

# Inhibicija biofilmova *Helicobacter pylori* s pomoću odabranih izolata bakterija mliječne kiseline

---

Karaula, Ivona

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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:159:726808>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Ivona Karaula  
0058218063**

**Inhibicija biofilmova *Helicobacter pylori* s pomoću  
odabranih izolata bakterija mliječne kiseline**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Mikrobiologija

**Mentor:** dr. sc. Deni Kostelac

**Zagreb, 2022.**

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

**Inhibicija biofilmova *Helicobacter pylori* s pomoću odabranih izolata bakterija mliječne kiseline**  
**Ivona Karaula, 0058218063**

## Sažetak:

*Helicobacter pylori* uzročnik je jedne od najčešćih bakterijskih infekcija u ljudi, a njezino otkriće prije 20 godina promijenilo je dijagnozu i liječenje gastroduodentitisa. Sposobnost preživljavanja u želucu povezana je višestrukim mehanizmima, a novija istraživanja upućuju na to da je formiranje biofilma povezano s kolonizacijom. Cilj ovoga rada bio je kvantificirati sposobnost formiranja biofilmova i stupanj autoagregacije *H. pylori* te karakterizirati izolate bakterija mliječne kiseline iz ovčjeg sira s ciljem pronalaska potencijanih probiotika. Određena je i sposobnost inhibicije biofilmova *H. pylori* te stupanj koagregacije izolata s ovom patogenom bakterijom u simuliranim uvjetima želuca. U eksperimentalnim uvjetima, *H. pylori* klasificirana je kao jak producent biofilma sa značajnim autoagregacijskim svojstvima (45%). Tri izolata pokazala su najveći stupanj inhibicije biofilma i koagregacije s *H. pylori* te su identificirani pomoću fermentacijskog profila kao *Latilactobacillus curvatus* DK1, *Lacticaseibacillus paracasei* DK5 i *Latilactobacillus curvatus* DK7.

**Ključne riječi:** probiotici, *Helicobacter pylori*, biofilm, inhibicija, koagregacija

**Rad sadrži:** 32 stranice, 7 slika, 4 tablice, 51 literaturni navod

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** dr. sc. Deni Kostelac

**Datum obrane:** 18. srpnja, 2022.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

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

Department of Biochemical Engineering  
Laboratory for General Microbiology and Food Microbiology

Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Food Technology

**Inhibition of *Helicobacter pylori* biofilms using selected isolates of lactic acid bacteria**  
**Ivona Karaula, 0058218063**

### Abstract:

*Helicobacter pylori* is the cause of one of the most common bacterial infections in humans, and its discovery 20 years ago has transformed the diagnosis and treatment of gastroduodenitis. The ability to survive in the stomach is related to several mechanisms, and recent research suggests that biofilm formation is related to colonization. The aim of this work was to quantify the ability to form biofilms and the degree of autoaggregation of *H. pylori* and to characterize isolates of lactic acid bacteria from sheep cheese to find potential probiotics. In addition, the ability to inhibit *H. pylori* biofilms and the degree of coaggregation of isolates with this pathogenic bacterium were determined under simulated gastric conditions. Under experimental conditions, *H. pylori* is classified as a strong biofilm producer with significant autoaggregation properties (45%). Three isolates showed the highest degree of biofilm inhibition and coaggregation with *H. pylori* and were identified as *Lactilactobacillus curvatus* DK1, *Lacticaseibacillus paracasei* DK5 and *Lactilactobacillus curvatus* DK7 based on the fermentation profile.

**Keywords:** probiotics, *Helicobacter pylori*, biofilm, inhibition, coaggregation

**Thesis contains:** 32 pages, 7 figures, 4 tables, 51 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** Deni Kostelac, PhD

**Thesis defended:** July 18<sup>th</sup>, 2022

*Od srca zahvaljujem dragom mentoru dr.sc. Deniju Kostelcu na velikoj pomoći, prenesenom znanju i korisnim savjetima tijekom izrade ovog rada.*

## Sadržaj

|  |    |
|--|----|
| 1. UVOD.....   | 1  |
| 2. TEORIJSKI DIO.....  | 2  |
| 2.1. CRIJEVNA MIKROBIOTA.....                                | 2  |
| 2.2. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE.....                        | 4  |
| 2.3. PROBIOTICI.....   | 5  |
| 2.3.1. DEFINICIJA I POVIJEST.....                            | 5  |
| 2.3.2. FUNKCIJA I MEHANIZAM DJELOVANJA PROBIOTIKA.....       | 6  |
| 2.4. HELICOBACTER PYLORI.....                                | 7  |
| 2.4.1. MIKROBIOLOŠKE KARAKTERISTIKE.....                     | 7  |
| 2.4.2. ADAPTACIJA I PATOGENOST.....                          | 9  |
| 2.5. UTJECAJ PROBIOTIKA NA H. PYLORI.....                    | 10 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO.....                                  | 12 |
| 3.1. MATERIJALI.....   | 12 |
| 3.1.1. MIKROORGANIZMI.....                                   | 12 |
| 3.1.2. HRANJIVE PODLOGE I KEMIKALIJE.....                    | 12 |
| 3.1.2.1. ODRŽAVANJE I UZGOJ BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE..... | 12 |
| 3.1.2.2. ODRŽAVANJE I UZGOJ HELICOBACTER PYLORI.....         | 12 |
| 3.1.2.3. KEMIKALIJE.....                                     | 12 |
| 3.1.3. APARATURA I PRIBOR.....                               | 13 |
| 3.2. METODE.....   | 13 |

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 3.2.1. | PRIPREMA RADNIH SUSPENZIJA .....                                  | 13 |
| 3.2.2. | ODREĐIVANJE BROJA ŽIVIH MIKROORGANIZAMA INDIREKTNOM METODOM.....  | 14 |
| 3.2.3. | SPOSOBNOST FORMIRANJA BIOFILMOVA BAKTERIJSKIH IZOLATA .....       | 14 |
| 3.2.4. | SPOSOBNOST FORMIRANJA BIOFILMOVA HELICOBACTER PYLORI.....         | 14 |
| 3.2.5. | INHIBICIJA FORMIRANJA BIOFILMOVA HELICOBACTER PYLORI .....        | 15 |
| 3.2.6. | ODREĐIVANJE AUTOAGREGACIJSKE SPOSOBNOSTI HELICOBACTER PYLORI..... | 16 |
| 3.2.7. | ODREĐIVANJE SPOSOBNOSTI KOAGREGACIJE.....                         | 17 |
| 3.2.8. | IDENTIFIKACIJA POMOĆU ANALIZE FERMENTACIJSKOG PROFILA .....       | 17 |
| 3.2.9. | STATISTIČKA OBRADA PODATAKA .....                                 | 17 |
| 4.     | REZULTATI I RASPRAVA .....  | 18 |
| 4.1.   | KVANTIFIKACIJA SPOSOBNOSTI FORMIRANJA BIOFILMA .....              | 18 |
| 4.2.   | SPOSOBNOST INHIBICIJE BIOFILMA HELICOBACTER PYLORI.....           | 19 |
| 5.     | ZAKLJUČCI.....  | 26 |
| 6.     | POPIS LITERATURE .....  | 27 |

## 1. UVOD

Unatoč desetljećima truda, infekcije *Helicobacter pylori* i dalje je teško liječiti. Više od polovice svjetske populacije zaraženo je s *H. pylori*, koja je glavni uzročnik duodenalnog i želučanog ulkusa, kao i raka želuca (Hathroubi i sur., 2018). Tijekom kronične infekcije, *H. pylori* se lokalizira unutar želučane sluznice zahvaljujući svojoj impresivnoj sposobnosti preživljavanja u ekstremnim uvjetima želuca. Ta sposobnost preživljavanja i opstanka u želucu povezana je s proizvodnjom ureaze, kemotaktičkom pokretljivošću i sposobnošću prilagodbe fluktuirajućem okruženju. Osim toga, nedavno je sugerirano da formiranje biofilma ima važnu ulogu u kolonizaciji (Hathroubi i sur., 2018). Studije su pokazale su da neki sojevi *H. pylori* imaju karakteristike koje ih čine sposobnima za proizvodnju biofilma *in vitro* (Andersen i Rasmussen, 2009). Ovo stvaranje biofilma uključuje pričvršćivanje pojedinačnih bakterija koje tvore mikrokolonije, spajanje mikrokolonija i rast u trećoj dimenziji.

Premda je broj recenziranih publikacija o djelovanju ovog patogena zadnjih godina u kontinuiranom porastu, neki važni mehanizmi, među kojima je i sam put prijenosa, još uvijek nisu do kraja razjašnjeni. (Kusters i sur., 2006). S obzirom na raznolikost uvjeta u pojedinim dijelovima gastrointestinalnog sustava, kao i na vanjske faktore koji na njih direktno utječu, mogućnost infekcije s *H. pylori* te razvoja bolesti značajno se razlikuje kod pojedinaca. Infekciji pogoduju stresni okolišni uvjeti kao što su prijevremeni porod, dohrana, primjena terapije antibioticima i dr. (Vitali Čepo i Filipović, 2014).

Terapija antibioticima još uvijek predstavlja glavni način liječenja oboljenja izazvanih infekcijom ovom bakterijom. Međutim, s obzirom na sve izraženiji razvoj rezistencije prema brojnim antibioticima, prevencija same infekcije postala je ključan faktor zaštite organizma. Danas se sve veći značaj pridaje istraživanju uloge probiotika i probiotičkih pripravaka prilikom inhibicije djelovanja *H. pylori* na gastrointestinalni sustav čovjeka.

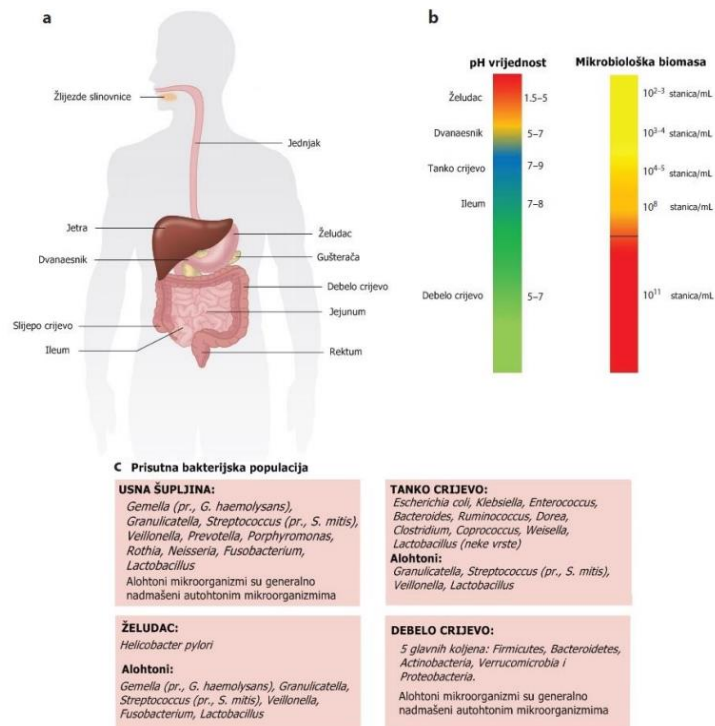
Cilj ovoga rada bio je kvantificirati sposobnost formiranja biofilmova i stupanj autoagregacije *H. pylori* te provesti probiotičku karakterizaciju izolata bakterija mliječne kiseline iz autohtonog ovčjeg sira kako bi se pronašli sojevi s potencijalnom primjenom u eliminaciji infekcija uzrokovanih ovom patogenom bakterijom. Nadalje, određena je sposobnost koagregacije potencijalnih probiotika i *H. pylori* kao i mogućnost inhibicije formiranja biofilma u simuliranim uvjetima želuca. Izolati s najvećim probiotičkim potencijalom identificirani su analizom fermentacijskog profila.



## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1 CRIJEVNA MIKROBIOTA

Mikrobiom se definira kao sveukupan genetički materijal određene mikrobiote (D'Argenio i Salvatore, 2015, Lederberg i McCray, 2001). Mikrobiota obuhvaća sve mikroorganizme koji nastanjuju različite dijelove ljudskog tijela (kožu, probavni trakt, dišni trakt, urogenitalni trakt) i s njim žive u simbiozi. Ljudski mikrobiom sadrži i do stotinu puta veći broj gena nego sam ljudski genom. Fiziološku mikrobiotu čovjeka čini čak  $10^{14}$  bakterija, među kojima su znanstvenici primjenom molekularne dijagnostike uspjeli izdvojiti više od 1000 bakterijskih vrsta. Crijevna mikrobiota odnosi se specifično na mikroorganizme koji koloniziraju probavni trakt. Većinu njih čine bakterije (čak 90 %), dok preostali dio čine arheje i virusi, kao i neki eukariotski organizmi, primjerice gljivice (Antal i sur., 2019). Mikroorganizmi koji nastanjuju gastrointestinalni sustav čovjeka imaju značajan utjecaj na održavanje zdravlja domaćina. Njihova uloga očituje se posebice u održavanju homeostaze, odvijanju metaboličkih procesa, probavi hrane, funkcioniranju imunološkog sustava te obrani od patogena.



**Slika 1.** Mikrobiološki sastav humanog gastrointestinalnog trakta. a) Osnovni dijelovi gastrointestinalnog trakta. b) Varijacije u pH vrijednosti probavnog trakta i koncentracija bakterijskih

stanica/mL. c) Dominantni tipovi autohtonih i alohtonih mikroorganizama (prema Walter i Ley, 2011).

Broj vrsta mikroorganizama koji nastanjuju gastrointestinalni trakt kreće se između 500 i 1000, a najviše koncentracije identificirane su upravo u debelom crijevu (D'Argenio i Salvatore, 2015; Xu i Knight, 2014). Brojne analize potvrdile su kako se broj bakterija u proksimalnom dijelu crijeva kreće oko  $100 \text{ mL}^{-1}$ , dok u kolonu taj broj doseže i do  $10^{11} \text{ mL}^{-1}$ . Mikrobna populacija ljudskih crijeva prolazi kroz konstantan utjecaj selektivnog pritiska od strane konkurentnih organizama te samog domaćina. Kao posljedica toga, uspostavlja se homeostaza u kojoj se brojčani omjeri pojedinih vrsta mogu značajno razlikovati. Ekološki sustav crijevne mikroflore uspostavlja se već samim rođenjem, dok njen razvoj i promjena karakteristika kako u ranom djetinjstvu, tako i u odrasloj dobi, ovise o brojnim faktorima iz okoliša (Verbanac i sur., 2017). Vaginalni terminski porod, dojenje te izlaganje mikroorganizmima već u ranoj dobi, pozitivno pridonose svojstvima crijevne mikrobiote. Znanstveno je dokazano i kako primjerice polifenoli i njihovi metaboliti doprinose poticanju rasta korisnih bakterija te inhibiciji patogena (Daglia, 2012). S druge strane, prijevremeni porod, porod na carski rez, dohrana te primjena antibiotika rezultiraju negativnim učincima na sastav crijevne mikrobiote. (Verbanac i sur., 2017).

Česte gastrointestinalne bolesti kod kojih su uočene promjene sastava crijevne mikrobiote su pretilost, kronične upalne bolesti crijeva (engl. *inflammatory bowel disease*, IBD), ulcerozni kolitis (engl. *ulcerative colitis*, UC), Crohnova bolest (engl. *Crohn's disease*, CD), sindrom iritabilnog kolona (engl. *irritable bowel syndrome*, IBS), kolorektalni karcinom i nealkoholna masna jetra. Spomenuti značaj mikrobiote u ljudskom metabolizmu manifestira se kroz regulaciju metabolizma ugljikohidrata, proteina i lipida. Za sam proces bitna je ekspresija različitih enzima mikrobiote i njihov utjecaj na enzime domaćina, što se najčešće ostvaruje fermentacijom. Funkcija mikrobiote od velikog je značaja kod sinteze kratkolančanih masnih kiselina (engl. *short chain fatty acid*, SCFA) te kod sinteze vitamina K i nekih vitamina B skupine (Guarner i Malagelada, 2003).

Antimikrobna zaštitna uloga crijevne mikrobiote očituje se u zauzimanju životnog prostora neželjenim mikroorganizmima te kompeticiji za nutrijente, kao i u proizvodnji brojnih metabolita koji imaju izraženo antimikrobno djelovanje. Za vrste poznatog roda *Lactobacillus* karakteristična je proizvodnja mliječne kiseline koja predstavlja važan faktor prilikom razaranja stanične stijenke neželjenih bakterija. Svoj utjecaj na imunološki sustav crijevna

mikrobiota pokazuje kroz sam doprinos njegovoj modulaciji preko utjecaja na crijevu pridruženo limfoidno tkivo (engl. *gut associated lymphoid tissues*, GALT), pri čemu se posebno ističe sudjelovanje u funkciji, ali i samom razvoju regulacijskih limfocita T (engl. *T regulatory cells*, Treg) te regulaciji prirodnih limfoidnih stanica (engl. *innate lymphoid cells*, ILCs). Uloga razvoja mikrobiote u najranijim razdobljima života značajna je upravo zbog sazrijevanja imunološkog sustava i odgovora na različite alergije (Antal i sur., 2019). Znanstveno je dokazano pozitivno djelovanje crijevnih mikrobiota na održavanje strukture barijere gastrointestinalnog sustava, za što je najbolji primjer njena uloga u održavanju međustaničnih veza (engl. *tight junctions* - održavanje dezmosoma).

Zadnjih pedesetak godina pokušava se definirati pojam tzv. zdravog mikrobioma, ali i dalje nije definirano što to točno podrazumijeva i što obuhvaća pojam zdravi mikrobiom u pogledu temporalno-spacijalnog te kvalitativnog i kvantitativnog udjela mikrobiota (Antal i sur., 2019). Paralelna evolucija domaćina i njegove vlastite mikroflore omogućuje razvoj i održavanje povoljnog simbiotskog odnosa u kojemu mikroorganizmi dobivaju stanište i potrebne hranjive tvari, dok je domaćinu osiguran dodatni metabolički kapacitet. Do sada su otkrivena tri osnovna simbiotička stanja ravnoteže domaćina i njegove mikrobiote. Sukladno tome, dogovorno su određena tri osnovna tipa sastava mikrobiote koji se nazivaju enterotipovima. Premda među njima nisu definirane striktno granice. Enterotipovi se razlikuju na osnovi varijacije jednog od tri roda *Bacteroides*, *Prevotella*, *Ruminococcus*.

## 2.2 BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE

Bakterije mliječne kiseline (BMK) obuhvaćaju skupinu velikog broja bakterijskih vrsta karakteriziranih sposobnošću fermentacije različitih ugljikohidrata. Zahvaljujući svom konzervirajućem učinku te mogućnosti poboljšanja teksture i okusa različitih prerađevina, bakterije mliječne kiseline pronašle su široku uporabu u brojnim granama prehrambene industrije (Samaržija i sur., 2000). BMK pripadaju Gram-pozitivnim, mezofilnim, nesporogenim bakterijama, te mogu biti štapićastog ili kuglastog oblika. Heterotrofne su i kemoorganotrofne. Proces metabolizma ovih mikroorganizama rezultira nastajanjem mliječne kiseline kao krajnjeg produkta fermentacije ugljikohidrata (Mokoena, 2017). Sve vrste BMK mogu se svrstati u jedan od sljedećih rodova: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Sporolactobacillus*, *Enterococcus* i *Leuconostoc* (Frece, 2021). BMK zauzimaju važan udio u populaciji raznolikih

mikroorganizama probavnog trakta zdravih ljudi i životinja. Osim što predstavljaju značajan sastavni dio mikrobiote gastrointestinalnog trakta, gdje ispoljavaju brojne pozitivne učinke na zdravlje čovjeka, predstavnici su i dijela mikrobiote usne šupljine, kože, urinarnog trakta, kao i spolnih organa (Lloyd-Price i sur., 2016). BMK pomažu u održavanju zdrave i odgovarajuće crijevne mikroflore te u inhibiciji rasta patogenih mikroorganizama.

Duga tradicija uporabe ovih bakterija bez dokazanih štetnih posljedica na ljudsko zdravlje osigurala im je GRAS (Generally Regarded as Safe) status prema US FDA, odnosno QPS (Qualified Presumption of Safety) status prema regulativi Europske Unije (Šušković i sur., 2019). BMK su okarakterizirane važnim metaboličkim produktima koji mogu imati značajan utjecaj na sigurnost mliječnih proizvoda. S obzirom na sve navedene prednosti, bakterije mliječne kiseline široko se primjenjuju u raznim granama industrije. Osim u biotehnološkoj i prehrambenoj proizvodnji, gdje se uvelike koriste zahvaljujući svojoj sposobnosti proizvodnje etanola, egzopolisaharida, različitih aroma te brojnih drugih metabolita, značajna je i njihova uloga u brojnim farmaceutskim i kozmetičkim proizvodnim postupcima (Chun-lei i sur., 2014). Zahvaljujući svojim korisnim učincima na zdravlje, kao i posjedovanju GRAS statusa, bakterije iz rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* već se tradicionalno koriste kao probiotici. (Miletić i sur., 2006).

## 2.3 PROBIOTICI

### 2.3.1 Definicija i povijest

Danas se pojam probiotika odnosi na pojedinačnu ili mješovitu kulturu živih mikroorganizama koji, primijenjeni u adekvatnoj količini, blagotvorno djeluju prema organizmu domaćina, odnosno čovjeka ili životinje, poboljšavajući svojstva njegove autohtone mikroflore (Šušković i sur., 1997). Probiotike karakterizira sposobnost manifestacije korisnog učinka na različitim mjestima u tijelu čovjeka ili životinje. Mogu djelovati u ustima i probavnom traktu kroz hranu ili u obliku kapsula, u gornjem respiratornom traktu kao aerosol, te lokalnom primjenom u urogenitalnom traktu (Šušković i sur., 1997). Današnja znanstvena i klinička otkrića upućuju na sve veći učinak probiotičkih mikroorganizama u suzbijanju kancerogenih procesa u probavnom sustavu. Čak i prije ovih otkrića, mikroorganizmi su se u proizvodnji fermentirane hrane i pića koristili već tisućama godina. Brojne probiotičke sojeve karakterizira sposobnost smanjenja intraluminalne pH vrijednosti debelog crijeva kao i povećavanja proizvodnje kratkolančanih masnih kiselina (Hauser i sur., 2020)

### 2.3.2 Funkcija i mehanizam djelovanja probiotika

Mehanizam probiotičkog djelovanja karakterizira posredan utjecaj na crijevni ekosustav, potaknut djelovanjem na imunološke mehanizme sluznice. Upravo interakcija probiotika s različitim, potencijalno patogenim mikrobima, omogućuje stvaranje kratkolančanih masnih kiselina kao krajnjih metaboličkih produkata. Kratkolančane masne kiseline čine uvjete za rast patogena nepovoljnima (Krznarić i sur., 2008). Probiotici posredstvom kemijskog signaliziranja komuniciraju sa stanicama domaćina. Probiotičko djelovanje bakterija mliječne kiseline može se iskazati različitim mehanizmima djelovanja prema patogenim mikroorganizmima u intestinalnom traktu: smanjenjem broja živih patogena (proizvodnjom bakteriocina te kompeticijom za hranjive tvari ili za mjesto vezanja na površini crijevnog epitela), izmjenom metabolizma patogena (povećanjem/smanjenjem enzimske aktivnosti) ili stimuliranjem imunološkog sustava (povećanjem razine antitijela odnosno aktivnosti makrofaga) (Šušković i sur., 1997).

Antagonističko djelovanje bakterija mliječne kiseline koje se koriste kao probiotici posljedica je sniženja pH vrijednosti (zbog nakupljanja organskih kiselina), proizvedenog  $H_2O_2$  u aerobnim uvjetima, proizvedenog diacetila te specifičnih inhibicijskih supstancija (Šušković i Kos, 2000). Mliječna i octena kiselina primjeri su lipofilnih kiselina koje bakterije mliječne kiseline tijekom rasta i fermentacije proizvode u značajnim količinama. Karakterizira ih mogućnost prodiranja u stanicu mikroorganizma te interferencije s osnovnim metabolizmom, što za posljedicu ima sniženje intracelularnog pH. Octena kiselina ima izraženije inhibicijsko djelovanje nego mliječna kiselina, što je posebice uočeno kod kvasaca i plijesni.

Dodatno antimikrobno djelovanje bakterija mliječne kiseline proizlazi iz mogućnosti proizvodnje bakteriocina. Bakteriocini se definiraju kao ekstracelulame supstancije proteinske prirode koje su djelotvorne prema sojevima iste ili srodne vrste (Šušković i sur., 1998). Mehanizam njihovog djelovanja bazira se na interakcijama sa specifičnim receptorima na površini mikrobnih stanica. Mogućnost stupanja molekule bakteriocina u interakciju s regulatorim sustavom bakterijske stanice rezultira značajnim utjecajem na brojne stanične funkcije (Vesković Moračanin i sur., 2014). Za bakteriocine Gram-pozitivnih mikroorganizama, u koje spadaju i bakterije mliječne kiseline, karakterističan je nešto širi spektar inhibicije, pa tako djeluju i na druge Gram-pozitivne vrste. Najpoznatiji bakteriocin iz bakterija mliječne kiseline je nizin, kojeg proizvodi *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

Mogućnost proizvodnje bakteriocina koji djeluju i na druge BMK predstavlja značajnu karakteristiku probiotičkih sojeva kojima se na taj način povećava mogućnost kolonizacije, kao i samog održavanja u gastrointestinalnom traktu (Šušković i sur., 1997).

Kriteriji za izbor probiotičkih sojeva dijele se na opće, tehnološke i funkcionalne. Prvenstveno se, za ispunjavanje općih kriterija, zahtjeva točna taksonomska identifikacija, genetička stabilnost te netoksičnost i nepatogenost. Probiotički sojevi moraju biti otporni na žučne soli kao i na niskim pH vrijednostima. Tehnološki kriteriji uključuju stabilnost poželjnih karakteristika tijekom pripreme kulture, skladištenja i isporuke, kao i visoku razinu broja živih bakterija u probiotičkom proizvodu ( $10^6$  -  $10^8$  mL<sup>-1</sup> ili g<sup>-1</sup>). Mikroorganizmi se tijekom procesa pripreme probiotičkih kultura moraju brzo i lako razmnožavati te nakon toga izdvajati, koncentrirati, smrzavati i liofilizirati. Za vrijeme čuvanja i distribucije trebaju imati visok stupanj preživljavanja. Tijekom fermentacijskih procesa, mikroorganizmi koji se koriste u probiotičke svrhe moraju osigurati dobivanje željenih organoleptičkih svojstava. Funkcionalni kriteriji podrazumijevaju prvenstveno sposobnost preživljavanja, razmnožavanja i metaboličke aktivnosti na "ciljanom" području primjene u organizmu, te sposobnost adhezije i kolonizacije crijevnog epitela.

Iznimno je značajna i sposobnost proizvodnje antimikrobnih supstancija, što se odnosi na bakteriocine, organske kiseline i vodikov peroksid. Ovi mikroorganizmi moraju se odlikovati antagonističkom aktivnošću prema patogenim i kariogenim bakterijama te mogućnošću kompeticije sa sudionicima normalne mikroflore (uključujući srodne ili pak iste vrste), kao i otpornošću prema bakteriocinima, kiselinama ili drugim antimikrobnim supstancijama koje autohtona mikroflora proizvodi. Osim toga, mora ih karakterizirati imunomodulacijski učinak te sposobnost iskazivanja jednog ili više klinički dokumentiranih korisnih učinaka na zdravlje (Frece i sur., 2010).

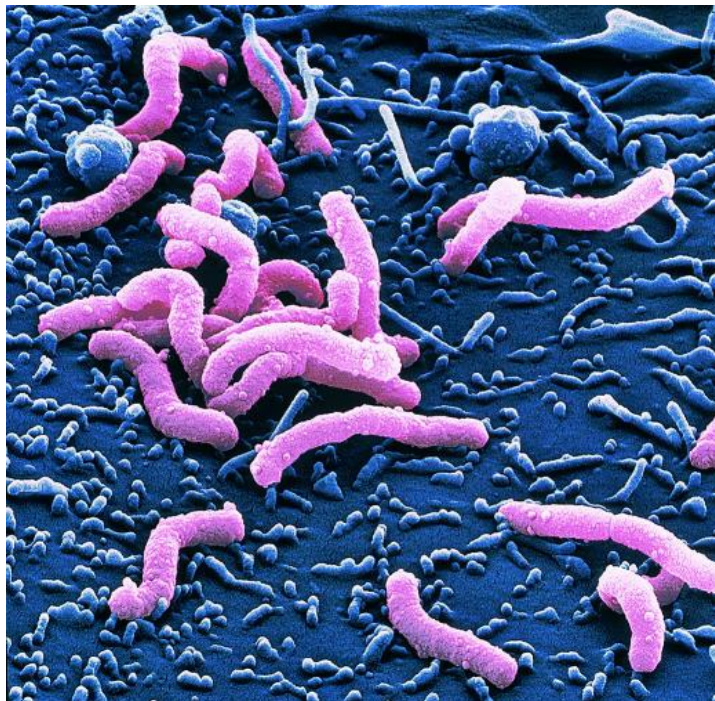
## **2.4 *Helicobacter pylori***

### 2.4.1 Mikrobiološke karakteristike

U rod *Helicobacter* ubraja se preko 20 bakterijskih vrsta, dok se za brojne još uvijek čeka formalno priznanje. Za vrste ovog roda karakteristično je da su pozitivne na katalazu i oksidazu, te većina na ureazu (Bauerfeind i sur., 1997). Trenutno se smatra kako su želuci svih sisavaca izloženi riziku od kolonizacije bakterijama roda *Helicobacter*. *Helicobacter pylori* je Gram-negativna bakterija čija je vanjska membrana građena od fosfolipida i lipopolisaharida.

Osim toga, za njenu vanjsku membranu karakteristični su i glukozidi kolesterola koji se mogu pronaći i u nekoliko drugih bakterija. Najčešće je spiralnog oblika, no u kulturama se također može pronaći u obliku koka, ali i u različitim nepravilnim oblicima. Mikroaerofilna je te joj je za rast potrebno 5–6 % kisika, oko 10 % ugljikovog dioksida i povećana vlažnost. Premda ne podnosi visoke koncentracije kisika, *H. pylori* zahtjeva prisutnost najmanje 2 % kisika. Razlog tome je njeno korištenje kisika kao terminalnog akceptora elektrona, kao i nemogućnost korištenja alternativnih akceptora (Kusters i sur., 2006). Dužina jedne bakterijske stanice iznosi 2 – 4  $\mu\text{m}$ , dok se širina kreće u rasponu 0.5-1  $\mu\text{m}$ . *H. pylori* karakterizira izražena sposobnost stvaranja biofilmova.

Specifična je po 4-7 bičeva koji se nalaze isključivo na jednom njenom polu te čiji su karakteristični filamenti građeni od dva kopolimerizirana flagelina: FlaA i FlaB. Upravo su oni uzrok visoke pokretljivosti ove bakterije, zahvaljujući kojoj je omogućeno brzo kretanje prema neutralnijem pH želučane sluznice gdje bakterija lakše preživljava (Suerbaum i sur., 1992). Optimalna temperatura rasta kreće se između 35 °C i 37 °C, dok se optimalni pH većinom kreće u rasponu 6-7. (Jiang i Doyle, 1998).



**Slika 2.** *H. pylori* na površini želučane stanice. Vizualizacija dobivena korištenjem obojane elektronske mikrofografije (Preuzeto od Logan i Walker, 2001).

#### 2.4.2 Adaptacija i patogenost

*H. pylori* pripada gastričnoj skupini bakterija roda *Helicobacter*, koje koloniziraju isključivo želudac. S druge strane, negastrične bakterije koloniziraju jetru te tanko i debelo crijevo. Brojna saznanja o povezanosti ove bakterije sa želučanim bolestima stara su više od desetljeća. Za želučanu je sluznicu karakteristično svojstvo nepropusnosti za kiselinu, kao i snažan puferski kapacitet. Premda je pH vrijednost na strani sluznice prema lumenu izrazito niska te iznosi 1-2, na strani epitela prevladava fiziološki pH (oko 7.4). Upravo u tom dijelu, duboko u mukoznom sloju, nastanjuje se *H. pylori*. Svojstveno joj je nalijeganje na želučani tip epitelnih stanica, dok na intestinalni tip ne naliže (Goddard i Logan, 2003). Zahvaljujući flagelama, *Helicobacter pylori* ima mogućnost kretanja kroz želučanu sluz koja je izrazito viskozna. Njena pokretljivost ovisi i o kemotaktičnim reakcijama na pojedine aminokiseline te kemijske spojeve kao što su urea, NaCl i NaHCO<sub>3</sub>. Uspješnijoj kolonizaciji želuca pridonosi karakteristična sposobnost proizvodnje ureaze koja ureu razgrađuje na amonijak i ugljikov dioksid (Dujšin, 2000). Nastale molekule ponašaju se kao puferi neutralizirajući niski pH želuca, čime je omogućeno povoljno okruženje za preživljenje i razmnožavanje ove bakterije.

*H. pylori* sposobna je preživjeti i u manje povoljnim, ekstremnim uvjetima, zahvaljujući svojoj sposobnosti transformacije u kokoidni oblik (Kusters i sur, 2006). Osim za ureazu, genom *H. pylori* sadrži i gene koji kodiraju za druge značajne enzime kao što su oksidaza, citotoksin, hemolizin, katalaza te različite proteaze. Za patogenezu u ljudskom želucu ključan je enzim arginaza. Ovaj dvometalni enzim katalizira pretvorbu L-arginina u L-ornitin i ureu, pri čemu ornitin dalje prelazi u poliamine neophodne za brojne metaboličke procese (Sudar-Milovanović i sur., 2015). Reakcija prethodi enzimskoj reakciji koju katalizira ureaza, a koja zahvaljujući oslobođenom amonijaku omogućuje *H. pylori* opstanak u izrazito kiselom okruženju. Arginaza *H. pylori* značajnu ulogu ima i kod izbjegavanja imunološkog sustava domaćina. Za ove procese predloženi su brojni mehanizmi te je dokazano kako je arginaza u kompetitivnom odnosu sa sintazom domaćina koja ima sposobnost indukcije dušičnog oksida za uobičajeni supstrat L-arginin. Time je smanjena sinteza NO koja predstavlja važnu sastavnicu urođene imunosti te učinkovito antimikrobno sredstvo koje izravno djeluje na brojne nepoželjne patogene. Svaka promjena koja utječe na metabolizam L-arginina te njegovu krajnju količinu, zapravo pridonosi smanjenju mogućnosti imunološkog sustava domaćina da na infekciju *H. pylori* odgovori učinkovito i u svoju korist (Chaturvedi i sur., 2012).



Gastritis se očituje kroz akutne i kronične upale. Premda infekcija u nekim slučajevima prolazi asiptomatski, na mjestima sluznice koja je dugotrajno bila izložena djelovanju upalnog procesa može doći do nastajanja peptičkih ulkusa. Ukoliko se na vrijeme počne s korištenjem odgovarajućih antimikrobnih lijekova, daljnje moguće komplikacije svest će se na najmanju moguću mjeru. Važno je naglasiti i kako je kronična upala želuca, uzrokovana ovom bakterijom, kritična komponenta prekursora raka želuca. Mehanizmi kojima *H. pylori* uzrokuje upalu te oštećenje sluznice još nisu u potpunosti razjašnjeni. Međutim, pretpostavlja se kako su u njih uključeni različiti faktori kako bakterije, tako i samog domaćina. Naime, bakterija djeluje na način da invadira površinu epitelnih stanica do određenog stupnja (Sugano i sur., 2015). Brojni toksini i lipopolisaharidi imaju mogućnost oštećenja mukoznih stanica, dok je izravno oštećenje stanica moguće zahvaljujući amonijaku koji nastaje kao jedan od produkata djelovanja enzima ureaze (Chmiela i sur., 2014).

## **2.5 Utjecaj probiotika na *H. pylori***

Nakon znanstveno dokazanih povezanosti *Helicobacter pylori* s brojnim želučanim bolestima, pokušala se razviti učinkovita terapija antibioticima. Međutim, već u samim počecima došlo je do poteškoća uzrokovanih rezistencijom ove bakterije na brojne antibiotike. Tome u prilog nije išao ni velik broj pacijenata koji se nisu pridržavali propisane terapije. S obzirom i na to kako trenutno nema licenciranog cjepiva protiv *H. pylori*, studije su se počele usmjeravati na razvijanje alternativnih metoda liječenja. Upravo zbog toga, u novije vrijeme se mnoga istraživanja fokusiraju na ispitivanje učinkovitosti uporabe probiotika u navedene svrhe (Ruggiero, 2014). Ovaj alternativni način liječenja infekcija izazvanih djelovanjem *H. pylori* još je u razvitku, a trenutno se u terapiji koristi dokazano učinkovita antibiotska terapija.

Sva do sad poznata opća načela djelovanja probiotika sve više se nastoje primijeniti u učinkovitom liječenju bolesti i ublažavanju simptoma infekcije *H. pylori*. Trenutno je broj *in vitro* i kliničnih studija u dostupnoj literaturi još uvijek ograničen.

Neimunološki mehanizmi odnose se na različite barijere; to je prije svega izrazita kiselost želuca te želučane sluznice, koja učinkovito štiti domaćina od patogena. Ova barijera dodatno se pojačava unosom probiotika. Naime, stimulirajući proizvodnju mucina te proizvodeći učinkovite antimikrobne spojeve, probiotici učinkovito ojačavaju navedenu barijeru te ujedno i konkuriraju *H. pylori* u vezanju za adhezijske receptore (Monteagudo-Mera i sur., 2019).

Imunološki mehanizmi odnose se na upalni odgovor na želučanu infekciju *H. pylori*. Naime, u tim uvjetima dolazi do oslobađanja raznih upalnih medijatora kao što su kemokini i citokini (Lesbros-Pantoflickova i sur., 2007). Odgovor citokina na upalu dovodi do migracije monocita i neutrofila na sluznicu. Usprkos proizvodnji faktora tumorske nekroze a te stimuliranju T stanica i proizvodnji raznih citokina, ovaj odgovor nema mogućnost potpunog uklanjanja infekcije, zbog čega se upalni proces nastavlja odvijati. Uloga probiotika ovdje je od velikog značaja. Naime, oni imaju mogućnost modifikacije imunološkog odgovora domaćina kroz interakciju s epitelnim stanicama, što rezultira lučenjem protuupalnih citokina (Lesbros-Pantoflickova i sur., 2007). Ove aktivnosti značajno smanjuju upale, a posebno se učinkovitim pokazao soj *L. salivarius* koji je u više provedenih *in vitro* studija uspješno inhibirao lučenje IL-8, stimulirano aktivnošću *H.pylori* (Kabir i sur., 1997). Studije provedene na životinjama dokazale su mogućnost posredovanja probiotičkih učinaka bakterija mliječne kiseline imunološkom regulacijom. To se posebice manifestira kroz kontrolu ravnoteže proupalnih i protuupalnih citokina te rezultira smanjenjem želučane aktivnosti i ublažavanjem upale (Lesbros-Pantoflickova i sur., 2007).

Kao što je navedeno, djelovanje probiotika zasniva se na stimuliranju imunoloških mehanizama sluznice. Primjerice, iznimno važan učinak očituje se u aktivaciji lokalnih makrofaga (Quinto i sur., 2014). Primjena probiotika u brojnim je slučajevima pokazala pozitivne posljedice za zdravlje organizama ljudi različite dobi. Tako je, primjerice, konzumiranje jogurta koji sadrži probiotike pozitivno utjecalo na zdravlje probavnog sustava djece zaražene *H. pylori*. (Ruggiero, 2014).

Nekoliko novijih istraživanja potvrdilo je i kako bakterije roda *Lactobacillus* učinkovito inhibiraju vezanje *H. pylori* na epitelne stanice želuca (Lorca i sur., 2000). Navedeni efekt dokazan je primjenom supernatanta kulture probiotičkih stanica.

Od velikog je značaja da osim direktnog djelovanja na sam patogen, probiotici imaju i mogućnost kooperacije sa sustavom domaćina, pomažući mu i na taj način u obrani od infekcije i razvoja bolesti. Osjetljivost na *H. pylori*, kao i sam ishod infekcije, ovise o brojnim čimbenicima. Najvažnije među njima svakako predstavljaju genetska obilježja patogena te samog domaćina. Primjena probiotika u novije vrijeme svakako predstavlja inovativnu i obećavajuću metodu u liječenju bolesti uzrokovanih ovom bakterijom, kao i u sprečavanju infekcije. Naravno, potrebno je provesti još brojna istraživanja s ciljem preciznijeg određivanja mehanizama izravnih i neizravnih učinaka probiotika na *H. pylori*, kao i spoznavanja novih aspekata patogeneze te učinkovitih metoda liječenja (Ruggiero, 2014).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1 Materijali

##### 3.1.1 Mikroorganizmi

- Izolati bakterija mliječne kiseline oznaka DK1 – DK10 iz autohtonog ovčjeg sira preuzeti su iz Zbirke mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
- *Helicobacter pylori* DSM®10241™, preuzet iz DSMZ (The Leibniz Institute, DSMZ German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH).

##### 3.1.2 Hranjive podloge i kemikalije

###### 3.1.2.1 Održavanje i uzgoj bakterija mliječne kiseline

- MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) agar (Biolife, Italija) sastava: pepton 10,0 g L<sup>-1</sup>; goveđi ekstrakt 10,0 g L<sup>-1</sup>; ekstrakt kvasca 5,0 g L<sup>-1</sup>; glukoza 20,0 g L<sup>-1</sup>; dinatrijev hidrogenfosfat 2,0 g L<sup>-1</sup>; natrijev acetat 5,0 g L<sup>-1</sup>; amonijev citrat 2,0 g L<sup>-1</sup>; magnezijev sulfat 0,2 g L<sup>-1</sup>; manganov sulfat 0,05 g L<sup>-1</sup>; agar 15,0 g L<sup>-1</sup>; Tween 80 1,0 g L<sup>-1</sup>; pH vrijednost podloge je 6.5; sterilizacija pri 121 °C, 15 min. Navedeni sadržaj je otopljen u destiliranoj vodi dobro promješšan i nakon sterilizacije razliven u petrijeve zdjelice.
- MRS bujon (Biolife, Italija), istog sastava kao MRS agar, ali bez dodanog agara. Sterilizacija se provela pri 121 °C, 15 min.

###### 3.1.2.2 Održavanje i uzgoj *Helicobacter pylori*

- TSB bujon (Biolife, Italija) sastava: produkti digestije kazeina 17 g L<sup>-1</sup>; produkti peptičke digestije soje 3 g L<sup>-1</sup>; glukoza (dekstroza) 2,5 g L<sup>-1</sup>; NaCl 5,0 g L<sup>-1</sup>; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,5 g L<sup>-1</sup>. Konačan pH podloge pri 25 °C je 7,3.

###### 3.1.2.3 Kemikalije

- etanol, 96% (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- fetalni teleći serum (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD)
- glicerol (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- kalijev dihidrogenfosfat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- kalijev hidroksid (Merck, Darmstadt, Njemačka)

- kalijev klorid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- kristal-violet 1% otopina (Biagnost, Zagreb, Hrvatska)
- ledena octena kiselina (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

### 3.1.3 Aparatura i pribor

- Automatske pipete (Eppendorf, SAD)
- Centrifuga Z 206 A (Hermle Labortechnik GmbH, Njemačka)
- spektrofotometar, Helios  $\beta$  UV-Vis (Unicam, Cambridge, UK)
- čitač mikrotitarskih pločica, Sunrise (Tecan, Grödig, Austrija)
- denzitometar (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francuska)
- Eppendorf tubice (2ml)
- Erlenmeyerove tikvice
- filteri za šprice „Minisart“, PTFE, 0.22  $\mu$ m (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- laboratorijske čaše
- mikrobiološke epruvete (16x160 mm, 18x180 mm)
- Petrijeve zdjelice ( $\varnothing$  10 cm)
- Štapići po Drigalskom
- Tehnička vaga, Extend (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- Vibromješač EV-102 (Tehtnica, Slovenija)

## 3.2 Metode

### 3.2.1 Priprema radnih suspenzija bakterija mliječne kiseline i *Helicobacter pylori*

Stanice bakterija mliječne kiseline prekonočno su uzgajane u MRS bujonu. *Helicobacter pylori* uzgajana je u mikroaerofilnim uvjetima; podloga je bila obogaćena ugljikovim dioksidom kako bi se osigurali optimalni uvjeti za rast i razmnožavanje.

Nakon toga, kod navedenih bakterija pojedinačno je provedeno centrifugiranje pri 6000 okretaja/min u trajanju od 10 minuta, kojim su bakterijske stanice izdvojene iz suspenzije. Supernatanti su potom odvojeni te su istaložene stanice resuspendirane u 9 mL sterilne deionizirane vode. Centrifuga je ponovno provedena pri istim uvjetima. Ispiranje sterilnom vodom ponovljeno je dva puta, nakon čega su istaložene stanice resuspendirane u 10 mL sterilne vode. Na ovaj način formirana je radna suspenzija stanica bakterija mliječne kiseline, kao i radna suspenzija *Helicobacter pylori*.

### 3.2.2 Određivanje broja živih mikroorganizama indirektnom metodom

Broj bakterijskih stanica u uzorcima određen je naciepljivanjem prethodno pripremljenih decimalnih razrjeđenja uzoraka na MRS agar. Hranjive podloge s naciepljenim razrjeđenjima stavljene su na inkubaciju, nakon čega su na njima izbrojane porasle kolonije. Iz broja poraslih kolonija izračunat je broj živih stanica po mililitru ispitivanih uzoraka, izražen kao CFU mL<sup>-1</sup> (CFU, eng. colony forming units).

### 3.2.3 Sposobnost formiranja biofilmova bakterijskih izolata

Sposobnost formiranja biofilmova određena je prema metodi opisanoj u Kostelac i sur. (2021). Ispitivani izolati bakterija mliječne kiseline klasificirani su prema jačini biofilmova formiranih nakon inkubacije.

U polistirenskim mikrotitarskim pločicama s 12 jažica dodano je 2 mL MRS bujona. Uzorci su naciepljeni sa 100 µL suspenzije prethodno uzgojenih bakterijskih kultura te su pločice inkubirane na 37 °C tijekom 48 h. Nakon inkubacije, sadržaj jažica je ispražnjen pažljivim pipetiranjem kako bi se izbjeglo grebanje dna jažica. Nastali talog bakterijskih stanica ispran je s 2 mL sterilne vode uz lagano miješanje. Preostale stanice (adhezirane u biofilm) fiksirane su dodatkom 2 mL metanola te inkubacijom tijekom 15 min. Nakon fiksiranja, metanol je uklonjen i pločice su osušene na zraku. Adhezirane stanice obojane su dodatkom 1 %-tnog kristal violeta tijekom 5 min, te je višak boje uklonjen temeljitim ispiranjem deioniziranom vodom. Dodatkom 2 mL 33 % octene kiseline otpuštena je vezana boja te je mjerena optička gustoća (OD) pri 595 nm pomoću spektrofotometra. Neinkulirani uzorci korišteni su kao negativna kontrola.

### 3.2.4 Sposobnost formiranja biofilmova *Helicobacter pylori*

Metodom opisanom u poglavlju 3.2.3 određena je i sposobnost formiranja biofilmova *Helicobacter pylori* u prisustvu izolata bakterija mliječne kiseline. U polistirenskim mikrotitarskim pločicama s 12 jažica dodano je 2 mL TSB bujona te su uzorci naciepljeni s 300 µL suspenzije prethodno uzgojenih kultura bakterija mliječne kiseline i 100 µL suspenzije *Helicobacter pylori*. Uzorci su stavljeni na inkubaciju, nakon čega je prema opisanom postupku određena sposobnost formiranja filmova *H. pylori*. Kao kontrola korišten je neinkulirani uzorak te uzorak u koji je umjesto izolata bakterija mliječne kiseline dodano 300 µL sterilnog MRS bujona.

Dobivene vrijednosti optičke gustoće uspoređene su s optičkom gustoćom negativne kontrole (ODC). Korišteni sojevi potom su klasificirani prema Borges i sur. (2012), a klasifikacije su prikazane u tablici 1.

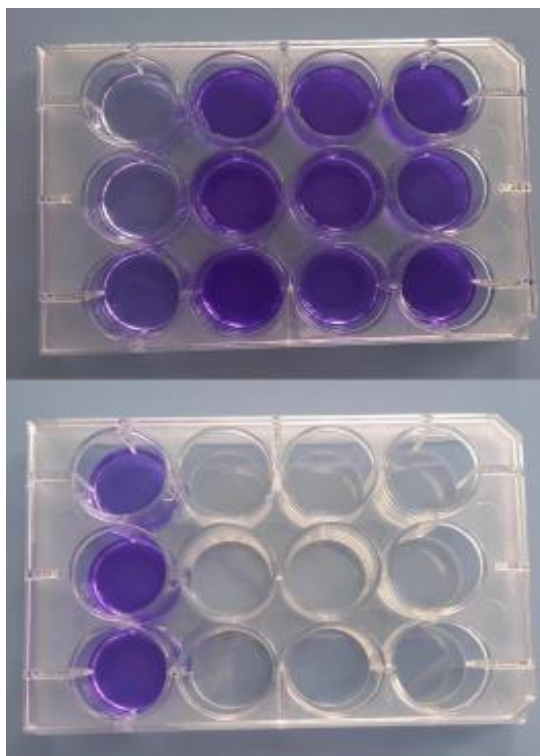
**Tablica 1.** Klasifikacija formacije biofilmova usporedbom optičke gustoće uzorka i negativne kontrole (prema Borges i sur. 2012)

| Usporedba OD i ODC vrijednosti        | Klasifikacija proizvodnje biofilma |
|---------------------------------------|------------------------------------|
| $OD < ODC$                            | nema formacije biofilma            |
| $ODC < OD < 2 \times ODC$             | slaba formacija biofilma           |
| $2 \times ODC < OD \leq 4 \times ODC$ | umjerena formacija biofilma        |
| $4 \times ODC < OD$                   | jaka formacija biofilma            |

### 3.2.5 Inhibicija formiranja biofilmova *Helicobacter pylori*

Ispitana je sposobnost formiranja biofilmova bakterije *Helicobacter pylori* u prisutnosti supernatanta kulture ispitivanih izolata bakterija mliječne kiseline izdvojenih nakon prekonoćnog uzgoja u MRS bujonu, kao i 50 %-tnih razrjeđenja odabranih sojeva.

Određivanje stupnja inhibicije provedeno je u mikrotitarskim pločicama s 12 jažica, a uzorci su sadržavali 2 mL TSB-a, 300  $\mu$ L supernatanta pojedinog soja bakterija mliječne kiseline te 100  $\mu$ L inokuluma suspenzije *Helicobacter pylori*. Uzorci u koje je umjesto izolata bakterija mliječne kiseline dodan sterilni MRS bujon, korišteni su kao kontrola. Kvantifikacija i klasifikacija proizvedenih biofilmova provedena je prema Borges i sur. (2012).



**Slika 3.** Fotografije mikrotitarskih pločica prilikom kvantifikacije biofilma *H. pylori* u prisutnosti supernatanta kulture odabranih izolata bakterija mliječne kiseline, nakon obrade kristal violetom.

### 3.2.6 Određivanje autoagregacijske sposobnosti *Helicobacter pylori*

Bakterijske stanice *H. pylori* su nakon prekonoćnog uzgoja u TSB bujonu izdvojene centrifugiranjem te je pripravljena suspenzija stanica u simuliranim uvjetima želuca. Simulirani uvjeti želuca postignuti su suspendiranjem pepsina (3 g/L) u 0,5 % otopini natrijevog klorida, kojoj je pH podešen na 2,5 s koncentriranom kloridnom kiselinom. U dobivenoj suspenziji je određen stupanj autoagregacije prilagođenom metodom prema Kostelac (2022). U uzorku koji miruje tijekom 24 h pažljivo se u odabranim intervalima uklanjao gornji sloj suspenzije te se mjerila apsorbancija pri 600 nm pomoću spektrofotometra. Apsorbancija uzoraka mjerila se intervalima od 15 min unutar 90 min. Stopa autoagregacije je izračunata prema izrazu:

$$\text{Autoagregacija (\%)} = (1 - A_t/A_0) \times 100 \quad [2]$$

gdje je:

$A_t$  – apsorbancija u vremenu  $t$

A0 – apsorbancija u vremenu 0

### 3.2.7 Određivanje sposobnosti koagregacije izolata

Za određivanje stupnja koagregacije pomješani su jednaki volumeni suspenzija bakterija mliječne kiseline i *H. pylori* u simuliranim uvjetima želuca. Uzorkovanje i određivanje stupnja koagregacije navedenih suspenzija provedeno je ekvivalentno autoagregacijskom postupku opisanom u poglavlju 3.2.6.

### 3.2.8 Identifikacija pomoću analize fermentacijskog profila

Biomasa bakterijskih kultura poraslih na MRS agaru resuspendirana je u API 50 CHL mediju pomoću mikrobiološke ušice. Prilikom mjerenja postignute gustoće suspenzije korišten je denzitometar, a konačna gustoća iznosila je 2 McF (eng. McFarland units). Ampule API 50 CHL stripa napunjene su suspenzijom, nakon čega je dodano mineralno ulje. Provedena je inkubacija na 37 °C u trajanju od 48 h, nakon čega su očitani rezultati. Promjena boje bromkrezol-purpurnog indikatora iz žute u plavu pokazuje kako je došlo do fermentacije šećera, što je rezultiralo zakiseljavanjem medija. Ampula 25 predstavlja iznimku zbog toga što se ovdje promjena boje iz ljubičaste u crnu smatra pozitivnim rezultatom. Rezultati su na kraju očitani korištenjem identifikacijskog softvera Api-web™ (BioMerieux, Francuska).

### 3.2.9 Statistička obrada podataka

Rezultati eksperimanata izraženi su kao srednje vrijednosti ponovljenih eksperimenata ± standardna devijacija. Statističke razlike među ponavljanjima određene su t-testom, a usporedbe među grupama provede su korištenjem ANOVA testa. Statistička značajnost podešena je na  $p < 0,05$  te su sve usporedbe rađene pomoću programa Excel.



## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu određena je sposobnost formacije biofilma izolata BMK iz ovčjeg sira i patogene bakterije *H. pylori*. Također, određena je sposobnost izolata BMK u inhibiciji proizvodnje biofilma *H. pylori* s ciljem pronalaska potencijalnih probiotika kojima je svojstvena mogućnost inhibicije adhezije ove želučano patogene bakterije te čija bi primjena uvelike pomogla u liječenju zaraženih bolesnika i sprječavanju same infekcije.

### 4.1 Kvantifikacija sposobnosti formiranja biofilma

Rezultati kvantifikacije i klasifikacije biofilmova izolata BMK u simuliranim uvjetima želuca prikazani su u tablici 2. Od deset testiranih sojeva, tri su soja klasificirana kao umjereni producenti biofilma, dok je jedan klasificiran kao snažan producent.

**Tablica 2.** Kvantifikacija proizvodnje biofilmova izolata bakterija mliječne kiseline iz ovčjeg sira nakon 48 h inkubacije.

| Bakterijski soj                | Rezultata <sup>a</sup> | Klasifikacija <sup>b</sup> |
|--------------------------------|------------------------|----------------------------|
| DK1                            | 0,193 ± 0,05           | umjeren producent biofilma |
| DK2                            | 0,177 ± 0,03           | slab producent biofilma    |
| DK3                            | 0,089 ± 0,06           | slab producent biofilma    |
| DK4                            | 0,194 ± 0,04           | umjeren producent biofilma |
| DK5                            | 0,392 ± 0,02           | snažan producent biofilma  |
| DK6                            | 0,103 ± 0,01           | slab producent biofilma    |
| DK7                            | 0,191 ± 0,04           | umjeren producent biofilma |
| DK8                            | 0,166 ± 0,05           | slab producent biofilma    |
| DK9                            | 0,194 ± 0,04           | umjeren producent biofilma |
| DK10                           | 0,123 ± 0,01           | slab producent biofilma    |
| ODC (optička gustoća kontrole) | 0,084 ± 0,03           |                            |
| 2 × ODC                        | 0,172 ± 0,03           |                            |
| 4 × ODC                        | 0,344 ± 0,03           |                            |

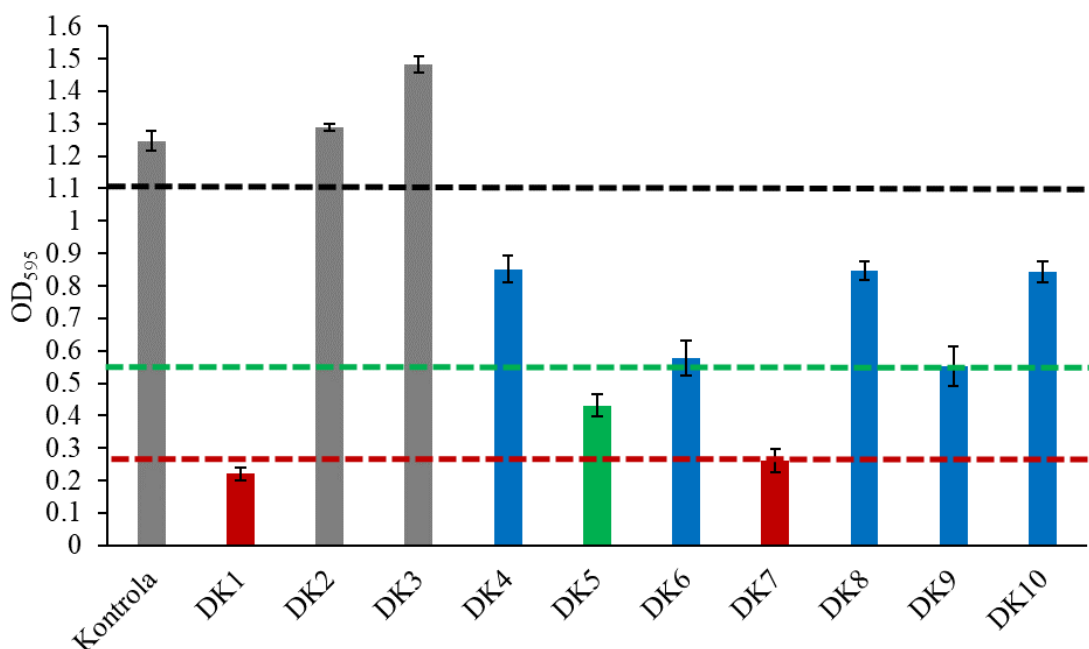
<sup>a</sup> vrijednost OD<sub>595</sub>; <sup>b</sup> klasifikacija prema Borges i sur. (2012)

S obzirom na dokazanu povezanost s kompetencijom adhezije i kompeticije s različitim patogenima, formacija biofilmova BMK predstavlja važan kriterij pri izboru probiotičkih

sojeva. Chen i sur. (2017) dokazali su kako mogućnost stvaranja biofilmova pojedinih sojeva BMK varira u ovisnosti o temperaturi, pH vrijednosti i vremenu uzgoja. Arena i sur. (2017) pojašnjali su važnost zastupljenosti biotičkih i abiotičkih karakteristika okruženja koja stimuliraju odnosno inhibiraju adheziju i formaciju biofilma BMK. Naime, biotičke površine, kao što je želučana sluznica, mogu predstavljati nepovoljno okruženje za formiranje biofilmova zahvaljujući niskoj pH vrijednosti, aktivnosti žučnih soli te djelovanju različitih imunoloških faktora samog domaćina (Arena i sur., 2017). Sličan učinak mogu imati i abiotičke površine, što proizlazi kao posljedica nepovoljne temperature ili pH vrijednosti, kao i neodgovarajućeg naboja ili hidrofilnih odnosno hidrofobnih svjstava površine. Brojna znanstvena istraživanja dokazala su i kako je probiotički potencijal ovisan o pojedinom soju (Kostelac, 2022). Izolati bakterija mliječne kiseline i i u ranijim su studijama prepoznati kao snažni producenti biofilma (Kostelac i sur., 2021), a rezultati ovog rada po prvi puta prikazuju navedenu sposobnost u simuliranim uvjetima želuca.

#### 4.2 Sposobnost inhibicije biofilma *Helicobacter pylori*

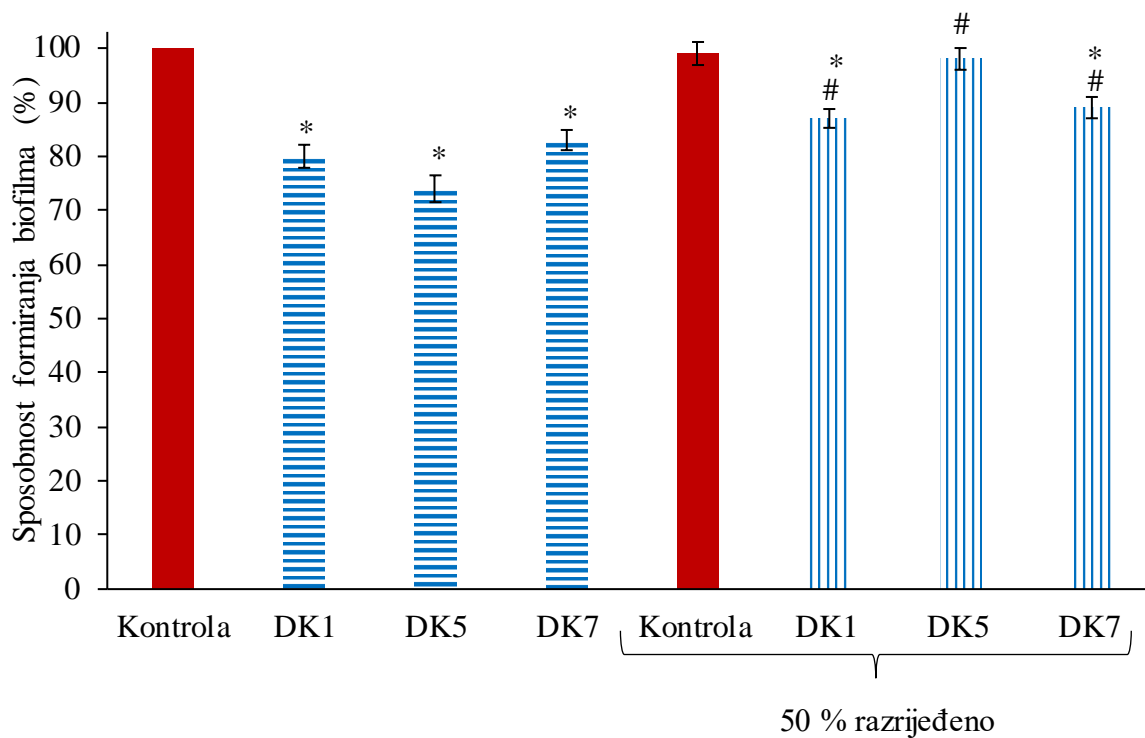
Kako bi se onemogućilo stvaranje agregata i biofilmova *H. pylori* prilikom razvoja probiotika, važno je ispitati utjecaj korisnih bakterija na formiranje biofilma patogena. U ovom radu određena je sposobnost formacije biofilma *H. pylori* u prisutnosti supernatanta kulture izolata BMK iz ovčjeg sira. Rezultati su prikazani su na slici 4.



**Slika 4.** Kvantifikacija proizvodnje biofilмова bakterije *Helicobacter pylori* DSM®10242™ u prisutnosti supernatanta kulture odabranih izolata bakterija mliječne kiseline izoliranih iz ovčjeg sira. Isprekidane linije iznačavaju granične vrijednosti optičke gustoće prema kojima je provedena klasifikacija jačine proizvedenog biofilma prema Borges i sur. (2012).

Dobiveni rezultati kvantifikacije proizvodnje biofilмова bakterije *H. pylori* pokazuju kako je u eksperimentalnim uvjetima *H. pylori* klasificirana kao snažan producent biofilma. U prisustvu supernatanta izolata DK1, DK5 i DK7 navedena sposobnost značajno opada te se klasificira kao nemogućnost stvaranja biofilma (DK1 i DK7) te slaba formacija u slučaju izolata DK5. U prisustvu ostalih sedam izolata formiranje biofilma klasificirano je kao snažno ili umjeren. Stoga, rezultati upućuju na to da tri izolata (DK1, DK5 i DK7) iskazuju snažan probiotički potencijal u inhibiciji biofilma *H. pylori*. Obzirom na rezultate, navedena tri probiotička izolata su izdvojena i uključena u daljnje eksperimente dok su preostali sojevi isključeni iz istraživanja.

Kako bi se pobliže ispitali mogući mehanizmi inhibicije biofilмова, određena je sposobnost formiranja biofilмова *H. pylori* u prisutnosti neutraliziranog supernatanta kulture, te u prisutnosti istog uz 50 % razrijeđenje poradi određivanja koncentracijske ovisnosti inhibicije. Rezultati su prikazani na slici 5.

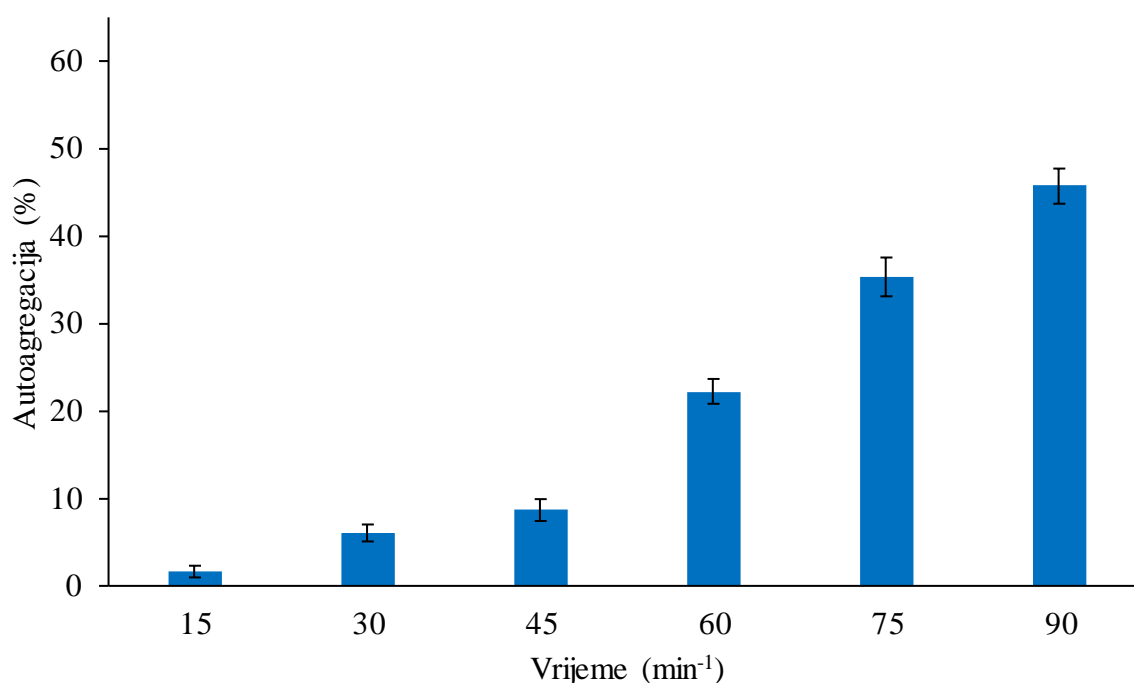


**Slika 5.** Sposobnost formiranja biofilma bakterije *Helicobacter pylori* DSM®10242™ u prisutnosti neutraliziranog te neutraliziranog i razrijeđenog supernatanta kulture izolata bakterija mliječne kiseline iz ovčjeg sira. Rezultati su prikazani kao postotak kontrolnog uzorka ± standardna devijacija. \*statistički značajno različito od kontrole, #značajno različito od nerazrijeđenog uzorka ( $p < 0,05$ ).

Iz rezultata je vidljivo kako i nakon neutralizacije dolazi do statistički značajnog gubitka sposobnosti formacije biofilma *H. pylori*. Značajan gubitak sposobnosti formacije biofilma zadržan je i nakon 50 % razrijeđenja za izolate DK1 i DK7 dok je kod izolata DK5 inhibicijska sposobnost izgubljena nakon razrijeđenja.

Visok stupanj inhibicije biofilmova prije neutralizacije može biti rezultat visoke koncentracije mliječne kiseline i povezane antimikrobne aktivnosti. Navedeno je posljedica ulaska mliječne kiseline u stanice acidotolerantnih mikroorganizama u nedisociranom obliku te naknadna disocijacija (Pavunc i sur., 2009). To uzrokuje zakiseljavanje citoplazme, što dovodi do inhibicije sinteze nukleinskih kiselina, lipida, peptidoglikana i proteina mikroorganizma. Dakle, dokazano je kako inhibicijsko djelovanje izoliranih bakterijskih sojeva potječe prvenstveno od mliječne kiseline koju proizvode. Zadržavanje inhibitorne aktivnosti nakon neutralizacije ukazuje na postojanje dodatnih mehanizama koje je potrebno dodatno istražiti.

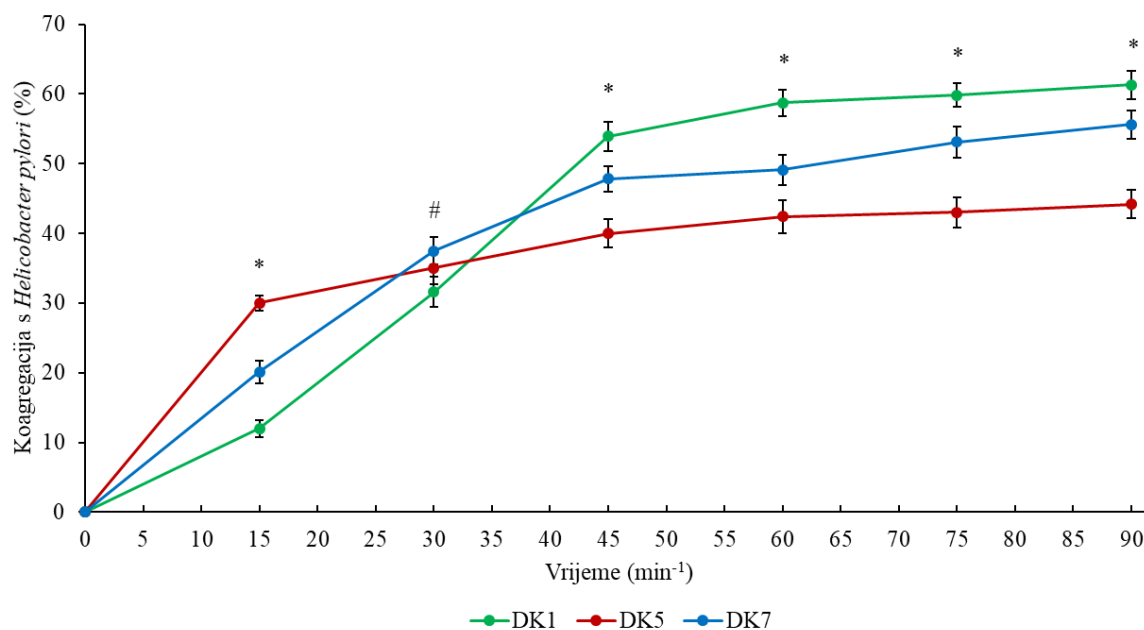
Jedan od preduvjeta stvaranja mikrobnih biofilmova je formiranje agregata koji su direktno povezani s kolonizacijskim potencijalom. Kako bi se ispitao utjecaj izolata BMK na agregacijska svojstva *H. pylori* prvo je određena autoagregacijska sposobnost *H. pylori* u eksperimentalnim uvjetima simuliranog želuca. Rezultati autoagregacije tijekom 90 minuta u uvjetima želuca prikazani su na slici 6.



**Slika 6.** Autoagregacija bakterije *Helicobacter pylori* DSM<sup>®</sup>10242<sup>™</sup> u simuliranim uvjetima želuca tijekom 90 minuta inkubacije. Rezultati su prikazani kao postotak ± standardna devijacija.

Iz rezultata je vidljivo kako je stupanj autoagregacije *H. pylori* ovisan o vremenu te u 90 minuta dostiže vrijednost od 45 %. Vremenska ovisnost autoagregacijske sposobnosti primjećena je i u ranijoj studiji (Yonezawa i sur., 2010), no raspon autoagregacije za više sojeva *H. pylori* iznosio je 40 i 85 % već u šestom satu što je značajno više nego u ovom radu. Navedena razlika može se pripisati različitim uvjetima, naime, u ovom su radu simulirani uvjeti želuca za razliku od rada spomenutih autora gdje su korišteni blagi uvjeti PBS pufera. Procjena sposobnosti autoagregacije iznimno je važna jer je jedan od ključnih faktora u razvoju biofilmova (Liu i sur., 2022).

Nadalje, ispitana je sposobnost koagregacije odabranih izolata BMK i *H. pylori* tijekom 90 minuta u simuliranim uvjetima želuca te su rezultati prikazani na slici 7.



**Slika 7.** Koagregacija bakterije *Helicobacter pylori* DSM®10242™ s odabranim izolatima bakterija mliječne kiseline iz ovčjeg sira u simuliranim uvjetima želuca tijekom 90 minuta inkubacije. \*statistički značajna razlika za sva tri izolata, #statistički značajna razlika među izolatima DK1 i DK7 ( $p < 0,05$ ).

Najveći postotak koagregacije, veći od 50 %, ostvaren je za izolate DK1 i DK7, koji su i u prethodnim eksperimentima iskazali najbolji probiotički potencijal ostvarujući najefikasniju inhibiciju formiranja biofilмова *H. pylori* i nakon neutralizacije i razrijeđenja. Koagregacija probiotika i patogeni bakterija istražena i ranije te je pokazano kako je svojstvo ovisno i o probiotičkom soju, ali i o patogenu, a preferiraju se više vrijednosti jer izražena koagregacija ukazuje na probiotičku modulaciju patogenih biofilмова i ispoljavanje inhibitornih učinaka (Kostelac i sur., 2022). Navedeno je potvrđeno u više studija te se generalno smatra da je ispitivanje koagregacije potencijalnih probiotika s patogenim mikroorganizmima korisno u detekciji probiotika za ljudsku ili životinjsku primjenu (Collado i sur., 2008).

Obzirom na dobivene rezultate, izolati DK1, DK5 i DK7 izdvojeni su kao potencijalni probiotici u primjeni za inhibiciju *H. pylori* te su biokemijski identificirani pomoću fermentacijskog profila.

Fermentacijski profili određeni su API 50 CHL testom i prikazani u tablici 3, te su u tablici 4 prikazani rezultati njihove biokemijske identifikacije.

**Tablica 3.** Fermentacijski profili bakterijskih izolata iz autohtonog ovčjeg sira (DK1, DK5 i DK7) dobiveni API 50 CHL testom.

| Ugljikohidrati             | DK1 | DK5 | DK7 |
|----------------------------|-----|-----|-----|
| Kontrola                   | -   | -   | -   |
| Glicerol                   | -   | -   | -   |
| Eritriol                   | -   | -   | -   |
| D-arabinoza                | -   | -   | -   |
| L-arabinoza                | -   | -   | -   |
| Riboza                     | +   | +   | +   |
| D-ksiloza                  | -   | -   | -   |
| L-ksiloza                  | -   | -   | -   |
| Adonitol                   | -   | -   | -   |
| $\beta$ -metil-ksilozid    | -   | -   | -   |
| Galaktoza                  | +   | +   | +   |
| D-glukoza                  | +   | +   | +   |
| D-fruktoza                 | +   | +   | +   |
| D-manoza                   | +   | +   | +   |
| L-sorboza                  | -   | +   | -   |
| Ramnoza                    | -   | -   | -   |
| Dulcitol                   | -   | -   | -   |
| Inozitol                   | -   | +   | -   |
| Manitol                    | +   | +   | +   |
| Sorbitol                   | -   | +   | -   |
| $\alpha$ -metil-D-manozid  | -   | -   | -   |
| $\alpha$ -metil-D-glukozid | +   | -   | +   |
| N-acetil glukozamin        | +   | +   | +   |
| Amigdalinalin              | -   | -   | -   |
| Arbutin                    | -   | +   | -   |
| Eskulin                    | +   | +   | +   |
| Salicin                    | +   | +   | +   |
| Celobioza                  | +   | +   | +   |
| Maltoza                    | +   | +   | +   |
| Laktoza                    | +   | +   | +   |
| Melibioza                  | -   | -   | -   |
| Saharoza                   | -   | +   | -   |
| Trehaloza                  | +   | +   | +   |

**Tablica 3.** Fermentacijski profili bakterijskih izolata iz autohtonog ovčjeg sira (DK1, DK5 i DK7) dobiveni API 50 CHL testom. – nastavak

|                     |   |   |   |
|---------------------|---|---|---|
| Inulin              | - | + | - |
| Melezitoza          | + | + | + |
| D-rafinoza          | - | - | - |
| Amidon              | - | - | - |
| Glikogen            | - | - | - |
| Ksilitol            | - | - | - |
| $\beta$ -gentobioza | - | + | - |
| D-turanoza          | - | + | - |
| D-liksoza           | - | - | - |
| D-tagatoza          | + | + | + |
| D-fukoza            | - | - | - |
| L-fukoza            | - | - | - |
| D-arabitol          | - | - | - |
| L-arabitol          | - | - | - |
| Glukonat            | - | + | - |
| 2-keto-glukonat     | - | - | - |
| 5-keto-glukonat     | - | - | - |

**Tablica 4.** Rezultati API 50 CHL biokemijske identifikacije izolata bakterija mliječne kiseline izoliranih iz ovčjeg sira.

| Oznaka soja | Rezultat                            | Postotak identifikacije |
|-------------|-------------------------------------|-------------------------|
| DK1         | <i>Latilactobacillus curvatus</i>   | 99,7                    |
| DK5         | <i>Lacticaseibacillus paracasei</i> | 99,9                    |
| DK7         | <i>Latilactobacillus curvatus</i>   | 99,7                    |

Biokemijskom analizom sojevi DK1 i DK7 identificirani su kao *Latilactobacillus curvatus* DK1 i *Latilactobacillus curvatus* DK7 s postotkom identifikacije  $\geq 99,7\%$ , dok je soj DK5 identificiran kao *Lacticaseibacillus paracasei* DK5 s postotkom  $\geq 99,9\%$ .



## 5. ZAKLJUČCI

Obzirom na dobivene rezultate može se zaključiti:

1. U ovom radu određena je sposobnost formacije biofilma za izolate bakterija mliječne kiseline. Od deset testiranih sojeva, jedan soj (DK5) klasificiran je kao snažan producent biofilma, četiri soja (DK1, DK4, DK7 i DK9) klasificirana su kao umjereni producenti biofilma te je ostalih pet sojeva klasificirano u skupinu slabih producenata biofilma.
2. Uspješno je kvantificirana sposobnost formacije biofilma *Helicobacter pylori* DSM®10242™ u prisustvu deset testiranih sojeva BMK. Najslabija mogućnost formacije biofilma utvrđena je u prisustvu izolata DK5, DK1 i DK7.
3. Određena je sposobnost formacije biofilma *H. pylori* u prisutnosti neutraliziranog te i razrijeđenog supernatanta izolata DK1, DK5 i DK7. Najslabija sposobnost utvrđena je u prisutnosti neutraliziranog supernatanta soja DK5 i iznosila je 75-80 %.
4. Određena je sposobnost autoagregacije *H. pylori* u simuliranim uvjetima želuca tijekom 90 minuta inkubacije. Postotak autoagregacije s vremenom je kontinuirano rastao te je krajnji rezultat iznosio gotovo 50 %.
5. Određena je sposobnost koagregacije bakterije *H. pylori* s odabranim izolatima BMK u simuliranim uvjetima želuca tijekom 90 minuta inkubacije. Najveći postotak koagregacije postignut je sa sojem DK1 i iznosio je 60 %, dok je najmanji postotak koagregacije postignut sa sojem DK5 i iznosio je 40 %.
6. Sojevi DK1, DK5 i DK7 identificirani su analizom fermentacijskog profila. Sojevi DK1 i DK7 identificirani su kao *Lactilactobacillus curvatus* s postotkom identifikacije 99,7. Soj DK5, čiji je postotak identifikacije iznosio 99,9, identificiran je kao *Lactocaseibacillus paracasei*.

## 6. POPIS LITERATURE

Andersen LP, Rasmussen L (2009) Helicobacter pylori-coccoid forms and biofilm formation. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*, **56**, str. 112-115.

Antal I, Jelić M, Sila S, Kolaček S, Tambić Andrašević A (2019) Ljudska mikrobiota i mikrobiom. *Acta med Croatica*., **73**, str. 3-11. <https://hrcak.srce.hr/218931>

Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, Bork P (2011) Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, **473**, str. 174-180. <https://www.nature.com/articles/nature09944>

Bauerfeind P, Garner R, Dunn BE, Mobley HL (1997) Synthesis and activity of Helicobacter pylori urease and catalase at low pH. *Gut*, **40**, str. 25–30. <https://doi.org/10.1136/gut.40.1.25>

Chan WY, Hui PK, Leung KM, Chow J, Kwok F, Ng CS (1994) Coccoid forms of Helicobacter pylori in the human stomach. *Am. J. Ch. Pathol.* **102**, str. 503-507. <https://doi.org/10.1093/ajcp/102.4.503>

Chaturvedi R, de Sablet T, Coburn LA, Gobert AP, Wilson KT (2011) Arginine and polyamines in Helicobacter pylori-induced immune dysregulation and gastric carcinogenesis. *Amino Acids*, **42**, str. 627–640. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-1038-4>.

Chmiela M (2014) Structural modifications of Helicobacter pylori lipopolysaccharide: An idea for how to live in peace. *World J Gastroenterol*, **20**, str. 9882. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i29.9882>.

Collado MC, Meriluoto J, Salminen S (2008) Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *Eur. Food Res. Technol*, **226**, str. 1065-1073.

Daglia M (2012) Polyphenols as antimicrobial agents. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **23**, str. 174–181. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.08.007>.

D'Argenio V, Salvatore F (2015) The role of the gut microbiome in the healthy adult status. *Clin. Chim. Acta*, **451**, str. 97–102. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.01.003>

Dinan TG, Stanton C, Cryan, JF (2013) Psychobiotics: A Novel Class of Psychotropic. *Biol. Psychiatry*, **74**, str. 720–726. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2013.05.001>.

Dujšin M (2000) Ulkusna bolest. *Paediatr Croat*, **44**, str. 61–67. <http://hpps.kbsplit.hr/hpps-2000/9.pdf>. Pristupljeno 10. srpnja 2022.

Egert M, de Graaf AA, Smidt H, de Vos WM, Venema, K (2006) Beyond diversity: functional microbiomics of the human colon. *Trends Microbiol.*, **14**, str. 86–91. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.12.007>.

Frece J, Markov K, Čvek D, Kovačević D, Krcivoj T (2010) Karakterizacija bakterijskog soja *Lactobacillus plantarum* 1K izoliranog iz “slavonskog kulena” kao probiotičke funkcionalne starter kulture, *MESO: Prvi hrvatski časopis o mesu*, **12**, str. 210–216. <https://hrcak.srce.hr/61999> Pristupljeno 8. srpnja 2022.

Frece J, Markov, K, Kovačević D, Rad Z (2010). *Određivanje autohtone mikrobne populacije i mikotoksina te karakterizacija potencijalnih starter kultura u slavonskom kulenu*. <https://hrcak.srce.hr/file/92735>. Pristupljeno 1.7.2022.

Frece J (2021) Mikrobiologija namirnica, Prehrambeno-biotehnoški fakultet. Sveučilište u Zagrebu.

Goddard AF, Logan RPH (2003) Diagnostic methods for *Helicobacter pylori* detection and eradication. *Br. J. Pharmacol.*, **56**, str. 273–283. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2125.2003.01941.x>.

Guarner F, Malagelada JR (2003) Gut flora in health and disease. *The lancet*, **361**, str. 512–519.

Hathroubi S, Servetas SL, Windham I, Merrell DS, Ottemann, KM (2018) *Helicobacter pylori* biofilm formation and its potential role in pathogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **82**, e00001–18.

Hauser G, Benjak Horvat I, Zelić M, Prusac M, Velkovski Škopić O (2020) Probiotici i prebiotici – koncept. *Medicus*, **29**, str. 95–114. <https://hrcak.srce.hr/clanak/337771> Pristupljeno 10. lipnja 2022.

Jiang X, Doyle MP (1998) Effect of Environmental and Substrate Factors on Survival and Growth of *Helicobacter pylori*. *J. of Food Prot.*, **61**, str. 929–933. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-61.8.929>.

Khandagale A, Reinhardt C (2018) Gut microbiota—architects of small intestinal capillaries. *Front. Biosci.*, **23**, str. 752-766.

Kos B, Šušković J, Goreta J, Matošić S (2000) Effect of protectors on the viability of *Lactobacillus acidophilus* M92 in simulated gastrointestinal conditions. *Food Technol. Biotechnol.*, **38**, str. 121-127.

Kostelac, D (2022) Formulacija i razvoj višeslojno mikroinkapsuliranoga probiotika s ciljanim učincima na zdravlje. Doktorska disertacija, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

Kostelac D, Gerić M, Gajski G, Markov K, Domijan AM, Čanak I, Jakopović Ž, Svetec IK, Žunar B, Frece J (2021) Lactic acid bacteria isolated from equid milk and their extracellular metabolites show great probiotic properties and anti-inflammatory potential. *Int. Dairy J.*, **112**, 104828.

Kostelac D, Sušac M, Sokač K, Frece J (2022) Equid milk is a source of probiotic bacteria with potential in caries reduction and preservation of periodontal health. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* str. e5485-e5485.

Krznarić Ž, Vranešić Bender D, Čuković-Čavka S, Vucelić B (2008) Diet Therapy of Inflammatory Bowel Disease. *MEDICUS*, **17**, str. 133–139. <https://hrcak.srce.hr/file/59766>. Pristupljeno 10. lipnja 2022.

G. Kusters J, H. M. van Vliet A, J. Kuipers E (2006) Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Clin. Microbiol. Rev.*, **19**, str. 449–490. <https://doi.org/10.1128/CMR.00054-05>

Kabir AM, Aiba Y, Takagi, A, Kamiya, S, Miwa, T Koga, Y (1997) Prevention of Helicobacter pylori infection by lactobacilli in a gnotobiotic murine model. *Gut*, **41**, str. 49–55. <https://doi.org/10.1136/gut.41.1.49>.

Lederberg J, McCray AT (2001) Ome SweetOmics--A genealogical treasury of words. *The scientist*, **15**, 8-8.

Lei CF, Ngai WT (2014) *A research agenda on managerial intention to green it adoption: From norm activation perspective*. research.polyu.edu.hk. <https://research.polyu.edu.hk/en/publications/a-research-agenda-on-managerial-intention-to-green-it-adoption-fr>. Pristupljeno 26. lipnja 2022.

Lesbros-Pantoflickova D, Corthésy-Theulaz I, L. Blum A (2007) Helicobacter pylori and Probiotics, *Nutr.J.*, **137**, str. 812S–818S. <https://doi.org/10.1093/jn/137.3.812S>

Liu AN, Teng KW, Chew Y, Wang PC, Nguyen TTH, Kao MC (2022) The Effects of HP0044 and HP1275 Knockout Mutations on the Structure and Function of Lipopolysaccharide in Helicobacter pylori Strain 26695. *Biomedicines*, **10**, str. 145

Lloyd-Price J, Abu-Ali G, Huttenhower C (2016) The healthy human microbiome. *Genome Med.*, **8**, str.1-11.

Lohoff M, Röllinghoff M, Sommer F (2000) Helicobacter pylori gastritis: a Th1 mediated disease? *J. Biotechnol.*, **83**, str.33–36.

Meštrović T, Profozić Z, Profozić V (2012) *Helicobacter pylori* and insulin resistance. *Liječnički vjesnik*, **134**. <https://hrcak.srce.hr/clanak/254416>. Pristupljeno 20. svibnja 2022.

Miletić ID, Stanković IM, Đorđević BI, Vidović B. B, Slavković JR (2006) Uticaj probiotika na mineralni sastav sireva tipa kvarka. *Prehrambena industrija-mleko i mlečni proizvodi*, **17**, str. 3-4.

Milovanović E, Obradović M, Bajić V, Bogdanović N, Radak Đ, Isenović E (2015) *The role of L-arginine in cardiovascular system* <https://vinar.vin.bg.ac.rs/bitstream/handle/123456789/10319/0301-06191501036S.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Pristupljeno 17. lipnja 2022.

Mokoena MP (2017) Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: a mini-review. *Molecules*, **22**, str. 1255.

Monteagudo-Mera A, Rastall R. A, Gibson G. R, Charalampopoulos D, Chatzifragkou A (2019) Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health. *Applied Microbiol. Biotechnol.*, **103**, str. 6463-6472.

Ruggiero P (2014) Use of probiotics in the fight against *Helicobacter pylori*. *World J Gastrointest. Pathophysiol.*, **5**, str. 384. <https://doi.org/10.4291/wjgp.v5.i4.384>.

Shiota S, Matsunari O, Watada M, Hanada K, Yamaoka Y (2010) Systematic review and meta-analysis: the relationship between the *Helicobacter pylori* dupA gene and clinical outcomes. *Gut Pathog.*, **2**, str. 13. <https://doi.org/10.1186/1757-4749-2-13>.

Suerbaum S, Josenhans C, Labigne A (1993) Cloning and genetic characterization of the *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flaB flagellin genes and construction of *H. pylori* flaA- and flaB-negative mutants by electroporation-mediated allelic exchange. *J. Bacteriol.*, **175**, str. 3278–3288. <https://doi.org/10.1128/jb.175.11.3278-3288.1993>.

Sugano K, Tack J, Kuipers EJ., Graham D.Y, El-Omar E.M, Miura S, i sur. (2015) Kyoto global consensus report on *Helicobacter pylori* gastritis. *Gut*, **64**, str. 1353–1367. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309252>.

Šušćković J, Kos B, Matošić S (1998). Probiotici: znanstvena činjenica ili pomodni trend? *Mljekarstvo : časopis za unaprjeđenje proizvodnje i prerade mlijeka*, **48**, str. 165–176. <https://hrcak.srce.hr/94838> Pristupljeno 3. svibnja 2022.

Šušković J, Kos B, Šantek B, Kniewald Z, Mrša V, Hruškar M, i sur., (2019) Biotehnologija u Hrvatskoj – povijesna baština i suvremeni trendovi, *Annu. Croat. Acad. Eng.*, **2019**, str. 438-484. <https://hrcak.srce.hr/238879> Pristupljeno 29. lipnja 2022.

Verbanac D, Perić M, Matijašić M, Panek M, Meštrović T, Leskovar D i sur. (2017) Uloga i promjene mikrobiote u postmenopauzi, pristupljeno 5. srpnja 2022.

Vesković-Moračanin S, Djukić D, Memisi N (2014) Bacteriocins produced by lactic acid bacteria: A review. *Acta Period. Technol.*, **45**, str. 271–283. <https://doi.org/10.2298/apt1445271v>

Vitali Čepo D, Filipović I (2014) Terapijska primjena i sigurnost probiotika, *Farmaceutski glasnik*, **70**, str. 651-668. <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:874289> Pristupljeno 16. travnja 2022.

Walter J, Ley R (2011). The human gut microbiome: ecology and recent evolutionary changes.

Yonezawa H, Osaki T, Kurata S, Zaman C, Hanawa T, Kamiya, S (2010) Assessment of in vitro biofilm formation by *Helicobacter pylori*. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, **25**, str. S90-S94.

## Izjava o izvornosti

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

Ivona Karaula  
Vlastoručni potpis