

Određivanje bakteriocinske aktivnosti *Lactobacillus* sojeva prema *Staphylococcus aureus* 3048 i *Listeria monocytogenes* ATCC 19111

Makovec, Ena

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:710926>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Ena Makovec

7038/BT

**Određivanje bakteriocinske aktivnosti *Lactobacillus* sojeva prema
Staphylococcus aureus 3048 i *Listeria monocytogenes* ATCC 19111**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biotehnologija 4

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Jasna Novak

Zagreb, 2017.

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura, na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Jasne Novak, u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost „Probiotici i starter kulture - površinski proteini i bakteriocini“ (IP-2014- 09-7009).

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima , probiotika i starter kultura
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Određivanje bakteriocinske aktivnosti *Lactobacillus* sojeva prema *Staphylococcus aureus* 3048 i *Listeria monocytogenes* ATCC 19111

Ena Makovec, 7038/BT

Sažetak: Tema ovoga rada bila je ispitati antimikrobno djelovanje autohtonih izolata hrvatskog tradicionalnog sušenog sira *L. casei* M2, *L. casei* M3, *L. plantarum* M4, *L. plantarum* M5, *L. casei* MA1, *L. plantarum* MA2 i *L. plantarum* MA3 prema bakterijama učestalim kontaminatima hrane. Budući da bakterije mliječne kiseline imaju važnu ulogu u konzerviranju i osiguravanju mikrobiološke kvalitete fermentiranog proizvoda zbog proizvodnje različitih ekstracelularnih metabolita i antimikrobnog djelovanja, navedeni bakterijski sojevi se ispituju kao potencijalne starter kulture za proizvodnju sireva. Metodom difuzije u agar i metodom s dvostrukim slojem agara ispitano je antibakterijsko djelovanje odabranih 7 *Lactobacillus* sojeva prema test-mikroorganizmima *Staphylococcus aureus* 3048 i *Listeria monocytogenes* ATCC 19111. Metoda difuzije u agar pokazala je da su odabrani sojevi uspješno inhibirali rast *S. aureus* 3048. Slično, svi *Lactobacillus* sojevi su iskazali antagonističko djelovanje prema *L. monocytogenes* ATCC 19111, izuzev sojeva *L. plantarum* MA2 i MA3. Metodom s dvostrukim slojem agara je dodatno potvrđeno potencijalno bakteriocinsko djelovanje prema bakterijama *L. monocytogenes* ATCC 19111 i *S. aureus* 3048.

Ključne riječi: antimikrobna aktivnost, bakteriocini, *Lactobacillus* sojevi

Rad sadrži: 25 stranica, 3 slike, 5 tablica, 43 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: izv. prof. dr. sc. Jasna Novak

Pomoć pri izradi: doc. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc, Katarina Zorić, mag. ing. biotechn.

Datum obrane: 7.7.2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

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

Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Antibiotics, Enzymes, Probiotics and Starter Cultures Technology
Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Determination of bacteriocinogenic activity of *Lactobacillus* strains according to *Staphylococcus aureus* 3048 and *Listeria monocytogenes* ATCC 19111

Ena Makovec, 7038/BT

Abstract: The subject of this work was to examine the antimicrobial activity of autochthonous isolates of the traditional Croatian dry cheese, *L. casei* M2, *L. casei* M3, *L. plantarum* M4, *L. plantarum* M5, *L. casei* MA1, *L. plantarum* MA2 and *L. plantarum* MA3, towards bacteria that are frequent food contaminants. Since lactic acid bacteria play an important role in conserving and securing the microbiological quality of the fermented product, due to the production of different extracellular metabolites and antimicrobial activity, these bacterial strains were tested as potential starter cultures for the cheese production. The antibacterial activity of the 7 selected *Lactobacillus* strains towards the test-microorganisms, *Staphylococcus aureus* 3048 and *Listeria monocytogenes* ATCC 19111, has been tested by the diffusion method in the agar and the agar-spot-test method. The diffusion method into the agar showed that the selected strains have successfully inhibited the growth of *S. aureus* 3048. Similar to that, all of the *Lactobacillus* strains showed antagonistic action towards *L. monocytogenes* ATCC 19111, with the exception of *L. plantarum* MA2 and MA3 strains. The agar-spot-test method further confirmed the potentially bacteriocinogenic activity towards *L. monocytogenes* ATCC 19111 and *S. aureus* 3048.

Keywords: antimicrobial activity, bacteriocins, *Lactobacillus* strains

Thesis contains: 25 pages, 3 figures, 5 tables, 43 references

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD Jasna Novak, Associate professor

Technical support and assistance: PhD Andreja Leboš Pavunc, Assistant Professor
Katarina Zorić, mag. ing. biotechn.

Defence date: July 7th 2017

SADRŽAJ:

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. PROIZVODNJA BAKTERIOCINA KAO OSNOVA PROBIOTIČKE FUNKCIONALNOSTI.....	2
2.1.1. Bakteriocini	2
2.1.2. Klasifikacija bakteriocina.....	3
2.1.3. Regulacija i prilagodba bakteriocina u gastrointestinalnom traktu	7
2.1.4. Bakteriocini i poboljšana kolonizacija u gastrointestinalnom traktu.....	9
2.1.5 Bakteriocini i inhibicija patogena u gastrointestinalnom traktu	10
3. MATERIJALI I METODE	11
3.1. MATERIJALI	11
3.1.1. Radni mikroorganizmi	11
3.1.2. Hranjive podloge.....	11
3.1.3. Kemikalije.....	12
3.1.4. Aparatura i pribor	12
3.2. METODE RADA	13
3.2.1. Održavanje i čuvanja mikroorganizama	13
3.2.2. Određivanje antibakterijske aktivnosti metodom difuzije s dvostrukim slojem agars ("Agar-spot-test metoda")	13
3.2.3. Priprava supernatanta kultura za određivanje antibakterijske aktivnosti	13
3.2.4. Određivanje antibakterijske aktivnosti metodom difuzije iz jažica u agaru	14
4. REZULTATI I RASPRAVA	15
4.1. Ispitivanje antimikrobnog djelovanja bakterija mliječne kiseline s naglaskom na antibakterijskom djelovanju prema patogenim bakterijama podrijetlom iz hrane, primjenom metode difuzije u agar	15
4.2. Ispitivanje bakteriocinske aktivnosti izoliranih sojeva bakterije mliječne kiseline prema patogenim bakterijama podrijetlom iz hrane primjenom agar-spot-test metode	17
5. ZAKLJUČAK.....	20
6. POPIS LITERATURE.....	21

1. UVOD

Procjenjuje se da gastrointestinalni trakt zdrave, odrasle ljudske osobe ima 10^{13} mikroorganizama (Ventura i sur., 2009). Mikrobna populacija intestinalnog trakta stječe se rođenjem te se primarno sastoji od velikog broja mikroorganizama kao što su bifidobakterije za koje se smatra da se nalaze u majčinom mlijeku i formiraju se tijekom prvih tjedana života prilikom dojenja (Martin i sur., 2009). Mikrobiota odraslog čovjeka dominantno sadrži populaciju *Firmicutes* (uključujući rodove *Klostridija* i bakterije mliječne kiseline) te *Bacteroidetes* (Eckburg i sur., 2005). Istraživanja crijevne mikroflore pokazala su da humani intestinalni trakt sadrži više od 1000 različitih filotipova koji tvore stabilne populacije ekosustava intestinalnog trakta odrasle osobe i stečene alohtone ili prijelazne flore dobivene iz prehrane (kao što su probiotici) ili iz okoline.

Probiotici su jedna ili više kultura živih mikroorganizama koji, primjenjeni u ljudi ili životinja, djeluju korisno na domaćina, poboljšavajući svojstva autohtone mikroflore probavnog sustava domaćina (Šušković, 1996). Smatra se da intestinalna mikrobiota ima ključnu ulogu u ljudskoj prehrani, metabolizmu, razvoju epitela, imunomodulaciji, regulaciji skladištenja masti i zaštiti od patogena pri čemu proizvodnja organskih kiselina (octene i mliječne) te bakteriocina imaju presudnu ulogu (Claus i sur., 2008). U tom smislu, probiotičke intervencije mogu korisno utjecati na intestinalnu mikrobnu ekologiju, crijevenu homeostazu i metabolizam domaćina te u konačnici, zdravlje domaćina, a jedno od glavnih svojstava probiotika za postizanje tih učinaka je njihova antimikrobna aktivnost. Stoga je cilj ovog rada bio ispitati antimikrobno djelovanje odabranih sojeva bakterija.

Bakterijski sojevi *L. casei* M2, *L. casei* M3, *L. plantarum* M4, *L. plantarum* M5, *L. casei* MA1, *L. plantarum* MA2 i *L. plantarum* MA3 su izolirani iz hrvatskog tradicionalnog sušenog sira, dobivenog spontanom fermentacijom mlijeka djelovanjem autohtono prisutnih bakterija mliječne kiseline te je ispitano njihovo antimikrobno djelovanje prema patogenim test-mikroorganizmima *Staphylococcus aureus* 3048 i *Listeria monocytogenes* ATCC 19111. Za ispitivanje antimikrobnog djelovanja navedenih bakterijskih sojeva primijenjena je metoda difuzije u agar i agar-spot-test metoda, odnosno metoda s dvostrukim slojem agara.

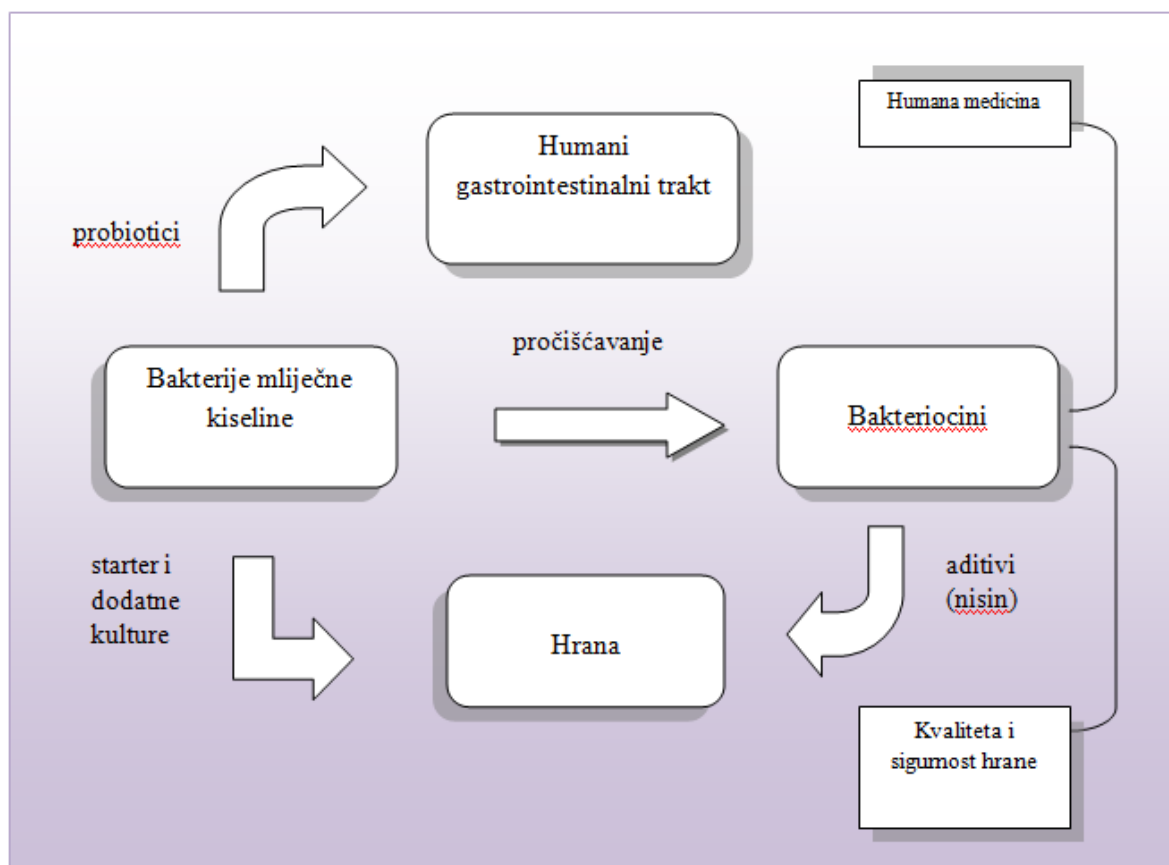
2. TEORIJSKI DIO

2.1. PROIZVODNJA BAKTERIOCINA KAO OSNOVA PROBIOTIČKE FUNKCIONALNOSTI

2.1.1. Bakteriocini

Bakteriocini su ribosomski sintetizirani proteini ili peptidi koji posjeduju antimikrobnu aktivnost uskog spektra djelovanja prema srodnim bakterijskim vrstama, a proizvode ih mnogi predstavnici Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija (Šušković i sur., 2010). Bakterijske vrste koje proizvode ove antimikrobne molekule posjeduju obrambeni mehanizam i sustav imuniteta koji im omogućuje da njihove stanice budu otporne na sintetizirane bakteriocine. Prema svojstvima, bakteriocini su uglavnom molekule manjih molekulskih masa (rijetko prelaze 10 kDa), često se posttranslacijski modificiraju, te su podložni razgradnji proteolitičkim enzimima, posebno proteazama gastrointestinalnog trakta sisavaca, što ih čini sigurnim za ljudsku prehranu.

Bakteriocini su općenito kationske amfipatske molekule jer sadrže suvišak lizilnih i arginilnih ostataka (Rodriguez i sur., 2003). U većini slučajeva, bakteriocini imaju uski spektar djelovanja, prema tome inhibiraju sojeve usko srodne mikroorganizmu producentu. Upravo zbog toga smatra se da ove antimikrobne molekule omogućuju mikroorganizmima proizvođačima kompetitivnu prednost u specifičnom mikrokolištu. Međutim, pojedini bakteriocini posjeduju široki spektar inhibicijskog djelovanja, poput nisine koje iskazuje antimikrobnu aktivnost prema brojnim Gram-pozitivnim vrstama. Nisin je bakteriocin kojeg sintetizira *Lactococcus lactis*, dakle sintetizira ga bakterija mliječne kiseline (BMK). One se danas intenzivno istražuju zbog mogućnosti njihove primjene u prehrambenoj industriji kao prirodnih konzervansa-biokonzervansa. BMK sintetiziraju mnoge antimikrobne komponente, osobito značajnim se smatra proizvodnja mliječne i octene kiseline (Šušković i sur., 2010). Međutim, pojedini sojevi BMK proizvode bioaktivne molekule kao što su etanol, mravlja kiselina, masne kiseline, vodikov peroksid, diacetil, reuterin i reutericiklin (De Vuyst i Leroy, 2007). Osim proizvodnje bakteriocina, neke BMK mogu sintetizirati druge antimikrobne molekule koje također mogu pridonijeti očuvanju hrane i sigurnosti. Na primjer, sojevi *Lactobacillus plantarum*, izolirani iz kiselog tijesta i silaže, pokazuju antifungalnu aktivnost zbog proizvodnje organskih kiselina, drugih metabolita niske molekularne mase i / ili cikličkih dipeptida (Schnürer i Magnusson, 2005). Bakteriocini pokazuju antimikrobnu aktivnost i prema mikroorganizmima kvarenja i patogenima iz hrane kao što su *Listeria monocytogenes* i *Staphylococcus aureus*.



Slika 1. Pregledni prikaz moguće primjene bakteriocina bakterija mliječne kiseline (De Vuyst i Leroy, 2007)

2.1.2. Klasifikacija bakteriocina

Klasifikacija bakteriocina je vrlo kompleksna upravo zbog raznolikosti ovih antimikrobnih molekula, stoga, budući da broj identificiranih bakteriocina, osobito Gram-pozitivnih bakterija, stalno raste, vrlo često se klasifikacije bakteriocina mijenjaju i nadopunjuju. Stoga, ne postoji uniformna podjela ovih molekula u skupine, već su različiti klasifikacijski pristupi.

Kolicini i mikrocini se ubrajaju u bakteriocine koje proizvode Gram-negativne bakterije. Proizvodi ih *Escherichia coli* i srodne vrste *Enterobacteriaceae*, a inhibiraju srodne bakterijske vrste iz rodova: *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter* (Šušković J. i Kos B., 2016). Kolicini su antimikrobne molekule čiji se geni nalaze na plazmidima te prilikom sinteze dolazi do ekspresije proteina lize, koji kad se

induciraju, aktiviraju fosfolipazu A što rezultira smrću stanica i oslobađanjem bakteriocina (Snijder i Dijkstra, 2000). U takvim slučajevima, proizvodnja kolicina je letalna za stanicu producenta. Molekulska masa kolicina iznosi od 25 do 80 kDa i sastoje se od 3 funkcionalne domene. Nasuprot tome, mikrocini su vrlo raznolika skupina od 14 peptida niske molekulske mase (<10 kDa) (Duquesne i sur., 2007). Oni su podklasificirani na temelju prisutnosti i lokalizacije posttranslacijskih modifikacija, organizacije genskog klastera i vodeće sekvence.

Mikrocini skupine I su molekule vrlo niskih molekulskih masa, otprilike 5 kDa i podložni su značajnim post-translacijskim modifikacijama koje omogućuju aktivnost konačne strukture molekule (Duquesne i sur., 2009). Posttranslacijske modifikacije omogućuju stvaranje tiazolnih i oksazolnih prstenova kojima molekula mikrocina B17 poprima karakterističnu strukturu (Bayer i sur., 1995). Primjerice, nukleotid-heptapeptid je karakterističan za mikrocina C7 / C51 (Guijarro i sur., 1995), a „lasso“ strukture su pronađene u cikličkom mikrocina J25 peptidu (Wilson i sur., 2003). Mikrocini većih molekulskih masa (5-10 kDa) pripadaju prema klasifikaciji skupini II, unutar koje se razlikuju molekule bakteriocina na temelju prisustva disulfidnih veza u skupini IIa (mikrocini L, V i 24). Mikrocini skupine IIb sadrže na C-terminalnom kraju peptid modificiran post-translacijskim modifikacijama koji ne sadrži disulfidne veze. Primjeri su mikrocini E492, M, H i I (Duquesne i sur., 2007). Mikrocini skupine I specifično djeluju na unutarstanične enzime odgovorne za stvaranje strukture ili sinteze DNA odnosno RNA. S druge strane, smatra se da je temelj antimikrobnog djelovanja mikrocina skupine II permeabilizacija unutrašnje membrane ciljnih stanica bakterija.

Bakteriocini koje proizvode Gram-negativne bakterije se klasificiraju u dvije skupine : skupinu I i skupinu II, na temelju modifikacija njihovih prepeptida koje dovode do specifičnih strukturnih karakteristika (Cotter i sur., 2005). Peptidi skupine I su oni koji se podvrgavaju posttranslacijskoj modifikaciji i, sve do nedavno, u tu grupu ubrajali su se isključivo lantibiotici. Lantibiotici su podležni značajnim post-translacijskim modifikacijama kojima se u strukturu uvode tioeterske aminokiseline lantionin i metil-lantionin, što u konačnici rezultira formiranjem intramolekulskih struktura prstena. Međutim, nedavno ažurirana klasifikacijska shema za bakteriocine predložila je podjelu skupine I na podskupine, zbog identifikacije novih molekula bakteriocina koji sadrže post-translacijske modifikacije atipične za lantibiotike (Rea i sur., 2011). Sada formiranu skupinu Ia čine mnoge lantibiotske skupine kojima je temelj za antimikrobno djelovanje interakcija s peptidoglikanskom pretečom lipida II, što uzrokuje narušavanje biosinteze stanične stijenke i / ili stvaranje pora,

čime se ugrožava struktura citoplazmine membrane ciljnih stanica (Pag i Sahl, 2002). Kod nisina, koji je opsežno proučavan lantibiotik, opisana su oba mehanizma djelovanja. "Labyrinthopeptins" A1, A2 i A3, koje sintetizira bakterija *Actinomadura namibiensis* DSM 6313 pripadaju skupini Ib, a razlikuju se po prisustvu aminokiseline labionina (Meindl i sur., 2010). Skupina Ic je novoformirana skupina kojoj pripadaju nedavno otkiveni saktibiotici koji sadrže sumpor vezan na α -ugljik, kao što je u strukturi antibiotika turicin CD i subtilizina A koje sintetiziraju *Bacillus thuringiensis* odnosno *Bacillus subtilis* (Rea i sur., 2010). Skupinu II čine raznoliki bakteriocini koji su dalje grupirani u četiri različite skupine (Nissen-Meyer i sur., 2009). Njihov općeniti mehanizam djelovanja se temelji na permeabilizaciji stanične membrane ciljne stanice, što uzrokuje depolarizaciju membrane i u konačnici smrt stanice.

Skupina IIa obuhvaća pediocinu slične bakteriocine, koji inhibiraju *Listeria* vrste, a sadrže konzervirani motiv Y-G-N-G-V na N-terminalnom kraju i barem jedan disulfidni most koji povezuje dva cisteinska ostatka (Drider i sur., 2006). To su najčešće proučavana skupina bakteriocina zbog svoje specifične antimikrobne aktivnosti prema vrlo često prisutnom patogenu u hrani, bakteriji *Listeria monocytogenes* (Cotter i sur., 2005). Skupinu IIb čine bakteriocini koji sadrže dva peptida kao što je abp118. Za optimalnu antimikrobnu aktivnost ovih molekula potrebna je prisutnost dvije komplementarne peptidne komponente (Oppegard i sur., 2007). Temelj antimikrobnog djelovanja ovih molekula bakteriocina je stvaranje ionsko-selektivnih kanala u ciljnim staničnim membranama. Ciklički peptidi kao gasericin A, pripadaju skupini IIc (Arakawa i sur., 2010). Konačno, bakteriocini skupine IID su raznolika skupina peptida s različitim mehanizmima djelovanja, kao što je istaknuto u sljedećim primjerima. Mehanizam djelovanja ovih bakteriocina je stvaranje ciljanih pora koji uključuje vezanje manozna PTS receptora kod bakteriocina laktocina A i laktocina B (Diep i sur., 2007), narušavanje citoplazmine membrane primjerice djelovanjem bakteriocina aurocina A53 (Netz i sur., 2002), ili inhibiciju stanične diobe kroz interakcije s lipidom II u slučaju laktocina 972 (Martinez i sur., 2008).

Tablica 1. Bakteriocini identificirani kod bakterija predstavnika crijevne mikrobiote (O' Shea i sur., 2012)

Podjela	Bakteriocin	Mirkoorganizam producent	Izvor
Bakteriocini Gram-negativnih bakterija			
Kolicini			
Grupa A	Kolicin E1-E9	<i>Escherichia coli</i>	Feces čovjeka
	Kolicin N	<i>Escherichia coli</i>	Feces čovjeka
	Kolicin S4	<i>Escherichia coli</i>	Feces čovjeka
Grupa B	Kolicin B	<i>Escherichia coli</i>	Feces čovjeka
	Kolicin Ia	<i>Escherichia coli</i>	Feces čovjeka
	Kolicin Ib	<i>Escherichia coli</i>	Feces čovjeka
	Kolicin M	<i>Escherichia coli</i>	Feces čovjeka
Mikrocini			
Skupina I	Mikrocin B17	<i>Escherichia coli</i>	Feces čovjeka
	Mikrocin C7/C51	<i>Escherichia coli</i>	Feces čovjeka
	Mikrocin J25	<i>Escherichia coli</i>	Feces čovjeka
	Mikrocin 15m	<i>Escherichia coli</i> LP15	Feces čovjeka
Skupina IIa	Mikrocin V	<i>Escherichia coli</i>	Feces čovjeka
	Mikrocin L	<i>Escherichia coli</i>	Feces čovjeka
Skupina IIb	Mikrocin E492	<i>Klebsiella pneumoniae</i> RYC492	Feces čovjeka
	Mikrocin H47	<i>Escherichia coli</i> H47	Feces čovjeka
Bakteriocini Gram-pozitivnih bakterija			
Skupina I (modificirana)			
Skupina Ia lantibiotici	Mutacin I	<i>Streptococcus mutans</i> UA140	Usna šupljina
	Mutacin II	<i>Streptococcus mutans</i> T8	Usna šupljina
	Mutacin III	<i>Streptococcus mutans</i> UA787	Usna šupljina
	Mutacin K8	<i>Streptococcus mutans</i> K8	Usna šupljina
	Nisin Z	<i>Lactococcus lactis</i> MM19	Feces čovjeka
	Salivaricin A	<i>Streptococcus salivarius</i> 20P3	Usna šupljina
	Salivaricin A1	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Usna šupljina
	Salivaricin B	<i>Streptococcus salivarius</i> K12	Usna šupljina
	Streptin	<i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Bifidobacterium longum</i> DJO10A	Usna šupljina Feces zdrave osobe
Skupina Ic saktibiotici	Turacin CD Trn-α/Trn-β	<i>Bacillus thuringiensis</i> DPC6431	Feces zdrave osobe

Skupina II (nemodificirana)			
Skupina IIa <i>Listeria</i>-aktivni slični pediocinima	Avicin A	<i>Enterococcus avium</i> 208/XA83	Dječji feces
	Bakteriocin RC714	<i>Enterococcus faecium</i> RC714	Feces čovjeka
	Bakteriocin 32	<i>Enterococcus faecium</i> VRE200	Klinički izolirani feces
	Bifidocin B	<i>Bifidobacterium bifidum</i> NCFB1454	
	Enterocin A	<i>Enterococcus faecium</i> DPC6482	Dječji feces
Skupina IIb s dva peptida	Pediocin PA-1	<i>Pediococcus acidilactici</i> UVA1	Feces dojenčadi
	Abp118	<i>Lactobacillus salivarius</i> UCC118	Ileocekalna regija humanog GIT
	Abp118α/Abp118β		
	Blp BlpM/BlpN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Klinički izoliran
	Laktacin F LafA/LafX	<i>Lactobacillus johnsonii</i> NCC 533	Feces čovjeka
Skupina IIc ciklički	Mutacin IV NImA/NImB	<i>Streptococcus mutans</i> UA140	Usna šupljina
	Salivarcin T	<i>Lactobacillus salivarius</i> DPC6488	Dječji feces
	SalTα/SalTβ		
	Gasericin A/Reutericin 6	<i>Lactobacillus gasseri</i> LA39	Feces dojenčadi
		<i>Lactobacillus reuteri</i> LA6	
Skupina IId s jednim peptidom ne slični pediocinu, linearni	ESL5	<i>Enterococcus faecalis</i> SL-5	Feces čovjeka
	Mutacin N	<i>Streptococcus mutans</i> N	Usna šupljina
	Plantaricin A	<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1	Usna šupljina
	Gasericin T	<i>Lactobacillus gasseri</i> SBT2055	Feces zdrave odrasle osobe

2.1.3. Regulacija i prilagodba bakteriocina u gastrointestinalnom traktu

Mnoge potencijalne probiotičke bakterije su upravo izolirane iz intestinalne mikrobiote čovjeka, a mnogi od tih sojeva upravo proizvode antimikrobne komponente i molekule specifičnijeg spektra djelovanja, antipatogene bakteriocine (tablica 1). Proizvodnja bakteriocina se smatra potencijalnim probiotičkim svojstvom. Fiziološki uvjeti koji se nalaze u gastrointestinalnom traktu su bez sumnje važni čimbenici koji utječu na proizvodnju bakteriocina *in vivo*. Na primjer, poznato je da je proizvodnja bakteriocina Gram-pozitivnih bakterija često dobro regulirana mehanizmom quorum sensinga (autoindukcijom), koji ovisi o

gustoći stanica producenta. U takvim slučajevima postizanje određene koncentracije visoko specifičnog inducirajućeg peptida ili indukcijskog faktora djeluje kao pokazatelj gustoće stanica. Kad je ova molekula prisutna u dovoljnim koncentracijama aktivira histidinske kinaze koje zatim uzrokuju fosforilaciju unutarstaničnog regulatora koji aktivira ekspresiju regulacijskog operona odgovornog za sintezu i izlučivanje bakteriocina (Kleerebezem i Quadri, 2001). U nekoliko slučajeva peptidi bakteriocina također imaju ulogu signalnog peptida i time autoreguliraju svoju sintezu. Proizvodnja bakteriocina često ovisi o uvjetima prisutnim u okolišu. Čimbenici poput temperature mogu utjecati na sintezu bakteriocina, kao što je slučaj sa sakacinom A, čija se sinteza eksprimira samo u uvjetima kada sojevi proizvođači bakteriocina *Lactobacillus sakei* Lb706 ili *Lactobacillus curvatus* LTH1174 rastu pri 25-30 °C (Diep i sur., 2000). Zanimljivo je da različiti mehanizmi mogu postojati i unutar jedne vrste. Na primjer, različiti indukcijski peptidi reguliraju proizvodnju plantaricina iz inače visoko konzerviranih bakteriocinskih operona u *Lactobacillus plantarum* C11 i *Lactobacillus plantarum* NC8. Dok nakupljanje plantaricina A posreduje u proizvodnji bakteriocina kod *Lactobacillus plantarum* C11, proizvodnja bakteriocina u *Lactobacillus plantarum* NC8 zahtijeva prisutnost određenih sojeva bakterija koji induciraju njihovu sintezu (Maldonado i sur., 2004a, b). Prema tome, u nekim slučajevima, proizvodnja bakteriocina zahtijeva kompeticijski okoliš poput onog prisutnog u gastrointestinalnom traktu. Nedostatak antimikrobne aktivnosti među izolatima povezanim sa zdravstvenom skrbi pripisuje se adaptivnom odgovoru tih sojeva u zdravstvenu okolinu gdje je prisutnost antibiotika uklonila veći dio okolne konkurentne flore. Moguće je i da pojedini bakterijski soj sintetizira više bakteriocina. U takvim slučajevima, proizvodnja bakteriocina kao odgovor na različite podražaje može dodatno povećati kompetitivnu prednost proizvodnog soja. Primjer toga je proizvodnja mutacina bakterije *Streptococcus mutans* UA140, uzročnika zubnog karijesa. Utvrđeno je da se mutacin IV uskog spektra gotovo isključivo sintetizira u tekućem mediju i stoga je vjerojatno važan za primarnu kolonizaciju *S. mutans* na površinu zuba. Međutim, proizvodnja lantibiotskog mutacina I širokog spektra djelovanja može se postići samo na membrani ili krutom mediju pa se pretpostavlja da kompetitivno okruženje tijekom rasta biofilma na gusto koloniziranoj površini zuba može biti preduvjet za proizvodnju mutacina I (Qi i sur., 2001). Stoga se može zaključiti da se *S. mutans* prilagođava prisutnošću drugih bakterijskih vrsta u usnoj šupljini proizvodnjom različitih bakteriocina. Sličan fenomen je zabilježen u probavnom traktu, na primjeru tripsin-ovisne proizvodnje lantibiotskog ruminokocina A pomoću striktnog anaerobnog crijevnog izolata *Ruminococcus gnavus* E1 (Gomez i sur., 2002). Važnost uloge crijevne proteaze potvrđena je *in vivo*

nakon što nije ustanovljena antimikrobna aktivnost u uzorku fecesa štakora, koji sadrži ovaj soj producent, kao posljedica oralne primjene inhibitora tripsina (Ramare i sur., 1993). Ovaj fenomen je povezan s uspješnom kolonizacijom naknadno inokuliranog soja *C. perfringens* koji je osjetljiv na ruminokocin A. Nakon prestanka tretmana inhibitorom tripsina, ponovno se pojavila antimikrobna aktivnost uzorka fecesa i nakon 3 dana *C. perfringens* više nije bilo moguće detektirati, čime se potvrđuje i ovisnost tripsina i sinteze i učinkovitosti ruminokocina A *in vivo*. Sinteza ruminokocina A ovisna o tripsinu ne samo da upućuje da ova antimikrobna aktivnost igra važnu ulogu u bakterijskim interakcijama u crijevima, već i ukazuje da bi proizvodnja bakteriocina mogla biti adaptacijski odgovor proizvodnog soja na fiziologiju crijevnog ekosustava.

2.1.4. Bakteriocini i poboljšana kolonizacija u gastrointestinalnom traktu

Iako bakteriocini pojedinih sojeva iskazuju aktivnost širokog spektra prema većem broju patogenih sojeva, većina ipak samo inhibira srodne komensalne mikroorganizme. Međutim, i bakteriocini širokog i uskog spektra potencijalno mogu omogućiti proizvodnom organizmu kompetitivnu prednost u kompleksnim mikrobnim zajednicama. Zanimljivo je da bakteriocin 32, kojeg sintetiziraju klinički izolati *Ent. faecium* sadrži karakterističnu sekvencu kao i pediocinu slični bakteriocini skupine IIa, ali nema karakterističnu aktivnost prema *Listeria* vrstama, koju iskazuju bakteriocini iz ove skupine (Inoue i sur., 2006). Utvrđeno je da izolati bakteriocina 32 antagonistički djeluju na druge sojeve *Ent. faecium*, kao i srodne vrste *Enterococcus hirae* i *Enterococcus durans*. Ekološka prednost bakterija koje proizvode bakteriocine može se primjeniti za poželjno djelovanje na mikrobiotu gastrointestinalnog trakta, a mehanizmi djelovanja mogu biti temelj terapije *in vivo*. Primjerice kompetitivna prednost unutar i između vrsta posredovana bakteriocinima omogućila je uspješnu kolonizaciju i prevladavanje komercijalnog probiotika *S. salivarius* K12, koji sintetizira lantibiotik, unutar usne šupljine.

2.1.5. Bakteriocini i inhibicija patogena u gastrointestinalnom traktu

Postoje brojni primjeri upotrebe bakteriocina ili probiotika koji proizvode bakteriocine za suzbijanje patogena u gastrointestinalnom traktu. Kolicini i mikrocini pokazuju značajan potencijal za inhibiciju enteričkih patogena (Cursino i sur., 2006). Vrlo često primjenjivan probiotički soj *E. coli*, soj Nissle 1917, proizvodi mikrocine H47 i M. Pokazalo se da je ovaj soj učinkovit za smanjenje kolonizacije bakterijskih patogena i liječenje proljeva u djece, kao i za liječenje upalne bolesti crijeva (O' Shea i sur., 2012). *E. coli* Nissle 1917 također inhibira invaziju *Yersinia enterocolitica*, *S. flexneri*, *Legionella pneumophila* i *L. monocytogenes* na intestinalne epitelne stanice INT407, dok je invazija *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* smanjena za 70%. Međutim, taj zaštitni učinak nije bio pripisan proizvodnji mikrocina ovim sojem jer je bakteriocin-negativni izogeni mutant jednako učinkovit kao roditeljski soj (Altenhoefer i sur., 2004). Ustanovljeno je i da mikrocin C7, kolicini E1 i Ib, aerobaktin i bakteriofag, koje proizvodi nepatogeni soj *E. coli* H22, također inhibiraju niz enteričkih patogena (Cursino i sur., 2006).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Radni mikroorganizmi

U ovom radu su korišteni sojevi roda *Lactobacillus* i test-mikroorganizmi prikazani u tablici 2. Sojevi su dio Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (ZBMK).

Tablica 2. Bakterijski sojevi korišteni u ovom radu i optimalni uvjeti uzgoja

Bakterijski sojevi	Oznaka soja	Hranjive podloge i uvjeti rasta
<i>Lactobacillus casei</i>	M2	MRS, 37°C, anaerobno
<i>Lactobacillus casei</i>	M3	MRS, 37°C, anaerobno
<i>Lactobacillus plantarum</i>	M4	MRS, 37°C, anaerobno
<i>Lactobacillus plantarum</i>	M5	MRS, 37°C, anaerobno
<i>Lactobacillus casei</i>	MA1	MRS, 37°C, anaerobno
<i>Lactobacillus plantarum</i>	MA2	MRS, 37°C, anaerobno
<i>Lactobacillus plantarum</i>	MA3	MRS, 37°C, anaerobno
<i>Staphylococcus aureus</i>	3048	HB, 37°C, aerobno
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19111	HB, 37°C, aerobno

3.1.2. Hranjive podloge

U radu su korištene sljedeće podloge:

a) hranjive podloge za održavanje i uzgoj bakterija mliječne kiseline

- MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) agar, sastava (g/l destilirane vode): pepton 10; mesni ekstrakt 10; kvašćev ekstrakt 5; glukoza 20; Tween 80 1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05; natrijev-acetat 5; agar 20. pH vrijednost podloge iznosi 6,5, a sterilizacija se provodi pri 121°C tijekom 15 min.
- MRS bujon je istog sastava kao podloga MRS agar, ali bez dodatka agara.

b) hranjive podloge za održavanje i uzgoj test-mikroorganizama

- HA (hranjivi agar) sastava (g/l destilirane vode): pepton 15; mesni ekstrakt 3; NaCl 5; K-fosfat 0,3. pH podloge je 7,3, a sterilizacija se provodi pri 121°C tijekom 15 minuta.
- HB (hranjivi bujon) je istog sastava kao podloga hranjivi agar, ali bez dodatka agara.

3.1.3. Kemikalije

- glicerol, „Alkaloid“, Makedonija
- etanol, „Kemika“, Hrvatska

3.1.4. Aparatura i pribor

- Petrijeve zdjelice
- epruvete
- automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- ependorfe
- kivete za centrifugiranje; 15 ml, 50 ml
- stalci za ependorfe
- stalci za epruvete
- pinceta
- autoklav, „Sutjeska“, Jugoslavija
- termostad, „Instrumentarija“, Hrvatska
- vodena kupelj, „Sutjeska“
- vibro-mješač EV-100, „Kartell“, Italija
- vaga, „Tehtnica“, Slovenija
- magnetska mješalica, „Tehtnica“, Slovenija
- hladnjak, „Gorenje“, Slovenija
- centrifuga Centric, „Tehtnica“, Slovenija
- centrifuga s hlađenjem 5804R, „Eppendorf“, SAD
- tresilica, „New Brunswick Scientific“, SAD
- zamrzivač (-80°C), „New Brunswick Scientific“, SAD
- čitač mikrotitarskih pločica LKB 5060-006, „GDV“, Italija

3.2. METODE RADA

3.2.1. Održavanje i čuvanja mikroorganizama

Sojevi bakterija mliječne kiseline su čuvani pri -80°C u MRS tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 15 % (v/v) glicerola, a test-mikroorganizmi su čuvani na -80°C u hranjivom bujonu s 15% (v/v) glicerola. Dan prije ekperimenta sojevi se inokuliraju u svježu hranjivu podlogu te inkubiraju pri optimalnoj temperaturi rasta prema uvjetima navedenim u tablici 2.

3.2.2. Određivanje antibakterijske aktivnosti metodom difuzije s dvostrukim slojem agara ("Agar-spot-test metoda")

Ova metoda se koristi za testiranje antagonističkog međudjelovanja bakterija mliječne kiseline. Kultura bakterije, čija se antibakterijska aktivnost ispituje, nacijepi se u obliku kapi (5 µl) na MRS-agar hranjivu podlogu i inkubira na 37°C dok se ne razviju kolonije (18-24 h). Petrijeve zdjelice, na kojima su izrasle kolonije, se preliju s 10 ml hranjivog „soft-agara“, koji sadrži 100 µl suspenzije test-mikroorganizma. Inkubacije traje 24 sata pri 37°C. Nakon inkubacije se izmjere promjeri porasle kulture (CD) i promjeri zone inhibicije (ID) te se izračuna efektivni inhibicijski odnos (EIR) (Coeuret i sur., 2004).

$$\text{EIR} = (\text{ID}-\text{CD})/\text{CD}$$

$\text{EIR} < 0,5$ – slaba inhibicija

$0,5 < \text{EIR} < 1,5$ – srednja inhibicija

$\text{EIR} > 1,5$ – jaka inhibicija

3.2.3. Priprava supernatanata kultura za određivanje antibakterijske aktivnosti

Prekonoćne kulture odabranih sojeva bakterija mliječne kiseline se centrifugiraju pri 9000 o/min tijekom 5 minuta te se dobiveni supernatant koristi za ispitivanje antibakterijske aktivnosti metodom difuzije iz jažica u agaru (3.2.4.).

3.2.4. Određivanje antibakterijske aktivnosti metodom difuzije iz jažica u agaru

Otopljena hranjiva podloga, ohlađena na 50°C, nacijepi se sa 150 µl prekonoćno uzgojenih kultura test-mikroorganizama (*Staphylococcus aureus* 3048 ili *Listeria monocytogenes* ATCC 19111) i izlije u Petrijeve zdjelice. Nakon skrutnjavanja podloge se izbuše „rupice“ u agaru pomoću bušača, promjera 7 mm, u koje se dodaje 50 µl pojedinih uzoraka bakterija mliječne kiseline (3.2.3.). Tako pripremljene Petrijeve ploče se stavljaju na 4°C tijekom 3 sata, s ciljem bolje difuzije supernatanta u podlogu prije početka rasta bakterijskih kultura, a zatim na inkubaciju u termostatu na 37°C tijekom 24 sata (Brkić, 1995). Nakon toga slijedi mjerenje zona inhibicije.

4. REZULTATI I RASPRAVA

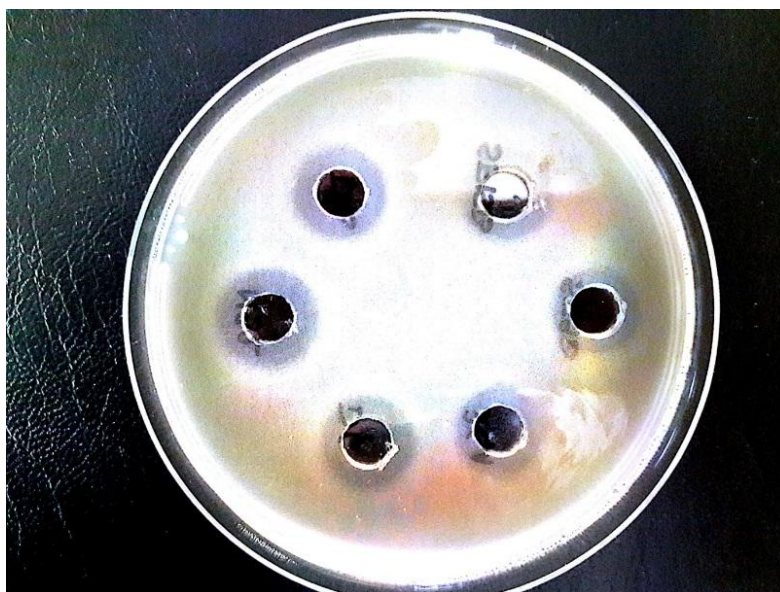
4.1. Ispitivanje antimikrobnog djelovanja bakterija mliječne kiseline s naglaskom na antibakterijskom djelovanju prema patogenim bakterijama podrijetlom iz hrane, primjenom metode difuzije u agar

Bakterijski sojevi *L. casei* M2, *L. casei* M3, *L. plantarum* M4, *L. plantarum* M5, *L. casei* MA1, *L. plantarum* MA2 i *L. plantarum* MA3 su sojevi izolirani iz hrvatskog tradicionalnog sušenog sira, dobivenog spontanom fermentacijom mlijeka djelovanjem autohtono prisutnih bakterija mliječne kiseline. Izolirani sojevi su identificirani u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura te se ispituju kao potencijalne starter kulture za proizvodnju sireva pri čemu bi se provodila kontrolirana fermentacija pasteriziranog mlijeka uz dobivanje proizvoda ujednačene kvalitete, ali autohtone arome i teksture. Općenito, bakterije mliječne kiseline imaju važnu ulogu u konzerviranju i osiguravanju mikrobiološke kvalitete fermentiranog proizvoda što je posljedica proizvodnje različitih ekstracelularnih metabolita koji imaju antimikrobno djelovanje. U prvom redu to je posljedica proizvodnje mliječne, zatim octene kiseline, vodikovog peroksida, hlapivih komponenti poput diacetila, antifugalnih komponenti poput masnih kiselina, ali i moguće biosinteze bakteriocina. Dakle, budući da je prilikom fermentacije vrlo važno inhibirati rast patogenih mikroorganizama ili drugih bakterija mliječne kiseline s nepoželjnim djelovanjem u korištenoj sirovini, ispitano je antimikrobno djelovanje odabranih bakterijskih sojeva prema patogenim test-mikroorganizmima podrijetlom iz hrane *Staphylococcus aureus* 3048 i *Listeria monocytogenes* ATCC 19111, metodom difuzije na krutim hranjivim podlogama (tablica 3, slika 2).

Gotovi svi sojevi su jače inhibirali rast test-mikroorganizma *Staphylococcus aureus* 3048 pri čemu je soj *L. plantarum* M4 bio najuspješniji u inhibiciji tog test-mikroorganizma, a sojevi *L. plantarum* MA2 i *L. plantarum* MA3 nisu inhibirali test-mikroorganizam *Listeria monocytogenes* ATCC 19111.

Tablica 3. Inhibicijsko djelovanje supernatanata kultura bakterije mliječne kiseline prema test-mikroorganizmima, ispitano metodom difuzije u agar

BMK	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19111	<i>S. aureus</i> 3048
	Zone inhibicije (cm)	
<i>L. casei</i> M2	1,2	1,1
<i>L. casei</i> M3	1,4	1,55
<i>L. plantarum</i> M4	1,4	1,65
<i>L. plantarum</i> M5	1,4	1,6
<i>L. casei</i> MA1	1,4	1,6
<i>L. plantarum</i> MA2	0	1,0
<i>L. plantarum</i> MA3	0	1,0



Slika 2. Inhibicijski učinak *Lactobacillus casei* M2 na test-mikroorganizam *Staphylococcus aureus* 3048 ispitano metodom difuzije u agar

4.2. Ispitivanje bakteriocinske aktivnosti izoliranih sojeva bakterija mliječne kiseline prema patogenim bakterijama podrijetlom iz hrane primjenom agar-spot-test metode

Kao što je već naglašeno, antimikrobno djelovanje bakterijskih sojeva potječe prvenstveno od nespecifičnog inhibicijskog utjecaja mliječne kiseline, ali isto tako može biti i posljedica proizvodnje specifičnih supstancija, bakteriocina. Bakteriocini su mali, ribosomski sintetizirani, peptidi ili proteini s antimikrobnim djelovanjem, u prvom redu prema srodnim bakterijskim vrstama (De Vuyst i Vandamme, 1994). Djeluju inhibitorno uglavnom prema srodnim Gram-pozitivnim bakterijama, uključujući i patogene u hrani kao što su *Listeria monocytogenes* i *Staphylococcus aureus*, dok je stanica producent imuna na proizvedeni bakteriocin (Šušković i sur., 2010). Zbog toga je metodom s dvostrukim slojem agara ispitano antagonističko djelovanje odabranih sojeva bakterija mliječne kiseline prema patogenim test-mikroorganizmima podrijetlom iz hrane (*Staphylococcus aureus* 3048 i *Listeria monocytogenes* ATCC 19111) (tablice 4 i 5, slika 3).

Prednost ove metode, u odnosu na ostale, kojima se ispituje antibakterijska aktivnost supernatanta, je u tome što mikroorganizam producent tijekom rasta luči antimikrobne supstancije direktno u podlogu na kojoj se testira inhibicija rasta test-mikroorganizma (Brkić, 1995). Zone inhibicije označavaju antibakterijsko djelovanje ispitanog soja prema ispitanim bakterijama mliječne kiseline. Efektivni inhibicijski odnosi, koji uključuju promjere zona porasle kulture čije se antimikrobno djelovanje ispituje i promjere zona inhibicije korištenih test-mikroorganizama pokazuju da svi sojevi jako inhibiraju oba test-mikroorganizma, osim sojeva *L. casei* M2 i *L. plantarum* MA3 koji pokazuju srednju inhibiju prema test-mikroorganizmu *Listeria monocytogenes* ATCC 19111. Uz to, svi ispitani sojevi jače inhibiraju rast test-mikroorganizma *Staphylococcus aureus* 3048, u odnosu na rast test-mikroorganizma *Listeria monocytogenes* ATCC 19111.

Bakteriocini su od posebne važnosti, ne samo zbog njihove primjene kao biokonzervansa u mliječnoj industriji, gdje se te bakterije najčešće koriste, nego i kao alternativna antimikrobna strategija umjesto antibiotika, zbog širenja antibiotske rezistencije, posebno posljednja gotovo tri desetljeća uslijed nekontrolirane upotrebe antibiotika (Kos i sur., 2011).

Tablica 4. Antagonističko međudjelovanje bakterija mliječne kiseline prema test-mikroorganizmu *Listeria monocytogenes* ATCC 19111, ispitano metodom dvostrukog sloja agara

BMK	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19111		
	CD	ID	EIR
<i>L. casei</i> M2	0,8 cm	1,45 cm	0,8125
<i>L. casei</i> M3	0,8 cm	1,85 cm	1,3125
<i>L. plantarum</i> M4	0,8 cm	2,0 cm	1,5
<i>L. plantarum</i> M5	0,8 cm	1,95 cm	1,4375
<i>L. casei</i> MA1	0,8 cm	2,05 cm	1,5625
<i>L. plantarum</i> MA2	0,8 cm	1,5 cm	0,875
<i>L. plantarum</i> MA3	0,8 cm	1,4 cm	0,75

CD – promjer porasle kulture; ID – promjer zone inhibicije; EIR – efektivni inhibicijski omjer

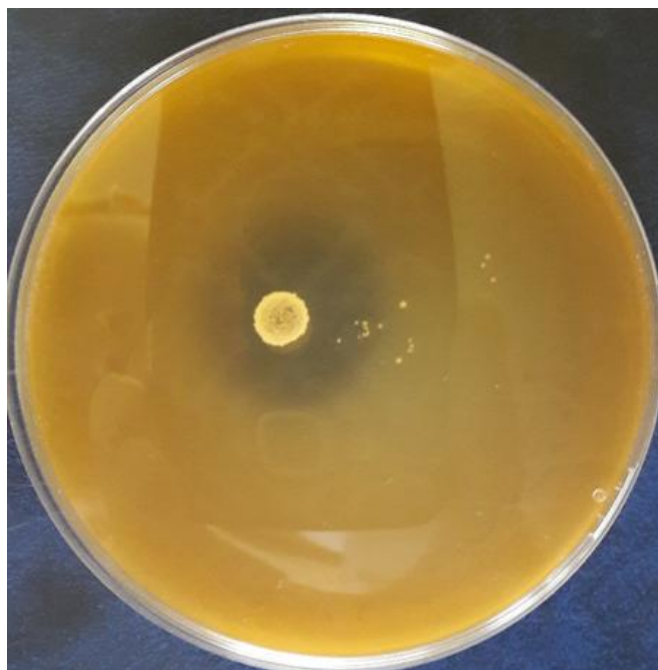
EIR<0,5 slaba inhibicija; 0,5<EIR<1,5 srednja inhibicija; EIR>1,5 jaka inhibicija

Tablica 5. Antagonističko međudjelovanje bakterija mliječne kiseline prema test-mikroorganizmu *Staphylococcus aureus* 3048, ispitano metodom dvostrukog sloja agara

BMK	<i>S. aureus</i> 3048		
	CD	ID	EIR
<i>L. casei</i> M2	0,8 cm	2,3 cm	1,875
<i>L. casei</i> M3	0,8 cm	2,2 cm	1,75
<i>L. plantarum</i> M4	0,8 cm	2,6 cm	2,25
<i>L. plantarum</i> M5	0,8 cm	2,8 cm	2,5
<i>L. casei</i> MA1	0,8 cm	3,3 cm	3,125
<i>L. plantarum</i> MA2	0,8 cm	2,8 cm	2,5
<i>L. plantarum</i> MA3	0,8 cm	2,7 cm	2,375

CD – primjer porasle kulture; ID – promjer zone inhibicije; EIR – efektivni inhibicijski omjer

EIR<0,5 slaba inhibicija; 0,5<EIR<1,5 srednja inhibicija; EIR>1,5 jaka inhibicija



Slika 3. Inhibicijski učinak *Lactobacillus casei* M2 na test-mikroorganizam *Staphylococcus aureus* 3048 ispitano metodom difuzije s dvostrukim slojem agara

5. ZAKLJUČAK

1. Odabrani sojevi roda *Lactobacillus* su inhibirali rast test-mikroorganizama *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 i *Staphylococcus aureus* 3048 što je ispitano metodom difuzije u agar.
2. Metodom s dvostrukim slojem agara je dodatno potvrđeno potencijalno bakteriocinsko djelovanje prema test-mikroorganizmima *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 i *Staphylococcus aureus* 3048.

6. POPIS LITERATURE

- Altenhoefer A., Oswald S., Sonnenborn U., Enders C., Schulze J., Hacker J., Oelschlaeger T. A. (2004) The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 interferes with invasion of human intestinal epithelial cells by different enteroinvasive bacterial pathogens. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **40**: 223–229.
- Arakawa K., Kawai Y., Ito Y., Nakamura K., Chujo T., Nishimura J., Kitazawa H., Saito T. (2010) HPLC purification and re-evaluation of chemical identity of two circular bacteriocins, gassericin A and reuterin 6. *Letters in Applied Microbiology* **50**: 406–411.
- Bayer A., Freund S., Jung G. (1995) Post-translational heterocyclic backbone modifications in the 43-peptide antibiotic microcin B17. Structure elucidation and NMR study of a ¹³C,¹⁵N-labelled gyrase inhibitor. *European Journal of Biochemistry* **234**: 414–426.
- Brkić B., (1995) Fiziološke značajke i antibakterijska aktivnost odabranih bakterija mliječne kiseline, Magistarski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
- Claus S. P., Tsang T. M., Wang Y., Cloarec O., Skordi E., Martin F. P., Rezzi S., Ross A., Kochhar S., Holmes E., Nicholson J. K. (2008) Systemic multicompartmental effects of the gut microbiome on mouse metabolic phenotypes. *Molecular Systems Biology* **4**: 219.
- Coeuret V., Gueguen M., Vernoux J. P. (2004) In vitro screening of potential probiotic activities of selected lactobacilli isolated from unpasteurized milk products for incorporation into soft cheese. *Journal of Dairy Research* **71**: 451–460.
- Cotter P. D., Hill C., Ross R. P. (2005) Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology* **3**: 777–788.
- Cursino L., Smajs D., Smarda J., Nardi R. M., Nicoli J. R., Chartone-Souza E., Nascimento A. M. (2006) Exoproducts of the *Escherichia coli* strain H22 inhibiting some enteric pathogens both in vitro and in vivo. *Journal of Applied Microbiology* **100**: 821–829.
- De Vuyst L., Leroy F. (2007) Bacteriocins from lactic acid bacteria: Production, purification, and food applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **13**: 194–199.
- De Vuyst L., Vandamme E. J. (1994) Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. U: *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*, L. de Vuyst, E. J. Vandamme (ured.), Blackie Academic and Professional, Glasgow, str. 91–142.

Diep D. B., Axelsson L., Grefslı C., Nes I. F. (2000) The synthesis of the bacteriocin sakacin A is a temperature-sensitive process regulated by a pheromone peptide through a three-component regulatory system. *Microbiology* **146** (9): 2155–2160.

Diep D. B., Skaugen M., Salehian Z., Holo H., Nes I. F. (2007) Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 2384–2389.

Drider D., Fimland G., Hechard Y., McMullen L. M., Prevost H. (2006) The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **70**: 564–582.

Duquesne S., Destoumieux-Garzon D., Peduzzi J., Rebuffat S. (2007) Microcins, geneencoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Natural Products Report* **24**: 708–734.

Duquesne S., Destoumieux-Garzon D., Zirah S., Knappe T. A., Goulard C., Peduzzi J., Marahiel M. A., Rebuffat S. (2009) Post-translational modification and folding of a lasso-type gene-encoded antimicrobial peptide require two enzymes only in Escherichia coli. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **611**: 35–36.

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 microbialflora. *Science* **308**: 1635–1638.

Gomez A., Ladire M., Marcille F., Fons M. (2002) Trypsin mediates growth phase-dependent transcriptional tegulation of genes involved in biosynthesis of ruminococcin A, a lantibiotic produced by aRuminococcus gnavusstrain from a human intestinal microbiota. *Journal of Bacteriology* **184**: 18–28.

Guijarro J. I., Gonzalez-Pastor J. E., Baleux F., San Millan J. L., Castilla M. A., Rico M., Moreno F., Delepierre M. (1995) Chemical structure and translation inhibition studies of the antibiotic microcin C7. The *Journal of Biological Chemistry* **270**: 23520–23532.

Inoue T., Tomita H., Ike Y. (2006) Bac 32, a novel bacteriocin widely disseminated among clinical isolates of Enterococcus faecium. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **50**: 1202–1212.

Kleerebezem M., Quadri L. E. (2001) Peptide pheromone-dependent regulation of antimicrobial peptide production in Gram-positive bacteria: a case of multicellular behavior. *Peptides* **22**: 1579–1596.

Kos B., Beganović J., Jurašić L., Švađumović M., Leboš Pavunc A., Uroić K., Šušković J. (2011) Coculture-inducible bacteriocin biosynthesis of different probiotic strains by dairy starter culture *Lactococcus lactis*. *Mljekarstvo* **61** (4): 273-282.

Maldonado A., Jimenez-Diaz R., Ruiz-Barba J. L. (2004a) Induction of plantaricin production in *Lactobacillus plantarum* NC8 after coculture with specific Gram-positive bacteria is mediated by an autoinduction mechanism. *Journal of Bacteriology* **186**: 1556–1564.

Maldonado A., Ruiz-Barba J. L., Jimenez-Diaz R. (2004b) Production of plantaricin NC8 by *Lactobacillus plantarum* NC8 is induced in the presence of different types of Gram-positive bacteria. *Archives of Microbiology* **181**: 8–16.

Martin R., Jimenez E., Heilig H., Fernandez L., Marin M. L., Zoetendal E. G., Rodriguez J. M. (2009) Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 965–969.

Martinez B., Bottiger T., Schneider T., Rodriguez A., Sahl H.G., Wiedemann I. (2008) Specific interaction of the unmodified bacteriocin Lactococcin 972 with the cell wall precursor lipid II. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 4666–4670.

Meindl K., Schmiederer T., Schneider K., Reicke A., Butz D., Keller S., Guhring H., Vertesy L., Wink J., Hoffmann H., Bronstrup M., Sheldrick G. M., Sussmuth R. D. (2010) Labyrinthopeptins: a new class of carbacyclic lantibiotics. *Angewandte Chemie International Edition in English* **49**: 1151–1154.

Netz D. J., Bastos Mdo C., Sahl H. G. (2002) Mode of action of the antimicrobial peptide aureocin A53 from *Staphylococcus aureus*. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 5274–5280.

Nissen-Meyer J., Rogne P., Oppegard C., Haugen H. S., Kristiansen P. E. (2009) Structure-function relationships of the non-lanthionine-containing peptide (class II) bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *Current Pharmaceutical Biotechnology* **10**: 19–37.

Oppegard C., Rogne P., Emanuelsen L., Kristiansen P. E., Fimland G., Nissen-Meyer J. (2007) The two-peptide class II bacteriocins: structure, production, and mode of action. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **13**: 210–219.

O' Shea E. F., Cotter P. D., Stanton C., Ross R. P., Hill C. (2012) Production of bioactive substances by intestinal bacteria as a basis for explaining probiotic mechanisms: Bacteriocins and conjugated linoleic acid. *International Journal of Food Microbiology* **152**: 189-205.

Pag U., Sahl H. G. (2002) Multiple activities in lantibiotics—models for the design of novel antibiotics? *Current Pharmaceutical Design* **8**: 815–833.

Qi F., Chen P., Caufield P. W. (2001) The group I strain of *Streptococcus mutans*, UA140, produces both the lantibiotic mutacin I and a nonlantibiotic bacteriocin, mutacin IV. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 15–21.

Ramare F., Nicoli J., Dabard J., Corring T., Ladire M., Gueugneau A. M., Raibaud P. (1993) Trypsin-dependent production of an antibacterial substance by a human *Peptostreptococcus* strain in gnotobiotic rats and in vitro. *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 2876–2883.

Rea M.C., Sit C.S., Clayton E., O'Connor P.M., Whittall R.M., Zheng J., Vederas J.C., Ross R.P., Hill C. (2010) Thuricin CD, a post-translationally modified bacteriocin with a narrow spectrum of activity against *Clostridium difficile*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 9352–9357.

Rea M.C., Cotter P.D., Hill C., Ross R.P. (2011) Classification of bacteriocins from Gram positive bacteria. U: Prokaryotic Antimicrobial Peptides-From Genes to Applications, Drider D., Rebuffat S. (ured.), Springer, New York, str. 29–53.

Rodriguez E., Martinez M. I., Horn N., Dodd H. M. (2003) Heterologous production of bacteriocins by Lactic Acid Bacteria. *International Journal of Food Microbiology* **80**: 101-116.

Schnürer J., Magnusson J. (2005) Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends in Food Science & Technology* **16**: 70–78.

Snijder H. J., Dijkstra B. W. (2000) Bacterial phospholipase A: structure and function of an integral membrane phospholipase. *Biochimica et Biophysica Acta* **1488**: 91–101.

Šušković J. (1996) Rast i probiotičko djelovanje odabranih bakterija mliječne kiseline. Disertacija. Prehrambeno-biotehnološki fakultet u Zagrebu.

Šušković J., Kos, B. (akad. god. 2016./2017.) Predavanja iz predmenta „Biotehnologija 4“. <http://moodle.srce.hr/2016-2017/course/view.php?id=12905> Pristupljeno 20. svibnja 2017.

Šušković J., Kos B., Beganović J., Leboš Pavunc A., Habjanič K., Matošić S. (2010) Antimicrobial Activity – The Most Important Property of Probiotic and Starter Acid Bacteria. *Food Technology and Biotechnology* **48 (3)** : 296-307.

Ventura M., Turrone F., Canchaya C., Vaughan E. E., O'Toole P. W., van Sinderen D. (2009) Microbial diversity in the human intestine and novel insights from metagenomics. *Frontiers in Bioscience* **14**: 3214–3221.

Wilson K. A., Kalkum M., Ottesen J., Yuzenkova J., Chait B. T., Landick R., Muir T., Severinov K., Darst S . A. (2003) Structure of microcin J25, a peptide inhibitor of bacterial RNA polymerase, is a lassoed tail. *Journal of the American Chemical Society* **125**: 12475–12483.

Izjava o izvornosti

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

ime i prezime studenta