentracije soli, konfiguracija mliječne kiseline i druge karakteristike. U novije vrijeme molekularne metode postale su važan alat za potpunu identifikaciju i klasifikaciju BMK. Najčešće korištene molekularne metode koje se koriste u tu svrhu su: poliakrilamid elektroforeza PFGE (engl. *Polyacrylamide electrophoresis*), analiza slučajnog umnažanja polimorfne DNA (engl. *Random Amplified Polymorphic DNA*, RAPD) i PCR metoda (engl. *Polymerase Chain Reaction*). Osim toga, koriste se gel elektroforeza u denaturirajućem gradijentu (engl. *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*, PCR-DGGE) ili gradijentu temperature (engl. *Temporal Temperature Gradient Electrophoresis*, PCR-TTGE), metode koje ne zahtijevaju uzgoj bakterija na hranjivim podlogama (Samaržija, 2015).

Taksonomski većina BMK pripada domeni *Bacteria*, koljenu *Firmicutes*, razredu *Bacilli*, redu *Lactobacillales* i porodici *Lactobacillaceae*. Porodici *Lactobacillaceae* pripada rod *Lactobacillus*, koji je ujedno i najveći s više od 150 vrsta unutar skupine BMK. Osim njega porodici *Lactobacillaceae* pripadaju i rodovi *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* i *Pediococcus* te drugi. Rod *Bifidobacterium* iako pripada koljenu *Actinobacteria*, također spada u skupinu BMK. Sve bakterijske vrste unutar navedenog roda karakterizira visok sadržaja G + C, koji se kreće u rasponu od 54 do 67 %. Morfološki BMK, mogu biti okruglog (*cocci*) ili štapićastog (*bacilli*) oblika, dok bifidobakterije imaju višestruko razgranati štapićasti oblik stanice (Samaržija, 2015; Quinto i sur., 2014).

2.1.2. Primjena bakterija mliječne kiseline u industriji

U današnje vrijeme široko je rasprostranjena primjena BMK u poljoprivredi, prehrambenoj industriji i medicini. Tome je uvjetovalo i što je BMK dodijeljen QPS (engl. *Qualified Presumption of Safety*) status od strane Europske agencije za sigurnost hrane (EFSA, *European Food Safety Authority*), odnosno GRAS (engl. *Generally Recognized As Safe*) status. Panel koji se bavi procjenom rizika i pruža stručna uputstva u području bioloških opasnosti (BIOHAZ panel) utvrdio je kako su fermentirajuće bakterije vezane uz hranu, bez obzira na to da li su otporne na antibiotike ili ne, sigurne za primjenu i da ne postoje nikakve

indikacije da bi mogle uzrokovati zdravstvene probleme (Bintsis, 2018a; EFSA, 2008). Međutim, sve je veća pojava rezistencije na antibiotike u klinički značajnih bakterija te se u tom smislu sve više potvrđuju i određene vrste BMK iz hrane, koje mogu djelovati kao nosioci „rezistentnih“ gena odgovornih za rezistenciju prema određenim antibioticima. Najveći rizik predstavlja prenošenje rezistencije na patogene bakterije prisutne u ljudskom gastrointestinalnom traktu, pa je potrebno stalno praćenje rezistencije kod prirodno prisutne mikroflore hrane i starter kultura. Najčešće se pojava antibiotičke rezistencije i njezin prijenos na druge bakterije prati i potvrđuje kod bakterija iz roda *Enterococcus* (posebice kod vrsta *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus faecium*), ali i kod ostalih rodova BMK (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, itd.) (Zdolec i sur., 2009; Mathur i Singh, 2005).

U prehrambenoj industriji BMK se najčešće koriste kao starter kulture u proizvodnji fermentirane hrane i pića. Prije se proizvodnja fermentirane hrane i pića temeljila na spontanoj fermentaciji zahvaljujući prirodno prisutnoj mikroflori na sirovom materijalu, ali upotrebom starter kultura postignut je visok stupanj kontrole samog procesa fermentacije i standardizacija konačnog proizvoda. Tijekom fermentacije, BMK uzrokuju acidifikaciju sirovog materijala proizvodnjom organskih kiselina (mliječna, octena, maslačna, propionska kiselina, itd.) iz ugljikohidrata. Osim organskih kiselina, procesom fermentacije dobivaju se različiti metaboliti kao što je etanol, vodikov peroksid, diacetil, acetoin i drugi. Na taj način mogu poboljšati nutritivne, organoleptičke i tehnološke karakteristike te produžiti trajnost fermentiranih proizvoda. Isto tako BMK se mogu koristiti u procesu konzerviranja hrane što se naziva biokonzerviranje čime se može produžiti vijek trajanja proizvoda korištenjem kontrolirane mikrobiote. BMK proizvode bakteriocine koji pomažu u biokonzerviranju jer imaju antagonističko, inhibicijsko i antimikrobno djelovanje prema patogenima bakterijama te mikroorganizmima koji uzrokuju kvarenje hrane. Različiti sojevi BMK mogu se pronaći u mliječnim proizvodima (jogurt, sir), fermentiranom mesu (salame, kobasice), fermentiranom povrću (masline, kiseli kupus) i brojnim drugim proizvodima. Osim što se koriste u hrani, BMK imaju važnu ulogu i u sintezi kemikalija, farmaceutskih proizvoda i drugih korisnih proizvoda (Ayivi i sur., 2020; Perez i sur., 2014; Leroy i De Vuyst, 2004).

2.1.3. Metabolizam bakterija mliječne kiseline

S obzirom na to da ne posjeduju funkcionalan lanac transporta elektrona i rastu u prisutnosti niske koncentracije kisika, BMK se uglavnom oslanjaju na fermentacijske procese

kako bi osigurale energiju potrebnu za daljnji rast i razvoj. Stoga primarna metabolička aktivnost BMK kojom dobivaju energiju za svoj rast je oksidacija različitih ugljikohidrata i srodnih komponenata. Prema metaboličkim putevima razgradnje ugljikohidrata i krajnjim produktima koji nastaju tim putevima, BMK se klasificiraju na: homofermentativne i heterofermentativne. Kod homofermentativnih vrsta glavni krajnji produkt fermentacije ugljikohidrata u anaerobnim uvjetima je mliječna kiselina. Homofermentativne vrste BMK metaboliziraju heksoze glikolizom (Embden-Mayerhof-Parnasovim putem), pri čemu ovim procesom iz jedne molekule glukoze dobivaju se 2 molekule mliječne kiseline (laktata) i 2 molekule ATP-a. BMK koje koriste isključivo ovaj metabolički put, odnosno glikolizu za fermentaciju heksoza su obligatno homofermentativne te one osim glukoze mogu metabolizirati i druge heksoze kao što je npr. fruktoza, galaktoza ili manozna. Međutim, ove vrste BMK nemaju enzim fosfoketolazu stoga nemaju sposobnost fermentirati pentoze. U slučaju kada je glikoliza optimalna, iz laktoze nastaje ~ 90% mliječne kiseline te male količine drugih organskih spojeva: diacetil, acetoin, acetaldehid i etanol te kiseline (octena, maslačna, propionska i mravlja). Vrste *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus amylophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* i *Lactobacillus helveticus* primjeri su obligatno homofermentativnih BMK (Bintsis, 2018b; Plavša, 2010).

Kod heterofermentativnih vrsta BMK i vrsta bifidobakterija kao krajnji produkti fermentacije fosfoketolaznim putem uz mliječnu kiselinu (najmanje 50 %) još nastaju CO₂, etanol i octena kiselina (acetat). U prvom stupnju razgradnje glukoze, koji se naziva pentoza fosfatni put, nastaje gliceraldehid-3-fosfat, acetil-fosfat i CO₂. Gliceraldehid-3-fosfat se zatim dalje procesom glikolize prevodi u mliječnu kiselinu, a acetil-fosfat se prevodi u octenu kiselinu i/ili etanol. Bakterije koje koriste samo ovaj metabolički put razgradnje ugljikohidrata su obligatno heterofermentativne, a u njih se ubrajaju vrste *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum* i *Lactobacillus reuteri* (Bintsis, 2018b; Plavša, 2010). Dakle, obligatno heterofermentativne vrste BMK molekulu glukoze pretvaraju u etanol, CO₂, mliječnu i octenu kiselinu, a pentoze fermentiraju u mliječnu i octenu kiselinu (Plavša, 2010). Pojedine vrste roda *Lactobacillus* definiraju se kao fakultativno heterofermentativne, jer mogu koristiti oba navedena metabolička puta fermentacije ugljikohidrata. Dakle, heksoze metaboliziraju glikolizom, pri čemu iz jedne molekule glukoze nastaju dvije molekule mliječne kiseline, a pentoze fermentiraju fosfoketolaznim putem u mliječnu i octenu kiselinu (Plavša, 2010). U fakultativno heterofermentativne bakterije ubrajaju se vrste *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactococcus lactis*,

Lactobacillus pentosus i *Lactobacillus xylosu* (Bintsis, 2018b). Također, BMK mogu fermentirati i disaharide, kao što su laktoza, maltoza i saharoza, koji se prvo transportiraju u bakterijsku stanicu jednim od dva transportna sustava: ATP - permeazni sustav (homofermentativne mezofilne vrste BMK) i fosfoenolpiruvat (PEP)-ovisni-fosfotransferazni sustav (homofermentativne termofilne vrste i heterofermentativne BMK) (Samaržija, 2015). Nakon toga određeni enzimi ih pocijepaju na jednostavnije šećera, koji se fermentiraju jednim od prethodno navedenih metaboličkih puteva.

2.1.4. Majčino mlijeko kao izvor bakterija mliječne kiseline

Majčino mlijeko, kao primaran izvor prehrane za novorođenčad, predstavlja bogat izvor biološki vrijednih sastojaka (proteina, ugljikohidrata, lipida, minerala i vitamina) potrebnih za pravilan rast i razvoj novorođenčadi te djeluje kao važan obrambeni mehanizam protiv različitih zaraznih bolesti. Osim toga, ono predstavlja i izvor mikroorganizama za razvoj i početni sastav crijevne mikrobiote novorođenčeta, koja zapravo potječe od mikroorganizama prisutnih u majčinim crijevima (Reis i sur., 2016; González i sur., 2013). Majčino mlijeko kao takvo pogodno je i za rast bakterija mliječne kiseline. Najčešće izolirane bakterije iz majčinog mlijeka pripadaju rodovima *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* te su potencijalni probiotici za crijeva dojenčadi (Reis i sur., 2016; Martín i sur., 2007; Martín i sur., 2004). Među tim populacijama bakterija, broj probiotičkih bakterija iznosi 10^1 - 10^7 CFU mL⁻¹ (Sakwinska i sur., 2016). Prijenos mikroorganizama iz majčinih crijeva do mliječnih žlijezdi odvija se preko dendritičkih stanica, koje mogu prodrijeti u crijevni epitel i na taj način prenijeti bakterije iz crijeva. Bakterije zatim cirkuliraju do mliječnih žlijezdi pomoću limfnog sustava i krvotoka, a zajedno se s mlijekom tijekom dojenja prenose u tijelo djeteta, gdje sudjeluju u stvaranju crijevne mikrobiote novorođenčeta (Łubiech i Twaruże, 2020; Rescigno i sur., 2001). Na sastav djetetove mikrobiote mogu utjecati različiti faktori kao što su prehrabene navike i tjelesna težina majke, prenatalni stres, zdravstveno stanje majke, genetika, korištenje lijekova i drugo (Łubiech i Twaruże, 2020; Navarro-Tapia i sur., 2020).

2.2. PROBIOTICI

2.2.1. Definicija probiotika

Riječ probiotik dolazi od grčke riječi 'pro bios' što znači „za život“ i tijekom godina se neprestano mijenjalo značenje ove riječi. Od početnog značenja, kojim se probiotik opisao kao „tvar koju neki mikroorganizam izlučuje kako bi potaknuo rast nekog drugog mikroorganizma koji se nalazi na istoj hranjivoj podlozi“, danas se najviše koristi definicija Svjetske zdravstvene organizacije (WHO - *World Health Organization*) i Organizacije za prehranu i poljoprivredu (FAO – *Food and Agriculture Organization of the United Nations*). Prema toj definiciji probiotici su „živi mikroorganizmi koji, kada se primjene u odgovarajućoj količini, ostvaruju pozitivne učinke na zdravlje domaćina“ (Vitali Čepo i sur., 2020; FAO/WHO, 2002; Šušković i sur., 1997). Prema svemu navedenom sam izraz probiotik se odnosi na proizvode koji sadrže žive mikroorganizme, koji svojim djelovanjem mogu poboljšati opće zdravstveno stanje ljudi i životinja te mogu imati različito mjesto djelovanja (npr. probavni ili urogenitalni trakt) (Šušković i sur., 1997).

Na tržištu probiotici mogu biti prisutni u hrani (mliječni i ne-mliječni proizvodi), kao dodaci prehrani, kao hrana za posebne medicinske potrebe ili mogu biti registrirani kao lijekovi (Vitali Čepo i sur., 2020; Hill i sur., 2014). Probiotici imaju važnu ulogu u zaštiti organizma od štetnih mikroorganizama i pomažu u jačanju imunološkog sustava domaćina. Obično se konzumiraju nakon uzimanja antibiotika, koji osim štetnih mikroorganizama prisutnih u probavnom traktu mogu uništiti i korisne mikroorganizme. Općenito se preporučuje redovita konzumacija hrane koja sadrži probiotičke bakterije kako bi se uspostavila pozitivna ravnoteža korisnih mikroba u crijevnoj mikrobioti (Soccol i sur., 2010).

Probiotičke BMK mogu se izolirati iz različitih izvora poput fermentirane hrane, životinja i ljudi. Da bi se određeni probiotički soj mogao koristiti kod ljudi, poželjno je da bude izoliran iz ljudskog gastrointestinalnog (GI) sustava, odnosno da bude humanog podrijetla kako bi imao visoku sposobnost adhezije na crijevni epitel. Korišteni probiotički soj također mora biti siguran za upotrebu, odnosno ne smiju imati štetno djelovanje za domaćina (Ayivi i sur., 2020; Gupta i Jeevaratnam, 2018). Najčešće se kao probiotici koriste sojevi koji pripadaju različitim vrstama rodova *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. gasseri*, *L. casei*, *L. reuteri*, *L. johnsonii*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. fermentum* i *L. salivarius*) i *Bifidobacterium* (*B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve* i *B. longum*) (Vitali Čepo i

sur., 2020). Ostale bakterije koje se mogu razmatrati kao probiotici uključuju *Streptococcus thermophilus*, nepatogene sojeve *E. Coli* (*Escherichia coli* Nissle 1917), *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Bacillus* i određene kvasce, kao što je *Saccharomyces boulardii* (Ayivi i sur., 2020; Upadhyayi Moudgal, 2012; Soccol i sur., 2010). Kako bi se određeni mikroorganizam mogao koristiti kao probiotik mora zadovoljiti određene kriterije koji su prikazani u tablici 1. Prilikom odabira potencijalnih probiotičkih sojeva provode se brojni *in vitro* testovi kako bi se utvrdila probiotička svojstva odabranih bakterijskih sojeva. Različiti modeli na kojima se provode ispitivanja stimuliraju uvjete koji prevladavaju u samom GI traktu, a najveću prepreku preživljavanju potencijalnih probiotika predstavlja nizak pH želuca i probavni enzimi koji mogu uzrokovati lizu stanice te žučne soli (Šušković i sur., 2009).

Tablica 1. Kriteriji za odabir probiotičkih sojeva (Šušković i sur., 2001)

Opći kriteriji	točna taksonomska identifikacija
	humano podrijetlo za humane probiotike
	netoksičnost i nepatogenost
	genetička stabilnost (nema prijenosa plazmida)
	otpornost prema žučnim solima
	otpornost prema niskim pH vrijednostima
Tehnološki kriteriji	stabilnost poželjnih karakteristika tijekom pripreme kulture, skladištenja i isporuke
	visoka razina broja živih bakterija u probiotičkom proizvodu (10^6 - 10^8 mL ⁻¹ ili g ⁻¹)
	brzo i lako razmnožavanje, izdvajanje, koncentriranje, smrzavanje i liofiliziranje tijekom procesa pripreme probiotičkih kultura, te visok stupanj preživljavanja za vrijeme čuvanja i distribucije
	dobivanje željenih organoleptičkih svojstava kad su uključeni u fermentacijske procese
Funkcionalni kriteriji	sposobnost preživljavanja, razmnožavanja i metabolizamske aktivnosti u „ciljanom” području primjene u organizmu
	sposobnost adhezije i kolonizacije crijevnog epitela
	produkcija antimikrobnih supstancija, uključujući bakteriochine, vodikov peroksid i organske kiseline
	antagonistička aktivnost prema patogenim i kariogenim bakterijama
	mogućnost kompeticije sa sudionicima normalne mikroflore, uključujući iste ili srodne vrste, otpornost prema bakteriocinima, kiselinama ili drugim antimikrobnim supstancijama koje proizvodi autohtona mikroflora
	imunomodulacijski učinak
	sposobnost iskazivanja jednog ili više klinički dokumentiranih korisnih učinaka na zdravlje

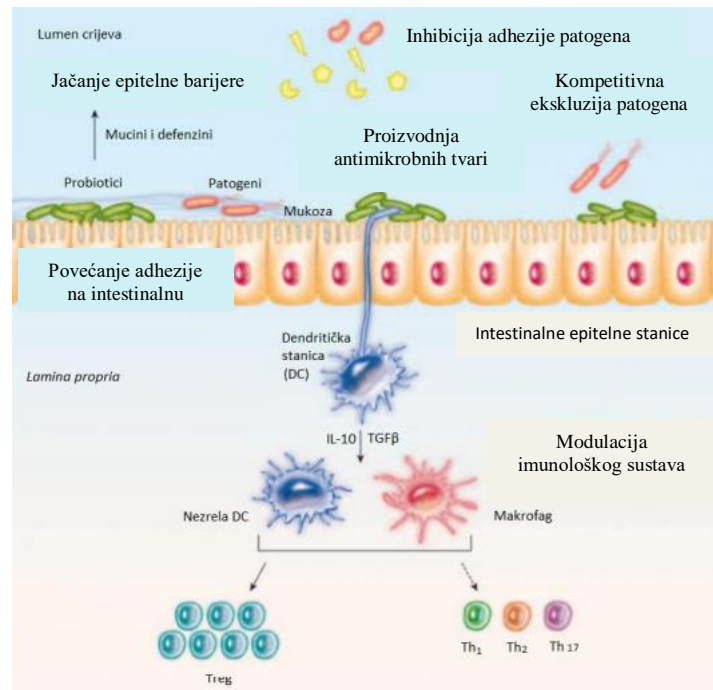
2.2.2. Mehanizam djelovanja probiotika

U brojnim istraživanjima opisani su različiti mehanizmi djelovanja probiotika. Mehanizam djelovanja razlikuje se ovisno o vrsti i dozi korištenog probiotičkog soja te putu njegova djelovanja. Iako svi probiotici nemaju iste mehanizme djelovanja, razlikuju se tri načina njihova djelovanja: probiotici mogu utjecati na zdravlje čovjeka interakcijom s drugim mikroorganizmima prisutnima na mjestu njihova djelovanja u GI traktu, jačaju mukoznu barijeru i utječu na imunološki sustav domaćina (Harzallah i Belhadj, 2016; Leroy i sur., 2008). Neki od mehanizama djelovanja probiotika prikazani su na slici 1.

Probiotici mogu djelovati antagonistički prema patogenim bakterijama smanjenjem pH lumena crijeva, inhibicijom adhezije bakterija i translokacije, ili produkcijom antimikrobnih tvari i defenzina (Harzallah i Belhadj, 2016). Tijekom fermentacije BMK dolazi do snižavanja pH uslijed nastanka organskih kiselina. Proizvedene organske kiseline, posebice mliječna i octena kiselina, pokazuju snažno inhibicijsko djelovanje prema Gram-negativnim bakterijama i smatraju se glavnim antimikrobnim komponentama odgovornim za inhibitorno djelovanje probiotika prema patogenima (Bermudez-Brito i sur., 2012). Osim organskih kiselina, probiotici proizvode i druge antimikrobne komponente, kao što su bakteriocini. Bakteriocini Gram-pozitivnih bakterija (obično BMK, uključujući laktacin B iz *L. acidophilus*, plantaricin iz *L. plantarum* i nizin iz *Lactococcus lactis*) imaju uzak spektar djelovanja i djelotvorni su samo prema srodnim bakterijama, ali neki bakteriocini mogu biti djelotvorni i prema patogenima iz hrane (Bermudez-Brito i sur., 2012; Nielsen i sur., 2010). Tako na primjer, probiotički soj *L. salivarius* subsp. *salivarius* UCC118 proizvodi peptid koji svojim djelovanjem može inhibirati velik broj patogena koji pripadaju rodovima *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Listeria* i *Salmonella* (Ayivi i sur., 2020).

Adhezija probiotika na intestinalne epitelne stanice smatra se preduvjetom njihovog probiotičkog djelovanja i važna je za njihovu kolonizaciju te interakciju između probiotičkog soja i domaćina. Probiotici mogu poboljšati funkciju epitelne barijere povećavajući proizvodnju mucina, koji je glavna komponenta mukoze, čime se sprječava adhezija patogena i smanjuje propusnost epitelnih stanica. Isto tako probiotički sojevi mogu inducirati ekspresiju antimikrobnih peptida kao što su defenzini. Defenzini, mali peptidi/proteini koji se izlučuju iz epitelnih stanica, pokazuju antimikrobno djelovanje protiv

bakterija, gljivica i plijesni te svojim djelovanjem stabiliziraju crijevnu barijeru (Ayivi i sur., 2020; Bermudez-Brito i sur., 2012; Furrrie i sur., 2005).



Slika 1. Mehanizmi djelovanja probiotika (preuzeto iz Bermudez-Brito i sur., 2012)

Jedan od mehanizama probiotika je i kompeticija s patogenim mikroorganizmima za mjesta vezanja na epitelnoj površini crijeva. Mnogi patogeni mikroorganizmi da bi uopće mogli preživjeti uvjete u GI traktu i uspješno kolonizirati sluznicu crijeva moraju se prvo vezati na crijevni epitel. Određeni sojevi bakterija iz roda *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* mogu se vezati na epitel crijeva i stvoriti „barijeru“ te na taj način spriječiti vezanje patogenih bakterija. Kompetitivna ekskluzija može se definirati kao natjecanje dva ili više bakterijska soja za dostupne nutrijente i mjesta vezanja na intestinalnu mukožu (Bermudez-Brito i sur., 2012; Šušković i sur., 1997). Hirano i sur. (2003) u svom su istraživanju dokazali kako *L. rhamnosus*, bakterijski soj koji ima veliku sposobnost adhezije, može inhibirati vezanje entero-hemoragične bakterije *Escherichia coli* na humanoj crijevnoj staničnoj liniji.

Poznato je i kako probiotičke bakterije mogu poticati imunološki odgovor domaćina, što se očituje u obliku povećane proizvodnje serumskog imunoglobulina A (IgA), povećavaju fagocitoznu aktivnosti makrofaga i broj NK stanice (engl. *natural killer cells*) te stimuliraju brojne druge nespecifične imunološke reakcije protiv patogena. Probiotici također reguliraju proizvodnju proinflatarnog citokina, sprječavaju apoptozu stanica, suzbijaju proliferaciju

T-stanica te se na taj način sprječavaju razna upalna stanja (Ayivi i sur., 2020; Bermudez-Brito i sur., 2012).

2.2.3. Učinak probiotika na ljudsko zdravlje

Stres, nepravilna prehrana, primjena lijekova (posebice antibiotika i citostatika) i brojni drugi čimbenici iz okoliša mogu dovesti do poremećaja ravnoteže crijevne mikroflore. Sve navedeno može dovesti do različitih crijevnih poremećaja i niza kroničnih bolesti koje ugrožavaju ljudsko zdravlje. Upravo iz toga razloga provodi se sve veći broj istraživanja potencijalnih probiotika i njihove primjene u sprječavanju i liječenju različitih gastrointestinalnih i urogenitalnih bolesti jer su se svojim antimikrobnim djelovanjem pokazali vrlo uspješnima u sprječavanju rasta i razmnožavanja brojnih štetnih mikroorganizama koji mogu biti uzročnici tih bolesti. Dakle, probiotici osim što sudjeluju u uspostavljanju i održavanju ravnoteže crijevne mikroflore, utječu i na cjelokupan imunološki sustav domaćina. Osim toga sve je veći značaj antibiotske rezistencije, do koje može doći zbog učestale upotrebe antibiotika u liječenju infektivnih bolesti. Prema tome sve više raste interes potrošača prema upotrebi funkcionalne hrane pa u to smislu i probiotika, kao funkcionalnih dodataka hrani, u prevenciji i liječenju određenih bolesti GI trakta, ali i zbog poboljšanja cjelokupnog zdravlja (Šušković i sur., 2009). U tablici 2 prikazane su neke od blagodati koje probiotici imaju na ljudsko zdravlje te mehanizimi djelovanja kojima to postižu.

Tablica 2. Potencijalne i utvrđene zdravstvene dobrobiti povezane s upotrebom probiotika te mehanizmi njihova djelovanja (prema Leroy i sur., 2008)

Povoljni učinci probiotika na zdravlje	Predloženi mehanizmi djelovanja
Prevenција kancerogenih stanja	Inhibicija transformacije prokancerogena u 'aktivne' kancerogene tvari, vezanje/inaktivacija mutagenih spojeva, jačanje imunološkog sustava, proizvodnja antimutagenih spojeva
Pomažu kod sindroma iritabilnih crijeva	Modulacija crijevne mikrobiote, redukcija proizvodnje plina u crijevima
Prevenција i upravljanje atopijskim bolestima	Modulacija imunosnog odgovora
Blagotvorno djelovanje kod upalnih bolesti crijeva (Crohnova bolest, ulcerozni kolitis, pouchitis)	Modulacija imunosnog odgovora, modulacija crijevne mikrobiote
Prevenција poremećaja urogenitalnog trakta	Proizvodnja antimikrobnih tvari, kompeticija s drugim mikroorganizmima za vezno mjesto, kompetitivna ekskluzija patogena
Prevenција/liječenje dijareje uzrokovane bakterijama/virusima	Modulacija crijevne mikrobiote, proizvodnja antimikrobnih tvari, kompeticija s drugim mikroorganizmima za vezno mjesto, poticanje proizvodnje mucina, modulacija imunosnog odgovora
Prevenција/liječenje infekcije bakterijom <i>Helicobacter pylori</i>	Proizvodnja antimikrobnih tvari, poticanje proizvodnje mucina, kompeticija s drugim mikroorganizmima za vezno mjesto, stimulacija specifičnog i nespecifičnog imunosnog odgovora
Pospješuju probavu laktoze	Djelovanje bakterijske β -galaktozidaze na laktozu

2.3. S-SLOJ

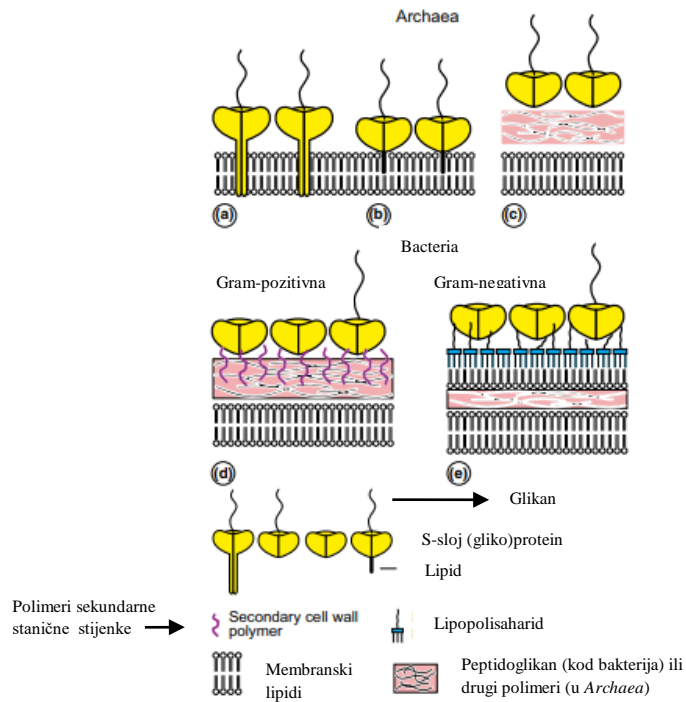
Vrlo važan površinski proteinski sloj prisutan kod bakterija, koji ih štiti od štetnih okolišnih uvjeta s obzirom na to da je u izravnom kontaktu s njime i koji je odgovoran za adheziju bakterija na različite podloge, naziva se S-sloj (engl. *surface layer*, *S-layer*). S-sloj je identificiran kod stotina različitih mikrobnih vrsta, koje pripadaju svim glavnim filogenetskim skupinama bakterija, a glavna je strukturna komponenta kod gotovo svih *Archaea* (Sleytr i sur., 2014).

2.3.1. Građa S-sloja

S-sloj predstavlja parakristalni dvodimenzionalni sloj, koji prekriva čitavu staničnu površinu, a građen je od velikog broja identičnih proteinskih ili glikoproteinskih podjedinica. Te proteinske podjedinice, tzv. S-proteini (engl. *Surface layer proteins*) na taj način formiraju visoko poroznu kristalnu rešetku koja može imati kosu (p1, p2), tetragonalnu (p4) ili heksagonalnu (p3, p6) simetriju. Heksagonalna simetrija je uglavnom prisutna kod bakterija iz

domene *Archaea*. Morfološka jedinica S-proteina može se sastojati od jedne, dvije, tri, četiri ili šest proteinskih jedinica, a udaljenost između dva centra proteinskih podjedinica kreće se u rasponu od 2,2 do 35 nm. Vanjska površina bakterijskih S-slojeva je glatka, a unutarnja valovita. Debljina S-sloja varira u rasponu od 5 - 25 nm (Sleytr i sur., 2014; Sleytr i sur., 1996). Kod *Archaea*, S-sloj sudjeluje u održavanju oblika stanice i procesu diobe stanica te predstavlja jedinu komponentu koja se nalazi izvan citoplazmatske membrane. Kod Gram-pozitivnih bakterija, proteinske podjedinice su vezane na peptidoglikansku staničnu stijenu, a kod Gram-negativnih na komponente vanjske membrane (lipopolisaharide) što je prikazano na slici 2 (Sleytr i sur., 2014).

Provedenim kemijskim i genetičkim analizama dokazano je kako različiti S-slojevi imaju uglavnom sličan sastav. Molekularna masa jedne proteinske ili glikoproteinske podjedinice koja gradi S-sloj kreće se u rasponu od 40 do 170 kDa (Sleytr i sur., 2014; Messner i sur., 2010; Claus i sur., 2005). S-proteini imaju dvije strukturne regije, jedna od njih odgovorna je za vezanje podjedinica S-sloja na staničnu stijenu, a druga za povezivanje proteinskih podjedinica formirajući pritom S-sloj. Podjedinice S-sloja vezane su na staničnu površinu nekovalentnim vezama (Hynönen i Palva, 2013). S-proteini obično su građeni od 40 - 60 % hidrofobnih aminokiselina, a sadrže malo ili uopće ne sadrže aminokiseline sa sumporom kao što su metionin i cistein (pronađen samo kod određenih S-slojeva). Izoelektrična točka S-proteina za većinu bakterija iznosi 4 - 6, dok je za neke bakterije iz roda *Lactobacillus* i domene *Archaea* (npr. *Methanothermobacter fermentans*), izoelektrična točka nešto viša (pI = 8-10) (Sleytr i sur., 2014).



Slika 2. Smještaj S-proteina na staničnoj površini kod *Archaea*, Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija (prema Sleytr i sur., 2014). Slika (a) komponente S-sloja kod *Archaea* sadrže „podjedinice slične gljivama“ s hidrofobnim trans-membranskim domenama ili podjedinice glikoproteina na koje su vezani lipidi (b). Kod pojedinih *Archaea* između plazmatske membrane i S-sloja nalazi se srednji kruti sloj (npr. preudomurein u metanogenim organizmima) (c). Kod Gram-pozitivnih bakterija (d) (gliko)proteini S-sloja vezani su na peptidoglikanski sloj preko polimera sekundarne stanične stijenke. Kod Gram-negativnih bakterija (e) S-sloj je usko vezan na lipopolisaharide vanjske membrane

2.3.2. Funkcije S-sloja

S-proteini formiraju vanjski sloj većine bakterijskih stanica i kao takvi nalaze se u izravnom kontaktu s okolinom pa se stoga njihova uloga može promatrati s dva aspekta. Kao prvo, S-proteini imaju ulogu u adheziji bakterija na različite supstrate i površine, kao što su epitelne stanice, gastrointestinalna mukoza i makromolekule ekstracelularnog matriksa te sudjeluju u autoagregaciji i koagregaciji s ostalim mikroorganizmima. Druga važna uloga S-proteina je da služe kao mehanička barijera koja štiti bakteriju od nepovoljnih uvjeta okoliša u kojem se nalazi (Gerbino i sur., 2015).

Autoagregacija predstavlja proces reverzibilnog nakupljanja stanica koje pripadaju istom bakterijskom soju. Prilikom nakupljanja, bakterije se spontano talože formirajući pri tome biofilm na mukozi domaćina. Ovaj proces posebno je proučavan kod bakterijskih sojeva koji bi mogli djelovati kao potencijalni probiotici jer se agregacijska svojstva bakterija smatraju potencijalno probiotičkim svojstvom. Autoagregacija bakterija smatra se prvim korakom za uspješnu adheziju bakterija na epitelne stanice crijeva (Panwar i sur., 2017; Gerbino i sur., 2015). U slučaju da dolazi do agregacije, odnosno nakupljanja dvaju različita bakterijska soja, riječ je o procesu koagregacije. Taj proces se može promatrati kao dio mehanizma kompetitivne ekskluzije, odnosno bakterije na taj način tvore barijeru čime se sprječava adhezija i kolonizacija patogenih mikroorganizama. Agregacijska svojstva bakterija iz roda *Lactobacillus* pripisuju se S-proteinima prisutnim na njihovoj površini. Uklanjanje S-proteina tretmanom s 5 M LiCl, utjecalo je na manju sposobnost autoagregacije bakterije *L. helveticus* M92 te njene koagregacije s bakterijom *S. Typhimurium* FP1. S druge strane, bakterija *L. crispatus* ZJ001 je nakon uklanjanja S-sloja sa stanične površine tretmanom s LiCl izgubila sposobnost autoagregacije (Panwar i sur., 2017; Chen i sur., 2007).

Kao što je ranije spomenuto, adhezija na epitelna i subepitelna tkiva važna je karakteristika koju određeni bakterijski soj mora imati kako bi mogao djelovati kao probiotik i uspješno kolonizirati GI trakt. Adhezija bakterija na različite stanične površine i interakcija sa stanicama domaćina omogućena je zbog prisutnosti određenih molekula koje su sastavni dio stanične površine bakterija, kao što su teihoninska, lipoteihoninska kiselina, (gliko)proteine i transmembranski proteini te polisaharidi (Li i sur., 2015). Dokazano je kako i S-slojevi određenih laktobacila djeluju kao adhezini, posredujući u vezanju bakterija na specifične komponente izvanstaničnog matriksa. Ovo svojstvo dokazano je eksperimentalno za S-slojeve koje eksprimiraju bakterije *L. crispatus* JCM 5810 (CbsA), *L. brevis* ATCC 8287 (SlpA) i *L. brevis* OLL2772. Adhezija bakterija na epitelne stanice također se pripisuje S-proteinima. Kemijskim uklanjanjem S-proteina značajno se smanjila adhezija bakterije *L. brevis* ATCC 8287 na humane intestinalne stanične linije Caco-2 i Intestine 407, endotelnu staničnu liniju EA-hy926 te staničnu liniju mjehura T24 (Panwar i sur., 2017; Hynönen i sur., 2002). Time je dokazana važna uloga S-proteina laktobacila prilikom adhezije na različite stanične linije.

S-proteini služe i kao zaštitni omotač bakterijama kada su izložene nepovoljnim okolišnim uvjetima koji mogu umanjiti njihovu sposobnost preživljavanja. Tako povećavaju

rezistentnost bakterija prema uvjetima GI trakta, kao što je npr. nizak pH i djelovanje proteolitičkih enzima. Uklanjanjem S-proteina s površine dokazana je manja sposobnost preživljavanja tri *Lactobacillus* soja (vrsta *L. acidophilus* i *L. helveticus*) u simuliranim uvjetima želučanog soka i soka tankog crijeva, što ukazuje na zaštitnu ulogu S-proteina kod tih bakterija (Meng i sur., 2014). Osim toga, S-sloj štiti bakterije i u drugim ekstremnijim uvjetima, kao što je visoka temperatura, visoki ionski naboj i prisutnost teških metala, ali to se uglavnom odnosi na Gram-negativne ekstremofile iz domene *Arhea* (Gerbino i sur., 2015).

Osim navedenih uloga, S-sloj ima ulogu u formiranju biofilma, mikrobne zajednice više međusobno povezanih vrsta bakterija. Bakterije u biofilmu su puno otpornije prema stresnim uvjetima kao što su antimikrobne tvari i imunosni sustav domaćina u odnosu na planktonske oblike (Marsh i sur., 2011). Zatim, pomaže u izbjegavanju imunosnog odgovora domaćina putem modifikacije odgovora T-stanica i citokina, obavlja funkciju molekularnog sita, služi kao mjesto vezanja velikih molekula, iona ili bakteriofaga i uočene su još brojne druge specifične uloge S-proteina. Međutim, važno je spomenuti kako S-sloj nema jednu specifičnu funkciju, već njegova uloga ovisi o samoj vrsti mikroorganizma koji ga eksprimira (Gerbino i sur., 2015). Karakteristična svojstva S-slojeva, posebice njihova strukturna i fizikalno-kemijska ujednačenost i mogućnost spontanog udruživanja proteinskih podjedinica, omogućili su bakterijama široku primjenu i u nanotehnologiji, sintetičkoj biologiji te niomimeticima (Sleytr i sur., 2014).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Radni mikroorganizmi

U ovom radu su korištene bakterije mliječne kiseline roda *Lactobacillus* izolirane iz majčinog mlijeka i test-mikroorganizmi prikazani u tablici 3. Sojevi su dio Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (ZBMK).

Tablica 3. Bakterijski sojevi iz Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura korišteni u ovom radu

Bakterijski sojevi	Oznaka soja	Hranjive podloge i uvjeti rasta
<i>Lactobacillus brevis</i>	MB1	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Lactobacillus brevis</i>	MB2	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Lactobacillus brevis</i>	MB13	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Lactobacillus brevis</i>	MB20	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	FP1	BHI, 37 °C, aerobno
<i>Staphylococcus aureus</i>	3048	BHI, 37 °C, aerobno
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19111	BHI, 37 °C, aerobno
<i>Escherichia coli</i>	3014	BHI, 37 °C, aerobno

3.1.2. Stanične linije

Za ispitivanje sposobnosti kompetitivne ekskluzije korištene su Caco-2 stanice. To su kontinuirane stanične linije koje sadrže heterogene humane tumorske stanice kolorektalnog epitela, a priređene su u Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković.

3.1.3. Hranjive podloge

U radu su korištene sljedeće hranjive podloge:

a) zaodržavanje i uzgoj bakterija mliječne kiseline

- MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) agar („Biovit“, Italija), sastava (g L⁻¹ destilirane vode): pepton 10,0; mesni ekstrakt 10,0; kvašćev ekstrakt 5,0; glukoza 20,0; Tween

801,0; MgSO₄ x 7H₂O 0,1; MnSO₄ x 7H₂O 0,05; natrijev-acetat 5,0; agar 20,0. pH vrijednost podloge iznosi 6,5, a sterilizacija se provodi pri 121 °C tijekom 15 minuta.

- MRS bujon („Biovit“, Italija) istog je sastava kao podloga MRS agar, ali bez dodatka agara („Biovit“, Italija).

b) za održavanje i uzgoj patogenih test-mikroorganizama

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

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

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

d) hranjiva podloga za kultivaciju staničnih linija

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

3.1.4. Kemikalije

- „nuclease-free water“, „Takara“, Japan
- 100 bp DNA Ladder, „Invitrogen“, SAD
- destilirana voda, PBF, Hrvatska
- EmeraldAmp MAX HS PCR Master Mix 2x Premix, „Takara“, Japan
- etanol 70 %, „Kemika“, Hrvatska
- etidijev bromid, „Boehringer Mannheim GmbH“, Njemačka
- etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA), „Sigma-Aldrich, SAD
- fetalni goveđi serum, „Gibco“, SAD
- fosfatni pufer, „Kemika“, Hrvatska
- Genomic Wizard DNA Purification kit, „Promega“, SAD
- glicerol, „Kemika“, Hrvatska
- gvanidinhidroklorid (GHC), „Sigma-Aldrich“, SAD
- izopropanol, „Kemika“, Hrvatska

- klorovodična kiselina (HCl), „Sigma-Aldrich“, SAD
- lizozim, „EuroBio“, Francuska
- natrijev klorid (NaCl), „Kemika“, Hrvatska
- natrijeva lužina (NaOH), „Kemika“, Hrvatska
- neesencijalne aminokiseline, „Gibco“, SAD
- pankreatin (165 U mg^{-1}) iz svinjske gušterače, „BioChemika“, Fluka, Švicarska
- pepsin, „Sigma“, SAD
- RNase A, „Qiagen“, Španjolska
- Triton X, „AppliChem“, Njemačka
- žučne soli, „Difco“, SAD
- λ DNA HindIII, „Fermentas“, Kanada

3.1.5. Aparatura i pribor

- autoklav, „Sutjeska“, Hrvatska
- automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- BioSpec-nano, „Shimatzu“, Japan
- Bunsenov plamenik, „OMM Laboratory Equipment“, Italija
- celulozna vata, „Lola Ribar“, Hrvatska
- centrifuga Centric 160, „Tehtnica“, Slovenija
- centrifuga s hlađenjem 5804R, „Eppendorf“, SAD
- čitač mikrotitarskih ploča Infinite F Plex, „Tecan“, Švicarska
- DNA-termoblok, „Eppendorf“, SAD
- hladnjak, „Gorenje“, Slovenija
- kadica za elektroforezu, „Bio- Rad“, SAD
- kivete za centrifugiranje (15 i 50 mL), „Falcon“, Engleska
- mikrotitarske pločice (24 i 96 jažica), „Falcon“, Engleska
- napajanje za elektroforetske kadice, „Bio- Rad“, SAD
- nastavci za automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- penicilinke, „Macherey-Nagel“, Njemačka
- Petrijeve zdjelice, „Golias“, Slovenija
- pincete, „Isolab“, Njemačka
- plastične tubice od 1,5 i 2 ml, „Eppendorf“, SAD

- staklene epruvete, „Scherf Präzision Europe GmbH“, Njemačka
- stalci za epruvete, „neoLab“, Njemačka
- stalci za tubice, „neoLab“, Njemačka
- T-boca, „Corning“, SAD
- termostat, „Instrumentarija“, Hrvatska
- transiluminator MiniBIS Pro, „DNR Bio-Imaging Systems Ltd.“, Izrael
- vibromješač Vortex V-1 plus, „BioSan“, Latvija
- vodena kupelj, „Sutjeska“, Jugoslavija
- zamrzivač (-80 °C), „New Brunswick Scientific“, SAD

3.2. METODE

3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama i staničnih linija

Sojevi bakterija mliječne kiseline čuvani su pri -80 °C u MRS tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 15 % (v/v) glicerola, a patogeni test-mikroorganizmi u BHI bujonu uz dodatak 15 % (v/v) glicerola. Dan prije eksperimenta sojevi su inokulirani u odgovarajuću svježju hranjivu podlogu te inkubirani pri optimalnim uvjetima rasta navedenim u tablici 3.

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

3.2.3. Izolacija genomske DNA

Ekstrakcija genomske DNA iz bakterija mliječne kiseline provedena je pomoću GenomicWizard DNA kita za izolaciju DNA. Po 5 mL prekonoćne kulture svake bakterije centrifugirano je 2 minute na 13000 o min⁻¹. Nakon uklanjanja supernatanta, talog stanica je resuspendiran u 480 µL 50 mM EDTA i 120 µL otopine lizozima (10 mg mL⁻¹) te inkubiran u vodenoj kupelji pri 37 °C tijekom 30-60 min. Nakon inkubacije, uzorak je centrifugiran te je dobiveni talog stanica resuspendiran u otopini za lizu jezgre koja je dio korištenog kita i inkubiran u vodenoj kupelji pri 80 °C tijekom 5 min. Nakon što je stanični lizat ohlađen pri sobnoj temperaturi, dodano je 3 µL otopine RNAze te je provedena inkubacije pri 37 °C tijekom 60 min. Nakon ponovnog hlađenja pri sobnoj temperaturi, uzorku je dodano 200 µL otopine za taloženje proteina, koja je dio kita za izolaciju DNA te je vorteksiran 20 sekundi,

inkubiran 5 min na ledu i centrifugiran pri 13000 o min^{-1} tijekom 3 minute. Supernatant koji sadrži DNA je prebačen u tubicusa 600 μL izopropanola te je sadržaj izmiješan okretanjem tubice dok niti DNA nisu formirale vidljivu masu. Nakon toga je slijedilo centrifugiranje, uklanjanje supernatanta i sušenje uzorka. Talog DNA je zatim ispran sa 600 μL 70 % etanola. Nakon sušenja uzorka 10-15 minuta na zraku, talogu je dodano 100 μL otopine za rehidraciju DNA, koja je dio kita za izolaciju te je talog rehidriran jednosatnom inkubacijom pri $65 \text{ }^\circ\text{C}$ u vodenoj kupelji. Tako dobivena DNA je pohranjena na $4 \text{ }^\circ\text{C}$ (Leboš Pavunc i sur., 2012).

Dobivenim uzorcima DNA je spektrofotometrijski izmjerena koncentracija pomoću uređaja BioSpec-nano, pri čemu je kao slijepa proba korištena otopina za rehidraciju DNA, koja je dio kita za izolaciju DNA (Leboš Pavunc i sur., 2012).

3.2.4. Ispitivanje osjetljivosti bakterija izoliranih iz majčinog mlijeka na antibiotike

3.2.4.1. Ispitivanje osjetljivosti bakterija na antibiotike E-testom i disk-difuzijskom metodom

Osjetljivost bakterija na antibiotike ispitana je metodom difuzije na krutim hranjivim podlogama metodom s antibiotskim diskovima i E-testom. U disk-difuzijskoj metodi, 100 μL bakterijske kulture optičke gustoće vrijednosti $\text{OD}_{620}=2$, inokulirano je u 12 mL MRS agara prethodno otopljenog i ohlađenog na $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Tako inokulirana hranjiva podloga izlivena je u Petrijeve zdjelice. Nakon skrutnjavanja, na površinu podloge su sterilnom pincetom postavljeni BD BBLTMSensi-DiscTM filter diskovi promjera 6 mm poznatog sadržaja antibiotika (ampicilin 10 μg , eritromicin 15 μg , gentamicin 10 μg , klindamicin 2 μg , kloramfenikol 30 μg , kanamicin 30 μg , streptomycin 10 μg , tetraciklin 30 μg , vankomicin 30 μg). Nakon prekonoćne inkubacije pri $37 \text{ }^\circ\text{C}$, izmjeren je promjer zona inhibicije, uključujući i promjer diska.

Osjetljivost sojeva na navedene antibiotike ispitana je i primjenom M. I. C. E. EvaluatorsTM E-testa, tako što su na podlogu pripremljenu na isti način kao u disk-difuzijskoj metodi, sterilnom pincetom nanese vrpce E-testa koje sadrže ampicilin, eritromicin, gentamicin, klindamicin, kloramfenikol, kanamicin, tetraciklin ili vankomicin u gradijentu koncentracije $0,016 - 256 \mu\text{g mL}^{-1}$, odnosno streptomycin u gradijentu koncentracije $0,064 - 1026 \mu\text{g mL}^{-1}$. Nakon 24 h inkubacije pri $37 \text{ }^\circ\text{C}$, očitane su minimalne inhibicijske koncentracije (engl. *Minimal Inhibitory Concentration*, MIC) na vrhu zone inhibicije oko vrpce, prema uputama proizvođača.

3.2.4.2. Detekcija gena za rezistenciju na antibiotike PCR metodom

DNA odabranih bakterija izoliranih iz majčinog mlijeka (3.2.3.) korištena je kao kalup za PCR reakciju sa svrhom detekcije potencijalno prijenosnih gena za rezistenciju na antibiotike pomoću specifičnih početnica navedenih u tablici 4. Reakcijska smjesa volumena 20 μL sadržavala je 10 μL EmeraldAmp MAX HS PCR Master Mix 2x Premix, po 0,04 μL početnica, 1 μL kalupa te vodu. Kao negativna kontrola da fragment dobiven nakon PCR reakcije nije produkt dimerizacije početnica korišten je uzorak koji ne sadrži DNA. PCR reakcija se odvijala prema uvjetima navedenim u tablici 5. Dobiveni PCR produkti razdvojeni su elektroforezom na agaroznom gelu (2 % (w v⁻¹)) pri naponu od 100 V. Standard se sastojao od 0,25 μL λ DNA HindIII i 0,5 μL 100 bp DNA Ladder. Gel je nakon završetka elektroforeze obojen u etidijevom bromidu koncentracije $\gamma=0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ i vizualiziran ultraljubičastim svjetlom na transiluminatoru MiniBIS Pro, pri valnoj duljini od 254 nm, upotrebom programa Gel Capture verzija 7.1 verzije 7.1 (Leboš Pavunc i sur., 2012).

Tablica 4. Specifične početnice za gene za rezistenciju na antibiotike i uvjeti PCR reakcije

Antibiotik	Ciljani gen	Početnice (5'-3')	Veličina PCR produkta	Referenca
gentamicin	<i>aac(6')Ie-aph(2'')Ia</i>	CACTATCATAACCACTACCG CAGAGCCTTGGGAAGATGAAG	348	Bujnakovai sur. (2014)
ampicillin	<i>bla</i>	TAGGTTTCAGATTGGCCCTTAG CATARTTCCGATAATASMGCC	297	Hummel i sur. (2007)

Tablica 5. Uvjeti provođenja PCR reakcije

Broj ponavljanja	plnA, plnJ, plnW, plnNC8		plnC, plnEF	
	T [°C]	Vrijeme	T [°C]	Vrijeme
1	95	3 min	95	3 min
30	95	30 sek	95	30 sek
	55	1 min	55	30 sek
	72	1 min	72	1 min
1	72	5 min	72	5 min

3.2.5. Uklanjanje S-proteina s površine bakterijskih sojeva

Prekonoćne bakterijske kulture ispitivanih *Lactobacillus* sojeva su centrifugirane pri 4200 o min⁻¹ tijekom 5 minuta te je talog stanica ispiran dva puta sterilnom fiziološkom

otopinom. Stanice su zatim resuspendirane u 5M GHCl-u i inkubirane pri sobnoj temperaturi tijekom 2 sata. Nakon inkubacije, stanice su centrifugirane pri 4200 o min⁻¹ tijekom 5 min te su dva puta isprane sterilnom fiziološkom otopinom i korištene za sljedeće pokuse.

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

Provedeno je *in vitro* ispitivanje kompetitivne ekskluzije patogene bakterije *Escherichia coli* 3014 sa sojevima BMK kojima su na površini stanica prisutni S-proteini, primjenom Caco-2 stanične linije.

Stanice Caco-2 stanične linije uzgojene se u minimalnom esencijalnom mediju (engl. MEM - *minimum essential medium*) u T-boci volumena 25 cm³ i održavane pri 37 °C i 5 %-tnoj atmosferi CO₂ u minimalnom esencijalnom mediju s dodatkom 10 % (v/v) toplinom inaktiviranog fetalnog goveđeg seruma (56 °C tijekom 30 min). Stanice su čuvane u opisanim uvjetima i svaka 2 dana im je dodan svježi medij. Za ispitivanje kompetitivne ekskluzije stanica bakterija mliječne kiseline, Caco-2 crijevne epitelne stanice su inokulirane u plastične pločice s 24 jažice u koncentraciji od 1 x 10⁵ stanica mL⁻¹ i inkubirane tjedan dana uz izmjenu medija svaka 2 dana. Prije primjene, Caco-2 stanice su isprane 3 puta fosfatnim puferom.

Prekonoćne kulture odabranih sojeva BMK uzgojene anaerobno pri 37 °C u MRS bujonu su centrifugirane pri 4200 o min⁻¹ tijekom 10 min s ciljem uklanjanja viška hranjive podloge da se spriječi mogući negativni učinak niskih pH vrijednosti ili izvanstaničnih proteina u supernatantu kulture. *E. coli* je uzgojena preko noći u BHI bujonu pri 37 °C u aerobnim uvjetima i centrifugirana na isti način kao BMK. Biomasa stanica patogenih bakterija i BMK je resuspendirana u fiziološkoj otopini i izmjerena je optička gustoća tako priređene suspenzije pri A₆₂₀ u mikrotitarskoj pločici. Talog stanica je zatim resuspendiran u odgovarajućim volumenima PBS-a kako bi se dobio OD=1. Zatim je svaki soj podijeljen u dvije Falconice, pri čemu su prvu paralelu činili sojevi s prisutnim S-proteinima, a drugu paralelu ti isti sojevi, ali kojima je uklonjen sloj S-proteina prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.2. Uzorci su centrifugirani 5 min pri 4200 o min⁻¹.

Ispitan je utjecaj predinkubacije BMK na adheziju *E. coli* 3014 na Caco-2 stanice. Caco-2 epitelne stanice su isprane 3 puta u fosfatnom puferu (pH = 7,4) te je u jažicu dodano 1 mL suspenzije BMK i stanice su inkubirane 30 min pri 37 °C. Nakon inkubacije, Caco-2

stanice su ispirane fosfatnim puferom te je u jažice dodano po 1 mL suspenzije patogenih bakterija i nastavljena je inkubacija pri 37 °C kroz 30 min. Prije dodatka suspenzije bakterijskih stanica na Caco-2 stanice, provjeren je početni broj stanica (CFU mL⁻¹) u suspenziji indirektnom metodom, tj. nacjepljivanjem priređenih decimalnih razrjeđenja u Petrijevim zdjelicama s optimalnim hranjivim podlogama. Jažice su nakon inkubacije ispirane 3 puta s 1 mL PBS-a kako bi se uklonile bakterijske stanice koje se nisu adhezirale te su inkubirane 10 min u 0,05 % (v/v) u otopini Triton X-100. Sadržaj svake jažice je prebačen u epicu i centrifugiran 5 min pri 13000 o min⁻¹. Potom je talog stanica resuspendiran u 1 mL fosfatnog pufera, a broj adheziranih stanica je određen indirektnom metodom nacjepljivanjem decimalnih razrjeđenja suspenzije bakterijskih stanica na odgovarajuću podlogu u obliku kapi (10 µL) u dvije paralele. Za određivanje broja poraslih bakterijskih stanica *E. coli* prije i nakon adhezije korištena je selektivna podloga Rapid agar. Nakon 48 sati aerobne inkubacije pri 37 °C su izbrojane izrasle kolonije i rezultat je izražen kao CFU mL⁻¹.

3.2.7. Ispitivanje agregacijskih svojstava BMK izoliranih iz majčinog mlijeka

3.2.7.1. Ispitivanje autoagregacijskih svojstava

Ispitana su autoagregacijska svojstva 4 različita soja bakterija mliječne kiseline uzgojenih u MRS bujonu, a ispitivanja su provedena u dvije paralele. Za prvu paralelu su stanice prikupljene centrifugiranjem (5 minuta pri 4200 o min⁻¹), ispirane dva puta te resuspendirane u fosfatnom puferu (pH = 7,4). Za drugu paralelu su korištene stanice kojima je S-sloj uklonjen prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.2. Volumen od 4 mL tako pripremljenih suspenzija odpipetiran je u penicilinke te homogeniziran na vibromješaču Vortex V-1 plus. Izmjerena je apsorbancija uzoraka u nultom satu pri 620 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica Infinite[®] F Plex te je nakon 5 h inkubacije uzoraka pri sobnoj temperaturi, ponovno izmjerena apsorbancija uzoraka uzetih s površine na isti način (Kos i sur., 2003). Postotak autoagregacije je izračunat prema formuli:

$$\% \text{ autoagregacije} = \left(1 - \frac{A_t}{A_0}\right) \cdot 100$$

gdje je:

A_t - apsorbancija u vremenu (nakon 5 sati)

A_0 - apsorbancija u vremenu 0.

3.2.7.2. Ispitivanje koagregacijskih svojstava

Koagregacija probiotičkih sojeva s patogenim sojevima *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* 3048, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FP1 i *Escherichia coli* 3014 određivana je iz suspenzija koje su se sastojale od 2 mL suspenzija stanica pojedinog soja BMK, s i bez sloja S-proteina i 2 mL suspenzija stanica jednog od test-mikroorganizama. Suspenzije su izmiješane na vibromješaču Vortex V-1 plus te ostavljene stajati 5 sati na sobnoj temperaturi. Postupak mjerenja identičan je postupku korištenom kod ispitivanja svojstva autoagregacije. Uspješnost koagregacije izračunata je pomoću sljedeće formule:

$$\% \text{ koagregacije} = \frac{\frac{\text{OD}(x) + \text{OD}(y)}{2} - \text{OD}(x + y)}{\frac{\text{OD}(x) + \text{OD}(y)}{2}} * 100$$

gdje OD_x i OD_y predstavljaju izmjerene vrijednosti OD_{620} svakog od dva ispitivana soja (0. sat), a $\text{OD}_{(x+y)}$ predstavlja OD vrijednost suspenzije ispitivanog para bakterija u vremenu (5. sat).

3.2.8. Preživljavanje probiotičkih bakterija u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta (GIT)

3.2.8.1. Priprava simuliranog želučanog soka i soka tankog crijeva

Simulirani želučani sok pripremljen je suspendiranjem pepsina (3 g L^{-1}) u 0,5 % sterilnoj otopini natrijevog klorida, kojoj je pH podešen na 2,5 i 3,0 s koncentriranom klorovodičnom kiselinom.

Simulirani sok tankog crijeva pripremljen je suspendiranjem pankreatina (1 g L^{-1}) i žučnih soli ($3,0 \text{ mg mL}^{-1}$ goveđe žuči) u 0,5 % sterilnoj otopini natrijeva klorida, kojoj je pH podešen na 8,0 s natrijevom lužinom.

3.2.8.2. Učinak simuliranog želučanog soka i soka tankog crijeva na preživljavanje probiotičkih bakterija

Ispitan je učinak simuliranih uvjeta gastrointestinalnog trakta na preživljavanje 4 soja bakterija mliječne kiseline uzgojenih u MRS bujonu, a ispitivanja su provedena u dvije paralele. Za prvu paralelu su stanice prikupljene centrifugiranjem (5 minuta pri 4200 o min^{-1}), isprane dva puta te resuspendirane u fiziološkoj otopini. Za drugu paralelu su korištene stanice kojima je S-sloj uklonjen prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.2. Prekonoćne bakterijske kulture centrifugirane su pri 4200 o min^{-1} tijekom 5 min i dva puta isprane sterilnom fiziološkom otopinom. U dijelu suspenzije je određen broj živih stanica mikroorganizama prije inkubacije u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta, a ostatak je centrifugiran 5 min pri 4200 o min^{-1} . Talog stanica je resuspendiran u 3 mL simuliranog želučanog soka te inkubiran pri $37 \text{ }^\circ\text{C}$ tijekom 2 sata. Nakon inkubacije, suspenzija je centrifugirana 5 min pri 4200 o min^{-1} , a talog je resuspendiran u 3 mL fiziološke otopine. Nakon toga, u dijelu suspenzije je određen broj živih stanica nakon inkubacije u želučanom soku, dok je ostatak suspenzije centrifugiran 5 min pri 4200 o min^{-1} . Talog je resuspendiran u 3 mL simuliranog soka tankog crijeva te inkubiran pri $37 \text{ }^\circ\text{C}$ tijekom 4 sata, nakon čega je u dijelu suspenzije određen broj živih stanica nakon inkubacije u tankom crijevu. Broj živih stanica je određivan indirektnom metodom, odnosno nacjepljivanjem decimalnih razrjeđenja suspenzija bakterijskih stanica u fiziološkoj otopini na MRS agar u obliku kapi ($10 \text{ } \mu\text{L}$) u dvije paralele. Nakon 48 h anaerobne inkubacije pri $37 \text{ }^\circ\text{C}$, izbrojane su porasle kolonije te je izračunat broj stanica po mililitru bakterijske kulture (CFU mL^{-1}).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. OSJETLJIVOST NA ANTIBIOTIKE BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE IZOLIRANIH IZ MAJČINOG MLIJEKA

Kako bi se bakterijski sojevi mogli koristiti kao probiotici namijenjeni za primjenu kod ljudi i životinja potrebno je ispitati njihovu rezistenciju na antibiotike. Mikrobiološka rezistencija na antibiotike predstavlja globalni zdravstveni problem zbog sve većeg broja multirezistentnih bakterija i nedostatka novih antibiotika. Antimikrobna rezistencija nastaje tijekom kontinuiranog izlaganja mikroorganizama (bakterija, gljivica, virusa i parazita) djelovanju određenih antimikrobnih sredstava, kao što su npr. antibiotici. To za posljedicu ima prilagodbu određenih mikroorganizama na njihovo djelovanje, dakle mikroorganizmi mogu preživjeti i rasti u prisutnosti antimikrobnog sredstva, koji bi ih u normalnim uvjetima ubio ili inhibirao njihov rast. U ovom slučaju naglasak se stavlja na antibiotsku rezistenciju. Antibiotici su lijekovi koji se koriste za liječenje bakterijskih zaraznih bolesti na način da sprječavaju razmnožavanje bakterija ili ih inaktiviraju putem nekoliko mehanizama, kao što je npr. inhibicija sinteze stanične stijenke ili sprječavaju umnožavanje DNA (Álvarez-Cisneros i Ponce-Alquicira, 2018). Do pojave ovog problema došlo je zbog prekomjerne upotrebe antibiotika kod liječenja ljudi, ali isto tako i njihove nepropisane i često nepotrebne upotrebe kod uzgoja životinja.

Korištenje antibiotika tijekom trudnoće i porođaja utječe na mikrobiotu majčinog mlijeka i povezano je s pojavom antibiotske rezistencije u crijevnoj mikrobioti dojenčeta. To izlaganje antibioticima može voditi prema pojavi gena za rezistenciju na antibiotike (engl. *Antibiotic Resistance Genes*, ARGs) u mikrobioti majčinog mlijeka, koji se onda dojenjem mogu prenijeti na novorođenče. Na taj način može doći do horizontalnog prijenosa gena (engl. *Horizontal Gene Transfer*, HGT) na komensalne, ali i patogene bakterije prisutne u intestinalnoj mikrobioti domaćina, odnosno dojenčeta (Das i sur., 2019). Horizontalni prijenos gena podrazumijeva izmjenu gena između različitih bakterija putem pokretnih genetičkih elemenata, kao što su konjugativni transpozoni, plazmidi i integroni (Partridge i sur., 2018).

Upravo iz tog razloga potrebno je ispitati mogućnosti prijenosa gena za rezistenciju kako bi se provjerila sigurnost primjene potencijalnih probiotičkih sojeva, ali i mogući načini prijenosa „rezistentnih“ gena. Osim što se ispituje antibiotska rezistencija u klinički značajnim bakterijama (patogene bakterije), važno je ispitati prisutnost rezistentnih gena i kod

komensalnih bakterija za koje se dokazalo da i one mogu biti nosioci „rezistentnih“ gena na patogene bakterijske vrste. To je osobito važno ispitati kod onih bakterijskih sojeva koji su namijenjeni za korištenje u prehrani ljudi ili ishrani životinja što uključuje praćenje rezistencije bakterija koje čine prirodnu mikrobiotu tradicionalno fermentirane hrane, koje se upotrebljavaju kao starter kulture i kao dodaci prehrani. Na temelju navedenog treba spomenuti kako je osjetljivost na antibiotike i jedan od glavnih općih izbornih kriterija prilikom odabira potencijalnih probiotičkih sojeva (Šušković i sur., 2001).

Ispitivana je osjetljivost određenih sojeva BMK iz roda *Lactobacillus* izoliranih iz majčinog mlijeka (*Lactobacillus brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20) na 9 različitih antibiotika (ampicilin, vankomicin, gentamicin, kanamicin, streptomycin, eritromicin, klindamicin, tetraciklin i kloramfenikol) pomoću disk – difuzijske metode i E- testa. Osjetljivost na navedene antibiotike nužno je ispitati kod probiotičkih sojeva koji su namijenjeni za primjenu kod ljudi i životinja što je definirano smjericama Europske agencije za sigurnost hrane (EFSA) iz 2012. godine. Vrijednosti promjera zona inhibicije dobivene metodom s antibiotskim diskovima, odnosno disk – difuzijskom metodom uspoređene su s definiranim standardima Instituta za kliničke i laboratorijske studije (engl. *Clinical Laboratory Standards Institute*, CLSI). Ako su dobiveni bakterijski sojevi sa zonama inhibicije većim ili jednakim 20 mm smatraju se osjetljivim (engl. *Sensitive*, S), a oni sa zonama inhibicije manjim od 20 mm, odnosno od 15 do 19 mm smatraju se umjereno osjetljivim (engl. *Intermediate*, I) na ispitivani antibiotik. Ispitivani bakterijski soj se smatra rezistentnim na antibiotik prisutan u filter disku u slučaju da mu izmjerena vrijednost promjera zone inhibicije bude manja ili jednaka 14 mm. Navedene vrijednosti definirane su CLSI standardima. U tablici 6 prikazani su rezultati dobiveni disk – difuzijskom metodom. Prema dobivenim rezultatima je vidljivo kako je kod sva 4 ispitivana bakterijska soja potvrđena rezistencija na vankomicin i na tri aminoglikozidna antibiotika - kanamicin, gentamicin i streptomycin, dok su na ostale antibiotike fenotipski osjetljivi.

Osjetljivost bakterija na navedene antibiotike ispitana je i pomoću E-testa, čime su određene minimalne inhibicijske koncentracije (MIC) antibiotika. Dobiveni rezultati E-testa uspoređeni su sa službenim graničnim vrijednostima (engl. *Cut-off values*) za antibiotsku rezistenciju, koje su propisane od strane Europske agencije za sigurnost hrane za navedene bakterije, a izraženi pomoću MIC vrijednosti. U slučaju da je MIC vrijednost veća od službene granične vrijednosti, bakterija se smatra rezistentnom na ispitivani antibiotik te njezinu rezistentnost

treba potvrditi molekularnim metodama (Álvarez-Cisneros i Ponce-Alquicira, 2018). MIC vrijednosti antibiotika određene E-testom prikazane su u tablici 7, gdje se jasno vidi kako su za antibiotike gentamicin i streptomycin dobivene puno veće MIC vrijednosti, što ukazuju na rezistentnost bakterija prema navedenim antibioticima. U slučaju preostalih ispitivanih antibiotika dobivene su puno manje MIC vrijednosti.

Tablica 6. Osjetljivost bakterija izoliranih iz majčinog mlijeka na 9 antibiotika određena disk-difuzijskom metodom

Bakterijski soj	Antibiotički disk								
	AM	CC	C	E	VA	TE	K	CN	S
MB1	S	S	S	S	R	S	R	R	R
MB2	S	S	S	S	R	S	R	R	R
MB13	S	S	S	S	R	S	R	R	R
MB20	S	S	S	S	R	S	R	R	R

*S-osjetljiv, I-umjereno osjetljiv, R-rezistentan

**ampicilin (AM), klindamicin (CC), kloramfenikol (C), eritromicin (E), vankomicin (VA), tetraciklin (TE), kanamicin (K), gentamicin (CN) i streptomycin (S)

Tablica 7. Vrijednosti MIC ($\mu\text{g mL}^{-1}$) antibiotika potrebne za inhibiciju rasta bakterija izoliranih iz majčinog mlijeka određene E-testom

Bakterijski soj	MIC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)								
	AM	CM	CL	EM	VA	TC	KM	GM	SM
MB1	0,032 (S)	0,047 (S)	1,0 (S)	1,00 (S)	/ (n.r.)	1,5 (S)	/ (n.r.) (R)	32 (R)	256 (R)
MB2	0,023 (S)	0,016 (S)	1,0 (S)	0,25 (S)	/ (n.r.)	3,0 (S)	/ (n.r.) (R)	24 (R)	512 (R)
MB13	0,016 (S)	0,016 (S)	1,5 (S)	0,25 (S)	/ (n.r.)	8,0 (S)	/ (n.r.) (R)	24 (R)	256 (R)
MB20	0,032 (S)	0,032 (S)	1,0 (S)	0,38 (S)	/ (n.r.)	1,0 (S)	/ (n.r.) (R)	96 (R)	512 (R)

*S-osjetljiv; I-umjereno osjetljiv; R-rezistentan; n.r. - *engl.* not required (osjetljivost navedenog antibiotika nije potrebno ispitati prema EFSA-i)

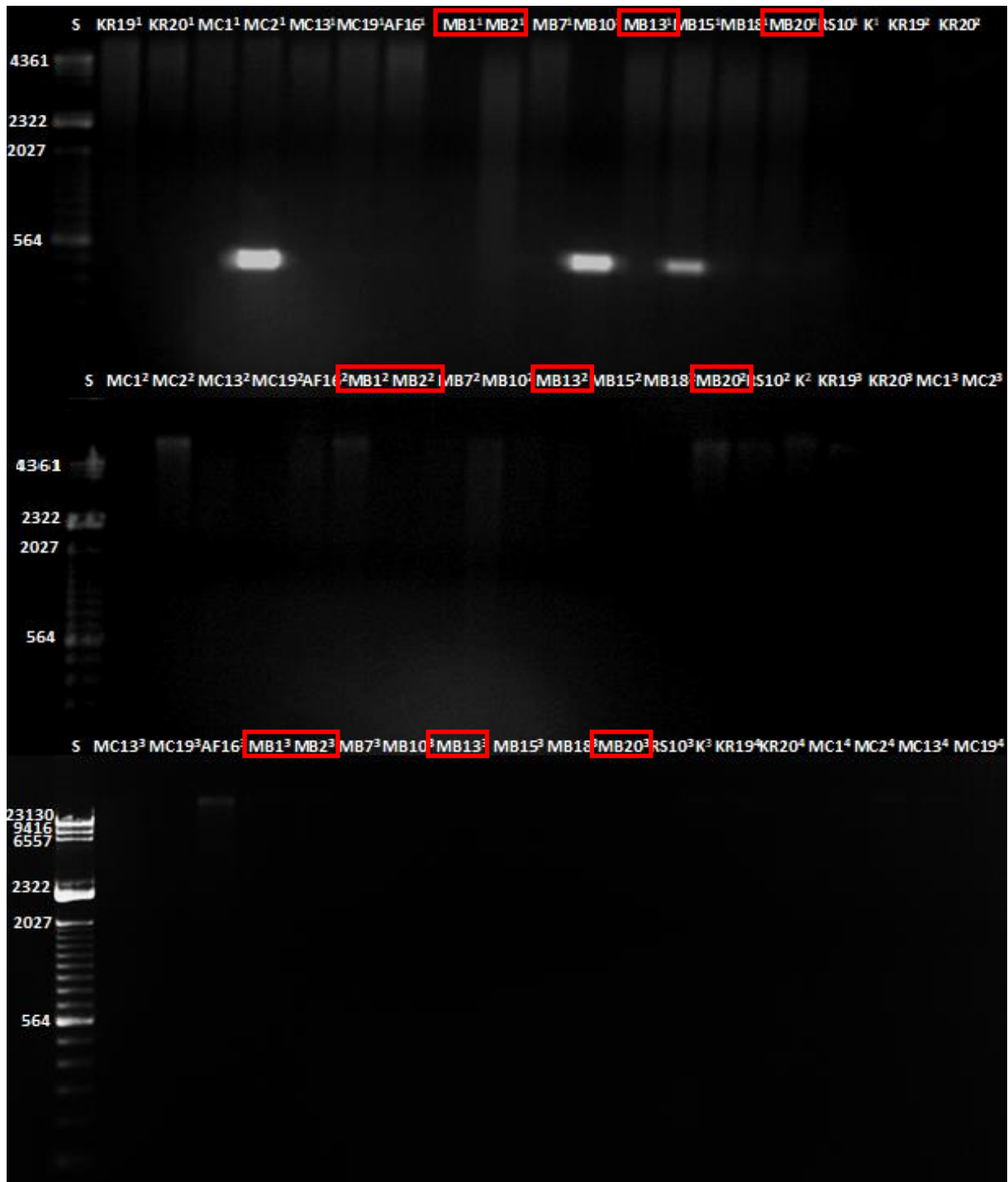
**ampicilin (AM), klindamicin (CM), kloramfenikol (CL), eritromicin (EM), vankomicin (VA), tetraciklin (TE), kanamicin (KM), gentamicin (GN) i streptomycin (SM)

Dobiveni su rezultati u skladu s očekivanjima i znanstvenim istraživanjima, prema kojima većina bakterija iz roda *Lactobacillus* pokazuje visoku urođenu rezistenciju na antibiotike:

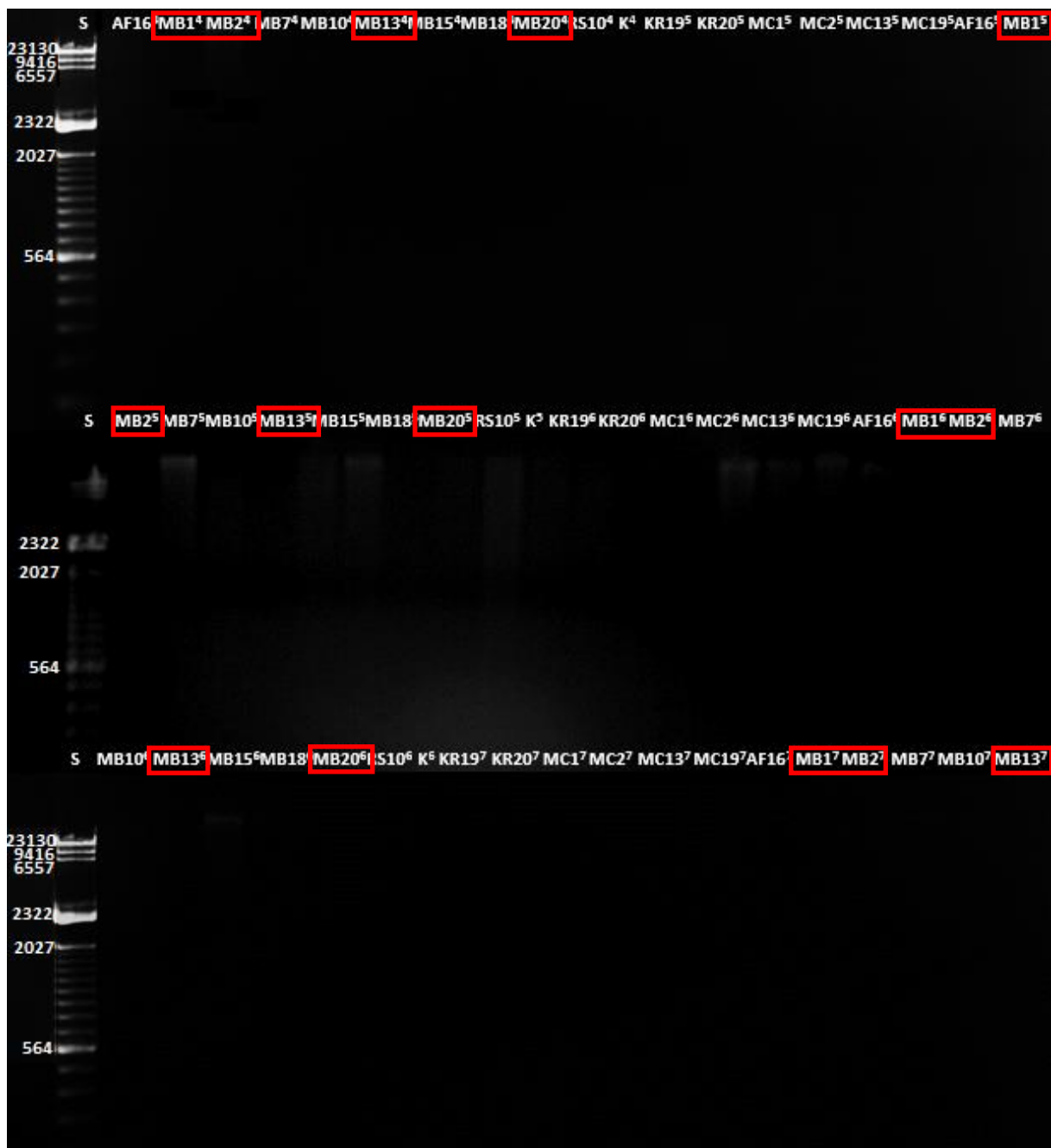
vankomicin, streptomycin, kanamicin, gentamicin, bacitracin, cefoksitin, metronidazol, nitrofurantoin i sulfadiazin te su osjetljivi na antibiotike koji svojim djelovanjem inhibiraju sintezu bjelančevina, a to su kloramfenikol, eritromicin, kuinupristin/dalfopristin, linkomicin, klindamicin i tetraciklin (Abriouel i sur., 2015). Osim navedenih antibiotika laktobacili su još osjetljivi na penicilin (ampicilin, oksacilin i piperacilin), inhibitorima β -laktamaza, ali su rezistentniji na cefalosporine (cefalotin, cefuroksim, ceftriakson i cefoksitin) koji djeluju kao inhibitori sinteze staničnog zida. Također, većina tvari koje inhibiraju sintezu nukleinske kiseline ima slabiji inhibicijski učinak kod većine bakterijskih vrsta roda *Lactobacillus* (Abriouel i sur., 2015; Gueimonde i sur., 2013). Guo i sur. (2017) u svome istraživanju dokazali su 85 %-tnu učestalost rezistencije na vankomicin u sojevima *Lactobacillus* izoliranih iz hrane, posebice kod vrsta *Lactobacillus plantarum* i *Lactobacillus casei*. Ova vrsta rezistencije nije prenosiva na druge bakterijske sojeve jer su geni smješteni na kromosomu (Guo i sur., 2017). Vankomicin stvara kompleks s D-alanil-D alaninom, koji je prekursor staničnog zida te na taj način dolazi do inhibicije sinteze peptidoglikana u staničnoj stijenci bakterije. U nekoliko vrsti BMK terminalni D-alaninski ostatak je zamijenjen s D-laktatom ili D-serinom u muramilpentapeptidu čime je onemogućeno vezanje vankomicina i bakterija postaje rezistentna na antibiotik (Gueimonde i sur., 2013; Delcour i sur., 1999). U aminoglikozidne antibiotike ubrajaju se streptomycin, kanamicin i gentamicin, koji inhibiraju sintezu bjelančevina ireverzibilnim vezanjem na 30 S podjedinicu ribosoma. Na taj način sprječavaju vezanje glasničke RNA na ribosom i to u konačnici dovodi do uginuća bakterijske stanice. Intrizična rezistencija na aminoglikozidne antibiotike kod laktobacila je uvjetovana nedostatkom citokromskog elektronskog transportnog sistema, koji je neophodan za ulazak antibiotika u bakterijsku stanicu (Bedenić, 2009). Rezistencija prema ostalim antibioticima varira između pojedinih vrsta roda *Lactobacillus*. Na temelju rezultata E-testa i disk-difuzijske metode, određene BMK iz roda *Lactobacillus* izolirane iz mikrobiote majčinog mlijeka smatraju se sigurnima za primjenu kod ljudi i životinja.

Nakon ispitivanja osjetljivosti sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka na antibiotike i dokazne rezistencije na određene antibiotike, bilo je potrebno utvrditi da li je rezistencija urođena ili stečena. Da bi se to potvrdilo provedena je genotipska karakterizacija rezistencije ispitivanih bakterijskih sojeva PCR (engl. *Polymerase Chain Reaction*) metodom pomoću specifičnih početnica za gene koji kodiraju za rezistenciju na antibiotike, koji mogu biti podložni horizontalnom transferu na druge bakterije. Genotipska karakterizacija je nužna u slučaju primjene potencijalnih probiotičkih sojeva kod ljudi i životinja s obzirom na to da je dokazana

prisutnost gena za antibiotsku rezistenciju kod više antibiotika (kloramfenikol, eritromicin, streptomycin, tetraciklin i vankomicin) na prijenosnim genetičkim elementima laktobacila (Comunian i sur., 2010).



Slika 3. Elektroforeza produkata PCR reakcije sa specifičnim početnicama za gene koji kodiraju za rezistencije na antibiotike gentamicin⁽¹⁾, ampicilin⁽²⁾, vankomicin⁽³⁾ i eritromicin⁽⁴⁾



Slika 4. Elektroforeza produkata PCR reakcije sa specifičnim početnicama za gene koji kodiraju za rezistencije na eritromicin⁽⁴⁾, streptomycin⁽⁵⁾, kanamicin⁽⁶⁾ i tetraciklin⁽⁷⁾



Slika 5. Elektroforeza produkata PCR reakcije sa specifičnim početnicama za gene koji kodiraju za rezistencije na tetraciklin⁽⁷⁾, klindamicin⁽⁸⁾ i kloramfenikol⁽⁹⁾

Bakterije iz roda *Lactobacillus* su izvrstan receptor za egzogene gene koji se prenose iz jedne bakterijske stanice u drugu konjugacijom, što su dokazali Abriouel i sur. (2015) u svojem istraživanju za konjugativni pAMβ1 plazmid pronađen u bakteriji *Lactobacillus plantarum*, koji se mogao prenijeti iz enterokoka i streptokoka. Nakon provedene PCR metode, dobiveni

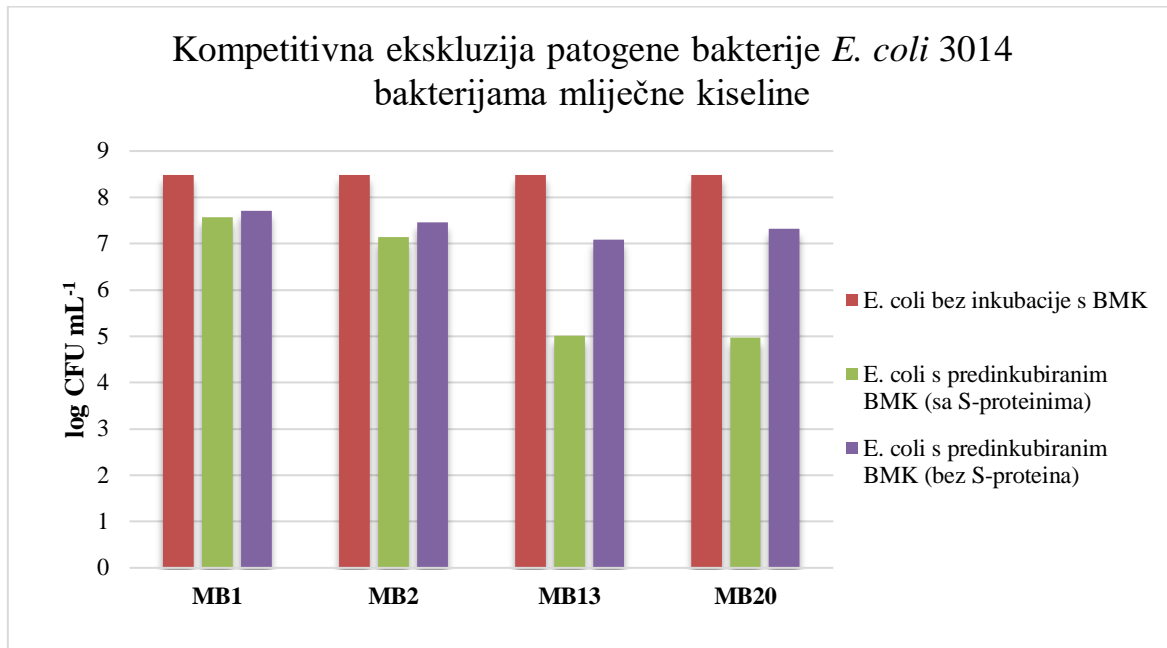
produkti su razdvojeni elektroforezom na agaroznom gelu, a dobiveni rezultati prikazani su na slikama 3-5. Kod ispitivanja prisutnosti gena za rezistenciju kod navedenih bakterija nema vidljivog signala što znači da nije došlo do amplifikacije ciljanih DNA sekvenci, odnosno nisu prisutni geni koji kodiraju za rezistenciju na navedene antibiotike. Niti jedan od ukupno 4 ispitivana *Lactobacillus* soja nije pokazao stečenu rezistenciju na antibiotike. Prema tome, s aspekta antibiotičke rezistencije ispitivani sojevi se mogu smatrati sigurnima za primjenu kao potencijalni probiotici ili funkcionalne starter kulture.

4.2. UTJECAJ S-PROTEINA NA POTENCIJALNA PROBIOTIČKA SVOJSTVA BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE IZOLIRANIH IZ MAJČINOGR MLIJEKA

Sposobnost adhezije na crijevne epitelne stanice ključno je svojstvo koje bakterija mora posjedovati da bi bakterija mogla preživjeti i kolonizirati gastrointestinalni trakt. To je ujedno i vrlo važno svojstvo koje treba posjedovati određena bakterija kako bi se mogla koristiti kao potencijalni probiotik. Bakterije iz roda *Lactobacillus* najčešći su probiotici koji, ukoliko se konzumiraju u odgovarajućim količinama, mogu imati brojne pozitivne učinke na zdravlje domaćina. Brojna istraživanja navode nekoliko mehanizama djelovanja probiotika kojima mogu zaštititi domaćina od raznih gastrointestinalnih infekcija. Jedan od mehanizama njihova djelovanja je i kompeticija s patogenim bakterijama za mjesta vezanja na intestinalnom epitelu jer imaju slične vrste adhezina na svojim površinama koji stupaju u interakciju sa specifičnim receptorima na staničnoj površini domaćina. Pri tom je istaknuta važna uloga sloja S-proteina probiotičkih sojeva prilikom same adhezije na crijevni epitel i kompetitivne ekskluzije s patogenom bakterijom. Dakle, neka od probiotičkih svojstava kao što je adhezija na crijevni epitel, agregacijska svojstva i inhibicija patogena usko su povezana s prisutnošću S-proteina (Panwar i sur., 2017).

U ovom radu ispitana je uloga S-proteina, koje eksprimiraju 4 bakterijska soja izolirana iz majčinog mlijeka, prilikom kompetitivne ekskluzije s patogenom bakterijom *E. coli* 3014. Istraživanje je provedeno *in vitro* primjenom Caco-2 stanične linije. Mjerenje je provedeno u dvije paralele. U prvoj paraleli ispitivani su sojevi s prisutnim S-proteinima, a u drugoj paraleli ti isti sojevi nakon što im je uklonjen sloj S-proteina tretmanom s 5M GHCl-om. Isto tako ispitan je i utjecaj predinkubacije BMK na adheziju *E. coli* 3014 na Caco-2 stanice. Nakon provedene inkubacije izbrojane su izrasle kolonije, a rezultat je izražen kao CFU mL⁻¹.

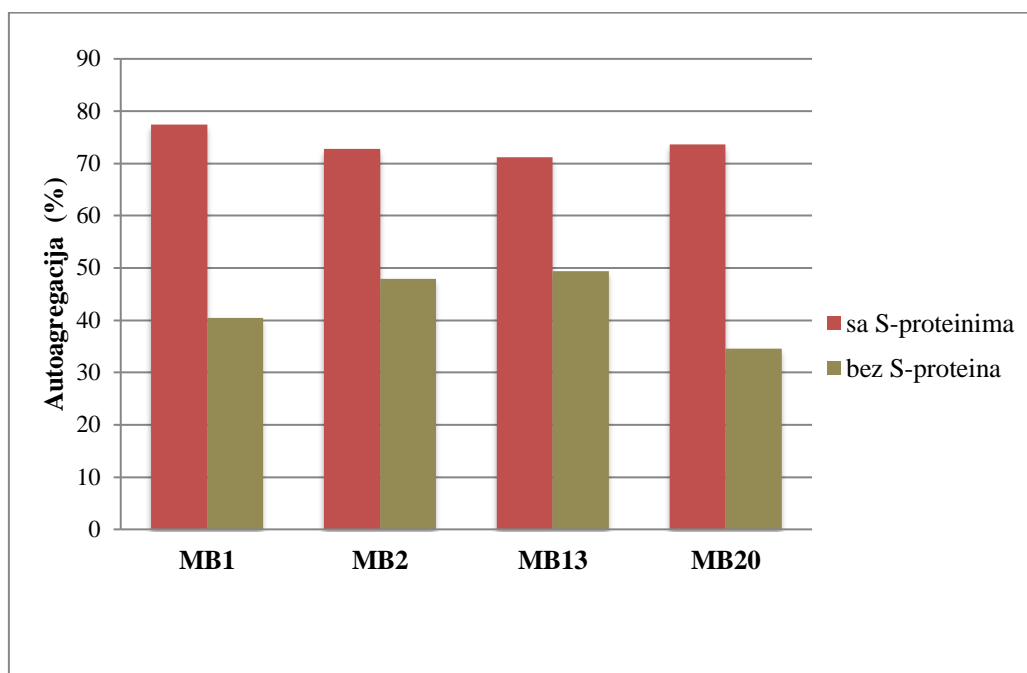
Na slici 6 prikazana je kompetitivna ekskluzija patogene bakterije *E. coli* 3014 sa sojevima *Lb. brevis* MB1, *Lb. brevis* MB2, *Lb. brevis* MB13 i *Lb. brevis* M20 sa S-proteinima i nakon što su S-proteini uklonjeni. Iz rezultata se jasno vidi kako sva 4 ispitana soja BMK pokazuju uspješniju kompetitivnu ekskluziju *E. coli* 3014 kada su S-proteini prisutni, nego kada su S-proteini uklonjeni zato što imaju važnu ulogu u adheziji bakterijskih stanica na crijevni epitel (slika 6).



Slika 6. Kompetitivna ekskluzija patogene bakterije *E. coli* 3014 sa sojevima *Lb. brevis* MB1, *Lb. brevis* MB2, *Lb. brevis* MB13 i *Lb. brevis* M20

S-proteini koji sudjeluju u adheziji bakterije na epitelne stanice crijeva mogu doprinijeti probiotičkoj aktivnosti laktobacila na način da inhibiraju vezanje patogena na epitel domaćina. U nekoliko studija dokazano je kako S-proteini imaju važnu ulogu u inhibiciji adhezije patogena kao što su *E. coli*, *E. coli* 0157:H7 ili *Salmonella* Typhimurium na crijevne stanice (Chen i sur., 2009; Horie i sur., 2002). Xue i sur. (2013) u svojem su istraživanju dokazali kako je uklanjanjem S-proteina, koje eksprimiraju *Lactobacillus* sojevi, tretmanom s 5 M LiCl smanjen njihov inhibitorni učinak prema bakterijama *Clostridium difficile*, *Shigella* i *Salmonella*. To je dokazano ispitivanjem kompetitivne ekskluzije *Lactobacillus* sojeva s navedenim bakterijama te je na taj način zaključeno kako su S-proteini uključeni u adheziju probiotika.

Nadalje je ispitan utjecaj S-proteina na autoagregacijska svojstva 4 različita soja bakterija mliječne kiseline izoliranih iz majčinog mlijeka. Kako bi se ispitala uloga S-proteina u autoagregaciji između pojedinog soja, ispitivanja su se provela u dvije paralele, u jednoj je mjerena apsorbancija bakterijskih sojeva sa S-proteinima, a u drugoj tim istim sojevima, ali nakon tretmana s 5M GHCl-a kojim su S-proteini uklonjeni s površine. Apsorbancija je mjerena pri 620 nm na početku i nakon 5 sati inkubacije te je na temelju toga izračunat postotak autoagregacije. Na slici 7 su prikazani konačni rezultati autoagregacije svih ispitivanih sojeva sa S-proteinima i bez njih. Bakterijski sojevi sa S-proteinima autoagregiraju u rasponu od 72 do 77,41 %, dok se taj raspon kod istih sojeva nakon što su im uklonjeni S-proteini kreće od 34,56 do 49,40 %. Prema dobivenim rezultatima istraživanja uočava se kako je veći postotak autoagregacije kod sva 4 soja kada imaju S-proteine na svojoj površini.

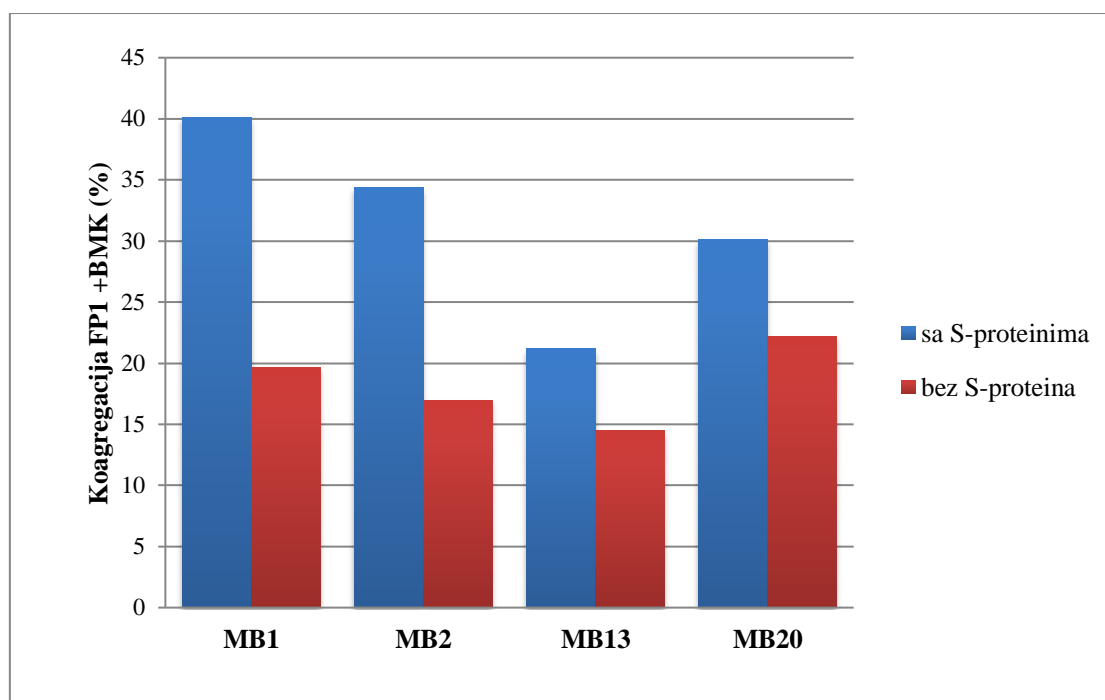


Slika 7. Autoagregacija sojeva *Lactobacillus brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 sa slojem S-proteina i nakon što su oni uklonjeni sa stanične površine

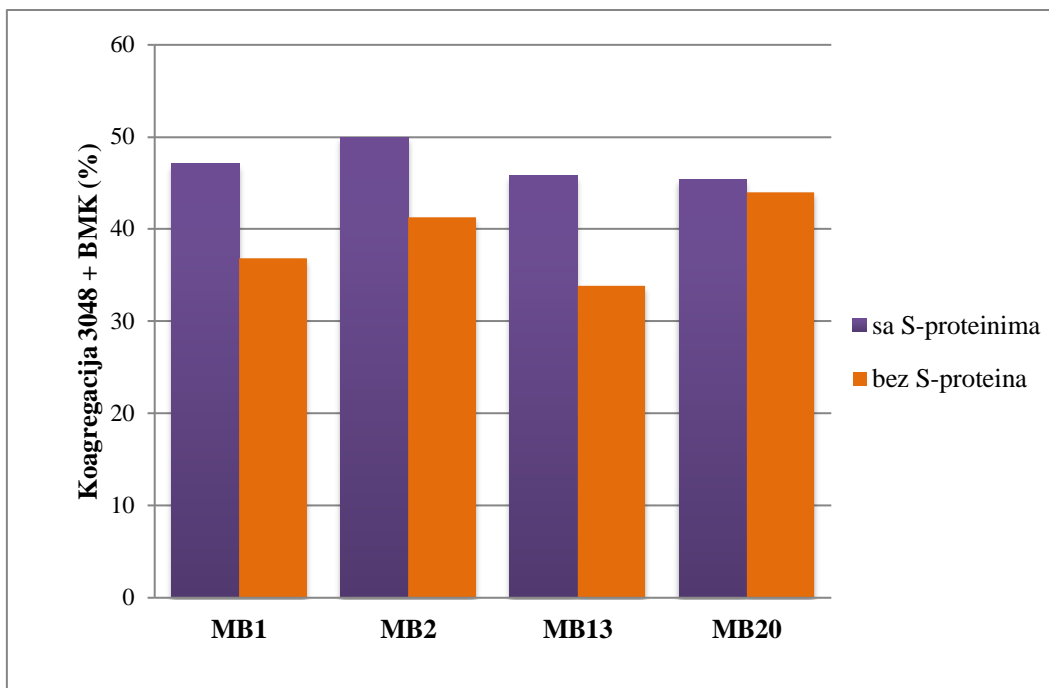
Osim kod autoagregacije, ispitan je utjecaj S-proteina i na koagregaciju navedenih sojeva s test-mikroorganizmima (*Salmonella enterica* serovar Typhimurium FP1, *Staphylococcus aureus* 3048, *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 i *Escherichia coli* 3014). Ispitivanje je također provedeno u dvije paralele, dakle u jednoj je mjerena apsorbancija sojeva sa S-proteinima na površini, a u drugoj tim istim sojevima nakon što su im uklonjeni S-proteini na isti način kao i kod ispitivanja autoagregacije. Postupak mjerenja apsorbancije proveden je na

isti način kao i kod ispitivanja svojstva autoagregacije te je nakon toga izračunata uspješnost koagregacije. Dobivene vrijednosti koagregacije sojeva BMK s i bez S-proteina s patogenima bakterijama prikazane su na slikama 8-11.

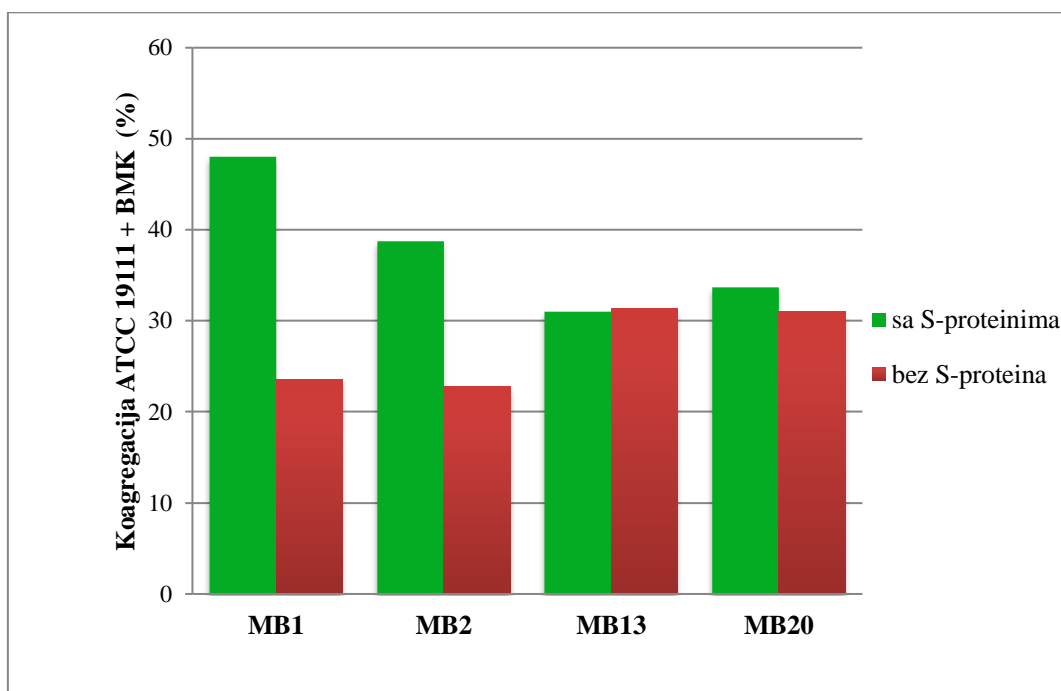
Sva 4 soja BMK pokazala su najbolju koagregaciju sa *Staphylococcus aureus* 3048 u odnosu na preostala 3 bakterije, a dobivene vrijednosti kreću se u rasponu od 47,08 do 49,95 % kada su prisutni S-proteini na površini te 33,85 do 44,03 % u slučaju kad su S-proteini uklonjeni. U slučaju koagregacije soja *Lactobacillus brevis* MB13 s bakterijom *Escherichia coli* 3014 dobiven je veći postotak koagregacije (40,38 %) nakon što su S-proteini uklonjeni, nego kada su S-proteini vezani na staničnu površinu bakterije (26,34 %). To odstupanje od ostalih rezultata može biti rezultat ljudske greške tijekom provođenja eksperimenta. Međutim, na temelju svih ostalih dobivenih rezultata zaključujemo kako sojevi sa S-proteinima bolje koagregiraju s test-mikroorganizmima od sojeva kojima su uklonjeni S-proteini s površine.



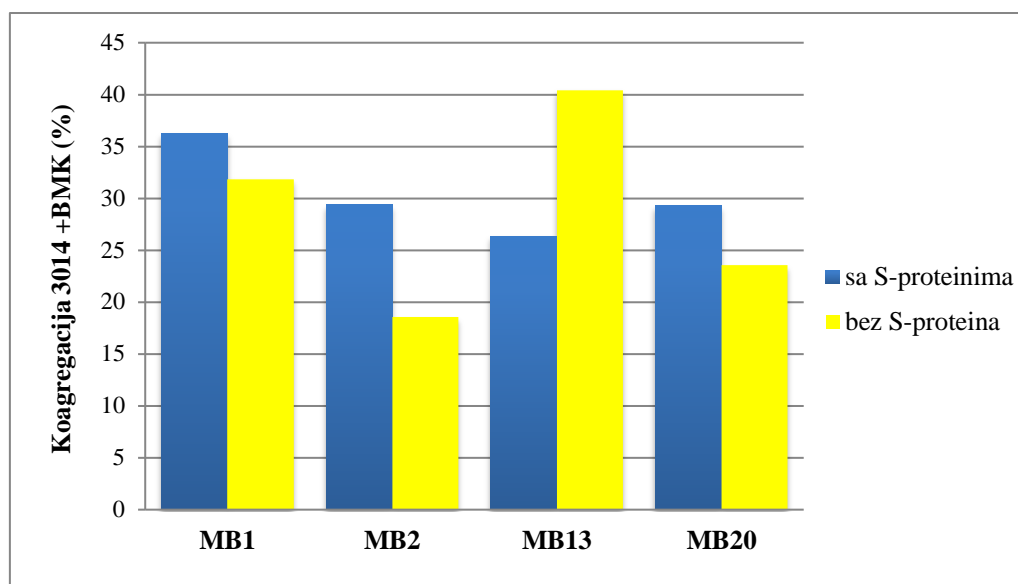
Slika 8. Koagregacija sojeva *L. brevis* MB1, *L. brevis* MB2, *L. brevis* MB13 i *L. brevis* MB20 sa S-proteinima i nakon što su oni uklonjeni, bakterijom *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FP1



Slika 9. Koagregacija sojeva *L. brevis* MB1, *L. brevis* MB2, *L. brevis* MB13 i *L. brevis* MB20 sa S-proteinima i nakon što su oni uklonjeni, bakterijom *Staphylococcus aureus* 3048

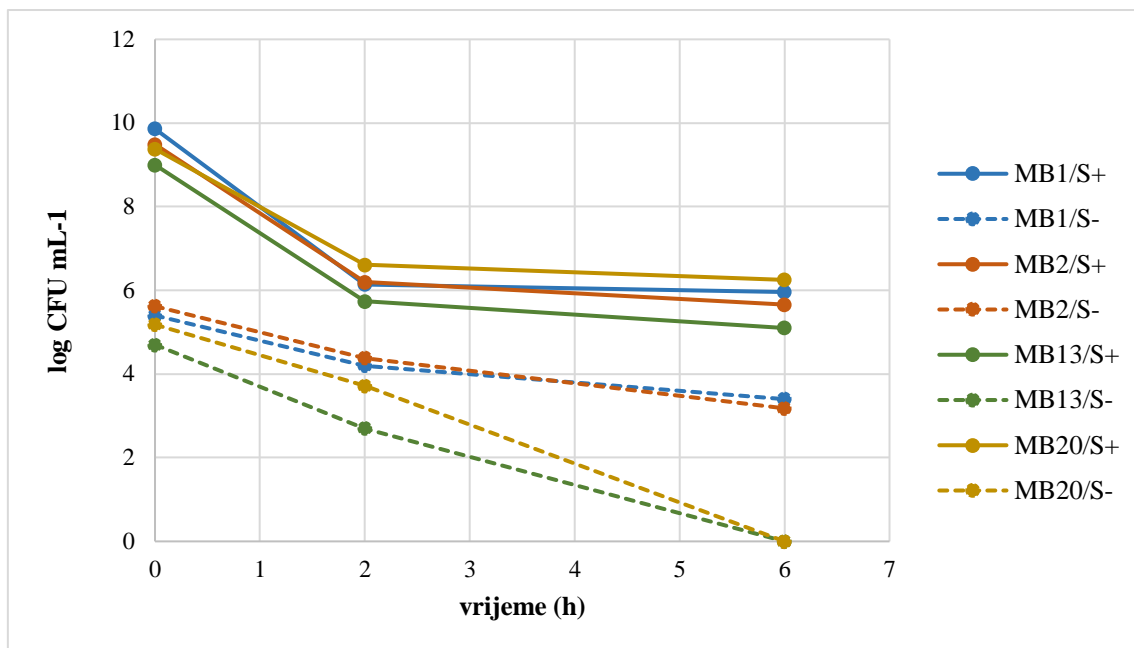


Slika 10. Koagregacija sojeva *L. brevis* MB1, *L. brevis* MB2, *L. brevis* MB13 i *L. brevis* MB20 sa S-proteinima i nakon što su oni uklonjeni, bakterijom *Listeria monocytogenes* ATCC 19111



Slika 11. Koagregacija sojeva *L.brevis* MB1, *L.brevis* MB2, *L.brevis* MB13 i *L.brevis* MB20 sa S-proteinima i nakon što su oni uklonjeni, bakterijom *Escherichia coli* 3014

Drugi autori su u svojim istraživanjima također ukazali na samu važnost S-proteina kod autoagregacije i koagregacije bakterija koje ih eksprimiraju. Kos i sur. (2003) u svojem istraživanju dokazali su kako je uklanjanjem S-proteina s 5M LiCl smanjena mogućnost autoagregacije kod bakterijskog soja *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. Do istih spoznaja došli su i Garrote i sur. (2004) u svom istraživanju s bakterijom *L. kefir* CIDCA 8321 nakon što su uklonjeni S-proteini. Također, uklanjanje S-proteina kod bakterije *L. helveticus* M92 rezultiralo je smanjenjem koagregacijskih svojstava s patogenom bakterijom *Salmonella* Typhimurium FP1 (Beganović i sur., 2011). Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti kako S-proteini imaju važnu ulogu u autoagregaciji i koagregaciji bakterija i da određeni sojevi nakon uklanjanja S-proteina mogu imati manju sposobnost autoagregacije i koagregacije. Autoagregacija, kao proces agregacije međusobno istih bakterijskih sojeva, igra važnu ulogu u formiranju biofilmova. U većini slučajeva, sposobnost autoagregacije bakterija povezana je sa svojstvima adhezije te njihovom sposobnošću preživljavanja i perzistiranja u gastrointestinalnom traktu (Ferreira i sur., 2011; Vlková i sur., 2008). Koagregacija, odnosno proces agregacije različitih bakterijskih sojeva, ima važnu ulogu u sprječavanju vezanja patogena za epitelne stanice gastrointestinalnog trakta. Sojevi *Lactobacillus* kroz sam proces koagregacije formiraju barijeru i na taj način sprječavaju adheziju i kolonizaciju patogene bakterije u GI traktu. Koagregacija s prisutnim potencijalnim patogenom omogućava probiotičkom soju proizvodnju antimikrobnih tvari, koje mogu inhibirati rast patogena u GI traktu (Ferreira i sur., 2011).



Slika 12. Preživljavanje stanica sojeva *L. brevis* MB1, *L. brevis* MB2, *L. brevis* MB13 i *L. brevis* MB20, prije (S+) i nakon ekstrakcije (S-) S-proteina tijekom 6 sati inkubacije u simuliranim uvjetima GIT-a

Ispitan je i utjecaj S-proteina na preživljavanje sojeva BMK u simuliranim uvjetima želučanog soka i soka tankog crijeva prije i nakon ekstrakcije S-proteina s njihove stanične površine. Broj živih bakterijskih stanica određen je brojanjem poraslih kolonija na hranjivoj podlozi (MRS agar). Izračunati broj stanica po mililitru bakterijske kulture (CFU mL⁻¹) za sva 4 ispitana *Lactobacillus* soja nakon inkubacije u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta prikazan je na slici 12. Prema rezultatima preživljavanja *L. brevis* sojeva nakon izlaganja tijekom 6 h simuliranim uvjetima GIT-a iznosi približno 10⁶ CFU mL⁻¹, što je minimalnim propisani broj probiotičkih stanica prema SZO. Nakon ekstrakcije S-sloja ustanovljeno je da *L. brevis* sojevi značajno slabije preživljavaju u simuliranim uvjetima GIT-a, a pri tome se broj poraslih kolonija sojeva MB13 i MB20 tijekom inkubacije značajno smanjuje, te u zadnjem satu inkubacije nije zabilježen broj poraslih kolonija, što upućuje na značajnu zaštitnu ulogu proteina S-sloja u nepovoljnim uvjetima GIT-a. Dobiveni rezultati su u skladu s istraživanjem Meng i sur. (2018), gdje je nakon 4 sata inkubacije u želučanom soku, postotak preživljavanja 4 bakterijska soja (*Lactobacillus bulgaricus* fb04, *L. rhamnosus* fb06, *L. gasseri* fb07 i *L. acidophilus* NCFM) iznosio 82 - 95 % te se on značajno smanjio nakon što su ekstrahirani S-proteini tretmanom s 5 M LiCl (45 - 66 %). Slično je dobiveno i nakon 4 sata inkubacije u soku tankog crijeva, postotak preživljavanja ispitivanih sojeva smanjio se za 22 - 34 % u odnosu na intaktne bakterijske stanice (Meng i sur., 2018).

5. ZAKLJUČCI

1. Prema rezultatima provedene disk – difuzijske metode i E- testa, svi ispitani sojevi BMK (*Lactobacillus brevis* MB1, *Lactobacillus brevis* MB2, *Lactobacillus brevis* MB13 i *Lactobacillus brevis* MB20), su fenotipski osjetljivi na sve primijenjene antibiotike osim na vankomicin i aminoglikozidne antibiotike (kanamicina, gentamicina i streptomicina). PCR metodom nije ustanovljena prisutnost genetičkih determinanti rezistencije na antibiotike.

2. Kompetitivnom ekskluzijom patogene bakterije *E. coli* 3014 sa sojevima BMK dokazan je utjecaj S-proteina prisutnih na staničnoj površini. Uspješnost kompetitivne ekskluzije patogene bakterije ispitivanim sojevima je smanjena nakon uklanjanja S-proteina.

3. Dokazana je uloga S-proteina i prilikom autoagregacije sojeva BMK te njihove koagregacije s patogenim bakterijama *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FP1, *Staphylococcus aureus* 3048, *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 i *Escherichia coli* 3014. Sojevi kojima su uklonjeni S-proteini imaju manju sposobnost autoagregacije i koagregacije s ispitivanim patogenim bakterijama nego sojevi koji na svojoj površini sadrže S-proteine.

4. S-proteini utječu i na sposobnost preživljavanja ispitivanih sojeva BMK u simuliranim uvjetima GIT-a. Nakon ekstrakcije S-proteina smanjena je sposobnost preživljavanja *Lactobacillus* sojeva u simuliranim uvjetima GIT-a što dokazuje i manji broj poraslih kolonija tijekom inkubacije u odnosu na sojeve kod kojih su prisutni S-proteini.

6. LITERATURA

Abriouel, H., Lerma, L. L., Casado Muñoz, M., Montoro, B. P., Kabisch, J., Pichner, R., Cho, G. S., Neve, H., Fusco, V., Franz, C. M., Gálvez, A., Benomar, N. (2015) The controversial nature of the *Weissella* genus: technological and functional aspects versus whole genome analysisbased pathogenic potential for their application in food and health. *Front. Microbiol.* [online] **6**, 1197.<<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2015.01197>>Pristupljeno 24. lipnja 2021.

Álvarez-Cisneros, Y. M., Ponce-Alquicira, E. (2018) Antibiotic Resistance in Lactic Acid Bacteria. U: *Antimicrobial Resistance - A Global Threat* (Kumar, Y., ured.) [online], IntechOpen, <<https://www.intechopen.com/books/6978>>. Pristupljeno 24. lipnja 2021.

Ayivi, R. D., Gyawali, R., Krastanov, A., Aljaloud, S. O., Worku, M., Tahergorabi, R., Claro da Silva, R., Ibrahim, S. A. (2020) Lactic Acid Bacteria: Food Safety and Human Health Applications. *Dairy* **1**, 202–232.

Bedenić, B. (2009) Antibakterijski lijekovi. U: *Medicinska mikrobiologija* (Uzunović-Kamberović, S., ured.), Štamparija Fojnica d.o.o., Zenica, str. 221-252.

Beganović, J., Frece, J., Kos, B., Leboš Pavunc, A., Habjanič, K., Šušković, J. (2011) Functionality of the S-layer protein from the probiotic strain *Lactobacillus helveticus* M92. *Antonie Van Leeuwenhoek* **100**, 43–53.

Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Munoz-Quezada, S., Gomez-Llorente, C., Gil, A. (2012) Probiotic mechanisms of action. *Ann. Nutr. Metab.* **61**, 160–174.

Bintsis, T. (2018a) Lactic acid bacteria: their applications in foods. *J. Bacteriol. Mycol.* **6**, 89-94.

Bintsis, T. (2018b) Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. *Microbiology* **4**, 665–684.

Bujnakova, D., Strakova, E., Kmet, V. (2014) *In vitro* evaluation of the safety and probiotic properties of *Lactobacilli* isolated from chicken and calves. *Anaerobe* **29**, 118–127.

Chen, X., Xu, J., Shuai, J., Chen, J., Zhang, Z., Fang, W. (2007) The S-layer proteins of *Lactobacillus crispatus* strain ZJ001 is responsible for competitive exclusion against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium*. *Int. J. Food Microbiol.* **115**, 307–312.

Chen, X., Chen, Y., Li, X., Chen, N., Fang, W. (2009) Characterization of surface layer proteins in *Lactobacillus crispatus* isolate ZJ001. *J. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 1176–1183.

Claus, H., Akca, E., Debaerdemaeker, T., Evrard, C., Declercq, J. P., Harris, J. R., Schlott, B., König, H. (2005) Molecular organization of selected prokaryotic S-layer proteins. *Can. J. Microbiol.* **51**, 731–743.

Comunian, R., Daga, E., Dupre, I., Paba, A., Devirgiliis, C., Piccioni, V., Perozzi, G., Zonenschain, D., Rebecchi, A., Morelli, L., De Lorentiis, A., Giraffa, G. (2010) Susceptibility to tetracycline and erythromycin of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from traditional Italian fermented foods. *Int. J. Food Microbiol.* **138**, 151–156.

Das, L., Virmani, R., Sharma, V., Rawat, D., Singh, Y. (2019) Human Milk Microbiota: Transferring the Antibiotic Resistome to Infants. *Indian J. Microbiol.* **59**, 410–416.

Delcour, J., Ferain, T., Deghorain, M., Palumbo, E., Hols, P. (1999) The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **76**, 159–184.

EFSA (2008) Scientific opinion of the panel on biological hazards on their request from EFSA on the maintenance of the list of QPS microorganisms intentionally added to food or feed. *EFSA J.* **928**, 1–48.

FAO/WHO (2002) Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario, Canada.

Ferreira, C. L., Grzeskowiak, L., Collado, M. C., Salminen, S. (2011) *In vitro* evaluation of *Lactobacillus gasseri* strains of infant origin on adhesion and aggregation of specific pathogens. *J. Food Prot.* **74**, 1482-1487.

Furrie, E., Macfarlane, S., Kennedy, A., Cummings, J. H., Walsh, S. V., O'neil, D. A., Macfarlane, G. T. (2005) Synbiotic therapy (*Bifidobacterium longum*/Synergy 1) initiates resolution of inflammation in patients with active ulcerative colitis: a randomised controlled pilot trial. *Gut* **54**, 242–249.

Garrote, G. L., Delfederico, L., Bibiloni, R., Abraham, A. G., Perez, P. F., Semorile, L., De Antoni, G. L. (2004) Lactobacilli isolated from kefir grains: Evidence of the presence of S-layer proteins. *J. Dairy Res.* **71**, 222- 230.

Gerbino, E., Carasi, P., Mobili, P., Serradell, M. A., Gómez-Zavaglia, A. (2015) Role of S layer proteins in bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 1877-1887.

González, R., Mandomando, I., Fumado, V., Saco, C., Macete, E., Alonso, P. L., Menendez, C. (2013) Breast milk and gut microbiota in African mothers and infants from an area of high HIV prevalence. *PLoS ONE* **8**, 1–9.

Gueimonde, M., Sánchez, B., De los Reyes-Gavilán, C., Margolles, A. (2013) Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Front. Microbiol.* **4**, 202.

Guo, H., Pan, L., Li, L., Lu, J., Kwok, L., Menghe, B., Zhang, H., Zhang, W. (2017) Characterization of Antibiotic Resistance Genes from *Lactobacillus* Isolated from Traditional Dairy Products. *J. Food Sci.* **82**, 724–730.

Gupta, R., Jeevaratnam, K. (2018) Lactic Acid Bacteria: Probiotic Characteristic, Selection Criteria, and its Role in Human Health (A Review). *J. Emerg. Technol. Innov. Res.* **5**, 411–424.

Harzallah, D., Belhadj, H. (2013) Lactic Acid Bacteria as Probiotics: Characteristics, Selection Criteria and Role in Immunomodulation of Human GI Mucosal Barrier. U: *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes* [online] (Kongo, M., ured.),

IntechOpen, str. 197-216.<[\(PDF\) Lactic Acid Bacteria as Probiotics: Characteristics, Selection Criteria and Role in Immunomodulation of Human GI Muccosal Barrier \(researchgate.net\)](#)> Pristupljeno 20. Lipnja 2021.

Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., Sanders, M. E. (2014) The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **11**, 506–14.

Hirano, J., Yoshida, T., Sugiyama, T., Koide, N., Mori, I., Yokochi, T. (2003) The effect of *Lactobacillus rhamnosus* on enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection of human intestinal cells in vitro. *Microbiol. Immunol.* **47**, 405–409.

Horie, M., Ishiyama, A., Fujihira-Ueki, Y., Sillanpa, EaE J., Korhonen, T. K., Toba, T. (2002) Inhibition of the adherence of *Escherichia coli* strains to basement membrane by *Lactobacillus crispatus* expressing an S-layer. *J. Appl. Microbiol.* **92**, 396-403.

Horvath, P., Coûté-Monvoisin, A. C., Romero, D. A., Boyaval, P., Fremaux, C., Barrangou, R. (2009) Comparative analysis of CRISPR loci in lactic acid bacteria genomes. *Int. J. Food Microbiol.* **131**, 62–70.

Hummel, A. S., Hertel, C., Holzapfel, W. H., Franz, C. M. (2007) Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 730–39.

Hynönen, U., Westerlund-Wikstrom, B., Palva, A., Korhonen, T. K. (2002) Identification by flagellum display of an epithelial cell- and fibronectin-binding function in the SlpA surface protein of *Lactobacillus brevis*. *J. Bacteriol.* **184**, 3360-3367.

Hynönen, U., Palva, A. (2013) Lactobacillus surface layer proteins: structure, function and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 5225-5243.

Khalid, K. (2011) An overview of lactic acid bacteria. *Int. J. Biosci.* **1**, 1-13.

Kos, B., Šušković, J., Vuković, S., Šimpraga, M., Frece, J., Matošić, S. (2003) Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J. Appl. Microbiol.* **94**, 981-987.

Leboš Pavunc, A., Beganović, J., Kos, B., Uroić, K., Šušković, J. (2012) Characterization and application of autochthonous starter cultures for fresh cheese production. *Food Technol. Biotechnol.* **50**, 141-151.

Leroy, F., De Vuyst, L. (2004) Lactic Acid Bacteria As Functional Starter Cultures For The Food Fermentation Industry. *Trends Food Sci. Technol.* **15**, 67-78.

Leroy, F., Falony, G., de Vuyst, L. (2008) Latest Developments in Probiotics. U: *Meat Biotechnology* (Toldrà, F., ured.), Springer Science + Business Media, LLC, str. 217-229.

Li, Q., Liu, X., Zhou, J., Wang, Y. (2015) Aggregation and adhesion abilities of 18 lactic acid bacteria strains isolated from traditional fermented food. *Int. J. Agric. Policy Res.* **3**, 84–92.

Liu, W., Pang, H., Zhang, H., Cai, Y. (2014) Biodiversity of lactic acid bacteria. U: *Lactic Acid Bacteria* (Zhang, H., Cai, Y., ured.), Springer, Dordrecht, TheNetherlands, str. 103–203.

Łubiech, K., Twaruże, M. (2020) *Lactobacillus* Bacteria in Breast Milk. *Nutrients* **12**, 1-13.

Mathur, S., Singh, R. (2005) Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria – a review. *Int. J. Food Microbiol.* **105**, 281-295.

Marsh, P. D., Moter, A., Devine, D. A. (2011) Dental plaque biofilms: communities, conflict and control. *Periodontol 2000* **55**, 16–35.

Martín, R., Langa, S., Reviriego, C., Jiménez, E., Marín, M. L., Olivares, M., Boza, J., Jiménez, J. (2004) The comensal microflora of human milk: new perspectives for food bacteriotherapy and probiotics. *Trends Food Sci. Technol.* **15**, 121–12.

Martín, R., Heilig, H. G., Zoetendal, E. G., Jiménez, E., Fernández, L., Smidt, H., Rodríguez, J.M. (2007) Cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of breast milk among healthy women. *Res. Microbiol.* **158**, 31–37.

Meng, J., Zhu, X., Gao, S. M., Zhang, Q. X., Sun, S., Lu, R. R. (2014) Characterization of surface layer proteins and its role in probiotic properties of three *Lactobacillus* strains. *Int. J. Biol. Macromol.* **65**, 110–114.

Meng, J., Zhang, Q. X., Lu, R. R. (2018) Identification and analysis of the function of surface layer proteins from three *Lactobacillus* strains. *Annals of Microbiology* **68**, 207–216.

Messner, P., Schäffer, C., Egelseer, E. M., Sleytr, U. B. (2010) Occurrence, structure, chemistry, genetics, morphogenesis, and function of S-layers. *Prokaryotic Cell Wall Compounds – Structure and Biochemistry*, Vol. Chapter 2 (Konig, H., Claus, H., Varma, A., eds.), pp. 53–109. Springer, Heidelberg, Germany.

Navarro-Tapia, E., Sebastini, G., Sailer, S., Toledano, L. A., Serra-Delgado, M., Garcia-Algar, Ó., Andreu-Fernández, V. (2020) Probiotic supplementation during the perinatal and infant period: Effects on gut dysbiosis and disease. *Nutrients* **12**, 2243.

Nielsen, D. S., Cho, G. S., Hanak, A., Huch, M., Franz, C. M., Arneborg, N. (2010) The effect of bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum* strains on the intracellular pH of sessile and planktonic *Listeria monocytogenes* single cells. *Int. J. Food Microbiol.* **141**, S53–S59.

Quinto, E. J., Jiménez, P., Caro, I., Tejero, J., Mateo, J., Girbés, T. (2014) Probiotic Lactic Acid Bacteria: A Review. *Food Nutr. Sci.* **5**, 1765-1775.

Panwar, R., Kumar, N., Kashyap, V., Singh, S., Singh, H. (2017) Insights into Involvement of S-layer Proteins of Probiotic Lactobacilli in relation to Gut Health. *Oct. Jour. Env. Res.* **5**, 228-245.

Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N., Jensen, S. O. (2018) Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **31**:e00088-17. doi: [10.1128/CMR.00088-17](https://doi.org/10.1128/CMR.00088-17).

Perez, R. H., Zendo, T., Sonomoto, K. (2014) Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB), various structures and applications. *Microb. Cell Factories* **13**, S3.

Plavša, T. (2010) Jabučno – mliječna fermentacija u vinu – pregledni rad. *Glasnik zaštite bilja* **6**, 70-79.

Reis, N. A., Saraiva, M. A. F., Duarte, E. A. A., de Carvalho, E. A., Vieira, B. B., Evangelista-Barreto, N. S. (2016) Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from human milk. *J. Appl. Microbiol.* **121**, 811-820.

Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolín, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J., Ricciardi-Castagnoli, P. (2001) Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat. Immunol.* **2**, 361–367.

Sakwinska, O., Moine, D., Delley, M., Combremont, S., Rezzonico, E., Descombe, P., Vinyes-Pares, G., Zhang, Y., Wang, P., Thakkar, S. K. (2016) Microbiota In Brest milk of Chinese lactating mothers. *PLoS ONE* **11**, e0160856.

Samaržija, D. (2015) Taksonomija, filogeneza, morfologija, fiziologija i metabolizam bakterija mliječne kiseline i bifidobakterija. U: *Fermentirana mlijeka*, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb, str. 27-84.

Savadogo, A., Ouattara, C. A. T., Bassole, I. H. N., Traore, S. A. (2006) Bacteriocins and lactic acid bacteria - a mini review. *African J. Biotechnol.* **5**, 678-683.

Sleytr, U. B., Messner, P., Pum, D., Sára, M. (1996) Crystalline bacterial cell surface proteins. Landes Company, Academic Press, Austin, Tex.

Sleytr, U. B., Schuster, B., Egelseer E. M., Pum, D. (2014) S-layers: principles and applications. *FEMS Microbiol. Rev.* **38**, 823–864.

Socol, C. R., Porto de Souza Vandenberghe, L., Rigon Spier, M., Pedroni Medeiros, A. B., Yamaguishi, C. T., De Dea Lindner, J., Pandey, A., Thomaz-Socol, V. (2010) The Potential of Probiotics: A Review. *Food Technol. Biotechnol.* **48**, 413–434.

Šušković, J., Brkić, B., Matošić, S. (1997) Mehanizam probiotičkog djelovanja bakterija mliječne kiseline. *Mljekarstvo* **47**, 57-73.

Šušković, J., Kos, B., Goreta, J., Matošić, S. (2001) Role of lactic acid bacteria and bifidobacteria in synbiotic effect. *Food Technol. Biotechnol.* **39**, 227-235.

Šušković, J., Kos, B., Frece, J., Beganović, J., Leboš Pavunc, A. (2009) Probiotički koncept – probiotici kao dodaci hrani i probiotici kao bioterapeutici. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **4**, 77-84.

Upadhyay, N., Moudgal, V. (2012) Probiotics: A Review. *Jcom* **19**, 76–84.

Vitali Čepo, D., Prusac, M., Velkovski Škopić, O., Tatarević, A. (2020) Preporuke o primjeni probiotika u ljekarničkoj praksi. *Medicus* **29**, 115-134.

Vlková, E., Rada, V., Šmehilová, M., Killer, J. (2008) Auto-aggregation and co-aggregation ability in bifidobacteria and clostridia. *Folia Microbiol.* **53**, 263-269.

Xue, C., Zhang, L., Li, H., Wang, S., Li, Q., Luo, X., Liu, W., Du, M., Yi, H., Han, X. (2013) Functionality of the S-layer proteins from *Lactobacillus* in the competitive against enteropathogens infection. *Eur. Food Res. Technol.* **236**, 249–255.

Zdolec, N., Kozačinski, L., Hadžiosmanović, M., Filipović, I., Njari, B. (2009) Antimikrobna rezistencija bakterija mliječne kiseline iz hrane. *Meso* **11**, 130-133.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Amrta Zlatjan

(potpis studenta)