

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Jelena S. Novaković Jovanović

**IZOLACIJA, KARAKTERIZACIJA I
ISPITIVANJE PROBIOTSKIH OSOBINA
AUTOHTONIH SOJEVA LAKTOBACILA**

doktorska disertacija

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Jelena S. Novaković Jovanović

**ISOLATION, CHARACTERIZATION AND
INVESTIGATION OF PROBIOTIC
PROPERTIES OF INDIGENOUS
LACTOBACILLI STRAINS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

MENTORI I ČLANOVI KOMISIJE:

Mentori:

dr Jelena Knežević-Vukčević, redovni profesor
Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

dr Biljana Nikolić, docent
Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije:

dr Dragana Mitić-Ćulafić, naučni saradnik
Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

dr Gordana Zavišić, naučni saradnik,
Galenika a.d., Beograd

Datum odbrane:

Ova disertacija je urađena u Službi za bazne tehnologije Instituta za istraživanje i razvoj i Službi za biološka ispitivanja Kontrole kvaliteta, kompanije Galenika a.d., na Katedri za mikrobiologiju Biološkog fakulteta Univerziteta u Beograd i u Institutu za zaštitu bilja i životnu sredinu, Odsek za štetočine bilja, u Beogradu.

Ovom prilikom želim da se zahvalim:

Dr Jeleni Knežević-Vukčević, redovnom profesoru Biološkog fakulteta, na pomoći, savetima i razumevanju, kao i na kritičkoj oceni i korisnim sugestijama tokom izrade rada;

dr Biljani Nikolić, docentu Biološkog fakulteta, na brojnim korisnim diskusijama, sugestijama i pomoći koje su upotpunile ovaj rad. Biljani hvala još i na vremenu i trudu koje je uložila tokom izrade ovog rada, kao i na ljudskom razumevanju koje mi je pokazala.

Zahvalnost dugujem i dr Dragani Mitić-Ćulafić i Marini Rajić na pomoći u eksperimentalnom radu;

Zahvaljujem se dr Jeleni Jović na pomoći tokom izvođenja eksperimenata genotipske identifikacije izolata;

Zahvaljujem se dr Branki Petković na pomoći u statističkoj obradi rezultata;

Zahvaljujem se dr Gordani Zavišić, koja me je i uvela u svet probiotika, na nesebičnoj podršci i znanju koje mi je prenela. Bez Gocinog entuzijazma, korisnih saveta i konstruktivnih ideja mnogo toga ne bi bilo ostvarivo. Goco, još jednom veliko hvala na prilikama koje ste mi pružili, iskustvu koje sa mnom delite i veri u mene.

Kolegama iz Službe za bazne tehnologije i Službe za biološka ispitivanja hvala na podršci i pomoći. Među njima moram posebno izdvojiti Goricu Janković koja me je strpljivo učila brojnim tehničkim umećima.

Hvala mr Svetlani Šeatović na zajedničkom radu, pruženom znanju i pomoći. Mojim koleginicama i drugaricama Svetlani, Bojani, Ljiljani, Nataši i Jeleni zahvaljujem i na podršci i prijateljstvu. Vi mi svaki dan činite lepšim!

Zahvalnost dugujem i svojim rukovodiocima iz Galenike a.d. Bojanu Pavloviću, Nataši Knežević i Radmili Mandić zahvaljujući kojima sam dobila stipendiju za doktorske studije i mogućnost da ovaj rad dovedem do kraja. Radmili Mandić hvala što mi je od prvog dana našeg zajedničkog rada pokazivala samo poverenje i razumevanje. Uz Vas sam naučila mnoge važne lekcije o životu i poslu koje ne pišu ni u jednoj knjizi (niti standardu), hvala na tome.

Malo je reći da veliku zahvalnost dugujem svojim roditeljima i bratu na bezrezervnoj veri, podršci i ljubavi koju su mi pružali oduvek, i u svim situacijama.

I na posletku, hvala Bati, Tari i Nikoli, koji daju smisao svemu što radim. Vi ste moj život i moja najveća radost.

*Mojim roditeljima,
bez vas nikada ne bih bila orao.*

Izolacija, karakterizacija i ispitivanje probiotskih osobina autohtonih sojeva laktobacila

Rezime

Cilj ove doktorske disertacije je bio ispitivanje probiotskih osobina novih, autohtonih sojeva laktobacila izolovanih iz gastrointestinalnog trakta zdravih beba i uzoraka domaćeg kravljeg sira sa područja Gornjeg Milanovca. Ukupno je obrađeno 46 uzoraka (43 humanog i 3 poreklom iz sira) iz kojih su izolovana 143 bakterijska soja. Od ovog broja 120 izolata su bili Gram pozitivne koke, 15 izolata Gram pozitivni bacili i 8 izolata Gram negativni bacili. Pripadnost rodu *Lactobacillus* je potvrđena kod 8 izolata (7 humanog i 1 poreklom iz sira) za koje je pokazano da su katalaza negativni, nesporulativni Gram pozitivni bacili, sposobni da rastu na MRS podlozi u anaerobnim uslovima. Genotipska identifikacija je pokazala da izolati Lac1, Lac2, Lac6 i Lac7 pripadaju vrsti *Lactobacillus plantarum*, izolati Lac3 i 5s vrsti *Lactobacillus casei*, izolat Lac4 vrsti *Lactobacillus paracasei* i izolat Lac5 vrsti *Lactobacillus gasseri*. Iz daljih ispitivanja je isključen izolat Lac5 zbog slabog rasta na čvrstoj podlozi. Fiziološkom i biohemijском karakterizacijom ispitivanih izolata pokazano je da se radi o nehemolitičnim, homofermentativnim vrstama koje rastu u širokom opsegu temperature (10-40°C), koncentracije NaCl (2,0-6,5%) i pH vrednosti (2,0-8,0). Takođe, utvrđeno je da izolat 5s raste mnogo sporije u odnosu na ostale izolate. Izolati su pokazali visok stepen otpornosti na lizozim, kisele uslove sredine i prisustvo žučnih soli. Proteolitička aktivnost je detektovana samo kod izolata Lac1. Svi ispitivani izolati rastu u prisustvu fenola od 0,4%, a izolat Lac2 i pri koncentraciji od 1%. Ispitivanje osetljivosti na najčešće upotrebljavane antibiotike pokazalo je da su svi izolati rezistentni prema vankomicinu, amikacinu, gentamicinu i norflokscinu, a osetljivi prema ampicilinu i rifampicinu. Ni jedan od ispitivanih izolata nije pokazao osetljivost prema α -amilazi, tripsinu, himotripsinu, pronazi E i katalazi.

Ispitivanje osnovnih probiotskih osobina pokazalo je visok procenat (preko 79%) preživljavnja izolata u simuliranim uslovima gastrointestinalnog trakta. Osim toga, bezćelijski supernatanti svih izolata su pokazali antimikrobno dejstvo prema pojedinim Gram pozitivnim i Gram negativnim bakterijama, dok je ono izostalo prema kvascima i

plesnima, kao i prema vrstama iz roda *Lactobacillus*. Ova poslednja osobina je značajna jer daje mogućnost kombinovanja dve i više vrsta u potencijalnoj proizvodnji probiotika. Antimikrobni efekat izostaje nakon neutralizacije bezćelijskog supernatanta, što pokazuje da se on pripisuje proizvodnji organskih kiselina i sniženju pH. Ispitivani izolati su pokazali srednji i visok stepen hidrofobnosti ćelijskog zida, a poseduju i sposobnost autoagregacije i koagregacije sa *E. coli* i *L. monocytogenes*. Prilikom ispitivanja sposobnosti adhezije izolata na HCT 116 ćelijsku liniju pokazan je umereni adhezioni potencijal.

Dobijeni rezultati ukazuju na to da svi izolovani sojevi poseduju probiotske osobine, pri čemu se među njima izdvajaju Lac 6 i Lac7 (oba *L. plantarum*), kao izolati sa najvišim stepenom preživljavanja u humanom gastrointestinalnom traktu i najširim antimikrobnim spektrom, kao i izolati 5s (*L. casei*) i Lac2 (*L. plantarum*) koji su pokazali najviši adhezioni potencijal.

Ključne reči: autohtoni izolati *Lactobacillus* sp., probiotici, antimikrobna aktivnost, adhezivnost

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Biologija mikroorganizama

UDK broj: 579.864:579.22 (043.3)

Isolation, characterization and investigation of probiotic properties of indigenous lactobacilli strains

Abstract

The aim of this Doctoral thesis was to investigate the probiotic properties of new, indigenous lactobacilli strains isolated from the gastrointestinal tract of healthy babies and homemade cheese samples originating from the area of Gornji Milanovac. We collected 46 samples (43 of human and 3 of dairy origin), from which 143 bacterial strains were isolated. Among them, 120 isolates were identified as Gram positive cocci, 15 isolates as Gram positive bacilli and 8 isolates as Gram negative bacilli. We showed that 8 isolates (7 of human and 1 of dairy origin) were catalase-negative, Gram positive bacilli that do not form spores and are able to grow on MRS medium in anaerobic conditions, and confirmed that they belong to the genus *Lactobacillus*. Genotypic identification showed that isolates Lac1, Lac2, Lac6 and Lac7 belong to the species *Lactobacillus plantarum*, isolates Lac3 and 5s to the *Lactobacillus casei*, Lac 4 to the *Lactobacillus paracasei* and isolate Lac5 to the *Lactobacillus gasseri*. Isolate Lac5 was excluded from further studies due to its poor growth on agar medium. Physiological and biochemical characterization showed that all isolates were nonhemolytic, homofermentative species, growing in a wide range of temperature (10 to 40°C), NaCl concentration (2.0 to 6.5%) and pH (2.0 to 8.0). Comparing to the other isolates, the 5s grew slower. The isolates showed high degree of resistance to lysozyme, acidic environmental conditions and the presence of bile salts. Only Lac1 isolate possessed proteolytic activity. All isolates grew in the presence of 0.4% phenol and Lac2 even at its concentration of 1%. Investigation of isolates sensitivity to antibiotics showed that all isolates were resistant to vancomycin, amikacin, gentamicin and norfloxacin, but sensitive to ampicillin and rifampicin. All tested isolates showed no sensitivity to α -amylase, trypsin, chymotrypsin, pronase E and catalase.

Investigation of probiotic properties showed that isolated strains survived in high percentage (over 79%) in simulated conditions of gastrointestinal tract. Additionally, all isolates showed antimicrobial effect against certain Gram positive and Gram negative bacteria, but not against yeasts and molds. No antimicrobial effect was detected against other species of the *Lactobacillus* genus. This last feature is important because it gives the

possibility of combining two or more species in the potential probiotic product. There was no antimicrobial effect after neutralization of cell-free supernatant, indicating that this feature can be attributed to the production of organic acids and lowering of the pH. The tested isolates showed medium and high degree of hydrophobicity of the cell wall, the ability of auto-aggregation, and also of co-aggregation with *E. coli* and *L. monocytogenes*. Moderate adhesion potential was detected when we investigated the ability of isolates to adhere to HCT 116 cell line.

The obtained results indicate that all isolated strains do possess probiotic properties, but isolates Lac 6 and Lac7 (both *L. plantarum*) could be marked as the most prosperous ones, due to their highest level of survival in the human gastrointestinal tract and the broadest antimicrobial spectrum, as well as isolates 5s (*L. casei*) and Lac2 (*L. plantarum*), due to their pronounced adhesion potential.

Keywords: indigenous *Lactobacillus* sp. strains, probiotics, antimicrobial activity, adhesion

Research field: Biology

Specific research field: Biology of microorganisms

UDK No.: 579.864:579.22 (043.3)

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Mikrobiota gastrointestinalnog trakta	1
1.2. Rod <i>Lactobacillus</i>	5
1.3. Ćelijski zid laktobacila	8
1.4. Definicija probiotika	10
1.5. Istorija istraživanja probiotika	13
1.6. Spektar delovanja probiotika na organizam domaćina	14
1.7. Primena probiotskih preparata	20
1.8. Karakteristike probiotskih bakterija	22
2. Cilj	27
3. Materijal i metode	28
3.1. Materijal	28
3.1.1. Mikroorganizmi	28
3.1.2. Ćelijska kultura	29
3.1.3. Podloge za kultivaciju mikroorganizama	29
3.1.4. Rastvori i reagensi za rad sa mikroorganizmima	33
3.1.5. Enzimi	35
3.1.6. Podloge i reagensi za gajenje kulture sisarskih ćelija	35
3.2. Metode	35
3.2.1. Uzimanje uzoraka	35
3.2.2. Izolacija bakterija iz uzoraka	36
3.2.3. Uslovi gajenja mikroorganizama	36
3.2.4. Određivanje ukupnog broja vijabilnih mikroorganizama (CFU)	37
3.2.5. Dugotrajno čuvanje	37
3.2.6. Identifikacija izolovanih sojeva bakterija	37
3.2.6.1. Preliminarna fenotipska identifikacija bakterija	37
3.2.6.1.1. Bojenje po Gramu	37
3.2.6.1.2. Ispitivanje aktivnosti katalaza	37

3.2.6.1.3.	Test hemolize	38
3.2.6.1.4.	Test anaerobnog rasta	38
3.2.6.1.5.	Test sporulacije	38
3.2.6.1.6.	Fermentacija ugljenih hidrata	38
3.2.6.2.	Genotipska identifikacija izolovanih sojeva laktobacila	38
3.2.6.2.1.	Ekstrakcija ukupne DNK	39
3.2.6.2.2.	Umnožavanje DNK fragmenata PCR metodom	39
3.2.6.2.3.	Sekvenciranje PCR produkata i analiza dobijenih sekvenci 16S rDNK	40
3.2.7.	Fiziološka i biohemijska karakterizacija izolovanih sojeva laktobacila	41
3.2.7.1.	Proizvodnja gasa iz laktoze	41
3.2.7.2.	Rast na različitim temperaturama	41
3.2.7.3.	Rast na različitim pH	42
3.2.7.4.	Rast u prisustvu različitih koncentracija NaCl	42
3.2.7.5.	Tolerancija na fenol	42
3.2.7.6.	Ispitivanje proteolitičke aktivnosti	42
3.2.7.7.	Kriva rasta	42
3.2.7.8.	Ispitivanje osetljivosti na antibiotike	43
3.2.7.9.	Ispitivanje osetljivosti na enzime	43
3.2.7.10.	Određivanje sadržaja mlečne i buterne kiseline metodom HPLC	44
3.2.8.	Ispitivanje probiotskih osobina izoovanih sojeva laktobacila	44
3.2.8.1.	Rezistencija na niske pH vrednosti	44
3.2.8.2.	Tolerancija na prisustvo žučnih soli	45
3.2.8.3.	Preživljavanje u simuliranim uslovima gastrointestinalnog trakta	45
3.2.8.4.	Ispitivanje antimikrobne aktivnosti	45
3.2.8.5.	Ispitivanje hidrofobnosti-MATH test	46

3.2.8.6.	Ispitivanje autoagregacije i koagregacije	46
3.2.8.7.	Ispitivanje vijabilnosti humanih ćelija u kulturi	47
3.2.8.8.	Ispitivanje sposobnosti adhezije izolovanih sojeva laktobacila <i>in vitro</i>	47
3.2.8.9.	Ispitivanje efekta postupka tripsinizacije na vijabilnost laktobacila	48
3.2.9.	Statističke analize	48
4.	Rezultati	50
4.1.	Uzorkovanje materijala i izolacija novih sojeva laktobacila	50
4.2.	Prečišćavanje, izolacija i fenotipska identifikacija izolovanih bakterijskih sojeva	50
4.3.	Fermentacija ugljenih hidrata	52
4.4.	Genotipska identifikacija izolovanih sojeva laktobacila	53
4.5.	Fiziološka i biohemijska karakterizacija izolovanih sojeva laktobacila	56
4.5.1.	Proizvodnja gasa iz laktoze	56
4.5.2.	Rast na različitim temperaturama	57
4.5.3.	Rast na različitim pH	57
4.5.4.	Rast u prisustvu različitih koncentracija NaCl	57
4.5.5.	Tolerancija na fenol	57
4.5.6.	Proteolitička aktivnost izolovanih sojeva laktobacila	59
4.5.7.	Dinamika rasta izolovanih sojeva laktobacila	59
4.5.8.	Osetljivost prema antibioticima	61
4.5.9.	Osetljivost izolovanih sojeva laktobacila na enzime	62
4.5.10.	Tip i sadržaj organskih kiselina u bezćelijskim supernatantima izolovanih sojeva laktobacila	63
4.6.	Probiotske osobine izoovanih sojeva laktobacila	63
4.6.1.	Rezistencija na niske vrednosti pH	63
4.6.2.	Tolerancija na prisustvo žučnih soli	64
4.6.3.	Preživljavanje u simuliranim uslovima gastrointestinalnog trakta	67
4.6.4.	Antimikrobna aktivnost izolovanih sojeva laktobacila	69

4.6.5. Hidrofobnost površine ćelija izolovanih sojeva laktobacila	71
4.6.6. Sposobnost autoagregacije i koagregacije izolovanih sojeva laktobacila	71
4.6.7. Sposobnost adhezije izolovanih sojeva laktobacila na HCT 116 ćelijsku liniju	74
5. Diskusija	76
6. Zaključci	92
7. Literatura	95
8. Prilozi	124
9. Opšti podaci o autorskim pravima	146

1. Uvod

Ljudsko telo naseljeno je velikim brojem različitih vrsta mikroorganizama. One naseljavaju površinu i duboke slojeve kože, uključujući i mlečne žlezde, salivu i oralnu mukozu, konjuktivu oka i gornji respiratorni trakt, a u najvećem broju nalaze se u gastrointestinalnom traktu i vagini (König i Brummer, 2014; Urbaniak *i sar.*, 2014). U sastav složenih mikrobijalnih zajednica koje sa organizmom domaćinom sačinjavaju takozvani supraorganizam ulaze bakterije, gljive i arhee (Eckburg *i sar.*, 2005). Sve one zajedno čine mikrobiotu koja se formira odmah nakon rođenja i koegzistira u organizmu domaćina tokom celog života. Koliko je mikrobiota čoveka raznovrsna vidi se iz podatka da u odraslom organizmu koegzistira preko 1000 različitih vrsta bakterija (Rajilić-Stojanović *i sar.*, 2007; Tap *i sar.*, 2009; Qin *i sar.*, 2010; König i Brummer, 2014), a na taj broj treba dodati i prisutne vrste gljiva i arhea. Njihov broj je mnogostruko manji, a dominantni predstavnici su rod *Candida* među gljivama, kao i metanogene arhee iz rodova *Methanobrevibacter* i *Methanosphaera* (Florin *i sar.*, 2000; Bernhardt i Knoke, 1997).

Mikrobiota ima veliki značaj za fiziologiju domaćina, utičući pre svega na varenje i apsorpciju hranljivih materija, sintezu vitamina, zaštitu od kolonizacije patogenima, modulaciju imunskog odgovora, regulaciju čuvanja masnih naslaga i stimulaciju intestinalne angiogeneze (Backhed *i sar.*, 2005). Genski sadržaj mikrobiote koja naseljava ljudski organizam sačinjava humani mikrobiom, koji je 100 puta veći od humanog genoma (Lönnermark, 2010).

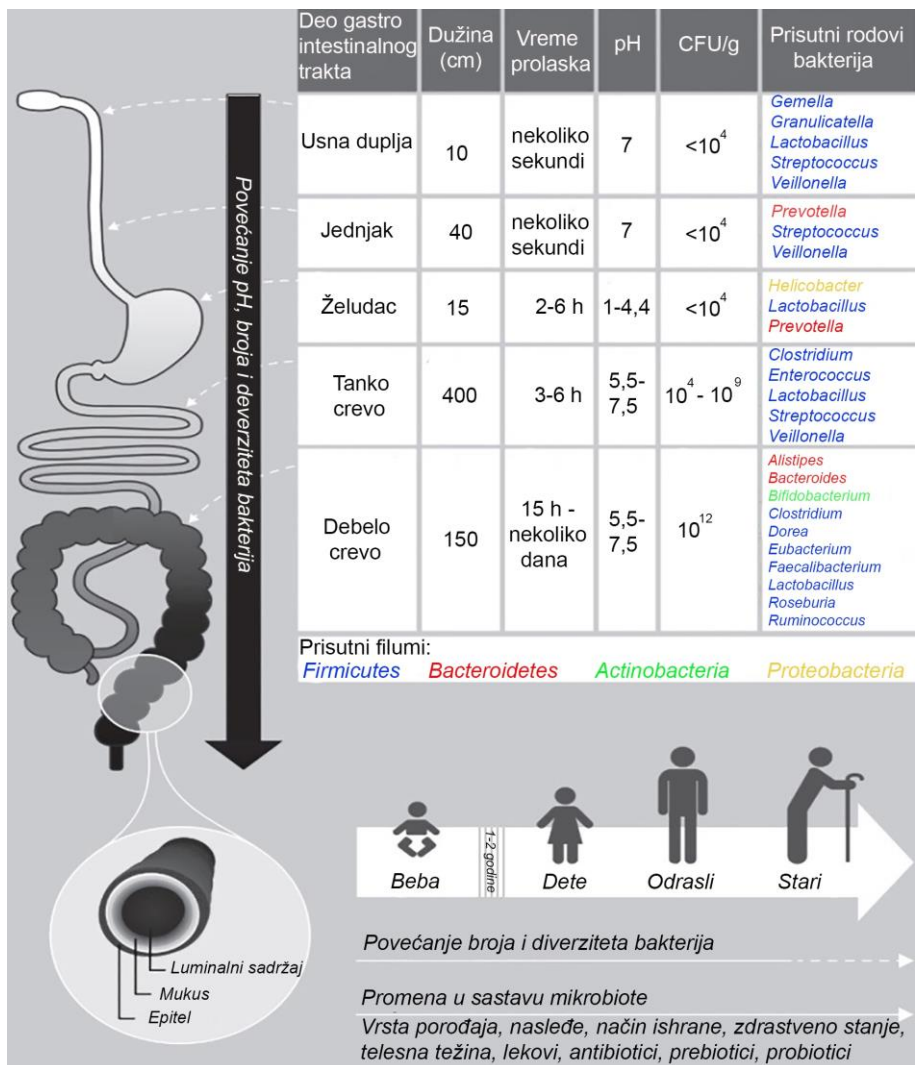
Bitnu komponentu humane mikrobiote predstavljaju bakterije mlečne kiseline, heterogena grupa mikroorganizama sa zajedničkim metaboličkim i fiziološkim karakteristikama, koju pored roda *Lactobacillus*, koji je najbrojniji, čine i rodovi *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus* i *Leuconostoc* (Dellaglio *i sar.*, 2005).

1.1. Mikrobiota gastrointestinalnog trakta

Kolonizacija gastrointestinalnog trakta počinje još na samom na rođenju, a nastavlja se tokom celog života, sa značajnim promenama karakterističnim za starosne dobi (Mitsuoka, 1992). U trenutku rođenja gastrointestinalni trakt novorođenčadi je gotovo sterilan, ali do kolonizacije dolazi brzo tokom prvih dana života, da bi se stabilna

populacija, po sastavu slična kao kod odraslog čoveka, uspostavila do druge godine života i sa završenim procesom uvođenja čvrste hrane (Slika 1). U gastrointestinalnom traktu zdravih ljudi bakterije su dominantno zastupljene u obliku pojedinačnih ćelija ili mikrokolonija, dok su multicelularne strukture, koje se često označavaju kao zajednice slične biofilmu, uglavnom karakteristika patogenih stanja (MacFarlane *i sar.*, 2004; Branda *i sar.*, 2005; Swidsinski *i sar.*, 2005). Kod novorođenčadi gastrointestinalni trakt prvo nastanjuju bakterije poput različitih vrsta rodova *Staphylococcus* i *Streptococcus* i familije *Enterobacteriaceae*. Ove vrste svojom aktivnošću proizvode nove metabolite pripremajući intestinalni sistem za uspostavljanje populacije striktno anaerobnih vrsta bakterija među kojima dominiraju predstavnici rodova *Bifidobacterium*, *Clostridium* i *Bacteroides*. Bakterije koje kolonizuju gastrointestinalni trakt novorođenčadi su poreklom iz okruženja, pre svega od majke, a na sastav bakterijske populacije utiču razni faktori kao što su tip porođaja, način ishrane, gestacijska starost, korišćenje antibiotika, hospitalizacija, okruženje, kao i zdravstveno stanje majke (Mitsuoka, 1992).

Smatra se da kod novorođenčadi koja se hrane isključivo majčinim mlekom dominiraju bifidobakterije, a da je nešto manja kolonizacija vrstama rodova *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* i familije *Enterobacteriaceae* (Slika 1). Sa druge strane, mikrobiota novorođenčadi na veštačkoj hrani je raznovrsnija i u njoj se mogu sresti vrste rodova *Bacteroides*, *Clostridium* i familije *Enterobacteriaceae* (Marquess *i sar.*, 2010).



Slika 1. Distribucija i broj bakterija u humanom gastrointestinalnom traktu
 (preuzeto iz Krogius-Kurikka, 2011)

Mikrobiota gastrointestinalnog trakta odraslog čoveka predstavlja funkcionalno uniformnu zajednicu koju karakterišu specifičnost i relativna stabilnost (Vanhouthe *i sar.*, 2004; Kurokawa *i sar.*, 2007; Rajilić-Stojanović *i sar.*, 2009; Turnbaugh *i sar.*, 2009; Gosalbes *i sar.*, 2011). Neke od njih su tranzitne, dok druge stabilno kolonizuju gastrointestinalni trakt, ali sve zajedno održavaju dinamičku ravnotežu, kako unutar intestinalne mikrobiote, tako i sa organizmom domaćinom. Broj bakterija prisutnih u usnoj duplji je 10^5 do 10^8 CFU/ml pljuvačke, u želucu taj broj iznosi oko 10^3 CFU/mL želudačnog soka, u duodenumu oko 10^4 CFU/mL sadržaja, u tankom crevu oko 10^7 do 10^9

CFU/g sadržaja, dok u debelom crevu taj broj dostiže 10^{12} CFU/g fecesa. U intestinumu su prisutne *Bacteria*, *Archaea* i *Eukarya*, kao i mnogi virusi (Rajilić-Stojanović *i sar.*, 2007; Reyes *i sar.*, 2010; Sekirov *i sar.*, 2010). Kod starijih ljudi, mikrobiota postaje nešto manje raznovrsna (Enck *i sar.*, 2009; Rajilić-Stojanović *i sar.*, 2009; Claesson *i sar.*, 2010), dok je kod stogodišnjaka značajno promenjena (Biagi *i sar.*, 2010).

Na sastav mikrobiote gastrointestinalnog trakta tokom života utiču faktori mikrobijalne zajednice (Turnbaugh *i sar.*, 2009), ali i spoljašnji faktori poput geografskog porekla (Li *i sar.*, 2008), načina ishrane (Muegge *i sar.*, 2011), telesne težine (Turnbaugh *i sar.*, 2009), zdravstvenog stanja (Sekirov *i sar.*, 2010), eventualne antimikrobne terapije (Jakobsson *i sar.*, 2010), kao i korišćenje probiotika i prebiotika (Flint *i sar.*, 2007; Kajander *i sar.*, 2008). Takođe, sa sastavom mikrobiote, menja se i pH vrednost pojedinih delova gastrointestinalnog trakta, od vrlo niske do neutralne (Duncan *i sar.*, 2009).

Mikrobiota gastrointestinalnog trakta, odnosno kolektivni mikrobijalni genom, nadomešćuje neke od osobina koje nedostaju genomu čoveka (Camp *i sar.*, 2009). Jedna od najvažnijih uloga mikrobiote gastrointestinalnog trakta je katabolizam vlakana koja nisu u potpunosti hidrolizovana enzimima domaćina tokom varenja (Topping i Clifton, 2001). Tako bakterije prevode unešene ugljene hidrate u vodonik, ugljen dioksid, metan i masne kiseline kratkog lanca (*Short Chain Fatty Acids*, SCFA), poput acetata, propionata i butirata. Najznačajniji proizvod bakterijske razgradnje vlakana su upravo SCFA, čija se uloga ogleda u *de novo* sintezi lipida i glukoze, a koji su glavni izvori energije za epitelijalne ćelije gastrointestinalnog trakta (Wolever *i sar.*, 1989; Guarner, 2006; Flint *i sar.*, 2008). Sa druge strane, bakterije razlažu i proteine nesvarljive za domaćina, hidrolizujući ih do aminokiselina, koje se dalje razgrađuju do vodonika, ugljen-dioksida, amonijaka, amina, metana i organskih kiselina, a u slučaju aromatičnih i aminokiselina sa sumporom, još i fenolnih jedinjenja i sulfida (Hughes *i sar.*, 2000). Mikrobiota gastrointestinalnog trakta još ima sposobnost metaboličke obrade nekih potencijalnih kancerogena, aktivacije bioaktivnih jedinjenja i produkcije vitamina (poput vitamina K, vitamina B12 i biotina), doprinosi metabolizmu žučnih soli, apsorpciji kalcijuma, magnezijuma i gvožđa, a takođe učestvuje i u regulisanju čuvanja masti (Guarner, 2006; Leser i Molbak, 2009; Hammes i Hertel, 2009). Dodatno, učestvuje i u sazrevanju

imunskog sistema domaćina i održavanju homeostaze (Round i Mazmanian, 2009), a ima i zaštitnu ulogu jer deluje kao brana od kolonizacije gastrointestinalnog sistema patogenim mikroorganizmima (Stecher i Hardt, 2008).

Kao primer korisne uloge crevne mikrobiote, najčešće se navodi tzv. "kolonizacioni otpor" ili "efekat barijere" (van der Waaij *i sar.*, 1971; Vollaard i Clasener, 1994) koji podrazumeva da bakterije već prisutne u crevima onemogućavaju kolonizaciju novounešenim mikroorganizmima, uključujući i patogene. U skladu sa ovim, može se pretpostaviti da bi se korigovanjem navika u ishrani moglo dovesti do povećanja relativne brojnosti tzv. korisnih bakterija i tako pozitivno uticati na zdravlje domaćina. Upravo je ovo bila originalna pretpostavka Mečnikova, koji je smatrao da su neophodna "sistematska istraživanja uticaja crevne mikrobiote na prevremeno starenje i načina ishrane koji sprečava truljenje u crevima, što bi moglo uticati na produženje života i održavanje snage tela" (FAO/WHO, 2002).

Deo mikrobiote domaćina čine i probiotski mikroorganizami. Probiotici su definisani kao živi mikroorganizami koji doprinose zdravlju domaćina kada se unose u odgovarajućim količinama (FAO/WHO, 2002). Članovi humane mikrobiote su jedan od izvora iz koga se izoluju nove probiotske vrste (Tuomola *i sar.*, 2001). Iako se i bifidobakterije, kao i neke druge vrste mikroorganizama koriste kao probiotici, fokus ovog rada postavljen je na ispitivanje probiotskog potencijala različitih vrsta laktobacila. Laktobacili su izabrani pre svega zbog njihove zdravstvene bezbednosti, kao i izrazito duge tradicije upotrebe.

1.2. Rod *Lactobacillus*

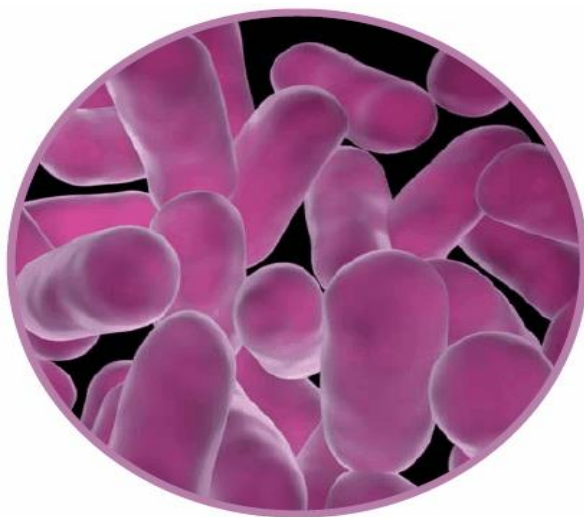
Rod *Lactobacillus* obuhvata više od 100 do sada opisanih vrsta. Pripada familiji *Lactobacillaceae*, redu *Lactobacillales*, klasi *Bacilli* i filumu *Firmicutes*. Rod obuhvata Gram pozitivne, katalaza i oksidaza negativne bacile koji ne formiraju endospore i ne poseduju citochrome (Slika 2). Kao izvor energije najčešće koriste različite šećere; poseduju efikasni metabolički put fermentacije šećera spregnut sa fosforilacijom substrata. Retki su izuzeci koji mogu koristiti arginin kao jedini izvor energije. Uglavnom su homofermentativni, i tada je krajnji produkt fermentacije mlečna kiselina, dok kod

heterofermentativnih vrsta najmanje polovinu od ukupne količine krajnjih produkata fermentacije čini mlečna kiselina, a ostatak su acetat, etanol, ugljen dioksid, format i sukcinat. Najprecizniju podelu po ovom kriterijumu dali su Kandler i Weiss (1986):

- Obligatno homofermentativni laktobacili fermentišu heksoze do mlečne kiseline, a pentoze i glukonat ne fermentišu. U ovu grupu spadaju *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* i *L. helveticus*;
- Fakultativno heterofermentativni laktobacili fermentišu heksoze do mlečne kiseline, a gas mogu da produkuju samo iz glukonata, ali ne i iz glukoze. U ovu grupu spadaju *L. plantarum* i *L. casei*;
- Obligatno heterofermentativni laktobacili fermentišu heksoze do mlečne i sirćetne kiseline, etanola i ugljendioksida. U ovu grupu spadaju *L. fermentum*, *L. fructosus*, *L. brevis*, *L. buchneri* i *L. reuteri*.

Laktobacili su u literaturi uglavnom označeni kao fakultativno anaerobni organizmi (Hammes i Hertel, 2009), međutim oni ne vrše aerobno disanje. Najbolje rastu u anaerobnim sredinama ili u uslovima smanjene koncentracije kiseonika i 5-10% ugljen dioksida, odnosno u mikroaerofilnim uslovima. Po pravilu, striktno aerobni uslovi su za njih letalni, što ukazuje da je sistem odbrane od reaktivnih kiseoničnih vrsti slabo konstitutisan. Zbog toga se u metaboličkom smislu smatraju organizmima koji su na samom pragu evolutivnog prelaska iz anaerobnog u aerobni svet (Hammes i Hertel, 2009).

Vrste roda *Lactobacillus* ne redukuju nitrate, ne razlažu želatin, ne produkuju indol niti vodonik-sulfid i retko produkuju pigmente. Za rast im je neophodno prisustvo aminokiselina, peptida, prekursora nukleinskih kiselina, vitamina, soli, masnih kiselina ili njihovih estara, kao i ugljenih hidrata. Optimalna temperatura za rast laktobacila je u opsegu 30-40°C, a mogu rasti na temperaturama od 2-53°C. Optimalna pH sredine za bakterije iz ovog roda je od 5,5-6,2 (Hammes i Hertel, 2009). Mogu se naći u mlečnim proizvodima, mesu i ribljim proizvodima, vinu, voću i voćnim sokovima, silaži, vodi, zemljištu i dr., a naseljavaju i gastrointestinalni trakt ljudi i reproduktivne organe žena, kao i mnogih životinja.



Slika 2. Morfologija ćelija laktobacila (preuzeto sa <http://www.sigmaaldrich.com/>)

U organizmu čoveka laktobacili su stabilni stanovnici mikrobiote gastrointestinalnog i urogenitalnog trakta, mada se mogu naći i u drugim sredinama. Smatra se da su vrste *L. gasseri*, *L. reuteri*, *L. crispatus*, *L. salivarius* i *L. ruminis* predominantno autohtone za čoveka, ali i vrste *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. johnsonii*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. delbrueckii*, *L. curvatus* i *L. sakei* se mogu naći u humanom gastrointestinalnom traktu. Mada su deo mikrobiote duodenuma, ileuma i kolona, mogu se naći i u uzorcima želuca (Heilig *i sar.*, 2002; Walter, 2005). U odnosu na odrasle osobe, mikrobiota novorođenčadi je izuzetno nestabilna, ali se i tu mogu naći laktobacili (Mackie *i sar.*, 1999). Najčešće izolovane vrste kod novorođenčadi su *L. salivarius*, *L. rhamnosus* i *L. paracasei* (Heilig *i sar.*, 2002), a njihov broj je oko 10^5 CFU/g fecesa, dok se taj broj kod beba starih mesec dana kreće od 10^6 do 10^8 CFU/g fecesa (Mackie *i sar.*, 1999). Kod odraslih ljudi broj laktobacila dostiže i oko 10^{12} CFU/g fecesa (Rajilić-Stojanović *i sar.*, 2007). Međutim, ovaj broj, iako veliki, predstavlja samo mali deo humane mikrobiote fecesa, odnosno oko 0,01% do 0,6% (Kimura *i sar.*, 1997; Sghir *i sar.*, 2000; Tannock *i sar.*, 2000; Dal Bello *i sar.*, 2003).

Nasuprot mikrobioti gastrointestinalnog trakta, laktobacili čine dominantnu komponentu mikrobiote ženskog urogenitalnog trakta (Redondo-Lopez *i sar.*, 1990; Zhou *i sar.*, 2007). Najčešće izolovane vrste vaginalnih laktobacila su *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L.*

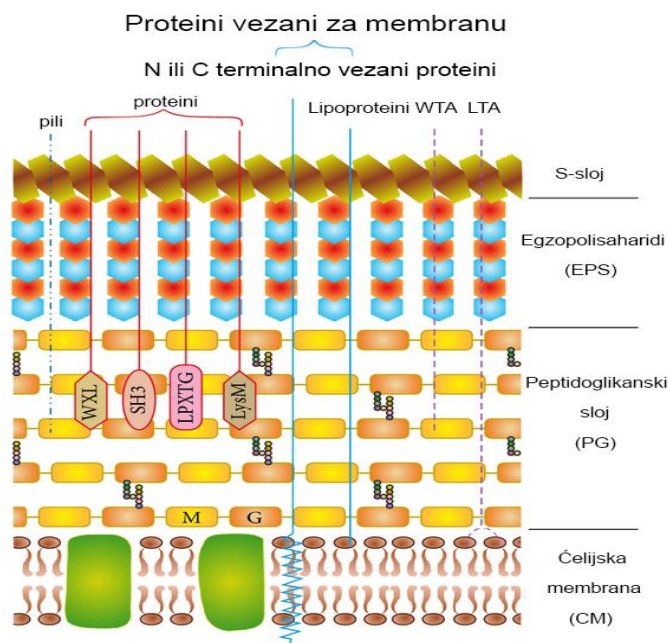
iners i *L. jensenii* (Burton i Reid, 2002; Vasquez *i sar.*, 2002; Burton *i sar.*, 2003; Anukam *i sar.*, 2006). Smatra se da zdrava i stabilna populacija vrsta roda *Lactobacillus* u ženskom urogenitalnom traktu doprinosi zaštiti od infekcija i pojave bakterijske vaginoze (Falagas *i sar.*, 2007).

Laktobacili nisu patogeni ili im je patogenost ograničena na ljude koji već pate od neke bolesti. Infekcije izazvane laktobacilima su veoma retke; procena je da je to 0,05-0,45% svih slučajeva endokarditisa i bakteremija. Međutim, do sada nisu nađeni specifični faktori patogenosti kod sojeva izolovanih iz obolelih pacijenata (Hammes i Hertel, 2009).

1.3. Ćelijski zid laktobacila

Površinske karakteristike laktobacila i struktura njihovog ćelijskog zida (Slika 3) su od presudnog značaja za uspešnu kolonizaciju gastrointestinalnog trakta laktobacilima. Iako su specifični biohemijski i genetički podaci o osobinama ćelijskog zida laktobacila i njegove biosinteze još uvek fragmentarni i nedovoljno objašnjeni, generalno se može reći da je on, kao i kod ostalih Gram pozitivnih bakterija, sastavljen od debelog, višeslojnog peptidoglikanskog sloja sa tejhajnim kiselinama, asociranim proteinima i egzopolisaharidima. Kod nekih vrsta on je okružen i S-sloj proteinima (Lebeer *i sar.*, 2008).

Sloj peptidoglikana ima važnu ulogu u stuktornom integritetu i zaštiti ćelije od lize. Ćelijski peptidoglikani su kovalentno i nekovalentno vezani za tejhajnu kiselinu, polisaharide i proteine (Delcour *i sar.*, 1999). Tejhajna kiselina je anjonski polimer ćelijskog zida i sastoji se od ponavljajućih jedinica poliglicerol fosfata ili poliribitol fosfata. U zavisnosti od mesta vezivanja, razlikujemo dva tipa tejhajne kiseline: (i) tejhajnu kiselinu ćelijskog zida, označenu kao WTA (Wall Teicholic Acid), koja je kovalentno vezana za peptidoglikan, i (ii) tejhajnu kiselinu citoplazmatične membrane, označenu kao LTA (Lipo Teicholic Acid), koja je kovalentno vezana za lipide citoplazmatične membrane (Neuhaus *i sar.*, 2003). Dok WTA poseduju svi laktobacili, LTA je prisutna samo kod nekih, a generalno možemo reći da su karakteristike molekula WTA i LTA specifične za soj (Perea Ve´lez *i sar.*, 2007a).



Slika 3. Čelijski zid laktobacila (preuzeto iz Lebeer *i sar.*, 2008)

Dok se neki od egzopolisaharida laktobacila ispuštaju u spoljašnju sredinu, drugi ostaju vezani za čelijski zid i njegov su integralni deo (Roberts, 1996; Sutherland, 1972). To su kompleksne strukture koje se ne razlikuju samo po šećernim monomerima koji ih izgrađuju, već i po vrsti veza koje među njima postoje, načinu grananja i supstitucijama, što sve doprinosi strukturnoj raznolikosti čelijskog zida laktobacila (De Vuyst i Degeest, 1999).

Naposletku, površinski proteini laktobacila mogu da se sekretuju u spoljašnju sredinu, ali mnogi od njih ostaju kovalentno ili nekovalentno vezani za čelijski zid ili citoplazmatičnu membranu, te mogu biti odgovorni za neke probiotske karakteristike. Za čelijski zid laktobacila se kovalentno vezuju sortaza-zavisni površinski proteini (Sortaza Dependent Proteins) koje obrađuje enzim sortaza. Sortaza ih specifično seče između treonina i glicina u molekulu proteina i kovalentno vezuje karboksilnu grupu treonina za amino grupu prekursora peptidoglikana. Na ovaj način, sortaza-zavisni proteini ostaju kovalentno vezani za peptidoglikan čelijskog zida (Marraffini *i sar.*, 2006). Smatra se da sortaza-zavisni proteini imaju ključnu ulogu u interakcijama laktobacila sa domaćinima

(Boekhorst *i sar.*, 2005). Značajno je i prisustvo lipoproteina koji se specifičnom N-terminalnom sekvencom kovalentno vezuju za lipide citoplazmatske membrane. Osnovna funkcija im je transportna, pošto prihvataju specifične supstrate, kao što su ugljeni hidrati i prosleđuju ih do transportnih sistema u citoplazmatskoj membrani (Sengupta *i sar.*, 2013). Nevalentno vezivanje proteina ostvaruje se preko N-ili C-terminalnih delova proteina koji u svom sastavu imaju hidrofobne aminokiseline (praćene pozitivno naelektrisanim ostacima) i zahvaljujući njima ostvaruju interakciju sa lipidima citoplazmatske membrane. Pored njih, postoje i oni koji su za površinu ćelije vezani protein-protein interakcijama, kao i oni koji su sekretovani u spoljašnju sredinu, a zatim elektrostatičkim interakcijama reasocirani za ćelijski zid (Avall-Jaaskelainen i Palva, 2005).

Uz sve gore pomenute proteine, pojedini sojevi laktobacila poseduju još i površinski S-sloj, sastavljen iz proteinskih subjedinića koje grade parakristalni heksagonalni ili tetragonalni monosloj. Proteinske subjediniće S-sloja su uglavnom mali bazni proteini (40-60 kDa) sa stabilnom tercijskom strukturom, koji su nevalentno vezani za tejsku kiselinu ili neutralne polisaharide ćelijskog zida i čine 10-15% od ukupnih površinskih proteina (Avall-Jaaskelainen i Palva, 2005).

U interakcijama bakterijskih i sisarskih ćelija značajna je uloga membranskih proteina lektina, koji poseduju dva ili više specifičnih domena za vezivanje za ugljene hidrate. Lektini generalno učestvuju u međućelijskim komunikacijama i opisani su kako kod bakterija, tako i kod drugih organizama. Bakterijski lektini poseduju hemaglutinaznu aktivnost, ali je njihova osnovna funkcija olakšavanje vezivanja bakterije za ćeliju domaćina, što je preduslov za kolonizaciju bakterija, važnu kako za uspostavljanje simbiotskog odnosa, tako i za nastajanje infekcije. Iz tog razloga, bakterijski lektini se često nazivaju adhezini, dok ugljene hidrate na površini ćelije domaćina nazivamo receptorskim molekulima (Lakhtin *i sar.*, 2007; Varki *i sar.*, 2009).

1.4. Definicija probiotika

Termin *probiotik* je prvobitno korišćen kao suprotnost terminu *antibiotik*. Reč je izvedena iz grčkih reči *pro* i *bios*, što bi u bukvalnom prevodu značilo "za život" (Hamilton-Miller *i sar.*, 2003). Ovaj termin Kollath (1953) je koristio da opiše ozdravljenje

pothranjenih pacijenata nakon korišćenja različitih organskih i neorganskih dodataka. Vergin (1954) je smatrao da se neravnoteža mikrobiote intestinuma izazvana antibioticima može ponovo uspostaviti ishranom bogatom probioticima, što mnogi autori označavaju kao prvu upotrebu termina *probiotik* u smislu u kom se on i danas koristi. U isto vreme Kolb (1955) je uočio štetne efekte antibiotika i predložio preventivno korišćenje probiotika. Kasnije, Lili i Stillvell (1965) definišu probiotike kao supstance koje produkuje jedna vrsta, a koje promovišu rast druge vrste mikroorganizma. Slično ovom pristupu, Sperti (1971) i Fujii i Cook (1973) opisuju probiotike kao jedinjenja koja ili stimulišu rast mikroorganizama ili povećaju rezistenciju domaćina prema infekciji, bez direktne inhibicije rasta patogena *in vitro*. Parker (1974) ih definiše kao organizme i supstance koje doprinose intestinalnom balansu. Međutim, ovu definiciju je osporio veliki broj autora, jer ovakva definicija može da podrazumeva čak i antibiotike. Kasnih 1980-ih i 1990-ih javlja se niz različitih definicija probiotika, od kojih je najčešće citirana Fulerova (1992), koji je probiotike definisao kao dodatke hrani koji sadrže žive mikroorganizme, a koji blagotvorno deluju na životinju domaćina, tako što unapređuju intestinalni balans. Manjkavost ove definicije se ogleda prevashodno u tome što se više odnosi na životinje, nego na ljude.

Različite definicije probiotika su davane sve do 2002. godine (Tabela 1), kada je radna grupa FAO/WHO, koja je radila na evaluaciji probiotika, dala definiciju koja se danas koristi. Kao što je već rečeno, probiotici su definisani kao živi mikroorganizmi koji doprinose zdravlju domaćina kada se unose u odgovarajućim količinama. U skladu sa ovom definicijom, veliki broj vrsta i rodova se može smatrati potencijalnim probioticima (Holzapfel *i sar.*, 1998), međutim komercijalno najvažniji su sojevi bakterija mlečne kiseline.

Tabela 1. Definicije probitika tokom istorije

Autor, godina	Definicija/Opis
Kollath, 1953	Probiotici se obično javljaju u hrani biljnog porekla kao vitamini, aromatične supstance, enzimi i eventualno prisutne druge supstance u vezi sa vitalnim procesima
Vergin, 1594	Probiotici su suprotnost antibioticima
Kolb, 1955	Štetni efekti antibiotika mogu biti sprečeni terapijom probioticima
Lilly i Stillwell, 1965	Supstanca izlučena od strane jednog mikroorganizma koja stimuliše rast drugog
Sperti, 1971	Ekstrakti tkiva koji stimulišu rast mikroorganizama
Fujii i Cook, 1973	Jedinjenja odgovorna za rezistenciju domaćina na infekcije, ali ne inhibiraju rast mikroorganizama <i>in vitro</i>
Parker, 1974	Organizmi i supstance koje doprinose intestinalnom mikrobijalnom balansu
Fuller, 1992	Živi mikroorganizmi, kao dodaci hrani, koji korisno utiču na životinju domaćina tako što unapređuju mikrobijalni balans
Havenaar i Huisint'Veld, 1992	Vijabilne mono- ili mešovite kulture mikroorganizama koje kod životinja i ljudi pokazuju korsne efekte poboljšanjem autohtone mikroflore
Salminen, 1996	Živa kultura mikroorganizma ili mlečni proizvod koji blagotvorno utiču na zdravlje i ishranu domaćina
Schaafsma, 1996	Živi mikroorganizmi koji nakon unosa određenog broja, pokazuju pozitivne zdravstvene efekte izvan osnovne ishrane
Salminen i sar., 1999	Preparati ćelija mikroorganizama ili njihovih komponenti, koje imaju blagotvorno dejstvo na zdravlje domaćina
Schrezenmeir i deVrese, 2001	Preparat ili proizvod koji sadrži žive definisane mikroorganizme u odgovarajućem broju koji utiče na mikrofloru određenog dela tela domaćina (implantacijom ili kolonizacijom) i ima blagotvorno dejstvo na zdravlje domaćina
FAO/WHO, 2002	Živi mikroorganizmi koji doprinose zdravlju domaćina kada se unesu u odgovarajućim količinama

1.5. Istorija istraživanja probiotika

Escherich je prvi, 1885. godine, prepoznao značaj ispitivanja bakterija prisutnih u fecesu i gastrointestinalnom traktu zdravih ljudi, a koja omogućavaju razumevanje fiziologije varenja, kao i patologiju i terapiju crevnih oboljenja izazvanih mikroorganizmima. Gotovo u isto vreme, 1900. godine, mikrobiolozi Tissier i Moro objavili su svoje nalaze ispitivanja izolata poreklom iz fecesa dojenih beba. Tissier je primetio prisustvo anaerobnog organizma po morfologiji i bojenju po Gramu sličnog laktobacilima, ali je uočio i da se njegove ćelije granaju. U skladu sa tom osobinom, nazvao ih je *Bacillus bifidus*. Moro 1905. godine izoluje novu vrstu koja potiče iz dojki majke, a nalazi se i u usnoj duplji i crevnom sadržaju novorođenčeta. Naziva je *Bacillus acidophilus* zbog izrazite tolerancije na kiselu sredinu. 1908. godine Tissier je utvrdio da je *Bacillus bifidus* dominantna vrsta u fecesu dojenih beba starosti oko tri dana nakon porođaja, dok je kod beba hranjenih veštačkim mlekom dominantna vrsta *Bacillus acidophilus* (Vasiljevic i Shah, 2008).

Gotovo istovremeno, dobitnik Nobelove nagrade Mečnikov je primetio izuzetnu dugovečnost Bugarskih seljaka, koja je bila značajno iznad proseka karakterističnog za početak XX veka. Oni su imali prosečan životni vek od 87 godina, a retki pojedinci (u proseku 1/250 ljudi) su bili stogodišnjaci ili stariji. Jedna od glavnih specifičnosti njihovog načina života bila je visoka zastupljenost fermentisanog mleka u ishrani. U svojoj poznatoj teoriji auto-intoksikacije, Mečnikov je izneo stav da toksini koje proizvode patogeni polako truju ljudski organizam, čime otpor tela kontinuirano slabi (Metchnikoff, 2004). On je još smatrao da se auto-intoksikacija može sprečiti korišćenjem kiselog mleka u ishrani, odnosno unošenjem bakterija mlečne kiseline. Njegov rad je zasnovan na organizmu koga je 1905. godine izolovao Grigorov i nazvao *Lactobacillus bulgaricus*. Ova vrsta je korišćena kao starter kultura za proizvodnju bugarskog kiselog mleka (*yahourth*). Mečnikov je na osnovu svojih eksperimenata došao do zaključka da je *L. bulgaricus* sposoban da uspešno kolonizuje crevni trakt i čak smanji broj prisutnih štetnih bakterija. Međutim, Herter i Kendall (1908) su pokazali da *L. bulgaricus* ipak nije u stanju da uspešno kolonizuje intestinalni trakt, ali jesu uočili određene značajne promene u intestinalnoj mikrobioti. Iako je ovime Mečnikovljeva teorija osporena, brojni naučnici su

nastavili da istražuju potencijalne dobrobiti koje bi bakterije mlečne kiseline mogle imati na ljudsko zdravlje. Tako su nešto kasnije izolovani sojevi vrste *Lactobacillus acidophilus* sposobni da kolonizuju digestivni trakt.

U svojim radovima Rettger i Horton (1914) i Rettger i Cheplin (1920) su dokazali da ishrana bogata mlekom ili laktozom kod životinja i ljudi može da dovede do transformacije crevne mikrobiote, u smislu povećanja brojnosti korisnih mikroorganizama. Ovi rezultati su probudili privredni interes za proizvode nastale fermentacijom pomoću *L. acidophilus* (Burke, 1938). Grupa istraživača u Japanu okupljenih oko Minoru Shirota prepoznali su značaj preventivne medicine i modulacije gastrointestinalne mikrobiote. Godine 1930. oni su izolovali soj sposoban da preživi prolaz kroz gastrointestinalni trakt i nazvali ga *Lactobacillus casei*. Ovaj soj je Shirota iskoristio za proizvodnju fermentisanog mlečnog proizvoda pod imenom "*Yakult*", a koji je 1935. godine inicirao osnivanje istoimene kompanije. U periodu od kasnih 30-tih do 50-tih godina prošlog veka istraživanja u ovoj oblasti su usporena zbog vanrednih uslova (depresija, rat) sa kojima se čitav svet suočavao u to vreme. Međutim, tokom 1950-ih i 60-ih dolazi do ponovnog interesovanja i intenzivnih istraživanja, koja i dovode do uvođenja koncepta probiotika.

1.6. Spektr delovanja probiotika na organizam domaćina

Probiotici ispoljavaju svoje pozitivne efekte na više različitih načina. Opšti mehanizam njihovog dejstva u gastrointestinalnom traktu se može opisati kao mikrobijalna interferencija, odnosno sposobnost probiotskog mikroorganizma da svojim prisustvom smanji i/ili ograniči prisustvo, odnosno štetno delovanje enteropatogenih mikroorganizama (Alvarez-Olmos *i sar.*, 2001; Bansal i Garg, 2008), što se može ostvariti direktno, ili kroz interakciju sa normalnom mikrobiotom. Naime, probiotici i enteropatogeni se bore za ista mesta vezivanja za epitel, kao i za nutrijente. Ukoliko je probiotski mikroorganizam prisutan u telu domaćina, fizičko blokiranje receptora ili steričke prepreke mogu mu pružiti kompetitivnu prednost u odnosu na patogene mikroorganizme. Postoje brojni *in vitro* dokazi da pojedini probiotski sojevi inhibiraju rast i adheziju mnogih enteropatogena (Bernet Camard *i sar.*, 1997; Coconnier *i sar.*, 1997;

Hudault *i sar.*, 1997; Gopal *i sar.*, 2001), a zahvaljujući tome smanjuju dužinu trajanja infekcije i rizik od nastanka dijareje.

Probiotici utiču na brojnost pojedinih vrsta mikrobiote i dovode do normalizacije broja mikroorganizama iz rodova *Bifidobacterium*, *Bacteroides* i *Clostridium* (Bansal i Garg, 2008). Regulacija sastava mikrobiote u velikoj meri se ostvaruje zahvaljujući proizvodnji inhibitornih supstanci, poput bakteriocina, mlečne kiseline, vodonik peroksida i dr., koje inhibiraju ili ubijaju alohtone vrste mikroorganizama. Dodatno, vodonik peroksid u kombinaciji sa laktoperoksidaza-tiocijanatom iz mleka postaje baktericidan za enteropatogene, zbog čega je opravdano tradicionalno korišćenje probiotika prisutnih u fermentisanim mlečnim proizvodima (Mijačević *i sar.*, 1989; Kaur *i sar.*, 2002).

Osim što regulišu brojnost i sastav mikrobite, probiotici mogu i direktno ublažavati različite patološke promene u intestinumu. Tako na primer *L. rhamnosus* i njemu slični sojevi mogu da stimulišu intestinalnu peristaltiku oslobađanjem kiselina (Bansal i Garg, 2008), što je važno u prevenciji konstipacije. Zahvaljujući probiotskim bakterijama koje proizvode β -galaktozidazu, ukupna aktivnost ovog enzima u gastrointestinalnom traktu je povećana, što podstiče razgradnju laktoze (Krack *i sar.*, 2005). Zahvaljujući svim pomenutim svojstvima, probiotici se mogu koristiti u tretmanu većeg broja gastrointestinalnih poremećaja. U slučaju infektivnog gastroenteritisa i dijareje, uključujući i onu izazvanu rotavirusima, efikasnost u tretmanu pokazuju probiotski sojevi *L. rhamnosus* GG, *L. casei* i *L. reuteri* (Alvarez-Olmos i Oberhelman, 2001; Senok *i sar.*, 2005; Bansal i Garg, 2008), kao i *Saccharomyces boulardii* (Guarino *i sar.*, 2008).

Smatra se da sindrom nervoznih creva nastaje kao posledica preteranog bakterijskog rasta u tankom crevu i povećane proizvodnje gasa (Wilhelm *i sar.*, 2008; Williams, 2010), a narušena crevna mikrobiota može biti izazivač ili dodatno pogoršavati kliničku sliku (Shanahan, 2000). Vrste *L. acidophilus*, *L. salvarius* UCC118 i *L. rhamnosus* GG regulišu brojnost bakterija intestinalne mikrobiote i na taj način indirektno imaju pozitivan efekat u tretmanu ove bolesti (Bansal i Garg, 2008; Williams, 2010).

Zapaljenske bolesti creva (*Inflammatory Bowel Diseases*) obuhvataju ulcerozni kolitis, Kronovu bolest i poučitis. Studije koje su se bavile remisijom Kronove bolesti su pokazale da je stopa relapsa bila značajno manja kod pacijenata koji su uz standardnu

terapiju unosili i probiotsku vrstu *S. boulardii* (Guslandi *i sar.*, 2000). Pored toga, nekoliko studija ukazuje na pozitivan uticaj probiotika na remisiju ulceroznog kolitisa (Rembacken, 1999; Williams, 2010). Laktobacili imaju i inhibitorni efekat na adheziju *Helicobacter pylori* potencijalnog izazivača gastritisa, čira na želucu, pa čak i kancera (Bansal i Garg, 2008). Osim toga, oni smanjuju i aktivnost ureaze, koja je neophodna za opstanak *H. pylori* u kiseloj sredini (Midolo *i sar.*, 1995; Kabir *i sar.*, 1997; Aiba *i sar.*, 1998; Coconnier *i sar.*, 1998).

Doprinosеći normalizaciji mikrobiote probiotici se često koriste i za tretman tegoba izazvanih antibiotskom terapijom (FAO/WHO, 2002). Jedan od osnovnih problema u vezi sa korišćenjem antibiotika je pojava dijareje izazvane povećanom brojnošću vrsta poput *Clostridium difficile* i/ili *Klebsiella oxytoca* i produkcije toksina. Primena probiotika dovodi do promene konzistencije stolice i smanjenja trajanja dijareje, a najveću efikasnost pokazuju vrste *L. rhamnosus* GG, *L. acidophilus* i *L. bulgaricus* (Bansal i Garg, 2008).

Osim što deluju u samom gastrointestinalnom traktu, laktobacili mogu da deluju i na fiziologiju različitih organskih sistema. Spektar potencijalno reverzibilnih neuropsihijatrijskih abnormalnosti kod pacijenata sa nefunkcionalnom jetrom, poznat kao hepatična encefalopatija, obuhvata promene ličnosti, narušavanje intelektualnih sposobnosti, a prate ih i poremećen nivo elektrolita, infekcije i gastrointestinalno krvarenje (Riggio *i sar.*, 2005). Pozitivno dejstvo u tretmanu ovog poremećaja uočeno je kod primene probiotske vrste *L. acidophilus* (Ziada *i sar.*, 2013).

Laktobacili i proizvodi njihovog metabolizma mogu imati pozitivan uticaj i na kardiovaskularni sistem (Sonestedt *i sar.*, 2011). Tako oni povećaju nivo intracelularnog kalcijuma u kardiomiocitima, čime se povećava kontraktilnost miokarda (Sobol *i sar.*, 2013). Nekoliko studija su pokazale pozitivne efekte probiotika na metabolizam kalcijuma. Mehanizmi odgovorni za to su povećana rastvorljivost minerala zbog proizvodnje masnih kiselina kratkih lanaca, povećana ekspresija kalcijum-vezujućih proteina, oslobađanje koštanih modulišućih faktora, uvećanje apsorptivne površine i degradacija mineralnih kompleksa ftalne kiseline (Bansal i Garg, 2008).

Hipertenzija se javlja kao posledica konverzije angiotenzina-I u potentni vazokonstriktor angiotenzin-II (Nakamura *i sar.*, 1995; Seppo *i sar.*, 2003; Liang *i sar.*,

2007). Laktobacili proizvode biološki aktivne peptide koji inhibiraju rad enzima koji konvertuje angiotenzin-I i imaju preventivnu i terapijsku ulogu u lečenju različitih ishemijskih bolesti srca (Oxman *i sar.*, 2001). Mnogobrojna *in vitro* i *in vivo* istraživanja su pokazala da dekonjugaciona i hidrosilazna aktivnost probiotskih sojeva prema konjugovanim žučnim solima uzrokuje snižavanje koncentracije holesterola, jer se on taloži zajedno sa konjugovanim žučnim solima (Šušković *i sar.*, 2000). *L. johnsonii* i *L. reuteri* su neki od probiotika za koje je utvrđeno da imaju sposobnost da smanjuju nivo serumskog holesterola (De Roos i Katan, 2000).

Kroz različite studije je uočeno da probiotici mogu da spreče ili odlože razvoj kancera. Ovu osobinu duguju svojoj sposobnosti inhibicije rasta nekih od učesnika intestinalne mikrobiote koji proizvode enzime uključene u promociju kancera, poput β -glukuronidaze, nitroreduktaze, azoreduktaze i steroid-7 α -dehidrosilaze (Vasiljevic i Shah, 2008). Osim toga, proizvodnjom masnih kiselina kratkog lanca i smanjenjem pH laktobacili ometaju aktivnost enzima uključenih u proces kancerogeneze. Takođe, butirrat je uključen u detoksikaciju elektrofilnih jedinjenja povećanjem ekspresije glutation transferaze (Bansal i Garg, 2008). Osim toga, različite vrste laktobacila, poput *L. casei*, imaju sposobnost vezivanja mutagena/kancerogena, što za posledicu ima supresiju kancera (Mombelli i Gismondo, 2000; de Roos i Katan, 2000). Postoje podaci da konzumiranje probiotika može imati preventivnu ulogu u nastanku kancera debelog creva (Rafter, 2004), a mehanizmi mogu uključiti smanjenje broja patogenih mikroorganizama, fermentaciju nesvarene hrane, inaktivaciju kancerogenih jedinjenja, poboljšanje imunskog odgovora domaćina, anti-proliferativne efekte povezane sa regulacijom apoptoze i diferencijacije ćelija i inhibiciju signalnih puteva tirozin kinaze (Uccello *i sar.*, 2012).

Probiotici pokazuju različite imunomodulatorne i anti-inflamatorne osobine kroz regulaciju imunskog odgovora, kako lokalnog, tako i sistemskog (Bansal i Garg, 2008; Sanders *i sar.*, 2013). Njihova značajna imunomodulatorna uloga se može razumeti ako se debelo crevo posmatra kao imunološki aktivan organ koji je konstantno izložen delovanju činioca mikrobiote uključujući i laktobacile, što nespecifično pokreće imunski odgovor. Upravo zahvaljujući direktnom kontaktu sa mikrobiotom u intestinumu, probiotici utiču na razvoj intestinalnog limfoidnog tkiva, koje je najveće u ljudskom organizmu. U njemu se

nalaze T i B ćelije, kao i dendritske, koje predstavljaju heterogenu grupu multifunkcionalnih antigen-prezentujućih ćelija. Postoje brojni dokazi u literaturi da laktobacili značajno utiču na aktivnost dendritskih ćelija i na održavanje balansa između subtipova T helper ćelija Th1 i Th2. Dok Th1 ćelije proizvode interferon- γ i faktor nekroze tumora- β uključene u ćelijski odgovor, Th2 ćelije su odgovorne za produkciju nekoliko tipova interleukina uključenih u humoralni imunski odgovor. Finom regulacijom balansa između Th1 i Th2 ćelija, laktobacili utiču i na humoralni i na ćelijski imunski odgovor (Gill, 1998; Salminen *i sar.*, 2000; Kalina i Mohamadzadeh, 2009). Značaj imunomodulatornih svojstava probiotika je posebno istaknut činjenicom da oni efikasno deluju ne samo na imunokompetentne, već i na imunokompromitovane osobe.

Iako mehanizmi kojima laktobacili moduliraju imunski odgovor nisu u potpunosti razjašnjeni, evidentno je da njihov efekat zavisi od vrste, pa čak i soja probiotskih bakterija, njihove vijabilnosti, količine i načina unosa, kao i od zdravstvenog stanja domaćina (Donnet-Hughes *i sar.*, 1999; Gill i Rutherford, 2001; Karlsson *i sar.*, 2002; Ibnou-Zekri *i sar.*, 2003). Tako je klinička studija pokazala da *L. plantarum* 299v poboljšava razvoj dece rođene sa HIV-om (Cunningham-Rundles *i sar.*, 2000). Takođe je pokazano da u slučaju infekcije rotavirusima, koji izazivaju akutnu dijareju kod dece, *L. rhamnosus* povećava broj ćelija koje luče odgovarajuća antitela specifična za rotavirus (Bansal i Garg, 2008).

Zahvaljujući svojim imunomodulatornim svojstvima, probiotici pokazuju pozitivan uticaj i u slučaju alergija, kada dovode do supresije inflamatornog odgovora (Pelto *i sar.*, 1998; Isolauri *i sar.*, 2001). Različite studije su pokazale vezu između pojave alergija i sastava intestinalne mikrobiote (Kirjavainen i Gibson, 1999; He *i sar.*, 2001; Kirjavainen *i sar.*, 2001; Ouwehand *i sar.*, 2002; Kalliomaki i Isolauri, 2003; Watanabe *i sar.*, 2005; Penders *i sar.*, 2006). Ovo se može zaključiti i iz rezultata istraživanja koje pokazuje da davanje laktobacila prenatalno, odnosno trudnicama koje imaju predispoziciju za atopijski ekcem, alergijski rinitis ili astmu, i postnatalno, bebama do 6 meseci starosti, dovodi do značajnog pada u učestalosti ovih bolesti i kod trudnica i kod beba (Kalliomaki *i sar.*, 2001). Međutim, kako tačan mehanizam anti-alergijskog delovanja još uvek nije poznat, kao ni to da li su probiotici efikasni u tretmanu svih vrsta alergija ili samo pojedinih,

postoje ograničenja u korišćenju probiotika u tretiranju alergija. Nejasno je i pitanje njihove efikasnosti u različitim fazama života (Bansal i Garg, 2008). Ono oko čega se većina slaže je da je uticaj skroman i da zavisi od ciljne grupe (Michail, 2009). Uz to, postoje mišljenja da mnogi efekti probiotika zavise od epigenetske modulacije genske ekspresije, koja bi mogla biti važna tokom kritičnih perioda ranog razvoja dece (Canani *i sar.*, 2012).

Reumatoidni artritis je hronična autoimuna bolest koja dovodi do jakih bolova u zglobovima (Tripathi *i sar.*, 2004) i pratećih oštećenja hrskavice i kostiju (Tak i Bresnihan, 2000). Na osnovu imunomodulatornih svojstva, smatra se da bi *L. casei* mogao imati antiarteroidni efekat. Međutim, efikasnost zavisi od faktora kao što su starost, hormonski status i kapacitet apsorpcije kalcijuma (Bansal i Garg, 2008).

Neka istraživanja čak ukazuju da bakterije iz gastrointestinalnog trakta mogu komunicirati sa centralnim nervnim sistemom (Logan i Katzman, 2005). S obzirom na ove pojave, očekivano je da uspostavljanje normalne intestinalne mikrobiote primenom probiotskih preparata može ublažiti simptome nekih mentalnih poremećaja, uključujući veliki depresivni poremećaj (Canli, 2014).

Postoje podaci da bi se u slučaju urogenitalnih infekcija i bolesti bubrega probiotici mogli koristiti kao alternativna terapija u odnosu na antibiotike. Na primer, antibiotska terapija urogenitalnih infekcija može kao nuspojavu imati i antibakterijski efekat prema anaerobnoj bakteriji mikrobiote *Oxalobacter formigenes*, odgovornoj za degradaciju oksalata kod ljudi. Kako je povišena koncentracija oksalata u urinarnom traktu povezana sa nastankom kamena u bubregu, alternativna terapija probioticima može zaštititi populaciju *O. formigenes* i time smanjiti rizik od nastanka kamena u bubregu (Bansal i Garg, 2008). Takođe je pokazano da oralna i vaginalna terapija probioticima ima pozitivne efekte na asimptomsku (Reid i Bruce, 2001) i simptomatsku bakterijsku vaginozu (Hilton *i sar.*, 1995; Sieber i Dietz, 1998). Izvedeno je nekoliko studija koje su pokazale da je moguće da laktobacili, koji su rezistentni na kisele uslove sredine i žučne soli, kolonizuju vaginu nakon oralnog uzimanja (Hilton *i sar.*, 1995).

1.7. Primena probiotskih preparata

Savremena populacija je zbog izmenjenog načina života sve izloženija promenama sastava intestinalne mikrobiote. Na ove promene utiče kako korišćenje antibiotika, koji smanjuju diverzitet mikrobiote gastrointestinalnog trakta i mogu imati dugotrajni, pa čak i stalni uticaj na njen sastav, tako i promene u navikama ishrane, koje podrazumevaju sve veće učešće industrijski obrađene hrane (Jernberg *i sar.*, 2007; Dethlefsen *i sar.*, 2008; Jakobsson *i sar.*, 2010). Promene u sastavu mikrobiote se dovode u vezu sa nizom zdravstvenih problema, ali je i dalje otvoreno pitanje da li je to primarna ili sekundarna pojava (Neish *i sar.*, 2009; Sekirov *i sar.*, 2010). Sve učestalije abnormalnosti u imunskom odgovoru čoveka, često čak i na bezazlene antigene, dovode se u vezu sa nedostatkom izlaganja mikroorganizmima u ranom životnom dobu, o čemu govori higijenska hipoteza (Strachan, 1989; Wills-Karp *i sar.*, 2001; Umetsu *i sar.*, 2002). Primećene značajne razlike u ishrani ljudi u industrijski razvijenim zemljama i zemljama u razvoju dovele su do postavljanja nove hipoteze, hipoteze o mikrobioti (Kirjavainen i Gibson, 1999; Noverr i Huffnagle, 2005). Ona izražava stav da su promene gastrointestinalne mikrobiote poremetile normalno funkcionisanje nekih od mehanizama imunološke tolerancije, što rezultira nizom poremećaja, kao što su pojava nerazvijene mikrobiote, nezrelog imunskog odgovora i povećanja alergijskih reakcija.

S obzirom na značaj mikrobiote gastrointestinalnog trakta za održavanje homeostaze kompletnog organizma, kao i na činjenicu da se njen kvalitativni i kvantitativni sastav savremenim načinom života stalno narušava, veoma je važno unošenje probiotskih bakterija. Kako konzumacija funkcionalne hrane često nije dovoljna, sve izraženija je potreba za korišćenjem specifičnih farmaceutskih probiotskih preparata, kako bi se narušena homeostaza obnovila ili uspostavljena održavala.

Na tržištu je sve veći broj probiotskih preparata koji sadrže kako prirodne izolate, tako i rekombinovane, odnosno genetički modifikovane probiotike. Genetički modifikovani probiotici ciljaju na tačno određena mesta delovanja ili proizvode željene proteine u gastrointestinalnom traktu. Tako, na primer, acidorezistentni probiotici mogu da posluže kao vektor za isporučivanje proizvoda u tanko crevo. Genetički modifikovane laktokoške koje proizvode lipaze (ubacivanjem gena za lipazu iz *Staphylococcus hyicus*),

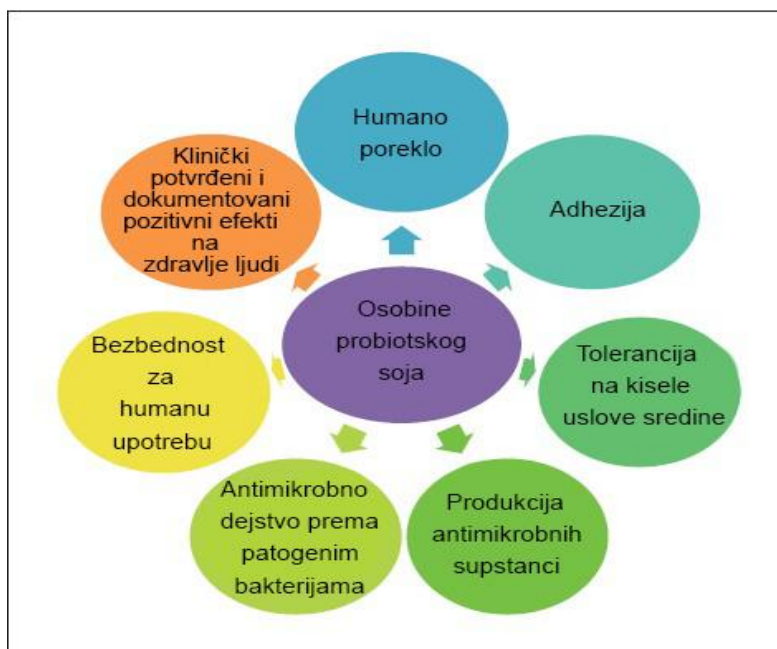
otporne su na dejstvo žučnih soli i koriste se za obezbeđivanje dovoljnih količina lipaza kako bi se olakšalo varenje lipida. Sličan pristup se može koristiti za laktozu u slučajevima intolerancije, kao i enzima razgradnje oksalata (poreklom iz *Oxalobacter formigenes*) u prevenciji bolesti bubrega (Ahmed, 2003; Bansal i Garg, 2008). Primer još jednog rekombinantnog probiotika je i Subalin koji sadrži transformisani *B. subtilis* 2335 sa ubačenim genom za sintezu humanog interferona α -2, a koji ima antibakterijsko i antivirusno dejstvo (Kaur *i sar.*, 2002).

U cilju poboljšanja efikasnosti kolonizacije i bolje aktivnosti, probiotici se često kombinuju sa supstancama označenim kao prebiotici. Prebiotici su definisani kao "nesvarljivi sastojci hrane koji blagotvorno utiču na domaćina tako što selektivno stimulišu rast i/ili aktivnost jednog ili ograničenog broja bakterija u gastrointestinalnom traktu" (Schrezenmeir *i sar.*, 2001), uključujući i probiotske bakterije. Najnoviji koncept uključuje korišćenje anti-adhezivnih ugljenih hidrata, koji bi sprečili adheziju i vezivanje patogena. Prebiotici, a posebno inulin, mogu da utiču na smanjenje učestalosti tumora debelog creva. U modernoj industriji najčešće korišćeni prebiotici su inulin, oligofruktoza, riboza, tagatoza, pektin i drugi (Schrezenmeir *i sar.*, 2001).

Termin sinbiotik se odnosi na proizvod koji sadrži mešavinu probiotika i prebiotika. U principu, prefiks *sin* podrazumeva sinergizam između probiotika i prebiotika. Sinbiotici pospešuju preživljavanje probiotika u gastrointestinalnom traktu i na taj način doprinose ispoljavanju probiotskog efekta. Probiotici i prebiotici mogu da se nađu u funkcionalnim namirnicama, koje obuhvataju fermentisane i nefermentisane mlečne proizvode. Pojam funkcionalnih namirnica odnosi se na one namirnice koje dopunjuju normalnu ishranu i predstavljaju koncentrovane izvore vitamina, minerala ili drugih supstanci sa hranljivim ili fiziološkim efektom, pojedinačno ili u kombinaciji. Međutim, probiotici i prebiotici se koriste i kao suplementi ishrani, koje Pravilnik o zdravstvenoj ispravnosti dijetetskih proizvoda (Sl. glasnik RS br. 45/10, 2010) definiše kao dodatke ishrani, koji su u prometu dizajnirani da se uzimaju u doziranim oblicima, odnosno u odmerenim pojedinačnim količinama (kapsule, tablete, ampule, kesice praška, bočice za doziranje u kapima i dr.).

1.8. Karakteristike probiotskih bakterija

Bakterije mlečne kiseline, uključujući i laktobacile, nemaju štetan uticaj na zdravlje ljudi, što im obezbeđuje GRAS (Generally Regarded As Safe) status prema US FDA legislativi (FAO/WHO, 2002). Međutim, iako su generalno prepoznati kao neškodljivi, ne mogu se svi laktobacili koristiti kao probiotici. Poželjno je da sojevi laktobacila koji bi se koristili kao probiotici budu humanog porekla, mada prema važećoj zakonskoj legislativi ovo nije formalan zahtev. Uz to, neophodno je da poseduju niz probiotskih svojstava i zadovolje nekoliko kriterijuma koji su jasno definisani u dokumentima FAO/WHO (2002, Slika 4). Pre svega, naziv probiotskog soja bi trebalo da bude u skladu sa Međunarodnim kodeksom nomenklature (International Code of Nomenclature), kako bi se osiguralo razumevanje na internacionalnom nivou, kao i da se sami sojevi deponuju u međunarodno priznatim kolekcijama kultura. Takođe, neophodno je da identifikacija bude tačna, što ponekad nije slučaj. Tako se u nekim probiotskim jogurtima umesto deklarisanе vrste *L. acidophilus* nalaze vrste *L. johnsonii* ili *L. gasseri*; umesto *L. casei* bakterija *L. paracasei*, a vrsta označena kao *Bifidobacterium longum* često je u stvari *B. animalis* (Šušćković i sar., 2009). Upravo zato i stoji preporuka FAO/WHO da se sojevi najpre identifikuju fenotipskim metodama, a nakon toga i genotipski (DNA/DNA hibridizacija, sekvenciranje 16S rRNK gena ili drugim međunarodno priznatim metodama). Obzirom na to da su probiotske osobine specifične za soj, preporučuje se i identifikacija metodama poput gel elektroforeze u pulsnom polju (Pulse Field Gel Electrophoresis, PFGE) (FAO/WHO, 2002).



Slika 4. Karakteristike probiotskih sojeva

Probiotski soj treba da ima mogućnost preživljavanja u gastrointestinalnom traktu, ali i da zadrži sposobnost razmnožavanja na mestu svog delovanja. To znači da soj mora biti tolerantan na želudačni sok i na prisustvo žučnih soli u uslovima intestinuma, ili da se u organizam unosi zajedno sa nosačem koji će mu to obezbediti.

Osim ovih osobina koje FAO/WHO smatra osnovnim, poželjno je da probiotski sojevi poseduju i neke druge osobine, poput sposobnosti adhezije na epitelijalne površine intestinuma i sposobnosti modulacije intestinalne mikrobiote, uključujući i antagonističko dejstvo prema patogenim mikroorganizmima, kao što su *Helicobacter pylori*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Clostridium difficile* i drugi. Probiotici moraju da budu nepatogeni i netoksični i ne smeju da nose genetički prenosivu rezistenciju na antibiotike (Mattila-Sandholm *i sar.*, 2002).

Antimikrobno delovanje, posebno prema patogenim mikroorganizmima, važno je funkcionalno svojstvo probiotskih bakterija koje im osigurava kompetitivnu prednost za mesta vezanja i hranjive supstance u gastrointestinalnom traktu. Utvrđivanje antagonističkog delovanja potencijalnih probiotskih sojeva prema mikroorganizmima izvodi se različitim *in vitro* metodama na čvrstim i tečnim hranljivim podlogama, kao i *in*

vivo na eksperimentalnim životinjama (Šušković, 1996; Kos, 2001; Frece, 2003).

Važno funkcionalno svojstvo probiotskih sojeva je adhezija na komponente mukusa ili ekstracelularni matriks crevnog epitela, koja je neophodna za njihovu integraciju u mikrobiotu gastrointestinalnog trakta, a time i ispoljavanje ostalih probiotskih svojstava, kao što su ekskluzija patogena i pozitivne interakcije sa ćelijama domaćina (Servin, 2004; Lebeer *i sar.*, 2008). Bakterijska adhezija započinje nespecifičnim fizičko-hemijskim interakcijama između bakterija i ćelija crevnog epitela, što omogućava specifične interakcije adhezina s površine bakterijske ćelije i komplementarnih receptora na epitelnim ćelijama intestinalnog trakta. Pojam adhezina obuhvata različite površinske strukture laktobacila, koje se mogu klasifikovati na više načina, najčešće prema ciljevima za koje se vezuju, načinu vezivanja i lokalizaciji na površini bakterija. Generalno možemo reći da osobine površine ćelijskog zida laktobacila doprinose njihovoj adhezivnosti. Adhezivnost probiotskih sojeva se uglavnom ispituje *in vitro*, na imobilisanom intestinalnom mukusu ili na nekim ekstracelularnim molekulima (kolagen, fibronektin), ali i na humanim epitelijalnim intestinalnim ćelijskim linijama poput Caco-2 i HT-29 (Perea Velez *i sar.*, 2007b).

Rezultate procene adhezivne sposobnosti dobijene *in vitro* je teško ekstrapolirati na *in vivo* situaciju u gastrointestinalnom traktu zbog postojanja odbrambenog sistema domaćina, kompeticije sa već postojećim konstituentima mikrobiote za prostor i nutrijente, kao i konstantnog ispiranja epitela creva koje nastaje zbog peristaltičkih pokreta (Servin, 2004). Sposobnost novounetih laktobacila da samo privremeno kolonizuju gastrointestinalni trakt se dovodi u vezu sa principom kolonizacionog otpora, koja je ostvarena kroz zauzimanje postojećih ekoloških niša gastrointestinalnog trakta dobro adaptiranim vrstama, tzv. ekskluzijom niša (Walter, 2005). Naime, mikrobiota gastrointestinalnog trakta zdravih ljudi je stabilna i pokazuje otpor prema kolonizaciji novim vrstama. Tako su Tannock *i sar.* (2000) pokazali da je uspešnost kolonizacije intestinumom sojem *L. rhamnosus* DR20 kod zdravih ljudi obrnuto srazmerna prisutnosti stabilne, autohtone populacije laktobacila. Drugi autori su objavili da je, suprotno odraslim ljudima, trajnu kolonizaciju probiotskim sojem *L. rhamnosus* GG moguće postići kod novorođenčadi, čija se mikrobiota tek razvija (Schultz *i sar.*, 2004).

Iako su neka od pitanja u pogledu sigurnosnih aspekata upotrebe probiotika još uvek otvorena, njihova efikasnost i bezbednost je nesumnjivo pokazana u nekoliko kliničkih studija, o čemu će kasnije biti reči (Filho-Lima *i sar.*, 2000). Kada govorimo o bezbednosnom aspektu upotrebe probiotika, važno je spomenuti da postoje i pojedini negativni izveštaji, ali se oni uglavnom odnose na imunokompromitovane osobe. Naime, u njima je pojava bakteriemije, dentalnog karijesa i endokarditisa potencijalno povezana sa upotrebom probiotika, ali ni jedan izveštaj ne identifikuje decidno laktobacile kao izazivače ovih bolesti (Ishibashi i Yamazaki, 2001; Salminen *i sar.*, 2002; Zé-Zé *i sar.*, 2004; Matsumoto *i sar.*, 2005; Koretz, 2009). S obzirom na to, negativni izveštaji o upotrebi probiotika ne bi trebalo da obeshrabre istraživače i potencijalne proizvođače, već je preporuka da se oni iskoriste kao osnova i podstrek za još bolje razumevanje i dalje proučavanje (Giraffa *i sar.*, 2012). Ono što i dalje stoji kao činjenica je to da je neophodno precizno dokumentovati procedure koje se tiču razvoja farmaceutskih probiotskih formulacija u smislu načina proizvodnje, obezbeđenja i kontrole kvaliteta, evaluacije bezbednosti, toksikologije, regulatornih zahteva za registraciju i marketing, itd.

Kada je u pitanju narušena intestinalna mikrobiota, proizvođač probiotika bi trebalo da jasno navede način i dužinu primene probiotskog preparata kako bi se njegovom upotrebom narušeni balans ponovo uspostavio. Definisane načina i dužine primene probiotika bi trebalo da bude rezultat naučnog istraživanja koje je potvrđeno i odobreno u zemlji u kojoj se preparat prodaje. FAO/WHO (2002) još preporučuje da bi proizvođači morali da naznače i minimalni dnevni unos preparata koji dovodi do poboljšanja zdravstvenog stanja korisnika, a te podatke bi trebalo da obezbede studije na laboratorijskim životinjama i kliničke studije. Međutim, najvažnije u ovim istraživanjima nije definisanje najboljeg od ispitivanih sojeva, već najpre validacija metoda kojima se detektuju i kvantifikuju probiotska svojstva, a zatim i dokazivanje njihovog postojanja kod ispitivanih sojeva (FAO/WHO, 2002).

Imajući u vidu da je značaj mikrobiote za održavanje opšteg zdravstvenog stanja organizma ogroman, kao i činjenicu da brojna patofiziološka stanja doprinose njenom narušavanju, te da konzumiranje funkcionalne hrane nije uvek dovoljno za ponovno uspostavljanje njene ravnoteže, neophodna je formulacija odgovarajućih farmaceutskih

probiotskih preparata. Njihovom pravilnom upotrebom moglo bi se intervenisati preventivno, kako do poremećaja ravnoteže mikrobiote ne bi došlo, ali i terapijski, odnosno onda kada je poremećen sastav mikrobiote dijagnostifikovan. U svetu su registrovane brojne probiotske formulacije, ali se neprestano radi na pronalaženju novih, koje bi bile efikasnije u prevenciji i tretmanu poremećaja koji su uzrokovani ili praćeni disbalansom mikrobiote.

Jedan od načina da se efikasnost probiotika poveća uključuje i pravilan izbor geografskog porekla probiotskih sojeva. Naime, interakcija probiotskih sojeva sa organizmom domaćina je u velikoj meri određena fiziologijom gastrointestinalnog trakta i načinom ishrane. Kako se ova svojstva razlikuju u različitim geografskim područjima, poželjno je da geografsko poreklo probiotskih sojeva i populacije koja ih koristi bude zajedničko (Freitas *i sar.*, 2003; Kaushik *i sar.*, 2009; Ghosh *i sar.*, 2012; Maheshwari *i sar.*, 2012; Tripathy *i sar.*, 2014; Sybesma *i sar.*, 2015). Upravo iz tog razloga nastao je ovaj rad, kao rezultat potrage za novim probiotskim sojevima autohtonim za područje Srbije. Rezultati dobijeni u ovom radu služili bi kao osnova za dalja istraživanja, čiji bi krajnji cilj bio formulacija farmaceutskog probiotskog preparata za domaće tržište.

2. Cilj

Cilj ove doktorske disertacije je izolacija i karakterizacija novih autohtonih sojeva laktobacila koji poseduju osobine probiotika. U okviru istraživanja postavljeni su sledeći konkretni zadaci:

1. Izolacija novih sojeva laktobacila iz oralnih briseva i fecesa zdravih beba, kao i iz uzoraka domaćeg sira;
2. Identifikacija izolata do nivoa vrste;
3. Karakterizacija uslova i dinamike rasta izolata, ispitivanje odabranih biohemijskih osobina, kao i ispitivanje osetljivosti na antibiotike i enzime;
4. Određivanje i uporedna analiza probiotskih karakteristika odabranih izolata: tolerancija na niske pH vrednosti sredine i prisustvo žučnih soli, preživljavanje u simuliranim uslovima gastrointestinalnog trakta, antimikrobna aktivnost i adhezivne osobine.

Rezultati ovog rada služiće kao osnova za dalja istraživanja, u cilju formulacije novog domaćeg farmaceutskog probiotskog preparata čijom bi se svakodnevnom upotrebom smanjio ili eliminisao niz tegoba, pre svega gastrointestinalnog porekla.

3. Materijal i metode

3.1. Materijal

3.1.1. Mikroorganizmi

Mikroorganizmi korišćeni u ovom radu su prikazani u Tabeli 2.

Tabela 2. Sojevi mikroorganizama

Sojevi mikroorganizama	Izvor/Referenca
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	ATCC kolekcija
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	ATCC kolekcija
<i>Klebsiella sp.</i> ATCC 10031	ATCC kolekcija
<i>Salmonella abony</i> NCTC 6017	NCTC kolekcija
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538-P	ATCC kolekcija
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 93419	ATCC kolekcija
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111	ATCC kolekcija
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	ATCC kolekcija
<i>Bacillus pumilus</i> NCTC 8241	NCTC kolekcija
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	ATCC kolekcija
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 314	ATCC kolekcija
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469	ATCC kolekcija
<i>Lactobacillus lactis</i> ATCC 7830	ATCC kolekcija
<i>Lactobacillus plantarum</i> Lac1	Ovaj rad
<i>Lactobacillus plantarum</i> Lac2	Ovaj rad
<i>Lactobacillus casei</i> Lac3	Ovaj rad
<i>Lactobacillus paracasei</i> Lac4	Ovaj rad
<i>Lactobacillus gasseri</i> Lac5	Ovaj rad
<i>Lactobacillus plantarum</i> Lac6	Ovaj rad
<i>Lactobacillus plantarum</i> Lac7	Ovaj rad
<i>Lactobacillus casei</i> 5s	Ovaj rad
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	ATCC kolekcija
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	ATCC kolekcija

3.1.2. Čelijska kultura

Korišćena je kultura ćelija kolorektalnog karcinoma HCT 116 (ATCC CCL-247).

3.1.3. Podloge za kultivaciju mikroorganizama

Korišćene su dehidratisane podloge (Merck) koje su rastvarane u destilovanoj vodi (dH₂O) u skladu sa preporukom proizvođača. Nakon rastvaranja, proveravan je pH i podloge sterilisane 15 min na 121°C.

MRS bujon (de Man, Rogosa i Sharp *Lactobacillus* Broth) pH 5,7

Bakto-proteinazni pepton	10 g
Mesni ekstrakt	10 g
Ekstrakt kvasca	4 g
D-glukoza	20 g
Dikalijum hidrogen fosfat	2 g
Tween 80	1 g
Diamonijum hidrogen citrat	2 g
Natrijum acetat	5 g
Magnezijum sulfat	0,2 g
Mangan sulfat	0,04 g
dH ₂ O	1000 mL

MRS agar (de Man, Rogosa i Sharp *Lactobacillus* Agar) pH 5,7

Bakto-proteinazni pepton	10 g
Mesni ekstrakt	10 g
Ekstrakt kvasca	4 g
D-glukoza	20 g
Dikalijum hidrogen fosfat	2 g
Tween 80	1 g
Diamonijum hidrogen citrat	2 g

Natrijum acetat	5 g
Magnezijum sulfat	0,2 g
Mangan sulfat	0,04 g
Agar	14 g
dH ₂ O	1000 mL

TSB bujon (Tryptic Soy Broth) pH 7,3

Pepton iz kazeina	17 g
Soja pepton	3 g
D-glukoza	2,5 g
Natrijum hlorid	5 g
Dikalijum hidrogen fosfat	2,5 g
dH ₂ O	1000 mL

TSA agar (Tryptic Soy Agar) pH 7,3

Pepton iz kazeina	15 g
Soja pepton	5 g
Natrijum hlorid	5 g
Agar	15 g
dH ₂ O	1000 mL

CA agar (*Pseudomonas Selective Agar*, CetrimideAgar) pH 7,0

Pepton iz želatina	20 g
Magnezijum hlorid	1,4 g
Kalijum sulfat	10 g
Cetrimid (N-acetil-N,N,N-trimetilamonijum bromid)	0,3 g
Agar	13 g
dH ₂ O	1000 mL

BP agar (*Staphylococcus* Selective Agar, Baird Parker) pH 6,8

Pepton iz kazeina	10 g
Mesni ekstrakt	5 g
Ekstrakt kvasca	1 g
Natrijum piruvat	10 g
Glicin	12 g
Litijum hlorid	5 g
Agar	15 g
Emulzija žumanceta u teluritu	50 mL
dH ₂ O	1000 mL

SDB bujon (Sabouraud-2 %DextroseBroth) pH 5,6

Mesni pepton	5 g
Pepton iz kazeina	5 g
D-glukoza	20 g
dH ₂ O	1000 mL

SDA agar (Sabouraud-2 %DextroseAgar) pH 5,6

Pepton	10 g
D-glukoza	20 g
Agar	17 g
dH ₂ O	1000 mL

MCB (MacConkey Broth) pH 7,1

Pepton iz kazeina	20 g
Laktoza	10 g
Žučne soli	5 g
Bromkrezol purpurno	0,01 g
dH ₂ O	1000 mL

MCA agar (MacConkey Agar) pH 7,1

Pepton iz kazeina	17 g
Mesni pepton	3 g
Natrijum hlorid	5 g
Laktoza	10 g
Mešavina žučnih soli	1,5 g
Neutral crveno	0,03 g
Kristal violet	0,001 g
Agar	13,5 g
dH ₂ O	1000 mL

XLD agar (Xyllose Lysine Deoxycholate Agar) pH 7,4

Ekstrakt kvasca	3 g
Natrijum hlorid	5 g
D-ksiloza	3,75 g
Laktoza	7,5 g
Saharoza	7,5 g
L-lizin	5 g
Natrijum deoksiholat	1 g
Natrijum tiosulfat	6,8 g
Amonijum gvožđe (III) citrat	0,8 g
Fenol crveno	0,08 g
Agar	14,5 g
dH ₂ O	1000 mL

Laktozni bujon pH 7,4

Pepton	5 g
Mesni ekstrakt	3 g
Laktoza	5 g
dH ₂ O	1000 mL

Krvni agar pH 7,4

Hranljivi supstrat

(ekstrakt srca i peptoni)	20 g
Natrijum hlorid	5 g
Agar	15 g
Defibrinisana ovčija krv	50-80 mL
dH ₂ O	1000 mL

Podloga sa obranim mlekom

Obrano mleko u prahu	100 g
Ekstrakt kvasca	5 g
Agar	15 g
dH ₂ O	1000 mL

3.1.4. Rastvori i reagensi za rad sa mikroorganizmima

Fosfatni pufer - PBS (za ispitivanje proteolitičke aktivnosti)

Dikalijum hidrogen fosfat	2,28 g
Kalijum dihidrogen fosfat	1,36 g
Natrijum hlorid	8,76 g
dH ₂ O	do 1000 mL

Vodonik peroksid (6%)

Vodonik peroksid	6 mL
dH ₂ O	100 mL

Fiziološki rastvor

Natrijum hlorid	9 g
dH ₂ O	1000 mL

Tris-HCl pufer pH 7,0

Tris-HCl	1,211 g
EDTA	0,372 g
Natrijum hlorid	8,775 g
dH ₂ O	1000 mL

AGF (*Artificial Gastric Fluid*, veštački želudačni sok) pH 2,0

Pepsin	3 mg/mL
Natrijum hlorid	125 mM
Kalijum hlorid	7 mM
Natrijum hidrogen karbonat	45 mM
dH ₂ O	1000 mL

AIF (*Artificial Intestinal Fluid*, Veštački intestinalni sok) pH 8,0

Pankreatin USP	0,1% (w/v)
Žučne soli	0,15% (w/v)
dH ₂ O	1000 mL

Komercijalni kit za PCR

QIAGEN Dneasy[®] Blood&Tissue Kit

Pufer za lizu bakterija (za PCR amplifikaciju)

20 mM Tris·Cl pH 8,0

2 mM Na EDTA

1,2% Triton X-100

Lizozim 20 mg/mL (dodati neposredno pre korišćenja)

0,5 M Fosfatni pufer (za PCR amplifikaciju)

Dinatrijum hidrogen fosfat	0,74 g
Kalijum dihidrogen fosfat	6,12 g
dH ₂ O	100 mL

3.1.5. Enzimi

U radu su korišćeni sledeći enzimi: α -amilaza (26 U/mg, Fluka, Switzerland), tripsin (3369 U/mg, Life technologies, Inc. Rockville, MD, USA), himotripsin (1300 U/mg, Life technologies, Inc. Rockville, MD, USA), pronaza E (7 U/mg, Sigma-Aldrich, Germany), katalaza iz *Aspergillus niger* (4000 U/mg, Sigma-Aldrich, Germany) i lizozim (23000 U/mg, Sigma-Aldrich, Germany).

3.1.6. Podloge i reagensi za gajenje kulture sisarskih ćelija

Korišćene su gotove podloge i puferi, poreklom od PAA Laboratories, GmbH. Za gajenje je korišćen DMEM medijum (Dulbecco's Modified Eagle Medium; pH 7,2) sa D-glukozom finalne koncentracije 4,5% i L-glutaminom finalne koncentracije 2 mM. Medijum je suplementiran fetalnim goveđim serumom do finalne koncentracije 10% i rastvorom antibiotika penicilina (100 IU/mL) i streptomicina (100 μ g/mL). Za ispiranje ćelija korišćen je Dulbecco's PBS pufer (bez kalcijuma i magnezijuma, pH 7,0). Za tripsinizaciju ćelija je korišćen gotov rastvor 0,05% tripsina (Gibco Life Technologies, Thermo Fisher Scientific).

3.2. Metode

3.2.1. Uzimanja uzoraka

U ovom radu je sakupljeno ukupno 46 uzoraka. Od toga, 43 je bilo humanog porekla (11 briseva oralne mukoze i 32 uzorka fecesa), a 3 poreklom iz domaćeg kravljeg sira sa područja Gornjeg Milanovca. Humani uzorci su, uz saglasnost roditelja, uzeti od zdravih beba mlađih od godinu dana koje nikada nisu primale terapiju antibioticima.

Uzorci su uzimani na aseptičan način i čuvani na temperaturi od 4°C u toku transporta do laboratorije, gde je izolacija započeta u narednih nekoliko sati.

3.2.2. Izolacija bakterija iz uzoraka

Uzorci oralnog brisa i kravljeg sira su resuspendovani u 5 mL, a uzorci fecesa u 10 mL fiziološkog rastvora i homogenizovani 2 min. Napravljena je serija decimalnih razblaženja u fiziološkom rastvoru i po 100 μ L razblaženja 10^{-5} , 10^{-6} i 10^{-7} zasejano na MRS agar. Podloge su inkubirane 48 h na 37°C u mikroaerofilnim uslovima. Izrasle pojedinačne kolonije su pokupljene ubodnom ezom, presejane na sveže ploče MRS agara i inkubirane u istim uslovima. Na ovaj način su dobijene čiste kulture potrebne za dalja ispitivanja.

3.2.3. Uslovi gajenja mikroorganizama

Prekonoćne kulture laktobacila su gajene u MRS bujonu 18-24 h na temperaturi od 37°C u mikroaerofilnim uslovima (GenBox microaerophilic, BioMerieux, Marcy l'Etoile, France). Laktobacili su na čvrstoj MRS podlozi inkubirani u istim uslovima tokom 48 h.

Prekonoćne kulture indikatorskih sojeva *S. aureus* ATCC 6538-P, *M. luteus* ATCC 93419, *B. cereus* ATCC 11778, *B. pumilus* NCTC 8241, *B. subtilis* ATCC 6633, *L. monocytogenes* ATCC 19111, *S. abony* NCTC 6017 i *P. aeruginosa* ATCC 9027 su gajene u TSB bujonu, a *E. coli* ATCC 8739 i *Klebsiella* sp. ATCC 10031 u MCB bujonu 24 h na 37°C. Kada je u pitanju gajenje na čvrstim podlogama, sojevi *S. aureus* ATCC 6538-P i *M. luteus* ATCC 93419 su gajeni na TSA i BP agaru; sojevi *B. cereus* ATCC 11778, *B. pumilus* NCTC 8241 i *B. subtilis* ATCC 6633 na TSA agaru; sojevi *E. coli* ATCC 8739 i *Klebsiella* sp. ATCC 10031 na MCA agaru; soj *S. abony* NCTC 6017 na XLD agaru i soj *P. aeruginosa* ATCC 9027 na CA agaru. Svi sojevi su inkubirani 24 h na 37°C.

Prekonoćne kulture sojeva *C. albicans* ATCC 10231 i *A. brasiliensis* ATCC 16404 su gajene u SDB bujonu 24 h na 25°C. U istim uslovima sojevi su gajeni i na čvrstoj SDA podlozi.

3.2.4. Određivanje ukupnog broja vijabilnih mikroorganizama (CFU, *Colony Forming Units*)

Ukupan broj vijabilnih mikroorganizama (CFU/mL) određivan je zasejavanjem 100 µL odgovarajućih razblaženja na čvrste podloge u triplikatu. Zasejane podloge su inkubirane u odgovarajućim uslovima, brojane su izrasle kolonije, a ukupan broj živih mikroorganizama određen prema formuli:

$$\text{CFU/mL} = \text{broj kolonija} \times 10 \times (1/\text{razblaženje})$$

3.2.5. Dugotrajno čuvanje bakterija

Izolovani i okarakterisani sojevi laktobacila su čuvani zamrznuti na temperaturi od -20°C u MRS bujonu koji je sadržao 20% (v/v) glicerola.

3.2.6. Identifikacija izolovanih sojeva bakterija

3.2.6.1. Preliminarna fenotipska identifikacija bakterija

Preliminarna identifikacija izolovanih bakterija izvršena je na osnovu bojenja po Gramu, katalaza testa, hemolitičnosti, sposobnosti rasta u anaerobnim uslovima, formiranja spora i fermentacije ugljenih hidrata.

3.2.6.1.1. Bojenje po Gramu

Bojenje po Gramu (Berić i Nikolić, 2014) je korišćeno kao prva faza u proceduri identifikacije izolata. Za rad su korišćene dobijene čiste kulture bakterija gajene u MRS bujonu uz blago mešanje od 58 rpm/min. Mikroskopski preparati su pravljeni od prekonoćnih kultura.

3.2.6.1.2. Ispitivanje aktivnosti katalaze

Prisustvo enzima katalaze je ispitivano tako što je ezom zahvaćena velika količina ćelija sa MRS agara i nanesena na pripremljenu i obeleženu mikroskopsku pločicu. Na ćelije je nanešeno 1-2 kapi 6% vodonik peroksida i praćena je pojava mehurića kiseonika.

3.2.6.1.3. Test hemolize

Prekonoćne kulture izolata zasejavane su na krvni agar, inkubirane na temperaturi od 37°C, 72 h u mikroaerofilnim uslovima, a zatim je praćena pojava zone hemolize (Lombardi *i sar.*, 2004).

3.2.6.1.4. Test anaerobnog rasta

Prekonoćne kulture izolata zasejavane su na MRS agar, inkubirane na temperaturi od 37°C 48h, ali u striktno anaerobnim uslovima, koji su obezbeđeni upotrebom GasPack™ anaerobnog sistema (Biomerieux), kako je opisano od strane Berić i Nikolić (2014).

3.2.6.1.5. Test sporulacije

Prisustvo spora kod izolovanih sojeva laktobacila je ispitivano nakon sedam dana inkubacije na ploćama MRS agara na temperaturi od 37°C u mikroaerofilnim uslovima. Dobijene pojedinaćne kolonije izolata su prenešene u 5 mL fiziološkog rastvora i homogenizovane. Nakon toga, suspenzija je inkubirana 20 minuta na 80°C (kako bi se inaktivirale vegetativne ćelije), da bi se po 100 µL suspenzije zasejavalo na TSA i SDA agar (hranljive podloge za bakterije i gljive). TSA podloge su inkubirane 48 h na temperaturi od 37°, dok su SDA podloge inkubirane 5 dana na temperaturi od 25°C. Nakon inkubacije posmatrano je ima li porasta na zasejanim podlogama.

3.2.6.1.6. Fermentacija ugljenih hidrata

Krajnja fenotipska identifikacija je izvršena korišćenjem komercijalnog kita API CH 50 (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France), koji se zasniva na obrascu fermentacije ugljenih hidrata (Charteris *i sar.*, 2001). Test je izveden u skladu sa uputstvom proizvođaća.

3.2.6.2. Genotipska identifikacija izolovanih sojeva laktobacila

Za genotipsku identifikaciju izolovanih bakterija do nivoa vrste korišćena je metoda sekvenciranja 16S rRNK gena.

3.2.6.2.1. Ekstrakcija ukupne DNK

Ukupna DNK izolovanih sojeva laktobacila ekstrahovana je pomoću QIAGEN Dneasy® Blood&Tissue Kit. Prekonočne kulture izolovanih sojeva laktobacila su centrifugirane 10 min na 7500 rpm, odbačen je supernatant, talog je resuspendovan u 180 µL pufera za lizu bakterija i dobijena suspenzija je inkubirana 30 minuta na 37°C. Nakon inkubacije dodato je 25 µL proteinaze K i 200 µL AL pufera (bez etanola), dobro vorteksovano i inkubirano 30 minuta na 56°C. Nakon inkubacije dodato je 200 µL 96% etanola i snažno promešano, kako bi se dobio homogen rastvor. Proces ekstrakcije je nastavljen u skladu sa uputstvom proizvođača.

3.2.6.2.2. Umnožavanje 16S rRNK gena PCR (*Polymerase Chain Reaction*) metodom

Umnožavanje 16S rRNK gena PCR metodom rađeno je tako što je pripremljena reakciona smeša koja sadrži: 1 x reakcioni pufer (10 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 0,1% Triton X-100, pH 9), 2,5 mM MgCl₂, 200 µM svakog dezoksinukleotida (dNTP), dva prajmera (10 pmol svaki) i 1U *Taq* DNK- polimeraze (Tabela 3). Količina DNK matrice u eksperimentima bila je 1µL 1:10 razređene ekstrahovane DNK uzorka. Za umnožavanje 16S rDNK korišćeni su prajmeri 27F 5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (Gürtler i Stanisich, 1996) i 1523R 5'-AGGAGGTGATCCAGCCG-3' (Gonzales *i sar.*, 1997), koji umnožavaju region dužine 1550 bp. Da bi se eliminisala mogućnost da je tokom pripreme uzoraka došlo do unakrsne kontaminacije, na svakih 10 uzoraka stavljana je negativna kontrola. Negativnu kontrolu je predstavljala dodatna tubica sa svim reagensima potrebnim za umnožavanje DNK, ali je umesto 1 µL uzorka, sipan 1 µL *Qiagen nuclease-free* vode.

Umnožavanje je obavljeno u Eppendorf Mastercycler®ep, po sledećem protokolu: inicijalna denaturacija na 94°C 5 min; denaturacija na 94°C 1 min, elongacija na 50°C 2 min, ekstenzija na 72°C 3 min (34 ciklusa); finalna ekstenzija na 72°C 10 min.

Tabela 3. Sastav PCR reakcione smeše

Sastojak	Stok konc.	Finalna konc. u reakcionoj PCR smeši	Količine za 20 μ l smeše
H ₂ O			12,85 μ L
Buffer A	10x	1x	2,0 μ L
MgCl ₂	25 mM	0,5 mM	0,4 μ L
dNTPs	10 mM	0,3 mM	0,6 μ L
27f	10 μ M	0,75 μ M	1,5 μ L
1523R	10 μ M	0,75 μ M	1,5 μ L
KAPATaq	5 U/ μ L	0,75U	0,15 μ L

3.2.6.2.3. Sekvenciranje PCR produkata i analiza dobijenih sekvenci 16S rDNK

Nakon uspešne amplifikacije, PCR produkti su prečišćeni pomoću QIAGEN QIAquick[®] PCR Purification Kit, prateći upustvo proizvođača. Za kontrolu amplifikacije korišćen je soj 30J *Staphylococcus* sp. (GenBank Acc. No. GU370938). Provera čistoće prečišćenih uzoraka izvršena je elektroforezom u 1% agaroznom gelu. Gel je napravljen rastvaranjem agaroze u 1x TBE puferu (Tris-Borate 90 mM, EDTA 1 mM) uz dodavanje etidijum bromida (0,5 μ g/mL). Za elektroforezu je korišćen 0,5x TAE pufer. Elektroforeza je tekla pri konstantnom naponu od 100 V/cm² gela. Veličina i količina DNK u PCR produktima je određena vizuelnim poređenjem sa markerom SERVA DNA 100 bp DNA Ladder. Gel je vizualiziran na UV transiluminatoru i slikan digitalnim fotoaparatom.

Reakcije sekvenciranja su urađene u BMR Genomics (Padova, Italy) na automatskom kapilarnom sekvencatoru. Amplifikovani fragment 16S rRNK gena svakog uzorka je sekvenciran u oba smera upotrebom istih prajmera koji su korišćeni za amplifikaciju DNK.

Kvalitet iščitanih nukleotidnih sekvenci je analiziran pomoću programima FinchTV v.1.4.0 (<http://www.geospiza.com>). Međusobno poređenje i uklapanje sekvenci izvršeno je u CLUSTAL W programu integrisanom unutar programa MEGA, verzija 5.10 (Thompson

i sar., 1994; Tamura *i sar.*, 2011), a dobijene sekvence su zatim upoređene BLAST (**Basic Local Alignment Search Tool**) analizom sa dostupnim sekvencama 16S rRNK gena u GenBank bazi podataka (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3.2.7. Fiziološka i biohemijska karakterizacija izolovanih sojeva laktobacila

Za fiziološku i biohemijsku karakterizaciju izolovanih sojeva laktobacila posmatrane su sledeće osobine: proizvodnja gasa iz laktoze, rast na različitim temperaturama, pH vrednostima sredine, u prisustvu različitih koncentracija fenola i NaCl, proteolitička sposobnost, dinamika rasta, rezistencija na najčešće korišćene antibiotike, otpornost na prisustvo enzima gastrointestinalnog trakta, kao i produkcija organskih kiselina.

3.2.7.1. Proizvodnja gasa iz laktoze

Pripremljene su epruvete laktoznog bujona sa prevrnutim Durhamovim cevčicama, koje su zatim inokulisane prekonoćnim kulturama (1% v/v) ispitivanih izolata. Epruvete su inkubirane 5 dana na temperaturi od 37°C u mikroaerofilnim uslovima. Tokom perioda inkubacije praćena je pojava gasa u cevčicama (pojava gasa je dokaz proizvodnje CO₂ iz laktoze).

3.2.7.2. Rast na različitim temperaturama

Dobijeni izolati su gajeni u MRS bujonu uz blago mešanje od 58 rpm/min. Dobijene prekonoćne kulture su zasejane na MRS agar, koji je zatim inkubiran sedam dana na odgovarajućim temperaturama (10°C, 15°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C i 50°C). Nakon inkubacije praćena je pojava rasta. Ispitivana je i kratkotrajna otpornost izolovanih sojeva laktobacila prema ekstremno visokim temperaturama. Za ovaj test su korišćeni talozi prekonoćnih kultura (nakon centrifugiranja talog je ispran PBS-om i resuspendovan u istom puferu). Kulture su inkubirane 10 min uz blago mešanje (na 58 rpm/min) na temperaturama od 80°C i 100°C. Nakon toga, određivano je preživljavanje izolata, poređenjem broja vijabilnih bakterija na početku i na kraju inkubacije.

3.2.7.3. Rast na različitim pH

Rast na različitim pH vrednostima sredine kod izolovanih sojeva laktobacila isptivan je zasejavanjem svežih prekonoćnih kultura (2% v/v) u MRS bujon podešene pH vrednosti (2, 3, 4, 5, 6, 7 i 8). Zasejani bujoni su inkubirani u mikroaerofilnim uslovima 24 h na 37°C. Nakon inkubacije praćena je pojava rasta zasejanih izolata.

3.2.7.4. Rast u prisustvu različitih koncentracija NaCl

Za potrebe ispitivanja tolerancije na soli u MRS bujon je dodat NaCl finalne koncentracije 2%, 4% i 6,5% NaCl. Ovako pripremljen bujon je inokulisan prekonoćnim kulturama (2% v/v) ispitivanih izolata i inkubiran 24 h uz blago mešanje od 58 rpm/min. Nakon inkubacije praćena je pojava rasta zasejanih izolata.

3.2.7.5. Tolerancija na fenol

Za potrebe ispitivanja u MRS bujon je dodat fenol, tako da se dobiju finalne koncentracije 0,2%, 0,4%, 0,8% i 1%. Ovako pripremljen bujon je inokulisan prekonoćnim kulturama (2% v/v) izolovanih sojeva laktobacila i inkubiran uz blago mešanje od 58 rpm/min. Uzorci su uzeti neposredno nakon inokulacije, a zatim posle 6 i 24 h inkubacije i određivan je ukupan broj vijabilnih mikroorganizama.

3.2.7.6. Ispitivanje proteolitičke aktivnosti

Proteolitička aktivnost izolovanih sojeva laktobacila ispitivana je na podlozi sa obranim mlekom kako je opisao Essid *i sar.* (2009). U podlozi su napravljeni bunarići prečnika 6 mm u koje su sipane sveže prekonoćne kulture izolovanih sojeva laktobacila. Ploče su inkubirane u mikroaerofilnim uslovima 24 h na temperaturi od 37°C. Praćena je pojava bistre zone oko bunarića koja nastaje hidrolizom kazeina.

3.2.7.7. Kriva rasta

Za praćenje brzine rasta izolovanih sojeva laktobacila korišćen je MRS bujon inokulisan prekonoćnim kulturama izolata (2% v/v). Uzorci su uzeti neposredno nakon

inokulacije, a zatim posle 4, 8, 12, 14, 16, 18 i 24 h inkubacije i određivan je ukupan broj vijabilnih bakterija.

3.2.7.8. Ispitivanje osetljivosti na antibiotike

Ispitivanje osetljivosti izolovanih sojeva laktobacila na antibiotike je rađeno u skladu sa Kirby-Bauer procedurom (Bauer *i sar.*, 1966). Naime, pojedinačne kolonije izolata laktobacila su resuspendovane u 5 mL MRS bujona, snažno homogenizovane i inkubirane 18-24 h na temperaturi od 37°C uz blago mešanje od 58 rpm/min. Nakon inkubacije, uzeto je po 100 µL dobijenih prekonoćnih kultura, pomešano sa 5 mL polučvrstog MRS agara (0,7%), dobro homogenizovano i razliveno na MRS agar (1,5%). Pošto su se podloge stegle, na površine su im sterilnom pincetom stavljene standardne antibiogram tablete prečnika 6 mm (Torlak). Ploče su najpre ostavljene 2 h u frižideru na +4°C da bi antibiotik difundovao pre početka razmnožavanja bakterija, a nakon toga su inkubirane 48 h na temperaturi od 37°C.

Po završetku inkubacije izmereni su prečnici zona inhibicije rasta bakterija oko diska sa antibiotikom. Dobijeni rezultati su interpretirani na sledeći način: ako je dijametar zone inhibicije rasta ≥ 21 mm izolat se smatra osetljivim, ako je 16-20 mm izolat je umereno osetljiv i ako je ≤ 15 mm smatra se rezistentnim na ispitivani antibiotik (Vikova *i sar.*, 2006; Liasi *i sar.*, 2009).

3.2.7.9. Ispitivanje osetljivosti na enzime

Dobijeni izolati su gajeni u MRS bujonu uz blago mešanje od 58 rpm/min. Dobijene prekonoćne kulture su prebačene u 5 mL otopljenog i na 45-47°C ohlađenog polučvrstog MRS agara (0,7%) kojim su prelivene ploče MRS agara. Nakon hlađenja, u podlozi su napravljeni bunarići prečnika 6 mm u koje je sipano po 100 µL rastvora sledećih enzima: pronaze E, katalaze, α -amilaze, lizozima, tripsina i himotripsina, svi u koncentracijama 1,0 µg/mL, 2,5 µg/mL i 5 µg/mL. Rastvori enzima su pripremljeni u TRIS-HCl puferu, pH 7. Ploče su najpre držane u frižideru 2 h, kako bi rastvor enzima difundovao u podlogu pre početka razmnožavanja bakterija. Nakon toga, ploče u čijim su bunarićima ukapani pronaza E i katalaza su inkubirane 18-24 h na temperaturi od 25°C, a

ostale ploče na temperaturi od 37°C. Nakon inkubacije posmatrano je formiranje svetle zone odsustva rasta oko bunarića. Formiranje ove zone ukazuje na osetljivost izolata na testirane enzime, a izostanak formiranja zone, odnosno nesmetani rast bakterija, na njihovu neosetljivost na testirane enzime (Oh *i sar.*, 2000).

3.2.7.10. Određivanje sadržaja mlečne i buterne kiseline metodom HPLC

Određivanje sadržaja organskih kiselina u bezćelijskom supernatantima prekonoćnih kultura izolata gajenih u MRS bujonu rađeno je primenom HPLC metode sa Diodaarray detektorom, na jonoizmenjivačkoj koloni tip H⁺ (Hewlett Packard, SAD). Za mobilnu fazu korišćena je 0,1% orto-fosforna kiselina. Hromatografski uslovi su uključivali sledeće: kolona: Supelcogel C610 H 300 x 7,8 mm; protok: 0,5 mL/min; injekciona zapremina: 20 µL; detekcija: 210 nm; temperatura: 30°C (Huh *i sar.*, 2006). Korišćeni su referentni standardi organskih kiselina. Izvršena je spektroskopska analiza snimljenih pikova i upoređena sa spektrima iz biblioteke. Sadržaj organskih kiselina izračunat je na osnovu površine pika iz standardne prave za pojedine organske kiseline.

3.2.8. Ispitivanje probiotskih osobina izolovanih sojeva laktobacila

Kao osnovne probiotske osobine kod izolovanih sojeva laktobacila ispitivane su rezistencija na niske pH vrednosti, tolerancija na prisustvo žučnih soli, preživljavanje simuliranih uslova prisutnih u gastrointestinalnom traktu, ispitivanje spektra antimikrobnog dejstva i adhezivne osobine.

3.2.8.1. Rezistencija na niske pH vrednosti

Za ispitivanje je pripremljen MRS bujon čija je pH vrednost podešena na 2, 3 i 4, a kao kontrola korišćen je MRS bujon bez podešavanja (pH 5,7). Pripremljeni MRS bujoni su inokulisani suspenzijom izolovanih sojeva laktobacila (2% v/v, broj bakterija u inokulumu ~10⁹ CFU/mL), dobro je promešano i inkubirano na 37°C. Uzorci su uzeti neposredno nakon inokulacije, a zatim posle 2 i 4 h inkubacije i određivan je ukupan broj vijabilnih bakterija.

3.2.8.2. Tolerancija na prisustvo žučnih soli

Ispitivanje tolerantnosti na prisustvo žučnih soli je ispitivano po protokolu Mishra i Prasad (2005). Rastvori žučnih soli, finalnih koncentracija 0,5%, 1% i 2%, su pripremljeni u MRS bujonu, dok je MRS bujon bez dodatih žučnih soli korišćen kao negativna kontrola. MRS bujoni sa svakom od ispitivanih koncentracija žučnih soli su inokulisani bakterijskom suspenzijom koja je sadržala $\sim 10^9$ CFU/mL (2% v/v) i inkubirani su uz blago mešanje od 58 rpm/min na 37°C. Uzorci su uzeti neposredno nakon inokulacije, a zatim posle 2 i 4 h inkubacije i određivanje ukupan broj vijabilnih bakterija.

3.2.8.3. Preživljavanje u simuliranim uslovima gastrointestinalnog trakta

Gastrointestinalna digestija je ispitivana kako su opisali Zarate *i sar.* (2000) i Fernandez (2003). Prekonoćne kulture izolovanih sojeva laktobacila su centrifugirane 10 min na 5000 rpm, dva puta isprane u PBS-u (pH 7,4) i resuspendovane u istom puferu tako da se dobije $\sim (10^8-10^9)$ CFU /mL. Dobijene suspenzije su dodate u pripremljeni AGF medijum pH 2 (2% v/v), dobro je promešano i inkubirano 2 h na 37°C uz mešanje (200 rpm), kako bi se simulirali uslovi crevne peristaltike. Uzorci za određivanje ukupnog broja živih ćelija su uzimani na svakih sat vremena (0, 1 i 2 h).

Nakon inkubacije u AGF medijumu suspenzija je centrifugirana na 5000 rpm, a bakterijski talog je resuspendovan u AIF medijumu (pH 8) i suspenzija inkubirana u istim uslovima još 2 h. Uzorci za određivanje ukupnog broja živih ćelija su uzimani na svakih sat vremena (0, 1 i 2 h).

3.2.8.4. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti

Za ispitivanje antimikrobne aktivnosti izolovanih sojeva laktobacila korišćen je difuzioni metod u bunarićima (Harris *i sar.*, 1989). Po 100 μ L prekonoćnih kultura svakog indikator soja koji su sadržali $\sim 10^8$ CFU/mL je pomešano sa 20 mL odgovarajuće čvrste podloge otopljene i držane na 44-47°C i sadržaj je sipan u prazne Petri kutije. Supernatant izolovanih sojeva laktobacila je dobijen centrifugiranjem prekonoćnih kultura 20 min na 5000 rpm na 4°C i podeljen u dve frakcije. Jedna frakcija je ostavljena nepromenjena, dok je kod druge pH vrednost podešena na pH 7 (pomoću 1M NaOH); obe frakcije su

sterilisane filtriranjem kroz 0,22 µm celulozno-acetatne filtre (Rotilabo syringe filters, Roth). U pripremljenim podlogama su izbušeni bunarići prečnika 6 mm i u njih je sipano po 100 µL supernatanta. Ploče su najpre ostavljene 2 h u frižideru na 4°C kako bi se omogućila potpuna difuzija pre početka razmnožavanja bakterija, a zatim su inkubirane u odgovarajućim, već opisanim, uslovima. Nakon inkubacije posmatrane su zone inhibicije rasta indikatorskih sojeva.

3.2.8.5. Ispitivanje hidrofobnosti - MATH test

Hidrofobne osobine ćelijske površine izolovanih sojeva laktobacila su ispitivane *in vitro* testom adhezije, u kojem je kao rastvarač korišćen n-heksadekan, tzv. MATH testom (*M**i**c**r**o**b**i**a**l**A**d**h**e**s**i**o**n**e**T**o**H**e**x**a**d**e**c**a**n**e*), koji je opisao Deepika *i sar.* (2009). Prekonoćne kulture su centrifugirane 20 min na 5000 rpm na 4°C, dva puta isprane u PBS puferu i resuspendovane u 10 mmol/L KH₂PO₄. Podešena je pH vrednost bakterijskih suspenzija na 3, kako bi se neutralisale elektrostatičke interakcije između bakterijskih ćelija i heksadekana. Inicijalna absorbanca (A₀) merena na 600 nm je podešena na ~0,6. Jednake zapremine bakterijske suspenzije i heksadekana su pomešane, dobro vorteksovane i ostavljene 20 min na sobnoj temperaturi bez mućkanja, kako bi došlo do razdvajanja faza. Nakon toga, donja vodena faza, koja sadrži slobodne bakterije, je pažljivo izdvojena i izmerena joj je absorbanca (A₁). Procenat adhezije za heksadekan (%Ad) je izračunat prema jednačini:

$$\%Ad = (1 - A_1/A_0) \times 100$$

Rezultati su interpretirani u skladu sa dobijenom vrednošću procenta bakterija vezanih za heksadekan (Ocana *i sar.*, 1999) i to na sledeći način: 0-35% - niska hidrofobnost; 36-70% - srednja hidrofobnost; 71-100% - visoka hidrofobnost.

3.2.8.6. Ispitivanje autoagregacije i koagregacije

Sposobnost autoagregacije i koagregacije izolovanih sojeva laktobacila ispitivana je spektrofotometrijski, kao što je opisano u Collado *i sar.* (2008). Prekonoćne kulture su centrifugirane 20 min na 5000 rpm na 4°C, dva puta isprane u PBS puferu i zatim

resuspendovane u istom puferu tako da se inicijalna absorbanca na 600 nm (A_0) podese na $\sim 0,6$. Nakon inkubacije na 37°C bez mućkanja, tokom 24 h, merena je absorbanca (A_x) u različitim vremenskim intervalima ($X = 2, 4, 24$ h). Procenat agregacije (%Ag) je izračunat prema jednačini:

$$\%Ag = (1 - A_x/A_0) \times 100$$

Za ispitivanje sposobnosti koagregacije, jednake zapremine prekonoćnih kultura izolata laktobacila i patogena (*E. coli* i *L. monocytogenes*) su pomešane i inkubirane 24 h na 37°C bez mešanja. Absorbanca suspenzije pomešanih kultura (A_{mix}), kao i samih patogena (A_{path}) i samih izolata laktobacila (A_{lac}) je merena u različitim vremenskim intervalima (2, 4, 24 h). Procenat koagregacije (%Co-Ag) je računat za svaki vremenski interval posebno prema jednačini:

$$\%Co-Ag = [1 - 2A_{mix}/(A_{pat} + A_{lac})] \times 100$$

3.2.8.7. Ispitivanje vijabilnosti humanih ćelija u kulturi

Vijabilnost humanih ćelija u kulturi je praćena u eksperimentima ispitivanja sposobnosti adhezije izolata na humane ćelije kolona u kulturi. Pomešano je 10 μ L suspenzije ćelija sa 20 μ L 0,4% vodenog rastvora trypan-blue i ostavljeno do 3 min. Ćelije su posmatrane pod mikroskopom i brojane pomoću hemocitometra, nakon čega je određen procenat živih ćelija (nebojene).

3.2.8.8. Ispitivanje sposobnosti adhezije izolovanih sojeva laktobacila *in vitro*

Ispitivanje sposobnosti adhezije izolovanih sojeva laktobacila je izvršeno u skladu sa protokolom koji su opisali Sanchez *i sar.* (2010) uz male modifikacije. Korišćene su HCT 116 ćelije, kao model epitela kolona. U svaki od 12 bunarića na ploči su dodavane suspenzije HCT 116 ćelija u medijumu, gustine 8×10^4 ćelija/bunaru. Medijum je sadržavao penicilin (100 U/mL) i streptomycin (100 μ g/ml), a ćelije su u njemu gajene sve do dostizanja 90% konfluentnosti i potpune ćelijske diferencijacije. Nakon toga, medijum je promenjen i ćelije su gajene dodatnih 24 h bez antibiotika.

Za pripremu suspenzija laktobacila, prekonoćne kulture izolovanih sojeva su centrifugirane 20 min na 5000 rpm na 4°C, dva puta isprane u PBS puferu i

resuspendovane u DMEM medijumu bez antibiotika. Za praćenje sposobnosti adhezije izolovanih sojeva laktobacila, ćelijski monosloj je dva puta ispran PBS-om i u svaki bunarić je dodata suspenzija laktobacila u odnosu broj HCT 116 ćelija/ broj bakterija ~ 1/10. Ćelije su ko-inkubirane sa bakterijama 60 min na 37°C sa 5% CO₂.

Kako bi se odstranile i sakupile ne-adherirane bakterije, medijum sa bakterijama je sakupljen u sterilnu epruvetu. Monosloj je ispran dva puta sa po 1 mL PBS koji su dodati u epruvetu sa prethodno sakupljenim medijumom.

Kako bi se sakupile adherirane bakterije monosloj je tretiran 0,1% tripsinom 3 min na 37°C, da bi se ćelije odlepile. Ploče su blago lupkane, a stanje humanih ćelija nakon toga proveravano je pod inverznim mikroskopom. Kada je potvrđeno da su se ćelije odlepile, dobijena suspenzija je prenetu u sterilne epruvete.

Odgovarajuća decimalna razblaženja ne-adheriranih (CFU_{non-adh}) i adheriranih (CFU_{adh}) bakterija zasejana su na MRS agar i određen je broj ne-adheriranih i adheriranih bakterija. Procenat adheriranih bakterija(%Ad) je računat prema jednačini:

$$\%Ad = [CFU_{adh} / (CFU_{adh} + CFU_{non-adh})] \times 100$$

3.2.8.9. Ispitivanje efekta postupka tripsinizacije na vijabilnost laktobacila

Pošto je protokol za sakupljanje adheriranih bakterija uključivao postupak tripsinizacije ćelijskog monosloja, bilo je neophodno proceniti uticaj tripsinizacije na vijabilnost laktobacila. Suspenzija bakterija je sipana u prazne bunarić ploče i simulirani su uslovi tripsinizacije korišćeni u eksperimentu ispitivanja sposobnosti adhezije. Odgovarajuća razblaženja suspenzije bakterija, pre i posle procesa tripsinizacije, zasejana su na ploče MRS agara koje su inkubirane 48 h na temperaturi od 37°C. Poređenjem dobijenih vrednosti određen je ukupan broj bakterija koje su preživele proces tripsinizacije.

3.2.9. Statističke analize

Dobijeni rezultati su podvrgnuti Kolmogorov-Smirnov testu radi provere normalne raspodele, a zatim analizi varijanse. Preživljavanje izolovanih sojeva laktobacila na niskim vrednostima pH, u prisustvu žučnih soli i veštačkim gastrointestinalnim tečnostima, osobine hidrofobnosti površine ćelija, autoagregacije i koagregacije (sa *L. monocytogenes* i

E. coli), kao i adhezije na ćelijsku liniju HCT 116 su analizirani primenom dvofaktorske ANOVA. *Post-hoc* analiza je urađena korišćenjem Fisher LSD testa. Statistički značajnom razlikom je smatrano $p < 0,05$. Pirsonova analiza korelacije je korišćena za analizu relacija između osobina hidrofobnosti, autoagregacije, koagregacije i adhezije. Sve analize su urađene u statističkom programu STATISTICA (data analysis software system), verzija 8.0 (StatSoft, Inc., 2007).

4. Rezultati

U ovom radu su ispitivane probiotske osobine autohtonih izolata laktobacila u cilju identifikacije sojeva koji bi se mogli koristiti za proizvodnju novog farmaceutskog probiotskog preparata. U prvom koraku su iz različitih izvora izolovani novi sojevi laktobacila, koji su identifikovani do nivoa vrste. Sojevi su zatim okarakterisani i određen je njihov probiotski potencijal, korišćenjem odgovarajućih *in vitro* testova.

4.1. Uzorkovanje materijala i izolacija novih sojeva laktobacila

Za izolaciju sojeva laktobacila humanog porekla korišćeni su uzorci uzeti od zdravih beba. Naime, prilikom redovne kontrole u Domu zdravlja Novi Beograd, bebama starim do osam meseci, uz saglasnost roditelja, uzimani su bris usne duplje ili uzorci fecesa. Uzorci koji nisu pokazivali nikakav patološki nalaz korišćeni su kao materijal za izolaciju. Ukupno je analizirano 43 uzoraka: 32 iz stolica beba starih od dvadeset dana do sedam meseci i 11 iz briseva usne duplje beba starih od jednog do osam meseci. Istovremeno, pored uzoraka humanog porekla, izolovane su i bakterije iz 3 uzorka domaćeg kravljeg sira sa područja Gornjeg Milanovca (Tabela 4).

4.2. Prečišćavanje, izolacija i fenotipska identifikacija izolovanih bakterijskih sojeva

Iz uzetih i obrađenih uzoraka izvršeno je zasejavanje na MRS agar, a nakon inkubacije dobijene su mešovite kulture bakterija koje su prečišćene uzastopnim presejavanjem pojedinačnih kolonija na nove čvrste podloge. Tek kada je potvrđeno da se radi o čistim kulturama, pristupilo se identifikaciji laktobacila.

Napravljeni su mikroskopski preparati svih prečišćenih bakterijskih sojeva i utvrđeno je da su, od ukupno 126 izolata humanog porekla, 104 Gram pozitivne koke, 14 Gram pozitivni bacili i 8 Gram negativni bacili. Od 17 izolata poreklom iz sira 16 su bile Gram pozitivne koke, dok je 1 bio Gram pozitivni bacil.

Tabela 4. Poreklo uzoraka za izolaciju laktobacila

Red. broj	Poreklo uzorka	Redn. broj	Poreklo uzorka
1.	Beba stara 1 mesec, uzorak stolice	24.	Beba stara 7 meseci, uzorak stolice
2.	Beba stara 3 meseca, uzorak stolice	25.	Beba stara 7 meseci, uzorak stolice
3.	Beba stara 3 meseca, uzorak stolice	26.	Beba stara 25 dana, uzorak stolice
4.	Beba stara 3 meseca, uzorak stolice	27.	Beba stara 8 meseci, uzorak stolice
5.	Beba stara 1 mesec, uzorak stolice	28.	Beba stara 4 meseca, uzorak stolice
6.	Beba stara 20 dana, uzorak stolice	29.	Beba stara 6 meseci, uzorak stolice
7.	Beba stara 15 dana, uzorak stolice	30.	Beba stara 1 mesec, uzorak stolice
8.	Beba stara 1 mesec, uzorak stolice	31.	Beba stara 18 dana, uzorak stolice
9.	Beba stara 4 meseca, uzorak stolice	32.	Beba stara 8 meseci, uzorak stolice
10.	Beba stara 6 meseci, uzorak stolice	33.	Beba stara 1 mesec, oralni bris
11.	Beba stara 8 meseci, uzorak stolice	34.	Beba stara 3 meseca, oralni bris
12.	Beba stara 8 dana, uzorak stolice	35.	Beba stara 2 meseca, oralni bris
13.	Beba stara 8 meseci, uzorak stolice	36.	Beba stara 3 meseca, oralni bris
14.	Beba stara 1 mesec, uzorak stolice	37.	Beba stara 4 meseca, oralni bris
15.	Beba stara 4 meseca, uzorak stolice	38.	Beba stara 1 mesec, oralni bris
16.	Beba stara 10 dana, uzorak stolice	39.	Beba stara 6 meseci, oralni bris
17.	Beba stara 6 meseci, uzorak stolice	40.	Beba stara 6 meseci, oralni bris
18.	Beba stara 8 meseci, uzorak stolice	41.	Beba stara 1 mesec, oralni bris
19.	Beba stara 4 meseca, uzorak stolice	42.	Beba stara 8 meseci, oralni bris
20.	Beba stara 12 dana, uzorak stolice	43.	Beba stara 7 meseci, oralni bris
21.	Beba stara 1 mesec, uzorak stolice	44.	Kravlji sir
22.	Beba stara 6 meseci, uzorak stolice	45.	Kravlji sir
23.	Beba stara 8 meseci, uzorak stolice	46.	Kravlji sir

Izolovani Gram pozitivni bacili su podvrgnuti preliminarnoj identifikaciji, da bi se utvrdilo da li pripadaju laktobacilima. Testovi koji su korišćeni u ovu svrhu su: katalaza test, test hemolize, testovi rasta u anaerobnim uslovima i sposobnost sporulacije.

Od 15 ispitanih Gram pozitivnih bacila 7 je bio katalaza pozitivno, izazivali su hemolizu na krvnom agaru, formirali su spore i nisu rasli u anaerobnim uslovima, te je odbačena mogućnost da oni pripadaju rodu *Lactobacillus*. Preostalih 8 Gram pozitivnih bacila su preliminarno okarakterisani kao laktobacili jer su bili katalaza negativni,

nehemolitični, nesporulativni i sposobni za rast i u anaerobnim uslovima. Od ovih 8 izolovanih potencijalnih laktobacila, 3 izolata su oralnog porekla, 4 fekalnog i 1 poreklom iz sira. Izolovani sojevi su obeleženi laboratorijskim brojem (Tabela 5) i sa njima su radena dalja ispitivanja.

Tabela 5. Izolovani sojevi laktobacila

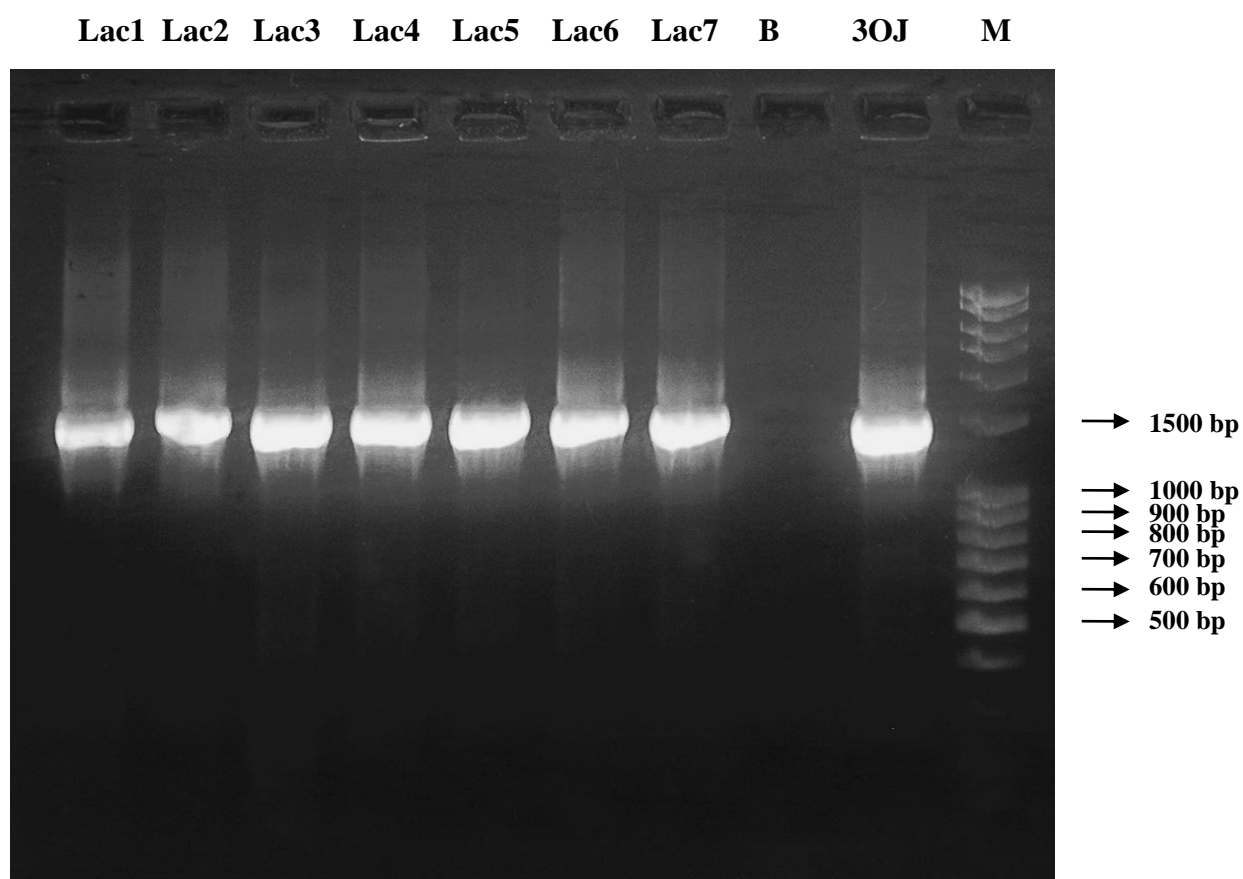
Naziv soja	Poreklo	
Lac1	Beba stara mesec dana	Oralni izolat
Lac2	Beba stara mesec dana	Oralni izolat
Lac3	Beba stara 3 meseca	Fekalni izolat
Lac4	Beba stara 3 meseca	Fekalni izolat
Lac5	Beba stara mesec dana	Oralni izolat
Lac6	Beba stara 20 dana	Fekalni izolat
Lac7	Beba stara 15 dana	Fekalni izolat
5s	Kravlji sir	Izolat iz mlečnog proizvoda

4.3. Fermentacija ugljenih hidrata

Sledeći korak u karakterizaciji izolovanih sojeva laktobacila bio je ispitivanje fermentacije ugljenih hidrata, a samim tim i njihova fenotipska identifikacija do nivoa vrste. U ovu svrhu korišćeni su komercijalni kitovi API 50CH (Biomerieux). Dobijeni rezultati su pokazali da je izolat Lac1 pokazivao najviše sličnosti sa vrstom *L. fermentum* (99,5% pouzdanosti). Izolat Lac2 je pokazivao sličnost sa vrstom *L. brevis* (98,6% pouzdanosti), izolat Lac3 visok stepen sličnosti sa vrstom *L. pentosus* (99,9% pouzdanosti), a izolat Lac4 sa vrstom *L. paracasei* spp. *paracasei* (98,6% pouzdanosti). Izolat Lac5 je pokazao sličnost sa vrstom *L. acidophilus* (85,6% pouzdanosti). Izolati Lac6 i Lac7 su pokazali visok stepen podudarnosti sa vrstom *L. plantarum* (99,9% i 99,3% pouzdanosti). Izolat 5s je na osnovu fenotipske identifikacije pokazao najviši stepen sličnosti sa vrstom *L. paracasei/casei* (94% pouzdanosti).

4.4. Genotipska identifikacija izolovanih sojeva laktobacila

Kako bi se izolovani sojevi laktobacila pouzdano identifikovali do nivoa vrste, totalna DNK je ekstrahovana, a zatim je region gena za 16s rRNK, dužine 1550 bp, umnožen PCR reakcijom uz pomoć odgovarajućih prajmera i prečišćen. Provera čistoće i veličine uzoraka izvršena je elektroforezom na 1% agaroznom gelu. Gel obojen etidijum bromidom je vizualizovan na UV transiluminatoru i slikan digitalnim fotoaparatom (Slika 5).



Slika 5. Fragmenti gena za 16S rRNK umnoženi pomoću 27f/1523R prajmera.

Lac1 do Lac7 - izolati laktobacila; B: negativna kontrola; 3OJ: pozitivna kontrola *Staphylococcus* sp.; M: marker - 100 bp DNA ladder, Serva, UK. Strelicama su označene dužine DNK fragmenata markera.

Uspešno je sekvenciran region gena za 16S rRNK svih 8 bakterijskih izolata. Veličina sekvenciranog produkta je varirala od uzorka do uzorka i iznosila je od 1445

do 1513 baznih parova (Prilozi 1-8). Svi bakterijski izolati identifikovani sekvenciranjem 16S rRNK gena su klasifikovani u rod *Lactobacillus*.

Izolati Lac1 i Lac2 su identifikovani kao *Lactobacillus plantarum*. Naime, sekvencirano je 1470, odnosno 1478 baznih parova ovih izolata. Poređenje sa postojećim sekvencama u bazi podataka BLAST analizom pokazalo je 100% podudarnosti sa 16S rRNK regionom bakterije *Lactobacillus plantarum*. Soj sa kojim je izvršeno poređenje sekvence izolata Lac1 je *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* TO 1003, čiji je genom delimično sekvenciran i nalazi se u bazi podataka pod pristupnim brojem AB713901.1, dok je sekvenca izolata Lac2 identična sa sekvencom *Lactobacillus plantarum* G8, pod pristupnim brojem JX183220.1.

Izolat Lac3 identifikovan je kao *Lactobacillus casei*. Sekvencirano je 1453 baznih parova ovog izolata. Poređenje sa postojećim sekvencama u bazi podataka BLAST analizom pokazalo je 100% podudarnosti sa 16S rRNK regionom bakterije *Lactobacillus casei*. Sojevi sa kojima je izvršeno poređenje sekvence izolata Lac3 su *Lactobacillus casei* MGB65-2, čiji je genom delimično sekvenciran i nalazi se u bazi podataka pod pristupnim brojem HM218007.1 i *Lactobacillus casei* IMAU:80793, u bazi podataka registrovan pod pristupnim brojem HM058958.1.

Izolat Lac4 identifikovan je kao *Lactobacillus paracasei*. Sekvencirano je 1513 baznih parova ovog izolata. Poređenje sa postojećim sekvencama u bazi podataka BLAST analizom pokazalo je 100% podudarnosti sa 16S rRNK regionom bakterije *Lactobacillus paracasei*. Sojevi sa kojima je izvršeno poređenje sekvence izolata Lac4 su *Lactobacillus paracasei* NRIC 1942, čiji je genom delimično sekvenciran i nalazi se u bazi podataka pod pristupnim brojem AB362763.1, kao i soj *Lactobacillus paracasei* NRIC 0638, u bazi podataka registrovan pod pristupnim brojem AB362702.1.

Izolat Lac5 identifikovan je kao *Lactobacillus gasseri*. Sekvencirano je 1459 baznih parova ovog izolata. Poređenje sa postojećim sekvencama u bazi podataka BLAST analizom pokazalo je 100% podudarnosti sa 16S rRNK regionom bakterije *Lactobacillus gasseri*. Sojevi sa kojim je izvršeno poređenje sekvence izolata Lac5 su *Lactobacillus gasseri* IMAUFB061, čiji je genom delimično sekvenciran i nalazi se u bazi podataka pod

pristupnim brojem JQ805679.1, kao i sa *Lactobacillus gasseri* NCC2856, u bazi podataka registrovan pod pristupnim brojem FJ557004.1.

Izolat Lac6 identifikovan je kao *Lactobacillus plantarum*. Sekvencirano je 1485 baznih parova ovog izolata. Poređenje sa postojećim sekvencama u bazi podataka BLAST analizom pokazalo je 100% podudarnosti sa 16S rRNK regionom bakterije *Lactobacillus plantarum*. Soj sa kojim je izvršeno poređenje sekvence izolata Lac6 je *Lactobacillus plantarum* Lp-01, čiji je genom delimično sekvenciran i nalazi se u bazi podataka pod pristupnim brojem HM130542.1.

Izolat Lac7 identifikovan je kao *Lactobacillus plantarum*. Sekvencirano je 1445 baznih parova ovog izolata. Poređenje sa postojećim sekvencama u bazi podataka BLAST analizom pokazalo je 100% podudarnosti sa 16S rRNK regionom bakterije *Lactobacillus plantarum*. Soj sa kojim je izvršeno poređenje sekvence izolata Lac7 je *Lactobacillus plantarum* soj MH58, čiji je genom delimično sekvenciran i nalazi se u bazi podataka pod pristupnim brojem FJ542299.1.

Izolat 5s identifikovan je kao *Lactobacillus casei*. Sekvencirano je 1497 baznih parova ovog izolata. Poređenje sa postojećim sekvencama u bazi podataka BLAST analizom pokazalo je 97% podudarnosti sa 16S rRNK regionom bakterije *Lactobacillus casei*. Soj sa kojim je izvršeno poređenje sekvence izolata 5s je *Lactobacillus casei* YIT 0180 (= ATCC 334), čiji je genom delimično sekvenciran i nalazi se u bazi podataka pod pristupnim brojem AB008204.1.

Sojevi su deponovani u Službi za biološka ispitivanja Kontrole kvaliteta, Galenika a.d., a u bazu podataka uvedeni pod odgovarajućim pristupnim brojevima (Tabela 6).

U toku prečišćavanja i identifikacije uočeno je da izolat Lac5 izrazito slabo raste na čvrstoj podlozi, zbog čega je on isključen iz daljeg eksperimentalnog rada, a ostalih 7 sojeva: Lac1, Lac2, Lac3, Lac4, Lac6, Lac7 i 5s podvrgnuti su daljoj fiziološkoj i biohemijskoj karakterizaciji.

Tabela 6. Sekvence izolata laktobacila deponovane u NCBI

Izolat	Pristupni broj	Homologija sa deponovanim sojevima
Lac1	JN315657	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> TO 1003, ID sekvence: AB713901.1
Lac2	JN315658	<i>Lactobacillus plantarum</i> G8, ID sekvence: JX183220.1
Lac3	JN315659	<i>Lactobacillus casei</i> MGB65-2, ID sekvence: HM218007.1 <i>Lactobacillus casei</i> IMAU:80793, ID sekvence: HM058958.1
Lac4	JN315660	<i>Lactobacillus paracasei</i> NRIC 1942, ID sekvence: AB362763.1 <i>Lactobacillus paracasei</i> NRIC 0638, ID sekvence: AB362702.1
Lac5	JN315661	<i>Lactobacillus gasserii</i> IMAUFB061, ID sekvence: JQ805679.1 <i>Lactobacillus gasserii</i> NCC2856, ID sekvence: FJ557004.1
Lac6	JN315662	<i>Lactobacillus plantarum</i> Lp-01, ID sekvence: HM130542.1
Lac7	JN315663	<i>Lactobacillus plantarum</i> MH58, ID sekvence: FJ542299.1
5s	nije deponovan	<i>Lactobacillus casei</i> YIT 0180, ID sekvence: AB008204.1

4.5. Fiziološka i biohemijska karakterizacija izolovanih sojeva laktobacila

Različite osobine poput proizvodnje gasa iz laktoze, rasta na različitim temperaturama, pH vrednostima sredine, u prisustvu različitih koncentracija fenola i NaCl, proteolitička sposobnost, dinamika rasta, rezistencija na najčešće korišćene antibiotike, otpornost na prisustvo enzima gastrointestinalnog trakta, kao i produkcija organskih kiselina su ispitivane u okviru fiziološke i biohemijske karakterizacije izolata.

4.5.1. Proizvodnja gasa iz laktoze

Na osnovu sposobnosti sojeva da proizvode CO₂ iz laktoze izvršena je fermentativna karakterizacija izolata. Daljom fenotipskom karakterizacijom je pokazana produkcija mlečne i buterne kiseline iz laktoze, ali ne i produkcija gasa (podaci nisu prikazani). Produkcija gasa od strane izolovanih sojeva laktobacila ispitivana je zasejavanjem u laktozni bujon sa dodatim Durhamovim cevčicama. Svi izolovani sojevi su fermentisali laktozu, a ni jedan nije produkovao gas, što ukazuje na to da su svi izolovani sojevi homofermentativni.

4.5.2. Rast na različitim temperaturama

Ispitivan je rast izolovanih sojeva na različitim temperaturama. Dok su izolati Lac1 i Lac2 rasli u opsegu temperature od 10-35°C, izolati Lac3, La4, Lac6, Lac7 i 5s rasli su u temperaturnom opsegu 15-40°C. Ni jedan od izolovanih sojeva laktobacila nije rastao na temperaturama od 45°C i 50°C. Ispitivanje otpornosti izolovanih sojeva laktobacila na kratkotrajno izlaganje (10 min) ekstremno visokim temperaturama (80°C i 100°C) pokazalo je da ni jedan od izolata nije sposoban da preživi pomenute uslove.

4.5.3. Rast na različitim pH

Ispitivana je sposobnost izolovanih sojeva laktobacila da rastu na različitim pH vrednostima MRS bujona, kao hranljivog medijuma. Svežim prekonocnim kulturama su inokulisani MRS bujoni čija je početna pH vrednost bila podešena na 2, 3, 4, 5, 6, 7 i 8. Ovakav opseg pH vrednosti je izabran jer se poklapa sa pH vrednostima prisutnim u različitim delovima gastrointestinalnog trakta (od pH 2 u želucu do pH 8 u intestinumu). Svi izolovani sojevi su rasli na svim ispitivanim pH vrednostima MRS medijuma.

4.5.4. Rast u prisustvu različitih koncentracija NaCl

Ispitivana je sposobnost izolovanih sojeva laktobacila da rastu u prisustvu različitih koncentracija NaCl (2%, 4% i 6,5%). Svi izolovani sojevi su rasli u prisustvu svih ispitivanih koncentracija NaCl.

4.5.5. Tolerancija na fenol

Fenol je jedna od supstanci prisutnih u gastrointestinalnom traktu sa potencijalno toksičnim dejstvom na laktobacile (Pan *i sar.*, 2009). Zato je ispitivana sposobnost izolovanih sojeva laktobacila da rastu u prisustvu različitih koncentracija fenola (0,2%, 0,4%, 0,8% i 1%). Rezultati pokazuju da svi izolovani sojevi rastu u prisustvu fenola do koncentracije od 0,4% (Tabela 7). Kada je fenol prisutan u koncentraciji od 0,8%, izolati Lac1, Lac4, Lac6, Lac7 i 5s su ostali vijabilni nakon 6 sati inkubacije, ali nakon 24 sata nije bilo rasta na zasejanim pločama. Izolati Lac2 i Lac3 su ostali vijabilni i nakon 24 sata inkubacije u MRS bujonu sa 0,8% fenola, ali u izuzetno malom broju. Nakon 6 sati

inkubacije u MRS bujonu sa 1% fenola preživljavaju svi ispitivani laktobacili, dok nakon 24 sata preživljava samo izolat Lac2.

Tabela 7. Tolerancija izolovanih sojeva laktobacila na fenol

Soj	Vreme	CFU/ml							
		Testirana koncentracija fenola							
		0,2%		0,4%		0,8%		1%	
	CFU/ml	%S ^a	CFU/ml	%S ^a	CFU/ml	%S ^a	CFU/ml	%S ^a	
Lac1	0h	2,30x10 ⁸		1,68x10 ⁷		1,04x10 ⁷		1,73x10 ⁷	
	6h	8,69x10 ⁷		2,72x10 ⁷		4,00x10 ³		1,00x10 ³	
	24h	7,90x10 ⁸	106,4	6,23x10 ⁷	107,9	<10 ¹	0	<10 ¹	0
Lac2	0h	3,21x10 ⁷		1,34x10 ⁷		1,28x10 ⁷		8,80x10 ⁶	
	6h	2,39x10 ⁷		1,40x10 ⁷		<10 ³		<10 ³	
	24h	5,50x10 ⁸	116,4	3,82x10 ⁷	106,4	2,00x10 ¹	4,2	1,00x10 ¹	16,8
Lac3	0h	5,70x10 ⁶		5,50x10 ⁶		4,20x10 ⁶		9,00x10 ⁵	
	6h	1,92x10 ⁷		1,18x10 ⁷		<10 ³		<10 ³	
	24h	1,00x10 ⁸	118,4	1,89x10 ⁷	107,9	2,00x10 ¹	4,5	<10 ¹	0
Lac4	0h	9,50x10 ⁶		3,70x10 ⁶		4,00x10 ⁶		1,20x10 ⁶	
	6h	1,47x10 ⁵		5,30x10 ⁶		<10 ³		<10 ³	
	24h	2,43x10 ⁷	105,8	7,10x10 ⁶	104,3	<10 ¹	0	<10 ¹	0
Lac6	0h	7,50x10 ⁸		7,00x10 ⁷		2,41x10 ⁷		2,21x10 ⁷	
	6h	4,83x10 ⁷		2,60x10 ⁷		2,00x10 ³		<10 ³	
	24h	4,30x10 ⁸	97,3	2,55x10 ⁷	94,4	<10 ¹	0	<10 ¹	0
Lac7	0h	3,63x10 ⁷		2,34x10 ⁷		2,41x10 ⁷		2,45x10 ⁷	
	6h	7,13x10 ⁷		8,30x10 ⁶		2,00x10 ³		1,00x10 ³	
	24h	3,00x10 ⁸	112,1	1,80x10 ⁷	98,5	<10 ¹	0	<10 ¹	0
5s	0h	1,10x10 ⁸		6,50x10 ⁸		6,80x10 ⁷		6,85x10 ⁶	
	6h	5,70x10 ⁶		1,85x10 ⁶		1,11x10 ⁵		2,00x10 ³	
	24h	1,20x10 ⁷	88	8,82x10 ⁶	78,9	<10 ¹	0	<10 ¹	0

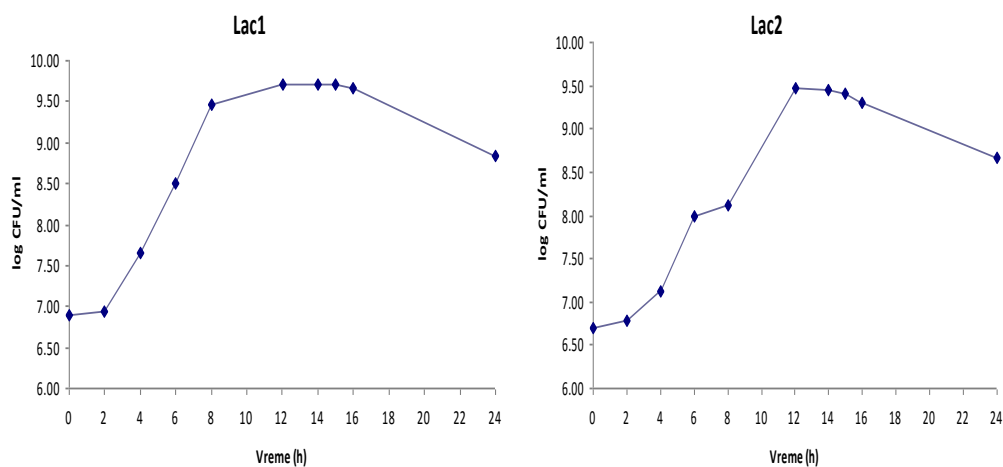
^aPreživljavanje izolata, izraženo kao procenat log CFU/ml. Rezultati predstavljaju srednju vrednost 3 nezavisna eksperimenta.

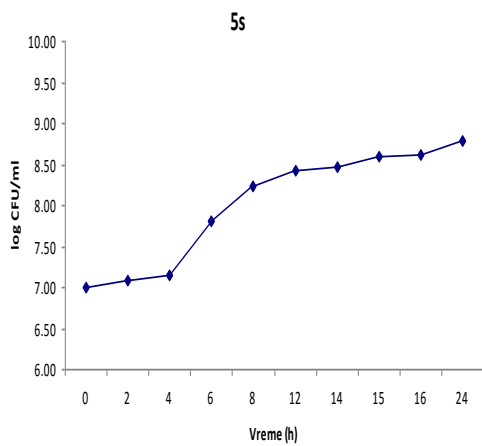
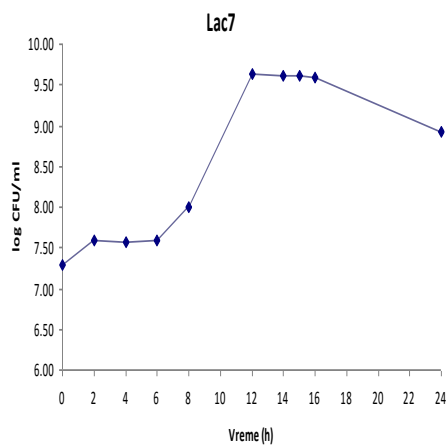
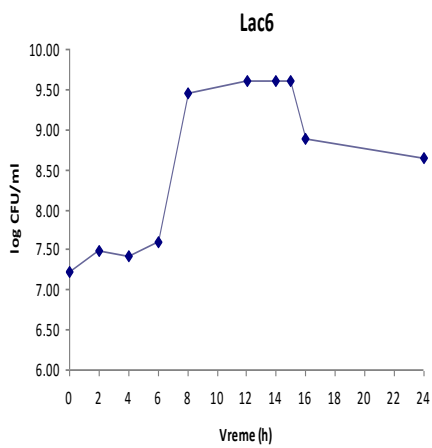
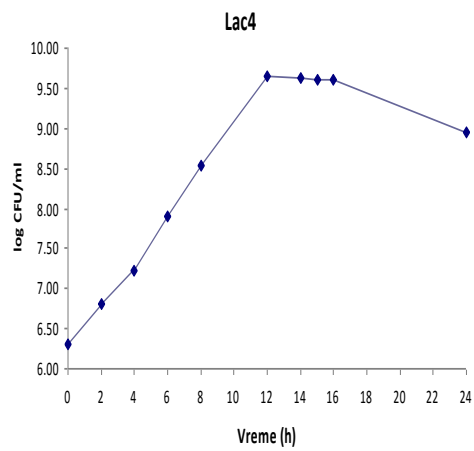
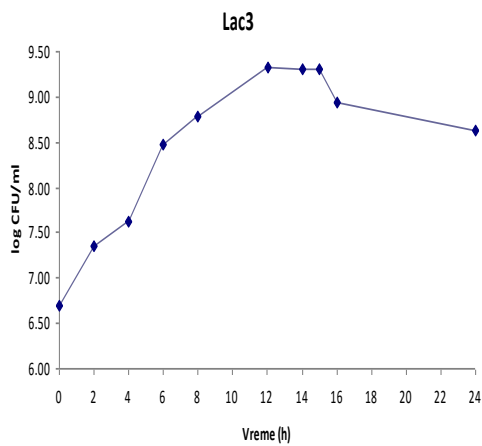
4.5.6. Proteolitička aktivnost izolovanih sojeva laktobacila

Proteolitička aktivnost izolovanih sojeva laktobacila praćena je indirektno, preko pojave svetle zone oko bunarića u podlozi sa obranim mlekom, kao posledica razgradnje kazeina od strane ispitivanih laktobacila. Jedino je izolat Lac1 pokazao proteolitičku aktivnost, sa prosvetljenom zonom od 2 mm.

4.5.7. Dinamika rasta izolovanih sojeva laktobacila

Jedna od osnovnih karakteristika svakog bakterijskog soja jeste njegova brzina rasta. Za određivanje krive rasta, sveže preonoćne kulture izolovanih sojeva laktobacila su inkubirane u MRS bujonu uz blago mešanje od 58 rpm/min. Tokom 24 sata inkubacije na temperaturi od 37°C uzimani su uzorci u kojima je određivan ukupan broj vijabilnih bakterija, a na osnovu detektovane brojnosti konstruisane su krive rasta izolovanih sojeva laktobacila (Slika 6).





Slika 6. Krive rasta izolovnih sojeva laktobacila.

Vrednosti standardne devijacije nalaze se u intervalu 0,01-0,04. Na graficima nisu prikazane, zbog toga što su značajno manje od podataka vidljivih na skali y-ose.

Kao što se može videti na slici 6, izolat Lac1 ima izraženu lag fazu; u eksponencijalnu fazu ulazi nakon 2 sata, a u stacionarnu nakon 8 sati inkubacije. Kod izolata Lac2 je slična situacija po pitanju lag faze, dok eksponencijalna faza traje duže, od drugog do dvanaestog sata inkubacije.

Kod izolata Lac3 i Lac4 se ne uočava lag faza, pošto ovi izolati odmah ulaze u eksponencijalnu fazu rasta. Oba izolata ulaze u stacionarnu fazu nakon 12 sati inkubacije.

Kod izolata Lac6 prva četiri sata inkubacije traje lag faza, zatim do osmog sata eksponencijalna faza, kada ovaj izolat ulazi u stacionarnu fazu. Izolat Lac7 ima najdužu lag fazu, koja traje sve do šestog sata. Eksponencijalna faza ovog izolata traje do dvanaestog sata inkubacije, a nakon toga sledi stacionarna faza rasta.

Izolat 5s ima dugu lag fazu (4 h) i raste mnogo sporije u odnosu na ostale izolate. Tokom inkubacije od 24 h nije uočen ulazak u stacionarnu fazu.

4.5.8. Osetljivost prema antibioticima

Osetljivost izolovanih sojeva laktobacila na najčešće upotrebljavane antibiotike je ispitivana korišćenjem antibiogram tableta. Prekonoćne kulture sojeva su zasejavane na ploče MRS agara, a onda su na njih dodavane antibiogram tablete i tako pripremljene ploče su inkubirane.

Dobijeni rezultati (Tabela 8) pokazuju da su svi izolovani sojevi laktobacila rezistentni prema vankomicinu, amikacinu i gentamicinu. Izolati humanog porekla su rezistentni i prema streptomycinu, kanamicinu i neomicinu, dok je izolat 5s poreklom iz sira osetljiv na ove antibiotike. Izolati Lac6 i 5s su rezistentni na penicilin, izolati Lac1 i Lac2 su prema ovom antibiotiku pokazali umerenu osetljivost, dok su izolati Lac3, Lac4 i Lac7 na njega osetljivi. Ispitivana je osetljivost i prema ampicilinu i ceftriaksonu, kao koji su takođe inhibitori sinteze ćelijskog zida. Svi ispitivani izolati su bili osetljivi prema ovim antibioticima, sa izuzetkom Lac3, Lac4, Lac7 i 5s koji su bili rezistentni na ceftriakson. Svi ispitivani izolati su osetljivi prema tetraciklinu (osim izolata 5s koji je umereno osetljiv i izolata Lac7 koji je rezistentan), eritromicinu (osim izolata Lac7 koji je umereno osetljiv) i hloramfenikolu (osim izolata Lac7 koji je rezistentan). Iz grupe antibiotika koji inhibiraju

sintezu nukleinskih kiselina, izolovani sojevi su pokazali rezistenciju prema norfloksacinu, a osetljivost prema rifampicinu.

Tabela 8. Osetljivost izolovanih sojeva laktobacila na antibiotike

Antibiotik	Prečnik zone inhibicije (mm)						
	Lac1	Lac2	Lac3	Lac4	Lac6	Lac7	5s
Vancomicin (30 µg)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Amikacin (30 µg)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Streptomycin (30 µg)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	27,00
Gentamicin (30 µg)	8,67±1,15	11,33±1,15	0,00	10,00±0,00	0,00	0,00	12,00
Kanamycin (30 µg)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	33,00
Neomicin (30 µg)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	34,00
Penicilin (6 µg)	16,00±0,00	17,67±1,53	21,67±1,53	24,67±0,58	13,00±1,73	31,33±1,15	13,00
Ampicilin (10 µg)	30,67±1,15	31,33±1,15	30,00±0,00	31,33±1,15	31,33±1,15	29,33±1,15	30,00
Ceftriakson (30 µg)	32,33±0,58	30,67±1,15	0,00	0,00	30,67±1,15	0,00	0,00
Tetraciklin (30 µg)	27,33±1,15	28,00±0,00	30,67±1,15	30,00±0,00	31,33±1,15	0,00	18,00
Eritromicin (15 µg)	38,00±0,00	36,67±1,15	30,67±1,15	30,00±0,00	30,00±2,00	16,67±1,15	34,00
Hloramfenikol (30 µg)	31,33±0,58	31,33±1,15	30,67±1,15	32,33±0,58	30,67±1,15	14,33±1,53	25,00
Norfloksacin (10 µg)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	12,00	0,00
Rifampicin (5 µg)	31,33±1,15	27,67±1,53	27,67±0,58	28,00±0,00	25,67±0,58	21,33±1,15	22,00

Rezultati predstavljaju srednje vrednosti dobijene iz 3 nezavisna eksperimenta: osetljiv (zeleno obojen): $d \geq 21$ mm, umereno osetljiv (žuto obojen): $d = 16-20$ mm, rezistentan (crveno obojen): $d \leq 15$ mm

4.5.9. Osetljivost izolovanih sojeva laktobacila na enzime

Da bi mogli da ostvaruju svoju funkciju i doprinose zdravlju domaćina, laktobacili moraju da zadrže svoju vijabilnost tokom prolaska kroz kompletan gastrointestinalni trakt čoveka gde su izloženi dejstvu različitih hidrolitičkih enzima (α amilaza u ustima, pepsin u želucu, tripsin i himotripsin u intestinumu).

Otpornost izolovanih sojeva laktobacila je ispitivana prema sledećim enzimima: α amilaza, lizozim, himotripsin, tripsin, pronaza E i katalaza. Testirane su koncentracije 1

mg/mL; 2,5 mg/mL i 5 mg/mL svih nabrojanih enzima. Ni jedan od izolovanih sojeva laktobacila nije pokazao osetljivost ni prema jednom od ispitivanih enzima.

4.5.10. Tip i sadržaj organskih kiselina u bezćelijskim supernatantima izolovanih sojeva laktobacila

Za određivanje tipa i sadržaja izabranih organskih kiselina korišćena je HPLC metoda. U tu svrhu izolati su gajeni u MRS bujonu tokom 24h, a zatim su bakterije istaložene centrifugiranjem, a za detekciju je korišćen profiltrirani supernatant (Tabela 9).

Tabela 9. Sadržaj organskih kiselina u supernatantima izolovanih sojeva laktobacila

Organska kiselina (g/L)	Lac1	Lac2	Lac3	Lac4	Lac6	Lac7	5s
Mlečna kiselina	14,91	13,50	13,61	13,40	14,02	17,71	10,04
Buterna kiselina	14,57	23,13	19,26	20,89	15,69	16,40	nt

nt - nije testirano

Odgovarajući hromatogrami su dati u Prilogu 9.

4.6. Probiotske osobine izolovanih sojeva laktobacila

Prvi korak u odabiru potencijalnih probiotskih sojeva su *in vitro* istraživanja kao dobar pokazatelj prisustva probiotskih svojstava, koja bi nakon toga trebalo da se potvrde i u *in vivo* uslovima. U skladu sa preporukama FAO/WHO (2002) u ovu svrhu je potrebno ispitati toleranciju na kiselu sredinu i prisustvo žučnih soli, spektar antimikrobnog dejstva i produkciju antimikrobnih supstanci, kao i sposobnost adhezije sojeva, potencijalnih probiotika, na crevni epitel.

4.6.1. Rezistencija na niske vrednosti pH

Za prolazak bakterija kroz gastrointestinalni trakt veoma je važna rezistencija na niske pH vrednosti. Zato je praćena dinamika rasta na niskim pH vrednostima MRS bujona.

Dobijeni rezultati (Tabela 10) su pokazali da su svi izolovani sojevi laktobacila tolerantni na niske pH vrednosti sredine, ali u različitoj meri. Najveći stepen rezistencije na

kiselu sredinu pokazuje izolat Lac6, a najmanji izolat Lac4. Procenat preživljavanja na pH 2 je u slučaju izolata Lac4 37,8%, dok je procenat preživljavanja ostalih izolata veći od 60% (61,4-84,3%). Procenat preživljavanja na pH 3 je u slučaju izolata Lac4 50,4%, dok je kod ostalih izolata procenat preživljavanja veći od 74%. Na pH 4 procenat preživljavanja izolata Lac4 je 57,3%, dok je za ostale ispitivane izolate veći od 89%.

4.6.2. Tolerancija na prisustvo žučnih soli

Još jedan važan kriterijum u odabiru probiotskih sojeva je njihova otpornost na prisustvo žučnih soli. Ova osobina izolovanih sojeva laktobacila je ispitivana praćenjem rasta laktobacila u medijumu koji je sadržao 0,5%; 1% i 2% žučnih soli.

Dobijeni rezultati (Tabela 11) su pokazali da su svi izolovani laktobacili tolerantni na prisustvo žučnih soli u svim ispitivanim koncentracijama. Procenat preživljavanja u prisustvu žučnih soli u koncentraciji od 0,5% i 1,0% je kod svih ispitivanih izolata veći od 88%, dok je pri koncentraciji od 2% nešto niži (najmanje 79,1%).

Tabela 10. Preživljavanje izolovanih sojeva laktobacila na niskim vrednostima pH

Izolati	Sati	V ^a pH=2	R ^b	%S ^c	V ^a pH=3	R ^b	%S ^c	V ^a pH=4	R ^b	%S ^c
Lac1	0	8,153±0,022			8,161±0,037			8,162±0,018		
	2	6,982±0,018	1,171		7,491±0,013	0,671		7,961±0,011	0,201	
	4	5,551±0,015	2,602	68,1%	6,111±0,042	2,050	74,9%	7,447±0,025	0,715	91,2%
Lac2	0	8,146±0,014			8,145±0,022			8,146±0,006		
	2	7,563±0,010	0,583		7,677±0,007	0,468		7,996±0,004	0,150	
	4	5,002±0,006	3,144	61,4%	7,352±0,026	0,793	90,3%	7,990±0,002	0,156	98,1%
Lac3	0	7,073±0,011			8,179±0,016			7,072±0,010		
	2	5,373±0,014	1,700		8,015±0,030	0,163		6,644±0,007	0,428	
	4	4,492±0,010	2,581	63,5%	7,380±0,018	0,709	90,2%	6,361±0,034	0,710	89,9%
Lac4	0	7,932±0,013			7,934±0,005			7,934±0,002		
	2	3,002±0,006	4,932		5,472±0,087	2,457		5,318±0,017	2,616	
	4	3,000±0,000	4,934	37,8%	4,001±0,007	3,933	50,4%	4,544±0,014	3,390	57,3%
Lac6	0	8,193±0,017			8,193±0,017			8,192±0,031		
	2	7,747±0,004	0,446		7,956±0,007	0,237		8,169±0,011	0,024	
	4	6,909±0,006	1,284	84,3%	7,278±0,023	0,914	88,8%	8,134±0,016	0,059	99,3%
Lac7	0	8,179±0,010			7,070±0,017			8,672±0,011		
	2	7,540±0,014	0,639		6,510±0,006	0,519		8,179±0,005	0,493	
	4	6,000±0,013	2,179	73,4%	5,903±0,009	1,168	83,5%	7,910±0,003	0,762	91,2%
5s	0	6,740±0,032			6,721±0,009			7,712±0,043		
	2	5,578±0,045	1,161		6,253±0,048	0,466		7,409±0,085	0,298	
	4	3,144±0,056	3,594	53,3%	5,954±0,021	0,767	88,6%	7,388±0,077	0,321	95,75%

^a Vijabilnost izolata, izražena kao log CFU/ml.

^b Redukcija vijabilnosti, izražena kao odnos log CFU/ml dobijenih u određenom vremenu i na početku inkubacije.

^c Preživljavanje izolata, izražena kao procenat log CFU/ml.

-Rezultati predstavljaju srednju vrednost 3 nezavisna eksperimenta.

Analiza statističke značajnosti data u Prilogu 10A.

Tabela 11. Preživljavanje izolovanih sojeva laktobacila u prisustvu žučnih soli

Izolati	Vreme (h)	V ^a Žučne soli 0,5%	R ^b	%S ^c	V ^a Žučne soli 1%	R ^b	%S ^c	V ^a Žučne soli 2%	R ^b	%S ^c
Lac1	0	7,826±0,013			7,826±0,017			7,826±0,006		
	2	7,998±0,048	-0,174		7,826±0,003	0,000		7,785±0,016	0,041	
	4	8,556±0,029	-0,730	109,3%	7,342±0,014	0,484	93,8%	7,002±0,013	0,824	89,5%
Lac2	0	7,408±0,025			7,408±0,012			7,408±0,012		
	2	7,903±0,014	-0,495		7,517±0,005	-0,098		7,358±0,018	0,056	
	4	8,001±0,032	-0,593	108,0%	7,524±0,009	-0,119	101,6%	7,326±0,025	0,082	98,9%
Lac3	0	7,312±0,042			7,314±0,011			7,313±0,013		
	2	7,842±0,063	-0,531		7,591±0,020	-0,277		7,069±0,026	0,244	
	4	8,075±0,073	-0,765	110,4%	7,602±0,017	-0,299	103,9%	7,001±0,014	0,312	95,7%
Lac4	0	7,952±0,048			7,954±0,008			7,954±0,012		
	2	7,792±0,014	0,162		7,708±0,009	0,247		7,629±0,008	3,326	
	4	7,699±0,017	0,255	96,8%	7,602±0,015	0,353	95,6%	7,295±0,088	0,653	91,7%
Lac6	0	7,651±0,009			7,651±0,010			7,651±0,010		
	2	7,778±0,000	-0,127		7,613±0,007	0,038		7,380±0,025	0,270	
	4	7,812±0,033	-0,162	102,1%	7,476±0,038	0,174	97,7%	6,052±0,045	1,598	79,1%
Lac7	0	7,536±0,010			7,537±0,008			7,536±0,010		
	2	8,053±0,046	-0,518		7,477±0,013	0,060		6,663±0,023	0,873	
	4	8,321±0,035	-0,786	110,4%	7,040±0,036	0,496	93,4%	6,612±0,010	0,924	87,7%
5s	0	7,387±0,014			7,387±0,014			7,387±0,014		
	2	7,146±0,156	0,241		6,960±0,023	0,426		6,416±0,041	0,971	
	4	7,114±0,102	0,273	96,3%	6,510±0,005	0,877	88,1%	5,908±0,005	1,478	79,9%

^a Vijabilnost izolata, izražena kao log CFU/ml.

^b Redukcija vijabilnosti izražena kao odnos log CFU/ml u određenom vremenu i na početku inkubacije.

^c Preživljavanje izolata, izraženo u procentima log CFU/ml

-Rezultati predstavljaju srednju vrednost 3 nezavisna eksperimenta.

Analiza statističke značajnosti data u Prilogu 10B.

4.6.3. Preživljavanje u simuliranim uslovima gastrointestinalnog trakta

Ispitivanje otpornosti izolovanih sojeva laktobacila prilikom prolaska kroz gastrointestinalni trakt je izvršeno *in vitro*, simuliranjem uslova koji vladaju u njegovom proksimalnom, odnosno distalnom delu (želucu i duodenumu) i to u realnom vremenskom periodu koji odgovara vremenu zadržavanja hrane u njemu tokom varenja.

Procenat preživljavanja izolovanih sojeva laktobacila nakon izlaganja veštačkom želudačnom soku pH vrednosti 2 (AGF) u trajanju od 120 minuta prikazan je na Tabeli 13. Dobijeni rezultati ukazuju na to da je otpornost na uslove koji vladaju u proksimalnom delu gastrointestinalnog trakta najmanja kod izolata 5s, a najveća kod izolata Lac6 i Lac7. Dobijeni rezultati se među sobom značajno ne razlikuju, a procenat preživljavanja kod svih sojeva je veći od 79,8%.

Uzorci koji su preživeli izlaganje želudačnom soku, izloženi su dejstvu žučnih soli u veštačkom intestinalnom fluidu (AIF) u trajanju od 120 minuta. Procenat preživljavanja izolata Lac1 bio je 98,9%, izolata Lac2 98,9%, izolata Lac3 89,1%, izolata Lac4 98,4%, izolata Lac 6 98,6%, izolata Lac7 99,0% i izolata 5s 88,9% (Tabela 12). Dobijeni rezultati su pokazali da je otpornost na žučne soli najmanja kod izolata 5s i Lac3, a najveća kod izolata Lac1, Lac6 i Lac7, kod kojih je ona skoro identična (98,9-99,0%). Kod svih ispitivanih laktobacila procenat preživljavanja bio je veći od 88,9%.

Tabela 12. Preživljavanje izolovanih sojeva laktobacila u veštačkim gastrointestinalnim tečnostima

Izolati	Vreme V^a	R^b	%S^c	V^a	R^b	%S^c
	AGF			AIF		
Lac1	0	10,475±0,058		6,991±0,012		
	1	9,903±0,011	0,574	6,978±0,009	0,014	
	2	8,579±0,037	1,897	6,914±0,009	0,077	98,9%
Lac2	0	10,405±0,111		7,334±0,024		
	1	9,954±0,010	0,460	7,263±0,236	0,033	
	2	8,857±0,024	1,557	7,259±0,034	0,074	98,9%
Lac3	0	10,633±0,026		6,038±0,066		
	1	9,952±0,048	0,679	5,996±0,085	0,040	
	2	8,731±0,042	1,901	5,380±0,018	0,661	89,1%
Lac4	0	10,300±0,027		6,246±0,115		
	1	9,903±0,014	0,398	6,253±0,048	0,022	
	2	8,623±0,021	1,678	6,144±0,056	1,132	98,4%
Lac6	0	10,756±0,015		6,830±0,051		
	1	10,259±0,101	0,455	6,813±0,012	0,020	
	2	9,355±0,096	1,394	6,732±0,014	0,100	98,6%
Lac7	0	10,792±0,025		6,924±0,010		
	1	10,251±0,069	0,491	6,903±0,016	0,021	
	2	9,341±0,040	1,450	6,857±0,016	0,067	99,0%
5s	0	9,843±0,007		7,853±0,013		
	1	8,914±0,005	0,929	7,395±0,021	0,458	
	2	7,853±0,013	1,990	6,986±0,002	0,867	88,9%

^aVijabilnost izolata, izražena kao logCFU/ml.

^bRedukcija vijabilnosti, izražena kao odnos logCFU/ml u određenom vremenu i na početku inkubacije.

^cPreživljavanje izolata, izraženo u procentima logCFU/ml, u poređenju sa odgovarajućom 0 vrednošću.

-Rezultati predstavljaju srednju vrednost 3 nezavisna eksperimenta.

Analiza statističke značajnosti data u Prilogu 10C.

4.6.4. Antimikrobna aktivnost izolovanih sojeva laktobacila

Za ispitivanje spektra antimikrobnog dejstva izolovanih sojeva laktobacila korišćena je difuziona metoda (*well diffusion test*), a za indikatorske sojeve su izabrani patogeni sojevi bakterija, kvasaca i plesni, kao i sojevi laktobacila. Antimikrobnu aktivnost izolata na druge sojeve laktobacila je važno ispitati zbog procene njihovog uticaja na već prisutne laktobacile, kao korisne članove mikrobiote domaćina, kao i zbog potencijalnog korišćenja dve ili više vrsta laktobacila u jednom probiotskom preparatu.

Za test su korišćeni nepuferisani i puferisani supernatanti izolata. U prvom slučaju korišćen je nepromenjen supernatant (pH 3,5-4), dok mu je u drugom pH vrednost podešena tako da bude u opsegu 6,8-7,2. Na ovaj način supernatant je neutralisan, odnosno eliminisan je antimikrobni efekat mlečne kiseline i eventualno prisutnog vodonik peroksida. Prisustvo antimikrobnog efekta u testu sa neutralisanim supernatantom ukazalo bi na moguću produkciju bakteriocina ili bakteriocinima sličnih supstanci, od strane izolovanih sojeva laktobacila. Neposredno pred izvođenje testa, supernatanti su profiltrirani kroz sterilne mikrobiološke filtere prečnika pora 0,45 μ m.

Dobijeni rezultati (Tabela 13) pokazuju da svi ispitivani izolati imaju antimikrobno dejstvo prema pojedinim Gram pozitivnim i Gram negativnim vrstama. Izolat Lac1 je pokazao najizraženije antimikrobno dejstvo prema *M. luteus* ATCC 93419, Lac2 i Lac4 prema *B. pumillus* NCTC 8241 i *B. subtilis* ATCC 6633, Lac3 prema *S. aureus* ATCC6538-P i *B. subtilis* ATCC 6633, Lac6 prema *B. subtilis* ATCC 6633 i *E. coli* ATCC 8739, Lac7 prema *E. coli* ATCC 8739 i *S. abony* NCTC 6017 i izolat 5s prema *S. abony* NCTC 6017. Ni jedan od ispitivanih izolata nije pokazao antimikrobnu aktivnost prema *C. albicans* ATCC 10231, niti prema *A. brasiliensis* ATCC 16404. Takođe, rezultati su pokazali da izolovani laktobacili nemaju antimikrobni efekat prema drugim laktobacilima.

U testu sa neutralisanim supernatantima ni jedan od izolovanih sojeva laktobacila nije pokazao antimikrobnu aktivnost ni prema jednom od ispitivanih mikroorganizama. Dobijeni rezultati ukazuju na to da je antimikrobna aktivnost najverovatnije posledica dejstva mlečne kiseline.

Tabela 13. Antimikrobna aktivnost izolovanih sojeva laktobacila

Indikatorski sojevi	Zona inhibicije (mm) ^a						
	Lac1	Lac2	Lac3	Lac4	Lac6	Lac7	5s
<i>S. aureus</i> ATCC 6538-P	0,0	0,0	3.7±0.2	0,0	3.5±0.1	3.5±0.4	1.8±0.2
<i>M. luteus</i> ATCC 93419	4,1±0,1	3,6±0,2	3,4±0,1	2,7±0,1	3,7±0,2	3,0±0,2	2,3±0,2
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	3,2±0,3	3,3±0,3	3,2±0,3	3,4±0,1	3,5±0,1	3,0±0,2	0,0
<i>B. pumilis</i> NCTC 8241	3,5±0,3	3,7±0,3	3,4±0,2	3,6±0,1	3,6±0,2	4,0±0,2	0,0
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	0,0	4,0±0,2	3,8±0,3	3,7±0,1	3,9±0,2	3,0±0,3	1,2±0,1
<i>L. rhamnosus</i> ATCC7469	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>L. lactis</i> ATCC 7830	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	2,7±0,3	0,0	0,0	3,1±0,1	3,7±0,1	4,0±0,2	2,2±0,3
<i>E. coli</i> ATCC 8739	2,6±0,2	2,8±0,2	0,0	2,8±0,2	3,9±0,3	4,2±0,3	2,8±0,1
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 10031	3,4±0,2	3,5±0,3	0,0	3,3±0,2	3,7±0,2	3,8±0,2	2,5±0,2
<i>S. abony</i> NTCC 6017	3,2±0,3	3,3±0,2	3,1±0,1	3,0±0,2	3,7±0,1	4,5±0,3	2,8±0,3
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

^aZona inhibicije je merena od ivice bunara do ivice zone inhibicije. Rezultati predstavljaju srednju vrednost 3 nezavisna eksperimenta.

4.6.5. Hidrofobnost površine ćelija izolovanih sojeva laktobacila

Za ispitivanje hidrofobnosti površine ćelija izolovanih sojeva laktobacila korišćena je MATH metoda. Ovom metodom se određuje odnos broja ćelija koje se vežu za organski rastvarač i broja ćelija koje ostaju u vodenoj fazi. Kao nepolarni rastvarač korišćen je heksadekan.

Prema dobijenim rezultatima (Tabela 14) najmanju hidrofobnost je pokazao izolat 5s (47,26%). Izolat Lac7 pokazuje srednji stepen hidrofobnosti (66,51%), dok su ostali ispitivani izolati pokazali visok stepen hidrofobnosti (preko 70%). Test je izveden i na soju *L. rhamnosus* ATCC 7469, a stepen hidrofobnosti koji je on pokazao je iznosio svega 5,67%.

Tabela 14. Hidrofobnost izolovanih sojeva laktobacila

Izolat	%Ad
Lac1	70,56±0,41
Lac2	77,63±0,33
Lac3	76,65±0,41
Lac4	80,51±0,14
Lac6	78,26±0,26
Lac7	66,51±0,59
5s	47,26±2,30

Rezultati predstavljaju srednju vrednost 4 nezavisna eksperimenta.
Analiza statističke značajnosti data u Prilogu 11.

4.6.6. Sposobnost autoagregacije i koagregacije izolovanih sojeva laktobacila

Sposobnost autoagregacije izolovanih sojeva laktobacila ispitivana je spektrofotometrijski, upoređivanjem vrednosti apsorbanci na 600 nm bakterijskih suspenzija na početku i nakon određenog perioda inkubacije bez agitacije. Na osnovu dobijenih vrednosti optičke gustine na početku i na kraju inkubacionog perioda izračunat je

procenat agregiranih ćelija. Uočeno je da procenat agregacije raste sa vremenom. Dobijeni rezultati (Tabela 15) pokazuju da je najviši stepen autoagregacije nakon 24 sata uočen kod izolata Lac6 (73,31%).

Na sličan način ispitana je i sposobnost koagregacije, pravljenjem mešovutih bakterijskih suspenzija i merenjem vrednosti apsorbanci na početku i na kraju inkubacionog perioda. Ispitivana je sposobnost koagregacije izolovanih sojeva laktobacila sa 2 patogena soja *L. monocytogenes* ATCC 19111 i *E. coli* ATCC 8739. Rezultati su pokazali da svi izolati koagregiraju sa oba test soja, ali je stepen koagregacije varirao zavisno od ispitivanih sojeva laktobacila i patogena (Tabela 15).

U testu sa sojem *L. monocytogenes* ATCC 19111 najviši stepen koagregacije je pokazao izolat Lac6 (55,49%), a najniži izolat Lac4 (16,48%). Sličan stepen koagregacije su pokazali izolati Lac2 i Lac3 (35,11%, 33,33%).

U testu sa sojem *E. coli* ATCC 8739 najviši stepen koagregacije je pokazao izolat Lac3 (47,55%), a najniži izolati 5s i Lac1 (17,85 % i 22,98%). Sličan stepen koagregacije su pokazali izolati Lac2, Lac6 i Lac7 (44,37%, 42,44%, 45,41%).

Tabela 15. Stepen autoagregacije i koagregacije izolovanih sojeva laktobacila.

Izolat	Vreme (h)	Autoagregacija (%)	Koagregacija sa <i>L. monocytogenes</i> (%)	Koagregacija sa <i>E. coli</i> (%)
Lac1	2	19,52±0,21	3,90±0,08	2,16±0,15
	4	31,67±0,22	24,57±0,16	9,37±0,29
	24	53,70±0,45	28,67±0,39	22,98±0,32
Lac2	2	18,06±0,32	13,56±0,18	4,32±0,17
	4	34,43±0,60	13,79±0,35	16,30±0,01
	24	44,99±0,48	35,11±0,32	44,37±0,13
Lac3	2	17,53±0,38	12,40±0,14	7,45±0,15
	4	35,29±0,67	25,69±0,04	9,68±0,18
	24	46,51±0,45	33,33±0,14	47,55±0,30
Lac4	2	13,07±0,36	3,52±0,22	5,09±0,15
	4	21,13±0,57	7,41±0,18	7,93±0,04
	24	52,60±0,40	16,48±0,03	27,86±0,15
Lac6	2	13,05±0,31	10,11±0,30	3,74±0,08
	4	29,53±0,32	10,44±0,23	7,90±0,04
	24	73,31±0,57	55,49±0,27	42,44±0,60
Lac7	2	23,38±0,12	11,62±0,23	1,33±0,14
	4	24,80±0,28	12,01±0,39	13,50±0,14
	24	70,26±0,59	22,65±0,17	45,41±0,43
5s	2	5,87±0,86	4,15±0,11	1,10±0,15
	4	19,84±0,99	5,27±0,12	2,84±0,04
	24	33,70±1,03	17,51±0,28	17,85±0,02

Rezultati predstavljaju srednju vrednost 4 nezavisna eksperimenta.
 Analiza statističke značajnosti data u Prilogu 12.

4.6.7. Sposobnost adhezije izolovanih sojeva laktobacila na HCT 116 ćelijsku liniju

Sposobnost adhezije laktobacila na humane ćelije praćena je *in vitro* korišćenjem ćelijske linije kolorektalnog kancera HCT 116, kao modela intestinalnog epitela. U literaturi adhezija se uglavnom predstavlja kao odnos broja adheriranih bakterija i ukupnog broja unetih bakterija. Međutim, tokom izvođenja eksperimenata primećen je znaćajan gubitak broja bakterija, odnosno zbir broja adheriranih i neadheriranih bakterija je bio uvek znaćajno manji od broja unetih bakterija na početku eksperimenta. U pokušaju da ustanovimo razloge, ispitan je efekat procesa tripsinizacije monosloja humanih ćelija, koji je neophodan korak u eksperimentalnom protokolu. Dobijeni rezultati su ukazali na znaćajan baktericidni efekat procesa tripsinizacije (Tabela 16), pri ćemu se procenat preživljavanja izolata kretao od 37,20 do 65,57%.

Tabela 16. Preživljavanje izolovanih sojeva laktobacila nakon tripsinizacije

Izolat	Inokulum CFU/ploći ^a	Nakon tripsinizacije CFU/ploći ^b	%S ^c
Lac1	232,50±3,54	86,50±3,54	37,20
Lac2	161,00±4,24	62,50±3,54	38,82
Lac3	176,00±2,83	81,00±1,41	46,02
Lac4	103,00±2,83	40,00±1,41	38,83
Lac6	142,00±4,24	56,50±2,12	39,79
Lac7	146,00±2,83	74,00±4,24	50,68
5s	20,33±3,06	13,33±1,53	65,57

^aRazblaženje 10⁻⁵

^b Razblaženje 10⁻⁵

^c Preživljavanje izolata nakon procesa tripsinizacije
Rezultati predstavljaju srednju vrednost 3 nezavisna eksperimenta.

Imajući to u vidu procenat adhezije u našim eksperimentima je računat kao odnos ukupnog broja adheriranih bakterija i sume adheriranih i neadheriranih bakterija. Dobijeni rezultati ukazuju da ispitivani izolati poseduju umeren adhezioni potencijal (Tabela 17). Najveći procenat adhezije je uočen kod izolata 5s, dok je kod izolata humanog porekla on najveći kod izolata Lac2, Lac6 i Lac7.

Tabela 17. Adhezija izolovanih sojeva laktobacila na HCT 116 ćelijsku liniju

Izolat	Adherirane ćelije CFU/ploči ^a	Neaderirane ćelije CFU/ploči ^b	%Ad ^c
Lac1	78,50±3,54	127,00±2,52	5,82
Lac2	100,00±2,83	100,33±2,52	9,06
Lac3	48,50±3,54	69,00±3,61	6,57
Lac4	55,50±4,95	123,00±3,00	4,32
Lac6	66,00±2,83	85,00±5,00	7,21
Lac7	81,00±4,24	99,00±2,00	7,56
5s	10,44±0,51	73,78±1,92	12,40

^a Razblaženje 10⁻⁴

^b Razblaženje 10⁻⁵

^c Adhezija izolata

Rezultati predstavljaju srednju vrednost 3 nezavisna eksperimenta.

Analiza statističke značajnosti data u Prilogu 13.

5. Diskusija

Gastrointestinalni trakt čoveka je kompleksan sistem, kako sa anatomskog, tako i sa funkcionalnog stanovišta. To je prostor sa različitim ekološkim nišama pogodnim za kolonizaciju mikroorganizmima koji omogućava pravilan proces prerade unešene hrane (varenje), sa ukupnom površinom koja iznosi 150-400 m² (Chin *i sar.*, 2000; Rajlić-Stojanović *i sar.*, 2007). Pretpostavlja se da gastrointestinalni trakt odraslog čoveka ima do 10¹⁴ živih bakterija, što je 10 puta više od ukupnog broja ćelija čovekovog tela. Neoštećen intestinalni epitel sa optimalnom mikrobiotom predstavlja veoma važnu barijeru za kolonizaciju patogenim mikroorganizmima, ali i za antigene i opasne materije koje se mogu naći u lumenu creva (Rajlić-Stojanović *i sar.*, 2007; He *i sar.*, 2010)

Deo mikrobiote gastrointestinalnog trakta su i laktobacili, kod kojih su uočene i opisane probiotske osobine (Fernandez *i sar.*, 2003; Šušković *i sar.*, 2009). Probiotici su definisani kao “živi mikroorganizmi koji, kada se unesu u odgovarajućim količinama, doprinose zdravlju domaćina“ (FAO/WHO, 2002). Postoje čvrsti naučni dokazi da održavanje zdrave mikrobiote doprinosi zaštiti od različitih gastrointestinalnih tegoba, poput infekcija ili zapaljenja. Različiti autori (Senok *i sar.*, 2005; Szajewska *i sar.*, 2007; Bansal i Garg, 2008; Williams, 2010) su pokazali efikasnost probiotika kao alternative antibioticima u tretmanu enteričnih infekcija ili smanjenju intenziteta dijareje, koja je posledica korišćenja antibiotika. Bakterije sa probiotskim osobinama suprimiraju rast potencijalno patogenih mikroorganizama i pojačavaju prirodne odbrambene mehanizme organizma.

Duga tradicija upotrebe bakterija mlečne kiseline, u koje se ubrajaju i laktobacili, bez štetnog uticaja na zdravlje čoveka, obezbedila im je GRAS (Generally Regarded As Safe) status prema US FDA, odnosno QPS (Qualified Presumption of Safety) status prema legislativi Evropske Unije. Odabir potencijalnih probiotskih sojeva temelji se na *in vitro* istraživanjima koja su dobar pokazatelj za utvrđivanje probiotskih svojstava koja bi bakterijski sojevi pokazali u *in vivo* uslovima. U ovu svrhu se koriste različiti statički i dinamički modeli koji simuliraju uslove u gastrointestinalnom traktu (De Boever *i sar.*, 2000).

Prednost probiotskih sojeva autohtonih za čoveka potiče iz činjenice da su izolovani iz okruženja koje je slično ekosistemu čiji će deo postati onda kada se unesu u

organizam korisnika. Ova osobina im daje veću mogućnost uspešne adaptacije i visok stepen upotrebljivosti njihovih korisnih karakteristika (Marques *i sar.*, 2010). Mesto delovanja probiotika je gastrointestinalni trakt, čije je razvijanje i sastav pod velikim uticajem načina ishrane, koji se razlikuje kod različitih osoba, ali i među različitim geografskim regionima. Zbog toga treba voditi računa i o geografskom poreklu probiotskih bakterija koje su u upotrebi, obzirom da je način ishrane u velikoj meri određen geografskim područjem, odnosno raspoloživim namirnicama i dijetetskim navikama pojedinih etničkih grupa i zajednica. Komercijalno dostupne probiotske kulture su uglavnom poreklom iz zapadnih zemalja ili Japana. U odnosu na efekte koje pokazuju u zemaljama porekla, stepen kolonizacije i blagotvorni efekti su po pravilu manji kada se primenjuju u prevenciji i tretmanu gastrointestinalnih oboljenja pacijenata drugih geografskih područja, što je utoliko izraženije, ukoliko su razlike u ishrani veće. Smatra se da autohtoni sojevi mogu da pokažu intenzivniju i dugotrajniju kolonizaciju gastrointestinalnog epitela, kao i da su bolja opcija za efikasnije delovanje u supresiji različitih intestinalnih tegoba (Ghosh *i sar.*, 2012).

Kako je ogromna većina probiotskih preparata komercijalno dostupnih na srpskom tržištu stranog porekla, smatramo opravdanom potragu za novim probiotskim sojevima autohtonim za ovo područje i upravo to je bio motiv za istraživanje obuhvaćeno ovim radom. Njegov cilj je bilo izolovanje, identifikacija i ispitivanje probiotskih osobina novih izolata laktobacila autohtonih za područje Srbije, kako bi se među njima izdvojili izolati sa potencijalom za proizvodnju novog probiotskog preparata. Najpre su iz različitih izvora izolovani novi sojevi bakterija, za koje je utvrđeno da pripadaju laktobacilima, a zatim su oni okarakterisani i ispitivana su njihova probiotska svojstva.

Ispitivanja su započeta sa 130 bakterijska izolata, a pripadnost rodu *Lactobacillus* je utvrđena kod njih 8. Relativno mali udeo laktobacila u ukupnom broju izolovanih bakterija u skladu je sa literaturnim podacima da laktobacili predstavljaju samo mali deo humane mikrobiote gastrointestinalnog trakta (Kimura *i sar.*, 1997; Sghir *i sar.*, 2000; Tannock *i sar.*, 2000; Dal Bello *i sar.*, 2003).

Kako bi se analizirao probiotski potencijal izolovanih laktobacila korišćeni su različiti testovi, sa ciljem da pokažu i kvantifikuju prisustvo željenih karakteristika. Kako

bi se mogle pratiti i porediti potencijalne probiotske osobine, kao i eventualni uticaj porekla izolata, za ispitivanja su izabrani izolati laktobacila izolovani iz gastrointestinalnog trakta beba (Lac1, Lac2, Lac3, Lac4, Lac5, Lac6, Lac7) i iz domaćeg sira (5s). Međutim, treba imati u vidu da jasno razgraničenje porekla izolata laktobacila nije moguće, s obzirom na to da većina vrsta laktobacila nije autohtona za gastrointestinalni trakt čoveka, iako ga naseljavaju. S druge strane, sojevi izolovani iz humanog gastrointestinalnog traka se koriste za proizvodnju kako probiotskih preparata, tako i za proizvodnju mlečno-kiselinskih proizvoda (Corcoran *i sar.*, 2005). Zato je veoma važno ispitati ekološke karakteristike svakog soja, uključujući i njihovu interakciju sa domaćinom.

Kako je osnovni preduslov za probiotsku primenu bakterija njihova adekvatna identifikacija, dobijeni izolati su najpre pomoću niza morfoloških, fizioloških i biohemijskih testova identifikovani do nivoa roda. Zbog velike heterogenosti ovog roda, fenotipska identifikacija zasnovana na fermentaciji šećera često dovodi do dvosmislenih rezultata, tako da je identifikacija do nivoa vrste klasičnim mikrobiološkim metodama često nemoguća (Felten *i sar.*, 1999; van Kerhoven *i sar.*, 2008). Rezultati fenotipskih metoda uopšte, pa tako i API50 CH, mogu biti teški za interpretaciju ili mogu davati dvosmislene rezultate, zbog čega zahtevaju dodatnu potvrdu. Ograničenja fenotipskih metoda su posledica promenljivosti bakterija i uslova spoljašnje sredine koji mogu uticati na gensku ekspresiju (Bezekova *i sar.*, 2013).

Iako su komercijalni kitovi za identifikaciju laktobacila, poput API 50 CH u širokoj upotrebi, pokazalo se da ovako dobijeni rezultati nisu uvek precizni. Razvojem metoda zasnovanih na DNK homologiji, uočeno je da nekoliko vrsta koje su fenotipski identifikovane kao *L. acidophilus*, u stvari predstavljaju 6 različitih vrsta koje se biohemijski međusobno ne mogu razlikovati. Ove su vrste potom genotipski identifikovane kao *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. amylovorus*, *L. gallinarum*, *L. gasseri* i *L. jensenii* (Pavlova *i sar.*, 2002). Zbog svega ovoga, smatra se da samo kombinacija fenotipskih i genotipskih metoda može pružiti najpouzdanije i najtačnije rezultate identifikacije laktobacila, pri čemu se prednost daje genotipskim metodama, jer one direktno ispituju genetički materijal i razlike u genskoj ekspresiji ne utiču na dobijene rezultate.

Postoji nekoliko odgovarajućih molekularnih metoda za identifikaciju laktobacila, kao što su nasumična amplifikacija polimorfne DNK (*randomly amplified polymorphic DNA*, RAPD analiza), restrikciona analiza amplifikovanih regiona ribozomalne DNK (*amplified ribosomal DNA restriction analysis*, ARDRA analiza), ribotipizacija (*ribotyping*) i sekvenciranje 16s rRNK gena (Velraeds *i sar.*, 1996; Maidak *i sar.*, 2001; Zhou *i sar.*, 2004). Koliko identifikacija laktobacila do nivoa vrsta može biti komplikovana vidi se u radu Brolaazo *i sar.* (2011) koji su pokazali da je čak i referentni soj korišćen za standardizaciju Multiplex PCR bio biohemijski pogrešno identifikovan.

Kao metodu izbora za genotipsku identifikaciju izolovanih sojeva laktobacila odlučili smo se za sekvenciranje 16s rRNK gena, kao najčešće korišćenu metodu u ove svrhe. Dobijeni rezultati pokazuju da se fenotipska identifikacija ne poklapa u potpunosti sa genotipskom. Identični rezultati su dobijeni kod izolata Lac 4 koji je identifikovan kao *L. paracasei*, kao i kod izolata Lac6 i Lac7, koji su identifikovani kao *L. plantarum*. Genotipskom identifikacijom pokazano je da vrsti *L. plantarum* pripadaju i izolati Lac1 i Lac2 (fenotipski identifikovani kao *L. fermentum* i *L. celobiosus*). Pripadnost vrsti *L. casei* je identifikovana kod izolata Lac3 i 5s, dok su oni fenotipski okarakterisani kao *L. pentosus* i *L. paracasei/casei*. Izolat Lac5 je fenotipski identifikovan kao *L. acidophilus*, a genotipski kao *L. gasseri*. Zajedno sa još nekoliko fenotipski veoma sličnih vrsta (*L. acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. crispatus*, *L. gallinarum* i *L. johnsonii*) *L. gasseri* pripada *L. acidophilus* grupi (Berger *i sar.*, 2007). Stoga nije neobično što fenotipske metode nemaju mogućnost jasnog razlikovanja ovih vrsta.

Još tokom preliminarne identifikacije, a i kasnije prilikom ispitivanja osnovnih osobina izolata roda *Lactobacillus*, izolat Lac5 je pokazao slab porast na čvrstoj podlozi i time u značajnoj meri otežao izvođenje eksperimenata. Zato je ovaj izolat isključen iz daljih ispitivanja.

Da bi za neku vrstu moglo da se tvrdi da ima probiotska svojstva i da kao takva može da pokaže pozitivan uticaj na ljudsko zdravlje, ona mora da zadovolji nekoliko kriterijuma. Uputstvo FAO/WHO (2002) za procenu probiotika za humanu upotrebu kaže da bi probiotici trebalo da budu u stanju ne samo da prežive prolazak kroz digestivni trakt, već da imaju mogućnost da se tu i razmnožavaju. Pre svega, moraju da imaju sposobnost

preživljavanja tokom prolaska kroz gornji deo gastrointestinalnog sistema (usna duplja i jednjak). Osim toga, poznato je da je veći deo gastrointestinalnog trakta kisela sredina, tako da je neophodno da probiotski sojevi poseduju i toleranciju na niske pH vrednosti, a zatim moraju biti otporni na želudačne enzime. Kada dospeju u intestinum moraju biti tolerantni prema žučnim solima, štaviše, moraju imati sposobnost da rastu u prisustvu žuči. Alternativno, oni se mogu unositi u organizam zajedno sa nosačem koji će im omogućiti da prežive prolazak kroz želudac i izlaganje žučnim solima.

Nakon konzumiranja probiotika, prvi stresni faktor za probiotike su enzimi prisutni u usnoj duplji (amilaze, lizozim) kojima su izloženi u kratkom vremenskom periodu (Havenaar *i sar.*, 1992). Izolovanim sojevima laktobacila je ispitivana otpornost prema dejstvu α -amilaze i lizozima, i svi su pokazali otpornost prema prisustvu ovih enzima u koncentraciji višestruko većoj od fiziološke. Sledeća prepreka za bakterije koje dospevaju u intestinalni trakt je nizak pH u želucu. Vreme zadržavanja može biti manje od jednog sata do nekoliko sati, zavisno od fiziologije domaćina, kao i vrste i količine unete hrane.

Vrednosti pH u želucu se kreću od 1,5 kada je zapremina hrane mala, pa do 5,5 kada je zapremina hrane velika (Giannella *i sar.*, 1972; Peterson *i sar.*, 1989). Svi izolovani sojevi laktobacila su pokazali sposobnost rasta i razmnožavanja na pH vrednostima u intervalu 2-4, što im daje mogućnost preživljavanja u želucu. Dodatno, ispitano je preživljavanje izolata laktobacila u veštačkom želudačnom soku (pH 2) i to izlaganjem koje bi vremenski odgovaralo periodu njihovog realnog zadržavanja u želucu (120 minuta). Procenat preživljavanja se kretao od 79-87%, što pokazuje visoku i međusobno sličnu otpornost svih testiranih izolata na uslove koji vladaju u proksimalnom delu gastrointestinalnog sistema.

Za one bakterije koje uspeju da prežive uslove u želucu, sledeći stresni faktor je sekrecija žuči i žučnih soli u gornjim delovima intestinalnog trakta (duodenumu). Koncentracija žučnih soli u duodenumu se kreće od 0,15 do 0,6%, u zavisnosti od unosa hrane (Fernandez *i sar.*, 2003), tako da je u ovom radu posebno ispitivana tolerancija na povišene koncentracije žučnih soli. Rezultati su pokazali da svi ispitivani izolati pokazuju toleranciju na prisustvo žučnih soli i u koncentraciji 4 puta većoj u odnosu na fiziološku.

Osim toga, kada su uzorci izolata koji su preživeli uslove proksimalnog dela gastrointestinalnog trakta (veštački želudačni sok) izloženi dejstvu veštačkog intestinalnog soka, odnosno žučnim solima u trajanju od 120 minuta, procenat preživljavanja bio je veći od 88%, a kod izolata Lac1, Lac2, Lac4, Lac 6 i Lac7 on je iznosio gotovo 100%. Poređenjem dobijenih rezultata sa ranije objavljenim vrednostima za slične izolate laktobacila (Zavišić *i sar.*, 2012) vidi se da su svi laktobacili izolovani u ovom radu izrazito otporni na uslove prisutne u gastrointestinalnom sistemu.

U intestinumu probiotici, pored žučnih soli, treba da prežive i dejstvo pankreasnog soka, koji sadrži proteaze i druge enzime (Ouwehand i Salminen, 2003). U skladu sa tim, u ovom radu je ispitivana osetljivost izolovanih sojeva laktobacila na enzime: pronaza E, katalaza, tripsin i himotripsin i to u koncentracijama od 1,0 µg/mL, 2,5 µg/mL i 5,0 µg/mL. Rezultati su pokazali da ni jedan od ispitivanih izolata nije osetljiv na ove enzime.

U gastrointestinalnom traktu su prisutne i određene supstance sa toksičnim efektom, poput fenola koji mogu imati bakteriostatičko dejstvo na laktobacile (Pan *i sar.*, 2009). Fenol je jedan od produkata intestinalne mikrobiote i proizvode ga različite bakterijske vrste, ali može nastati i kao posledica deaminacije nekih aromatičnih aminokiselina poreklom iz hrane ili deaminacijom već prisutnih proteina u gastrointestinalnom traktu (Šušković *i sar.*, 1997). Detoksikaciju fenola i drugih toksičnih supstanci obavlja jetra, pre njihovog izlučivanja u urin i feces (Rašić i Kurmann, 1983). Paulo (1991) je uočio odsustvo laktobacila na podlogama sa 0,5% fenola, dok su Xanthopoulos *i sar.* (2000) prijavili bakteriostatički efekat na koncentraciji fenola od 0,4%. Obzirom na konstantnu prisutnost fenola u gastrointestinalnom traktu i na njegovo inhibitorno dejstvo na bakterije, tolerancija na prisustvo fenola daje laktobacilima, potencijalnim probioticima, veće mogućnosti preživljavanja i ispoljavanja korisnih osobina. Izolati ispitivani u ovom radu su otporni na prisustvo fenola u koncentraciji 0,4%, s tim da je izolat Lac2 preživljavao, iako u malom broju, čak i koncentraciju od 1%.

Antimikrobna aktivnost probiotskih bakterija, posebno prema patogenim vrstama mikroorganizama, važno je funkcionalno svojstvo probiotskih bakterija, koje im osigurava prednost u kompeticiji za mesta vezivanja i hranjive materije u gastrointestinalnom traktu. Izraženo antagonističko dejstvo prema patogenim mikroorganizmima, kao što su

Helicobacter pylori, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* i *Clostridium difficile*, detektovano je za mnoge probiotske sojeve, što značajno doprinosi stabilizaciji i moduliranju intestinalne mikrobiote (Šušković *i sar.*, 1997; Reid i Bruce, 2001; Servin, 2004).

Antimikrobna aktivnost laktobacila je posledica sinteze supstanci poput organskih kiselina, vodonik peroksida, etanola, ali i bakteriocina (Servin, 2004). Posebna pažnja je poslednjih godina posvećena bakteriocinima, s obzirom na njihov značajan udeo u antimikrobnom potencijalu bakterija mlečne kiseline (Jamuna i Jeevaratnam, 2004).

U ovom radu je ispitivana antimikrobna aktivnost nativnog supernatanta izolovanih sojeva laktobacila prema Gram pozitivnim i Gram negativnim bakterijama, među kojima su i neki izazivači bolesti kod ljudi, kao i prema kvascima i plesnima. Izolati Lac6 i Lac7 su bili efikasni prema svim ispitivanim bakterijskim sojevima, dok je kod izolata Lac1, Lac2, Lac3, Lac4 i 5s uočeno odsustvo antimikrobne aktivnosti prema nekim bakterijama. U većini slučajeva, uočen je izraženiji antibakterijski efekat izolata prema Gram pozitivnim bakterijama, međutim antibakterijski efekat Lac6 je podjednako izražen prema obe grupe bakterija, dok je efekat Lac7 čak snažniji prema Gram negativnim bakterijama. Imajući u vidu da su intestinalni patogeni češće iz grupe Gram negativnih bakterija, izolate Lac6 i Lac7 možemo istaći kao najpotentnije u pogledu antibakterijske efikasnosti, dok je antibakterijski potencijal izolata 5s najslabiji. Sa druge strane, ni jedan od izolata nije pokazao antimikrobnu aktivnost prema kvascima i plesnima (*C. albicans* ATCC 10231, *A. brasiliensis* ATCC 16404). Bitno uočeno svojstvo izolata je i odsustvo antagonističkog delovanja prema drugim testiranim laktobacilima (*L. rhamnosus* ATCC 7469, *L. lactis* ATCC 7830), što ukazuje na mogućnost njihove primene u probiotskom preparatu koji bi sadržao više sojeva laktobacila.

Analiza prirode agensa odgovornog za antibakterijsko delovanje je pokazala da antimikrobna aktivnost izostaje u eksperimentu sa supernatantom čija je pH vrednost podešena na 7 (neutralisan efekat kiselina i inaktivisan eventualno prisutni vodonik peroksid). Ovakvi rezultati ukazuju da izolati najverovatnije ne produkuju bakteriocine, kao glavne antimikrobne agense laktobacila, već da je antimikrobna aktivnost bazirana na sintezi organskih kiselina, čime bi se moglo objasniti odsustvo antifungalnog efekta.

Vrste roda *Lactobacillus* poseduju proteolitičke enzime koji razgrađuju proteine mleka do peptida, prevodeći ih tako u biodostupni oblik, zbog čega smanjuju potencijalno negativan uticaj proteina mleka na zdravlje domaćina. Proteolitička aktivnost je opisana kod vrsta *L. helveticus*, *L. delbrueckii*, *L. bulgaricus*, *L. Lactis*, *L. cremoris* i drugih. Strukturne komponente proteolitičkog sistema bakterija mlečne kiseline se mogu podeliti u tri grupe na osnovu svojih funkcija: proteinaze, koje razlažu kazein do peptida; peptidaze, koje hidrolizuju peptide i transpotni sistem koji prenosi produkte razgradnje kroz membranu (Kunji *i sar.*, 1996; Gilbert *i sar.*, 1997; Dib *i sar.*, 2014). Zna se da proteinaze laktobacila doprinose smanjenju alergija izazvanih mlekom i mlečnim proizvodima kod beba, a koje mogu dovesti do ozbiljnih problema u ishrani zbog nedostatka proteina (Yuan, 2009; Hadji Sfaksi *i sar.*, 2012). Prisustvo ovakvih proteinaza je opisano kod vrsta *L. brevis*, *L. cellobiosus*, *L. fermentum* i *L. plantarum* (Mugula *i sar.*, 2003). Kod izolata ispitivanih u ovom radu, proteolitička aktivnost je uočena jedino kod izolata Lac1 i u daljem radu bi je trebalo detaljnije ispitati, jer bi proteolitička aktivnost mogla imati praktičnu primenu i u regulaciji krvnog pritiska. Naime, do povećanja krvnog pritiska dolazi konvertovanjem angiotenzina-I u potentne vazokonstriktore, za šta je odgovoran angiotenzin I-konvertujući enzim (Angiotensin I-converting enzyme, ACE). Inhibicija aktivnosti ACE kao posledicu ima sniženje krvnog pritiska. Laktobacili svojom proteolitičkom aktivnošću mogu da proizvedu ACE inhibitore, što su pokazali i Shuang *i sar.* (2008). Naime, oni su pokazali da fermentisano mleko kome je dodat soj *L. helveticus* 130B4, za koji je pokazano da sadrži ACE inhibitorni peptid κ -CN 107-115, poseduje potencijal snižavanja krvnog pritiska. Bioaktivni peptidi se mogu koristiti u formulaciji funkcionalne hrane, predstavljajući zdraviju prirodnu alternativu regulaciji krvnog pritiska.

Zbog već prisutne široke upotrebe laktobacila kao starter kultura i probiotika za humanu upotrebu, kao i sve veće primene novih sojeva, posebno u probiotske svrhe (Temmerman *i sar.*, 2003), postoji snažna potreba za postojanjem kriterijuma za bezbednosnu procenu sojeva laktobacila pre njihove komercijalne upotrebe. Trenutno, postoji nekoliko nezvaničnih smernica, koje se razlikuju u svojim preporukama, ali ako se sagledaju sve zajedno, vidi se da predlažu procenu osobina koje se odnose na sistemske infekcije, štetnu metaboličku aktivnost, preteranu stimulaciju imunskog odgovora i

prenosivost gena rezistencije na antibiotike (Adams, 1999; Marteau, 2001; FAO/WHO, 2002; Mattila-Sandholm *i sar.*, 2002). Jedan od aspekata bezbednosti je ispitivanje produkcije hemolizina, kao bitnih faktora patogenosti mnogih bakterija. Naša ispitivanja su pokazala da ni jedan od ispitivanih sojeva laktobacila ne produkuje hemolizine, što ih čini bezbednim sa ovog aspekta.

Novije smernice smatraju da je prenosivost rezistencije na antibiotike glavna opasnost u vezi sa komercijalno korišćenim laktobacilima (Bernardeau *i sar.*, 2008; Vankerckhoven *i sar.*, 2008; EFSA, 2011;). Ove smernice trenutno nisu obavezujuće, jer nisu usvojene od strane ni jednog autoriteta i stoga je na samim proizvođačima starter kultura ili probiotika da donose zaključke o bezbednosti sojeva koje koriste. EFSA (*E**u**r**o**p**e**a**n**Food**S**a**f**e**t**y**A**u**t**h**o**r**i**t**y*, 2011) smatra da laktobacili koji se dodaju ishrani ne bi trebalo da nose prenosive gene antibiotske rezistencije. Srećom, laktobacilima se odgovarajućim postupcima mogu ukloniti plazmidi na kojima su smešteni geni za rezistenciju na neke antibiotike (Huys *i sar.*, 2006; Rosander *i sar.*, 2008), tako da je moguće i takve sojeve učiniti bezbednijim. Jedan takav primer je komercijalni probiotik *L. reuteri* soj DSM17938, izveden iz *L. reuteri* ATCC 55730 uklanjanjem dva plazmida, bez gubljenja probiotskih karakteristika (Rosander *i sar.*, 2008).

Osetljivost na antibiotike je ispitivana i u ovom radu. Kao što rezultati pokazuju, izolovani sojevi laktobacila su rezistentni na veliki broj antibiotika. Zahvaljujući ovoj osobini, na izolate ne bi značajno uticala terapija ovim antibioticima, što bi doprinelo održanju balansa intestinalne mikrobiote tokom antibiotske terapije. Međutim, ukoliko bi ta rezistencija bila prenosiva, sojevi bi se mogli smatrati nebezbednim. Svi ispitivani sojevi su pokazali rezistenciju na vankomicin, što je osobina opisana kod svih vrsta roda *Lactobacillus*, s tim da ova rezistencija nije prenosiva (Klein *i sar.*, 2000). Uz to, različiti autori su pokazali da je rezistencija na aminoglikozide, kinolone i glikopeptide česta osobina laktobacila (Klein *i sar.*, 2000; Danielsen i Wind, 2003; Temmerman *i sar.* 2003; Ammor *i sar.*, 2007), što je pokazano i u ovom radu. Međutim, geni za rezistenciju na ove grupe antibiotika (sem na kinolone), kao i na peniciline, cefalosporine i hloramfenikol su smešteni na plazmidima i transpozonima (van Hoek *i sar.*, 2011). U literaturi je opisana i rezistencija vrste *L. plantarum* na tetracikline (Danielsen, 2002), što je slučaj i sa izolatom

Lac7 ispitivanim u ovom radu. Sa aspekta zdravstvene bezbednosti ovo je potencijalno nepovoljno, jer su i geni za rezistenciju na tetraciklin smešteni na plazmidu (van Hoek *i sar.*, 2011). Generalno, širenje gena smeštenih na mobilnim genetičkim elementima je verovatnije u sredinama bogatim mikroorganizmima, u kojima su vrste fizički blizu, što jeste slučaj sa gastrointestinalnim traktom (van Hoek *i sar.*, 2011). Da bi se razumeo potencijal laktobacila za transfer gena mobilnim genetičkim elementima, neophodno je poznavanje njihovih molekularnih osobina, kao i ekologije humanog gastrointestinalnog trakta (van Hoek *i sar.*, 2011), zbog čega je neophodno posvetiti posebnu pažnju daljim istraživanjima u ovom pravcu.

Da bi se pozitivna probiotska svojstva izolovanih sojeva bakterija ispoljila, neophodna je njihova integracija u mikrobiotu gastrointestinalnog trakta. Za vezivanje i kolonizaciju crevnog epitela veoma su bitne adhezivne karakteristike probiotskih bakterija (Goldin i Gorbach, 1992). Naime, nakon dolaska u kolon, probiotici se vezuju za epitel i privremeno kolonizuju njegovu mukoznu površinu, što im omogućava duži opstanak u intestinalnom traktu. Što duže probiotik ovde opstaje, veće su mogućnosti da ispolji antimikrobno delovanje prema štetnim bakterijama, ali i druge korisne interakcije sa mukoznom površinom, poput imunomodulatornog delovanja (Goldin i Gorbach, 1992; Ouwehand *i sar.*, 1999). Pored toga, adhezija probiotskih sojeva za intestinalni epitel obezbeđuje prednost u kompeticiji sa patogenima za kolonizaciju gastrointestinalnog trakta (Vinderola i Reinheimer, 2003). Možemo generalno reći da je sposobnost adhezije blisko povezana i korelisana sa svim pozitivnim efektima probiotika, o kojima smo govorili u prethodnom tekstu. Različite studije su pokazale da je adhezija na epitelijalne ćelije intestinuma ne samo preduslov za kolonizaciju bakterija, već i ključni mehanizam odgovoran za njihovu probiotsku aktivnost (Servin, 2004). Sojevi sa najvišim stepenom sposobnosti adhezije imaju i najveći uticaj na zdravlje domaćina (Majamaa *i sar.*, 1996; Shornikova *i sar.*, 1997; Kirjavainen *i sar.*, 1999; Ouwehand *i sar.*, 1999). U skladu sa tim, sposobnost adhezije bi se mogla posmatrati kao jedan od najvažnijih kriterijuma za procenu probiotskih osobina laktobacila. Rezultati različitih studija ukazuju da je ova osobina specifična karakteristika vrste, pa čak i soja (Jacobsen *i sar.*, 1999; Jonsson *i sar.*, 2001; Ouwehand *i sar.*, 2001; Servin, 2004).

Bakterijska adhezija započinje nespecifičnim fizičko-hemijskim interakcijama, koje onda omogućavaju specifične interakcije adhezina s površine bakterijske ćelije i komplementarnog receptora na epitelijalnim ćelijama u intestinalnom sistemu. Adhezivna svojstva laktobacila čine različite vrste interakcija kao što su pasivne sile, elektrostatičke interakcije i hidrofobne sterne sile, a zavise između ostalog i od karakteristika tejhodne kiseline citoplazmatske membrane i lektinskih proteina (Servin, 2004). Generalno možemo reći da je stepen hidrofobnosti bakterijske površine jedan od faktora koji određuju njena adhezivna svojstva, a od njih zavisi proces vezivanja za površinu intestinalnog epitela, ali i sposobnost međusobnih interakcija bakterijskih ćelija, uključujući autoagregaciju i koagregaciju. Agregacija bakterija označava sposobnost grupisanja bakterijskih ćelija u tečnoj kulturi. Kada su u pitanju ćelije istog soja, ova pojava se označava kao autoagregacija, a kada se radi o ćelijama različitih vrsta bakterija kao koagregacija.

Postoji više eksperimentalnih modela koji se koriste za detekciju i kvantifikovanje adhezivnog potencijala probiotskih sojeva. U *in vitro* testovima koji se koriste pri proceni stepena adhezivnosti potencijalnih probiotskih sojeva, različite površine mogu imitirati uslove koji vladaju u gastrointestinalnom sistemu i odražavati morfološke i funkcionalne karakteristike zrelih enterocita (Bianchi *i sar.*, 2004). Jedan od testova koji se koriste je određivanje hidrofobnosti bakterija u *in vitro* uslovima. U testu se koristi nepolarni rastvarač heksadekan za koji se ćelije svojim hidrofobnim površinama vezuju. Rezultati dobijeni u ovom radu pokazuju da je najmanji stepen vezivanja za heksadekan, odnosno najmanji stepen hidrofobnosti uočen kod izolata 5s (47,26%), a najveći kod izolata Lac4 (80,51%). Međutim, u analizi rezultata treba biti oprezan, pošto različiti autori pokazuju da postoji pozitivna korelacija između hidrofobnosti i adhezije za hidrofobnu površinu intestinalne mukoze (Wadström *i sar.*, 1987; Lichtenberger, 1995; Ehrmann *i sar.*, 2002; Kos *i sar.*, 2003), ali ne i između hidrofobnosti i adhezije za intestinalni mukus (Ouweland *i sar.*, 1999; Muñoz-Provencio *i sar.*, 2009). Ovi podaci ukazuju da hidrofobnost ćelijskog zida ne mora uvek da bude precizna mera adhezivnog potencijala (Maxwell i Miller, 2011). Iz svega navedenog se može uočiti da postoje određene poteškoće u utvrđivanju adhezivnog potencijala *in vitro*, što je posledica razlika u sojevima, u mehanizmu adhezije

i uticaja uslova ispitivanja u pojedinim eksperimentima. Zbog toga se smatra da analiza stepena adhezije za heksadekan nije dovoljna, pa smo shodno tome i saglasno sa ispitivanjima koja su izvršili Del Re *i sar.* (1998), u daljim eksperimentima kao meru sposobnosti adhezije probiotskih bakterija za crevni epitel analizirali sposobnost agregacije. Dobijeni rezultati ukazuju da izolovani sojevi laktobacila pokazuju različiti stepen autoagregacije, najniži je uočen kod izolata 5s (33,70%), a najviši kod izolata Lac6 i Lac7 (73,31%, 70,26%).

Da test autoagregacije može biti važan pokazatelj adhezivnih svojstava probiotskih sojeva potvrdili su Boris *i sar.* (1998), pokazavši da sojevi *L. acidophilus*, *L. gasseri* i *L. jenseni*, kod kojih se javlja fenomen autoagregacije ćelija, imaju jako izraženu sposobnost adhezije za ćelije vaginalnog epitela, što doprinosi mogućnosti kolonizacije. Pored toga što je merilo adhezivnog potencijala, osobina autoagregacije je poželjna i sa stanovišta dobrog preživljavanja nepovoljnih uslova koji vladaju u gastrointestinalnom traktu, sa čim je u vezi i činjenica da ona predstavlja prvi korak u formiranju mikrozajednica laktobacila (Gill *i sar.*, 2010). Da autoagregacija povećava stepen preživljavanja u gastrointestinalnom traktu vidi se i iz rada Miettinen *i sar.* (1998) koji pokazuje da ona doprinosi zaštiti od nepovoljnog delovanja žuči. Inače stepen autoagregacije je izraženiji u kiseloj sredini, što je važno kada se uzme u obzir da u gastrointestinalnom traktu vladaju kiseli uslovi (Gill *i sar.*, 2010).

Sa druge strane osobina koagregacije laktobacila može da spreči ili oteža infekcije patogenima, što u krajnjoj instanci može da doprinese uklanjanju patogena iz gastrointestinalnog trakta (Schachtsiek *i sar.*, 2004; García-Cayuela *i sar.*, 2014). Koagregacija kod ispitivanih izolata laktobacila je posmatrana na primeru dva patogena soja, *L. monocytogenes* ATCC 19111 i *E. coli* ATCC 8739. Svi izolati koagregiraju sa oba test soja, ali je stepen koagregacije varirao zavisno od ispitivanih sojeva, kako laktobacila tako i patogena. U testu sa sojem *L. monocytogenes* ATCC 19111, najviši stepen koagregacije je pokazao izolat Lac6 (55,49%), a najniži izolat Lac4 (16,48%). U testu sa sojem *E. coli* ATCC 8739, najviši stepen koagregacije je pokazao izolat Lac3 (47,55%), a najniži izolati 5s i Lac1 (17,85 % i 22,98%).

Pored modela za utvrđivanje stepena hidrofobnosti i stepena agregacije, bitno je i direktno ispitati i sposobnost probiotskih sojeva da se u *in vitro* uslovima adheriraju za različite ćelijske linije. U ovu svrhu se najčešće koriste one ćelije koje odražavaju strukturne i funkcionalne karakteristike normalnog humanog crevnog epitela (Chauviere *i sar.*, 1992; Wang *i sar.*, 2008; Moussavi i Adams, 2009; Gulden *i sar.*, 2013). Površinske ćelijske komponente laktobacila (adhezini, polisaharidi i proteini) igraju glavnu ulogu u adheziji laktobacila na intestinalni epitel (Velez *i sar.*, 2007; Kravtsov *i sar.*, 2008). Kod laktobacila je uočena velika raznolikost površinske arhitekture ćelije, a poznato je i da oni mogu da menjaju svoje površinske osobine kao odgovor na promene životne sredine (Taranto *i sar.*, 2003; Fozo 2004). Različiti makromolekuli koji čine ćelijski zid laktobacila doprinose očuvanju integriteta ćelija za vreme sredinskog stresa (Guerzoni *i sar.*, 2001). Arhitektura površine ćelija laktobacila i njihova sposobnost sekrecije određenih površinskih komponenti ili specifičnih jedinjenja, koja deluju direktno na domaćina, daju laktobacilima posebne soj specifične fizičko-hemijske osobine ćelije (Sengupta *i sar.*, 2013). U ovom radu je ispitivana i sposobnost adhezije izolovanih sojeva laktobacila na humanu ćelijsku liniju kolona HCT 116. U testu adhezivnosti, najveći stepen adhezije uočen je upravo kod izolata 5s, a najmanji kod izolata Lac4.

Sumiranjem rezultata svih primenjenih testova za procenu adhezivnosti može se uočiti da su svi humani izolati pokazali visok stepen hidrofobnosti, sposobnost formiranja autoagregata i koagregata, ali umereni stepen adhezivnosti na ćelije HCT 116. S druge strane, izolat iz sira (5s) je pokazao nizak stepen hidrofobnosti, umereno formiranje autoagregata i koagregata, ali značajno veću adhezivnu sposobnost. Uočljiva je pozitivna korelacija između osobina hidrofobnosti i agregacije, ali rezultati adhezije sa oba ova svojstva pokazuju negativnu korelaciju, što je neočekivano (Prilog 14). Iz ovih rezultata možemo zaključiti da je kod humanih izolata hidrofobnost ćelijskog zida osnovni faktor odgovoran za formiranje agregata, ali ne i za adhezivnost na humane ćelije. Za visok stepen adhezivnosti izolata 5s može biti odgovorna njegova relativno visoka otpornost u procesu tripsinizacije. Dodatno, ovaj izolat mnogo sporije raste nego ostali, što može uticati na ekspresiju specifičnih površinskih struktura koje mogu uticati na stepen različitih interakcija sa ćelijama intestinuma, ali svakako zahteva dodatna istraživanja.

Dok većina autora smatra adhezivnost pozitivnom osobinom probiotskih sojeva, ima i literaturnih podataka koji ističu da sposobnost adhezije laktobacila za tkivo domaćina potencijalno može biti i negativna osobina (Ouweland i Salminen, 2003). Prijanjanje na tkiva, naročito oštećena, često predstavlja prvi korak u patogenezi (Finlay i Falkow, 1997; Wilson *i sar.*, 2002). U skladu sa tim postoji mogućnost da se izborom probiotika sa izuzetno viskim stepenom adhezije, izabere u stvari potencijalno patogeni soj. Međutim, većina probiotika koji se danas koriste pripadaju rodovima *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, koji se generalno smatraju bezbednim i vrlo retko su povezivani sa bilo kakvim bolestima (Salminen *i sar.*, 2002; Borriello *i sar.*, 2003). Zato se može tvrditi da kolonizacija oštećenog tkiva laktobacilima, ne samo da nije faktor rizika, već donosi korist domaćinu. Osim toga, Apostolou *i sar.*, (2001) su pokazali da u *in vitro* uslovima ne postoje značajne razlike u adhezivnom kapacitetu kliničkih izolata laktobacila i laktobacila izolovanih iz fecesa zdravih osoba.

Rezultati dobijeni u ovom radu su pokazali da osobine poput nehemolitičnosti, antimikrobne aktivnosti prema različitim Gram pozitivnim i Gram negativnim bakterijama, ali i odsustva iste prema drugim sojevima laktobacila, dobro preživljavanje simuliranih uslova gastrointestinalnog trakta, kao i sposobnost adhezije za crevnu mukozu, a koje su potvrđene kod svih izolovanih sojeva laktobacila, ukazuju na to da se oni mogu smatrati probiotiskim sojevima. Pri tome, razlike u poreklu izolovanih sojeva laktobacila samo delimično utiču na njihove probiotske karakteristike. Pokazano je da uslove humanog gastrointestinalnog trakta u najmanjem procentu preživljava upravo izolat 5s koji nije humanog porekla. Imajući to u vidu, može se reći da humano poreklo ispitivanih sojeva probiotika može obezbediti bolju kompetitivnost u odnosu na ostale, kao i veću sposobnost preživljavanja nepovoljnih uslova humanog gastrointestinalnog trakta, što se objašnjava boljom adaptiranošću na njih. Međutim, sa druge strane, izolat 5s je pokazao najviši stepen adhezije na epitel kolona, što je osobina posebno važna za dugotrajnu kolonizaciju i ispoljavanje korisnih efekata probiotskih sojeva. Ovo svojstvo ga čini konkurentnim u odnosu na izolate humanog porekla, jer iako bi on lošije preživljavao nepovoljne uslove gastrointestinalnog trakta, dobra adhezivna svojstva bi mu omogućila da se, iako prisutan u manjem broju, bolje veže za intestinalni epitel. Uz soj *Lactobacillus casei* 5s, po svojim

adhezivnim osobinama, spektru antimikrobnog dejstva i sposobnosti preživljavanja uslova gastrointestinalnog trakta kao najbolji kandidati za dalja ispitivanja se izdvajaju i humani izolati Lac2, Lac6 i Lac7, koji pripadaju vrsti *Lactobacillus plantarum*.

Odabir jednog ili više probiotskih sojeva je prvi korak u procesu razvoja probiotskog preparata. Budući da su u ovom radu detektovana osnovna probiotska svojstva ispitivanih izolata, dalja evaluacija bi mogla da uključi *in vitro* ispitivanje kompetitivne inhibicije adhezije enteropatogena na ćelije crevnog epitela, kao i karakterizaciju površinskih struktura laktobacila koje su odgovorne za uočena adhezivna svojstva. Kako su sojevi pokazali da poseduju rezistenciju prema pojedinim antibioticima, neophodno je ispitati prenosivost uočene antibiotske rezistencije. U slučaju plazmidno kodirane rezistencije prema pojedinim antibioticima, neophodno je uraditi *plasmid curing* i na taj način ukloniti genetičke determinante koje bi se mogle horizontalno prenositi unutar mikrobiote.

Dalji tok istraživanja bi uključio ispitivanja *in vivo* na eksperimentalnim životinjama, kao i kliničke studije, kojima bi utvrdili eventualnu toksičnost i gastričnu podnošljivost. Uz to, ovakvim istraživanjima moguće je ispitati efekat probiotika na regulaciju sastava i brojnosti intestinalne mikrobiote, njihovu sposobnost ublažavanja patoloških promena u intestinumu, imunomodulatorne i anti-inflamatorne osobine, kao i efekat na kardiovaskularni sistem. Deo ovih ispitivanja je već započet, pa je tako u do sada sprovedenim *in vivo* ispitivanjima na Wistar pacovima koji su bili na dijeti bogatoj mastima izolat 5s pokazao značajan hipolipidemijski efekat (kroz smanjenje ukupnog holesterola i triglicerida), kao i sposobnost adhezije i kolonizacije tankog creva. Uz to, u studiji oralne toksičnosti na miševima pokazana je zdravstvena bezbednost ovog soja.

Drugi pravac daljeg istraživanja odnosio bi se na analizu tehnoloških aspekata proizvodnje, kako bi se definisali optimalni uslovi pripreme i čuvanja proizvoda. Radi dobijanja stabilnih probiotskih preparata najčešće se koriste tehnološki postupci liofilizacije (sušenje zamrzavanjem na izuzetno niskim temperaturama) i *spray-drying* (sušenje u struji toplog vazduha). Ovim tehnikama se smanjuje aktivnost vode u proizvodu, čime se obezbeđuje zadržavanje vijabilnosti ćelija tokom pripreme finalnog proizvoda i omogućava njegova stabilnost.

Međutim, kako sam postupak liofilizacije ili sušenja ipak utiče na vijabilnost, neophodno je korišćenje različitih supstanci sa protektivnom ulogom. Najčešće korišćeni zaštitni agensi su laktoza i obrano mleko, ali se pored njih koriste još i askorbinska kiselina, glicerol, sorbitol, manitol, škrob, dekstrin, trehaloza i drugi. Najsavremenija metoda zaštite bakterijskih sojeva od negativnih uticaja zamrzavanja i sušenja je postupak mikroinkapsulacije, koji koristi različite sisteme na bazi polisaharida ili proteina. Osim što štiti vijabilnost probiotskih sojeva u toku pripreme proizvoda, mikroinkapsulacija pospešuje i preživljavanje uslova humanog gastrointestinalnog trakta.

Osim pitanja zaštite sojeva prilikom pripreme proizvoda, važan faktor stabilnosti su i uslovi čuvanja gotovog proizvoda u toku roka trajanja. Vijabilnost sojeva je veća kada se proizvod čuva na 2-8°C nego na sobnoj temperaturi. Međutim, čuvanje na niskim temperaturama povlači dodatna pitanja koja nisu uvek ostvariva, niti praktična. Pre svega, nije uvek moguće ispoštovati hladan lanac od proizvođača do prodavca, posebno kada se radi o izvozu, a to dodatno utiče na cenu proizvoda. Potreba da se probiotik čuva na hladnom nije komforna ni za korisnike, koji onda takve proizvode izbegavaju.

Probiotski preparati pripadaju grupi dijetetskih proizvoda koje regulatorna tela, poput Agencije za lekove i medicinska sredstva u našoj zemlji i Američke asocijacije za hranu i lekove u svetu, ne kontrolišu pre izlaska na tržište. Neki od probiotskih preparata imaju na pakovanju ili u uputstvu naznačen spektar dejstva i efektivnost, ali se samo mali broj proizvoda može pohvaliti kliničkom studijom na ljudima, koja bi potvrdila njihove efekte i zato bi svaki ozbiljan proizvođač trebao da ima sprovedenu kliničku studiju za probiotski proizvod pre izlaska na tržište. Uz kliničke studije, za pravilnu upotrebu probiotika potrebna je i dodatna edukacija lekara koji preporučuju ove proizvode, kako bi pacijentima mogli pružiti pouzdane informacije o probiotiku koji bi bio najefikasniji u tretmanu njihovih tegoba.

6. Zaključci

Na osnovu rezultata dobijenih u ovom radu mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Iz ukupno 43 gastrointestinalna uzorka (uzorci fecesa i briseva usne duplje), poreklom od zdravih beba starih do osam meseci koje nisu primale antibiotsku terapiju, izolovano je 126 bakterijskih sojeva, od čega 104 Gram pozitivnih koka, 8 Gram negativnih bacila i 14 Gram pozitivnih bacila.
2. Iz ukupno 3 uzorka domaćeg sira sa područja Gornjeg Milanovca izolovano je ukupno 17 bakterijskih sojeva, od čega 16 Gram pozitivnih koka i 1 Gram pozitivni bacil.
3. Među izolovanim Gram pozitivnim bacilima njih ukupno 7 iz gastrointestinalnog trakta i 1 iz sira su bili nesporogeni, katalaza negativni, nehemolitični i sposobni da rastu i razmnožavaju se u anaerobnim uslovima, te su preliminarno determinisani kao pripadnici roda *Lactobacillus*. Sojevi humanog porekla su označeni kao Lac1-Lac7, dok je soj iz sira označen kao 5s.
4. Fenotipska identifikacija, zasnovana na ispitivanju fermentacije ugljenih hidrata komercijalnim kitovima API 50CH, je pokazala da je izolat Lac1 najbliži sa *L. fermentum* (99,5% pouzdanosti), Lac2 sa *L. brevis* (98,6% pouzdanosti), Lac3 sa *L. pentosus* (99,9% pouzdanosti), Lac4 sa *L. paracasei* spp. *paracasei* (98,6% pouzdanosti), Lac5 sa *L. acidophilus* (85,6% pouzdanosti), Lac6 i Lac7 sa *L. plantarum* (99,9% i 99,3% pouzdanosti), a 5s sa *L. paracasei/casei* (94% pouzdanosti).
5. Genotipskom identifikacijom, izvršenom sekvenciranjem 16s rRNK gena, izolati su identifikovani do nivoa vrste i to Lac1, Lac2, Lac6 i Lac7 kao *L. plantarum*, Lac3 i 5s kao *L. casei*, Lac4 kao *L. paracasei*, a Lac5 kao *L. gasseri*.
6. Soj Lac5 je zbog sporog rasta isključen iz daljih istraživanja.
7. Fiziološka i biohemijska karakterizacija izolata je pokazala da ne proizvode gas toko fermentacije, rastu u opsegu temperature od 10°C do 40°C, tolerišu pH vrednosti u intervalu 2-8, a NaCl u koncentracijama od 2% do 6,5%. Koncentraciju fenola do 0,4% tolerišu svi ispitivani izolati, Lac3 preživljava i 0,8%, a Lac2 čak i 1% fenola. Proteolitičku aktivnost pokazuje samo izolat Lac1.

8. Dinamika rasta svih izolata humanog porekla je slična, dok 5s soj pokazuje vidno sporiji rast.
9. Svi izolati su rezistentni prema vankomicinu, amikacinu, gentamicinu i norflokscinu, a osetljivi prema ampicilinu i rifampicinu.
10. Svi izolati su otporni na dejstvo lizozima, α -amilaze, tripsina, himotripsina, pronaze E i katalaze.
11. Svi izolati su tolerantni na niske pH vrednosti podloge (pH 2-4). Najveći stepen rezistencije pokazuje izolat Lac6, a najmanji izolat Lac4. Dodatno, u veštačkom želudačnom soku (pH 2) nakon 120 minuta procenat preživljavanja svih sojeva bio je veći od 79,8%.
12. Svi izolati su izrazito tolerantni na prisustvo žučnih soli u podlozi (0,5%-2%), s obzirom da je njihovo preživljavanje veće od 79,1%. Dodatno, u veštačkom intestinalnom fluidu nakon 120 minuta procenat preživljavanja svih sojeva bio je veći od 88,9%.
13. Svi izolati su pokazali antimikrobno dejstvo prema pojedinim Gram pozitivnim i Gram negativnim bakterijama, dok je ono izostalo prema kvascima i plesnima, kao i prema drugim vrstama laktobacila. Antimikrobni efekat se pripisuje proizvodnji organskih kiselina, odnosno sniženju pH.
14. Na osnovu sposobnosti vezivanja za organski rastvarač heksadekan, srednji stepen hidrofobnosti ćelijskog zida pokazali su izolati 5s (47,26%) i Lac7 (66,51%), dok su ostali izolati pokazali visoku hidrofobnost, koja se kretala u intervalu 70,56%-80,51%.
15. Najmanji stepen autoagregacije uočen je kod izolata 5s (33%). Izolati Lac1, Lac2, Lac3 i Lac4 su pokazali srednji stepen autoagregacije (oko 50%), a izolati Lac6 i Lac7 visoku autoagregaciju (oko 70 %).
16. U testu koagregacije sa *L. monocytogenes* najveću sposobnost je pokazao izolat Lac6 (55,49%), a najnižu izolati Lac4 i 5s (oko 17%). Umereni stepen koagregacije su pokazali izolati Lac1, Lac2, Lac3 i Lac7 (22,65% - 35,11%). U testu sa sojem *E. coli* najviši stepen koagregacije je pokazao izolat Lac3 (47,55%), a najniži izolati

5s, Lac1 i Lac4 (17,85% - 27,86%). Umereni stepen koagregacije su pokazali izolati Lac2, Lac6 i Lac7 (42,44% - 45,41%).

17. Svi ispitivani izolati pokazali su sposobnost adhezije na ćelijsku liniju debelog creva HCT 116. Najviši adhezioni potencijal uočen je kod izolata 5s (12,4%) i Lac2 (9,06%), a najmanji kod izolata Lac4 (4,32%).
18. Statistička obrada rezultata je ukazala na postojanje pozitivne korelacije između osobina hidrofobnosti i agregacije, ali negativne između oba ova svojstva i adhezivnosti na humane ćelije.
19. Iako svi izolovani sojevi poseduju probiotske osobine, kao izolati sa najvišim stepenom preživljavanja u humanom gastrointestinalnom traktu, najširim antimikrobnim spektrom i najboljim adhezivnim svojstvima, izdvajaju se humani izolati Lac2, Lac6 i Lac7, koji svi pripadaju vrsti *L. plantarum*, kao i soj 5s, koji pripada vrsti *L. casei*, kao najbolji kandidati za dodatna ispitivanja.

Ovaj rad predstavlja osnovu za dalja istraživanja, u cilju formulacije novog domaćeg farmaceutskog probiotskog preparata. Izolovani sojevi laktobacila su adekvatno identifikovani i okarakterisani i njihove osnovne probiotske osobine su potvrđene. Dalji koraci ka dobijanju konkretnog probiotskog preparata trebalo bi da budu provera porekla rezistencije na antibiotike, sposobnosti kompetitivne inhibicije adhezije enteropatogena, kao i *in vivo* istraživanja kojima bi se ispitaio spektar delovanja probiotika i aspekti zdravstvene bezbednosti. Drugi pravac daljeg istraživanja odnosio bi se na definisanje tehnoloških aspekata proizvodnje, kako bi se utvrdili optimalni uslovi pripreme i čuvanja preparata.

7. Literatura

1. Adams M.R. (1999). Safety of industrial lactic acid bacteria. *J. Biotechnol.*, 68 (2-3), 171-178.
2. Ahmed F.E. (2003). Genetically modified probiotics in foods. *Trends Biotechnol.*, 21 (11), 491-497.
3. Aiba Y., Suzuki N., Kabir A.M.A., Takagi A., Koga Y. (1998). Lactic acid-mediated suppression of *Helicobacter pylori* by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in a gnotobiotic murine model. *Am. J. Gastroenterol.*, 93, 2097-2101.
4. Alvarez-Olmos M.I., Oberhelman R.A. (2001). Probiotic agents and infectious diseases: a modern perspective on a traditional therapy. *Clin. Infect. Dis.*, 32, 1567-1576.
5. Ammor M.S., Florez A.B., Mayo B. (2007). Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiol.*, 24, 559-570.
6. Anukam K. C., Osazuwa E. O., Ahonkhai I., Reid G. (2006). Assessment of *Lactobacillus* species colonizing the vagina of apparently healthy Nigerian women, using PCR-DGGE and 16S rRNA gene sequencing. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 22, 1055–1060.
7. Apostolou E., Kirjavainen P.V., Saxelin M., Rautelin H., Valtonen V., Salminen S.J., Ouwehand A.C. (2001). Good adhesion properties of probiotics: a potential risk for bacteremia? *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 31, 35-9.
8. Avall-Jaaskelainen S., Palva A. (2005). *Lactobacillus* surface layers and their applications. *FEMS Microbiol. Rev.*, 29, 511–529.
9. Backhed F., Ley R. E, Sonnenburg J. L., Peterson D. A., Gordon J. I. (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*, 307, 1915-1920.
10. Bansal T., Garg, S. (2008). Probiotics: from functional foods to pharmaceutical products, *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 9, 267-287.
11. Bauer A.W., Kirby M.M., Sherris J.C., Turck M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am J. Clin Pathol.*, 45, 493-496.

12. Berger B., Pridmore R.D., Barretto C., Delmas-Julien F., Schreiber K., Arigoni F., Brüssow H. (2007). Similarity and differences in the *Lactobacillus acidophilus* group identified by polyphasic analysis and comparative genomics. *J. Bacteriol.*, 189 (4), 1311-1321.
13. Berić T., Nikolić B. (2014). Mikrobiološki praktikum. Biološki fakultet Univerzitet u Beogradu. Beograd.
14. Bernardeau M., Vernoux J.P., Henri-Dubernet S., Gueguen, M. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. *Int. J. Food Microbiol.*, 126 (3), 278-85.
15. Bernet-Camarad M.F., Lievin V., Brassart D., Neeser J.R., Servin A.L., Hudault S. (1997). The human *Lactobacillus acidophilus* strain La-1 secretes a non bacteriocin antibacterial substances active *in vivo* and *in vitro*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 2747-2753.
16. Bernhardt H., Knoke M. (1997). Mycological aspects of gastrointestinal microflora. *Scand. J. Gastroenterol. S222*, 102–106.
17. Bezeková J., Domig K.J., Lavová M., Čanigová M. (2013). Phenotypic and genotypic identification of NSLAB from raw cow milk. *Animal Sci. Biotechnol.*, 46 (2), 87-92.
18. Biagi E., Nylund L., Candela M., Ostan R., Bucci L., Pini E., Nikkila J., Monti D., Satokari R., Franceschi C., Brigidi P., De Vos W. (2010). Th rough ageing, and beyond: gut microbiota and infl amatory status in seniors and centenarians. *PLoS One* 5: e10667.
19. Bianchi M. A., Del Rio D., Pellegrini N., Sansebastiano G., Neviani E. (2004). A fluorescence-based method for the detection of adhesive properties of lactic acid bacteria to Caco-2 cells. *Lett. Appl. Microbiol.*, 39, 301-305.
20. Boekhorst J., M. De Been W. H. J., Kleerebezem M., Siezen R. J. (2005). Genome-wide detection and analysis of cell wall-bound proteins with LPxTG-like sorting motifs. *J. Bacteriol.*, 187, 4928–4934.

21. Boris S., Suarez J.E., Barbes C. (1997). Characterization of the aggregation promoting factor from *Lactobacillus gasseri*, a vaginal isolate. *J. App. Microbiol.*, 83, 413–420.
22. Borriello S.P., Hammes W.P., Holzapfel W., Marteau P., Schrezenmeir J., Vaara M., Valtonen V. (2003). Safety of probiotics that contain lactobacilli or bifidobacteria. *Clin. Infect. Dis.*, 36, 775-80.
23. Branda S. S., Vik A., Friedman L., Kolter R. (2005). Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol.*, 13, 20–26.
24. Brolaazo E.M., Leite D.S., Tiba M.R., Villarroel M., Marconi C., Simoes J.A. (2011). Correlation between API 50 CH and multiplex polymerase chain reaction for the identification of vaginal lactobacilli in isolates. *Braz. J. Microbiol.*, 42, 225-232.
25. Burke A. D. (1938). Practical manufacture of cultured milks and kindred products. Milwaukee, Wis.: The Olsen Publishing Co.
26. Burton J. P., Cadieux P. A., Reid G. (2003). Improved understanding of the bacterial vaginal microbiota of women before and after probiotic instillation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 97–101.
27. Burton J.P., Reid G. (2002). Evaluation of the bacterial vaginal flora of 20 postmenopausal women by direct (Nugent score) and molecular (polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis) techniques. *J. Infect. Dis.*, 186, 1770–1780.
28. Camp J.G., Kanther M., Semova I., Rawls J. F. (2009). Patterns and scales in gastrointestinal microbial ecology. *Gastroenterol.*, 136, 1989-2002.
29. Canani B. R., Di Costanzo M., Leone L. (2012). The epigenetic effects of butyrate: Potential therapeutic implications for clinical practice. *Clin. Epigenetics.* 4(1), 1-7.
30. Canli T. (2014). Reconceptualizing major depressive disorder as an infectious disease. *Biol. Mood Anxiety Disord.*, 4, 10.
31. Charteris W.P., Kelly P.M., Morelli L., Collins J.K. (2001). Quality control *Lactobacillus* strains for use with the API 50 CH and API ZYM systems at 37 degrees C. *J. Basic Microbiol.*, 41, 241-251.

32. Chauviere G., Coconnier M. H., Kerneis S., Fourniat J., Servin A.L. (1992). Adhesion of *Lactobacillus acidophilus* strain LB to human enterocyte-like Caco-2 cells. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 138, 1689-1696.
33. Chin J., Turner B., Barchia I., Mullbacher A. (2000). Immune response to orally consumed antigens and probiotic bacteria. *Immunol. Cell Biol.*, 78, 55–66.
34. Claesson M. J., Cusack S., O’Sullivan O., Greene-Diniz R., de Weerd H., Flannery E. Marchesi J.R., Falush D., Dinan T., Fitzgerald G., Stanton C., van Sinderen D., O’Connor M., Harnedy N., O’Connor K., Henry C., O’Mahony D., Fitzgerald A.P., Shanahan F., Twomey C., Hill C., Ross R.P., O’Toole P.W. (2010). Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 108, 4586-4591.
35. Coconnier M.H., Lievin V., Bernet-Camard M.F., Hudault S., Servin A.L. (1997). Antibacterial effect of the adhering human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 41, 1046-52.
36. Coconnier M.H., Liévin V., Hemery E., Servin A.L. (1998). Antagonistic activity against *Helicobacter infection in vitro* and *in vivo* by the human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 4573-4580.
37. Collado M.C., Meriluoto J., Salminen S. (2008). Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *Eur. Food Res. Technol.*, 226, 1065–1073.
38. Corcoran B. M., Stanton C., Fitzgerald G. F., Ross R. P. (2005). Survival of probiotic lactobacilli in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(6), 3060–3067.
39. Cunningham-Rundles S., Ahrné S., Bengmark S., Johann-Liang R., Marshall F., Metakis L., Califano C., Dunn A.M., Grasseley C., Hinds G., Cervia J. (2000). Probiotics and immune response. *Am. J. Gastroenterol.*, 95 (1), S22-25.
40. Dal Bello F., Walter J., Hammes W. P., Hertel C. (2003). Increased complexity of the species composition of lactic acid bacteria in human feces revealed by alternative incubation condition. *Microb. Ecol.*, 45, 455–463.

41. Danielsen M. (2002). Characterization of the tetracycline resistance plasmid pM5057 from *Lactobacillus plantarum* 5057 reveals a composite structure. *Plasmid*, 48, 98.
42. Danielsen M., Wind A. (2003). Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *Int. J. Food Microbiol.*, 82,1.
43. De Boever P., Deplancke B., Verstraete W. (2000). Fermentation by gut microbiota cultured in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem is improved by supplementing a soygerm powder. *J. Nutr.*, 130, 2599-2606.
44. De Roos N.M., Katan M.B. (2000). Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: A review of papers published between 1988 and 1998. *Am. J. Clin. Nutr.*, 71, 405-411.
45. De Vuyst L., Degeest B. (1999). Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 23, 153–177.
46. Deepika G., Green R.J., Frazier R.A., Charalampopoulos D. (2009). Effect of growth time on the surface and adhesion properties of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *J. Appl Microbiol.*, 107, 1230-12340.
47. Del Re B., Sgorbati B., Miglioli M., Palenzona, D. (2000). Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Lett. App. Microbiol.*, 31, 438–442.
48. Delcour J., Ferain T., Deghorain M., Palumbo E., Hols P. (1999). The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Anton. Leeuw. Int. J. G.*, 76, 159–184.
49. Dellaglio F., Felis G. E. (2005). Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Probiotics and Prebiotics: Scientific Aspects*, 25–49. Edited by G. W. Tannock. Norfolk, UK: Caister Academic Press.
50. Dethlefsen L., Huse S., Sogin M.L., Relman D.A. (2008). The pervasive Effects of an Antibiotic on the Human Gut Microbiota, as Revealed by Deep 16S rRNA Sequencing. *PLoS Biol*, 6, e280.

51. Dib W., Biscola V., Choiset Y., Chobert J.M., Haertlé T., Chekroun A., Saidi D., Kheroua O. (2014). Characterization of a new isolate of *Lactobacillus brevis* WD19 from Algerian goat milk with proteolytic activity. *GARJAS*, 3 (12), 423-432.
52. Donnet-Hughes A., Rochat F., Serrant P., Aeschlimann J.M., Schiffrin E.J. (1999) Modulation of nonspecific mechanisms of defense by lactic acid bacteria: effective dose. *J. Dairy Sci.*, 82, 863–869.
53. Duncan S. H., Louis P., Thomson J. M., Flint H. J. (2009). The role of pH in determining the species composition of the human colonic microbiota. *Environ. Microbiol.*, 11, 2112-2122.
54. Eckburg P.B., Bik E.M., Bernstein C.N., Purdom E., Dethlefsen L., Sargent M., Gill S.R., Nelson K.E., Relman D.A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 308 (5728), 1635–1638.
55. EFSA. (2011). Guidance on the scientific requirements for health claims related to gut and immune function. *EFSA J.*, 9, 1984.
56. Ehrmann M.A., Kurzak P., Bauer J., Vogel R.F. (2002). Characterization of lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry. *J. Appl. Microbiol.*, 92, 966–975.
57. Enck P., Zimmermann K., Rusch K., Schwartz A., Klosterhalfen S., Frick J. S. (2009). The effects of ageing on the colonic bacterial microflora in adults. *Gastroenterol.*, 47, 653-658.
58. Essid I., Medini M., Hassouna M. (2009). Technological and safety properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from a Tunisian traditional salted meat. *Meat. Sci.*, 81, 203-208.
59. Falagas M. E., Betsi G. I., Athanasiou S. (2007). Probiotics for the treatment of women with bacterial vaginosis. *Clin. Microbiol. Infect.*, 13, 657–664.
60. FAO/WHO. (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a Joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. World Health Organization, London, Ontario, Canada.

61. Felten A., Barreau C., Bizet C., Lagrange H., Philippicon A. (1999). *Lactobacillus* species identification H₂O₂ production, and antibiotic resistance and correlation with human clinical status. *J. Clin. Microbiol.*, 37, 727-733.
62. Fernandez M.F., Boris S., Barbes C. (2003). Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. *J. Appl. Microbiol.*, 94, 449-455.
63. Filho-Lima J.V.M., Vieira E.C., Nicoli J.R. (2000). Antagonistic effect of *Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces boulardii* and *Escherichia coli* combinations against experimental infections with *Shigella flexneri* and *Salmonella enteritidis* subsp. *typhimurium* in gnotobiotic mice. *J. Appl Microbiol.*, 88 (3), 365-370.
64. Finlay B.B., Falkow S. (1997). Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 61, 136-69.
65. Flint H. J., Duncan S. H., Scott K. P., Louis P. (2007). Interactions and competition within the microbial community of the human colon: links between diet and health. *Environ. Microbiol.*, 9, 1101-1111.
66. Flint H.J., Bayer E.A., Rincon M.T., Lamed R., White B.A. (2008). Polysaccharide utilization by gut bacteria: Potential for new insights from genomic analysis. *Nat. Rev. Microbiol.*, 6, 121–131.
67. Florin T.H., Zhu G., Kirk K.M., Martin N.G. (2000). Shared and unique environmental factors determine the ecology of methanogens in humans and rats. *Am. J. Gastroenterol.*, 95 (10), 2872–2879.
68. Fozo E. M., Kajfasz J. K., Quivey Jr R. G. (2004). Low pH induced membrane fatty acid alterations in oral bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, 238 (2), 291–295.
69. Frece J. (2003). *In vitro* i *in vivo* istraživanja probiotičkog mehanizma djelovanja bakterija: *Lactobacillus acidophilus* M92, *Lactobacillus plantarum* L4 i *Enterococcus faecium* L3. Magistarski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska.

70. Freitas M., Tavan E., Cayuela C., Diop L., Sapin C., Trugnan G. (2003). Host-pathogens cross-talk. Indigenous bacteria and probiotics also play the game. *Biol. Cell*, 95, 503–506.
71. Fujii A., Cook E.S. (1973). Probiotics, antistaphylococcal and antifibrinolytic activities of omega-guanidine acids and omegaguanidinoacyl-L-histidines. *J. Med Chem.*, 16: 1409-1411.
72. Fuller R. (1992). History and development of probiotics. In R. Fuller (Ed.), *Probiotics, the scientific basis*. London, UK: Chapman & Hall.
73. García-Cayuela T., Korany A.M., Bustos I., de Cadiñanos L.P.G., Requena T., Peláez C., Martínez-Cuesta M.C. (2014). Adhesion abilities of dairy *Lactobacillus plantarum* strains showing an aggregation phenotype. *Food Res Int.*, 57, 44–50.
74. Ghosh D., Das S., Bagchi D., Smarta R.B. (2012). *Innovation in Healthy and Functional Foods*. CRC Press.
75. Giannella R. A., Broitman S.A., Zamcheck N. (1972). Gastric acid barrier to ingested microorganisms in men: Studies *in vivo* and *in vitro*. *Gut*, 13, 251–256.
76. Gilbert C., Blanc B., Frot-Contaz J., Atlan D. (1997). Comparison of cell surface proteinase activities within the *Lactobacillus* genus. *J. Dairy.*, 64, 561–571.
77. Gill F.N., Martinez R.C.R., Gomes B.C., Nomizo A., De Martinis E., C.P. (2010). Vaginal lactobacilli as potential probiotics against *Candida* spp. *Braz. J. Microbiol.*, 41, 6-14.
78. Gill H.S. (1998). Stimulation of the immune system by lactic cultures. *Int. Dairy J.*, 8, 535–544.
79. Gill H.S., Rutherfurd K.J. (2001). Viability and dose–response studies on the effects of the immunoenhancing lactic acid bacterium *Lactobacillus rhamnosus* in mice. *Br. J. Nutr.*, 86, 285–289.
80. Giraffa G. (2012). Selection and design of lactic acid bacteria probiotic cultures. *Eng Life Sci.*, 12, 391–398.
81. Goldin B. R., Gorbach S. L. (1992). Probiotics for humans. In: *Probiotics. The scientific basis*, Fuller, R. (ed). Chapman and Hall, London, 355-376.

82. Gonzales J.M., Mayer F., Moran M.A., Hodson R.E., Whitman W.B. (1997). *Sagittula stellata* gen. nov., sp. nov., a lignin-transforming bacterium from a coastal environment. *Int J. Syst Bacteriol.*, 47, 773-780.
83. Gopal P.K., Prasad J., Smart J., Gill H.S. (2001). *In vitro* adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Int. Food Microbiol.*, 67 (3), 207-216.
84. Gosalbes M. J., Durban A., Pignatelli M., Abellan J. J., Jimenez-Hernandez N., Perez- Cobas A. E., Latorre A., Moya A. (2011). Metatranscriptomic approach to analyze the functional human gut microbiota. *PLoS One*. 6 (3): e17447.
85. Guarino A., Albano F., Ashkenazi S., Gendrel D., Hoekstra J.H., Shamir R., Szajewska H. (2008). Expert Working Group. The ESPGHAN/ESPID evidenced-based guidelines for the management of acute gastroenteritis in children in Europe. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 46 (S2), S81–122.
86. Guarner F. (2006). Enteric flora in health and disease. *Digestion*, 73, 5-12.
87. Guerzoni M. E., Lanciotti R., Cocconcelli P. S. (2001). Alteration in cellular fatty acid composition as a response to salt, acid, oxidative and thermal stresses in *Lactobacillus helveticus*. *Microbiol.*, 147 (8), 2255–2264.
88. Gülden B.K., Kuleasan H., Sömer V. F., Akpınar D. (2013). Determining potential probiotic properties of human originated *Lactobacillus plantarum* strains. *Biotechnol. Bioproc. Eng.*, 18, 479-485.
89. Gürtler V., Stanisich V.A. (1996). New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiol.*, 142, 3-16.
90. Guslandi M., Mezzi G., Sorghi M., Testoni P.A. (2000). *Saccharomyces boulardii* in maintenance treatment of Crohn's disease. *Dig. Dis. Sci.*, 45, 1462-1464.
91. Hadji Sfaxi I., El-Ghaish S., Ahmadova A., Rabesona H., Haertlé T., Chobert J.M. (2012). Characterization of new strain *Lactobacillus paracasei* I-N-casein β 10 with proteolytic activity: Potential role in decrease in immuno-reactivity. *Eur. Food Res. Technol.*, 235, 447–455.

92. Hamilton-Miller J. M. T. (2004). Review: Probiotics and prebiotics in the elderly. *Postgrad. Med. J.*, 80, 447-451.
93. Hammes W.P., Hertel C. (2009). Genus I. *Lactobacillus* Beijerinck 1901, 212^{al}. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Second edition, Vol Three, Williams B. Whitman, New York, 465-511.
94. Harris L.J., Daeschel M.A., Stiles M.E., Klaenhammer T.R. (1989). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.*, 52, 384-387.
95. Havenaar R., Ten Brink B., Huis in't Veld J. H. J. (1992). Selection of strains for Probiotic use. In: Probiotics. The Scientific Basis, R. Fuller Ed. Chapman & Hall, London. 209–221.
96. He F., Ouwehand A.C. , Isolauri E., Hashimoto H., Benno Y. , Salminen S. (2001). Comparison of mucosal adhesion and species identification of bifidobacteria isolated from healthy and allergic infants. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 30 (1), 43-7.
97. He X., Tian Y., Guo L., Lux R., Zusman D.R., Shi W. (2010). Oral-derived bacterial flora defends its domain by recognizing and killing intruders - A molecular analysis using *Escherichia coli* as a model intestinal bacterium. *Microb. Ecol.*, 60, 655–664.
98. Heilig H. G. H. J., Zoetendal E. G., Vaughan E. E., Marteau P., Akkermans A. D. L., de Vos W. M. (2002). Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. *Environ. Microbiol.*, 68, 114–123.
99. Hilton E., Rindos P., Isenberg H.D. (1995). *Lactobacillus* GG vaginal suppositories and vaginitis. *J. Clin. Microbiol.*, 33, 1433.
100. Holzapfel W.H., Haberer P., Snel J., Schillinger U., Huis in't Veld J.H.J. (1998). Overview of gut flora and probiotics. *Intl. J. Food Microbiol.*, 41, 85–101.
101. Hudault S., Liévin V., Bernet-Camard M.F., Servin A.L. (1997). Antagonistic activity *in vitro* and *in vivo* exerted by *Lactobacillus casei* (strain GG) against *Salmonella typhimurium* infection. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 513-518.

102. Hughes R., Magee E.A., Bingham S. (2000). Protein degradation in the large intestine: relevance to colorectal cancer. *Curr. Issues Intest. Microbiol.*, 1(2), 51-8.
103. Huh Y.S., Jun Y.S., Hong Y.K., Song H, Lee S.Y., Hong W.H. (2006). Effective purification of succinic acid from fermentation broth produced by *Mannheimia succiniciproducens*. *Proc Biochem.*, 41, 1461-1465.
104. Huys G., D'Haene K., Swings J. (2006). Genetic basis of tetracycline and minocycline resistance in potentially probiotic *Lactobacillus plantarum* strain CCUG 43738. *Antimicrob. Agents Ch.*, 50 (4), 1550-1551.
105. Ibnou-Zekri N., Blum S., Schiffrin E.J., von der Weid T. (2003). Divergent patterns of colonization and immune response elicited from two intestinal *Lactobacillus* strains that display similar properties *in vitro*. *Infect. Immun.*, 71, 428-436.
106. Ishibashi N., Yamazaki S. (2001). Probiotics and safety. *Am J. Clin Nutr.*, 73(2 S), 465S-470S.
107. Isolauri E., Sutas Y., Kankaanpaa P., Arvilommi H., Salminen S. (2001). Probiotics: effects on immunity. *Am. J. Clin. Nutr.*, 73, 444S-450S.
108. Jacobsen C.N., Rosenfeldt Nielsen V., Hayford A.E., Moller P.L., Michaelsen K.F., Paerregaard A., Sandstrom B., Tvede M., Jakobsen M. (1999). Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by *in vitro* techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 4949-4956.
109. Jakobsson H. E., Jernberg C., Andersson A. F., Sjolund-Karlsson M., Jansson J. K., Engstrand L. (2010). Short-term antibiotic treatment has differing long-term impacts on the human throat and gut microbiome. *PLoS One*, 5, 9836.
110. Jakobsson H. E., Jernberg C., Andersson A. F., Sjolund-Karlsson M., Jansson J. K., Engstrand L. (2010). Short-term antibiotic treatment has differing long-term impacts on the human throat and gut microbiome. *PLoS One*, 5, e9836.

111. Jamuna M., Jeevaratnam K. (2004). Isolation and characterization of lactobacilli from some traditional fermented foods and evaluation of the bacteriocins. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 50, 79-90.
112. Jernberg C., Lofmark S., Edlund C., Jansson J. K. (2007). Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *ISMEJ*, 1, 56-66.
113. Jonsson H., Strom E., Roos S. (2001). Addition of mucin to the growth medium triggers mucus-binding activity in different strains of *Lactobacillus reuteri* *in vitro*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 204, 19–22.
114. Kabir A.M., 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, 49-55.
115. Kajander K., Myllyluoma E., Rajilić-Stojanović M., Kyronpalo S., Rasmussen M., Jarvenpaa S., ZoetendaL E. G., De Vos W. M., Vapaatalo H., Korpela R. (2008). Clinical trial: multispecies probiotic supplementation alleviates the symptoms of irritable bowel syndrome and stabilizes intestinal microbiota. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 27, 48-57.
116. Kalina W.V., Mohamadzadeh M. (2009). Lactobacilli as natural enhancer of cellular immune response. *Discovery medicine* 5 (26), 199-203.
117. Kalliomaki M., Isolauri E. (2003). Role of intestinal flora in the development of allergy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 3 (1), 15-20.
118. Kalliomaki M., Salminen S., Arvilommi H., Kero P., Koskinen P., Isolauri E. (2001). Probiotics in primary prevention of atopic disease: A randomised placebo-controlled trial. *Lancet.*, 357, 1076-9.
119. Kandler O., Weiss N. (1986): Regular, non-sporing Gram-positive rods, in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol.2 (P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe, and J.G. Holt, eds.), Williams and Wilkins, Baltimore, 1208-1234.
120. Karlsson H., Hesse C., Rudin A. (2002). Innate immune responses of human neonatal cells to bacteria from the normal gastrointestinal flora. *Infect. Immun.*, 70, 6688–6696.

121. Kaur I.P., Chopre K., Saini A. (2002). Probiotics: potential pharmaceutical applications. *Eur J. Pharm. Sci.*, 15 (1) 1-9.
122. Kaushik J.K., Kumar A., Duary R.K., Mohanty A.K., Grover S., Batish V.K. (2009). Functional and probiotic attributes of an indigenous isolate of *Lactobacillus plantarum*. *PLoS One*, 4(12), e8099.
123. Kimura K., McCartney A. L., McConnell M. A., Tannock G. W. (1997). Analysis of fecal populations of bifidobacteria and lactobacilli and investigation of the immunological responses of their human hosts to the predominant strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 3394–3398.
124. Kirjavainen P.V., Apostolou E., Arvola T., Salminen S.J. , Gibson G.R., Isolauri E. (2001). Characterizing the composition of intestinal microflora as a prospective treatment target in infant allergic disease. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 32 (1), 1-7.
125. Kirjavainen P.V., Gibson G.R. (1999). Healthy gut microflora and allergy, factors influencing development of the microbiota. *Ann. Med.*, 31 (4), 288-92.
126. Klein G., Hallmann C., Casas I.A., Abad J., Louwers, J., Reuter G. (2000). Exclusion of *vanA*, *vanB* and *vanC* type glycopeptide resistance in strains of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus rhamnosus* used as probiotics by polymerase chain reaction and hybridization methods. *J. Appl. Microbiol.*, 89, 815.
127. Kolb H. (1955). Die behandlung akuter infekte unter dem gesichtswinkel der prophylaxe 484 chronischer Leiden. Über die Behandlung mit physiologischen Bakterien. *Microecol. Therapy*.
128. Kollath W. (1953). The increase of the diseases of civilization and their prevention. *Munch Med Wochenschr.*, 95, 1260–1262.
129. König J., Brummer R.J. (2014). Alteration of the intestinal microbiota as a cause of and a potential therapeutic option in irritable bowel syndrome. *Benef. Microbes*, 5 (3), 247-261.
130. Koretz R.L. (2009). Probiotics, critical illness and methodology. *Nutr Clin Practice.*, 24, 145-149.

131. Kos B., Susković J., Vuković S., Simpraga M., Frece J., Matosić S. (2003). Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J. Appl. Microbiol.*, 94, 981–987.
132. Kos, B. (2001). Probiotic Concept: *In Vitro* Investigations with chosen lactic acid bacteria, PhD Thesis, Faculty of Food Technology and Biotechnology. University of Zagreb, Croatia.
133. Krack A., Sharma R., Figulla H.R., Anker S.D. (2005). The importance of the gastrointestinal system in the pathogenesis of heart failure. *Eur. Heart J.*, 26 (22), 2368-2374.
134. Kravtsov E. G., Yermolayev A.V., Anokhina I. V., Yashina N.V., Chesnokova V. L., Dalin M. V. (2008). Adhesion characteristics of *Lactobacillus* is a criterion of the probiotic choice. *B. Exp. Biol. Med.*, 145 (2), 232–234.
135. Kunji E.R.S., Mierau I., Hagting A., Poolman B., Konings W.N. (1996). The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Anton. Leeuw. Int. J. G.*, 70, 187–221.
136. Kurokawa K., Itoh T., Kuwahara T., Oshima K., Toh H., Toyoda A., Takami H., Morita H., Sharma V.K., Srivastava T.P., Taylor T.D., Noguchi H., Mori H., Ogura Y., Ehrlich D.S., Itoh K., Takagi T., Sakaki Y., Hayashi T., Hattori M. (2007). Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Res.*, 14, 169-181.
137. Lakhtin V.M., Lakhtin M.V., Pospelova V.V., Shenderov B. A. (2007). Lectins of lactobacilli and bifidobacteria. II. Probiotic lectins of lactobacilli and bifidobacteria as possible signal molecules regulating inter-and intrapopulation relationships between bacteria and between bacteria and the host. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 19 (3), 153-157.
138. Lebeer S., Vanderleyden J., de Keersmaecker S.C.J. (2008). Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiol. Mol. Biol. R.*, 728–764.

139. Leser T. D., Molbak L. (2009). Better living through microbial action: the benefits of the mammalian gastrointestinal microbiota on the host. *Environ. Microbiol.*, 11, 2194-2206.
140. Li L.L., Hou Z.P., Li T.J., Wu G.Y., Huang R.L., Tang Z.R., Yang C.B., Gong J., Yu H., Kong X. F. (2008). Effects of dietary probiotic supplementation on ileal digestibility of nutrients and growth performance in 1- to 42-day-old broilers. *J. Sci. Food Agric.*, 88:35–42.
141. Liasi S.A., Azmi T.I., Hassan M.D., Shuhaimi M., Rosfarizan M., Ariff A.B. (2009). Antimicrobial activity and antibiotic sensitivity of three isolates of lactic acid bacteria from fermented fish product, Budi. *Malays. J. Microbiol.*, 51, 33-37.
142. Lichtenberger L.M. (1995). The hydrophobic barrier properties of gastrointestinal mucus. *Annu. Rev. Physiol.*, 57, 565–583.
143. Lilly D. M., Stillwell R. H. (1965). Probiotics: growth- promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 147 (3659), 747-748.
144. Liong M.T. (2007). Probiotics: a critical review of their potential role as antihypertensives, immune modulators, hypocholesterolemic, and perimenopausal treatments. *Nutr. Rev.*, 65 (7), 316-28.
145. Logan A.C., Katzman M. (2005). Major depressive disorder: probiotics may be an adjuvant therapy. *Med. Hypotheses.*, 64 (3), 533-8.
146. Lombardi A., Gatti M., Rizzotti L., Torriani S., Andrighetto C., Giraffa G. (2004). Characterization of *Streptococcus macedonicus* strains isolated from artisanal Italian rawmilk cheeses. *Int Dairy J.*, 14, 967–976.
147. Lönnermark E. (2010). Lactobacilli in the normal microbiota and probiotic effects of *Lactobacillus plantarum*. PhD thesis, Department of infectious medicine, Sahlgrenska academy University of Gothenburg, Sweden.
148. Macfarlane S., Furrie E., Cummings J.H., Macfarlane G.T. (2004). Chemotaxonomic analysis of bacterial populations colonizing the rectal mucosa in patients with ulcerative colitis. *Clin. Infect. Dis.*, 38, 1690–1699.

149. Mackie R. I., Sghir A., Gaskins H. R. (1999). Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.*, 69, 1035S–1045S.
150. Maheshwari R, Rani B., Verma D., Yadav R.K. (2012). Indigenous probiotics and health benefits. *Bull. Env. Pharmacol. Life Sci.*, 2 (1): 83- 86.
151. Maidak B., Cole J.R., Lilburn T.G., Parker C.T. Jr., Saxman P.R., Farris R.J., Garrity G.M., Olsen G.J., Schmidt T.M., Tiedje J.M. (2001). The RDP-II (Ribosomal Database Project, release 10; <http://rdp.cme.msu.edu>). *Nucleic Acids Res.*, 29, 173-174.
152. Majamaa H., Isolauri E. (1996). Evaluation of the gut mucosal barrier: Evidence for increased antigen transfer in children with atopic eczema. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 97, 985-90.
153. Marques T.M., Wall R., Ross R. P., Fitzgerald G.F., Ryan C.A., Stanton C. (2010). Programming infant gut microbiota: influence of dietary and environmental factors. *Curr. Opin. Biotech.*, 21, 149–156.
154. Marques T.M., Wall R., Ross R.P., Fitzgerald G.F., Ryan C.A., Stanton C. (2010). Programming infant gut microbiota: influence of dietary and environmental factors. *Curr Opin Biotechnol.*, 21 (2):149-56.
155. Marraffini L.A., Dedent A.C., Schneewind O. (2006). Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of Grampositive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 70, 192-221.
156. Marteau P. (2001). Safety aspects of probiotic products. *Scand. J. Food Nutr.*, 45, 22-24.
157. Matsumoto M., Tsuji M., Sasaki H., Fujita K., Nakano K., Shintani S. Ooshima T. (2005). Cariogenicity of the probiotic bacterium *Lactobacillus salivarius* in rat. *Caries Res.*, 39, 479-483.
158. Mattila-Sandholm T., Myllarinen P., Crittenden R., Mogensen G., Fonden R., Saarela M., (2002). Technological challenges for future probiotic foods. *Int. Dairy J.*, 12, 173–182.
159. Maxwell L., Van Tassell, Michael J., Miller. (2011). *Lactobacillus* adhesion to mucus. *Nutrients*, 3, 613-636.

160. Metchnikoff I. I. (2004). The prolongation of life: Optimistic studies (reprinted edition 1907). New York, NY, USA. Springer.
161. Michail S. (2009). The role of Probiotics in allergic diseases. *All., Asth. Cl. Im.*, 5:5, doi: 10.1186/1710-1492-5-5.
162. Midolo P.D., Lambert J.R., Hull R., Luo F., Grayson M.L. (1995). *In vitro* inhibition of *Helicobacter pylori* NCTC 11637 by organic acids and lactic acid bacteria. *J. Appl. Bacteriol.*, 79, 475-479.
163. Miettinen M., Matikainen S., Vuopio-Varkila J., Pirhonen J., Varkila K., Kurimoto M., Julkunen I. (1998). Lactobacilli and streptococci induce interleukin-12 (IL-12), IL-18, and gamma interferon production in human peripheral blood mononuclear cells. *Infect Immun.*, 66, 6058-6062.
164. Mijačević Z., Otenhaj-Mer I., Ivanović D. (1989). Antibakterijska aktivnost laktoperoksidaza-tiocijanat vodonikperoksid sistema u mleku. *Dairy*, 39, 199-204.
165. Mishra V., Prasad D. N. (2005). Application of *in vitro* methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. *Int. J. Food Microbiol.*, 103, 109–115.
166. Mitsuoka T. (1992). The human gastrointestinal tract. In: Wood BJB (ed). The Lactic acid bacteria, vol. 1. Elsevier: London, 69–114.
167. Mombelli, B., Gismondo, M.R. (2000). The use of probiotics in medical practice. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 16 (4), 531-536.
168. Moussavi M., Adams M. C. (2009). An *in vitro* study on bacterial growth interactions and intestinal epithelial cell adhesion characteristics of probiotic combinations. *Curr. Microbiol.*, 60, 327-335.
169. Muegge B.D., Kuczynski J., Knights D., Clemente J.C., Gonzalez A., Fontana L., Henrissat B., Knight R., Gordon J.I. (2011). Diet drives convergence in gut microbiome functions across mammalian phylogeny and within humans. *Science*, 332 (6032), 970–974.
170. Mugula J.K., Sorhaug T., Stepaniak L. (2003). Proteolytic activities in Togwa, a Tanzanian fermented food. *Int. J. Food Microbiol.*, 84, 1–12.

171. Muñoz-Provencio D., Llopis M., Antolín M., de Torres I., Guarner F., Pérez-Martínez G., Monedero V. (2009). Adhesion properties of *Lactobacillus casei* strains to resected intestinal fragments and components of the extracellular matrix. *Arch. Microbiol.*, 191, 153–161.
172. Nakamura Y., Yamamoto N., Sakai K., Takano T. (1995). Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme. *J. Dairy Sci.* 78 (6), 1253-1257.
173. Neish A. S. (2009). Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterol.*, 136, 65-80.
174. Neuhaus F. C., Baddiley J.. (2003). A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 67, 686–723.
175. Noverr M. C., Huffnagle G. B. (2005). The microflora hypothesis of allergic diseases. *Clin. Exp. Allergy.*, 35, 1511-1520.
176. Ocana V.S, de Ruiz Holgado A.A.P., Nader M.E. (1999). Characterization of a bacteriocin like substance produced by a *Lactobacillus salivarius* strain. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 5631-5635.
177. Oh S., Kim S.H., Worobo R.W. (2000). Characterization and purification of a bacteriocin produced by a potential probiotic culture, *Lactobacillus acidophilus* 30SC. *J. Dairy Sci.*, 83, 2747-2752.
178. Ouwehand A., Isolauri E., Salminen S. (2002). The role of the intestinal microflora for the development of the immune system in early childhood. *Eur. J. Nutr.*, 41(S1), I32-7.
179. Ouwehand A.C., Kirjavainen P.V., Grönlund M.M., Isolauri E., Salminen S.J. (1999). Adhesion of probiotic micro-organisms to intestinal mucus. *Int. Dairy J.*, 9, 623–630.
180. Ouwehand A.C., Salminen S. (2003). *In vitro* adhesion assays for probiotics and their *in vivo* relevance: a review. *Microb. Ecol. Health D.*, 15, 175-184.

181. Oxman T., Shapira M., Klein R., Avazov N., Rabinowitz B. (2001). Oral administration of *Lactobacillus induces* cardioprotection. *J. Altern. Complement Med.*, 7 (4), 345-354.
182. Pan X., Wu T., Zhang L., Cai L., Song Z. (2009) Influence of oligosaccharides on the growth and tolerance capacity of lactobacilli to simulated stress environment. *Lett. Appl. Microbiol.*, 48, 362–367.
183. Parker R. B. (1974). Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Anim. Nutr. Health.*, 29, 4-8.
184. Paulo E. M. (1991). Isolamento e caracterização de *Lactobacillus acidophilus* de fezes de suínos para uso como probiótico. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
185. Pavlova S.I., Kilic A.O., Kilic S.S., So J.S., Nader-Macias M.E., Simoes J.A., Tao L. (2002). Genetic diversity of vaginal lactobacilli from women in different countries based on 16S rRNA gene sequences. *J. Appl. Microbiol.*, 92, 451-459.
186. Pelto L., Isolauri E., Lilius E.M., Nuutila J., Salminen S. (1998). Probiotic bacteria down-regulate the milk-induced inflammatory response in milk-hypersensitive subjects but have an immunostimulatory effect in healthy subjects. *Clin. Exp. Allergy.*, 28, 1474–1479.
187. Penders J., Stobberingh E. E., Thijs C., Adams H., Vinkw C., van Ree R., van den Brandt P. A. (2006). Molecular finger printing of the intestinal microbiota of infants in whom atopic eczema was or was not developing. *Clin. Exp. Allergy*, 36 (12),1602-8.
188. Perea Ve´lez M., Verhoeven T. L. A., Draing C., Von Aulock S., Pfitzenmaier M., Geyer A., Lambrichts I., Grangette C., Pot B., Vanderleyden J., De Keersmaecker S. C. J. (2007a). Functional analysis of D-alanylation of lipoteichoic acid in the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 3595–3604.

189. Perea Ve'lez M., De Keersmaecker S. C. J., Vanderleyden J. (2007b). Adherence factors of *Lactobacillus* in the human gastrointestinal tract. *FEMS Microbiol. Lett.*, 276, 140–148.
190. Peterson W. L., Mackowiak P. A., Barnett C. C., Marling-Cason M., Haley M. L. (1989). The human gastric bactericidal barrier: mechanisms of action, relative antibacterial activity, and dietary influences. *J. Infect. Dis.*, 159, 979–983.
191. Qin J., Li R., Raes J., Arumugam M., Burgdorf K. S., Manichanh C., Nielsen T., Pons N., Levenez F., Yamada T., Mende D.R., Li J., Xu J., Li S., Li D., Cao J., Wang B., Liang H., Zheng H., Xie Y., Tap J., Lepage P., Bertalan M., Batto J.M., Hansen T., Le Paslier D., Linneberg A., Nielsen H.B., Pelletier E., Renault P., Sicheritz-Ponten T., Turner K., Zhu H., Yu C., Li S., Jian M., Zhou Y., Li Y., Zhang X., Li S., Qin N., Yang H., Wang J., Brunak S., Doré J., Guarner F., Kristiansen K., Pedersen O., Parkhill J., Weissenbach J., Meta HIT Consortium, Bork P., Ehrlich S.D., Wang J. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464, 59-65.
192. Rafter J. (2004). The effects of probiotics on colon cancer development. *Nutr. Res. Rev.*, 17, 277-284.
193. Rajilić-Stojanović M., Heilig H. G., Molenaar D., Kajander K., Surakka A., Smidt H., de Vos W. M. (2009). Development and application of the human intestinal tract chip, a phylogenetic microarray: analysis of universally conserved phylotypes in the abundant microbiota of young and elderly adults. *Environ. Microbiol.*, 11, 1736-1751.
194. Rajilić-Stojanović M., Smidt H., de Vos W.M. (2007). Diversity of the human gastrointestinal tract microbiota revisited. *Environ. Microbiol.*, 9, 2125-2136.
195. Rajilić-Stojanović M., Smidt H., de Vos W. (2007). Diversity of the human gastrointestinal tract microbiota revisited. *Environ. Microbiol.*, 9, 2125-2136.
196. Rašić J. L., Kurmann J. A. (1983). Bifidobacteria and their role. *Basel: Birkhauser Verlag.*, 295.

197. Redondo-Lopez V., Cook R. L., Sobel J. D. (1990). Emerging role of lactobacilli in the control and maintenance of the vaginal bacterial microflora. *Rev. Infect. Dis.*, 12, 856–872.
198. Reid G., Bruce A.W. (2001). Selection of *Lactobacillus* strains for urogenital probiotic applications. *J. Infect. Dis.*, 183 (S1), S77-80.
199. Rembacken B.J., Snelling A.M., Hawkey P.M., Chalmers D.M., Axon A.T. (1999). Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet.*, 354, 635-9.
200. Rettger L. F., Cheplin H. A. (1920). The intestinal flora with special reference to the implantation of *Bacillus acidophilus*. Yale University Press, New Haven.
201. Rettger L. F., Horton G. D. (1914). A comparative study of the intestinal flora of white rats kept on experimental and ordinary mixed diet. *Centralbl. f. Bakt., Abt. I, Orig.*, 73, 362-372.
202. Reyes A., Haynes M., Hanson N., Angly F. E., Heath A. C., Rohwer F., Gordon J. I. (2010). Viruses in the faecal microbiota of monozygotic twins and their mothers. *Nature*, 466, 334-338.
203. Riggio O., Efrati C., Catalano C., Pediconi F., Mecarelli O., Accornero N., Nicolao F., Angeloni S., Masini A., Ridola L., Attili A.F., Merli M. (2005). High prevalence of spontaneous portal-systemic shunts in persistent hepatic encephalopathy: a case-control study. *Hepatology*, 42, 1158-1165.
204. Roberts I. S. (1996). The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 50, 285–315.
205. Rosander A., Connolly E., Roos, S. (2008). Removal of antibiotic resistance gene-carrying plasmids from *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 and characterization of the resulting daughter strain, *L. reuteri* DSM 17938. *Appl. Environ. Microb.*, 74 (19), 6032-6040.
206. Round J. L., Mazmanian S. K. (2009). The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat. Rev. Immunol.*, 9, 313-323.

207. Salminen M.K., Tynkkynen S., Rautelin H., Saxelin M., Vaara M., Ruutu P., Sarna S., Valtonen V., Järvinen A. (2002). *Lactobacillus* bacteremia during a rapid increase in probiotic use of *Lactobacillus rhamnosus* GG in Finland. *Clin Infect Dis.*, 35 (10), 1155-1160.
208. Salminen S., Ouwehand A., Benno Y., Lee Y.K. (2000). Probiotics: how should they be defined? *Trends Food Sci. Technol.*, 10, 107–110.
209. Salminen S., Tynkkynen M.K., Rautelin H., Saxelin M., Vaara M., Ruutu P., Sarna S., Valtonen V., Jarvinen A. (2002). *Lactobacillus* bacteremia during a rapid increase in probiotic use of *Lactobacillus rhamnosus* GG in Finland. *Clin. Infect. Dis.*, 35, 1155-60.
210. Sanchez B., Urdaci M. C., Margolles A. (2010). Extracellular proteins secreted by probiotic bacteria as mediators of effects that promote mucosa–bacteria interactions. *Microbiol.*, 156, 3232–3242.
211. Sanders M.E., Guarner F., Guerrant R., Holt P.R., Quigley E.M., Sartor R.B., Sherman P.M., Mayer E.A. (2013). An update on the use and investigation of probiotics in health and disease. *Gut*, 62, 787–96.
212. Schachtsiek M., Hammes W.P., Hertel C. (2004). Characterization of *Lactobacillus cornyformis* DSM 20001T surface protein Cpf mediating coaggregation with and aggregation among pathogens. *Appl. Environ Microb.*, 70, 7078-7085.
213. Schrezenmeir J., de Vrese M. (2001). Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition 1–3. *Am J. Clin Nutr.*, 73, 361S–364S.
214. Schultz M., Gottl C., Young T. J., Iwen T., Vanderhoof T. A. (2004). Administration of oral probiotic bacteria to pregnant women causes temporary infantile colonization. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 38, 293–297.
215. Sekirov I., Russell S. L., Antunes L. C., Finlay B. B. (2010). Gut microbiota in health and disease. *Physiol. Rev.*, 90, 859-904.
216. Sengupta R., Altermann E., Anderson R.C., Warren C., McNabb C., Moughan P.J., Roy N.C. (2013). The role of cell surface architecture of lactobacilli

- in host-microbe interactions in the gastrointestinal tract. *Mediat. Inflamm.*, ID 237921.
217. Senok A.C., Ismaeel A.Y., Botta G.A. (2005). Probiotics: facts and myths. *Clin. Microbiol Infect.*, 11, 958-66.
 218. Seppo L., Jauhiainen T., Poussa T., Korpela R. (2003). A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *Am. J. Clin. Nutr.*, 77 (2), 326-30.
 219. Servin A.L. (2004): Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev.*, 28, 405-440.
 220. Sghir A., Gramet G., Suau A., Rochet V., Pochart P., Dore J. (2000). Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 2263–2266.
 221. Shanahan F. (2000). Probiotics and inflammatory bowel disease: Is there a scientific rationale? *Inflamm. Bowel Dis.*, 6, 107-115.
 222. Shornikova A.V., Casas I.A., Isolauri E., Mykkanen H., Vesikari, T. (1997) *Lactobacillus reuteri* as a therapeutic agent in acute diarrhea in young children. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 24, 399–404.
 223. Shuang Q., Tsuda H., Miyamoto T. (2008). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in skim milk fermented with *Lactobacillus helveticus* 130B4 from camel milk in inner Mongolia, China. *J. Sci. Food Agric.*, 88, 2688–2692.
 224. Sieber R., Dietz U.T. (1998). *Lactobacillus acidophilus* and yogurt in the prevention and therapy of bacterial vaginosis. *Int. Dairy J.*, 8, 599-607.
 225. Sl. glasnik RS br. 45/10, 2010, Pravilnik o zdravstvenoj ispravnosti dijetetskih proizvoda.
 226. Sobol C. V. , Korotkov S. M. , Belostotskaya G. B. , Nesterov V. P. (2013). The influence of probiotics and probiotic product on respiration of mitochondria and intracellular calcium signal in cells of cardiovascular system. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A. Memb. Cell Biol.*, 7 (4), 294-301.

227. Sonestedt E., Wirfält E., Wallström P., Gullberg B., Orho-Melander M., Hedblad B. (2011). Dairy products and its association with incidence of cardiovascular disease: the Malmö diet and cancer cohort. *Eur. J. Epidemiol.*, 26 (8), 609-18.
228. Sperti G.S. (1971). Probiotics. AVI Publishing Co. Inc, West Point, Connecticut.
229. StatSoft, Inc. (2007). STATISTICA (data analysis software system), verzija 8.0. (www.statsoft.com).
230. Stecher B., Hardt W. D. (2008). The role of microbiota in infectious disease. *Trends Microbiol.*, 16, 107-114.
231. Strachan D. P. (1989). Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ*, 299, 1259-1260.
232. Šušković J. (1996). Rast i probiotičko djelovanje odabranih bakterija mliječne kiseline. Disertacija, Prehrambeno biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska.
233. Šušković J., Kos B., Frece J., Beganović J., Leboš Pavunc A., (2009). Probiotički koncept – probiotici kao dodaci hrani i probiotici kao bioterapeutici. *Croat. J. Food. Biotech. Nutr.*, 4 (3-4), 77-84 .
234. Šušković J., Kos B., Matošić S., Besendorfer V. (2000). The effect of bile salts on survival and morphology of a potential probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 16 (7), 673-678.
235. Šušković J., Brkić B., Matošić S., Marić V. (1997). *Lactobacillus acidophilus* M92 as potential probiotic strain. *Milchwissen*, 52, 430–435.
236. Sutherland I. W. (1972). Bacterial exopolysaccharides. *Adv. Microb. Physiol.*, 8, 143–213.
237. Swidsinski A., Weber J., Loening-Baucke V., Hale L. P., Lochs H. (2005). Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease. *J. Clin. Microbiol.*, 43, 3380–3389.
238. Sybesma W., Kort R., Lee Y. K. (2015). Locally sourced probiotics, the next opportunity for developing countries? *Trends Biotechnol.*, 33 (4),197–200.

239. Szajewska H., Skorka A., Ruszczynski M., Gieruszczak-Białek D. (2007). Meta-analysis: *Lactobacillus GG* for treating acute diarrhea in children. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 25, 871–81.
240. Tak P.P., Bresnihan B. (2000). The pathogenesis and prevention of joint damage in rheumatoid arthritis: advances from synovial biopsy and tissue analysis. *Arthritis Rheum.*, 43, 2619–33.
241. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, 28, 2731–9.
242. Tannock G. W., Munro K., Harmsen H. J. M., Welling G. W., Smart J., Gopal P. K. (2000). Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 2578–2588.
243. Tap J., Mondot S., Levenez F., Pelletier E., Caron C., Furet J. P., Ugarte E., Muñoz-Tamayo R., Paslier D.L., Nalin R., Dore J., Leclerc M. (2009). Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environ. Microbiol.*, 11, 2574–2584.
244. Taranto M. P., Fernandez Murga M. L., Lorca G., De Valdez G. F. (2003). Bile salts and cholesterol induce changes in the lipid cell membrane of *Lactobacillus reuteri*. *J. Appl. Microbiol.*, 95 (1), 86–91.
245. Temmerman R., Pot B., Huys G., Swings J. (2003). Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Int. J. Food Microbiol.*, 81 (1), 1-10.
246. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. (1994), CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22, 4673-4680.

247. Topping D.L., Clifton P.M. (2001). Short-chain fatty acids and human colonic function: Roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol. Rev.*, 81, 1031-1064.
248. Tripathi K.D. (2004). Essentials in medical pharmacology. 4th ed. New Delhi: Jaypee.
249. Tripathy P. P., Suar M., Das J.K., Saini M.R. (2014). Probiotic and functional characteristics of an indigenous *Lactobacillus* species isolated from traditional fermented product (Dahi-Chenna) of rural Odisha. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 3 (11), 82-95.
250. Tuomola E., Crittenden R., Playne M., Isolauri E., Salminen S. (2001). Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *Am. J. Clin. Nutr.*, 73, 393S–398S.
251. Turnbaugh, P. J., Hamady, M., Yatsunenko, T., Cantarel, B. L., Duncan, A., Ley, R. E., Sogin M.L., Jones W.J., Roe B.A., Affourtit J.P., Egholm M., Henrissat B., Heath A.C., Knight R., Gordon J.I. (2009). A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, 457, 480-484.
252. Uccello M., Malaguarnera G., Basile F., D’agata V., Malaguarnera M., Bertino G., Vacante M., Drago F., Biondi A. (2012). Potential role of probiotics on colorectal cancer prevention. *BMC Surg.*, 12 (1 1), S35.
253. Umetsu D.T., McIntire J.J., Akbari O., Macaubas C., De Kruyff R.H. (2002). Asthma: an epidemic of dysregulated immunity. *Nat. Immunol.*, 3, 715–20.
254. Urbaniak C., Cummins J., Brackstone M. , Macklaim J.M., Gloor G.B., Baban C.K., Scott L., O’Hanlon D.M., Burton J.P., Francis K.P., Tangney M., Reid G. (2014). Bacterial microbiota of human breast tissue. *Appl. Environ. Microbiol.*, doi:10.1128/AEM.00242-14.
255. van der Waaij D., de Vries, J.M., van Derwees, J.E.C. (1971). Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic-treated mice. *J. Hyg.*, 69, 405-411.
256. van Hoek A. H. A. M., Mevius D., Guerra B., Mullany P., Roberts A. P., Aarts H. J. M. (2011). Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Front. Microbiol.*, 3, 384.

257. van Kerkhoven L.A.S., Eikendal T., Laheij R.J.F., van Oijen M.G.H., Jansen J.B.M.J. (2008). Gastrointestinal symptoms are still common in a general Western population. *Neth. J. Med.*, 66 (1), 18-22.
258. Vanhoutte T., Huys G., de Brandt E., Swings J. (2004). Temporal stability analysis of the microbiota in human feces by denaturing gradient gel electrophoresis using universal and group-specific 16S rRNA gene primers. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 48, 437-446.
259. van Kerckhoven V., Huys G., Vancanneyt M., Vael C., Klare I., Romond M.-B., Entenza J.M., Moreillon P., Wind R.D., Knol J., Wiertz E., Pot B., Vaughan E.E., Kahlmeter G., Goossens H. (2008). Biosafety assessment of probiotics used for human consumption: recommendations from the EU-PROSAFE project. *Trends Food Sci. Tech.*, 19 (2), 102-114.
260. Varki A., Cummings R.D., Esko J.D., Freeze H.H., Stanley P., Bertozzi C.R., Hart G.W., Etzler M.E. (2009). Microbial Lectins: Hemagglutinins, Adhesins, and Toxins. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 34, 1234-1239.
261. Vasiljevic T., Shah N.P. (2008). Probiotics-From Metchnikoff to bioactives. *Int. Dairy J.*, 18, 714-728.
262. Vasquez A., Jakobsson T., Ahrne S., Forsum U., Molin G. (2002). Vaginal *Lactobacillus* flora of healthy Swedish women. *J. Clin. Microbiol.*, 40, 2746-2749.
263. Velez M. P., De Keersmaecker S. C. J., Vanderleyden J. (2007) Adherence factors of *Lactobacillus* in the human gastrointestinal tract. *FEMS Microbiol. Lett.*, 276 (2), 140-148.
264. Velraeds M.M., van der Mei H.C., Reid G., Busscher H. J. (1996). Inhibition of initial adhesion of uropathogenic *Enterococcus faecalis* by bio-surfactants from *Lactobacillus* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 1958-1963.
265. Vergin F. (1954). Anti- and probiotika. *Hippokrates*, 25, 16-19.
266. Vikova E., Popelarova V., Trojanova I., Kiler J. (2006). Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria isolated from gastrointestinal tract of calves. *Livest. Prod. Sci.*, 105, 253-259.

267. Vinderola C.G., Reinheimer J.A. (2003). Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “*in vitro*” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Res. Int.*, 36, 895-904.
268. Vollaard E. J., Clasener H. A. (1994). Colonization resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 38 (3), 409–414.
269. Wadström T., Andersson K., Sydow M., Axelsson L., Lindgren S., Gullmar B., (1987). Surface properties of lactobacilli isolated from the small intestine of pigs. *J. Appl. Bacteriol.*, 62, 513–520.
270. Walter J. (2005). The microecology of lactobacilli in the gastrointestinal tract, p. 51–82. In G. W. Tannock (ed.), *Probiotics & prebiotics: scientific aspects*. Caister Academic Press, Norfolk, United Kingdom.
271. Wang B., Wei H., Yuan J., Li Q., Li Y., Li N., Li J. (2008). Identification of a surface protein from *Lactobacillus reuteri* JCM1081 that adheres to porcine gastric mucin and human enterocyte-like HT-29 Cells. *Curr. Microbiol.*, 57, 33-38.
272. Watanabe S., Narisawa Y., Arase S., Okamatsu H., Ikenaga T., Tajiri Y., Kumemura M. (2005). Differences in fecal microflora between patients with atopic dermatitis and healthy control subjects. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 111 (3), 587-91.
273. Wilhelm S.M., Brubaker C.M., Varcak E.A., Kale-Pradhan P.B. (2008). Effectiveness of probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome. *Pharmacotherapy*, 28, 496-505.
274. Williams N.T. (2010). Probiotics. *Am. J. Health-Syst Pharm.*, 67 (6), 449-458.
275. Wills-Karp M., Santeliz J., Karp C.L. (2001). The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis. *Nat. Rev. Immunol.*, 1, 69–75.
276. Wilson M., McNab R., Henderson B. (2002). *Bacterial Disease Mechanisms*, 1st edn. Cambridge, Cambridge University.
277. Wolever T.M., Brighenti F., Royall D., Jenkins A.L., Jenkins D.J. (1989). Effect of rectal infusion of short chain fatty acids in human subjects. *Am. J. Gastroenterol.*, 84, 1027–1033.

278. Xanthopoulos V., Litopoulou-tanetaki E., Tzanetakis N. (2000). Characterization of *Lactobacillus* isolates from infant faeces as dietary adjuncts. *Food Microbiol.*, 17 (2), 205-215.
279. Yuan Q. (2009). Insight into milk protein allergy: Microenvironment matters. *Gastroenterol.*, 124, 259–261.
280. Zarate G., Perez Chaia A., Gonzalez S., Oliver G. (2000). Viability and b-galactosidase activity of dairy propionibacteria subjected to digestion by artificial gastric and intestinal fluids. *J. Food Protect.*, 63, 1214–1221.
281. Zavišić G., Petričević S., Radulović Ž., Begović J., Golić N., Topisirović L., Strahinić I. (2012). Probiotic features of two oral *Lactobacillus* isolates. *Braz. J. Microbiol.*, 43, (1), 418-428.
282. Zé-Zé L., Tenreiro R., Duarte A., Salgado M.J., Melo-Cristino J., Lito L., Carmo M.M., Felisberto S., Carmo G. (2004). Case of aortic endocarditis caused by *Lactobacillus casei*. *J. Med Microbiol.*, 53, 451–453.
283. Zhou X., Bent S.J., Schneider M.G., Davis C.C., Islam M.R., Forney L. J. (2004). Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods. *Microbiol.*, 150, 2565-2573.
284. Zhou X., Brown C. J., Abdo Z., Davis C. C., Hansmann M. A., Joyce P., Foster J. A., Forney L. J. (2007). Differences in the composition of vaginal microbial communities found in healthy Caucasian and black women. *ISME J.*, 1, 121–133.
285. Ziada D.H., Soliman H.H., El Yamany S.A., Hamisa M.F., Hasan A.M. (2013). Can *Lactobacillus acidophilus* improve minimal hepatic encephalopathy? A neurometabolite study using magnetic resonance spectroscopy. *Arab J. Gastroenterol.*, 14 (3), 116–122.

8. Prilozi

Prilog 1. Sekvenca 16S rRNK gena izolata Lac1, GenBank: JN315657.1

GAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAACTCTGGTATTGAT
TGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACA
CGTGGGAAACCTGCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAAT
ACCGCATAACAACCTTGGACCGCATGGTCCGAGCTTGAAAGATGGCTTCGGCTA
TCACTTTTGGATGGTCCC GCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCA
CCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACT
GAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAAT
GGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTC
GTAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTT CAGGTATT
GACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA
TACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGC
GGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGG
AAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGG
TGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTC
TGTA ACTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCC
TGGTAGTCCATAACCGTAAACGATGAATGCTAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTC
AGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGC
TGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTT
TAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATC
TAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGT
CGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCT
TATTATCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACA
AACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGG
CTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAA
GCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACA
TGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTT
CCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAG
TCGGTGGGGTAACCTTTTAGGAACCAGCCGCCTAAGGTGGG

Prilog 2. Sekvenca 16S rRNK gena izolata Lac2, GenBank: JN315658

GAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAACTCTGGTATTGAT
TGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACA
CGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAAT
ACCGCATAACAACCTGGACCGCATGGTCCGAGCTTGAAAGATGGCTTCGGCTA
TCACTTTTGGATGGTCCC GCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCA
CCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACT
GAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAAT
GGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTC
GTA AAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTT CAGGTATT
GACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA
TACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGC
GGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGG
AAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGG
TGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTC
TGTA ACTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCC
TGGTAGTCCATAACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCT
TCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAG
GCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGG
TTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAA
TCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTT
GTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCC GCAACGAGCGCAACC
CTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGAC
AAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGG
GCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTA
AGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTAC
ATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTT
CCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACACCCAAA
GTCGGTGGGGTAACCTTTTAGGAACCAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGA

Prilog 3. Sekvenca 16S rRNK gena izolata Lac3, GenBank: JN315659

CGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAGTTCTCGTTGATGATCGGTGCTT
GCACCGAGATTCAACATGGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGT
AACCTGCCCTTAAGTGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATA
GATCCAAGAACCGCATGGTTCTTGGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTT
GGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCG
ATGATACGTAGCCGAACCTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACG
GCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAA
GTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTC
TGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAACTGTTGCCGGCGTGACGGTATC
CAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG
TGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTT
AAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGCGCATCGGAAACTGG
GAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACCTCATGTGTAGCGGTGAAATG
CGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAC
GACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAG
TCCATGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTG
CCGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAA
ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT
CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTTTGATCACCTGAGA
GATCAGGTTTCCCCTTCGGGGGCAAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCA
GCTCGTGTTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATGA
CTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGTGACAAACCG
GAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACA
CACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAGACCGCGAGGTCAAGCTA
ATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAA
GTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGG
GCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCGAAGCCGG
TGCGCGTAACCCTTTTAGGGAGCGAGCCG

Prilog 4. Sekvenca 16S rRNK gena izolata Lac4, GenBank: JN315660

ATACATGCAAGTTCGAACGAGTTCTCGTTGATGATCGGTGCTTGCACCGAGATT
CAACATGGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTT
AAGTGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAGATCCAAGAA
CCGCATGGTTCTTGGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCC
GCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGATGATACGTA
GCCGAACTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAATC
CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGA
GCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTGGA
GAAGAATGGTCGGCAGAGTAACTGTTGTTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAA
AGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGT
TATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGT
GAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGCGCATCGGAAACTGGGAACTTGAGT
GCAGAAGAGGACAGTGGAACCTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAT
GGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGG
CTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTA
AACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAAC
GCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGA
ATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACG
CGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTTTGATCACCTGAGAGATCAGGTTTC
CCCTTCGGGGGCAAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGT
GAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATGACTAGTTGCCAG
CATTTAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGG
GGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACA
ATGGATGGTACAACGAGTTGCGAGACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGC
CATTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAATCGC
TAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACAC
ACCGCCCGTACACCATGAGAGTTTGTAAACCCGAAGCCGGTGGCGTAACCC
TTTTAGGGAGCGAGCCGTCTAAGGTGGGACAAATGATTAGGGTGAAGTCGTAA
CAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGTTGGATCAC

Prilog 5. Sekvenca 16S rRNK gena izolata Lac5, GenBank: JN315661

AGTCGAGCGAGCTTGCCTAGATGAATTTGGTGCTTGCACCAAATGAAACTAGA
TACAAGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCAAGAGA
CTGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGGATAACAACACTAGACGC
ATGTCTAGAGTTTAAAAGATGGTTCTGCTATCACTCTTGGATGGACCTGCGGTG
CATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAATGATGCATAGCCGAG
TTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGG
GAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACG
CCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGGTAGTGAAGAA
AGATAGAGGTAGTAACCTGGCCTTTATTTGACGGTAATTACTTAGAAAGTCACG
GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGG
ATTTATTGGGCGTAAAGCGAGTGCAGGCGGTTCAATAAGTCTGATGTGAAAGC
CTTCGGCTCAACCGGAGAATTGCATCAGAACTGTTGAACTTGAGTGCAGAAG
AGGAGAGTGGAACCTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAA
CACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAG
CATGGGTAGCGAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGA
GTGCTAAGTGTTGGGAGGTTTCCGCCTCTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAG
CACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGG
GGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACCGCAAGAA
CCTTACCAGGTCTTGACATCCAGTGCAAACCTAAGAGATTAGGAGTTCCCTTC
GGGACGCTGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATG
TTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCATTAGTTGCCATCATTAAAG
TTGGGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGA
CGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGAC
GGTACAACGAGAAGCGAACCTGCGAAGGCAAGCGGATCTCTGAAAGCCGTTC
TCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGCTGGAATCGCTAGTA
ATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGC
CCGTCACACCATGAGAGTCTGTAACACCCAAAGCCGGTGGGATAACCTTTATA
GGAGTCAGCCGTCTAAGGTAGGACAGATGATTAG

Prilog 6. Sekvenca 16S rRNK gena izolata Lac6, GenBank: JN315662

AAGCCCCGCTTGGCGGCGTGCCTATACATGCAAGTCGAACGAACTCTGGTATT
GATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTA
ACACGTGGGAAACCTGCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCT
AATACCGCATAACAACCTTGGACCGCATGGTCCGAGCTTGAAAGATGGCTTCGG
CTATCACTTTTGGATGGTCCC GCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGC
TCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGG
ACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCAC
AATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGG
CTCGTAAAACCTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTCAAGG
ATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGG
TAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCA
GGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCAT
CGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAG
CGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCT
GGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGAT
ACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCG
CCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCG
CAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCAT
GTGGTTTAATTGGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTATG
CAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCAT
GGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC
AACCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCG
GTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGA
CCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGA
GAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCG
CCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAAT
ACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACAC
CCAAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTAGGAACCAGCCGCCTAAAGGTGAACAGGT
ATAGGG

Prilog 7. Sekvenca 16S rRNK gena izolata Lac7, GenBank: JN315663

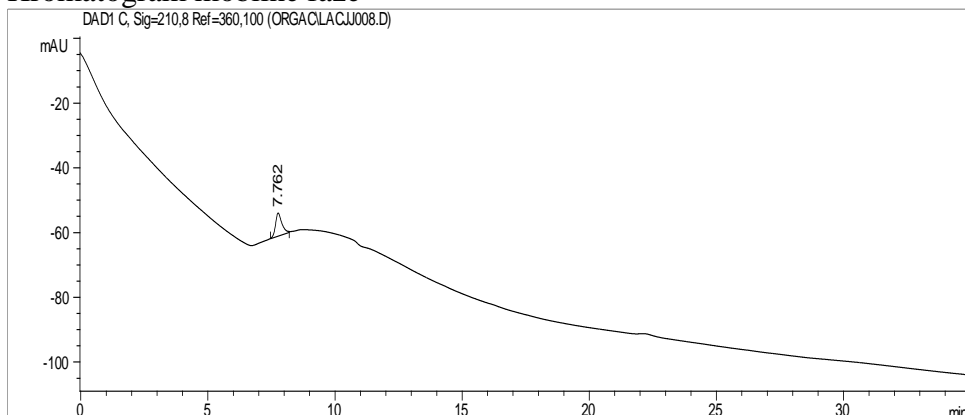
ACATGCAGTCGACGAACTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATT
TGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGG
GGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTTGGACCGCATG
GTCCGAGCTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGC
GTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGA
CCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACG
GGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAAC
GCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTTAAAGAAGA
ACATATCTGAGAGTAACTGTTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCAC
GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCG
GATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAG
CCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGA
AGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAG
AACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAA
AGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGAT
GAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTA
AGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGAC
GGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAG
AACCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTT
CGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGAT
GTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATT
AGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGAT
GACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGG
ATGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATT
CTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGT
AATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCG
CCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACCCAAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTA
GGAACCAGCCGCTAATGGTGA

Prilog 8. Sekvenca 16S rRNK gena izolata 5s

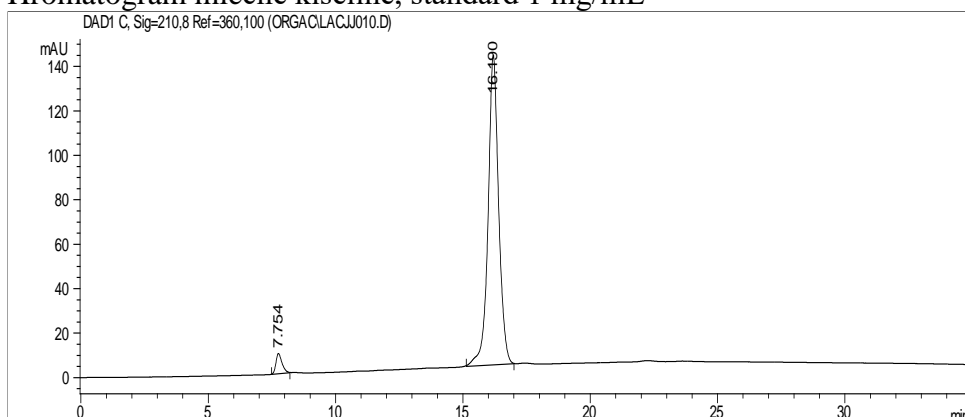
GGCCGACGTGGGCTATCTGCAGTCGACGAGTTCTCGTTGATGATCGGTGCTTG
CACCGAGATTCAACATGGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTA
ACCTGCCCTTAAGTGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAG
ATCCAAGAACCGCATGGTTCTTGGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTG
GATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGA
TGATACGTAGCCGAACCTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGG
CCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGT
CTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGGTTCGTA AAACTCTG
TTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAACTGTTGTCGGCGTGACGGTATCCA
ACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTG
GCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAA
GTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGCGCATCGGAAACTGGGA
AACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCG
TAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTA ACTGA
CGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCC
ATGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCG
CAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACT
CAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCG
AAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTTTGATCACCTGAGAGA
TCAGGTTTCCCCTTCGGGGGCAAATGACAGGTGGTGATGGTTGTTCGTCAGC
TCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATGACT
AGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGTGACAAACCGGA
GGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACA
CGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAGACCGCGAGGTCAAGCTAATC
TCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTC
GGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCC
TTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCGAAGCCGGTGG
CGTAACCCTTTTAGGGAGCGAGCCGTCTAAGGTGGGACAAAGATTAGGGGAA
GTCTACAGAGCGCAA

Prilog 9. Spektroskopska slika sadržaja mlečne i buterne kiseline

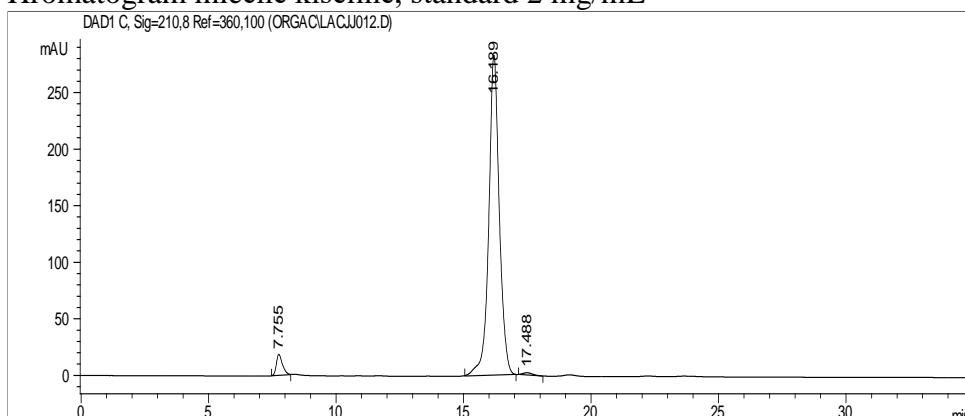
Hromatogram mobilne faze



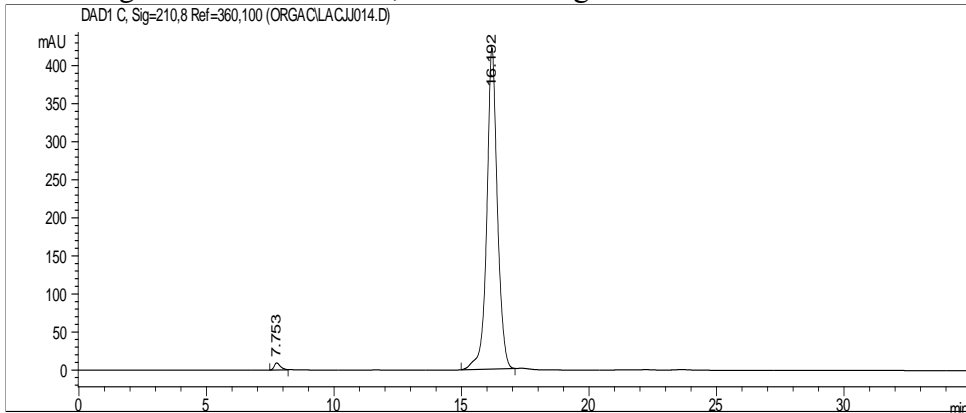
Hromatogram mlečne kiseline, standard 1 mg/mL



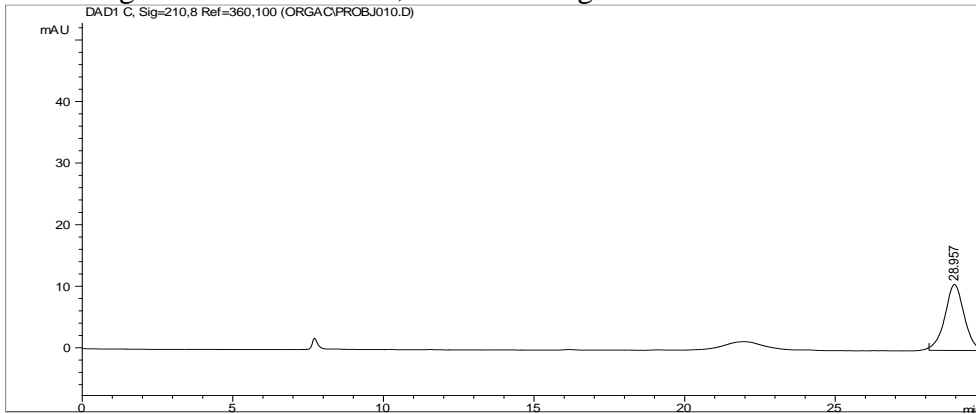
Hromatogram mlečne kiseline, standard 2 mg/mL



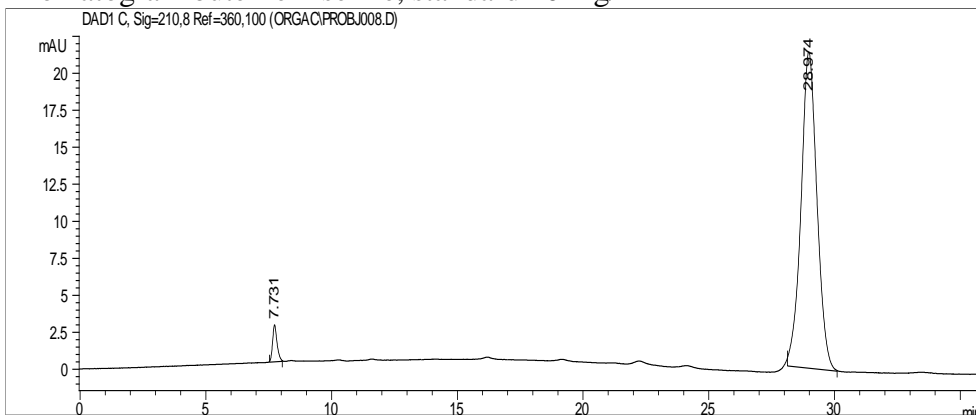
Hromatogram mlečne kiseline, standard 3 mg/mL



Hromatogram buterne kiseline, standard 5 mg/L

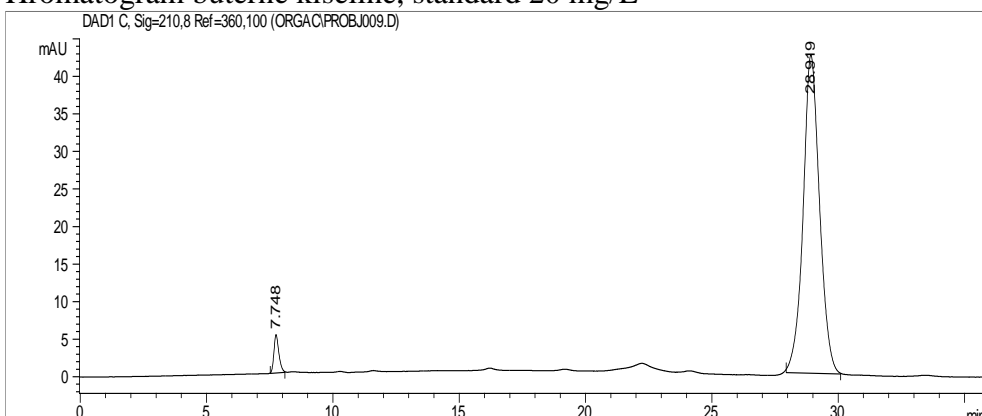


Hromatogram buterne kiseline, standard 10 mg/L

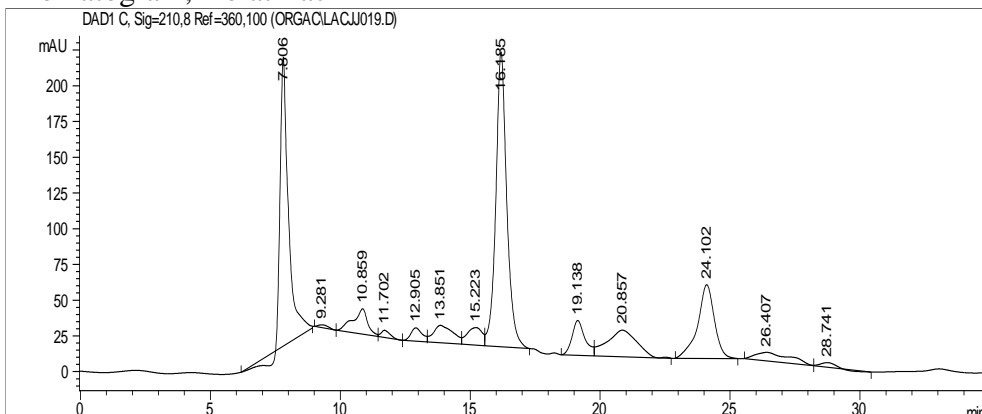


Prilog 9. Spektroskopska slika sadržaja mlečne i buterne kiseline (nastavak)

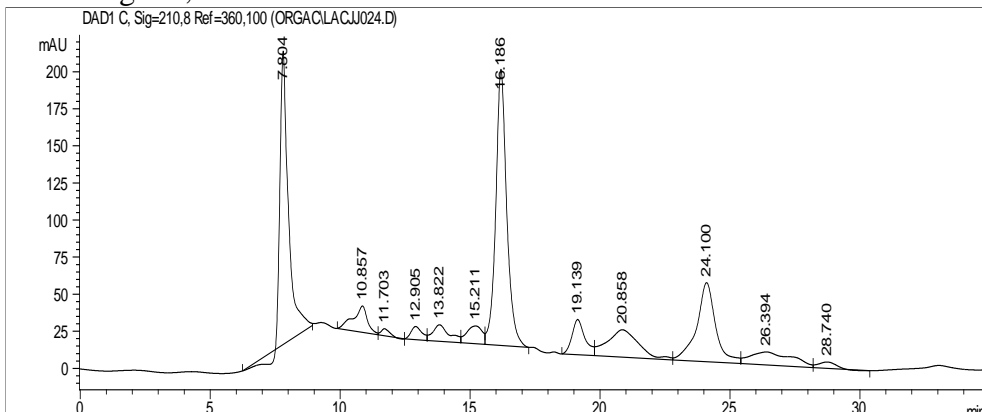
Hromatogram buterne kiseline, standard 20 mg/L



Hromatogram, izolat Lac 1

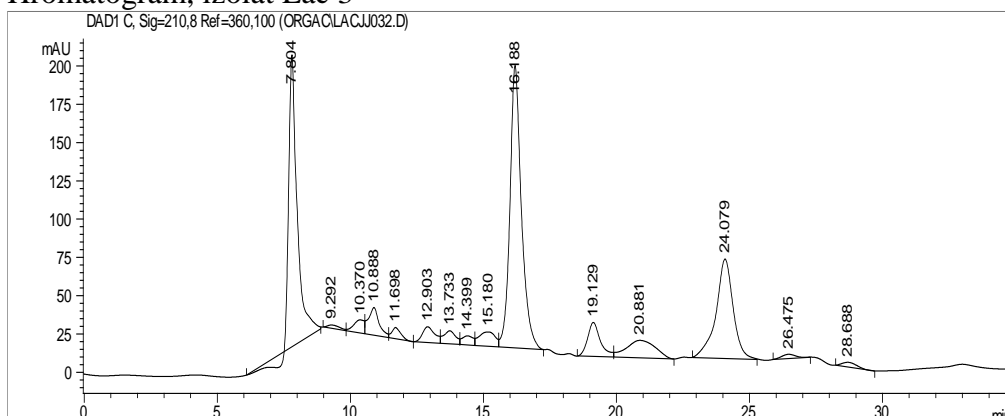


Hromatogram, izolat Lac 2

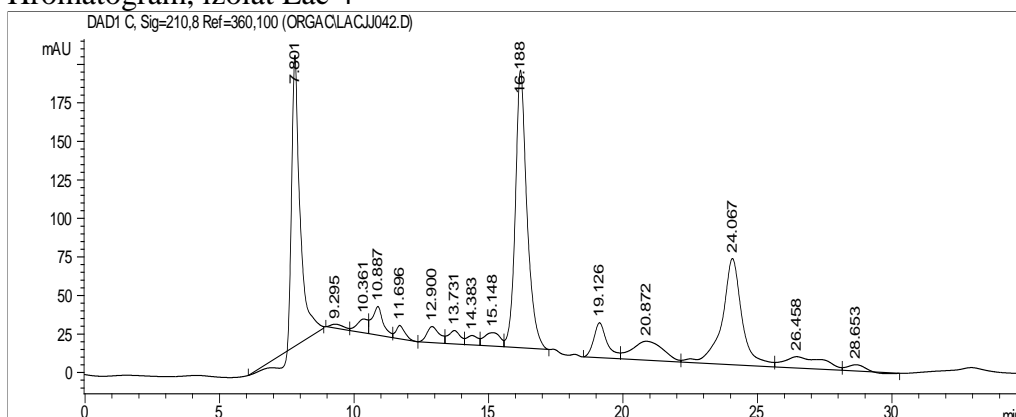


Prilog 9. Spektroskopska slika sadržaja mlečne i buterne kiseline (nastavak)

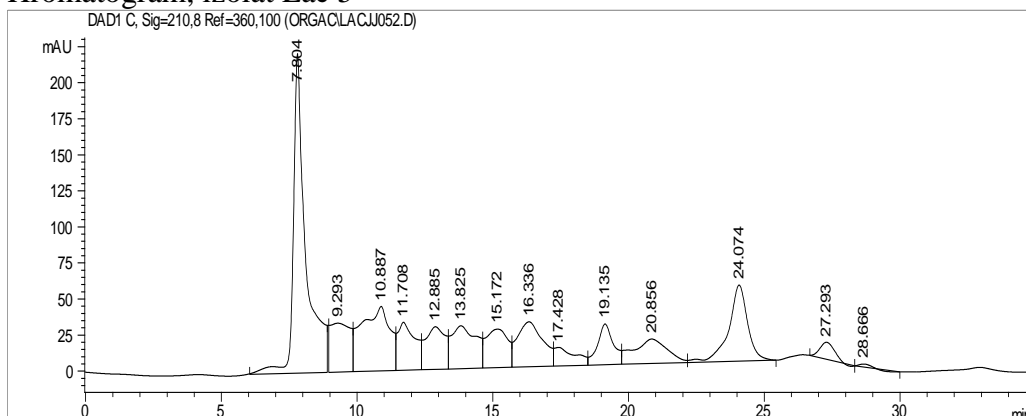
Hromatogram, izolat Lac 3



Hromatogram, izolat Lac 4

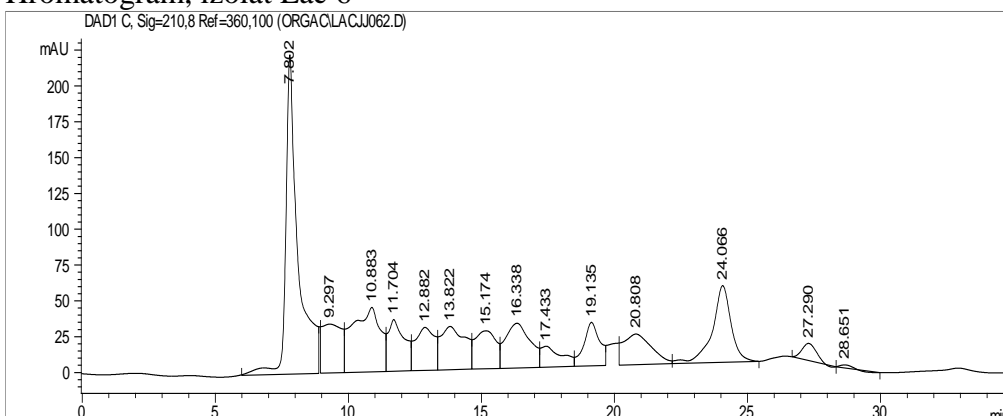


Hromatogram, izolat Lac 5

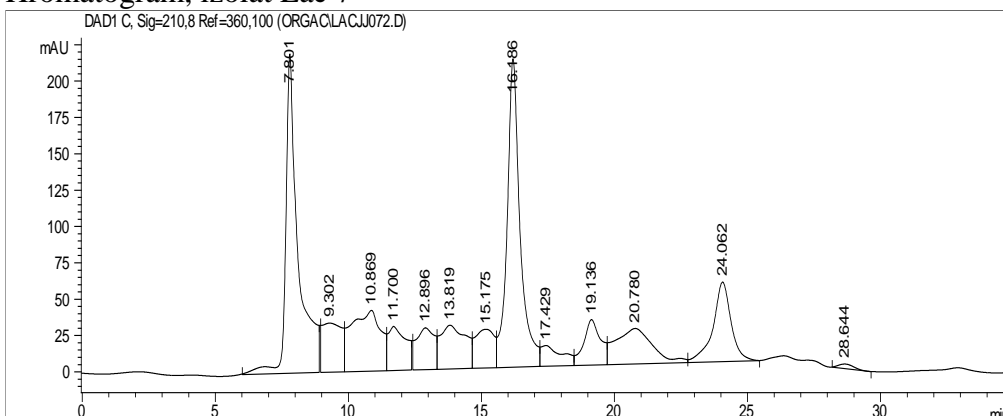


Prilog 9. Spektroskopska slika sadržaja mlečne i buterne kiseline (nastavak)

Hromatogram, izolat Lac 6



Hromatogram, izolat Lac 7



Prilog 10. Statistička značajnost razlika u preživljavanju laktobacila u različitim uslovima spoljašnje sredine

A. Na niskim vrednostima pH (u svakom periodu merenja među izolatima)

		pH=2			pH=3			pH=4		
		0	2h	4h	0	2h	4h	0	2h	4h
Lac1 vs	Lac2		***	***		***	***			***
	Lac3	*	***	***		***	***	*	***	***
	Lac4	***	***	***	***	***	*	***	***	***
	Lac6		***	***		***	***		***	***
	Lac7		***	***	*	***	***	***	***	***
	5s	***	***	***	***	***	*	***	***	*
Lac2 vs	Lac3		***	***		***			***	***
	Lac4	***	***	***	***	***	***	***	***	***
	Lac6			***		***	**		***	**
	Lac7		***			***	***	***	***	
	5s	***	***	***	***	***	***	***	***	***
Lac3 vs	Lac4	**	***	***	***	***	***	*	***	***
	Lac6	**	***	***			***	**	***	***
	Lac7	**	***	***	**	***	***	***	***	***
	5s	***	***	***	***	***	***	***	**	*
Lac4 vs	Lac6	***	***	***	***	***	***	***	***	***
	Lac7	***	***	***	*	***	***	***	***	***
	5s	***	***	***	**	***	***	***	***	***
Lac6 vs	Lac7		***	*	**	***	***	***		***
	5s	***	***	***	***	***	***	***	***	***
Lac7 vs	5s	***	**	***	***	***	***	***	***	***

* p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 (dvo faktorska ANOVA za ponovljena merenja, Fisher LSD test).

B. U prisustvu žučnih soli (u svakom periodu merenja među izolatima)

		Žučne soli 0,5%			Žučne soli 1%			Žučne soli 2%		
		0	2h	4h	0	2h	4h	0	2h	4h
Lac1 vs	Lac2	***	*	***	***	***	***	***	***	***
	Lac3	***	**	***	***	***	***	***	***	
	Lac4	*	***	*	***	*	***	*	***	***
	Lac6	*	***	**	***	***	***	***	***	*
	Lac7	***			***	***	***	***	***	***
	5s	***	***	***	***	***	***	***	***	**
Lac2 vs	Lac3	***		*	***	***	***	***	***	***
	Lac4	***	*	***	***	***	***	***	***	
	Lac6	*	*	***	***	***	***	***		***
	Lac7		***	***	***	***	***	***	***	***
	5s	***	***	**	*	***	***		**	***
Lac3 vs	Lac4	***		***	***	*		***	***	***
	Lac6	***		***	***		***	***	***	*
	Lac7	***	***	***	***	***	***	***	***	***
	5s	***	***	*	***	***	***	**	***	***
Lac4 vs	Lac6	***			***		***	***	***	***
	Lac7	***	***	**	***	***	***	***	**	***
	5s	***	***	***	***	***	***	***	***	***
Lac6 vs	Lac7		***	***	***	***	***	***	***	***
	5s	***	***	***	***	***	*	***	**	**
Lac7 vs	5s	***	***	***	***	***	***	***	***	***

* p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 (dvofaktorska ANOVA za ponovljena merenja, Fisher LSD test).

C. U veštačkim gastrointestinalnim tečnostima (u svakom periodu merenja među izolatima)

		AGF			AIF		
		0	1h	2h	0	1h	2h
Lac1 vs	Lac2	*		***	***	***	***
	Lac3	***		***			***
	Lac4	***		***	***	***	***
	Lac6	***	***	***	***	***	***
	Lac7	***	***	***	*	*	
	5s	***	***	***	***	***	*
Lac2 vs	Lac3	***			***	***	***
	Lac4	***				**	**
	Lac6	***	***	**	***	***	***
	Lac7	***	***	**	***	***	***
	5s	***	***	***	***		***
Lac3 vs	Lac4	***			***	***	*
	Lac6	***	***	*	***	***	***
	Lac7	***	***	*	***	**	***
	5s	***	**	**	***	***	***
Lac4 vs	Lac6	***	***	**	***	***	***
	Lac7	***	***	***	***	***	***
	5s	***	**	***	***	***	***
Lac6 vs	Lac7				*	*	*
	5s		***	**		***	***
Lac7 vs	5s		***	**		***	***

* p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 (dvo faktorska ANOVA za ponovljena merenja, Fisher LSD test).

Prilog 11. Statistička značajnost razlika u hidrofobnosti ćelijskog zida među izolatima

	Lac2	*
	Lac3	
Lac1 vs	Lac4	**
	Lac6	*
	Lac7	
	5s	***
	Lac3	
Lac2 vs	Lac4	
	Lac6	
	Lac7	*
	5s	***
	Lac4	
Lac3 vs	Lac6	
	Lac7	
	5s	***
	Lac6	
Lac4 vs	Lac7	**
	5s	***
	Lac7	*
Lac6 vs	5s	***
Lac7 vs	5s	***

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (dvofaktorska ANOVA za ponovljena merenja, Fisher LSD test).

Prilog 12. Statistička značajnost razlika u sposobnosti autoagregacije i koagregacije

A. Svakog pojedinačnog izolata u funkciji vremena

	Autoagregacija					
	0 vs 2h	0 vs 4h	0 vs 24h	2 vs 4h	2 vs 24h	4 vs 24h
Lac1	***	***	***	*	***	***
Lac2	***	***	***	**	***	*
Lac3	***	***	***	***	***	*
Lac4	**	***	***		***	***
Lac6	**	***	***	**	***	***
Lac7			***		***	***
5s	*	***	***	***	***	*

Koagregacija sa <i>L. monocytogenes</i>						
	0 vs 2h	0 vs 4h	0 vs 24h	2 vs 4h	2 vs 24h	4 vs 24h
Lac1	**	***	***	***	***	*
Lac2	*	***	***	*	***	***
Lac3	*	***	***	***	***	**
Lac4		**	***		***	***
Lac6		***	***	*	***	***
Lac7	**	***	***		***	***
5s		***	***	*	***	***

Koagregacija sa <i>E. coli</i>						
	0 vs 2h	0 vs 4h	0 vs 24h	2 vs 4h	2 vs 24h	4 vs 24h
Lac1		***	***	***	***	***
Lac2	*	***	***	***	***	***
Lac3	*	***	***	***	***	***
Lac4	*	***	***	***	***	***
Lac6	*	***	***	***	***	***
Lac7	*	***	***	***	***	***
5s		***	***	***	***	***

* p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 (dvofaktorska ANOVA za ponovljena merenja, Fisher LSD test).

Prilog 12. Statistička značajnost razlika u sposobnosti autoagregacije i koagregacije (nastavak)

B. U svakom periodu merenja među izolatima

		Autoagregacija				Koagregacija sa <i>L. monocytogenes</i>				Koagregacija sa <i>E. coli</i>			
		0	2h	4h	24h	0	2h	4h	24h	0	2h	4h	24h
Lac1 vs	Lac2												
	Lac3												
	Lac4			*				*					
	Lac6				**				*				**
	Lac7	*			*			*					*
	5s		**		***			**	*	*	*	*	**
Lac2 vs	Lac3												
	Lac4			*									
	Lac6				***				*				**
	Lac7	**			***								*
	5s		*	*	*						*	*	**
Lac3 vs	Lac4			*									
	Lac6				***				*				*
	Lac7	**			***								*
	5s				*			*		*	*		**
Lac4 vs	Lac6				**				**				*
	Lac7	**			**								*
	5s				**								**
Lac6 vs	Lac7	*											
	5s				***				***				***
Lac7 vs	5s	***	**		***			**		*			***

* p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 (dvofaktorska ANOVA za ponovljena merenja, Fisher LSD test).

Prilog 13. Statistička značajnost razlika u sposobnosti adhezije među izolatima

	Lac2	***
	Lac3	***
Lac1 vs	Lac4	***
	Lac6	***
	Lac7	
	5s	***
	Lac3	***
	Lac4	***
Lac2 vs	Lac6	***
	Lac7	***
	5s	***
	Lac4	**
Lac3 vs	Lac6	***
	Lac7	***
	5s	***
	Lac6	***
Lac4 vs	Lac7	***
	5s	***
Lac6 vs	Lac7	***
	5s	***
Lac7 vs	5s	***

p<0,01, *p<0,001 (dvofaktorska ANOVA za ponovljena merenja, Fisher LSD test).

Prilog 14. Analiza korelacije između svojstava hidrofobnosti, autoagregacije, koagregacije (sa *L. monocytogenes* i *E. coli*) i adhezije na ćelije kolona HCT 116

		Hidrofobnost	Autoagregacija	Koagregacija sa <i>L.monocytogenes</i>	Koagregacija sa <i>E.coli</i>	Adherirane bakterije na ćelije HCT 116
Hidrofobnost	Pearson	1	0,465*	0,383*	0,431*	-0,609**
	Correlation (r)					
	Sig. (2-tailed)		0,034	0,044	0,022	0,003
	N	28	21	28	28	21
Autoagregacija	Pearson	0,465*	1	0,730**	0,724**	-0,530*
	Correlation (r)					
	Sig. (2-tailed)	0,034		0,000	0,000	0,013
	N	21	21	21	21	21
Koagregacija sa <i>L.monocytogenes</i>	Pearson	0,383*	0,730**	1	0,937**	-0,412
	Correlation (r)					
	Sig. (2-tailed)	0,044	0,000		0,000	0,064
	N	28	21	28	28	21
Koagregacija sa <i>E.coli</i>	Pearson	0,431*	0,724**	0,937**	1	-0,478*
	Correlation (r)					
	Sig. (2-tailed)	0,022	0,000	0,000		0,028
	N	28	21	28	28	21
Adherirane bakterije na ćelije HCT 116	Pearson	-0,609**	-0,530*	-0,412	-0,478*	1
	Correlation (r)					
	Sig. (2-tailed)	0,003	0,013	0,064	0,028	
	N	21	21	21	21	21

Pirsonov koeficijent korelacije ukazuje na korelisanost osobina i to na sledeći način:
 $r < 0$ negativna korelacija; $r = 0$ ne postoji korelacija; $r > 0$ pozitivna korelacija.

9. Opšti podaci o autorskim pravima

Biografija

Jelena Novaković Jovanović je rođena 15.06.1979. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu školu i IX beogradsku gimnaziju "Mihajlo Petrović Alas". Studijsku grupu Ekologija i zaštita životne sredine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je 1998. godine, gde je 2005. godine diplomirala sa prosečnom ocenom 9,31 i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Školske 2008/09. godine upisala je doktorske studije na Biološkom fakultetu, modul Mikrobiologija.

Od 2008. je zaposlena u farmaceutskoj kompaniji Galenika a.d. U periodu od 2008.-2010. godine radila je na poslovima stručnog saradnika u Institutu za istraživanje i razvoj, Laboratoriji za biotehnologiju. U tom periodu je bila angažovana na inovacionom projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije 451-01-0065/2008-01/28 pod nazivom "Razvoj probiotičkog preparata za humanu upotrebu na bazi bakterija mlečne kiseline". Od 2010. godine radi u Službi za biološka ispitivanja Kontrole kvaliteta na poslovima kontrole kvaliteta lekova i dijetetskih proizvoda, kao i praćenju ambijentalnih uslova u proizvodnim pogonima kompanije Galenika a.d.

Učestvovala je na više stručnih edukacija i konferencija u zemlji i inostranstvu. Bila je dobitnik FEMS granta za mlade istraživače za skup "10th Symposium on lactic acid bacteria" održanom 2011. godine u Egmond aan Zee, Holandija. Bila je predavač po pozivu iz oblasti mikrobiološkog kvaliteta sirovina i endotoksina na PharmaLab kongresu u Dizeldorfu 2013. i 2015. godine, kao i iz oblasti metoda ispitivanja kvaliteta lekova na European Microbiology Conference skupu u Pragu 2014. godine, sva tri skupa u organizaciji European Compliance Academy (ECA).

Do sada je publikovala 3 rada u naučnim časopisima i 6 saopštenja u zbornicima sa naučnih skupova u zemlji i inostranstvu.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписана Јелена С. Новаковић Јовановић

број индекса Б 1003/2008

Изјављујем

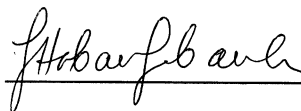
да је докторска дисертација под насловом

Изолација, карактеризација и испитивање пробиотских особина аутохтоних сојева лактобацила

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 07.03.2016.



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Јелена С. Новаковић Јовановић

Број индекса Б 1003/2008

Студијски програм Биологија/Микробиологија

Наслов рада Изолација, карактеризација и испитивање пробиотских особина аутохтоних сојева лактобацила

Ментор др Јелена Кнежевић-Вукчевић, редовни професор Биолошког факултета
Универзитета у Београду

др Биљана Николић, доцент Биолошког факултета Универзитета у
Београду

Потписана Јелена С. Новаковић Јовановић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 07.03.2016.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Изолација, карактеризација и испитивање пробиотских особина аутохтоних сојева лактобацила

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 07.03.2016.



1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.