

Funkcionalnost *Levilactobacillus brevis* sojeva iz mikrobiote majčinog mlijeka koji eksprimiraju S-proteine

Kobeščak, Maja

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:159:193267>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-24**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2021.

Maja Kobeščak

1447/N

FUNKCIONALNOST
LEVILACTOBACILLUS BREVIS
SOJEVA IZ MIKROBIOTE
MAJČINOŠ MLIJEKA KOJI
EKSPRIMIRAJU S-PROTEINE

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 prof. dr. sc. Jasne Novak, uz pomoć dr. sc. Martine Banić i Nine Čuljak, mag. ing. biotechn.

Ovaj diplomski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost „Potencijalne terapijske biomolekule druge generacije probiotika (PRO-BIO 2.0)“ (IP-2019-04-2237) voditeljice prof. dr. sc. Blaženke Kos.

Ponajprije se želim zahvaliti svojoj mentorici, prof. dr. sc. Jasni Novak, na stručnom vodstvu, pomoći, brojnim savjetima i prenesenom znanju tijekom provođenja i pisanja ovog rada.

Također želim zahvaliti dr. sc. Martini Banić i Nini Čuljak, mag. ing. biotechn. na velikoj pomoći i korisnim savjetima tijekom izrade ovog rada.

Najveće hvala ide mojim roditeljima, bratu i bakama, bez čije bezuvjetne ljubavi i potpore tijekom cjelokupnog obrazovanja ovo ne bi bilo moguće.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Nutricionizam

FUNKCIONALNOST *LEVILACTOBACILLUS BREVIS* SOJEVA IZ MIKROBIOTE MAJČINOG MLIJEKA KOJI EKSPRIMIRAJU S-PROTEINE

Maja Kobeščak, 1447/N

Sažetak:

Mikrobiota majčinog mlijeka, koja doprinosi razvoju imunološkog sustava i presudna je za sastav intestinalnog mikrobioma novorođenčeta, značajan je, ali još neistražen izvor probiotičkih bakterija. Cilj ovoga rada je izolacija, identifikacija i analiza funkcionalnih svojstava *Lactobacillus* sojeva mikrobiote majčinog mlijeka. 16S rDNA sekvenciranjem ustanovljena je učestalost *Levilactobacillus brevis* između *Lactobacillus* vrsta mikrobiote majčinog mlijeka. Nakon analize površinskih proteina pomoću SDS-PAGE za daljnja istraživanja odabrana su četiri soja *L. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 koji ekspimiraju potencijalne S-proteine. *L. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 uspješno se prilagođavaju na simulirane uvjete gastrointestinalnog trakta jer je nakon inkubacije tijekom 6 sati koncentracija bakterijskih stanica iznosila iznad 10^6 CFU mL⁻¹. S obzirom na to da iskazuju mogućnost autoagregacije iznad 96 % i bakterijske adhezije na otapala, postoji mogućnost uspješne adhezije *L. brevis* sojeva *in vitro*. Sva četiri soja iskazuju inhibicijsko djelovanje prema enteropatogenim mikroorganizmima, ali i prema *Staphylococcus aureus* vrstama, koje su često uzročnik laktacijskog mastitisa. Antistafilokokno djelovanje je značajno funkcionalno svojstvo probiotičkih bakterija, koje ima potencijal bioterapijske primjene. Odabrani *L. brevis* sojevi sintetiziraju S-proteine, imaju potencijal za kolonizaciju gastrointestinalnog trakta te širok spektar antimikrobnog djelovanja što doprinosi daljnjim istraživanjima funkcionalnosti ovih sojeva.

Ključne riječi: 16S rDNA sekvenciranje, *Levilactobacillus brevis*, mikrobiota majčinog mlijeka, S-protein

Rad sadrži: 42 stranice, 11 slika, 3 tablice, 69 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: prof. dr. sc. Jasna Novak

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

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. doc. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc
2. prof. dr. sc. Jasna Novak
3. prof. dr. sc. Jasna Mrvčić
4. doc. dr. sc. Antonija Trontel (zamjena)

Datum obrane: 24. 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: Nutrition

FUNCTIONALITY OF S-PROTEIN EXPRESSING *L. BREVIS* STRAINS ISOLATED FROM HUMAN MILK MICROBIOTA

Maja Kobeščak, 1447/N

Abstract:

The human milk microbiome impacts the development of an infant's immune system and defines the composition of its first gut microbiota and is significant, but still unexplored source of probiotic bacteria. The main goal of this thesis was to identify and describe the functionality of *Lactobacillus* strains isolated from human milk microbiota. *Levilactobacillus brevis* naturally present in human milk microbiota were identified by 16S rDNA sequencing. SDS-PAGE analysis of *L. brevis* MB1, MB2, MB13 and MB20 surfacome suggests the expression of potential S-proteins. *L. brevis* MB1, MB2, MB13 and MB20 successfully adapted to the simulated gastrointestinal conditions and after 6 hours incubation survived in the counts of over 10^6 CFU mL⁻¹. *L. brevis* MB1, MB2, MB13 and MB20 exerted adhesion ability *in vitro* since measured autoaggregation of bacterial cells was higher than 96 % and showed bacterial adhesion to solvents. All four strains inhibit enteropathogenic microorganisms, as well as *Staphylococcus aureus* species, a common cause of lactation mastitis. Antistaphylococcal activity is a significant functional feature of probiotic bacteria, with potential for biotherapeutic use. Selected strains of *L. brevis* synthesize S-proteins, have the potential to colonize gastrointestinal tract and have a wide range of antimicrobial effects, which contribute to further research of their functionality.

Keywords: 16S rDNA sequencing, human milk microbiota, *Levilactobacillus brevis*, S-protein

Thesis contains: 42 pages, 11 figures, 3 tables, 69 references, 0 supplements

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. Jasna Novak, Full professor

Technical support and assistance: PhD. Martina Banić, MSc Nina Čuljak

Reviewers:

1. PhD. Andreja Leboš Pavunc, Assistant professor
2. PhD. Jasna Novak, Full professor
3. PhD. Jasna Mrvčić, Full professor
4. PhD. Antonija Trontel, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: 24 September 2021

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. RAZNOLIKOST EKOSUSTAVA KAO IZVORA PROBIOTIČKIH SOJEVA	2
2.1.1. Humani ekosustavi kao izvor korisnih bakterija s bioaktivnim učincima	2
2.1.2. Majčino mlijeko kao izvor korisnih bakterija s bioaktivnim učincima	3
2.2. MIKROBIOTA MAJČINOG MLIJEKA KAO IZVOR BAKTERIJA ZA KOLONIZACIJU INTESTINALNE MIKROBIOTE NOVOROĐENČETA.....	5
2.3. S-PROTEIN KAO FUNKCIONALNA BIOMOLEKULA BAKTERIJA IZ MIKROBIOTE MAJČINOG MLIJEKA	7
3. EKSPERIMENTALNI DIO	8
3.1. MATERIJALI	8
3.1.1. Bakterijski sojevi.....	8
3.1.2. Hranjive podloge.....	8
3.1.3. Kemikalije.....	9
3.1.4. Aparatura i pribor.....	10
3.2. METODE RADA.....	11
3.2.1. Izolacija bakterija iz roda <i>Lactobacillus</i> iz mikrobiote majčinog mlijeka.....	11
3.2.2. Održavanje i čuvanje mikroorganizama.....	11
3.2.3. Izolacija genomske DNA iz bakterijskih sojeva	11
3.2.4. RAPD-PCR (<i>engl. Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction</i>) i hijerarhijska klaster analiza elektroforetskih profila PCR produkata.....	12
3.2.5. Genotipska identifikacija bakterija iz majčinog mlijeka	13
3.2.5.1. <i>Amplifikacija 16S rDNA PCR metodom</i>	13
3.2.5.2. <i>Sekvenciranje 16S rDNA gena</i>	13
3.2.6. Ekstrakcija i natrij dodecil sulfat-poliakrilamidna gel elektroforeza (<i>engl. Sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE</i>) površinskih proteina.....	13
3.2.7. Preživljavanje sojeva u nepovoljnim simuliranim uvjetima gastrointestinalnog sustava.....	14
3.2.7.1. <i>Priprava simuliranog želučanog soka i soka tankog crijeva</i>	14
3.2.7.2. <i>Incubiranje bakterijskih stanica u simuliranim sokovima gastrointestinalnog sustava</i>	15
3.2.7.3. <i>Određivanje broja živih mikroorganizama indirektnom metodom</i>	15
3.2.8. Ispitivanje svojstava autoagregacije bakterijskih stanica	15
3.2.9. Mikrobna adhezija na otapala (<i>engl. Microbial adhesion to solvents, MATS</i>).....	16
3.2.10. Određivanje antimikrobne aktivnosti turbidimetrijskom metodom	16
4. REZULTATI I RASPRAVA	18
4.1. IZOLACIJA BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE IZ MIKROBIOTE MAJČINOG MLIJEKA.....	18
4.2. ISPITIVANJE PRISUTNOSTI S-PROTEINA BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE IZ MIKROBIOTE MAJČINOG MLIJEKA	19
4.3. IDENTIFIKACIJA BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE IZ MIKROBIOTE MAJČINOG MLIJEKA	20
4.4. PREŽIVLJAVANJE <i>L. BREVIS</i> U SIMULIRANIM UVJETIMA GIT-a.....	22
4.5. ADHEZIJSKA SVOJSTVA <i>L. BREVIS</i> SOJEVA IZ MIKROBIOTE MAJČINOG MLIJEKA	24
4.6. ANTIBAKTERIJSKO DJELOVANJE <i>L. BREVIS</i> SOJEVA IZ MIKROBIOTE MAJČINOG MLIJEKA..	28
5. ZAKLJUČCI	34
6. LITERATURA	35

1. UVOD

Majčino mlijeko optimalan je izvor biološki aktivnih tvari i nutrijenata potrebnih za prehranu novorođenčeta. Dugo se vremena smatralo da je majčino mlijeko sterilno, ali prema recentnim istraživanjima ustanovljeno je da sadrži vlastitu mikrobiotu. Upravo bakterije u majčinom mlijeku doprinose kolonizaciji gastrointestinalnog trakta (GIT) i formiranju intestinalne mikrobiote novorođenčeta te imaju značajnu ulogu u razvoju imunološkog sustava i štite od kroničnih nezaraznih bolesti kasnije tijekom života. Bakterije prirodno prisutne u majčinom mlijeku imaju GRAS (*engl. Generally recognized as safe*) status zbog dokazane sigurnosti primjene tijekom mnogih godina, humanog su porijekla i imaju potencijalno probiotičko djelovanje, što ih čini zanimljivima za daljnja istraživanja (Ruiz i sur., 2019).

Cilj ovog rada bio je identificirati i opisati bakterijske sojeve izolirane iz mikrobiote majčinog mlijeka. Nakon izolacije genomske DNA iz odabranih sojeva, provedena je genotipska identifikacija 16S rDNA sekvenciranjem. Prisutnost S-proteina u bakterijama izoliranim iz mikrobiote majčinog mlijeka do sada nije potvrđena, stoga je za identificirane sojeve ispitana i prisutnost S-proteina natrij dodecil sulfat-poliakrilamidnom gel elektroforezom (SDS-PAGE), s obzirom na to da je poznato da su određene probiotičke bakterije producenti S-proteina. Da bi korisne bakterije mogle pozitivno djelovati na organizam domaćina, ključno je da nakon prolaska kroz GIT zadrže visoku koncentraciju biomase tijekom određenog vremenskog perioda. Zbog toga je ispitana sposobnost preživljavanja odabranih sojeva u GIT-u simulacijom uvjeta u želucu i tankom crijevu. U svrhu daljnje karakterizacije odabranih sojeva, ispitana su svojstva autoagregacije i mikrobne adhezije na otapala. Oba svojstva ukazuju na sposobnost bakterije da se veže na epitelne stanice crijeva. Turbidimetrijskom metodom ispitano je antimikrobno djelovanje supernatanata odabranih sojeva prema sedam patogenih test-mikroorganizama, a za definiranje bakteriocinskog potencijala i prema četiri srodne bakterije mliječne kiseline (BMK).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. RAZNOLIKOST EKOSUSTAVA KAO IZVORA PROBIOTIČKIH SOJEVA

Većina kasnije okarakteriziranih probiotičkih sojeva humanog su porijekla te su izvorno izolirani iz debelog crijeva, tankog crijeva i majčinog mlijeka, a mnogi su izolirani iz ekosustava hrane poput mlijeka i fermentiranih mliječnih proizvoda koji su vjerojatno animalnog porijekla.

Prilikom primjene probiotičkih sojeva kao dodataka prehrani ili prehrambenih proizvoda doprinose funkcionalnim učincima poput smanjenja razine kolesterola u krvi, kolonizacije intestinalnog, urogenitalnog i respiratornog trakta, sudjelovanja u metabolizmu laktoze, apsorpciji kalcija i sintezi vitamina, stimulaciji imunološkog sustava te direktno i/ili indirektno inhibiranju karcinogeneze, proizvodnji antimikrobnih molekula, smanjenju infekcija i ublažavanju poremećaja funkcija probavnog sustava (Zommiti i sur., 2020).

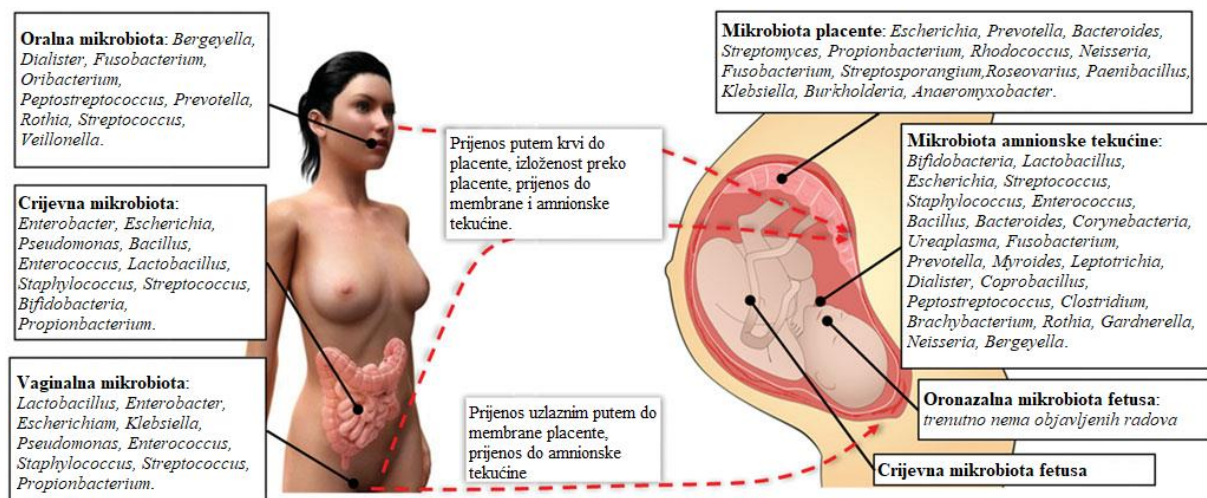
2.1.1. Humani ekosustavi kao izvor korisnih bakterija s bioaktivnim učincima

Novorođenče sve esencijalne nutrijente za rast i razvoj dobiva iz majčinog mlijeka (Martin i sur., 2016). Osim nutrijenata, majčino mlijeko pozitivno utječe na imunološki sustav djeteta i štoviše, predstavlja „inokulum“ koji će kolonizirati mikrobiotu gastrointestinalnog sustava novorođenčeta (Fernández i sur., 2013). Nekada se smatralo da je majčino mlijeko sterilno, ali nedavno provedene studije pokazuju suprotno (Mediano i sur., 2017). Ustanovljeno je da je sastav majčinog mlijeka promjenjiv, a mijenja se s obzirom na fazu dojenja (Cabrera-Rubio i sur., 2012).

Svjetska zdravstvena organizacija (*engl. World Health Organization, WHO*) preporuča dojenje kao isključivi način prehrane do 6 mjeseci starosti djeteta, ali unatoč preporuci, manje od 40 % djece je isključivo dojeno (UNICEF, 2018). Brojni su razlozi za prestanak dojenja, a najčešće se radi o mastitisu, čija je učestalost 33 % (Civardi i sur., 2013; Jiménez i sur., 2008). S obzirom na to da su bakterijski uzročnici mastitisa najčešće *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus epidermidis*, prvi izbor liječenja su antibiotici (Angelopoulou i sur., 2018). Terapija antibioticima iskazuje antimikrobni učinak i na autohtonu mikrobiotu majke i djeteta pa se istražuju alternativni načini liječenja, poput antimikrobnog djelovanja bakteriocina (Fernández i sur., 2013), antimikrobnih peptida koji su produkt određenih vrsta bakterija (Cotter i sur., 2013).

Točan mehanizam bakterijske kolonizacije majčinog mlijeka nije u potpunosti razjašnjen, ali je poznato da se bakterije iz mikrobiote gastrointestinalnog sustava majke mogu translocirati u mliječnu žlijezdu (Perez i sur., 2007). Drugi potencijalni ekosustavi tijela čovjeka kao izvor korisnih bakterija s bioaktivnim učincima su koža, usna šupljina novorođenčeta pa čak i mikrobiota partnera (Biagi i sur., 2017; Ross i sur., 2017).

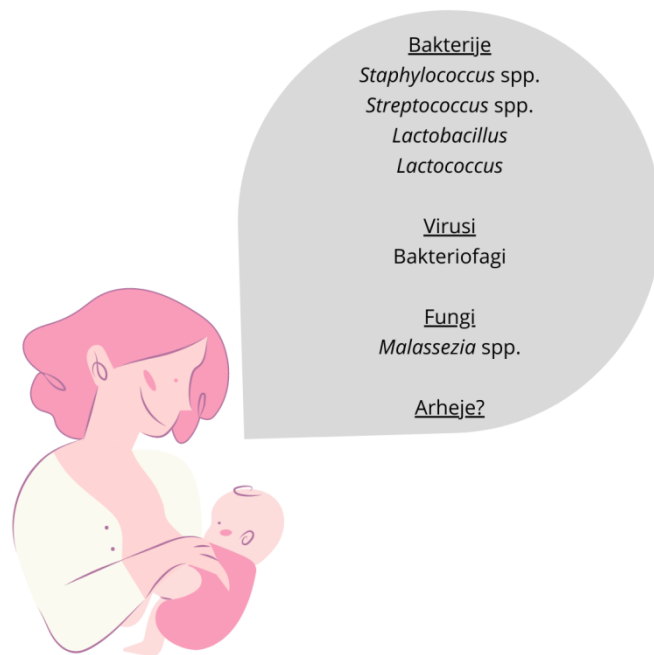
Na slici 1 prikazani su najčešće identificirani bakterijski sojevi različitih humanih ekosustava te pretpostavljeni mehanizmi za kolonizaciju mikrobiote fetusa.



Slika 1. Najzastupljeniji bakterijski sojevi u mikrobioti majke i fetusa i potencijalni izvori bakterija za kolonizaciju mikrobiote fetusa (prilagođeno prema Stinson i sur., 2017)

2.1.2. Majčino mlijeko kao izvor korisnih bakterija s bioaktivnim učincima

Istraživanja prisutnosti mikroorganizama u majčinom mlijeku uglavnom su se fokusirala na dokazivanje prisutnosti bakterija, stoga nije iznenađujuće što se dugo smatralo kako su bakterije jedina vrsta mikroorganizama prisutna u majčinom mlijeku, no prema recentnim istraživanjima, u majčinom mlijeku zastupljeni su, iako u nižem postotku, brojni drugi mikroorganizmi, poput virusa i funga (slika 2). Osim mikrobiote, u majčinom se mlijeku nalaze i funkcionalne biomolekule poput hormona, citokina, imunoglobulina, laktoferina, antitijela, miRNA i oligosaharida (Stinson i sur., 2020).



Slika 2. Mikroorganizmi identificirani u majčinom mlijeku (prilagođeno prema Stinson i sur., 2020)

Imunološki sustav prva je linija obrane organizma od bakterija, virusa i alergena. Kod novorođenčeta se imunodgovor tek razvija prilikom prvog susreta s vanjskim okolišem (Gervassi i Horton, 2014), stoga se kao odgovor na izloženost mukoze gastrointestinalnog i respiratornog trakta okolišnim čimbenicima tijekom ranog djetinjstva pokreće niz imunorekacija (Torow i sur., 2017). Ograničena antioksidativna i protuupalna aktivnost respiratornog i gastrointestinalnog trakta, smanjeno lučenje imunoglobulina, odgođena funkcionalnost T-stanica i nedovoljno razvijene fizičke i kemijske zaštitne barijere (npr. ograničena kiselost GIT) karakteristike su imunološkog sustava novorođenčeta (Yu i sur., 2018). Tijekom dojenja mikrobiota i funkcionalne biomolekule majčinog mlijeka dopijevaju u organizam novorođenčeta gdje utječu na sastav mikrobiote GIT, stimuliraju mukozne stanice GIT te potiču razvoj imunološkog sustava. Prvi mjeseci života predstavljaju prekretnicu u razvoju djeteta, a majčino mlijeko doprinosi razvoju imunološke obrane od patogena i tolerancije na prisutne antigene (Iwasaki i Medzhitov, 2015).

2.2. MIKROBIOTA MAJČINOG MLIJEKA KAO IZVOR BAKTERIJA ZA KOLONIZACIJU INTESTINALNE MIKROBIOTE NOVOROĐENČETA

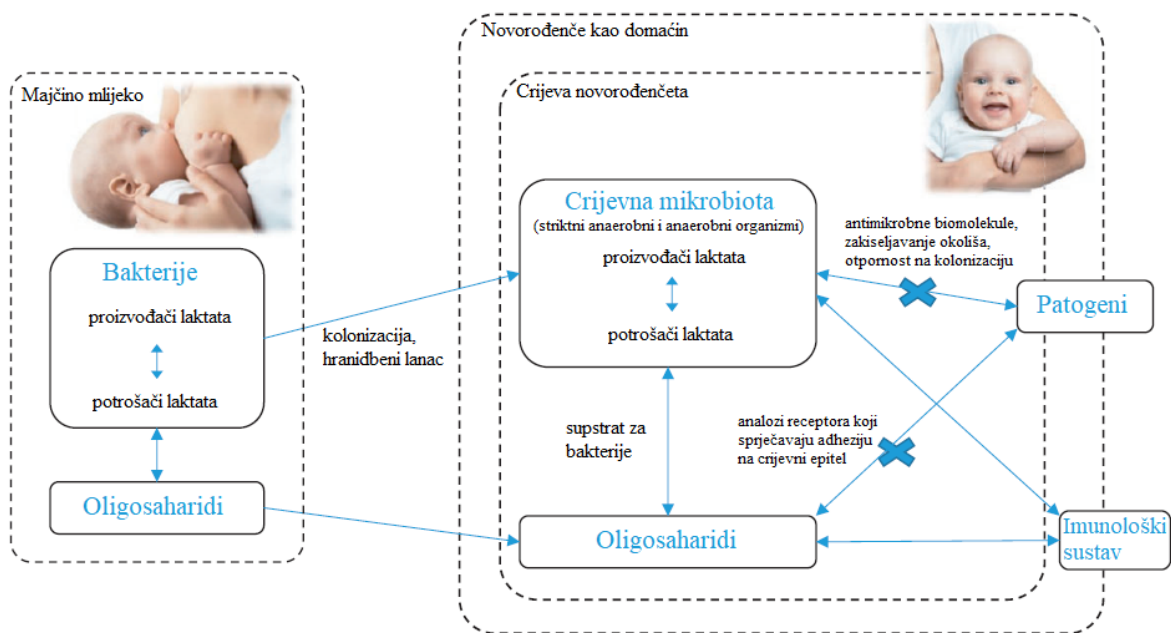
Dominantne vrste bakterija prisutne u majčinom mlijeku su *Staphylococcus*, *Streptococcus* i *Propionibacterium*, a često su prisutni i pripadnici vrsta *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Rothia* i *Veillonella*. Dodatno, u majčinom su mlijeku u manjim postocima relativne zastupljenosti prisutne i bakterije iz vrste *Bacteroides*, *Enterococcus*, *Ralstonia*, *Pseudomonas*, *Escherichia/Shigella* (Stinson i sur., 2020). Karakterističan sastav mikrobiote majčinog mlijeka povezuje se s geografskom lokacijom i načinom života i prema tome je ustanovljeno da je bioraznolikost sastava mikrobiote žene koje žive u ruralnom području veća u usporedbi s mikrobiotom žene iz urbanih sredina. Pri tome su vrste iz rodova *Streptococcus* i *Staphylococcus* identificirane u mlijeku majki neovisno o geografskoj i demografskoj lokaciji (Lackey i sur., 2019).

Brojna su istraživanja pokazala kako mikrobiota majčinog mlijeka i njeni metaboliti pozitivno utječu na razvoj gastrointestinalnog i imunološkog sustava novorođenčeta (Stewart i sur., 2018; Praveen i sur., 2015) te da postoje značajne razlike u sastavu, raznolikosti i ulozi mikrobiote gastrointestinalnog sustava u novorođenčadi koja su isključivo dojena i novorođenčadi koja su uz dojenje primali drugu hranu (Ho i sur., 2018).

Poznato je da bakterijski sojevi iz mikrobiote majčinog mlijeka potiču imunološki odgovor i inhibiraju preživljavanje patogena na način da potiču lučenje IgA iz mukoznih stanica i razvoj B-stanica u Peyerovim pločama kao prvi korak u obrani organizma od štetnih učinaka (Kotani i sur., 2014) i induciraju sazrijevanje citotoksičnih Th1 stanica *in vitro* (M'Rabet i sur., 2008). Bakterije iz roda *Lactobacillus* mogu potaknuti otpuštanje TNF- α i Th1 citokina i aktivirati regulatorne T-stanice, NK stanice i CD4⁺ i CD8⁺ T-stanice (Fernandez i sur., 2013), a komensalne bakterije poput *Lactobacillus gasseri* i *Lactobacillus crispatus* imaju sposobnost adhezije na epitel crijevne sluznice, čime ukazuju na bolju kolonizaciju korisnih bakterija u GIT dojene djece, dok *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus gasseri* i *Streptococcus salivarius* smanjuju adheziju patogena na epitelne stanice GIT *ex vivo* (Damaceno i sur., 2017). Veći udio bakterija iz vrste *Bifidobacterium* u prvom tjednu života povezuje se s većom razinom IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-13 i TNF u 3. godini života (Rabe i sur., 2020), a prema Malago i sur. (2010) bakterije iz mikrobiote majčinog mlijeka štite epitel crijeva novorođenčeta od gastrointestinalnih infekcija.

Prema Stewart i sur. (2018), dojenje je najznačajniji čimbenik koji je utjecao na sastav i ulogu mikrobiote gastrointestinalnog sustava. Prve godine života ključne su za razvoj intestinalne mikrobiote, a sva odstupanja prilikom stvaranja mikrobiote povezuju se s razvojem neinfektivnih bolesti poput astme, alergija, pretilosti i neurodegenerativnih bolesti kasnije u životu. Upravo zbog toga je značajno u potpunosti razumjeti zaštitnu ulogu majčinog mlijeka u tom procesu. Razumijevanje bi potencijalno omogućilo optimizaciju mikrobiote majčinog mlijeka tijekom dojenja, ali i u proizvodnji nadomjesnih formula za novorođenčad te bi time direktno djelovali na prevenciju i smanjenje prevalencije kroničnih neinfektivnih bolesti u svijetu (Stinson, 2019).

Utjecaj majčinog mlijeka na razvoj gastrointestinalnog i imunološkog sustava novorođenčeta prikazan je na slici 3.



Slika 3. Učinak mikrobiote i oligosaharida majčinog mlijeka na intestinalnu mikrobiotu novorođenčeta te uspostavljanje mikrobiote putem hranidbenog lanca, interakcija s imunološkim sustavom i inhibicijom patogena (prilagođeno prema Jost i sur., 2015)

2.3. S-PROTEIN KAO FUNKCIONALNA BIOMOLEKULA BAKTERIJA IZ MIROBIOTE MAJČINOG MLIJEKA

S-proteini su površinski proteini koji tvore vanjsku ovojnica (S-sloj) bakterijske stanice. Identificirani su u Gram-pozitivnim i Gram-negativnih bakterijskim vrstama. S-sloj čine brojne identične podjedinice (gliko)proteina koje su međusobno i s površinom stanice povezani nekovalentnim interakcijama. Proteini podjedinica uglavnom sadrže hidrofobne i kisele aminokiseline (Sára i Sleytr, 2000). Do sada opisane uloge S-proteina uključuju održavanje oblika stanice (Engelhardt, 2007), posredovanje u bakterijskoj adheziji (Beganović i sur., 2011a) i zaštitnu ulogu od raznih okolišnih čimbenika, poput antimikrobnih peptida (de la Fuente-Núñez i sur., 2012), mehaničkih oštećenja (Engelhardt, 2007), promjena okolišnog pH (Gilmour i sur., 2000).

Pojedini sojevi roda *Lactobacillus* eksprimiraju S-proteine. *Levilactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus hilgardii* i pripadnici nekadašnje skupine *Lactobacillus acidophilus* sadrže S-proteine. U vrstama *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* i *Lactobacillus rhamnosus* postojanje S-proteina nije ustanovljeno, štoviše *Lactobacillus casei* se smatra vrstom koja ne proizvodi S-proteine (Hynönen i Palva, 2013). Najčešće predložena uloga S-proteina u bakterijama iz roda *Lactobacillus* je posredovanje tijekom bakterijske adhezije. Iako uklanjanje S-proteina s površine bakterijske stanice smanjuje njenu sposobnost adhezije, uloga S-proteina u adheziji nije u potpunosti razjašnjena (Tallon i sur., 2007; Frece i sur., 2005; Kos i sur., 2003). Pojedini bakterijski sojevi sadrže S-proteine specifične za određene receptore na epitelnim stanicama koji potiču vezanje, ali i nespecifični S-proteini mogu potaknuti vezanje na hidrofobne površine jer su i sami hidrofobne prirode (van der Mei i sur., 2003). Osim uloge u mikrobnj adheziji, istraživanja pokazuju da S-proteini bakterija roda *Lactobacillus* štite stanicu od uvjeta u GIT. Predlaže se i biotehnološka primjena S-proteina bakterija roda *Lactobacillus* kao nosača raznih molekula, poput primjerice antitijela u svrhu jestivih cjepiva (Hynönen i Palva, 2013).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Bakterijski sojevi

U ovom radu izolirano je 12 bakterijskih sojeva iz uzorka majčinog mlijeka. Za provođenje pojedinih eksperimenata korištene su srodne BMK i test-mikroorganizmi navedeni u tablici 1. Sojevi su dio Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Tablica 1. Bakterijski sojevi iz Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura koji su korišteni u ovom radu

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

3.1.2. Hranjive podloge

U radu su korištene sljedeće hranjive podloge:

a) za održavanje i uzgoj BMK

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

b) za održavanje i uzgoj patogenih test-mikroorganizama

- BHI (Brain Heart Infusion) tekuća podloga, sastava (g L⁻¹ destilirane vode): infuzije telećeg mozga i goveđeg srca i peptoni 27,7; glukoza 2; NaCl 5; puferi 2,5. pH podloge je 7,4, a sterilizacija se provodi pri 121 °C tijekom 15 minuta.
- HB (hranjiva tekuća podloga), sastava (g L⁻¹ destilirane vode): pepton 15; mesni ekstrakt 3; NaCl 5; K-fosfat 0,3. pH podloge je 7,3, a sterilizacija se provodi pri 121 °C tijekom 15 minuta.

3.1.3. Kemikalije

- etanol, „Kemika“, Hrvatska
- glicerol, „Kemika“, Hrvatska
- Genomic Wizard DNA Purification kit, „Promega“, SAD
- RNase A, „Qiagen“, Španjolska
- Tris (hidroksimetil)-aminometan, „Carlo Erba“, Italija
- EDTA, „Sigma-Aldrich, SAD
- amonij-persulfat (APS), „Kemika“, Hrvatska
- glicin, „Gram-mol“, Hrvatska
- akrilamid, „Sigma“, SAD
- TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletlen), „Sigma“, SAD
- β-merkaptotanol, „Sigma“, SAD
- metilensko modriilo R-250, „Sigma“, SAD
- natrijev dodecilsulfat, „Sigma“, SAD
- ledena octena kiselina, „Kemika“, Hrvatska
- standard za elektroforezu proteina ProSieve QuadColor, „Lonza“, SAD
- početnice „Invitrogen“, SAD
- etidijev bromid, „Boehringer Mannheim GmbH“, Mannheim
- agaroz, „Appligane“, Francuska
- λ DNA HindIII standard, „Fermentas“, Kanada
- 100 bp DNA Ladder standard, „Invitrogen“, SAD
- izopropanol, „Kemika“, Hrvatska
- lizozim, „EuroBio“, Francuska
- nuclease-free water, „Takara“, Japan

- EmeraldAmp, Max HS PCR Master Mix (2x Premix), „Takara“, Japan
- GoTaq G2 Hot Start polimeraza, „Promega“, SAD
- početnice, „Invitrogen“, SAD
- pankreatin (165 U mg^{-1}) iz svinjske gušterače, „BioChemika“, Fluka, Švicarska
- pepsin, „Sigma“, SAD
- žučne soli, „Difco“, SAD
- natrijev klorid (NaCl), „Kemika“, Hrvatska
- klorovodična kiselina (HCl), „Sigma-Aldrich“, SAD
- natrijeva lužina (NaOH), „Kemika“, Hrvatska

3.1.4. Aparatura i pribor

- autoklav, „Sutjeska“, Hrvatska
- centrifuga Centric 160, „Tehtnica“, Slovenija
- centrifuga s hlađenjem 5804R, „Eppendorf“, SAD
- BioSpec-nano, „Shimadzu“, Japan
- hladnjak, „Gorenje“, Slovenija
- termostat, „Instrumentarija“, Hrvatska
- vodena kupelj, „Sutjeska“, Jugoslavija
- zamrzivač (-80 °C), „Eppendorf“, SAD
- čitač mikrotitarskih ploča Infinite F Plex, „Tecan“, Švicarska
- automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- vibro-mješač EV-100, „Kartell“, Italija
- Bunsenov plamenik, „OMM Laboratory Equipment“, Italija
- apsorbirajući papir, „Lola Ribar“, Hrvatska
- mikroeprovete, „Eppendorf“, SAD
- Petrijeve zdjelice, „Golias“, Slovenija
- kivete za centrifugiranje (15 i 50 mL), „Falcon“, Engleska
- staklene epruvete, „Scherf Präzision Europe GmbH“, Njemačka
- stalci za mikroeprovete, „neoLab“, Njemačka
- stalci za epruvete, „neoLab“, Njemačka
- mikrotitarske pločice (24 i 96 jažica), „Falcon“, Engleska
- Millex filter $0,22 \mu\text{m}$, „Merck“, SAD

- BD Discardit šprica, „Becton Dickinson“, SAD
- vaga, „Tehtnica“, Slovenija
- HPLC igla za nanošenje proteinskih uzoraka, „Hamilton“, SAD
- komora za elektroforezu, „Sigma“, SAD
- ABI 2720 PCR uređaj, „Applied Biosystems“, SAD
- power supply, „BioRad“, SAD
- vibro-mješač EV-100, „Kartell“, Italija
- transiluminator MiniBIS Pro, DNT, Izrael

3.2. METODE RADA

3.2.1. Izolacija bakterija iz roda *Lactobacillus* iz mikrobiote majčinog mlijeka

U ispitivanju su korišteni uzorci majčinog mlijeka hrvatskih roditelja (N=5). Nasumičnim odabirom bakterijskih kolonija poraslih nakon 48 h inkubacije uzorka i prvog decimalnog razrijeđenja majčinog mlijeka na MRS agaru pri 37 °C, izolirano je 12 bakterijskih sojeva. Pomoću mikrobiološke ušice, svaka odabrana kolonija je u cilju umnožavanja bakterijske biomase sterilno inokulirana u 1,5 mL MRS tekuće podloge. Nakon 18 h anaerobne inkubacije, porasla bakterijska kultura je „streak plate“ metodom nacijspljena na MRS agar kako bi se provjerila čistoća kulture te je nakon 48 h inkubacije ponovno odabrana jedna kolonija za umnožavanje u MRS tekućoj podlozi. Nakon 18 h inkubacije, postupak pročišćavanja bakterijske kulture ponovljen je još jednom.

3.2.2. Održavanje i čuvanje mikroorganizama

Novoizolirani sojevi su pohranjeni u Zbirci mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u optimalnoj hranjivoj podlozi (MRS tekuća podloga za BMK, HB za test-mikroorganizme) na -80 °C s dodatkom 15 % glicerola. Dan prije eksperimenta sojevi su inokulirani u svježu hranjivu podlogu te inkubirani pri optimalnim uvjetima rasta.

3.2.3. Izolacija genomske DNA iz bakterijskih sojeva

Ekstrakcija genomske DNA sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka, provedena je pomoću Genomic Wizard DNA kita (Promega, SAD), iz bakterijske biomase izdvojene centrifugiranjem 5 mL bakterijske kulture 2 min pri 13000 g. Nakon uklanjanja supernatanta,

talog stanica je resuspendiran u 480 μL EDTA (50 mM) i 120 μL otopine lizozima (10 mg mL^{-1}) te je dobivena suspenzija inkubirana u vodenoj kupelji 45 min pri 37 °C. Centrifugiranjem uzorka nakon inkubacije, dobiven je talog koji je potom resuspendiran u 600 μL otopine za lizu jezgre i inkubiran u vodenoj kupelji 5 min pri 80 °C. Nakon hlađenja na sobnu temperaturu, lizatu je dodano 3 μL otopine RNAze te je dobivena suspenzija inkubirana 30 min pri 37 °C. Zatim je uzorku sobne temperature dodano 200 μL otopine za taloženje proteina te je vorteksiran 20 s, inkubiran 5 min na ledu i centrifugiran na 13000 g 3 min. Izdvojeni supernatant koji sadrži DNA je prebačen u čistu mikroeprevetu u koju je prethodno dodano 600 μL izopropanola sobne temperature, nakon čega se uzorak miješao okretanjem mikroeprevete dok niti DNA nisu formirale vidljivu masu. Supernatant je zatim uklonjen centrifugiranjem te je nakon sušenja mikroeprevete na čistom apsorbirajućem papiru, talog DNA ispran sa 600 μL etanola (70 % (v/v)). Nakon 10-15 min sušenja na zraku, talogu je dodano 100 μL otopine za rehidraciju DNA nakon čega je uslijedila inkubacija u vodenoj kupelji 1 h pri 65 °C. Dobivenim uzorcima DNA je spektrofotometrijski izmjerena koncentracija uređajem Biospec-nano (Shimadzu, Japan) te su pohranjeni pri 4 °C.

3.2.4. RAPD-PCR (*engl. Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction*) i hijerarhijska klaster analiza elektroforetskih profila PCR produkata

DNA bakterija izoliranih iz majčinog mlijeka korištena je kao kalup u RAPD-PCR reakciji provedenoj u ABI 2720 PCR uređaju (Applied Biosystems, SAD). Reakcijska smjesa volumena 25 μL sadržavala je 12,5 μL EmeraldAmp MAX HS PCR Master Mix 2x Premix (Takara, Japan), 0,5 μL univerzalne M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3') početnice, 10 μL vode i 2 μL kalupa. Nakon početnog koraka denaturacije DNA pri 94 °C tijekom 1 min, slijedilo je 35 ciklusa denaturacije pri 94 °C tijekom 1 min, sparivanja početnica pri 40 °C tijekom 20 s i sinteze komplementarnih lanaca 80 s pri 72 °C, a zatim 5 min završne elongacije pri 72 °C. Dobiveni PCR produkti su razdvojeni elektroforezom na agaroznom gelu (1 % (w/v)) pri 60 V, pri čemu je kao standard korištena smjesa 0,25 μL λ DNA HindIII (Fermentas, Kanada) i 0,5 μL 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, SAD). Nakon elektroforeze, gel je obojan etidijevim bromidom koncentracije 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ i vizualiziran UV na transiluminatoru MiniBIS Pro (DNR Bio-Imaging Systems Ltd., Izrael) pri valnoj duljini od 254 nm pomoću programa Gel Capture (DNR Bio-Imaging Systems Ltd., Izrael) verzije 7.1 (Leboš Pavunc i sur., 2012). Zatim je pomoću softvera GelCompar II (Applied Maths, Belgija), usporedbom dobivenih elektroforetskih profila, provedena hijerarhijska klaster analiza čiji su rezultati prikazani u obliku dendrograma.

3.2.5. Genotipska identifikacija bakterija iz majčinog mlijeka

3.2.5.1. Amplifikacija 16S rDNA PCR metodom

Reakcijska smjesa potrebna za umnožavanje 16S rDNA regije sadržavala je 1x GoTaq Flexi pufera bez MgCl₂, 1,5 mM MgCl₂, 1,5 μM početnica UNI16SF (5'-GAGAGTTTGATCCTGGC-3') i UNI16SR (5'-AGG AGG TGA TCC AGC CG-3'), 0,2 mM deoksinukleotida (*engl. Deoxynucleotide triphosphates*, dNTPs), 0,025 U μL⁻¹ Taq polimeraze i 1 ng μL⁻¹ DNA. PCR program se sastojao od početne denaturacije na 96 °C kroz 5 min, 30 ciklusa po 30 s denaturacije pri 96 °C, 30 s komplementarnog vezanja pri 55 °C i 30 s elongacije pri 72 °C, nakon čega je slijedilo 5 min završne elongacije pri 72 °C. Dobiveni PCR produkti su pročišćeni primjenom QIAquick PCR purification kita (Qiagen, Njemačka) prema uputama proizvođača, kako bi se uklonio višak početnica, nukleotida, enzima, soli i drugih nečistoća, nakon čega je spektrofotometrijski izmjerena koncentracija dsDNA uređajem Biospec-nano (Shimadzu, Japan). 30 μL pročišćenih PCR produkata poslano je na sekvenciranje u ovlaštenu instituciju Macrogen (Macrogen, Nizozemska).

3.2.5.2. Sekvenciranje 16S rDNA gena

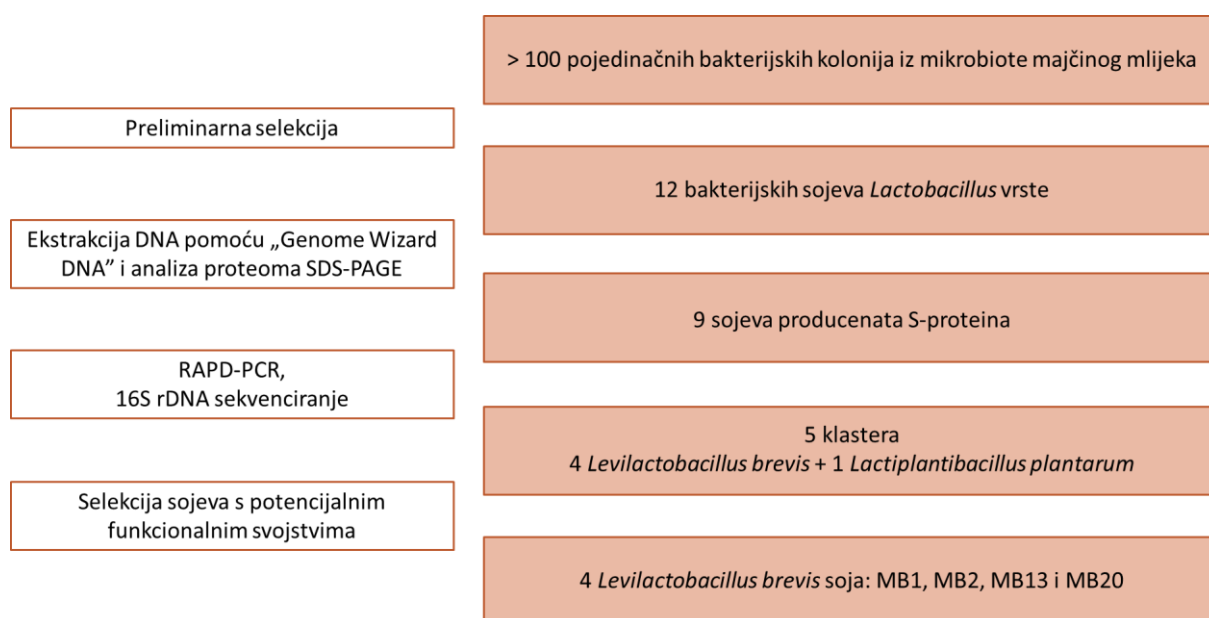
Sekvenciranje umnožene 16S rDNA provedeno je u servisu Macrogen (Macrogen, Nizozemska) korištenjem automatskog četverokapilarnog uređaja ABI 3730xl Genetic Analyser (Applied Biosystems, SAD), koji radi na principu Sangerove dideoksi metodi zaustavljanja sinteze DNA ugradnjom 2', 3'-dideoksinukleotida (*engl. Dideoxynucleotide triphosphates*, ddNTPs). Dobiveni rezultati se uspoređuju s poznatim sekvencama u NCBI (*engl. National Center for Biotechnology Information*) bazi podataka primjenom BLASTn algoritma (*engl. Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool*) dostupnog na poveznici <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>.

3.2.6. Ekstrakcija i natrij dodecil sulfat-poliakrilamidna gel elektroforeza (*engl. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) površinskih proteina

Optička gustoća (*engl. Optical density*, OD) stanica svih prekonocnih bakterijskih kultura podešena je na vrijednost 2 te je 1 mL bakterijske suspenzije (OD₆₂₀=2) centrifugiran tijekom 2 min pri 16 000 g. Dobiveni talog stanica je ispran destiliranom vodom i resuspendiran u 50 μL 2 x koncentriranog Laemmli pufera (1,25 mL 1 M Tris-HCl (pH=6,8), 4 mL SDS (10 % (w/v)), 2 mL glicerol (100 % (v/v)), 0,5 mL 0,5 M EDTA, 4 mg bromfenol plavo, 0,2 mL β-merkaptetanol). Tako priređeni uzorci su prokuhani 5 min te je 20 μL

naneseno u jažice unaprijed pripremljenog poliakrilamidnog (10 % (v/v)) gela. Elektroforetsko razdvajanje proteina na gelu provedeno je u komori za elektroforezu pri konstantnom naponu od 100 V tijekom 2,5 h. Pritom je korišten standard ProSieve QuadColor Protein Marker (Lonza, Švicarska) koji sadrži proteine poznate molekulske mase u rasponu 4,6-315 kDa. Nakon završene elektroforeze, gel je inkubiran u otopini za bojanje (0,02 % Coomassie Brilliant Blue praha, 25 % izopropanola i 10 % octene kiseline) kroz najmanje 2 h, a zatim u otopini octene kiseline (10 % (v/v)) do odbojavanja pozadine.

Prikaz metoda rada korištenih tijekom izolacije i identifikacije *Lactobacillus* sojeva iz mikrobiote majčinog mlijeka prikazana je na slici 4.



Slika 4. Postupak izolacije i identifikacije *Lactobacillus* sojeva iz mikrobiote majčinog mlijeka hrvatskih roditelja

3.2.7. Preživljavanje sojeva u nepovoljnim simuliranim uvjetima gastrointestinalnog sustava

3.2.7.1. Priprava simuliranog želučanog soka i soka tankog crijeva

Simulirani sokovi gastrointestinalnog sustava pripremljeni su prema Kos i sur. (2003). Simulirani želučani sok pripremljen je suspendiranjem 3 g L⁻¹ pepsina u 0,5 % (w/v) sterilnoj otopini natrijevog klorida (Kemika, Hrvatska) pH vrijednosti 2,0. Simulirani sok tankoga crijeva pripremljen je suspendiranjem 1 g L⁻¹ pankreatina (Fluka, Švicarska) i 3,0 g L⁻¹ žučnih soli (Difco, SAD) u 0,5 % (w/v) otopini natrijeva klorida pH vrijednosti 8,0.

3.2.7.2. Inkubiranje bakterijskih stanica u simuliranim sokovima gastrointestinalnog sustava

Ispitivanje preživljavanja BMK u simuliranim uvjetima GIT provedeno je prema Kos i sur. (2003). Stanice odabranih sojeva prikupljene su centrifugiranjem 5 min pri 3500 o min⁻¹ i dva puta isprane sterilnom fiziološkom otopinom. Potom su resuspendirane u simuliranom želučanom soku te inkubirane 2 h pri 37 °C, nakon čega je broj živih bakterija određen indirektnom metodom. Talog stanica prikupljen centrifugiranjem pri 3500 o min⁻¹ je potom resuspendiran u simuliranom soku tankog crijeva te su tako priređene suspenzije inkubirane 4 h pri 37 °C, nakon čega je broj preživjelih bakterija ponovno određen indirektnom metodom.

3.2.7.3. Određivanje broja živih mikroorganizama indirektnom metodom

Broj živih bakterija određen je indirektnom metodom, odnosno naciepljivanjem priređenih decimalnih razrjeđenja suspenzija bakterijskih stanica u sterilnoj fiziološkoj otopini na MRS agar u obliku kapi (10 µL) u dvije paralele. Nakon 48 h inkubacije pri 37 °C izbrojane su porasle kolonije i izračunat je broj živih stanica (*engl. Colony-forming units, CFU*) po mililitru uzorka.

3.2.8. Ispitivanje svojstava autoagregacije bakterijskih stanica

Bakterijske stanice uzgojene u optimalnoj tekućoj hranjivoj podlozi su prikupljene centrifugiranjem, isprane dva puta te resuspendirane u fosfatnom puferu (pH=7,4) do koncentracije od približno 10⁹ CFU mL⁻¹. Volumen od 4 mL tako pripremljenih suspenzija, otpipetiran je u penicilinke te homogeniziran na vibromješaču Vortex V-1 plus (BioSan, Latvija). Izmjerena je apsorbancija uzoraka u nultom satu pri 620 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica Infinite[®] F Plex (Tecan, Švicarska) 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 iz formule:

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

gdje je:

A_t - apsorbancija u vremenu (nakon 5 sati)

A₀ - apsorbancija u vremenu 0.

3.2.9. Mikrobna adhezija na otapala (*engl. Microbial adhesion to solvents, MATS*)

Sposobnost mikrobne adhezije na otapala sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka ispitana je prema Kos i sur. (2003). Bakterijske stanice uzgojene do stacionarne faze rasta u optimalnoj tekućoj hranjivoj podlozi prikupljene su centrifugiranjem, dva puta isprane sterilnom destiliranom vodom i resuspendirane u 10 mL 0,1 mol L⁻¹ KNO₃ (pH=6,2). Priređenim suspenzijama stanica (V=3 mL) koncentracije približno 10⁸ CFU mL⁻¹, izmjerena je apsorbancija pri 600 nm (A₀), a zatim im je dodano otapalo (V=1 mL). Ispitana je adhezija na otapala:

- kloroform (elektron-akceptorsko otapalo)
- etil-acetat (jako elektron-donorsko otapalo)
- heksan (nepolarno otapalo)

Tako pripremljena suspenzija je inkubirana na sobnoj temperaturi 15-20 minuta, nakon čega je izmjerena apsorbancija vodene faze (A) te je postotak adhezije izračunat prema slijedećoj formuli:

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

3.2.10. Određivanje antimikrobne aktivnosti turbidimetrijskom metodom

Supernatanti kultura pripremljeni su na način da su odabrani sojevi BMK, kojima se ispituje antimikrobna aktivnost, prethodno uzgojeni u anaerobnim uvjetima preko noći pri 37 °C, nakon čega je provedeno centrifugiranje 5 min pri 4200 o min⁻¹ i filtriranje kroz filter veličine pora 0,22 μm.

Turbidimetrijskom metodom ispitano je antimikrobno djelovanje supernatanata odabranih sojeva bakterija mliječne kiseline izoliranih iz mikrobiote majčinog mlijeka prema patogenim test-mikroorganizmima i srodnim BMK. U jažice mikrotitarske pločice dodano je 190 μL supernatanta ispitivanih bakterijskih kultura i 10 μL patogenih test-mikroorganizama prethodno uzgojenih u BHI tekućoj podlozi ili 10 μL srodnih BMK prethodno uzgojenih u MRS tekućoj podlozi. Antimikrobno djelovanje ispitivanih sojeva BMK tijekom 24 h uzgoja test-mikroorganizama i BMK pri 37 °C određeno je spektrofotometrijski mjerenjem prividne apsorbancije pri valnoj duljini 620 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica. Razlika u

prividnoj apsorbanciji kontrole (nacijepnjene BHI tekuće podloge ili MRS tekuće podloge bez dodanog supernatanta bakterija mliječne kiseline čije se antimikrobno djelovanje ispituje) i uzoraka s dodanim supernatantom, mjera je inhibicije rasta test-mikroorganizama. Kao slijepa proba, korištena je neinokulirana hranjiva podloga.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. IZOLACIJA BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE IZ MIKROBIOTE MAJČINOG MLIJEKA

Mikrobiota novorođenčeta, posebice BMK vrste *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, ima temeljnu ulogu u održavanju ravnoteže između mikroorganizama prisutnih u GIT te pozitivno djeluje na zdravlje novorođenčeta i razvoj imunološkog sustava, tj. stanične imunosti (Galdeano i sur., 2019). Na sastav intestinalne mikrobiote utječu brojni čimbenici kao što je primjerice način prehrane (dojenje ili dojenačke formule), način poroda (carski rez ili vaginalni porod), okolišni čimbenici i terapija antibioticima u majke (Navarro-Tapia i sur., 2020). Majčino mlijeko potencijalan je izvor probiotičkih mikroorganizama, no još je uvijek limitirajući broj znanstvenih istraživanja u tom području upravo zbog poteškoća tijekom kultivacije prisutnih mikrobnih vrsta iz uzoraka majčinog mlijeka. Najčešće izolirane bakterije iz mikrobiote majčinog mlijeka predstavnici su rodova *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* (Biagi i sur., 2017; Damaceno i sur., 2017; Jiménez i sur., 2008). U istraživanju sličnosti u sastavu mikrobiote majki i dojenčadi koju su proveli Vaidya i sur. (2020) utvrđena je mogućnost da mikrobiota majke putem majčinog mlijeka kolonizira GIT novorođenčeta. Izolirani sojevi mikrobiote majke i dojenčadi zajednički su i identificirani su kao pripadnici vrsta *Lactobacillus* i *Bifidobacteria*.

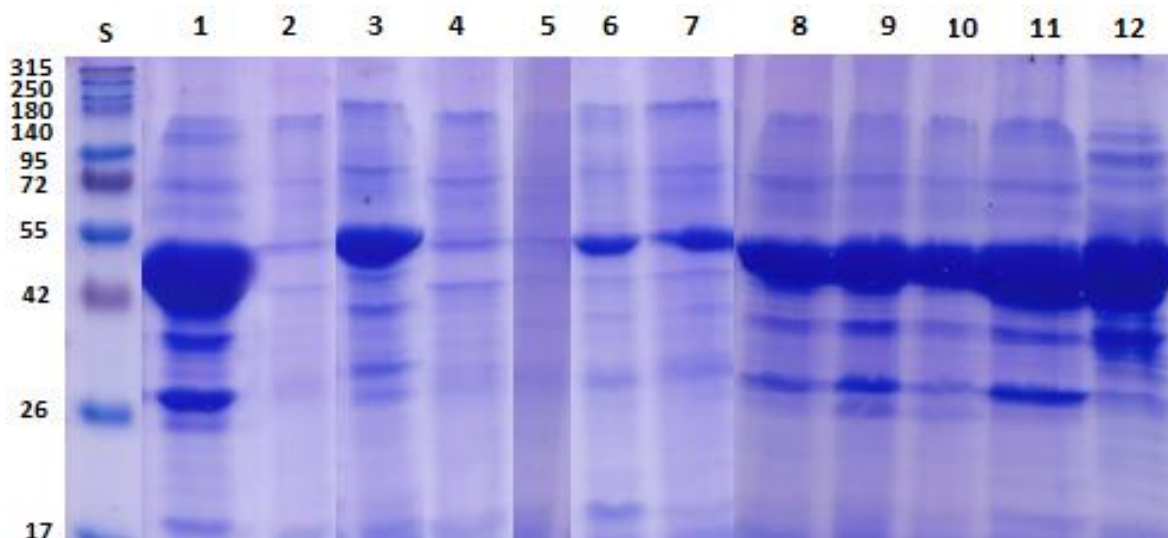
S obzirom na to da su mnogi sojevi iz roda *Lactobacillus* okarakterizirani kao probiotičke bakterije upravo je cilj ovog rada bio ustanoviti prisutnost bakterija iz ovog roda u mikrobioti majčinog mlijeka. Kako prema pojedinim istraživanjima S-proteini probiotičkih *Lactobacillus* sojeva posreduju u funkcionalnim učincima ovih bakterija (Banić i sur., 2018; Uroić i sur.; 2016; Hynönen i sur., 2014), nakon identifikacije sojeva iz mikrobiote majčinog mlijeka, cilj je bio ustanoviti prisutnost ovih proteina analizom površinskih proteina. Prilikom preliminarnе selekcije odabrano je više od 100 pojedinačnih bakterijskih kolonija iz uzoraka majčinog mlijeka, a zatim je između 12 bakterijskih sojeva ispitana mogućnost ekspresije S-proteina analizom površinskog proteoma. Iz novoizoliranih sojeva, ekstrahirana je genomaska DNA te je u uzorcima izmjerena spektrofotometrijski koncentracija DNA (tablica 2) pomoću uređaja Biospec-nano (Shimadzu, Japan).

Tablica 2. Koncentracije dsDNA u uzorcima ekstrahirane DNA pojedinih sojeva BMK određene BioSpec-Nano uređajem

Oznaka izolata	DNA (ng μL^{-1})
1	10,20
2	218,59
3	105,75
4	236,85
5	575,20
6	56,15
7	128,35
8	144,87
9	186,78
10	197,36
11	129,41
12	22,76

4.2. ISPITIVANJE PRISUTNOSTI S-PROTEINA BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE IZ MIKROBIOTE MAJČINOG MLIJEKA

Ekspresija S-proteina rijetko je svojstvo te je ustanovljeno samo kod pojedinih probiotičkih bakterija iz roda *Lactobacillus*. Prema trenutnim znanstvenim spoznajama ne postoje podaci o soju mikrobiote majčinog mlijeka koji sintetizira S-proteine. S obzirom na specifična svojstva S-proteina, u ovom radu provedena je SDS-PAGE analiza površinskih proteina kao prikladan pristup za primarnu detekciju prisutnosti S-proteina. Iz 12 izolata koji pripadaju *Lactobacillus* vrstama, ekstrahirani su površinski proteini koji su zatim analizirani SDS-PAGE metodom. Analizom proteinskih profila je kod čak 9 sojeva utvrđena prisutnost dominantne proteinske vrpce koja može upućivati na prisutnost S-proteina (slika 5). Svih 9 sojeva su 16S rDNA sekvenciranjem identificirani kao pripadnici vrste *Levilactobacillus brevis*, koja je prema literaturi jedna od najčešćih okarakteriziranih producenata S-proteina među vrstama roda *Lactobacillus* (Banić i sur., 2018; Uroić i sur., 2016).

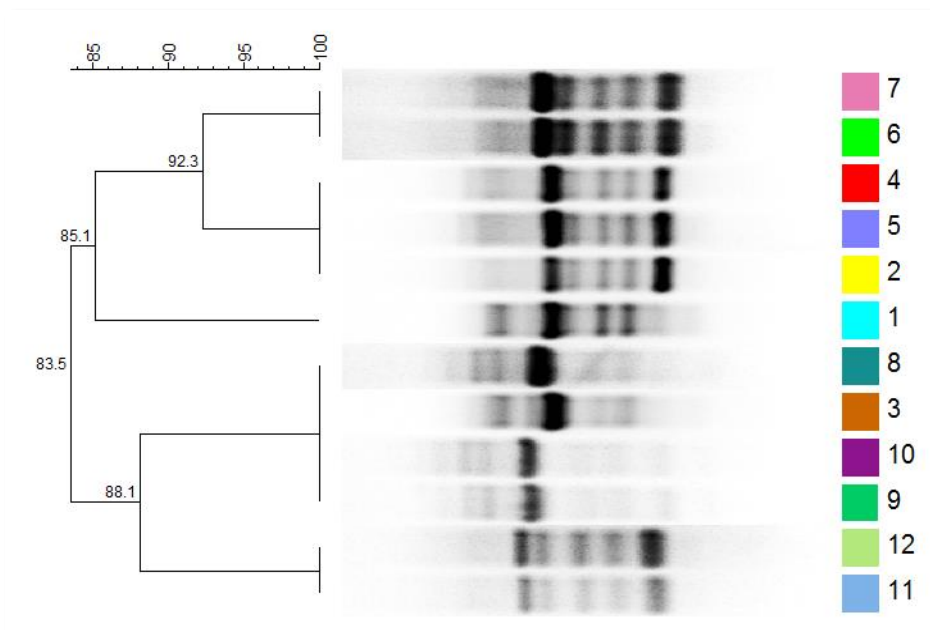


Slika 5. SDS-PAGE analiza površinskog proteoma sojeva 1-*L. brevis* MB1, 2-*L. plantarum* MB18, 3-*L. brevis* MB20, 4-*L. plantarum* MB18, 5-*L. plantarum* MB18, 6-*L. brevis* MB13, 7-*L. brevis* MB13, 8-*L. brevis* MB20, 9-*L. brevis* MB20, 10-*L. brevis* MB20, 11-*L. brevis* MB2, 12-*L. brevis* MB2

4.3. IDENTIFIKACIJA BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE IZ MIKROBIOTE MAJČINOG MLIJEKA

Uspoređena je sličnost genotipskih profila izolata dobivenih elektroforezom RAPD-PCR produkata, kako bi se ustanovila bioraznolikost vrsta. Analizom dendrograma (slika 6) dobivenog hijerarhijskom klaster analizom, uočeno je 5 različitih klastera, odnosno 5 različitih sojeva.

16S rDNA 5 sojeva odabranih temeljem analize dendrograma amplificirana je i pročišćena te je sekvenciranjem ustanovljeno da 4 odabrana soja pripadaju vrsti *Levilactobacillus brevis*, a jedan vrsti *Lactiplantibacillus plantarum* (tablica 3).



Slika 6. Dendrogram elektroforetskih profila RAPD-PCR produkata 12 sojeva izoliranih iz uzoraka majčinog mlijeka

Tablica 3. Rezultati 16S sekvenciranja odabranih izolata iz mikrobiote majčinog mlijeka

Oznaka izolata	Oznaka soja	Sličnosti sa sekvencama pohranjenim u NCBI banci gena	
		Rezultat identifikacije	Pristupni broj u NCBI banci gena
1	MB1	<i>Levilactobacillus brevis</i>	MK774569.1
12	MB2	<i>Levilactobacillus brevis</i>	CP050541.1
6	MB13	<i>Levilactobacillus brevis</i>	MT512175.1
4	MB18	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	MT604681.1
10	MB20	<i>Levilactobacillus brevis</i>	KM495924.1

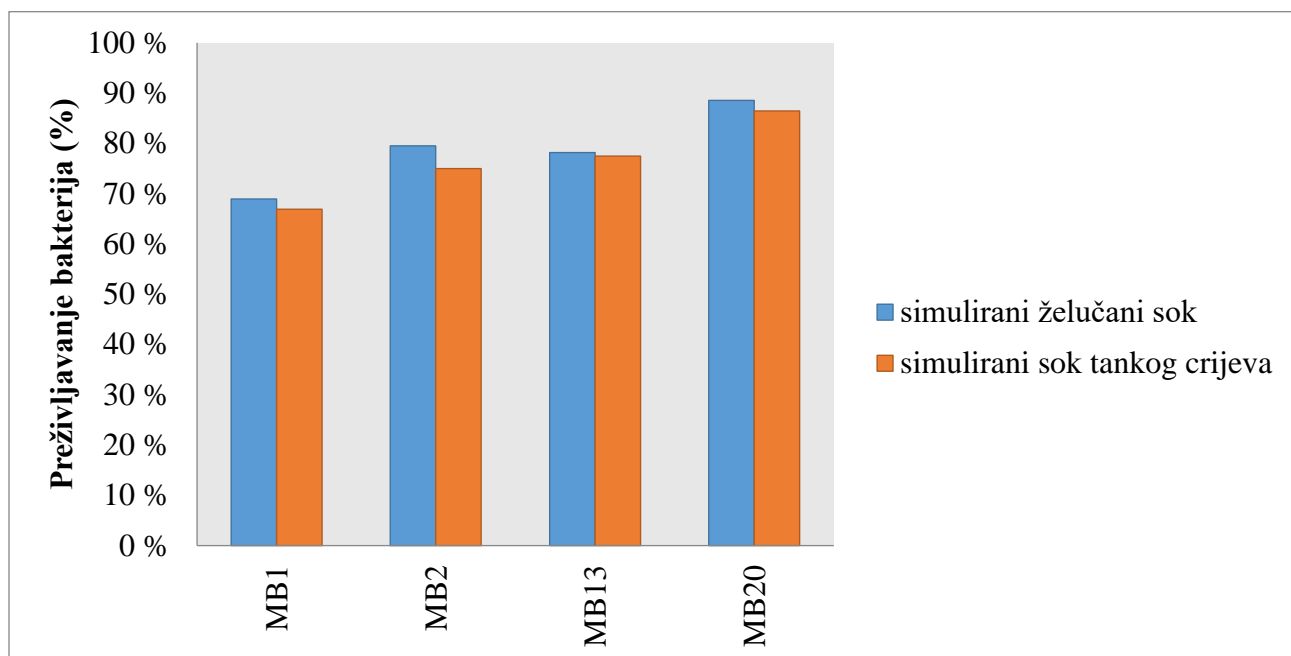
16S sekvenciranjem sojeva izoliranih iz mikrobiote majčinog mlijeka, kod kojih je SDS-PAGE analizom utvrđena dominantna proteinska vrsta, identificirani su sojevi *L. brevis* i *L. plantarum*, vrste roda *Lactobacillus* koji su najčešće opisani producenti S-proteina (Banić i sur., 2018; Uroić i sur., 2016). Prema trenutnim znanstvenim spoznajama utvrđeno je kako u dosadašnjim istraživanjima nisu identificirani S-proteini u bakterijskim sojevima izoliranim iz

mikrobiote majčinog mlijeka. Dakle, ovo je prvo istraživanje u kojemu je SDS-PAGE analizom utvrđena prisutnost S-proteina na površini bakterijske stanice izolirane iz mikrobiote majčinog mlijeka.

4.4. PREŽIVLJAVANJE *L. BREVIS* U SIMULIRANIM UVJETIMA GIT-a

S obzirom na znatnu raznolikost bakterijskih vrsta u mikrobioti majčinog mlijeka i prepoznatu ulogu tijekom razvoja novorođenčeta, posljednjih je godina povećan znanstveni interes za karakterizaciju korisnih učinaka ovih bakterija, a time i probiotičkog potencijala sojeva izoliranih iz mikrobiote majčinog mlijeka (Jost i sur., 2015). Ciljano mjesto djelovanja probiotičkih BMK crijevni je epitel domaćina, a da bi se postigao koristan učinak na organizam nakon oralnog unosa, dovoljan broj bakterija treba preživjeti tranzit i zadržati se u GIT-u. Glavna prepreka preživljavanju je niska vrijednost pH u želucu (pH \approx 2), odnosno sok gušterače i žuč prisutni u tankom crijevu pa je tako podnošljivost niskog pH i žučnih soli neophodno svojstvo BMK za kolonizaciju i metaboličku aktivnost BMK u domaćina (Zamfir i Grosu-Tudor, 2014). Ispitivanje preživljavanja BMK u simuliranim uvjetima GIT-a doprinosi definiranju potencijalnih kandidata za probiotičke sojeve. Prednost sojeva BMK koji su izolirani iz mikrobiote majčinog mlijeka prema probiotičkom konceptu su humano podrijetlo i sigurnost primjene. U majčinom su mlijeku prisutni brojni bakterijski sojevi vrste *Lactobacillus* čija se potencijalna probiotička svojstva razlikuju s obzirom na soj. Soltan Dallal i sur. (2021) ispitali su sposobnost preživljavanja 122 bakterijska soja vrste *Lactobacillus* izoliranih iz uzoraka majčinog mlijeka u GIT uvjetima *in vitro*. 19 izolata, pripadnika sojeva *L. casei*, *L. brevis*, *L. rhamnosus*, *L. fermentum*, *L. actobacillus*, *L. fermentum* i *L. paracasei*, uspješno je preživjelo simulirane uvjete. Kozak i sur. (2015) istražili su probiotički potencijal 21 soja *Lactobacillus* vrsta izoliranih iz majčinog mlijeka i dojenčadi. Pri tome su soj *L. crispatus* i tri soja *L. gasseri* uspješno preživjeli u uvjetima GIT-a *in vitro* te su pokazali mogućnost adhezije na monosloj stanične linije Caco-2. Također je sve veći broj istraživanja koja povezuju zaštitnu ulogu specifičnih S-proteina na površini vanjske strane stanice određenih *Lactobacillus* sojeva s uspješnim preživljavanjem u uvjetima GIT-a (Beganović i sur., 2011b), stoga su za ispitivanje odabrani pripadnici vrste *L. brevis* koji su identificirani kao producenti S-proteina: MB1, MB2, MB13 i MB20. Ispitivano je preživljavanje sojeva u simuliranom želučanom soku, a zatim i u simuliranom soku tankog crijeva, temeljem primjene indirektna metode za određivanje broja preživjelih bakterijskih stanica.

Na slici 7 prikazano je preživljavanje odabranih sojeva u uvjetima simuliranog želučanog soka i simuliranog soka tankog crijeva, izraženo kao postotak broja preživjelih bakterija u odnosu na početan broj bakterija.



Slika 7. Preživljavanje sojeva *L. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog sustava

Uspješnim preživljavanjem probiotičkih sojeva u simuliranim uvjetima GIT-a smatra se preživljavanje iznad 10^6 CFU mL⁻¹, jer je to prema definiciji broj probiotičkih stanica za postizanje funkcionalnih učinaka *in vivo*. Prema dobivenim rezultatima broj poraslih bakterijskih kolonija sva četiri *L. brevis* soja nakon inkubacije u uvjetima GIT-a *in vitro* bio je iznad navedene vrijednosti. Soj *L. brevis* MB20 preživio je simulirane uvjete u najvećem postotku (86 %), dok postotak preživljavanja za *L. brevis* MB13 i MB2 iznosi 77 %, odnosno 74 %, odnosno za soj MB1 67 %.

Simulacijom uvjeta GIT-a ispitana je sposobnost preživljavanja odabranih bakterijskih sojeva pri niskim pH vrijednostima i u prisutnosti enzima gušterače i žučnih soli. Preživljavanje svih ispitivanih *L. brevis* sojeva u zadovoljavajućoj koncentraciji nakon simulacije uvjeta GIT-a prikazano u ovom radu ukazuje na zaštitnu ulogu S-proteina, koju su opisali u istraživanjima, na temelju rezultata površinske strukture ispitivanih *Lactobacillus* sojeva i preživljavanja simuliranih uvjeta GIT-a koji odgovaraju dobivenim rezultatima ovog rada, Banić i sur. (2018), Uroić i sur. (2016), Meng i sur. (2014) i Frece i sur. (2005).

Uspješno preživljavanje svih ispitivanih sojeva potvrđuje da unos majčinog mlijeka dojenjem omogućava njihovu kolonizaciju GIT-a novorođenčeta, gdje mogu iskazati probiotička svojstva. Dobiveni rezultati podupiru hipotezu da je majčino mlijeko izvor bakterija za kolonizaciju GIT-a i time formiranja mikrobiote novorođenčeta te da tijekom dojenja dolazi do vertikalne transmisije majčine mikrobiote u mikrobiotu novorođenčeta (Jost i sur., 2014).

4.5. ADHEZIJSKA SVOJSTVA *L. BREVIS* SOJEVA IZ MIKROBIOTE MAJČINOG MLIJEKA

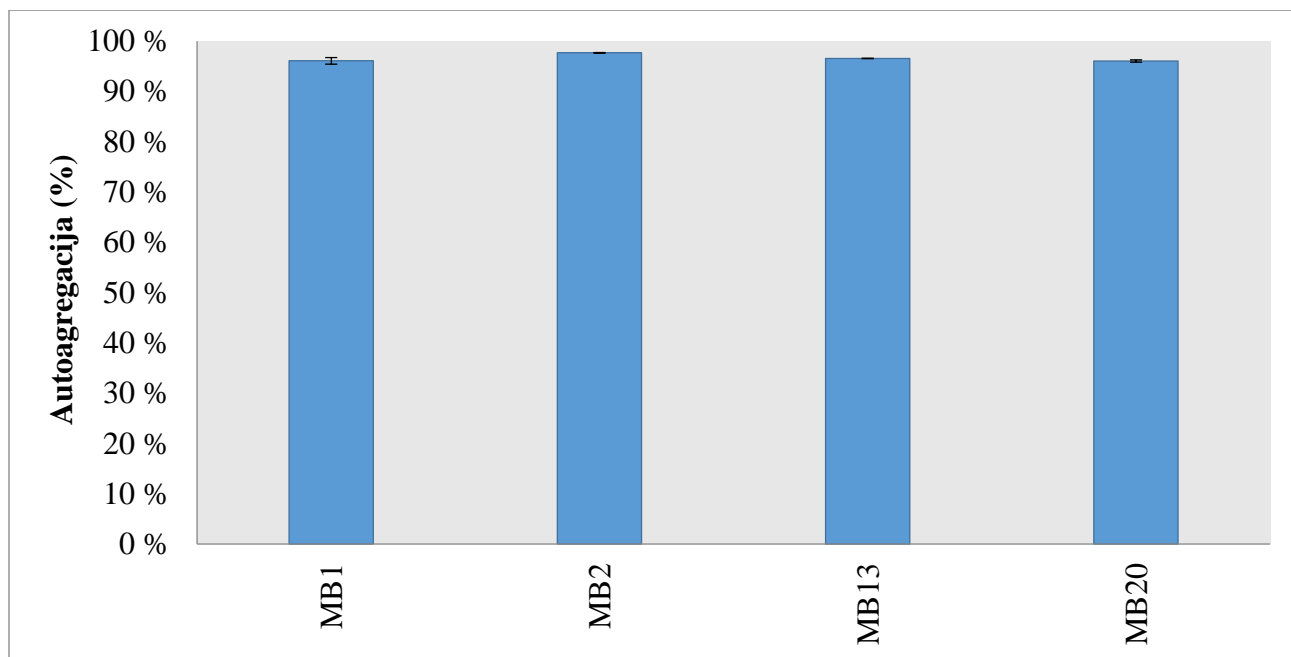
Autoagregacija je proces reverzibilnog nakupljanja stanica koje pripadaju istom bakterijskom soju i time uzrokuje spontano taloženje stanica. Značajna sposobnost autoagregacije povezuje se s predispozicijom za uspješniju adheziju bakterije na crijevni epitel, jer onemogućava uklanjanje bakterijskih stanica uslijed peristaltike crijeva, a povećava vjerojatnost za kolonizaciju i produženo zadržavanje u GIT-u te u konačnici kompetitivnu prednost pred drugim bakterijama u intestinalnom ekosustavu (Kos i sur., 2003). Sposobnost BMK da sprečavaju adheziju patogenih mikroorganizama na crijevni epitel pripisuje se svojstvu autoagregacije i formiranju zaštitnog sloja na crijevnom epitelu (Vlková i sur., 2008; Collado i sur., 2007), a smatra se da je mogućnost agregacije bakterijskih stanica povezana i sa svojstvima adhezije na biotičke i abiotičke površine (Tuo i sur., 2013). Jedna od opisanih uloga S-proteina na površini bakterijske stanice upravo je posredovanje tijekom molekularnih mehanizama bakterijske adhezije (Beganović i sur., 2011a), zbog toga je cilj ovog rada bio ispitati adhezijska svojstva *L. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 procjenom sposobnosti autoagregacije sojeva *in vitro*.

Tijekom procesa agregacije bakterijskih stanica smanjuje se optička gustoća ispitivane suspenzije, a iz podataka dobivenih mjerenjem razlike u apsorbanciji uzoraka u nultom satu te nakon 5 sati izračunava se sposobnost autoagregacije odabranih sojeva.

Bakterijske stanice sva četiri odabrana soja *L. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 imaju izrazito uspješnu sposobnost autoagregacije koja, prema rezultatima, iznosi iznad 96 % (slika 8), što im potencijalno omogućava bolju kolonizaciju i učinkovitije probiotičko djelovanje u intestinalnom sustavu domaćina.

S obzirom na to da svi ispitivani sojevi eksprimiraju S-proteine i pokazuju uspješnu autoagregaciju, potrebno je istražiti posreduju li S-proteini u autoagregacijskim svojstvima

bakterije, kao što to pokazuju rezultati istraživanja provedenih na drugim *Lactobacillus* sojevima (Banić i sur., 2018; Uroić i sur., 2016). Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se precizno utvrdila uloga S-proteina u autoagregaciji, primjerice određivanjem sposobnosti autoagregacije nakon uklanjanja S-proteina s površine bakterijske stanice ekstrakcijom s litijevim-kloridom ili pak inaktivacijom *slp* gena koji kodiraju za ove proteine.



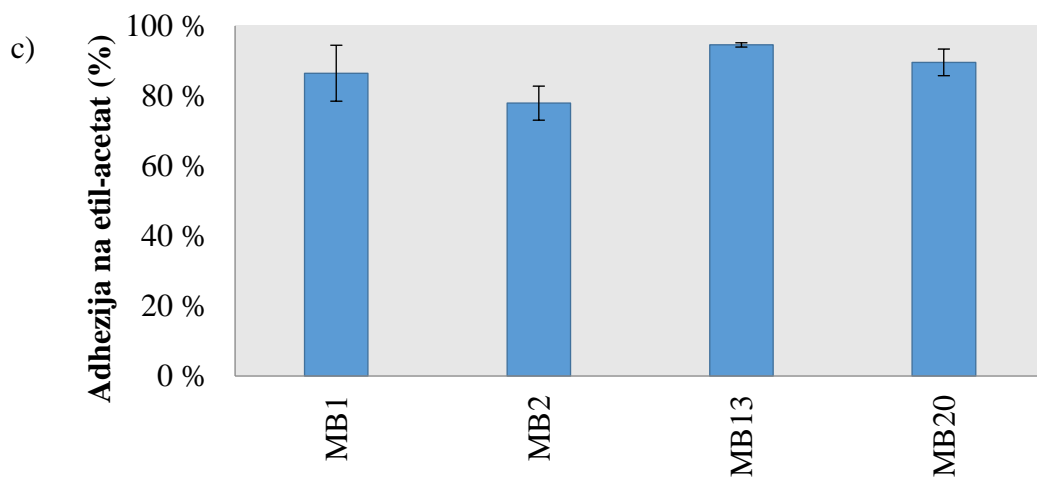
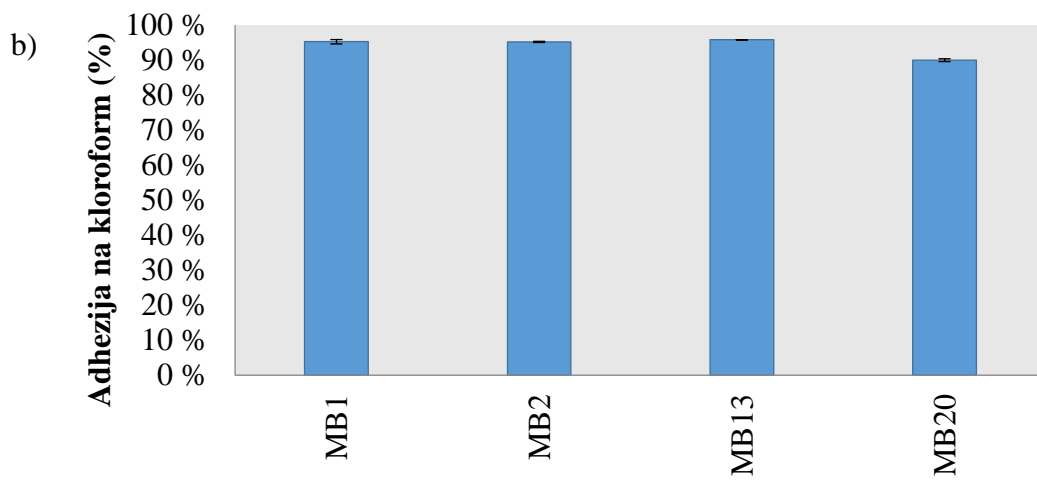
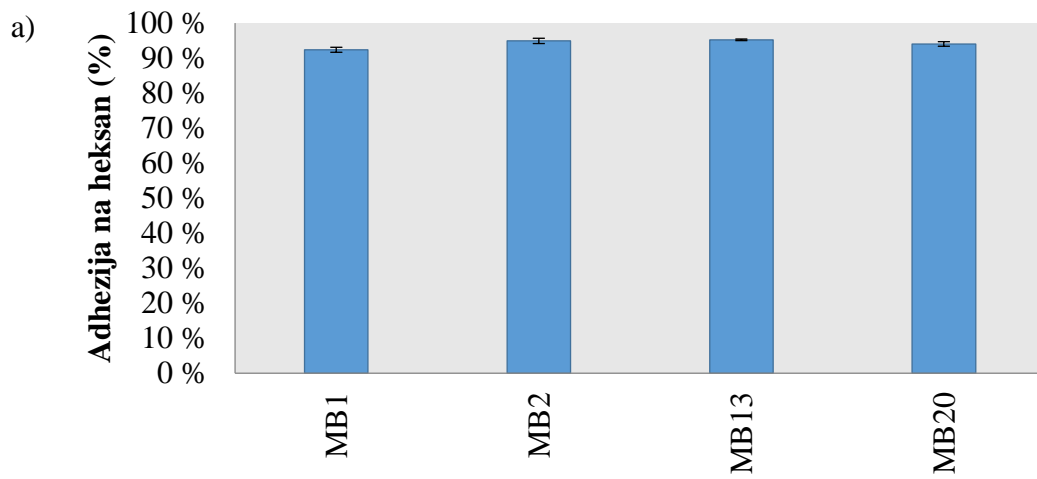
Slika 8. Sposobnost autoagregacije odabranih sojeva *L. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20

Bakterijska adhezija na epitelne stanice GIT-a uvjetovana je interakcijama adhezina, primjerice glikoproteina, egzopolisaharida ili S-proteina, s površine bakterijske stanice i odgovarajućeg receptora na epitelnoj stanici te je zbog toga bitno istražiti fizikalno-kemijska svojstva površine bakterijske stanice. Mikrobna adhezija na otapala koristi se za određivanje elektron donorskih i elektron akceptorskih afiniteta površine ispitivanih stanica, odnosno za određivanje hidrofилnosti ili hidrofobnosti ispitivanih stanica. Tijekom određivanja adhezije na otapala, korišteni su kloroform kao elektron-akceptorsko otapalo, etil-acetat kao elektron-donorsko otapalo i heksan kao neutralno otapalo. Sva četiri ispitivana bakterijska soja pokazuju visok postotak adhezije na heksan, što ukazuje na hidrofobnost stanica (slika 9a). Hidrofilnost stanica objašnjena je većom količinom COO^- i HSO_3^- skupina na površini stanice, tj. postojanjem polisaharida, dok hidrofobnost ukazuje na postojanje glikoproteinskih struktura na površini stanice (Pelletier i sur., 1997), što odgovara identificiranom S-proteinu na površini stanica *L. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20. Rezultati dobiveni u ovom radu u skladu su sa studijama koje povezuju postojanje proteinskih struktura na površini bakterijske

stanice i hidrofobnost stanice, tj. podupiru hipotezu da S-proteini doprinose hidrofobnosti površine stanice (Banić i sur., 2018; Rong i sur., 2015; Kos i sur., 2003). Iako pojedini sojevi mogu sadržavati S-proteine specifične za određene receptore koji potiču vezanje na epitelne stanice, za poticanje vezanja na hidrofobne površine dovoljna je ekspresija nespecifičnih S-proteina jer su i sami hidrofobnih karakteristika (van der Mei i sur., 2003). Također, postotak adhezije na kloroform (slika 9b) neznatno je veći u odnosu na adheziju na etil-acetat (slika 9c), ali s obzirom na to da je postotak adhezije na oba otapala iznad 70 %, može se zaključiti da bakterijske stanice pokazuju elektron-donorska i elektron-akceptorska svojstva.

Značajna autoagregacija ispitivanih sojeva ukazuje na prednosti prilikom kolonizacije crijevnog epitela, a ispitivanjem adhezije na otapala dokazana je prisutnost struktura na površini bakterijske stanice koje stupaju u interakcije s receptorima na epitelnim stanicama crijeva i omogućavaju povezivanje i kolonizaciju. Osim što im adhezija omogućava kolonizaciju GIT, vezanjem ispitivanih sojeva bakterija na receptore na epitelu stanica crijeva onemogućava vezanje i kolonizaciju patogenih mikroorganizama, jer su u direktnoj kompeticiji za vezno mjesto.

S obzirom da svi ispitivani sojevi *L. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 ekspimiraju S-proteine, pokazuju fenotip autoagregacije, a površina bakterijske stanice je hidrofobnih svojstava, prepoznata je korelacija između struktura na površini stanice i adhezijskih svojstava. Rezultati ovog rada u skladu su s rezultatima postignutima u istraživanjima prilikom kojih su okarakterizirani proteini i druge površinske komponente stanične stjenke sojeva iz roda *Lactobacillus* (Banić i sur., 2018; Collado i sur., 2017; Tuo i sur., 2013). Iako je pretpostavljena poveznica generalno svojstvo prisutno unutar bakterijske vrste, potrebno je za svaki novoizolirani soj, koji se istražuje kao probiotički, zasebno odrediti strukturu i adhezivna svojstva.



Slika 9. Adhezija *L. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 na a) heksan b) kloroform c) etil-acetat

4.6. ANTIBAKTERIJSKO DJELOVANJE *L. BREVIS* SOJEVA IZ MIKROBIOTE MAJČINOG MLIJEKA

Prema Šušković i sur. (2010), probiotički sojevi BMK inhibiraju rast patogenih mikroorganizama proizvodnjom molekula s antimikrobnim djelovanjem, poput mliječne kiseline, vodikovog peroksida, etanola, ali i bakteriocina koji djeluju inhibitorno na srodne BMK. Vrste BMK roda *Lactobacillus* producenti su velikog broja antimikrobnih molekula sa širokim spektrom antimikrobnog djelovanja i s obzirom na broj bakteriocina koje sintetiziraju pokazuju veću raznolikost u odnosu na vrste roda *Bifidobacterium* (Darvishi i sur., 2021).

Poznato je da je laktacijski mastitis najčešći uzrok prijevremenog prestanka dojenja (Civardi i sur., 2013, Jiménez i sur., 2008), stoga je značajno definirati mogućnost pojedinih sojeva iz mikrobiote majčinog mlijeka da inhibiraju *Staphylococcus* vrste koje su glavni uzročnici laktacijskog mastitisa. Prvenstveno je važna inhibicija *S. aureus*, najčešće identificiranog soja uzročnika mastitisa, ali i inhibicija *S. epidermidis* jer je ustanovljeno da komensalne bakterije izolirane iz majčinog mlijeka uslijed antimikrobnog djelovanja imaju učinak bakterioterapijskih komponenata koje sprječavaju infekcije mliječne žlijezde uzrokovane stafilokokima (Angelopoulou i sur., 2018; Mediano i sur., 2017; Jiménez i sur., 2008). Prema rezultatima provedenih istraživanja, predlaže se primjena sojeva *L. fermentum* CECT5716, *L. salivarius* CECT 5713 i *L. gasseri* CECT5714 izoliranih iz mikrobne populacije majčinog mlijeka u liječenju mastitisa, kao alternativa terapiji antibioticima (Arroyo i sur., 2010; Jiménez i sur., 2008). Dodatno, oralna primjena *L. salivarius* PS2 tijekom trećeg trimestra u žena koje su u prethodnim trudnoćama imale mastitis pokazuje potencijalno preventivni učinak, tj. smanjuje rizik od laktacijskog mastitisa tijekom trenutne trudnoće (Fernández i sur., 2016). Široka i učestala uporaba antibiotika u terapijske svrhe povećava rizik od razvoja bakterijske rezistencije i povećane virulencije (Dancer, 2004) te nuspojava poput vaginalne kandidijaze i dijareje povezane s uporabom antibiotika (Pirota i Garland, 2006). Antibiotici također utječu na autohtonu mikrobiotu majke i dojenčeta, što bi se izbjeglo alternativnim liječenjem laktacijskog mastitisa i uporabom probiotičkih sojeva bakterija humanog podrijetla (Fernández i sur., 2013). S ciljem određivanja potencijalnog terapijskog učinka ispitana je antimikrobna aktivnost prema test-mikroorganizmima, u prvom redu prema *S. aureus* 3048 i *S. aureus* K-144, a zatim prema drugim predstavnicima učestalih patogenih bakterija *Escherichia coli* 3014, *Bacillus cereus* TM2, *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Iako je majčino mlijeko izvor komensalnih bakterija, ustanovljene su infekcije oportunističkim bakterijama i patogenima poput *Brucella melitensis*, *Leptospira interrogans*,

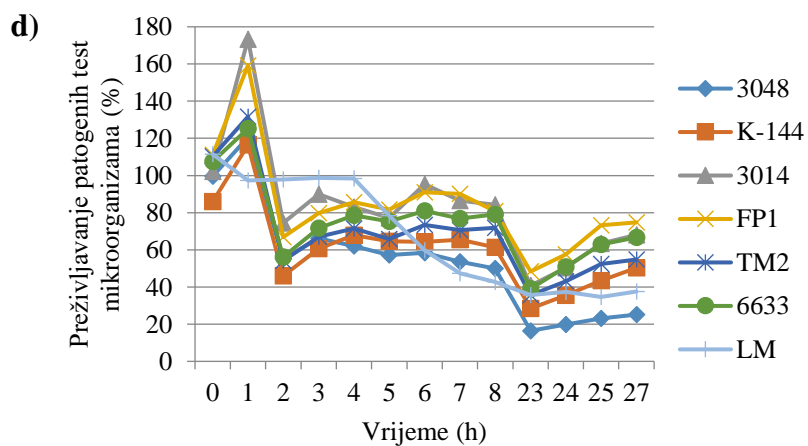
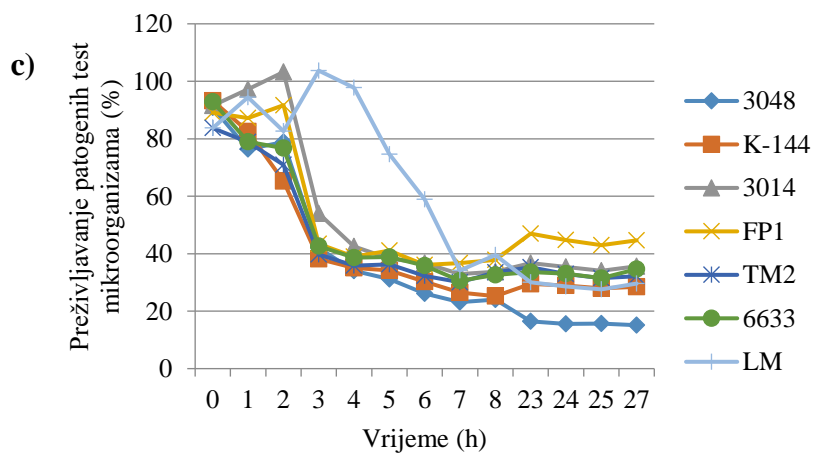
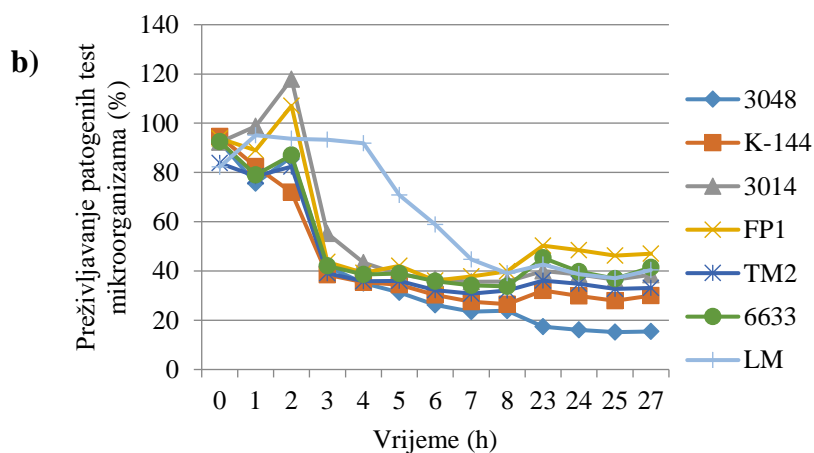
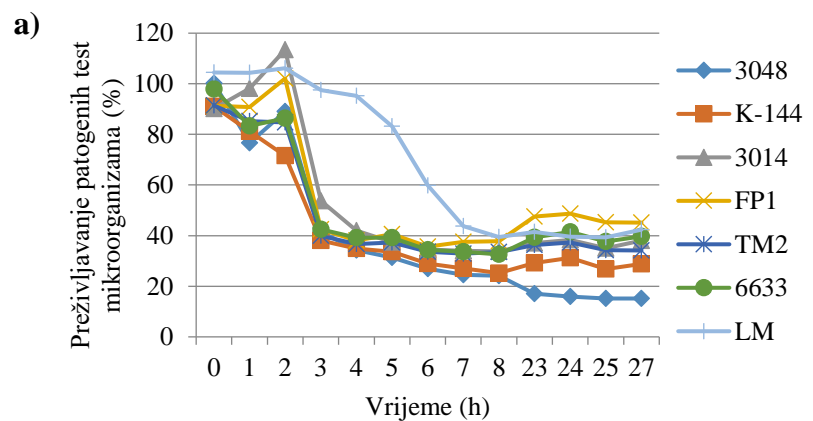
Listeria monocytogenes, *Salmonella enterica* i *Streptococcus agalactia* prisutnih u mlijeku zaraženih majki (Jost i sur., 2015). Stoga je ispitano i inhibicijsko djelovanje prema *S. enterica* serovar Typhimurium FP1 i *L. monocytogenes* ATCC 19111 kao modelnim mikroorganizmima.

Pojedini sojevi *Lactococcus lactis* i *Enterococcus faecalis* C901 izolirani iz mikrobiote majčinog mlijeka sintetiziraju bakteriocine i to nisin, odnosno enterocin (Jost i sur., 2015). Prema literaturi se bakteriocin širokog spektra lakticin 3147 može primijeniti u veterinarskoj medicini za suzbijanje mastitisa krava, dok je nisin također pokazao potencijalnu učinkovitost u smanjenju infekcija prilikom laktacijskog mastitisa (Angelopou i sur., 2018). Kako bi se preliminarno ustanovilo postoji li mogućnost da antimikrobno djelovanje proizlazi iz sinteze bakteriocina, provedene su i analize inhibicijskog djelovanja prema srodnim BMK: *Enterococcus faecium* ATCC 9430, *L. actococcus lactis* subsp. *lactis* LMG 9450, *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954 i *Lactobacillus helveticus* M92.

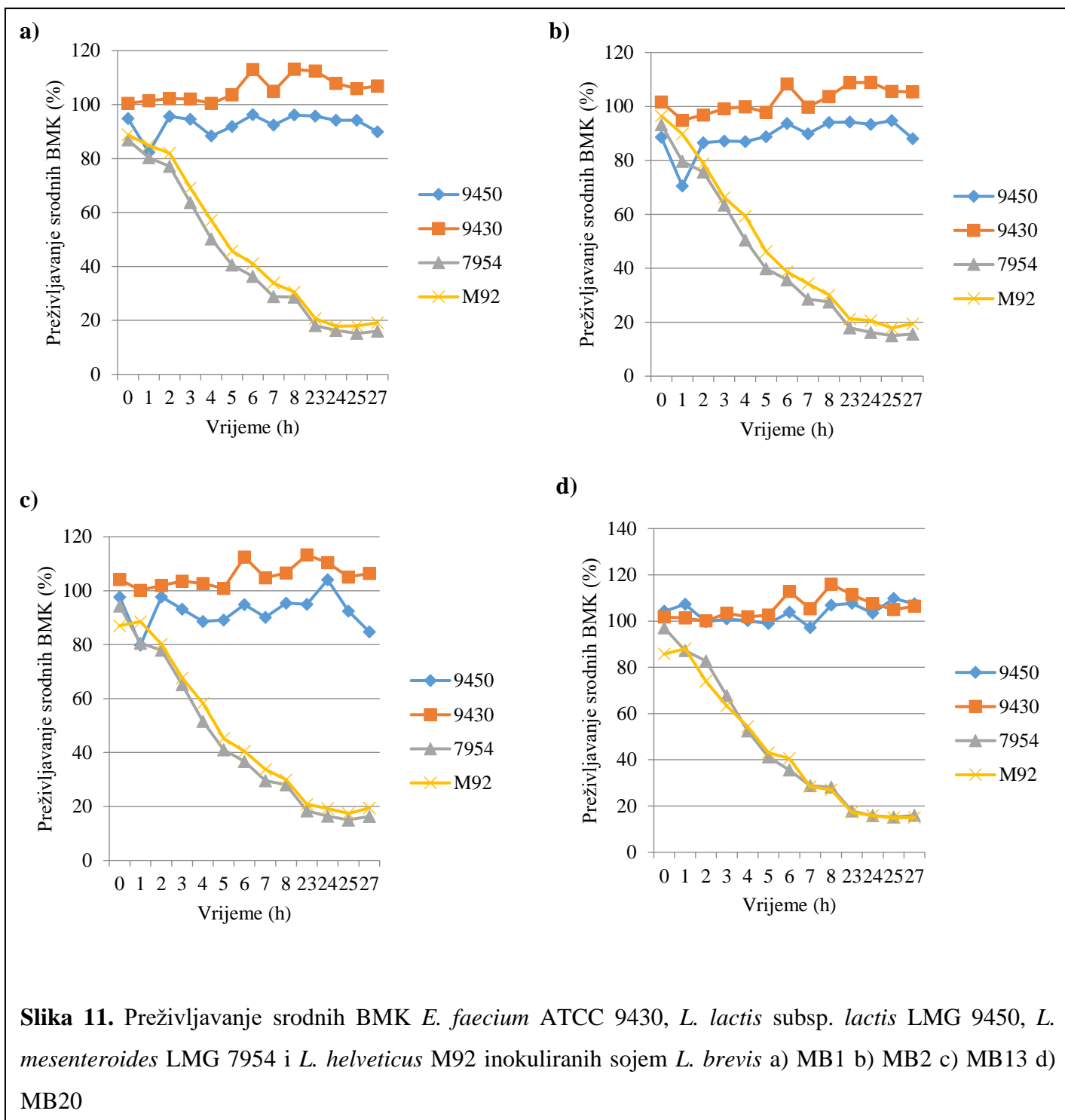
Antimikrobna aktivnost supernatanata odabranih sojeva *L. brevis*, MB1, MB2, MB13 i MB20, izoliranih iz mikrobiote majčinog mlijeka ispitana je turbidimetrijskom metodom. Antimikrobno djelovanje je određeno spektrofotometrijski, a razlika između apsorbancije kontrole, tj. nacijepljenih test-mikroorganizama i apsorbancije uzoraka s dodanim supernatantom ispitivanih sojeva mjera je inhibicije njihovog rasta. Apsorbancija je mjerena tijekom 27 sati.

Odabrani sojevi BMK izolirani iz mikrobiote majčinog mlijeka pokazuju sličnu antimikrobnu aktivnost na patogene test-mikroorganizme. Inhibirali su rast svih patogenih test-mikroorganizama tijekom 27 sati iznad 50 % (slika 10a, b, c, d). U najvećoj mjeri je inhibiran rast *S. aureus* 3048 i K-144, dok je najveće preživljavanje pokazala *S. enterica* serovar Typhimurium FP1. Bakterijski soj MB20 je inhibirao *L. monocytogens* ATCC 19111 u većoj mjeri nego preostala tri ispitivana soja.

Ispitivani sojevi BMK izolirani iz mikrobiote majčinog mlijeka pokazuju i antimikrobno djelovanje na srodne BMK. Sva četiri ispitivana soja inhibirala su rast sojeva *L. mesenteroides* LMG 7954 i *L. helveticus* M92 za više od 80 %, dok nisu inhibirali rast sojeva *E. faecium* ATCC 9430 i *L. lactis* subsp. *lactis* LMG 9450 (slika 11a, b, c, d).



Slika 10. Preživljavanje patogenih test-mikroorganizama *S. aureus* 3048, *S. aureus* K-144, *E. coli* 3014, *S. enterica* serovar Typhimurium FP1, *B. cereus* TM2, *B. subtilis* ATCC 6633 i *L. monocytogenes* ATCC 19111 inokuliranih sojem *L. brevis* a) MB1 b) MB2 c) MB13 d) MB20



Slika 11. Preživljavanje srodnih BMK *E. faecium* ATCC 9430, *L. lactis* subsp. *lactis* LMG 9450, *L. mesenteroides* LMG 7954 i *L. helveticus* M92 inokuliranih sojem *L. brevis* a) MB1 b) MB2 c) MB13 d) MB20

Značajno funkcionalno svojstvo probiotičkih bakterija je zaštita od bakterijskih infekcija, odnosno antimikrobni učinak. Probiotički sojevi sintetiziraju antimikrobne biomolekule, poput vodikovog peroksida, organskih kiselina, bioaktivnih peptida i bakteriocina, koje imaju snažno inhibitorno djelovanje prema patogenim bakterijama, čestim kontaminantima hrane, kao što su to *E. coli*, *Salmonella spp.* i *L. monocytogenes*. Probiotički

sojevi mikrobiote majčinog mlijeka smanjuju permeabilnost crijeva i potiču sintezu mucina te na taj način poboljšavaju zaštitnu funkciju intestinalne sluznice. Također, antimikrobno djelovanje ostvaruju kompeticijom za hranjive tvari i vezno mjesto na crijevnom epitelu (Jiménez i sur., 2010). Pretpostavlja se da je inhibicijski učinak sojeva *L. brevis* u ovom radu prvenstveno posljedica sinteze mliječne kiseline kao primarnog metabolita BMK. Prema Singh i sur. (2021) supernatanti kojima je uklonjena biomasa sojeva laktobacila izoliranih iz mikrobiote majčinog mlijeka inhibiraju rast *B. cereus*, *S. enterica* serovar Typhimurium FP1 i *Shigella flexneri*.

Dobiveni rezultati ispitivanja antimikrobnog djelovanja turbidimetrijskom metodom ukazuju na to da *L. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 produciraju razne antimikrobne molekule, uključujući moguće bakteriocine koji inhibiraju rast patogenih mikroorganizama i nekih srodnih BMK, što je u skladu s dostupnim podacima o antimikrobnom djelovanju vrsta *Lactobacillus* (Šušković i sur., 2010). Brojna druga istraživanja su potvrdila antimikrobno djelovanje sojeva *Lactobacillus* prema patogenim mikroorganizmima, čestim kontaminantima hrane, kao što su *L. monocytogenes*, *E. coli*, *S. aureus* i *S. Typhimurium* (Kariyawasam i sur., 2020; Jang i sur., 2019; Hynönen i sur., 2014). Rezultati ovog rada podudaraju se s rezultatima prethodno navedenih istraživanja i dodatno ukazuju na antimikrobno djelovanje prema patogenima *B. cereus* TM2 i *B. subtilis* ATCC 6633, tj. prema odabranim srodnim BMK *L. mesenteroides* LMG 7954 i *L. helveticus* M92. *L. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 na srodne BMK *E. faecium* ATCC 9430 i *L. lactis* subsp. *lactis* LMG 9450 nisu djelovale antimikrobno. S obzirom na to da su BMK vrste *Enterococcus* i *Lactococcus* dio komensalne mikrobne populacije majčinog mlijeka (Damaceno i sur., 2017; Jiménez i sur., 2008), nedostatak antimikrobne aktivnosti može se smatrati poželjnim jer ne dolazi do inhibicije srodnih, prirodno prisutnih, BMK koje također imaju pozitivan učinak na zdravlje domaćina. S obzirom na mogućnost inhibicije rasta 9 od 11 test mikroorganizama, *L. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 iskazuju široki spektar antimikrobnog djelovanja i time se može pretpostaviti i mogućnost sinteze različitih antimikrobnih molekula (Darvishi i sur., 2021).

Bakterije *L. brevis* izolirane iz mikrobiote majčinog mlijeka koje ekspimiraju S-proteine smatraju se sigurnima za korištenje, humanog su podrijetla i potencijalno probiotičkog djelovanja, a pokazuju značajnu sposobnost preživljavanja u gastrointestinalnim uvjetima, adhezije i kolonizacije na crijevni epitel, što ih čini perspektivnim kandidatima za daljnja ispitivanja i potencijalnu uporabu u biotehnoškim procesima i razvoju novih terapijskih strategija.

Ovi rezultati vrijedan su doprinos istraživanjima s ciljem identifikacije i karakterizacije bakterijskih sojeva izoliranih iz mikrobiote majčinog mlijeka i za razumijevanje mehanizama koji pozitivno utječu na kolonizaciju GIT-a i stimulaciju razvoja imunološkog sustava novorođenčeta, odnosno stabilizaciju sastava prvog intestinalnog mikrobioma. Također su temelj za daljnja istraživanja mogućnosti da se bakterijski sojevi vrste *L. brevis* izolirani iz mikrobiote majčinog mlijeka primjene za postizanje probiotičkog učinka u ljudi.

5. ZAKLJUČCI

1. Između izoliranih sojeva mikrobiote majčinog mlijeka značajna je učestalost *L. brevis* sojeva *Lactobacillus* vrsta.
2. SDS-PAGE analizom prvi puta je dokazana prisutnost S-proteina u *L. brevis* sojevima MB1, MB2, MB13 i MB20.
3. S obzirom na to da sojevi *L. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 uspješno preživljavaju simulirane uvjete GIT-a, pokazuju mogućnost autoagregacije te je površina bakterijske stanice hidrofobna s elektron-donorskim i elektron-akceptorskim svojstvima, iskazuju potencijal za kolonizaciju GIT-a domaćina.
4. *L. brevis* sojevi iskazuju antimikrobno djelovanje prema enteropatogenim mikroorganizmima, iz *Staphylococcus aureus* vrsta, uzročnika laktakcijskog mastitisa. Antistafilokokno djelovanje značajno je funkcionalno svojstvo probiotičkih bakterija, koje ima potencijal bioterapijske primjene i doprinosa suzbijanju infekcija kod novorođenčadi.

6. LITERATURA

Angelopoulou, A., Field, D., Ryan, C. A., Stanton, C., Hill, C., Ross, R. P. (2018) The microbiology and treatment of human mastitis. *Med. Microbiol. Immunol.* **207**, 83–94.

Arroyo, R., Martín, V., Maldonado, A., Jiménez, E., Fernández, L., Rodríguez, J. M. (2010) Treatment of infectious mastitis during lactation: antibiotics versus oral administration of lactobacilli isolated from breast milk. *Clin. Infect. Dis.* **50**, 1551–1558.

Banić, M., Uroić, K., Leboš Pavunc, A., Novak, J., Zorić, K., Durgo, K., Petković, H., Jamnik, P., Kazazić, S., Kazazić, S. (2018) Characterization of S-layer proteins of potential probiotic starter culture *Lactobacillus brevis* SF9B isolated from sauerkraut. *LWT.* **93**, 257-267.

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

Beganović, J., Leboš Pavunc, A., Gjuračić, K., Špoljarec, M., Šušćović, J., Kos, B. (2011b) Improved sauerkraut production with probiotic strain *Lactobacillus plantarum* L4 and *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954. *J. Food Sci.* **76**, 124-129.

Biagi, E., Quercia, S., Aceti, A., Beghetti, I., Rampelli, S., Turrone, S., Faldella, G., Candela, M., Brigidi, P., Corvaglia, L. (2017) The bacterial ecosystem of mother's milk and infant's mouth and gut. *Front. Microbiol.* **8**, 1214.

Cabrera-Rubio, R., Mira, A., Isolauri, E., Laitinen, K., Salminen, S., Collado, M. C. (2012) The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *Am. J. Clin. Nutr.* **96**, 544–551.

Civardi, E., Garofoli, F., Tziella, C., Paolillo, P., Bollani, L., Stronati, M. (2013) Microorganisms in human milk: lights and shadows. *J. Matern. Fetal. Neonatal Med.* **26**, 30–34.

Collado, M. C., Meriluoto, J., Salminen, S. (2007) Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus. *Lett. Appl. Microbiol.* **45**, 454-460.

- Cotter, P. D., Ross, R. P., Hill, C. (2013) Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 95–105.
- Damaceno, Q. S., Souza, J. P., Nicoli, J. R., Paula, R. L., Assis, G. B., Figueiredo, H. C., Azevedo, V., Martinis, F. S. (2017) Evaluation of potential probiotics isolated from human milk and colostrum. *Probiotics Antimicro. Proteins.* **9**, 371–379.
- Dancer, S. J. (2004) How antibiotics can make us sick: the less obvious adverse effects of antimicrobial chemotherapy. *Lancet Infect. Dis.* **4**, 611–619.
- Darvishi, N., Allahyari Fard, N., Sadrnia, M. (2021) Genomic and proteomic comparisons of bacteriocins in probiotic species *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* and inhibitory ability of *Escherichia coli* MG 1655. *Biotechnol. Rep.* **31**, e00654.
- de la Fuente-Núñez, C., Mertens, J., Smit, J., Hancock, R. E. (2012) The bacterial surface layer provides protection against antimicrobial peptides. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 5452–5456.
- Engelhardt, H. (2007) Are S-layers exoskeletons? The basic function of protein surface layers revisited. *J. Struct. Biol.* **160**, 115–124.
- Fernández, L., Cárdenas, N., Arroyo, R., Manzano, S., Jiménez, E., Martín, V., Rodríguez, J. M. (2016) Prevention of infectious mastitis by oral administration of *Lactobacillus salivarius* PS2 during late pregnancy. *Clin. Infect. Dis.* **62**, 568–573.
- Fernández, L., Langa, S., Martín, V., Maldonado, A., Jiménez, E., Martín, R., Rodríguez, J. M. (2013) The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. *Pharmacol. Res.* **69**, 1–10.
- Frece, J., Kos, B., Svetec, I. K., Zgaga, Z., Mrša, V., Šušković, J. (2005) Importance of S-layer proteins in probiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* M92. *J. Appl. Microbiol.* **98**, 285–292.
- Galdeano, C. M., Cazorla, S. I., Dumit, J. M. L., Vélez, E., Perdígón, G. (2019) Beneficial effects of probiotic consumption on the immune system. *Ann. Nutr. Metab.* **74**, 115–124.
- Gervassi, A. L., Horton, H. (2014) Is infant immunity actively suppressed or immature? *Virology.* **5**, 1–9.

- Gilmour, R., Messner, P., Guffanti, A. A., Kent, R., Scheberl, A., Kendrick, N., Krulwich, T. A. (2000) Two-dimensional gel electrophoresis analyses of pH-dependent protein expression in facultatively alkaliphilic *Bacillus pseudofirmus* OF4 lead to characterization of an S-layer protein with role in alkaliphily. *J. Bacteriol.* **182**, 5969-5981.
- Ho, N. T., Li, F., Lee-Sarwar, K. A., Tun, H. M., Brown, B. P., Pannaraj, P. S., Bender, J. M., Azad, M. B., Thompson, A. L., Weiss, S. T., Azcarate-Peril, M. A., Litonjua, A. A., Kozyrskyj, A. L., Jaspán, H. B., Aldrovandi, G. M., Kuhn, L. (2018) Meta-analysis of effects of exclusive breastfeeding on infant gut microbiota across populations. *Nat. Commun.* **9**, 4169.
- Hynönen, U., Kant, R., Lähteinen, T., Pietilä, T. E., Beganović, J., Smidt, H., Uroić, K., Åvall-Jääskeläinen, S., Palva, A. (2014) Functional characterization of probiotic surface layer protein-carrying *Lactobacillus amylovorus* strains. *BMC Microbiol.* **14**, 199.
- Hynönen, U., Palva, A. (2013) *Lactobacillus* surface layer proteins: Structure, function and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 5225–5243.
- Iwasaki, A., Medzhitov R. (2015) Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat. Immunol.* **16**, 343–353.
- Jang, H. J., Lee, N. K., Paik, H. D. (2019) Probiotic characterization of *Lactobacillus brevis* KU15153 showing antimicrobial and antioxidant effect isolated from kimchi. *Food. Sci. Biotechnol.* **28**, 1521–1528.
- Jiménez, E., Fernández, L., Maldonado, A., Martín, R., Olivares, M., Xaus, J., Rodríguez, J. M. (2008) Oral administration of *Lactobacillus* strains isolated from breast milk as an alternative for the treatment of infectious mastitis during lactation. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 4650–4655.
- Jiménez, E., Martín, R., Maldonado, A., Martín, V., Gómez de Segura, A., Fernández, L., Rodríguez, J. M. (2010) Complete genome sequence of *Lactobacillus salivarius* CECT 5713, a probiotic strain isolated from human milk and infant feces. *J. Bacteriol.* **192**, 5266– 5267.

- Jost, T., Lacroix, C., Braegger, C. P., Rochat, F., Chassard, C. (2014) Vertical mother-neonate transfer of maternal gut bacteria via breastfeeding. *Environ. Microbiol.* **16**, 2891-2904.
- Jost, T., Lacroix, C., Braegger, C., Chassard, C. (2015) Impact of human milk bacteria and oligosaccharides on neonatal gut microbiota establishment and gut health. *Nutr. Rev.* **73**, 426-437.
- Kariyawasam, K., Yang, S. J., Lee, N. K., Paik, H. D. (2020) Probiotic properties of *Lactobacillus brevis* KU200019 and synergistic activity with fructooligosaccharides in antagonistic activity against foodborne pathogens. *Food Sci. Anim. Resour.* **40**, 297–310.
- 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.
- Kotani, Y., Kunisawa, J., Suzuki, Y., Sato, I., Saito, T., Toba, M., Kohda, N., Kiyono, H. (2014) Role of *Lactobacillus pentosus* strain b240 and the Toll-like receptor 2 axis in Peyer's patch dendritic cell-mediated immunoglobulin A enhancement. *PLoS ONE.* **9**, e91857.
- Kozak, K., Charbonneau, D., Sanozky-Dawes, R., Klaenhammer, T. (2015) Characterization of bacterial isolates from the microbiota of mothers' breast milk and their infants. *Gut Microbes.* **6**, 341-351.
- Lackey, K. A., Williams, J. E., Meehan, C. L., Zachek, J. A., Benda, E. D., Price, W. J., Foster, J. A., Sellen, D. W., Kamau-Mbuthia, E. W., Kamundia, E. W., Mbugua, S., Moore, S. E., Prentice, A. M., K, D. G., Kvist, L. J., Otoo, G. E., García-Carral, C., Jiménez, E., Ruiz, L., Rodríguez, J. M., Pareja, R. G., Bode, L., McGuire, M. K. (2019) What's normal? Microbiomes in human milk and infant feces are related to each other but vary geographically: The INSPIRE Study. *Front. Nutr.* **6**, 45.
- Leboš Pavunc, A., Beganović, J., Kos, B., Uroić, K., Blažić, M., Šušković, J. (2012) Characterization and application of autochthonous starter cultures for fresh cheese production. *Food Technol. Biotechnol.* **50**, 141-151.

- M'Rabet, L., Vos, A. P., Boehm, G., Garssen, J. (2008) Breast-feeding and its role in early development of the immune system in infants: consequences for health later in life. *J. Nutr.* **138**, 1782–1790.
- Malago, J. J., Tooten, P. C., Koninkx, J. F. (2010) Anti-inflammatory properties of probiotic bacteria on *Salmonella*-induced IL-8 synthesis in enterocytelike Caco-2 cells. *Benef. Microbes.* **1**, 121–130.
- Martin, C. R., Ling, P. R., Blackburn, G. L. (2016) Review of infant feeding: key features of breast milk and infant formula. *Nutrients.* **8**, 279.
- Mediano, P., Fernández, L., Jiménez, E., Arroyo, R., Espinosa-Martos, I., Rodríguez, J. M., Marín, M. (2017) Microbial diversity in milk of women with mastitis: potential role of coagulase-negative staphylococci, viridans group streptococci, and corynebacteria. *J. Hum. Lact.* **33**, 309–318.
- Meng, J., Zhu, X., Gao, S. M., Zhang, Q. X., Sun, S., Lu, R. (2014) Characterization of surface layer proteins and its role in probiotic properties of three *Lactobacillus* strains. *Int. J. Biol. Macromol.* **65**, 110-114.
- Navarro-Tapia, E., Sebastiani, G., Sailer, S., Toledano, L. A., Serra-Delgado, M., García-Algar, O., Andreu-Fernández, V. (2020) Probiotic supplementation during the perinatal and infant period: effects on gut dysbiosis and disease. *Nutrients* **12**, 2243.
- Pelletier, C., Bouley, C., Cayuela, C., Bouttier, S., Bourlioux, P., Bellon-Fontaine, M. N. (1997) Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 1725-1731.
- Perez, P. F., Doré, J., Leclerc, M., Levenez, F., Benyacoub, J., Serrant, P., Segura-Roggero I, Schiffrin, E. J., Donnet-Hughes, A. (2007) Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? *Pediatrics.* **119**, e724.
- Pirotta, M. V., Garland, S. M. (2006) Genital *Candida* species detected in samples from women in Melbourne, Australia, before and after treatment with antibiotics. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 3213–3217.

- Praveen, P., Jordan, F., Priami C., Morine, M. J. (2015) The role of breast feeding in infant immune system: a systems perspective on the intestinal microbiome. *Microbiome*. **3**, 41.
- Rabe, H., Lundell, A. C., Sjöberg, F., Ljung, A., Strömbeck, A., Gio-Batta, M., Maglio, C., Nordström, I., Andersson, K., Nookaew, I., Wold, A. E., Adlerberth, I., Rudin, A. (2020) Neonatal gut colonization by *Bifidobacterium* is associated with higher childhood cytokine responses. *Gut microbes*. **12**, 1–14.
- Rong, J., Zheng, H., Liu, M., Hu, X., Wang, T., Zhang, X., Jin, F., Wang, L. (2015) Probiotic and anti-inflammatory attributes of an isolate *Lactobacillus helveticus* NS8 from Mongolian fermented koumiss. *BMC Microbiol*. **15**, 196.
- Ross, A. A., Doxey, A. C., Neufeld, J. D. (2017) The skin microbiome of cohabiting couples. *mSystems*. **2**, e043-17.
- Ruiz, L., García-Carral, C., Rodriguez, J. M. (2019) Unfolding the human milk microbiome landscape in the omics era. *Front. Microbiol*. **10**, 1378.
- Sára, M., Sleytr, U. B. (2000) S-layer proteins. *J. Bacteriol*. **182**, 859–868.
- Singh, K. S., Singh, B. P., Rokana, N., Singh, N., Kaur, J., Singh, A., Panwar, H. (2021) Bio-therapeutics from human milk: prospects and perspectives. *J. Appl. Microbiol*.
- Soltan Dallal, M. M., Maragheh, N. Rajabi, Z., Hosseini, M. B., Papizadeh, M., Hassanpour, G., Sharifi Yazdi, S., Memariani, M., Haghigat Khajavi, S., Abrichamchian Iangaroodi, S. M., Agha Mirzaei, M. H., Mehrnaz, M. (2021) Probiotic properties of Lactobacilli isolated from human milk and their inhibitory effect on gastrointestinal pathogenic bacteria. *Afr. J. Microbiol*. **11**, 318-324.
- Stewart, C. J., Ajami, N. J., O'Brien, J. L., Hutchinson, D. S., Smith, D. P., Wong, M. C., Ross, M. C., Lloyd, R. E., Doddapaneni, H., Metcalf, G. A., Muzny, D., Gibbs, R. A., Vatanen, T., Huttenhower, C., Xavier, R. J., Rewers, M., Hagopian, W., Toppari, J., Ziegler, A. G., She, J. X., Akolkar, B., Lernmark, A., Hyoty, H., Vehik, K., Krischer, J. P., Petrosino, J. F. (2018) Temporal development of the gut microbiome in early childhood from the TEDDY study. *Nature*. **562**, 583-588.

Stinson, L. F. (2019) Establishment of the early-life microbiome: a DOHaD perspective. *J. Dev. Orig. Health Dis.* **11**, 201-210.

Stinson, L. F., Payne, M. S., Keelan, J. A. (2017) Planting the seed: Origins, composition, and postnatal health significance of the fetal gastrointestinal microbiota. *Crit. Rev. Microbiol.* **43**, 352-369.

Stinson, L. F., Sindi, A. S. M., Cheema, A. S., Lai, C. T., Mühlhäusler, B. S., Wlodek, M. E., Payne, M. S., Geddes, D. T. (2020) The human milk microbiome: who, what, when, where, why, and how? *Nutr. Rev.* **79**, 529-543.

Šušková, J., Kos, B., Beganović, J., Leboš Pavunc, A., Habjanič, K., Matošić, S. (2010) Antimicrobial activity – the most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. *Food Technol. Biotechnol.* **48**, 296-307.

Tallon, R., Arias, S., Bressollier, P., Urdaci, M. C. (2007) Strain- and matrix-dependent adhesion of *Lactobacillus plantarum* is mediated by proteinaceous bacterial compounds. *J. Appl. Microbiol.* **102**, 442–451.

Torow, N., Marsland, B. J., Hornef, M. W., Gollwitzer, E. S. (2017) Neonatal mucosal immunology. *Mucosal Immunol.* **10**, 5–17.

Tuo, Y., Yu, H., Ai, L., Wu, Z., Guo, B., Chen, W. (2013) Aggregation and adhesion properties of 22 *Lactobacillus* strains. *J. Dairy Sci.* **96**, 4252-4257.

UNICEF (2018) The state of world's children 2017: children in a digital world.

Uroić, K., Novak, J., Hynönen, U., Pietilä, T. E., Leboš Pavunc, A., Kant, R., Kos, B., Palva, A., Šušková, J. (2016) The role of S-layer in adhesive and immunomodulating properties of probiotic starter culture *Lactobacillus brevis* D6 isolated from artisanal smoked fresh cheese. *LWT.* **69**, 623-632.

Vaidya, Y., Patel, M., Patel, K., Raol, G., Bhavsar, N., Surati, V., Gopani, Y., Joshi, I., Jha, R., Kunjadia, A. (2020) A temporary stability and vertical lactating mother-infant transfer of breast milk microbiota through breastfeeding. *J. Adv. Sci. Res.* **11**, 191-197.

van der Mei, H. C., van de Belt-Gritter, B., Pouwels, P. H., Martinez, B., Busscher, H. J. (2003) Cell surface hydrophobicity is conveyed by S-layer proteins—a study in recombinant lactobacilli. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*. **28**, 127–134.

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

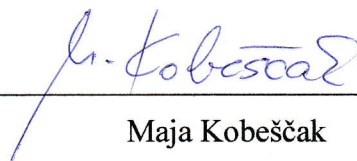
Yu, J. C., Khodadadi, H., Malik, A., Davidson, B., Salles, E., Bhatia, J., Hale, V. L., Baban, B. (2018) Innate immunity of neonates and infants. *Front. Immunol.* **9**, 1759.

Zamfir, M., Grosu-Tudor, S. S. (2014) Stress response of some lactic acid bacteria isolated from Romanian artisan dairy products. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 375-384.

Zommiti, M., Feuilleley, M. G. J., Connil, N. (2020) Update of Probiotics in Human World: A Nonstop Source of Benefactions till the End of Time. *Microorganisms.* **8**, 1907.

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.



Maja Kobeščak