

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Nikola D. Popović

Ispitivanje probiotičkih i imunomodulatornih
karakteristika prirodnih izolata enterokoka u
modelima *in vitro* i *in vivo*

Doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Nikola D. Popović

Examination of probiotic and
immunomodulatory characteristics of natural
isolates of enterococci on *in vitro* and *in vivo*
models

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019

Mentori:

dr Katarina Veljović, viši naučni saradnik
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,
Univerzitet u Beogradu

dr Branko Jovčić, vanredni profesor
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

dr Katarina Veljović, viši naučni saradnik
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,
Univerzitet u Beogradu

dr Branko Jovčić, vanredni profesor
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Jelena Đokić, naučni saradnik
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,
Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane doktorske disertacije: _____

Ova doktorska disertacija je urađena u Laboratoriji za molekularnu mikrobiologiju Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu. Deo rezultata urađen je i u Odeljenju za imunologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković”, Univerziteta u Beogradu u saradnji sa dr Đorđem Miljkovićem.

Ovom prilikom želim da se zahvalim mentorima i članovima komisije za pregled i ocenu doktorske disertacije:

dr Katarini Veljović, mom mentoru, koja me je uvela u svet nauke, sugestijama i velikoj slobodi u toku izrade ove doktorske disertacije;

dr Jeleni Đokić na pomoći u eksperimentalnom radu i sugestijama tokom rešavanja svih problema, na strpljenju i vremenu koje smo proveli diskutujući o rezultatima i budućim planovima;

dr Branku Jovčiću na korisnim i brojnim stručnim savetima i sugestijama tokom izrade i pisanja ove teze, kao i na kritičnoj oceni teze.

Zahvaljujem se svim članovima Laboratorije za molekularnu mikrobiologiju, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo na ogromnoj podršci i kvalitetno provedenom vremenu kao i kolegama sa Odeljenja za imunologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković”.

Reči su suvišne, hvala Marini Tušup, Duziju, Eni i Vladi, Maji i Sanji, Peđi, Aci, Ljupki i Bokiju,...

Ivane, hvala ti na svakom trenutku!

Najdublju zahvalnost dugujem mojim roditeljima, majci Angelini i ocu Draganu na безусловnoj ljubavi i strpljenju kao i bratu Milošu i njegovoj porodici.

Veliko hvala mojim najdražim princezama Emiliji i Sofiji.

Ispitivanje probiotičkih i imunomodulatornih karakteristika prirodnih izolata enterokoka u modelima *in vitro* i *in vivo*

REZIME

Enterokoke pripadaju grupi mlečnokiselinskih bakterija koje su široko rasprostranjene u prirodi. Predominantno se nalaze u gastrointestinalnom traktu životinja, od insekata do čoveka i preko fecesa se oslobađaju u spoljašnju sredinu, nakon čega naseljavaju različita staništa. Imaju kontroverzni status zbog uloge u bolničkim infekcijama i širenja gena odgovornih za rezistenciju na antibiotike. S druge strane, neki sojevi se koriste kao probiotici za životinje i čoveka, kao i starter kulture u mlekarskoj industriji. Da bi se enterokoke koristile kao probiotici neophodno je da budu bezbedne za korišćenje, da nemaju hemolitičku i želatinoznu aktivnost i da nisu otporne na antibiotike. Enterokoke sintetišu antimikrobne proteine, bakteriocine, i na taj način regulišu brojnost drugih bakterija i modulišu odgovor domaćina na infekciju. One mogu da sintetišu i biomolekule koji interaguju sa ćelijama domaćina i na taj način mogu da menjaju različite signalne puteve unutar ćelija domaćina. Biomolekuli sintetisani od strane probiotičkih enterokoka nazivaju se postbiotici. Primena postbiotika predstavlja bezbednu alternativu korišćenja enterokoka u biomedicini.

Ova doktorska disertacija imala je za cilj da ispita probiotička i imunomodulatorna svojstva prirodnih sojeva enterokoka izolovanih iz fermentisanih mlečnih proizvoda sa područja Zapadnog Balkana. Definisana su tri cilja: 1. da se pronađu sojevi bezbedni za korišćenje u biomedicini; 2. da se ispituju probiotičke karakteristike tih sojeva u modelima *in vitro*; i 3. da se ispita imunomodulatorni efekat odabranog soja u modelima *in vitro* i *in vivo*. U cilju ispitivanja bezbedne upotrebe enterokoka kao probiotika testirano je ukupno 75 sojeva iz fermentisanih mlečnih proizvoda koje pripadaju vrstama: *Enterococcus durans* (50 sojeva), *Enterococcus faecium* (15 sojeva), *Enterococcus faecalis* (6 sojeva), *Enterococcus italicus* (3 soja) i *Enterococcus hirae* (1 soj). Hemolitičku aktivnost pokazalo je 18,7% (14/75), dok je želatinaznu aktivnost imalo 6,7% (5/75) testiranih sojeva. Na osnovu rezultata testa mikrodilucije pokazana je visoka učestalost rezistencije na ciprofloksacin 48,2% (27/56), dok su u manjoj meri testirani sojevi rezistentni na gentamicin 10,7% (6/56). Na osnovu rezultata sposobnosti formiranja biofilma u primenjenim uslovima, devet sojeva nema sposobnost formiranja biofilma, 11 sojeva ima mogućnost formiranja slabog biofilma, BGG09-28 ima sposobnost formiranja jakog biofilma, dok sojevi BGTRK4-42 i BGZLM1-5 pokazuju veoma jaku sposobnost formiranja. Na osnovu prisustva gena koji kodiraju različite faktore virulencije u genomu ispitivanih enterokoka, uočava se visoka zastupljenost gena koji

kodiraju adhezine. Uočeno je da 30,4% sojeva poseduje tri gena koji kodiraju različite faktore virulencije, po 21,7% sojeva sadrži dva, odnosno četiri gena, 17,4% ima pet gena i po 4,3% ispitivanih enterokoka sadrži 6 ili 7 gena koji kodiraju faktore virulencije, dok prisustvo, odnosno odsustvo gena u okviru *fsr* operona varira od analiziranog soja. Gen koji kodira želatinazu, *gelE* gen, prisutan je kod 5 sojeva, dok je prisustvo gena za serinsku proteazu potvrđeno kod 12 sojeva. Nije pronađeno prisustvo gena koji kodiraju hijaluronidazu i citolizin aktivirajući protein. Analizom preživljavanja simuliranih uslova gastrointestinalnog trakta pokazano je da testirane enterokoke preživljavaju između 94,4% - 98,8% ± 1,3% želudačni sok, 87,1% - 97,9% ± 2,9% dvanaestopalačni sok i 82,7% - 92,9% ± 3,0% crevni sok. Da bi ostvarile svoj probiotički efekat, enterokoke moraju da se vežu za mucin, proteine ekstraćelijskog matriksa i ćelije domaćina. Procenat vezivanja enterokoka za mucin iznosio je 71,4% ± 3,1%, za kolagen 74,1% ± 4,1% i fibronektin 73,9% ± 2,7%. Analizom vezivanja za HT29-MTX ćelijsku liniju pokazano je da se enterokoke vezuju u proseku 86,7% ± 5,4%. Sojevi *En. faecium* BGZLM1-5 i BGPAS1-3 pokazali su antimikrobni efekat na *Listeria monocytogenes* ATCC19111. *L. monocytogenes* je patogena bakterija koja se prenosi hranom, narušava crevnu epitelnu barijeru i dovodi do razvoja listerioze, posebno kod imunokompromitovanih pacijenata. Dalje je analiziran potencijal soja *En. faecium* BGPAS1-3, u modulaciji odgovora diferenciranih Caco-2 intestinalnih epitelih ćelija na infekciju *L. monocytogenes* ATCC19111. Pokazano je da soj BGPAS1-3 sintetiše antilisterijski molekul proteinske prirode, koji je vezan za ćelijski zid i delimično otporan na visoku temperaturu. Pored toga, soj BGPAS1-3 ubijen izlaganjem visokoj temperaturi može da spreči narušavanje čvrstih veza između diferenciranih Caco-2 ćelija inficiranih sa *L. monocytogenes* ATCC19111, istovremeno dozvoljavajući indukciju imunskih mehanizama važnih za antilisterijski odgovor domaćina i stimulišući ekspresiju *TGF-β* iRNK u intestinalnim epitelih ćelijama. Dodatno, modulacija *MyD88* zavisna od *TLR2* i *TLR4* puteva od strane BGPAS1-3 uključena je u odgovor domaćina na prisustvo *L. monocytogenes* ATCC19111. Pokazano je da živ i toplotom ubijeni BGPAS1-3 u modelu proizvodnje jogurta smanjuje broj *L. monocytogenes* ATCC19111 prvih sedam dana tokom skladištenja za nešto manje od 1 log/ml. Pored celih ćelija temperaturom ubijenog BGPAS1-3, korišćene su i frakcije peptidoglikana i peptidoglikana bez teihoične kiseline u cilju ispitivanja modulacije imunskog odgovora ćelija mezenteričnih limfnih čvorova (MLČ) stimulisanim konkanavalinom A (KonA) na modelu *in vitro*. Pokazano je da ispitivane frakcije ne menjaju metabličku aktivnost i nisu citotoksične u testiranim odnosima. Produkcija IFN- γ i IL-17, pro-inflamacijskih citokina ostala je nepomenjena u odnosu na netretirane KonA-stimulisane

MLČ ćelije, dok je produkcija IL-10 povećana. Uzimajući u obzir prethodne rezultate dobijene u modelima *in vitro* koji ukazuju na potencijalni immunosupresivni i protektivni efekat ovog soja, ispitan je efekat toplotom ubijenih ćelija na *in vivo* modelu inflamacijske bolesti. Kao model ispitivanja izabran je eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis (EAE), najčešće korišćen životinjski model multiple skleroze. Rezultati su pokazali da primena toplotom ubijenog BGPAS1-3 (10^9 ćelija po jednom pacovu na dan) tokom 30 dana ogleda utiče na klinički tok bolesti ublažavajući simptome u početnim fazama bolesti. S obzirom da je pokazano da imunomodulatorne terapije mogu da dovedu do ključnih promena u sastavu mikrobiote, u nastavku je ispitan efekat ćelija toplotom ubijenog BGPAS1-3 na mikrobiom imunizovanih ženki DA pacova DGGE metodom. Klonirano je i sekvencirano ukupno 14 jedinstvenih DNK fragmenata. Analizom sekvenci specifičnih fragmenata pokazano je da je *Lactobacillus intestinalis* prisutan samo na početku tretmana (kod još uvek zdravih životinja), dok nije detektovan 30. dana nakon imunizacije niti u kontrolnoj grupi, kao ni u grupi koja je bila toplotom ubijeni BGPAS1-3. Interesantno je da su vrste *Lb. murinus* i *En. hirae* prisutne samo u uzorcima fecesa imunizovanih životinja koje su 30 dana tretirane toplotom ubijenim BGPAS1-3, a nisu prisutne u kontrolnoj grupi. Korišćenjem univerzalnih prajmera pokazano je da se *Shuttleworthia satelles* i *Muribaculum intestinale* pojavljuju samo 30. dan u fecesima kontrolnih imunizovanih životinja koje nisu tretirane toplotom ubijenim BGPAS1-3. Analizom sekvenci dobijenih umnožavanjem prajmerima specifičnim za *Bifidobacteria* spp. pokazano je prisustvo *Bifidobacterium pseudolongum* samo u fecesima kontrolnih i tretiranih životinja 30 dana nakon imunizacije.

Rezultati ove doktorske disertacije pokazali su da sojevi enterokoka izolovani iz mleka i fermentisanih mlečnih proizvoda imaju nizak patogeni potencijal i dobar probiotički potencijal. Pokazano je da u *in vitro* modelu živ i toplotom ubijen *Enterococcus faecium* BGPAS1-3 ispoljava antilisterijski efekat, i istovremeno omogućava razvoj efikasnog imunskog odgovora domaćina protiv *Listeria monocytogenes* i podstiče produkciju molekula koji doprinose zaštiti intestinalne epitelne barijere. Toplotom ubijeni BGPAS1-3 ispoljava terapijski efekat *in vivo* na modelu eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa.

Ključne reči: *Enterococcus*, probiotik, toplotom ubijen, *Listeria monocytogenes* infekcija, imunomodulacija, EAE

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Molekularna biologija prokariota

Examination of probiotic and immunomodulatory characteristics of natural isolates of enterococci on *in vitro* and *in vivo* models

SUMMARY

Enterococci belong to a group of lactic acid bacteria that are widespread in nature. They are predominantly found in the gastrointestinal tract of animals, from insects to humans and through faeces they are released into the environment, where they colonize different habitats. They have a controversial status according to the role as causative agents of hospital infections and the spread of genetic determinants of antibiotic resistance. In contrary, some strains have been used as probiotics for animals and humans, as well as a starter cultures in the dairy industry. In order to use enterococci as probiotics, it is necessary to determine their safety, i.e. absence of hemolytic and gelatinase activity and susceptibility to clinically relevant antibiotics. Enterococci synthesize antimicrobial proteins, bacteriocins, by which way they regulate the number of other bacteria and modulate the host response to the infection. They can also synthesize biomolecules that interact with the host cells, and change the different signalling pathways within host cells. Biomolecules synthesized by probiotic enterococci are called postbiotics. The use of postbiotic represents a safety alternative to the enterococci application in biomedicine.

The aim of this dissertation was examination of probiotic and immunomodulatory characteristics of enterococci isolated from fermented dairy products from the Western Balkans countries. Three objectives were defined: 1. to find strains safe for use in biomedicine; 2. to examine the probiotic characteristics on *in vitro* models, and 3. to examine the immunomodulatory effect of the selected strain on *in vitro* and *in vivo* models. In order to analyse the safe use of enterococci as a probiotics, a total of 75 isolates from fermented dairy products were tested: *Enterococcus durans* (50 isolates), *En. faecium* (15 isolates), *En. faecalis* (6 isolates), *En. italicus* (3 isolates) and *En. hirae* (1 isolate). 18.7% (14/75) strains showed hemolytic activity, while 6.7% (5/75) had gelatinase activity. Based on the results of the microdilution test, 48.2% (27/56) of strains were ciprofloxacin resistance, while 10.7% (6/56) strains were resistant to gentamicin. According to the analysis of selected enterococci genomes, high incidence of adhesin encoding genes could be noticed. It was found that 30.4% of strains have three genes encoding different virulence factors, 21.7% of strains having two or four genes, 17.4% having five genes, and 4.3% of studied enterococci containing 6 or 7 genes which encode virulence factors, while the presence or absence of

gene within the *fsr* operon varies from the analyzed strains. Hyaluronidase and cytolysin activating protein encoding genes were not detected. According to the results of biofilm formation assay, nine strains had no ability to form a biofilm and 11 strains had weak biofilm forming ability. The BGG09-28 had a strong biofilm forming ability, while strains BGTRK4-42 and BGZLM1-5 showed very strong biofilm forming ability. An analysis of the survival of simulated conditions of the gastrointestinal tract showed that 94.4% - 98.8% \pm 1.3% of tested enterococci survived gastric juice, 87.1% - 97.9% \pm 2.9% survived duodenum juice and 82.7% - 92.9% \pm 3.0% survived intestinal juice. In order to achieve their probiotic effect, enterococci must bind to mucin, extracellular matrix proteins or host cells. 71.4% \pm 3.1% of tested enterococci bind to mucin on average, 74.1% \pm 4.1% bind to collagen and 73.9% \pm 2.7% bind to fibronectin. Additionally, 86.7% \pm 5.4% of enterococci adhere to HT29-MTX cell line, in average. *En. faecium* BGZLM1-5 and BGPAS1-3 strains showed antimicrobial effect on *L. monocytogenes* ATCC19111. *Listeria monocytogenes*, the common foodborne pathogenic bacteria, compromise the intestinal epithelial barrier, which leads to development of the listeriosis, very serious disease especially among immunocompromised individuals. Due to that, we analysed the potential of BGPAS1-3, enterococci with strong direct antilisterial effect, to modulate the response of differentiated intestinal epithelial Caco-2 cells, in *L. monocytogenes* ATCC19111 infection. Considering the controversial status of enterococci, we tested the antilisterial potential of heat-killed BGPAS1-3, which could be used as potential postbiotic. It was shown that the antilisterial molecule is rotein, tied to bacterial cell wall and partially resistant to the high-temperature treatment. Additionally, heat-killed BGPAS1-3 could prevent tight junction disruption in differentiated Caco-2 monolayer infected with *L. monocytogenes* ATCC19111, simultaneously allowing the induction of immune mechanisms important for antilisterial host response and stimulate the expression of *TGF- β* in intestinal epithelial cells. Finally, we showed that the modulation of *MyD88* by BGPAS1-3 was dependent on *TLR2* and *TLR4* pathways. In addition, we showed that live and heat-killed BGPAS1-3, in the yoghurt production model, reduced the number of *L. monocytogenes* ATCC19111 during the first seven days of storage for slightly less than 1 log/ml. Taking into account that the intestine is an important site for modulation of the immune system, the next goal was to investigate the effect of the heat-killed BGPAS1-3 cells, BGPAS1-3 peptidoglycan and BGPAS1-3 peptidoglycan without teichoic acid on mesenteric lymph node (MLN) cells stimulated by concanavalin A (ConA) in the *in vitro* model. It has been shown that the investigated fractions weren't cytotoxic in the tested ratio and did not change the metabolic activity. The production of IFN- γ and IL-17, pro-inflammatory

cytokines, remained unchanged compared to untreated ConA-stimulated MLN cells, while IL-10 production was increased. Taking into account the previous results obtained in *in vitro* models that indicate the potential immunosuppressive and protective effect of BGPAS1-3, the effect of the heat-killed cells in *in vivo* model of inflammatory disease was examined. Experimental autoimmune encephalomyelitis was chosen as model for testing the effect of heat-killed BGPAS1-3. The results showed that the application of the heat-killed BGPAS1-3 (10^9 cells per rat per day) during 30 days of treatment affects the clinical course of the disease alleviating the symptoms in the initial stages of the disease. Since it has been shown that immunomodulatory therapies can lead to changes in the composition of the microbiota, the effect of heat-killed BGPAS1-3 cells on the microbiota of immunized female DA rats was examined by DGGE. A total of 14 unique DNA fragments were cloned and sequenced. Sequence analysis revealed that *Lactobacillus intestinalis* was present only at the beginning of the treatment (healthy animals) without detection in any other experimental group of animals. It is interesting that *Lb. murinus* and *En. hirae* were present only in faeces of immunized animals that were treated for 30 days with heat-killed BGPAS1-3, but were not present in the control group. Also, it has been shown that *Shuttleworthia satelles* and *Muribaculum intestines* appeared only on the 30th day in faeces of control immunized animals that were not treated with heat-killed BGPAS1-3. Using *Bifidobacteria*-specific primers the presence of *Bifidobacterium pseudolongum* was showed in the faeces of control and treated animals 30 days after immunization.

The results of this doctoral dissertation showed that enterococcal strains isolated from milk and fermented dairy products have low pathogenic potential and good probiotic potential. It has been shown that the *in vitro* model of the live and heat-killed *Enterococcus faecium* BGPAS1-3 exhibits an antilisterial effect, simultaneously allowing the development of an effective immune host response against *Listeria monocytogenes* and stimulates the production of molecules that contribute to the protection of the intestinal epithelial barrier. Furthermore, heat-killed BGPAS1-3 exhibits a therapeutic effect *in vivo* on the model of experimental autoimmune encephalomyelitis.

Keywords: *Enterococcus*, probiotic, heat-killed, *Listeria monocytogenes* infection, immunomodulatory, EAE

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Molecular biology of prokaryotes

SADRŽAJ

1.	Uvod	1
1.1.	Rod <i>Enterococcus</i>	1
1.2.	Identifikacija enterokoka	2
1.3.	Enterokoke kao patogeni	3
1.3.1.	Rezistencija enterokoka na antibiotike	4
1.3.2.	Virulentne determinante enterokoka	8
1.3.3.	Enterokoke i formiranje biofilma	12
1.4.	Enterokoke kao probiotici	15
1.4.1.	Bakteriocini enterokoka	17
1.4.2.	Uticaj enterokoka na epitelnu barijeru	19
1.4.3.	Konkurentno isključivanje patogenih bakterija	19
1.4.4.	Modulacija imunskog odgovora posredovana probiotičkim bakterijama .	20
1.4.4.1.	Prepoznavanje enterokoka preko TLR domaćina	24
1.5.	<i>Listeria monocytogenes</i> kao model ispitivanja infekcije	25
1.6.	Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis kao model ispitivanja autoimunskih bolesti	26
2.	Ciljevi rada	28
3.	Materijal i metode	29
3.1.	Bakterijski sojevi	29
3.2.	Medijumi za kultivaciju bakterija	31
3.3.	Priprema bakterijskih ekstrakata	32
3.4.	Izolacija ukupne DNK iz enterokoka	33
3.5.	Izolacija plazmidne DNK iz <i>Escherichia coli</i> DH5a	33
3.6.	Lančana reakcija polimeraze „PCR“	34
3.7.	Horizontalna gel elektroforeza DNK	35
3.8.	Metode procene bezbednosnog statusa enterokoka	35
3.8.1.	Test hemolitičke aktivnosti	35
3.8.2.	Test želatinazne aktivnosti	36
3.8.3.	Test mikrodilucije	36
3.8.4.	Test formiranja biofilma	37
3.9.	Metode procene probiotičkih karakteristika enterokoka	37
3.9.1.	Test preživljavanja enterokoka u simuliranim uslovima gastrointestinalnog trakta	37
3.9.2.	Test vezivanja enterokoka za imobilisani mucin, kolagen i fibronektin ...	38
3.9.3.	Kultivacija HT29-MTX ćelijske linije	39
3.9.4.	Test vezivanja enterokoka za HT29-MTX	39
3.10.	Metode probiotičke karakterizacije <i>Enterococcus faecium</i> BGPAS1-3	40
3.10.1.	Test antimikrobnog delovanja <i>Enterococcus faecium</i> BGPAS1-3	40
3.10.2.	Određivanje broja <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC19111 ćelija u modelu proizvodnje jogurta sa dodatkom živog i toplotom ubijenog soja <i>En. faecium</i> BGPAS1-3	41
3.10.3.	Kultivacija i diferencijacija Caco-2 ćelijske linije	42
3.10.4.	Testovi adhezije i invazije <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC19111 na diferenciranim Caco-2 ćelijama u kombinaciji sa živim i toplotom ubijenim <i>Enterococcus faecium</i> BGPAS1-3	43
3.10.5.	Izolovanje ukupne RNK iz Caco-2 ćelija	44

3.10.6.	Reakcija reverzne transkripcije	44
3.10.7.	Kvantitativna reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu „q-PCR“	45
3.10.8.	Metoda Western blot	46
3.11.	Metode ispitivanja imunomodulatornog potencijala toplotom ubijenog <i>Enterococcus faecium</i> BGPAS1-3 in vitro	48
3.11.1.	Eksperimentalne životinje	48
3.11.2.	Izolovanje ćelija mezenteričnih limfnih čvorova i uspostavljanje primarne ćelijske kulture	48
3.11.3.	Merenje metaboličke aktivnosti testom MTT	49
3.11.4.	Merenje citotoksičnosti tretmana testom LDH	49
3.11.5.	Merenje produkcije citokina testom ELISA	50
3.12.	Metode ispitivanja imunomodulatornog potencijala toplotom ubijenog <i>Enterococcus faecium</i> BGPAS1-3 in vivo	50
3.12.1.	Imunizacija životinja	50
3.12.2.	Primena toplotom ubijenog <i>Enterococcus faecium</i> BGPAS1-3 na Dark Agouti pacovima <i>in vivo</i>	51
3.12.3.	Evaluacija kliničke slike eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa	51
3.12.4.	Elektroforeza u gradijentu denaturišućeg agensa (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE analiza)	51
3.13.	Statistička obrada rezultata	53
4.	Rezultati	54
4.1.	Odabir i identifikacija sojeva roda <i>Enterococcus</i>	54
4.2.	Ispitivanje bezbednosnog statusa enterokoka	55
4.2.1.	Ispitivanje hemolitičke i želatinazne aktivnosti	55
4.2.2.	Ispitivanje osetljivosti na antibiotike	56
4.2.3.	Ispitivanje formiranja biofilma	56
4.2.4.	Analiza prisustva gena za faktore virulencije	57
4.3.	Ispitivanje probiotičkih osobina odabranih sojeva enterokoka	59
4.3.1.	Ispitivanje preživljavanja enterokoka u simuliranim uslovima gastrointestinalnog trakta	59
4.3.2.	Ispitivanje vezivanja enterokoka za imobilisani mucin	60
4.3.3.	Ispitivanje vezivanja enterokoka za imobilisani kolagen i fibronektin	61
4.3.4.	Ispitivanje vezivanja enterokoka za HT29-MTX ćelijsku liniju	62
4.3.5.	Ispitivanje antimikrobne aktivnosti	63
4.4.	Probiotička karakterizacija <i>Enterococcus faecium</i> BGPAS1-3	64
4.4.1.	Ispitivanje antimikrobnog delovanja <i>Enterococcus faecium</i> BGPAS1-3.....	65
4.4.2.	Efekat živog i toplotom ubijenog BGPAS1-3 na rast <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC19111 u modelu proizvodnje jogurta	66
4.4.3.	Efekat živog i toplotom ubijenog BGPAS1-3 na adheziju i invaziju <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC19111 na diferenciranim Caco-2 ćelijama	68
4.4.4.	Efekat živog i toplotom ubijenog BGPAS1-3 na Caco-2 ćelije: ekspresija proteina čvrstih veza, IL-8 i TGF- β	70
4.4.5.	Efekat živog i toplotom ubijenog BGPAS1-3 na modelu infekcije <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC19111 diferenciranih Caco-2 ćelija	72
4.5.	Ispitivanja imunomodulatornog potencijala toplotom ubijenog <i>Enterococcus faecium</i> BGPAS1-3 u modelu in vitro	77

4.5.1.	Uticaj BGPAS1-3 na metaboličku aktivnost ćelija mezenteričnih limfnih čvorova	77
4.5.2.	Uticaj toplotom ubijenog BGPAS1-3 na produkciju citokina ćelija mezenteričnih limfnih čvorova	78
4.6.	Ispitivanja imunomodulatornog potencijala toplotom ubijenog <i>Enterococcus faecium</i> BGPAS1-3 u modelu <i>in vivo</i>	79
4.6.1.	Efekat toplotom ubijenog BGPAS1-3 na klinički tok eksperimentalnog autoimunuskog encefalomijelitisa	79
4.6.2.	Efekat toplotom ubijenog BGPAS1-3 na mikrobiom imunizovanih ženki Dark Agouti pacova	80
5.	Diskusija	83
5.1.	Virulentni potencijal enterokoka	84
5.2.	Probiotički potencijal enterokoka	88
6.	Zaključci	97
7.	Literatura	102
8.	Prilozi	133
8.1.	Prilog 1	133
8.2.	Prilog 2	158

1. UVOD

1.1. Rod *Enterococcus*

Bakterije roda *Enterococcus* pripadaju grupi mlečnokiselinskih bakterija (MKB) koje su široko rasprostranjene u prirodi. Najveći broj vrsta ovog roda je zastupljen u gastrointestinalnom traktu (GIT) životinja, od insekata do čoveka, odakle se preko fecesa oslobađaju u spoljašnju sredinu, nakon čega naseljavaju različita staništa poput vode, zemljišta i površine biljaka. Enterokoke su se prilagodile različitim uslovima sredine kao što su ekstremne temperature, salinitet i različite pH vrednosti (Giraffa i sar. 1997). Zahvaljujući ovoj sposobnosti preživljavaju nepovoljne uslove kao što su uslovi karakteristični za proces obrade i pripreme hrane, zbog čega se mogu naći u fermentisanim proizvodima od mleka i mesa, kao i u drugim vrstama prehrambenih proizvoda (Moreno i sar. 2006). Pojedine vrste ovog roda su od davnina korišćene kao starter kulture za proizvodnju Čeder sira (Dahlberg i Kosikowski, 1948). Danas bakterije ovog roda nisu generalno prihvaćene kao sigurne (engl. generally recognized as safe, GRAS) zbog sve veće učestalosti bolničkih infekcija izazvanih najčešće sojevima vrste *En. faecium*. Zbog poželjnog ukusa, arome, boje, strukture, kao i ukupnog senzornog profila proizvoda, u zemljama Mediterana enterokoke se koriste kao nestarterska kultura u proizvodnji različitih tipova sira: Mozzarella, Feta, Cebreiro, Hispanico i Venaco (Villani i Coppola, 1994; Casalta i Zennaro, 1997; Centeno i sar. 1999; Oumer i sar. 2001; Sarantinopoulos i sar. 2002a). Pored svoje uloge u sazrevanju sireva, enterokoke mogu da sintetišu antimikrobna jedinjenja koja imaju inhibitorni efekat na patogene bakterije poput *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Clostridium* spp. i *Bacillus* spp. (Lauková i Czikková, 1999).

Predstavnici roda *Enterococcus* su Gram-pozitivne, katalaza negativne i fakultativno anaerobne bakterije koje nemaju sposobnost formiranja spora. Čelije su okruglog oblika i mogu biti pojedinačne, u paru ili formiraju kraće ili duže lance. Većina vrsta su nepokretne izuzev *En. gallinarum* i *En. casseliflavus* i bez pigmentacije, izuzev vrsta sa žutim pigmentom koje se najčešće nalaze na biljkama kao što su *En. sulfureus*, *En. mundtii* i *En. casseliflavus* (Holzapfel i Wood, 2012). Rastu na temperaturama od 10°C do 45°C, a optimalna temperatura za njihov rast je 35°C ± 2°C. Tolerantne su na povišene koncentracije soli, odnosno rastu u bujonu koji sadrži od 6,5% do 8,0% natrijum hlorida. Enterokoke rastu pri pH vrednostima od 4 do 10, pri čemu je optimalan rast oko pH 7 (Moreno i sar. 2006).

Sadržaj G+C njihove DNK kreće se od 37 do 45 mol %. Genomi enterokoka variraju od 2,3 Mb (*En. sulfureus*) do 5,4 Mb (*En. pallens*) i smatra se da je veličina direktno korelisana sa uslovima kompeticije u staništima u kojima se enterokoke nalaze (Lebreton i sar. 2017).

Filogenetskom analizom zasnovanom na poređenju sekvence gena za 16S ribozomalnu RNK (rRNK) pokazano je da su bakterije roda *Enterococcus* filogenetski srodnije MKB iz roda *Vagococcus*, *Tetragenococcus* i *Carnobacterium* nego sa bakterijama roda *Streptococcus* i *Lactococcus* (Facklam i sar. 2002). Slabija zastupljenost enterokoka u vodenim ekosistemima kao i kod vodenih organizama, a široka rasprostranjenost kod kopnenih životinja ide u prilog pretpostavci da su se enterokoke odvojile od bakterija sličnih vagnokokama u vodenim ekosistemima, a da su široku ekspaniziju doživele nakon prolagođavanja vodenih organizama na kopnene uslove života pre 425 miliona godina (Lebreton i sar. 2017).

Istorija enterokoka počinje 1899. godine kada je francuski naučnik Thiercelin opisao nove Gram-pozitivne diplokoke i označio ih kao rod *Enterococcus*. Međutim, već 1906. godine su preimenovane u *Streptococcus faecalis* na osnovu sposobnosti da formiraju kratke ili dugačke lance i predominantno su se izolovale iz pacijenata sa endokarditisom. Tek 1984. godine *St. faecalis* i *St. faecium* su reklasifikovane u rod *Enterococcus* kada su Schleifer i Kilpper-Balz dali genetičke dokaze da su bili dovoljno daleko od ostalih članova roda *Streptococcus* (Gilmore i sar. 2013). Danas se u rod *Enterococcus* uvrštava 58 vrsta. (<http://www.bacterio.net/enterococcus.html>).

1.2. Identifikacija enterokoka

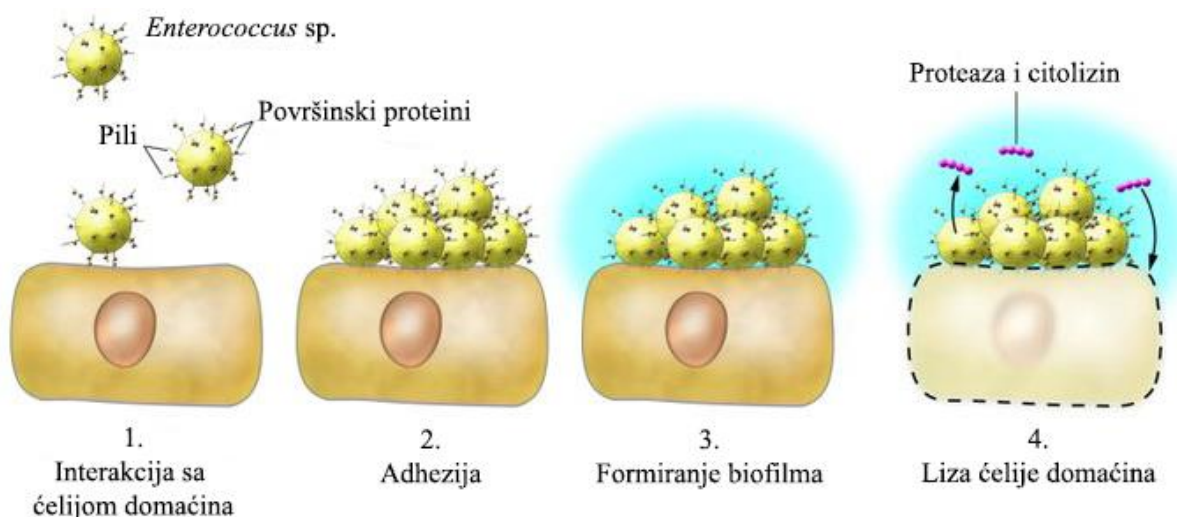
Uobičajena ekološka niša bakterija roda *Enterococcus* su creva čoveka i drugih životinja. Međutim, enterokoke se mogu naći u zemljištu, na biljkama ili u prehrambenim proizvodima. Poslednjih godina enterokoke su sve značajniji uzročnici bolničkih infekcija pa je njihova detekcija i identifikacija od velikog značaja (Franz i sar. 2003). Sposobnost enterokoka da rastu pri specifičnim uslovima se široko koristi u njihovoj selektivnoj izolaciji. Iako se ovim pristupom mogu razlikovati *Enterococcus* spp. od drugih vrsta bakterija, neki izolati mogu biti pogrešno identifikovani. Konvencionalne metode bazirane na fiziološkim karakteristikama se i dalje koriste za identifikaciju vrsta, međutim, na ovaj način se ne mogu u potpunosti razdvojiti sve vrste enterokoka (Facklam i Collins, 1989). Genotipska

identifikacija analizom sekvence gena za 16S i 23S rRNK je znatno pouzdanija, međutim pojedine vrste se ni na ovaj način ne mogu u potpunosti razdvojiti (Ogier i Serror, 2008). Zbog toga su razvijene alternativne molekularne metode koje pored analize sekvence gena za 16S i 23S rRNK mogu da uključuju i umnožavanje gena za D-alanin-D-alanin ligazu (*ddl*) (Angeletti i sar. 2001), superoksid dismutazu (*sodA*) (Jackson i sar. 2004), *vanA*, *vanB* i *vanC* gena (Bell i sar. 1998), α subjedinica RNK polimeraze (*rpoA*), fenilalanin-tRNK sintaze (*pheS*) (Naser i sar. 2005) kao i intergenske sekvence (IS) gena za 16S i 23S rRNK, te analizu fragmenata dobijenih topljenjem visoke rezolucije (engl. high resolution melt analysis, HRM) koja detektuje jednonukleotidne polimorfizme (engl. single-nucleotide polymorphisms, SNP) u fragmentima DNK (Gurtler i sar. 2012). Identifikacija kliničkih izolata *En. faecalis* i *En. faecium* većinom je rađena elektroforezom u pulsirajućem polju (engl. pulsed-field gel electrophoresis, PFGE) i analizom sekvenci gena kućepazitelja (engl. housekeeping gene) multilokusnom tipizacijom (engl. multilocus sequence typing, MLST). Studije *En. faecalis* i *En. faecium* bazirane na ovoj analizi omogućile su identifikaciju grupe gena specifičnih za domaćina kao što su CC2 i CC9 kod kliničkih izolata *En. faecalis* (engl. clonal complexes, CC) i CC17 kod *En. faecium* uzročnika bolničkih infekcija (Leavis i sar. 2006). Komparativnom genomskom hibridizacijom (engl. comparative genomic hybridization, CGH) moguće je identifikovati gene specifične za kliničke izolate, a kojih nema u izolatima iz fermentisanih prehrambenih proizvoda (McBride i sar. 2009). Poslednjih godina se u ovakvim istraživanjima primenjuje sekvenciranje genoma enterokoka čime se omogućava funkcionalna i taksonomska analiza svih gena (Tyson i sar. 2018).

1.3. Enterokoke kao patogeni

Enterokoke su komensalni organizmi koji imaju sposobnost preživljavanja u usnoj šupljini, crevnom i urogenitalnom traktu. Prirodna sposobnost enterokoka da lako stiču, akumuliraju i dele ekstrahromozomalne elemente koji nose genetičke determinante virulencije ili otpornost na antibiotike, omogućava im preživljavanje pod različitim sredinskim stresovima i delimično objašnjava njihovu povećanu učestalost kao uzročnika bolničkih infekcija (Jett i sar. 1994). Danas su enterokoke prepoznate kao drugi najčešći uzročnik infekcija urinarnog trakta i treći najčešći uzročnik bakteremija unutar bolnica (Shah i sar. 2018). Bakterije ovog roda su odgovorne za približno 30% svih slučajeva infektivnog

endokarditisa, pri čemu je *En. faecalis* glavni uzročnik, dok je manji broj endokarditisa povezan sa infekcijom *En. faecium* (Dahl i sar. 2018). Faktori koji doprinose patogenosti enterokoka su: višestruka rezistencija na antibiotike, prisustvo virulentnih determinanti i sposobnost formiranja biofilma (Budzik i Schneewind, 2006) (Slika 1).



Slika 1: Mehanizam virulentnosti enterokoka. Slika preuzeta iz Budzik i Schneewind, 2006. i modifikovana.

1.3.1. Rezistencija enterokoka na antibiotike

Uporedno sa pojavom da su *En. faecalis* i *En. faecium* značajni uzročnici bolničkih infekcija, izolovani su i sojevi obe vrste koji su otporni na većinu antibiotika koji se koriste u tretmanu infekcija. Enterokoke poseduju urođenu otpornost na širok spektar antibiotika uključujući cefalosporine, peniciline i niske koncentracije aminoglikozida, koji se često koriste za lečenje infekcija izazvanim Gram-pozitivnim bakterijama (Gold i Moellering, 1996). Međutim, mnogo veći izazov u terapiji infekcija izazvanim enterokokama predstavlja otpornost na antibiotike koju su stekle putem plazmida, transpozona i/ili mutacija. Putem ovih mehanizama, enterokoke su stekle otpornost na visoke koncentracije β -laktama, aminoglikozida i glikopeptida (vankomicin i teikoplanin) (Hollenbeck i Rice, 2012).

β -laktamski antibiotici interferiraju sa umrežavanjem peptidoglikana, finalnim korakom sinteze ćelijskog zida bakterija. Transpeptidaze i karboksipeptidaze, enzimi koji katalizuju reakcije umrežavanja peptidoglikana, predstavljaju ciljna mesta delovanja β -laktamskih antibiotika. Svi β -laktamski antibiotici deluju kao ireverzibilni inhibitori penicilin vezujućih proteina (penicillin-binding protein, PBP) enzima koji katalizuje umrežavanje

peptidoglikana u finalnoj fazi biosinteze ćelijskog zida (Salton i Shockman, 1981). Analizom genoma *En. faecalis* i *En. faecium* utvrđeno je postojanje šest gena koji kodiraju PBP: *ponA*, *pbpF*, *pbpZ*, *pbp5*, *pbpA* i *pbpB*. Urođena otpornost na dejstvo penicilina povezana je sa prisustvom specifičnog gena na hromozomu, *pbp5*, koji kodira PBP sa niskim afinitetom vezivanja za penicilin. Kao rezultat, minimalna inhibitorna koncentracija za peniciline je 2-8 µg/ml za *En. faecalis* i 8-16 µg/ml za *En. faecium* (Sifaoui i sar. 2001). Visoki nivo rezistencije na ampicilin (MIK 128 µg/ml ili više) pripisana je mutacijama koje rezultuju zamenom aminokiselina, pre svega supstituciji Met485 → Ala u blizini aktivnog serinskog ostatka i umetanje serinskog ostatka na poziciju 466 u strukturu predviđenu za interakciju sa kompleksom aktivnog mesta (Rice i sar. 2004). Dodatno, rezistenciji na β-laktamske antibiotike doprinosi i prisustvo β-laktamaza, enzima koji degraduju β-laktamski prsten. Prvobitno opisan u stafilokokima, gen *blaZ* kodira β-laktamazu kao deo operona sa *blaR1*, transmembranskim senzorom i *blaI*, genom koji kodira represor (Hackbarth i Chambers, 1993). Analizom aminokiselinske sekvence proteina kodiranih genima ovog operona iz enterokoka ukazano je verovatno poreklo iz *St. aureus*. Za razliku od stafilokoka, *blaZ* se kod enterokoka konstitutivno eksprimira na mnogo nižem nivou nego kod stafilokoka (Sarti i sar. 2012).

Glikopeptidi su antibiotici koji se vezuju za terminalni D-alanin-D-alanin deo peptidoglikanskih prekursora, čime sprečava unakrsno povezivanje lanaca peptidoglikana i inhibira sintezu ćelijskog zida (Lebreton i sar. 2011). U osnovi visokog nivoa otpornost na vankomicin (MIK > 64 µg/ml) je promena D-alanin-D-alanin u D-alanin-D-laktat čime je smanjeno vezivanje vankomicina za peptidoglikanski lanac i do 1000 puta, dok je u osnovi niskog nivoa otpornosti na vankomicin (MIK 4 - 32 µg/ml) promena D-alanin-D-alanin u D-alanin-D-serin čime je sedam puta smanjeno vezivanje vankomicina za peptidoglikanski lanac. Do danas je opisano devet različitih klastera gena koji su odgovorni za otpornost na vankomicin kod enterokoka: *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanM* i *vanN* (Courvalin, 2006). Kod enterokoka se najčešće nalaze *vanA*, *vanB* i *vanC* klasteri. Klaster *vanA* je karakterističan za zemljišne enterokoke, dok je *vanB* klaster zastupljeniji kod kliničkih enterokoka (Guardabassi i Agersø, 2006). Urođena karakteristika *En. gallinarum* i *En. casseliflavus*, jeste da oni nose *vanC*, hromozomski kodiran genski klaster koji je odgovoran za nizak nivo otpornosti na vankomicin kroz promenu terminalnog dipeptida iz D-alanin-D-alanin do D-alanin-D-serin (Arias i sar. 2000).

Rezistenciju na aminoglikozide enterokoke postižu putem tri mehanizma: (I) smanjenim unosom antibiotika u ćeliju i/ili smanjenom akumulacijom antibiotika u ćeliji, (II) ekspresijom enzima, kodiranih genima na plazmidima, koji modifikuju hemijsku strukturu antibiotika acetilacijom, fosforilacijom ili adenilacijom što dovodi do inaktivacije antibiotika, i (III) promenom na nivou mete ovih antibiotika, bakterijskih ribozoma, što dovodi do smanjenja afiniteta vezivanja aminoglikozida za njih (Topisirović i Jovčić, 2013). Urođena otpornost na aminoglikozide je posredovana prisustvom hromozomski kodiranih enzima, acetiltransferaze AAC(6')-I i fosfotransferaze APH(3')-IIIa, koji mogu da modifikuju i inaktiviraju antibiotike iz ove grupe. Pored toga, enterokoke su sposobne da modifikuju ribozomalnu metu ovih antibiotika pomoću rRNK metiltransferaze poznate pod nazivom EfmM. Ovaj enzim prepoznaje specifičan citidin na poziciji 1404 16S rRNK kod *En. faecium*, a metilacija ovog ostatka uzrokuje otpornost na kanamicin (Galimand i sar. 2011). Za visok nivo rezistencije na aminoglikozide (engl. high-level resistance to aminoglycosides, HLGR) su odgovorni mobilni genetički elementi koji nose gen za enzime koji modifikuju aminoglikozide. Takvi enzimi mogu biti fosfotransferaze (APHs) koje koriste ATP da fosforilišu hidroksilnu grupu na antibiotiku, acetiltransferaze (ACCs) koje koriste acetyl-CoA da acetiluju amino grupu na antibiotiku ili nukleotidiltransferaze koje koriste ATP da adeniluju hidroksilnu grupu antibiotika. HLGR se najčešće povezuje sa članovima APH(2'')-I-fosfotransferazne familije ili ACC(6')-Ie-APH(2'')-Ia familijom koje su kodirane različitim transpozonomima ili konjugativnim plazmidima (Chow, 2000).

Linezolid je antibiotik koji se vezuje za 23S rRNK i onemogućava interakciju aminoacil-tRNK sa A mestom ribozoma, čime se inhibira rast polipeptidnog lanca (Shinabarger i sar. 1997). Otpornost enterokoka na linezolid se ostvaruje putem dva mehanizma: mutacije u genima koji kodiraju 23S rRNK, pri čemu enterokoke, kao i mnoge druge bakterije, imaju više kopija 23S rRNK gena i broj mutiranih alela korelira sa fenotipom otpornosti (Marshall i sar. 2002) i enzimskom modifikacijom 23S rRNK metilacijom adenina na položaju 2503 (Toh i sar. 2007). Cfr metilaza koja metiluje A2503 23S rRNK, a čiji gen koji je lokalizovan na plazmidu, i pronađena je među kliničkim izolatima *En. faecalis* i stafilokoka (Diaz i sar. 2012).

Tetraciklini svoj antibakterijski efekat ostvaruju vezivanjem za 30S subjedinicu bakterijskog ribozoma što sprečava vezivanje aminoacil-tRNK za A mesto čime se inhibira sinteza proteina. Ovaj antibiotik sprečava vezivanje oslobađajućih faktora (engl. releasing factor, RF1 i RF2) tokom procesa terminacije translacije (Roberts, 2005). Mehanizmi

rezistencije na tetracikline se ostvaruju putem efluksa antibiotika, modifikacije ribozoma kao ciljnog mesta i inaktivacije antibiotika delovanjem specifičnih enzima. Efluks pumpe kodirane su *tetK* i *tetL* genima lociranim na plazmidu. Dodatno, *tetM*, *tetO*, *tetQ*, *tetS*, *tetT*, *tetP*, *tetW* geni su lokalizovani na hromozomu i mogu se preneti preko Tn916 transpozona, a kodiraju proteine sa značajnom homologijom sa bakterijskim elongacionim faktorom koji hidrolizuje GTP u prisustvu ribozoma, menja ribozomalnu konformaciju i pomeraju vezan tetraciklin (Chopra i Roberts, 2001).

Svoje dejstvo na sintezu proteina eritromicin ispoljava putem blokiranja tunela u velikoj subjedinci ribozoma i sprečavanjem daljeg rasta nascentnog peptida. S druge strane, on dovodi i do prevremene disocijacije peptidil-tRNK sa ribozoma tokom translokacije, jer blokira P mesto i sprečava prenos sa A mesta na P mesto (Menninger, 1995). Dodatno, pokazano je da ovaj antibiotik inhibira sastavljanje 50S ribozomalnih subjedinića što dovodi do disocijacije ribozoma u ćeliji (Champney i Tober, 1999). Najčešći oblik stečene rezistencije prema makrolidima je sinteza enzima koji metiluju specifične adenine 23S rRNK u okviru 50S ribozomalne subjediniće i time smanjuje afinitet vezivanja makrolida za ribozom (Clancy i sar. 1996). Modifikacija targeta za makrolide zavisi od ekspresije gena za enzim adenin-N^{6,6}-dimetiltransferazu koji su locirani na plazmidima u okviru transpozona. Ovi enzimi su kodirani *erm* genima (Sutcliffe i sar. 1996). Kod enterokoka pronađeni su *ermA* i *ermB* koji kodiraju metiltransferaze i *ermC* koja kodira ErmC metilazu (Mayford i Weisblum, 1990; Jensen i sar. 1999). Dodatno, prisustvo efluks pumpi kodiranih genima na hromozomu omogućava urođenu rezistenciju na makrolide. U genomima *En. faecalis* i *En. faecium* pronađeni su geni *mefA* i *msrA* čiji proteinski produkti omogućuju efluks eritromicina iz ćelije (Leclercq, 2002).

Hinoloni su sintetički agensi širokog antimikrobnog spektra. Derivati su 1,4-dihidro-4-okso-3-hinolinkarboksilne kiseline. Danas se hinoloni dele u tri generacije. Ciprofloksacin i levofloksacin su antibiotici druge generacije. Hinolonski antibiotici inhibiraju replikaciju DNK, tj. aktivnost DNK žiraze i DNK topoizomeraze. Oba enzima su heterotetrameri koje čine: GyrA i GyrB (žiraza) i ParC i ParE (topoizomeraza IV). Mutacije u ciljnim genima, posebno *gyrA* i *parC*, opisane kod *En. faecium* i *En. faecalis*, su odgovorne za urođenu otpornost na hinolone. Ove mutacije nisu detektovane kod *En. gallinarum* i *En. casseliflavus* (Werner i sar. 2010).

Hloramfenikol je antibiotik koji podjednako deluje na Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije. Molekularni mehanizam delovanja hloramfenikola i njegovo

antimikrobno delovanje, posledica je specifične inhibicije sinteze proteina na 70S ribozomu. Primarno mesto vezivanja ovog antibiotika je 50S subjedinica ribozoma (mesto sa visokim afinitetom za hloramfenikol). Opisana su dva glavna mehanizma rezistencije, aktivni efluks i enzimska inaktivacija. Kod enterokoka rezistencija na hloramfenikol je determinisana *catA* genom koji kodira hloramfenikol acetiltransferazu (Prescott, 2000).

Nitrofurantoin je antibiotik koji se koristi za lečenje infekcija urinarnog trakta od 1953. godine do danas (Garau, 2008). Bakterijska nitroreduktaza konvertuje nitrofurantoin u visoko reaktivne elektrofilne intermedijere. Ovi intermedijeri nespecifično napadaju ribozomalne proteine inhibirajući sintezu proteina (McOsker i Fitzpatrik, 1994).

Rifampicin inhibira rast bakterija vezivanjem za β subjedinicu RNK polimeraze i sprečava inicijaciju transkripcije (Wehrli i sar. 1968). Decenijama je korišćen kao deo antibiotskog koktela za lečenje infekcija izazvanih *Mycobacterium tuberculosis*, a odnedavno je našao primenu i u lečenju stafilokoknih infekcija. Molekularni mehanizmi rezistencije se ogledaju u mutacijama gena koji kodiraju β subjedinicu RNK polimeraze. Pored toga, enzimska inaktivacija rifampicina je primećena u nekoliko slučajeva (Andrews i sar. 2000). Iako se rifampicin nije intenzivno koristio za lečenje infekcija izazvanih enterokokama, rezistencija na rifampicin je uobičajena kod enterokoka, skoro 79% kliničkih izolata pokazuje rezistenciju na rifampicin. Verovatno je to posledica izloženosti dejstvu na rifampicin tokom tretmana za neenterokokalne infekcije (Lautenbach i sar. 1998).

1.3.2. Virulentne determinante enterokoka

Povećana učestalost infekcija izazvanih enterokokama kod imunokompromitovanih pacijenata podstakla je istraživače da okarakterišu faktore koji omogućavaju bakterijama da efikasno kolonizuju domaćina, prevaziđu barijere i izazovu patološke promene. Patogeneza većine infekcija uključuje niz događaja kao što su kolonizacija, adhezija za ćelije domaćina, invaziju tkiva i otpornost na nespecifične odbrambene mehanizme (Upadhyaya i sar. 2009). Do sada je okarakterisano nekoliko grupa faktora virulencije: površinski faktori koji utiču na kolonizaciju ćelija domaćina, sekretovani faktori virulencije koji oštećuju tkiva (Sava i sar. 2010) i faktori koji utiču na imunski odgovor domaćina (Jett i sar. 1994).

Sposobnost da se vežu za tkivo domaćina i otpornost na nizak pH i visoke koncentracije žučnih soli doprinose da su enterokoke među najzastupljenijim bakterijama

koje kolonizuju kolon. Njihovi adhezini im omogućavaju da se vežu za receptore mukozne membrane ili proteine ekstraćelijskog matriksa (EĆM) i da na taj način favorizuju kolonizaciju epitela. Sposobnost kolonizacije domaćina nije dovoljna osobina za karakterizaciju enterokoka kao patogena, već je potrebno da ove bakterije poseduju i neke od drugih faktora virulencije, a prisustvo gena koji obezbeđuju rezistenciju na antibiotike povećava njihov patogeni potencijal. Virulentni faktori koji doprinose kolonizaciji su: agregaciona supstanca, kolagen vezujući protein, endokarditis specifični antigen i enterokokalni površinski protein (Chajęcka-Wierzchowska i sar. 2017).

Agregaciona supstanca (AS) je površinski protein kodiran sa plazmida molekulske mase 137 kDa sa strukturom sličnom ukosnici koja interaguje sa enterokokalnom vezujućom supstancom (EVS) na drugim enterokokama i na taj način formiraju kompleks koji je neophodan preduslov za razmenu genetičkog materijala. Prema originalnom modelu, većina enterokoka konstitutivno eksprimira EVS, dok enterokoke koje sadrže AS kodirajuće polne plazmide ekspimiraju AS kada su stimulisane peptidnim feromonima drugih enterokoka (Dramsi i sar. 2005). Prema trenutnom modelu feromonima indukovane konjugacije odnos hromozomski kodiranog feromona (cCF10) i inhibitora indukcije konjugacije koji je kodiran plazmidom (iCF10) određuje stanje indukcije donorske ćelije. U kulturi donorskih ćelija koje rastu u bakterijskom medijumu, ravnoteža ova dva peptida održava transferni sistem. Ravnoteža se može pomeriti u korist feromona, bilo proizvodnjom feromona od strane ćelija primaoca u neposrednoj blizini ili interakcijom inhibitora sa komponentama plazme kada bakterije rastu u krvotoku domaćin (Dunny, 2007). Feromoni su mali peptidi, 7-8 aminokiselina, kodirani genima *cpd*, *cob*, *ccf*, *cad*, lokalizovanim na hromozomu (An i Clewell, 2002). Kada se feromoni vežu za svoje receptore na površini donorskih ćelija, signal se prenosi i indukuje ekspresiju gena za AS. AS je epidemiološki povezan za infekcijama urogenitalnog trakta, povećava vezivanje za bubrežne ćelije i štiti *En. faecalis* od ubijanja polimorfonuklearnim leukocitima (Kreft i sar. 1992). Prisustvo AS omogućava vezivanje za fibronektin, trombospondin, vitronektin i kolagen tipa I, dok je vezivanje za lamine i kolagen tipa IV nezavisno od AS (Rozdzinski i sar. 2001).

Kolagen vezujući protein (Ace/Acm) je površinski protein molekulske mase približno 74 kDa. Kod *En. faecalis* kodiran je *ace* genom, dok je kod *En. faecium* kodiran *acm* genom (Nallapareddy i sar. 2008). Acm protein pokazuje veći afinitet vezivanja za kolagen tipa I nego za kolagen tipa IV, dok Ace protein pokazuje podjednak afinitet vezivanja za oba tipa kolagena (Nallapareddy i sar. 2003).

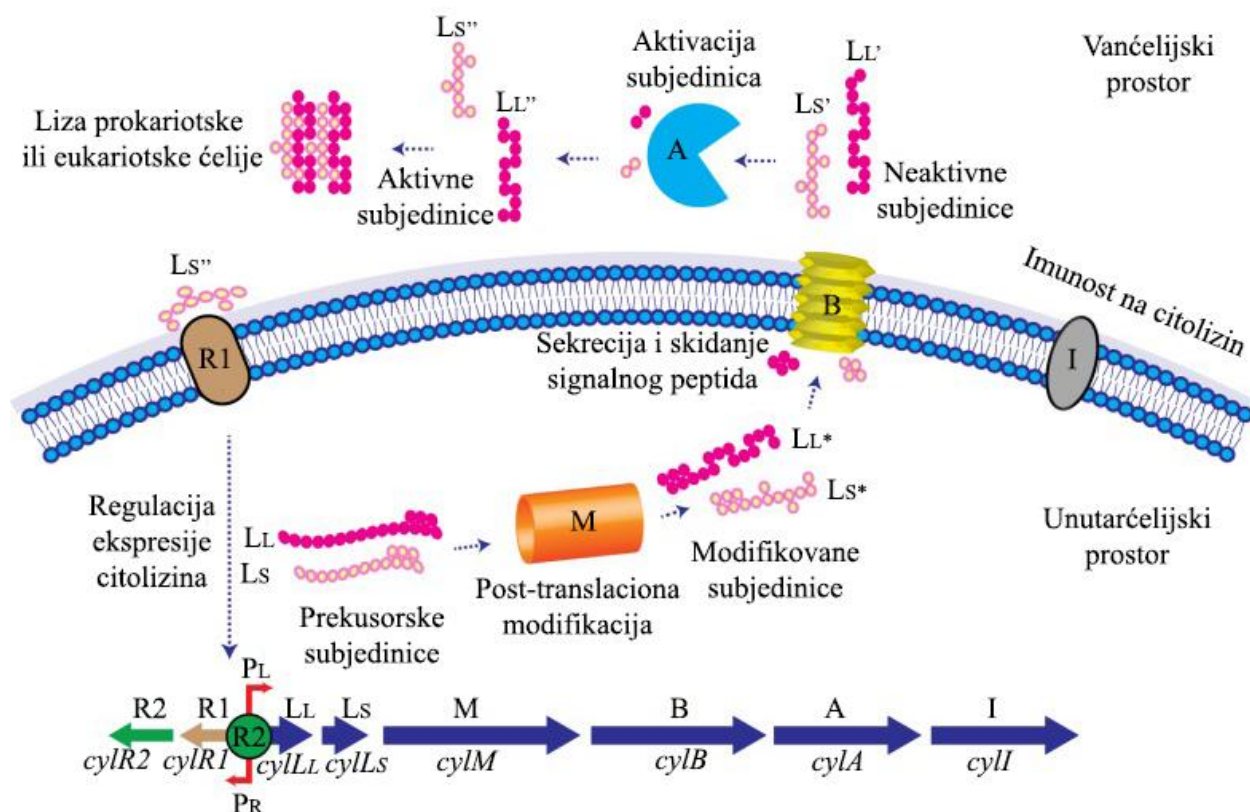
Antigen specifičan za endokarditis je protein molekulske mase približno 34 kDa kodiran *efaA^{fs}* genom kod *En. faecalis*, i *efaA^{fm}* kod *En. faecium* (Sava i sar. 2010). Gen *efaA* je deo operona koji kodira ABC transporter (permeazu), regulisanu jonima mangana. EfaA protein pokazuje homologiju sa adhezinima prisutnim u ćelijskim zidovima streptokoka (FimA, ScaA, PsaA i SsaB) (Elsner i sar. 1998; Archimbaud i sar. 2002).

Enterokokalni površinski protein (engl. enterococcal surface protein, Esp) je najveći identifikovani protein kod enterokoka i molekulske je mase oko 200 kDa. Gen *esp* kodira protein i lokalizovan je na patogenom ostrvu zajedno sa genima koji su odgovorni za rezistenciju na antibiotike (Leavis i sar. 2004). Pokazano je da je prisustvo *esp* gena kod *En. faecium* u korelaciji sa otpornošću na ampicilin, ciprofloksacin, imipenem (Billstrom i sar. 2008) i vankomicin (Ochoa i sar. 2013). Esp protein se vezuje za kolagen i fibronektin, dok enterokoke deficijentne za ovaj protein pokazuju smanjeno inicijalno vezivanje. Pokazano je da Esp protein ima ulogu u formiranju biofilma koji može imati važnu ulogu u razmeni genetičkog materijala između ćelija, čime se povećava njihova otpornost na antibiotike (Donlan i Costerton 2002).

Nakon procesa kolonizacije, patogeni sojevi enterokoka mogu da sintetišu toksične supstance koje imaju destruktivan efekat na tkivo domaćina. Takvi virulentni faktori su citolizin (Cyl), želatinaza (GeLE) i hijaluronidaza (HylN).

Citolizin je egzotoksin tipa bakteriocina, koji pokazuje baktericidna svojstva prema Gram-negativnim i Gram-pozitivnim bakterijama i hemolitička svojstva prema eritrocitima, leukocitima i makrofagima (De Vuyst i sar. 2003).

Za produkciju citolizina je odgovoran operon koji se sastoji od osam gena: *cylR1*, *cylR2*, *cylLl*, *cylLs*, *cylM*, *cylB*, *cylA* i *cylI* (Slika 2). Operon se može naći na konzervisanom feromon-zavisnom plazmidu (npr. pAD1) ili unutar ostrva patogenosti u bakterijskom hromozomu. Ekspresija citolizina je kodirana *cylLl* i *cylLs* genima, *cylM* kodira citolizin modifikujući protein, *cylB* kodira protein koji omogućava da citolizin izađe u spoljašnju sredinu gde se aktivira serinskom proteazom kodiranom *cylA* genom, dok *cylI* gen obezbeđuje imunost na citolizin. Dodatno, ekspresija citolizina je regulisana regulatornim sistemom koji se sastoji od transportnog proteina kodiranog *cylR1* genom i DNK vezujućeg proteina kodiranog *cylR2* genom (Van Tyne i sar. 2013).



Slika 2: Model ekspresije citolizina kod enterokoka. Slika preuzeta iz Garsin i sar. 2014. i modifikovana.

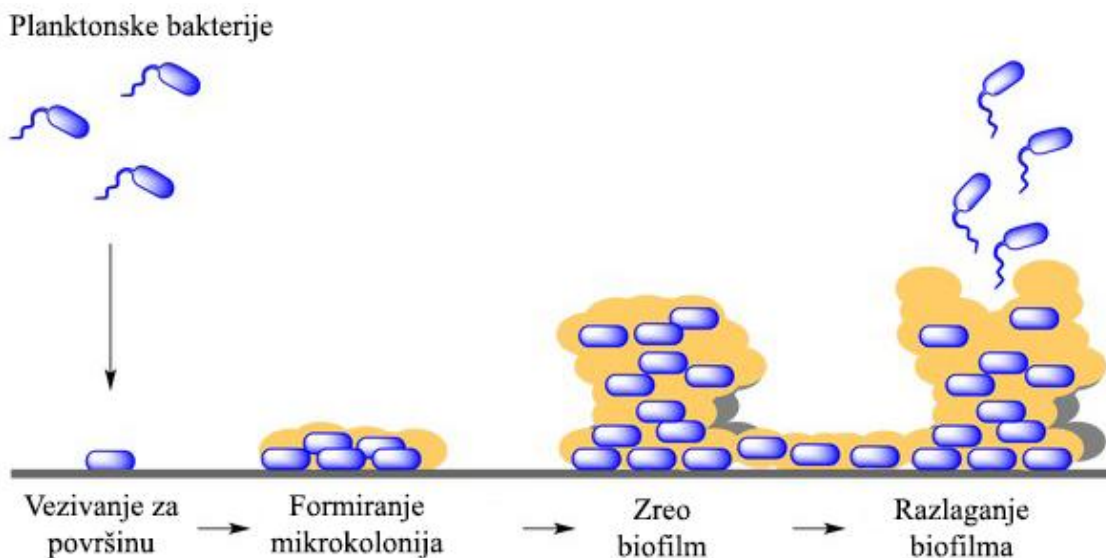
Želatinaza je ekstracelularna cink-zavisna metalo-endopeptidaza sa molekularnom masom od oko 30 kDa koja ima sposobnost da hidrolizuje želatin, elastin, kolagen, hemoglobin, kao i druge bioaktivne peptide. Kodirana je *gelE* genom koji se nalazi na hromozomu i koji je pod kontrolom *fsr* lokusa. Delecije ili mutacije unutar *fsr* lokusa dovode do izostanka sinteze želatinaze, iako je gen prisutan. Dodatno, posledica ovog fenomena jeste smanjenje sposobnosti formiranja biofilma do 30% (Mohamed i Huang, 2007).

Hijaluronidaza enterokoka je protein sa molekulskom masom oko 45 kDa i kodirana je *hylN* genom koji se nalazi na hromozomu. Ovaj enzim ima ulogu u degradaciji mukopolisaharida vezanih za tkiva i hrskavice čime omogućava širenje infekcije (Vankerckhoven i sar. 2004). Obično se nalazi kod kliničkih izolata *En. faecium*, dok se kod kliničkih izolata *En. faecalis* veoma retko sreće. Takođe, hijaluronidaza je prisutna i u drugim vrstama enterokoka izolovanih iz hrane: *En. casseliflavus*, *En. mundtii* i *En. durans* (Trivedi i sar. 2011).

1.3.3. Enterokoke i formiranje biofilma

Biofilmovi su zajednice mikroorganizama koje su pričvršćene za različite biotičke i abiotičke površine i okružene su ekstracelularnom polimernom supstancom (EPS) (Mohamed i Huang, 2007). Formiranje biofilma se odvija u nekoliko faza (Slika 3):

- primarno vezivanje za površinu: planktonske, slobodno plutajuće ćelije se mogu pričvrstiti za biotičku ili abiotičku površinu, u početku reverzibilno, a kasnije te veze postaju ireverzibilne. Nekoliko elemenata je uključeno u primarno vezivanje kao što su svojstva ćelije, osobine supstrata i ekološki faktori. Inicijalno vezivanje bakterijskih ćelija zahteva elektrostatičke interakcije, Luisove interakcije kiseline i baze, Van der Valsove i hidrofobne veze, kako bi se prevazišlo odbacivanje od negativno naelektrisanih površina. Pored toga i površinski proteini ćelije su uključeni u inicijalno vezivanje (van Merode i sar. 2006).
- formiranje mikrokolonija: kada se bakterije ireverzibilno vežu za neku površinu, dolazi do povećane produkcije EPSa koji drži ćelije zajedno i dalje pomaže prekrivanju površine. Komponente EPSa uključuju proteine (enzime i strukturne proteine), polisaharide, ekstracelularnu DNK (eDNA) i lipide. Bakterijske populacije u okviru biofilma imaju tendenciju za dostizanjem velike ćelijske gustine što je omogućeno "quorum-sensing" sistemom. "Quorum-sensing" sistem je kontrolisan koncentracijom signalnih molekula, autoinducera, koje bakterije sintetišu i otpuštaju u okruženje. Jednom kada ovi signalni molekuli dostignu kritičnu koncentraciju koja zavisi od gustine ćelija, bakterije kolektivno ekspimiraju gene uključene u simbiozu, virulenciju, pokretljivost, konjugaciju i formiranje biofilma (Miller i Bassler, 2001).
- zreli biofilmovi: mikrokolonije i EPS su se razvile u trodimenzionalnu strukturu sa neravnomerno raspoređenim bakterijama koje deluju kao kanali za transport vode, hranljivih materija i kiseonika. Unutar zrelog biofilma, bakterije mogu da prenose DNK bilo putem eDNK konjugacijom ili horizontalnim prenosom (Donlan i Costerton 2002; Montanaro i sar. 2011). U zavisnosti od stanja ćelija i razlike u lokalnim uslovima unutar biofilma, neke ćelije će umreti, a ćelijske komponente mrtvih bakterija mogu reabsorbovati ostale ćelije u biofilmu, degradovati komponente EPSa ili dobiti signal da ekspimiraju gene čiji će produkti indukovati razlaganje biofilma (Costerton i sar. 1999).



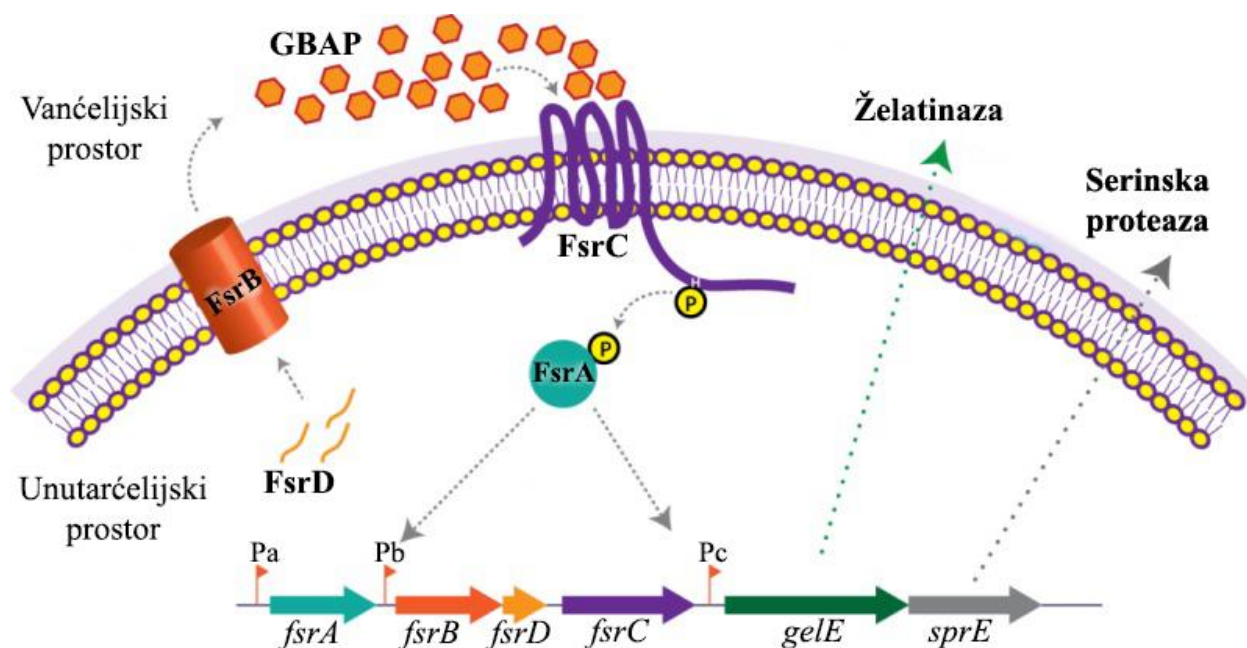
Slika 3: Formiranje biofilma. Slika preuzeta sa <https://poulinlabumd.com/research/> i modifikovana

- Razlaganje biofilma: u starijim biofilmovima razlaganje može biti aktivno uzrokovano ćelijskim signalima ili promenama u okolini (nivoi nutrijenata, ograničenja u izvorima ugljenika i/ili kiseonika, nivoi cikličnog diguanil-monofosfata, azot oksida i enzima koji degraduju EPS) (McDougald i sar. 2012) ili može biti fizičko razlaganje biofilma do kog dolazi usled strujnih sila koje uzrokuju sečenje biofilma (Donlan i Costerton, 2002).

U formiranje biofilma kod enterokoka su uključeni faktori životne sredine i proteini na površini ćelije. Enterokoke se mogu naći u različitim ekološkim nišama i razvile su različite mehanizme preživljavanja nepovoljnih uslova kao što su nedostatak hranljivih materija, pH, nedostatak kiseonika. Svaki od ovih faktora može uticati na formiranje biofilma (Callow i Callow, 2006). Pokazano je da glukoza stimuliše formiranje biofilma kod *En. faecalis* i *En. faecium*. Transkripcioni regulator *bopD*, koji vezuje šećere i deo je *bop* operona uključen je u formiranje biofilma *En. faecalis* (Creti i sar. 2006). Kristich i sar. (2004) su pokazali da prisustvo šećera u medijumima za rast bakterija (M17, BHI, TSB i drugi) promoviše formiranje i/ili sazrevanje biofilma. Dodatno, *ebp* operon je identifikovan kod kliničkih i sredinskih izolata *En. faecalis* i sadrži gene *ebpA*, *ebpB*, *ebpC* i *srtC* koji su pod kontrolom *ebpR* regulatora. Nije poznato na šta tačno regulator odgovara, ali studije pokazuju povećanu ekspresiju u prisustvu bikarbonata i/ili ugljen-dioksida (Bourgogne i sar. 2007). Prisustvo 10% humanog seruma u medijumu za rast bakterija povećava vezivanje enterokoka

za plastiku i silikon. Produkcija biofilma indukovana serumom kod *En. faecalis* je smanjena kod mutanata za *salB* gen u odnosu na divlji soj (engl. wild-type, wt) (Mohamed i sar. 2006). Genski klaster *epa* (engl. enterococcal polysaccharide antigen, epa) kodira glikoziltransferazu koja je uključena u sintezu polisaharida i proizvodnju biofilma (Mohamed i sar. 2004).

Jedan od najbolje izučenih mehanizama formiranja biofilma kod enterokoka je *fsr* dvokomponentni "quorum-sensing" sistem i ovaj operon se sastoji od četiri gena, *fsrA*, *fsrB*, *fsrC* i *fsrD* (Slika 4). Gen *fsrD* kodira ciklični autoindukujući peptid, feromon koji aktivira sintezu želatinaze (engl. gelatinase biosynthesis-activating pheromone, GBAP). Za sazrevanje GBAP neophodan je FsrB. GBAP interaguje sa senzornom histidin-kinazom, FsrC, koja fosforilacijom aktivira regulator odgovora, FsrA. Aktiviran FsrA pozitivno reguliše ekspresiju *fsr* operona i transkripciju nizvodnih gena, *gelE* i *sprE*, koji kodiraju sekretovanu želatinazu (GelE) i serinsku proteazu (SprE) (Hancock i Perego, 2004). Želatinaza može da razgradi mnoge proteine čime povećava hidrofobnost i stimulise vezivanje za površine (Carniol i Gilmore, 2004). Dodatno, GelE-SprE je uključen u oslobađanje eDNK što doprinosi razvoju biofilma.



Slika 4: Mehanizam *fsr* aktivacije kod *En. faecalis* i sinteza želatinaze i serinske proteaze. Slika preuzeta iz Garsin i sar. 2014 i modifikovana.

1.4. Enterokoke kao probiotici

Poslednjih godina sve je veće interesovanje za upotrebu probiotičkih bakterija za održavanje opšteg zdravlja gastrointestinalnog trakta i prevenciju ili tretman infekcija creva. Prema definiciji Organizacije za hranu i poljoprivredu (engl. Food and Agriculture Organization, FAO) i Svetske zdravstvene organizacije (engl. World Health Organization WHO), probiotici su živi mikroorganizmi koji kada se unesu u odgovarajućim količinama, doprinose poboljšanju zdravstvenog statusa domaćina. (FAO/WHO, 2004). Među najvažnijim dokumentovanim efektima probiotika jeste sprečavanje dijareje, konstipacija, anti-inflamacijska, antibakterijska i antioksidativna aktivnost (Moslehi-Jenabian i sar. 2010). Probiotici su takođe pokazali svoje efekte u ublažavanju simptoma alergije, sindroma stečene imunodeficijencije, respiratornih i infekcija urinarnog trakta. Postoje izveštaji o njihovim pozitivnim efektima na umor, autizam, osteoporozi, gojaznost i dijabetes tipa 2 (Harish i Varghese, 2006). Predloženi mehanizmi delovanja probiotičkih bakterija uključuju (I) direktnu antimikrobnu aktivnost; (II) vezivanje probiotičkih bakterija za vezivna mesta na tkivima domaćina čime se zauzimaju mesta za vezivanje patogenih bakterija (konkurentno isključivanje), (III) stimulaciju funkcije epitelne barijere; (IV) modulaciju imunskog odgovora stimulacijom produkcije anti-inflamacijskih citokina i regulacije pro-inflamacijskih citokina; i (V) inhibiciju ekspresije virulentnih gena ili proteina gastrointestinalnih patogena (Corr i sar. 2009). Sojevi bakterija koji pripadaju rodovima *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*, a koji su deo gastrointestinalne mikrobiote, su najčešće korišćene probiotičke bakterije (Guarner i Malagelada, 2003). Neki sojevi enterokoka, kao što su *En. faecium* SF68 i *En. faecalis* Symbioflor 1 (McFarland i Dublin, 2008; Lappin i sar. 2009), već duže vreme se koriste kao probiotske kulture za poboljšanje opšteg stanja organizma čoveka i sisara (Holzapfel i Wood 2012). Posle duge istorije bezbedne upotrebe probiotika u fermentisanim mlečnim proizvodima i dokazanih korisnih efekata na zdravlje ljudi, farmaceutska i prehrambena industrija se sve više interesuju za ove vrste mikroorganizama (Liong, 2011). Pored probiotika, danas je u upotrebi nekoliko vrsta korisnih dodataka hrani kao što su prebiotici, sinbiotici i postbiotici. Pokazano je da podstiču rast životinja, otpornost na bolesti, a koriste se i kao dopuna ili alternativa terapiji antibioticima (Irianto i Austin, 2002; Hoseinifar i sar. 2017). Prebiotici se sastoje od polisaharida koji se ne vare u digestivnom traktu životinja (na primer laktuloza, inulin, oligofruktoza), ali koje fermentišu određene bakterije u debelom crevu i time selektivno promovišu rast određenih grupa bakterija.

Sinbiotici se sastoje od kombinacije prebiotika i probiotika gde prebiotička komponenta utiče na rast probiotičke komponente i u sinergiji ostvaruju pozitivan efekat na zdravlje (Franz i sar. 2011). Postbiotici su solubilni molekuli ili molekuli vezani za ćeliju probiotičkih sojeva koji samostalno mogu da dovedu do željenog efekta (Tsilingiri i sar. 2012). Prvi od kriterijuma za izbor probiotika uključivali su toleranciju na nepovoljne uslove gastrointestinalnog trakta (želudačnu kiselinu i žuč), sposobnost da se vezuju za gastrointestinalnu sluzokožu i kompetitivno isključivanje patogena (Collins i sar. 1998). Međutim, sa razvojem istraživanja o mehanizmima kojima probiotičke bakterije mogu delovati pozitivno na zdravlje domaćina proširio se broj analiza kojima se mogu detektovati potencijalni probiotički sojevi. Ovo je vrlo važno jer je sve veća učestalost infekcija prouzrokovanih patogenim sojevima koji su rezistentni na veliki broj antibiotika zbog čega je hitno potrebno naći alternativne pristupe u sprečavanju i tretmanu ovih infekcija. Takođe izuzetno je veliki porast učestalosti bolesti koje su posledica poremećenog imunskog odgovora, kako neodgovarajuće usmerenog (ka sopstvenim antigenima), jakog imunskog odgovora kod autoimunskih bolesti tako i nedovoljno jakog imunskog odgovora kod tumora. Imajući u vidu da je među različitim sojevima enterokoka pokazano prisustvo različitih molekula od kojih neki imaju jaku antimikrobnu aktivnost protiv klinički značajnih patogena, dok neki sintetišu molekule sa snažnom imunomodulatornom aktivnošću, a da je sa druge strane ova grupa bakterija okarakterisana kao kontroverzna, predložen je pristup za odabir probiotičkih sojeva enterokoka kojim bi se svaki enterokokalni soj individualno proučio (Franz i sar. 2003). Idealno bi bilo da takvi sojevi nemaju faktore virulencije, da su senzitivni na relevantne kliničke antibiotike ili da se koriste kao prebiotici ili postbiotici (Pandey i sar. 2015).

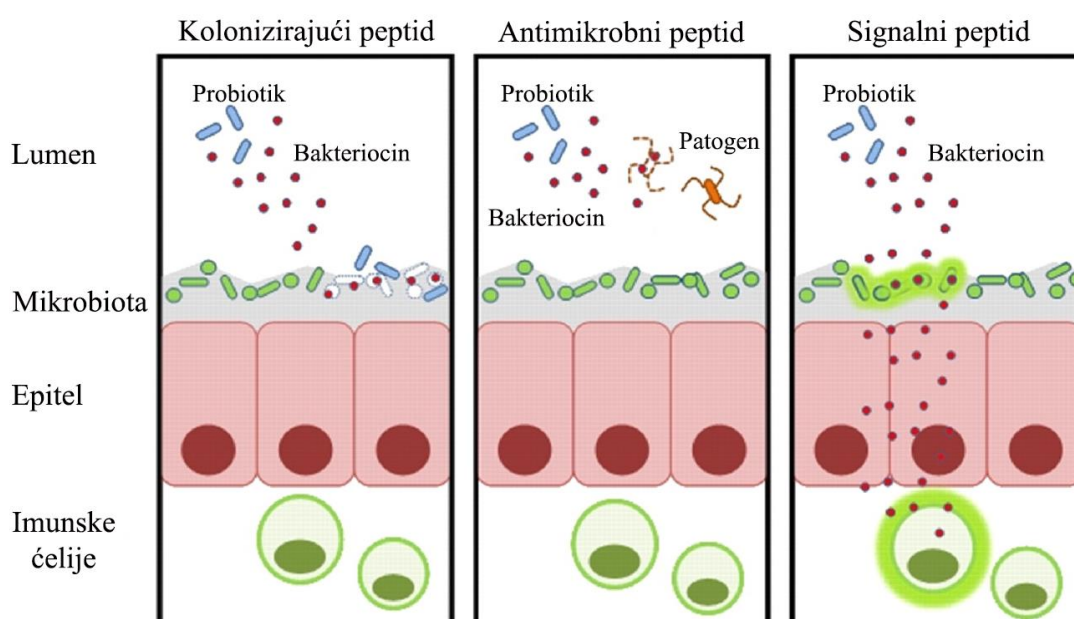
Mehanizmi kojima enterokoke ostvaruju svoj probiotički efekat su: proizvodnja inhibitornih supstanci (vodonik peroksid, bakteriocini, organske kiseline), povećanje funkcije epitelne barijere, konkurentno isključivanje patogenih bakterija za vezujuća mesta, modulaciju imunskog odgovora putem povećanja produkcije anti-inflamacijskih citokina i regulacije pro-inflamacijskih citokina (Pandey i sar. 2015).

1.4.1. Bakteriocini enterokoka

Bakteriocini su mali, ribozomalno sintetisani peptidi ili proteini koji imaju uzak antimikrobni spektar delovanja, ograničen na blisko srodne vrste ili bakterije iste ekološke niše (Cotter i sar. 2005). Većina MKB ima sposobnost sinteze bakteriocina koji se mogu grubo podeliti u dve klase, klasa I - modifikovani bakteriocini koji poseduju atipične aminokiseline (AK), kao što je lantionin i dehidrirane AK, koje nastaju kao posledica posttranslacionih modifikacija treonina i serina i klasa II - nemodifikovani bakteriocini ili sa malim modifikacijama kao što je ciklizacija ili formiranje disulfidnih mostova (Mokoena, 2017).

Bakteriocini enterokoka su većinom termostabilni, tolerantni na široki opseg pH vrednosti i inaktiviraju se gastrointestinalnim enzimima. Enterocini su bakteriocini enterokoka i mnogi enterocini pokazuju snažnu antimikrobnu aktivnost protiv mikroorganizama prisutnih u hrani, kao što su *L. monocytogenes*, *St. aureus*, *Clostridium* spp., *E. coli*, *Vibrio cholerae* i *Bacillus cereus* (Giraffa i sar. 1997). Franz i sar. (2007) su predložili klasifikaciju enterocina prema njihovim karakteristikama. Ova klasifikacija obuhvata četiri glavne grupe: klasa I – lantibiotični enterocini (lantibiotici), klasa II – nelantibiotični enterocini, klasa III – ciklični enterocini i klasa IV – veliki proteini. Klasa II je podeljena na tri podklase: IIa – pediocinska familija enterocina, IIb – dvopeptidni enterocini i IIc – enterocini sintetisani bez lider peptida. Među ovim enterocinima enterokoke najređe proizvode lantibiotike i do sada su opisana samo dva: citolizin i enterocin W (Sawa i sar. 2012; Ali i sar. 2017). Enterocini klase IIa su identifikovani kod mnogih vrsta enterokoka i variraju u dužini od 37 do 58 aminokiselinskih ostataka, ali svi dele konsenzusnu sekvencu KYYGNGL/VXCXKXXCXVDW na N-terminalnom kraju (Drider i sar. 2006). Dva cisteina u konzervisanoj N-terminalnoj sekvenci formiraju disulfidni most, što je preduslov za antimikrobnu aktivnost. Ovi enterocini su od posebnog interesa jer snažno inhibiraju rast *L. monocytogenes* (Eijsink i sar. 2002). Enterocin 1071 i enterocin C pripadaju grupi dvopeptidnih enterocina i sastoje se od dva peptida (enterocin 1071A i enterocin 1071B, kao i enterocin C1 i enterocin C2), čiji su geni kolokalizovani, i neophodno je prisustvo oba peptida kako bi ovi enterocini ispoljili antimikrobnu aktivnost (Franz i sar. 2002; Maldonado-Barragán i sar. 2009). Enterocini sintetisani bez lider peptida obuhvataju dvokomponentne enterocine kojima nedostaje YGNGVXC motiv. Ovi enterocini pripadaju IIc klasi. Enterocini iz ove grupe zadržavaju antimikrobnu aktivnost i kada su izgrađeni samo od pojedinačnih

peptida, ali je mnogo veća aktivnost kada su prisutna oba peptida. Najpoznatiji enterocin iz ove grupe je L50 koji se sastoji iz dva peptida L50A i L50B (Gálvez i sar. 1998). Ciklični enterocini obuhvataju enterocine kod kojih su N- i C- terminalni kraj kovalentno vezani i formiraju cikličnu strukturu. Jedan od najpoznatijih enterocina iz ove grupe je AS-48 koji je prvi put opisan kod kliničkog izolata *En. faecalis* (Gálvez i sar. 1986). Enterocini klase IV čine veliki (preko 30 kDa) i termolabilni proteini koji imaju drugačiji antimikrobni mehanizam od drugih enterocina. Najpoznatiji među njima jeste enterolizin A. Čelije proizvođači ovog enterocina nemaju uvek protein koji obezbeđuje imunost, već imunost na ovaj enterocin obezbeđuju promenama u ćelijskom zidu (Nilsen i sar. 2003). Proizvodnja bakteriocina smatra se veoma važnom osobinom u kontekstu probiotičke efikasnosti jer mogu povećati sposobnost probiotičkog soja - proizvođača bakteriocina da kompetira sa drugim bakterijama GITa čime potencijalno inhibira rast patogenih bakterija. Međutim, moguće je da bakteriocini doprinose funkcionalnosti probiotika na više načina (Slika 5). Bacteriocini mogu da budu od značaja tokom kolonizacije, olakšavajući uvođenje i/ili dominaciju probiotičkog soja - proizvođača bakteriocina u već prenaseljenu nišu. Dodatno, bakteriocini mogu delovati kao antimikrobni peptidi, direktno inhibirajući konkurentske sojeve ili patogene. Takođe, bakteriocini mogu da funkcionišu kao signalni peptidi, tako što signaliziraju drugim bakterijama putem "quorum-sensing" ili modulacijom imunskih ćelija domaćina (Dobson i sar. 2011).



Slika 5: Mehanizmi preko kojih proizvodnja bakteriocina može doprineti probiotičkoj funkcionalnosti.

Slika preuzeta iz Dobson i sar. 2011. i modifikovana.

1.4.2. Uticaj enterokoka na epitelnu barijeru

Intestinalni epitel je u stalnoj komunikaciji sa luminalnim sadržajem i dinamičnom i promenljivom crevnom mikrobiotom. Intestinalna barijera je najznačajniji odbrambeni mehanizam koji održava integritet epitela i čuva organizam od spoljašnje sredine, a čine je mukozne površine, antimikrobni peptidi, sekretoroni imunoglobulin (Ig) A i kompleks epitelnih međucelijskih adhezina (Ohland i MacNaughton, 2010). Jedna od najvažnijih komponenti epitelne barijere su proteini između ćelija nazvani proteini čvrstih veza (engl. tight junction, TJ). TJ predstavljaju multiproteinski kompleks koji onemogućava paraćelijsko curenje rastvora i vode kao i mešanje proteina apikalne i bazolateralne strane. Mogu se razlikovati dve TJ proteinske porodice, kladini, koji sadrže 27 članova kod sisara i TJ-pridruženi MARVEL proteini (engl. tight junction associated MARVEL proteins, TAMP), koji uključuju okcludin, tricelulin i MarvelD3. Oni su povezani sa velikim brojem TJ regulatornih proteina. TJ prolaze kroz fiziološku i patofiziološku regulaciju promenom sastava ili zastupljenosti proteina. Patofiziološki uslovi koji uključuju promene TJ proteinskog sastava su efekti vezivanja patogena na TJ proteine, izmenjen sastav TJ proteina tokom inflamacije i infekcije i izmenjena ekspresija TJ proteina kod karcinoma (Günzel i Fromm, 2012). Patogene bakterije, uključujući *L. monocytogenes* i enterohemoragičnu *E. coli* mogu poremetiti čvrste međucelijske komplekse i izazvati disfunkciju epitelne barijere što im olakšava invaziju u domaćina (Drolia i sar. 2018). Pokazano je da su kladini glavna determinanta funkcionalne barijere čvrstih veza i da je smanjenje ekspresije kladina u korelaciji sa različitim ljudskim bolestima (Hadj-Rabia i sar. 2004; Usami i sar. 2006).

1.4.3. Konkurentno isključivanje patogenih bakterija

Mehanizmi koje koristi jedna vrsta bakterija za isključivanje ili smanjenje rasta druge vrste su: stvaranje neprijateljske mikroekologije, uklanjanje ili zauzimanje dostupnih receptora za vezivanje bakterija, proizvodnja i lučenje antimikrobnih supstanci i metabolita i konkurentsko trošenje esencijalnih nutrijenata (Rolfe, 1991). Da bi stekle konkurentsku prednost, bakterije mogu da modifikuju svoje okruženje čime postaju manje pogodne za njihove konkurente. Proizvodnja antimikrobnih supstanci i mlečne kiseline su primeri kako bakterije modifikuju životnu sredinu (Schiffrin i Blum, 2002). Pokazano je da enterokoke

inhibiraju širok spektar patogena, uključujući *E. coli*, *Salmonella* spp., *Helicobacter pylori* i *L. monocytogenes* (Tsai i sar. 2004).

Vezivanje za crevnu mukozu se smatra preduslovom za kolonizaciju i važna je osobina koja omogućava interakciju između probiotičkih sojeva i domaćina, modulaciju imunskog odgovora i antagonizam patogena (Hirano i sar. 2003). Zbog toga je vezivanje jedan od glavnih kriterijuma za selekciju novih probiotičkih sojeva i povezano je sa određenim korisnim efektima probiotika (Juntunen i sar. 2001). Enterokoke ispoljavaju različite površinske determinante koje su uključene u njihovu interakciju sa ćelijama crevnog epitela i mukusom. Peharaste ćelije crevnog epitela luče mucin, složenu glikoproteinsku smešu koja je glavna komponenta mukusa, čime se sprečava prodor patogenih bakterija, a ekspresiju mucina mogu da stimulišu komensalne bakterije, a mehanizam uključuje protein primarnog odgovora mijeloidne diferencijacije (engl. myeloid differentiation primary response protein, MyD88) (Frantz i sar. 2012). Pored mucina, u mukusu se nalaze i lipidi, slobodni proteini, imunoglobulini i različite soli. Kao što je već pomenuto, pokazano je da nekoliko proteina enterokoka promoviše vezivanje za mukus. Sa druge strane, pod određenim okolnostima, enterokoke mogu da degraduju mukus kako bi omogućile blizak kontakta sa epitelom (Sicard i sar. 2017). Takođe, mogu da modulišu gensku ekspresiju MUC2 i MUC3 proteina i da na taj način obezbede kolonizaciju (Carasi i sar. 2017).

Kao i većina bakterija, enterokoke ekspimiraju široki spektar površinskih proteina uključenih u njihovo vezivanje za proteine EĆM. Najčešći od ovih proteina su bakterijske površinske komponente koje prepoznaju molekule adhezivnog matriksa (engl. microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules, MSCRAMM) (Hall i sar. 2007). Svi MSCRAMM dele istu strukturu, sa dva susedna IgG-preklopljena domena koja posreduju njihovom vezivanju za komponente EĆM domaćina, kao što su kolagen i fibronektin (Josse i sar. 2017).

1.4.4. Modulacija imunskog odgovora posredovana probiotičkim bakterijama

Poznato je da probiotičke bakterije mogu imati imunomodulatorni efekat koji je rezultat interakcije sa epitelnim i dendritskim ćelijama (DĆ), monocitima/makrofagima i limfocitima, i to pre svega onim lokalizovanim u crevima i pripadajućim limfnim tvorevinama. Imunski sistem se deli na urođeni i adaptivni. Adaptivni imunski odgovor zavisi

od T i B limfocita, koji su specifični za određene antigene. Nasuprot tome, urođeni imunski sistem reaguje na grupu molekula karakterističnu za mikroorganizme uopšteno pod nazivom molekulski obrasci povezani sa mikroorganizmima (engl. microorganism-associated molecular patterns, MAMP) odnosno sa patogenima (engl. pathogen-associated molecular patterns, PAMP) (Gómez-Llorrente i sar. 2010). MAMP interaguju sa različitim grupama receptora urođene imunosti koji su ispoljeni na imunskim i nekim neimunskim ćelijama i na taj način modulišu urođeni imunski odgovor. Među ovim receptorima za prepoznavanje molekularnih obrazaca (engl. pattern recognition receptors, PRR) su najpoznatiji "toll-like" receptori (engl. toll-like receptors, TLR), ekstraćelijski C tip lektinski receptori (engl. C type lectin receptors, CLR) i unutarćelijski receptori slični oligomerizujućim nukleotid-vezujućim proteinima (engl. nucleotide binding oligomerization domain-containing protein, NOD) koji prenose signale nakon interakcije sa mikroorganizmima (Lebeer i sar. 2010). Pokazano je da probiotičke bakterije najčešće interaguju sa epitelnim intestinalnim ćelijama i DĆ koje onda migriraju dalje do mezenteričnih limfnih čvorova i mogu dovesti do aktivacije ili tolerance imunskog odgovora, međutim ukoliko je narušena intestinalna barijera, same bakterije mogu da migriraju i do mezenteričnih limfnih čvorova (Wells, 2011). TLR su transmembranski proteini eksprimirani na različitim imunskim ćelijama, kao što su B ćelije, ćelije prirodne ubice (engl. natural killer NK), DĆ, makrofagi, monociti, ali i na neimunskim ćelijama kao što su fibroblasti, epitelne i endotelne ćelije. Kod sisara (Tabela 1), TLR familija sadrži jedanaest proteina (TLR1-TLR11). Aktivacija TLR se javlja nakon vezivanja liganda za ekstraćelijske ponovke bogate leucinom (Mills, 2011).

Kod ljudi, TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 i TLR10 su povezani sa spoljašnjom membranom i prvenstveno reaguju na MAMP-ove koji se nalaze na površini ćelije vanćelijskih mikroorganizama. TLR3, TLR7, TLR8 i TLR9 se nalaze na površini endozoma i reaguju na nukleinske kiseline (Gómez-Llorrente i sar. 2010) i najvažniji su u prepoznavanju unutarćelijskih ili patogena unetih endocitozom (virusi, unutarćelijske bakterije).

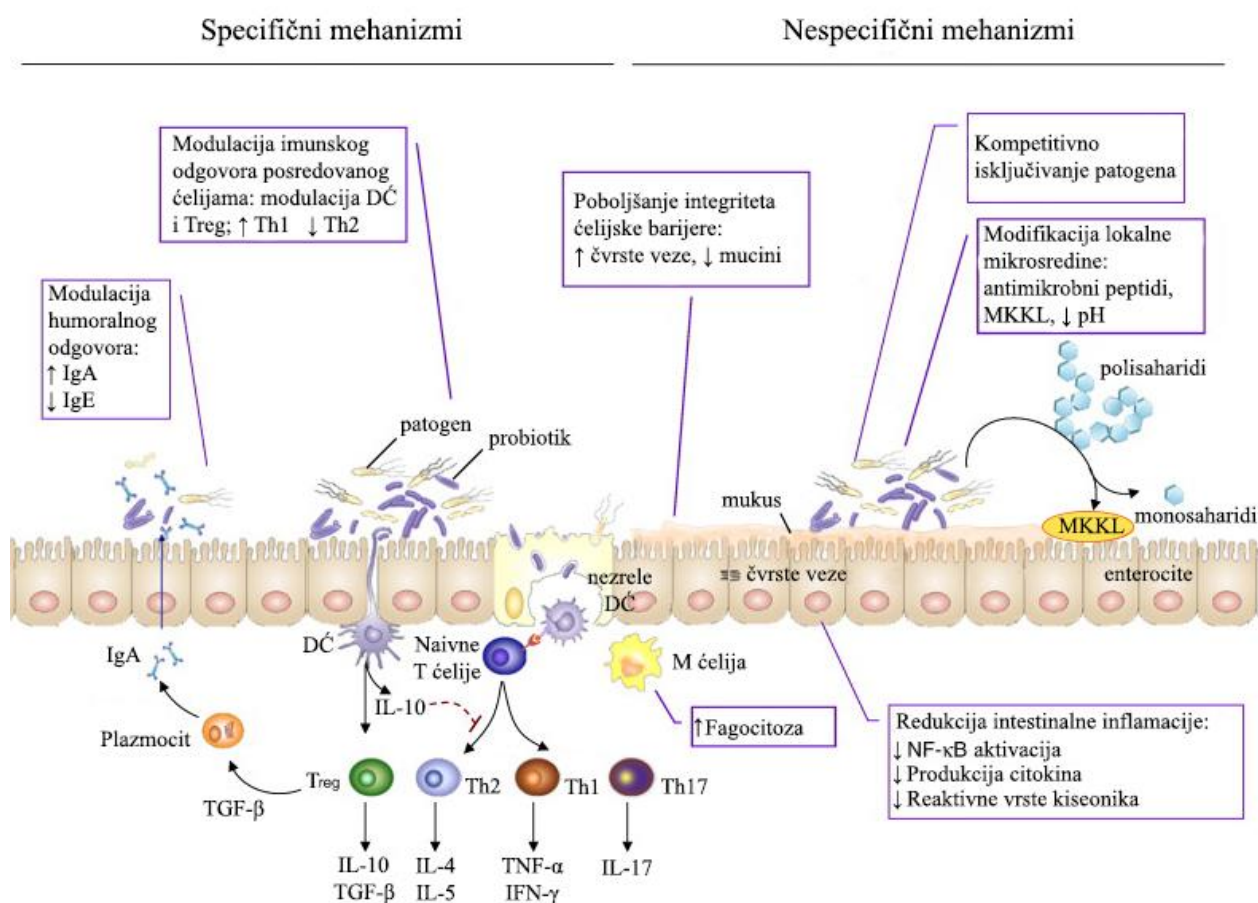
Dimerizacija TLR i visokokonzerviranog domena "toll-interleukin-1" receptora (engl. toll-interleukin-1 (IL-1) receptor, TIR) dovodi do regrutovanja adapterskog molekula MyD88, TIR domena koji sadrži adapterski protein i TIR domena koji sadrži adapter indukovani interferonom β (engl. TIR domain-containing adapter inducing interferon (IFN)- β , TRIF) i aktiviranja signalnog puta. TLR signalni put, izuzev TLR3, regrutuje MyD88 koji aktivira mitogenom aktivirane proteinske kinaze (MAPK) i nuklearni faktor (NF)- κ B signalni put. Aktivacija TLR3 dovodi do regrutacije adapterskog proteina TRIF, što dovodi do

ekspresije IFN tipa 1 (Kawai i Akira, 2010; Lebeer i sar. 2010). Pokazano je da aktivacija TLR utiče na ekspresiju kostimulatornih molekula CD80, CD83, CD86 (engl. cluster of differentiation, CD) neophodnih za aktivaciju antigen specifičnih limfocita i hemokinskog receptora CCR7 (C-C motif receptor, CCR) neophodnog za migraciju DĆ, što sve dovodi do regulacije aktivacije imunskog odgovora. Komensalne i probiotičke bakterije mogu koaktivacijom različitih receptora na nezrelim DĆ da indukuju razvoj tolerogenih DĆ. Signalizacija preko TLR9 je od suštinskog značaja za posredovanje anti-inflamacijskog efekta probiotika, međutim pokazano je da su i drugi TLR uključeni u ovaj efekat. Posle aktivacije komensalnim i probiotičkim bakterijama, DĆ migriraju u lokalne limfne čvorove gde mogu dovesti do supresije imunskog odgovora.

Tabela 1. Najznačajniji ligandi, njihovo poreklo i TLR koji ih prepoznaje.

Receptor	Ligand (MAMP)	Poreklo
TLR1	Triacil lipopeptid Solubilni faktori	Bakterije i mikobakterije <i>Neisseria meningitidis</i>
TLR2	Lipoproteini/lipopeptidi Peptidoglikani Lipoteihoična kiselina Lipoarabinoman Fenol-solubilni modulin Glikoinozitolfosfolipidi Glikolipidi Porini Atipični lipopolisaharidi Atipični lipopolisaharidi Zimozan Protein toplotnog šoka 70	Različiti patogeni Gram-pozitivne bakterije Gram-pozitivne bakterije Mikobakterije <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Trypanosoma cruzi</i> <i>Treponema maltophilum</i> <i>Neisseria</i> spp. <i>Leptospira interrogans</i> <i>Porphyromonas gingivalis</i> Gljive Domaćin
TLR3	Dvolančana RNK	Virusi
TLR4	Lipopolisaharid Taksol Fuzioni proteini Proteini omotača Protein toplotnog šoka 60 Protein toplotnog šoka 70 Tip III ponovak ekstradomen A fibronektina Oligosaharidi hijaluronske kiseline Polisaharidni fragmenti heparan sulfata Fibrinogen	Gram-negativne bakterije Biljke Respiratorni virusi Mouse mammary-tumour virus <i>Chlamydia pneumoniae</i> Domaćin Domaćin Domaćin Domaćin
TLR5	Flagelin	Bakterija
TLR6	Diacil lipopeptid Lipoteihoična kiselina Zimozan	<i>Mycoplasma</i> Gram-pozitivne bakterije Gljive
TLR7	Imidazoquinoline Loksoribin Bropirimin Jednolančana RNK	Sintetičko jedinjenje Sintetičko jedinjenje Sintetičko jedinjenje Virusi
TLR8	Imidazoquinoline Jednolančana DNK	Sintetičko jedinjenje Virusi
TLR9	CpG-ponovci DNK	Bakterije i virusi
TLR10	Nepoznat	Nepoznato
TLR11	Nepoznat	Patogeni urogenitalnog trakta

U limfnim čvorovima mogu da iniciraju diferencijaciju naivnih antigen-specifičnih T limfocita u T_{reg} ćelije, (engl. T helper, Th) što dovodi do inhibicije razvoja pro-inflamacijskih Th₁, Th₂ i Th₁₇ ćelija (Bermudez-Brito i sar. 2012). Pokazano je da probiotici mogu da suprimiraju intestinalnu inflamaciju preko smanjenja ekspresije TLR, sekretovanja metabolita koji inhibiraju produkciju TNF- α od strane infiltriranih mononukleara i inhibicije NF- κ B signalnog puta u enterocitima (Lebeer i sar. 2010). Komponente ćelijskog zida enterokoka mogu interagovati sa TLR2 u kombinaciji sa TLR6, promovisati dimerizaciju i aktivaciju NF- κ B signalnog puta preko MyD88 (Wells, 2011). Stimulacija TLR2 povećava produkciju citokina i ima bitnu ulogu u pojačavanju transepitelne otpornosti na invaziju bakterija (Pinto i sar. 2009). TLR4 ima značajnu ulogu u odbrani domaćina protiv infekcije izazvane bakterijama iz roda *Salmonella* i *Listeria*. Aktivacija TLR4 dovodi do indukcije pro-inflamacijskih medijatora, povećanja ekspresije TLR2 što dovodi do regrutovanja inflamacijskih ćelija i iniciranja odgovarajućih odgovora u slezini. Kolektivno, ovi događaji omogućavaju kontrolu bakterijskog umnožavanja (Töttemeyer i sar. 2003).



Slika 6: Mehanizmi delovanja probiotika. Slika preuzeta iz Iacono i sar. 2011. i modifikovana.

1.4.4.1. Prepoznavanje enterokoka preko TLR domaćina

Pokazano je da konačni odgovor domaćina na enterokoke zavisi od kombinacije različitih molekula koji ulaze u sastav ćelijskog zida, kao što su peptidoglikan (PG), proteini, polisaharidi, lipidi, lipoproteini i glikopolimeri. Peptidoglikan enterokoka je najveća komponenta ćelijskog zida sastavljena od umreženih biopolimera koji formiraju zaštitnu barijeru protiv vanćelijskog okruženja i funkcioniše kao nosač proteina i drugih polimera neophodnih za rast i deljenje ćelije, patogenezu i otpornost na antibiotike (Hendrickx i sar. 2013). Ćelije domaćina prepoznaju peptidoglikane preko TLR2 i ovo najčešće vodi aktivaciji imunskog odgovora protiv bakterija koje ispoljavaju ovaj molekul. Međutim, novija istraživanja o imunomodulatornom efektu različitih sojeva laktobacila pokazala su da peptidoglikani različitih sojeva mogu imati različit imunomodulatorni efekat (Kolling i sar. 2018). S obzirom da je pokazano da građa peptidoglikana kod enterokoka zavisi od uslova sredine kojima je bakterija izložena (Chang i sar. 2018), enterokoke izolovane iz različitih izvora mogu proizvoditi peptidoglikane različite građe što može biti povezano i sa različitim imunomodulatornim efektom različitih sojeva. U skladu sa ovim da bi se što ispravnije pretpostavio uticaj na imunski sistem domaćina neophodno je ispitati imunomodulatorni efekat svakog soja ponaosob.

Među glikopolimerima najzastupljenije su teihoična kiselina vezana za ćelijski zid (engl. wall teichoic acid, WTA) i lipoteihoična kiselina (engl. lipoteichoic acid, LTA). LTA je važan faktor virulencije *En. faecalis* jer može stimulisati leukocite da oslobode određene medijatore povezane sa inflamacijskim odgovorom i igra kritičnu ulogu u formiranju biofilma (Fabretti i sar. 2006). Osnovna struktura LTA se sastoji od glikolipidnog dela i 1,3-poliglicerolfosfata supstituisanog na položaju C-2 sa D-alaninom i ostacima koji sadrže kojibioze (Theilacke i sar. 2006). *Dlt* operon se sastoji od 4 gena: *dltA*, *dltB*, *dltC* i *dltD*, i odgovorni su za sintezu D-alanina (Wang i sar. 2015). Inaktivacija *dlt* gena rezultira odsustvom D-alanil ostataka LTA i smanjenje virulentnosti *En. faecalis*. Alanil-estri sa D-konfiguriranim glicerofosfatom utiču na delovanje antibiotika, patogenezu, adheziju, formiranje biofilma i virulenciju Gram-pozitivnih bakterija (Fabretti i sar. 2006). Bakterijska LTA specifično interaguje sa TLR2. Interakcija LTA sa TLR2-zavisnim putevima može aktivirati unutarćelijske glasnike, kao što je MyD88 i MAPK, uključujući NF- κ B, važan transkripcioni faktor koji promovise brzo oslobađanje citokina i stimuliše ekspresiju inflamacijskih citokina (Park i sar. 2013). Međutim, neki radovi povezuju ovakav pro-

inflamacijski efekat WTA i LTA sa efektom kontaminirajućih lipoproteina (Hashimoto i sar. 2006; Hashimoto i sar. 2007). Dodatno je pokazano da različite vrste laktobacila indukuju različit balans u produkciji pro-inflamacijskog IL-12 i anti-inflamacijskog IL-10 kod makrofaga, i da je stimulacija produkcije IL-10 preko TLR-2 i ERK posredovana sa WTA i LTA što ukazuje na anti-inflamacijski efekat ovih kiselina (Kaji i sar. 2010). Iako je građa WTA kod *En. faecalis* već dugo poznata, tek je 2011. molekularnim metodama pokazano da *En. faecium* ispoljava WTA različite strukture od WTA koju produkuje *En. faecalis* (Bychowska i sar. 2011). Kako struktura WTA može biti značajno izmenjena pod uticajem različitih uslova životne sredine u kojima određeni soj enterokoka živi (Hendrickx i sar. 2013) to bi moglo da dovede i do izmenjenog efekta ovog molekula na ćelije domaćina, zbog čega je važno ispitati efekat svakog soja ponaosob na ćelije domaćina.

1.5. *Listeria monocytogenes* kao model ispitivanja infekcije

L. monocytogenes je Gram-pozitivna, štapićasta, fakultativno anaerobna bakterija koja može da raste na niskim temperaturama i otporna je na visoke koncentracije soli (Gandhi i Chikindas, 2007). Prepoznata je kao humani patogen 1970ih, a kao patogen koji se prenosi hranom 1980ih godina. Prema podacima iz 2010. godine, godišnji broj infekcija na svetskom nivou je 23 150, dok je smrtnost inficiranih osoba veoma visoka, čak 30% (de Noordhout i sar. 2014). Nakon ingestije zagađene hrane (do 10^9 bakterija) kod većine osoba razvija se gastroenteritis sa različitim intenzitetom simptoma. Nasuprot tome, kod dece, starijih osoba, imunokompromitovanih osoba i trudnica čak i nizak nivo kontaminacije hrane ($10^2 - 10^4$ bakterija) može da dovede do bakterijske sepse, meningitisa ili infekcija fetusa i komplikacije trudnoće (McLauchlin, 1990). Zahvaljujući svojoj prilagodljivosti na različite uslove životne sredine, sposobnosti da prođe različite barijere u domaćinu i jedinstvenom unutarćelijskom načinu života, *L. monocytogenes* se koristi kao model u izučavanju interakcije domaćin-patogen, a u poslednje vreme i kao model u izučavanju interakcije sa mikrobiotom creva (Radoshevich i Cossart, 2018). Nakon ingestije kontaminirane hrane od strane domaćina, *L. monocytogenes* interaguje sa crevnim epitelom, prolazi intestinalnu epitelnu barijeru i prelazi u lamina propria-u, a zatim se putem krvi i limfe distribuira do jetre i slezine (Cossart, 2011). Nakon ulaska u nefagocitne ćelije kao što su epitelne ćelije, ili nakon fagocitoze, *L. monocytogenes* biva internalizovana u vakuolu (Pizarro-Cerdá i sar. 2012), što dovodi do polimerizacije aktina i do citoskelenog rearanžmana. U većini slučajeva, *L. monocytogenes*

izlazi iz vakuole pomoću aktivnosti potentnih faktora virulencije. *L. monocytogenes* može da preživi, da se deli u citoplazmi ćelije domaćina, da menja ćelijske procese domaćina i da prelazi iz jedne u drugu ćeliju i to procesom koji se zasniva na vezivanju bakterija za aktin (Lambrechts i sar. 2008). Ulazak *L. monocytogenes* u fagocitne i nefagocitne ćelije je uslovljen površinskim proteinima internalin A (InlA) i InlB koji interaguju sa eukariotskim receptorima na ćelijskoj membrani E-kaderin i Met, i receptorom faktora rasta hepatocita (engl. hepatocyte growth factor, HGF) čime se indukuje endocitoza posredovana receptorima (Cossart i Helenius, 2014). Kada bakterija uđe unutar vakuole, koristi listeriolizin O (LLO) i dve fosfolipaze PlcA i PlcB za narušavanje membrane vakuole i bekstvo u ćelijsku citoplazmu (Rabinovich i sar. 2012). U citoplazmi *L. monocytogenes* eksprimira protein uključen u izgradnju aktina (ActA) koji interaguje sa kompleksom ARP2/3 i posreduje u polimerizaciji aktina čime se širi iz jedne u drugu ćeliju specifičnim izgledom komete (Boujemaa-Paterski i sar. 2001). Pored fagocitoze, PAMP koje eksprimira *L. monocytogenes* na svojoj površini interaguju sa TLR kako na površini ćelije tako i u fagozomima što dovodi do aktivacije NF- κ B. Bakterijska liza u citoplazmi aktivira inflamazom kao i sintazu cikličnog GMP-AMP koja produkuje ciklične dinukleotide. Ovi molekuli aktiviraju protein koji stimuliše ekspresiju gena za interferon. Dodatno, tokom infekcije, TLR1, TLR2 i NOD1 su aktivirani i sinergistički stimulišu NF- κ B signalizaciju i otpočinju antibakterijski efekat (Radoshevich i Cossart, 2018).

1.6. Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis kao model ispitivanja autoimunskih bolesti

Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis (EAE) je najčešće korišćen životinjski model multiple skleroze (MS). MS je hronično, autoimunsko, inflamacijsko oboljenje centralnog nervnog sistema (CNS) koje dovodi do degradacije mijelina i aksona u različitim stepenima i izaziva ozbiljne motorne i senzorne neurološke disfunkcije (Kearney i sar. 2015). Učestalost ove bolesti u svetu je u značajnom porastu i regionalno znatno varira pri čemu je najviša u Severnoj Americi (140 na 100000) i Evropi (108 na 100000), a najniža u Podсахarskoj Africi (2,1 na 100000) i Istočnoj Aziji (2,2 na 100000) (Goldenberg, 2012). Kliničke manifestacije bolesti su posledica lezija unutar CNS-a koje nastaju usled infiltracije imunskih ćelija, prevashodno CD4⁺ T limfocita koji specifično prepoznaju neki od antigena

CNS-a, čime u CNS-u pokreću inflamaciju, demijelinizaciju i degradaciju aksona što dovodi do prekida u prenosu nervnih signala i manifestacije bolesti (Kearney i sar. 2015). Uzrok MS može da bude multifaktorski, odnosno i genetski i faktori životne sredine doprinose riziku od nastanka bolesti. Za potrebe istraživanja EAE se može indukovati primenom materijala dobijenog iz kičmene moždine u vidu ukupnog homogenata tkiva CNS ili specifičnim antigenima CNS (bazni protein mijelina, MBP, mijelin oligodendrocitni glikoprotein, MOG, proteolipidni protein, PLP, kao i peptidima ovih proteina emulgovanim u odgovarajućem adjuvansu) u kombinaciji sa Frojndovim adjuvansom, nespecifičnim imunostimulatorom, ili pasivno uz pomoć $CD4^+$ T ćelija dobijenih iz limfnih organa životinja kod kojih je prethodno uspostavljen aktivan EAE (Kohm i sar. 2004). Kliničku manifestaciju EAE karakterišu pareza ili paraliza, koja se širi od repa, preko zadnjih i prednjih udova, dovodeći u teškim slučajevima, do smrti eksperimentalne životinje (Simmons i sar. 2013). Nakon imunizacije životinja smešom antigena ili pojedninačnim antigenima dolazi do aktiviranja lokalnih antigen-prezentujućih ćelija, DĆ i makrofaga, koje preuzimaju antigen i prezentuju ga naivnim $CD4^+$ T limfocitima u drenirajućim limfnim čvorovima (DLČ). Prepoznavanje antigena od strane antigen-specifičnih naivnih T limfocita kao i stimulacija ovih ćelija preko ko-stimulatornih molekula ispoljenih na površini DĆ i citokinima koje ove ćelije proizvode dovodi do diferencijacije i klonске ekspanzije Th1 i Th17 ćelija (Kapadia i Sakic, 2011). Th1 i Th17 ćelije nakon napuštanja DLČ, ulaze u cirkulaciju i dospevaju do CNS-a gde se dodatno aktiviraju dejstvom lokalnih antigen-prezentujućih ćelija, što dalje dovodi do regrutovanja imunskih ćelija na mesto inicijalne infiltracije i širenja inflamacije u CNS-u (McMahon i sar. 2005).

2. CILJEVI RADA

Enterokoke su bakterije koje ulaze u sastav startera i/ili probiotika. Probiotički sojevi enterokoka su nepatogene bakterije koje imaju pozitivan uticaj na zdravlje domaćina i uključeni su u mehanizame intestinalne odbrane, deluju kao antagonisti protiv patogena, poboljšavaju epitelnu barijeru creva i aktiviraju urođeni i stečeni imunitet. Enterokoke predstavljaju značajan izvor jedinjenja koja mogu imati koristan efekat na domaćina i mogu biti iskorišćene u prevenciji i tretmanu različitih bolesti kod ljudi i životinja. Međutim, poslednjih godina sve je veći broj sojeva sa patogenim potencijalom zbog čega je neophodno ispitati svaki soj ponaosob i učestalost pojedinih molekula u potencijalu ovih bakterija za patogenezu.

Imajući u vidu kontroverzni status bakterija iz roda *Enterococcus* glavni ciljevi su bili sledeći:

1. Ispitati bezbednosni status enterokoka izolovanih iz fermentisanih mlečnih proizvoda sa područja Zapadnog Balkana:

- hemolitičku i želatinaznu aktivnost,
- osetljivost na antibiotike,
- prisustvo faktora virulencije i
- formiranje biofilma.

2. Ispitati probiotička svojstva odabranih sojeva enterokoka u modelima *in vitro*:

- preživljavanje simuliranih uslova gastrointestinalnog trakta,
- vezivanje za mucin, kolagen i fibronektin,
- vezivanje za HT29-MTX ćelijsku liniju,
- antimikrobni potencijal,
- efekat na intestinalne ćelije i
- efekat na modelu infekcije.

3. Ispitati imunomodulatorni potencijala odabranog soja u modelima *in vitro* i *in vivo*:

- metaboličku aktivnost ćelija iz mezenteričnih limfnih čvorova *in vitro*
- produkciju citokina *in vitro*
- efekat na inflamacijske bolesti *in vivo*

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Bakterijski sojevi

Prirodni sojevi enterokoka korišćeni u ovom radu prikazani su u Tabeli 2. Indikatorski sojevi prikazani su u Tabeli 3.

Tabela 2. Spisak korišćenih sojeva enterokoka

Vrsta/Soj	Region	Poreklo	Referenca
<i>En. durans</i> BGG01-43	Srbija, Golija	Sir	Terzić-Vidojević i sar. (2014)
<i>En. durans</i> BGG01-44	Srbija, Golija	Sir	
<i>En. durans</i> BGG01-48	Srbija, Golija	Sir	
<i>En. durans</i> BGG01-11	Srbija, Golija	Sir	
<i>En. durans</i> BGG02-47	Srbija, Golija	Sir	
<i>En. durans</i> BGG02-48	Srbija, Golija	Sir	
<i>En. durans</i> BGG05-35	Srbija, Golija	Sir	Golić i sar. (2013)
<i>En. durans</i> BGG05-13	Srbija, Golija	Sir	
<i>En. durans</i> BGG06-32	Srbija, Golija	Sir	Terzić-Vidojević i sar. (2014)
<i>En. durans</i> BGG06-15	Srbija, Golija	Sir	
<i>En. faecium</i> BGG07-19	Srbija, Golija	Sir	Golić i sar. (2013)
<i>En. durans</i> BGG08-25	Srbija, Golija	Sir	Terzić-Vidojević i sar. (2014)
<i>En. durans</i> BGG08-26	Srbija, Golija	Sir	
<i>En. durans</i> BGG08-30	Srbija, Golija	Sir	
<i>En. faecium</i> BGG09-28	Srbija, Golija	Sir	
<i>En. durans</i> BGG09-30	Srbija, Golija	Sir	
<i>En. faecium</i> BGG011-27	Srbija, Golija	Sir	
<i>En. faecium</i> BGG011-29	Srbija, Golija	Sir	
<i>En. durans</i> BGG011-38	Srbija, Golija	Sir	
<i>En. durans</i> BGG011-41	Srbija, Golija	Sir	
<i>En. durans</i> BGV2a-50	Srbija, Vlasina	Sir	Terzić-Vidojević i sar. (2013)
<i>En. durans</i> BGV2a-53	Srbija, Vlasina	Sir	
<i>En. durans</i> BGV2a-54	Srbija, Vlasina	Sir	
<i>En. durans</i> BGV2a-55	Srbija, Vlasina	Sir	
<i>En. durans</i> BGPT2-84	Srbija, Stara Planina	Sir	Begović i sar. (2011)
<i>En. durans</i> BGPT3-30	Srbija, Stara Planina	Sir	
<i>En. faecium</i> BGPT5-1P	Srbija, Stara Planina	Sir	
<i>En. durans</i> BGAL3-13	Srbija, Aleksinac	Sir	Golić i sar. (2013)
<i>En. durans</i> BGAL3-16	Srbija, Aleksinac	Sir	
<i>En. durans</i> BGAL3-19	Srbija, Aleksinac	Sir	
<i>En. durans</i> BGAL3-23	Srbija, Aleksinac	Sir	
<i>En. durans</i> BGBU1-40	Srbija, Beljanica	Sir	
<i>En. durans</i> BGBU1-46	Srbija, Beljanica	Sir	
<i>En. durans</i> BGRE2-40	Srbija, Beljanica	Sir	
<i>En. hirae</i> BGRE2-48	Srbija, Beljanica	Sir	
<i>En. faecium</i> BGZLM1-5	Srbija, Zlatar	Mleko	
<i>En. durans</i> BGZLS30-21	Srbija, Zlatar	Sir	
<i>En. faecium</i> BGZLS30-22	Srbija, Zlatar	Sir	
<i>En. faecalis</i> BGZLS45-5	Srbija, Zlatar	Sir	
<i>En. faecalis</i> BGZLS45-13	Srbija, Zlatar	Sir	
<i>En. faecalis</i> BGZLS45-20	Srbija, Zlatar	Sir	

<i>En. durans</i> BGTRS1-10	BiH ^a , Vlačić	Sir	
<i>En. durans</i> BGTRS1-20	BiH, Vlačić	Sir	
<i>En. durans</i> BGTRS1-29	BiH, Vlačić	Sir	
<i>En. durans</i> BGTRS1-49	BiH, Vlačić	Sir	
<i>En. durans</i> BGTRS7-67	BiH, Vlačić	Sir	
<i>En. durans</i> BGTRS7-54	BiH, Vlačić	Sir	
<i>En. durans</i> BGTRS10-45	BiH, Vlačić	Sir	
<i>En. durans</i> BGTRM1-42	BiH, Vlačić	Mileram	
<i>En. durans</i> BGTRM1-52	BiH, Vlačić	Mileram	Terzić-Vidojević i sar. (2014)
<i>En. durans</i> BGTRM7-33	BiH, Vlačić	Mileram	
<i>En. durans</i> BGTRM7-39	BiH, Vlačić	Mileram	
<i>En. durans</i> BGTRM7-40	BiH, Vlačić	Mileram	
<i>En. durans</i> BGTRM7-43	BiH, Vlačić	Mileram	
<i>En. durans</i> BGTRM7-47	BiH, Vlačić	Mileram	
<i>En. faecalis</i> BGTRM10-21	BiH, Vlačić	Mileram	
<i>En. italicus</i> BGTRK1-35	BiH, Vlačić	Kajmak	
<i>En. italicus</i> BGTRK4-35	BiH, Vlačić	Kajmak	
<i>En. italicus</i> BGTRK4-42	BiH, Vlačić	Kajmak	
<i>En. durans</i> BGTRK10-29	BiH, Vlačić	Kajmak	
<hr/>			
<i>En. faecium</i> BGPAS1-2	BiH, Pale	Sir	
<i>En. faecium</i> BGPAS1-3	BiH, Pale	Sir	
<i>En. faecium</i> BGPAS1-4	BiH, Pale	Sir	
<i>En. faecium</i> BGPAS1-10	BiH, Pale	Sir	Terzić-Vidojević i sar. (2015)
<i>En. faecium</i> BGPAS1-20	BiH, Pale	Sir	
<i>En. faecium</i> BGPAS1-48	BiH, Pale	Sir	
<i>En. faecium</i> BGPAS1-58	BiH, Pale	Sir	
<i>En. faecium</i> BGPAS1-71	BiH, Pale	Sir	
<hr/>			
<i>En. durans</i> ZGPR1-18	Hrvatska, Prigorje	Sir	
<i>En. durans</i> ZGPR2-1	Hrvatska, Prigorje	Sir	
<i>En. durans</i> ZGPR2-8	Hrvatska, Prigorje	Sir	
<i>En. faecalis</i> ZGPR2-9	Hrvatska, Prigorje	Sir	
<i>En. faecalis</i> ZGPR2-13	Hrvatska, Prigorje	Sir	Golić i sar. (2013)
<i>En. durans</i> ZGPR2-20	Hrvatska, Prigorje	Sir	
<i>En. durans</i> ZGBP4-19	Hrvatska, Bilogorsko- Podravski region	Sir	

Napomena: ^a - Bosna i Hercegovina.

Tabela 3. Spisak korišćenih indikatorskih sojeva

Indikator sojevi	Referenca
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	ATCC ^a kolekcija
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC19111	ATCC kolekcija
<i>Bacillus cereus</i> ATCC11778	ATCC kolekcija
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	ATCC kolekcija
<i>Salmonella</i> Enteritidis 654/7E	Veterinarski zavod, Novi Sad
<i>Enterococcus faecalis</i> BG221	Laboratorijska kolekcija
<i>Streptococcus thermophilus</i> BGKMJ1-36	Laboratorijska kolekcija
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> BGVLJ1-21	Laboratorijska kolekcija
<i>Streptococcus agalactiae</i> B165	Labodijagnostika, Beograd
<i>Streptococcus pyogenes</i> A2941	Labodijagnostika, Beograd
<i>Streptococcus pneumoniae</i> P173	Labodijagnostika, Beograd
<i>Enterococcus faecalis</i> V583	Paulsen i sar. 2003
<i>Chromobacterium violaceum</i> CV026	McClellan i sar. 1997
<i>Bacillus subtilis</i> 168	Berić i sar. 2012
<i>Erwinia carotovora</i>	Berić i sar. 2012
<i>Enterococcus faecium</i> DDE3	Veljović i sar. 2015
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MN1-596	Gajić i sar. 1999
<i>Streptococcus mutans</i> BGSF1	Strahinić i sar. 2007
<i>Enterococcus faecalis</i> BGPM3	Fira i sar. 2000
<i>Achromobacter xylosoxidans</i> MS4	Filipić i sar. 2017
<i>Acinetobacter baumannii</i> 6077/12	Novović i sar. 2015
<i>Klebsiella pneumoniae</i> Ni9	Novović i sar. 2015
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MMA83	Jovčić i sar. 2011

Napomena: ^a - ATCC - American Type Culture Collection

3.2. Medijumi za kultivaciju bakterija

Za gajenje enterokoka, streptokoka, laktokoka, *Bacillus cereus* i *Bacillus subtilis* korišćen je GM17 medijum: M17 medijum (Merck, GmbH, Darmštadt, Nemačka) uz dodatak glukoze (5 g/l).

Za rast bakterija *E. coli*, *Salmonella* Enteritidis, *Achromobacter xylosoxidans*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Chromobacterium violaceum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Erwinia carotovora* i *Staphylococcus aureus* je korišćen Luria-Bertani (LB) medijum.

Za rast *Listeria monocytogenes* je korišćen Brain heart infusion (BHI) (Merck, GmbH Darmštadt, Nemačka).

Čvrste podloge za rast bakterija pripremane su dodavanjem agara (17g/l) (Torlak, Beograd, Srbija) u GM17, MRS, LB i BHI tečni medijum, pre sterilizacije u autoklavu u trajanju od 20 min na 121°C.

Sojevi enterokoka, *Staphylococcus aureus* i *Listeria monocytogenes*, su inkubirani na 37°C bez aeracije, dok su bakterije *E. coli*, *Salmonella* Enteritidis, *Achromobacter xylosoxidans*, *Acinetobacter baumannii* i *Klebsiella pneumoniae* kultivisane na 37°C uz

aeraciju (180 rpm). Sojevi laktobacila, laktokoka i streptokoka su inkubirani na 37°C u 5% CO₂ inkubatoru. Sojevi *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* i *Chromobacterium violaceum* su inkubirani na 30°C bez aeracije, dok su *Pseudomonas aeruginosa* i *Erwinia carotovora* kultivisane na 30°C uz aeraciju (180 rpm).

3.3. Priprema bakterijskih ekstrakata

Bakterijski ekstrakti *En. faecium* BGPAS1-3 pripremljeni su obaranjem prekonoćne kulture (5000 rpm, 10 min, Eppendorf Centrifuge 5804 R), skupljanjem supernatanta i filtriranjem kroz sterilan filter 0,22 µm (Sarstedt, Nimbrecht, Nemačka), dok su ćelije oprane u fosfatnom puferu (PBS) koji je sadržao natrijum hlorid (8 g/l), kalijum hlorid (2 g/l), kalijum fosfat (14,4 g/l) i dinatrijum fosfat dihidrat (2,4 g/l). Nakon pranja, bakterijske ćelije su resuspendovane u PBS i skuvane u vodenom kupatilu (Köttermann, Ice, Nemačka) na 100°C u trajanju od 30 minuta. Nakon kuvanja, ćelije su stavljene na led i čuvane na -20°C, dok su supernatanti odmah korišćeni.

U cilju ispitivanja imunomodulatornog potencijala *En. faecium* BGPAS1-3 u modelima *in vitro*, korišćene su temperaturom ubijene ćelije sa kojih je uklonjena teihoična kiselina vezana za ćelijski zid po metodi koju su uspostavili Kühner i saradnici (2014) sa manjim modifikacijama. Temperaturom ubijene ćelije resuspendovane su u rastvoru 1 M natrijum hlorida i grejane na 100°C tokom 20 minuta, oprane i resuspendovane u bidestilovanoj vodi. Nakon sonifikacije u trajanju od 30 minuta, suspenzija je tretirana sa 15 mg/ml DNaze i 60 mg/ml RNaze u 0,1 M TRIS-HCl i inkubirana 60 minuta na 37°C. Zatim je dodat rastvor 50 mg/ml tripsina u bidestilovanoj vodi i inkubirano dodatnih 60 minuta na 37°C. Enzim je inaktiviran zagrevanjem suspenzije na 100°C tokom 3 minuta. Nakon ispiranja suspenzije, teihoična kiselina vezana za ćelijski zid je oslobođena dodavanjem 1 M HCl i inkubiranjem na 37°C tokom 4 sata uz mešanje. Nakon toga, dobijeni pelet je opran u bidestilovanoj vodi, a supernatant uparen do suvog i resuspendovan u Na-fosfatnom puferu, pH 7.

3.4. Izolacija ukupne DNK iz enterokoka

Ukupna DNK iz enterokoka je izolovana po modifikovanoj metodi koju su uspostavili Hopwood i sar. (1985). Bakterijske kulture enterokoka rasle su u GM17 na 37°C do logaritamske faze rasta ($A_{600nm}=0,6-0,8$). Talog dobijen centrifugiranjem na 13000 rpm tokom 10 minuta je opran u 500 μ l TEN pufera (50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8, 50 mM natrijum hlorida) i resuspendovan u 500 μ l PP pufera (0,5 M saharoza, 40 mM amonijum acetat, 10 mM magnezijum acetat, pH 7) sa lizozimom (7 mg/ml). Liziranje ćelija je rađeno inkubiranjem na 37°C tokom 30 min, nakon čega je dodavano 250 μ l 2% SDS-a. Suspenzija je intenzivno vorteksovana do smanjenja viskoziteta, u trajanju od jednog minuta. Zatim su odstranjivani proteini više puta ponovljenom fenolnom ekstrakcijom, dodavanjem 250 μ l neutralnog fenol hloroforma, i intenzivnim mešanjem u trajanju od 30 sec i centrifugiranjem 13000 rpm tokom 20 min. Supernatant je odvojen u nove mikrotube u koje je dodavana 1/10 volumena 3M natrijum acetata (pH 4,8) i 1 volumen 2-propanola, a zatim je smeša lagano mešana i inkubirana 5 min na sobnoj temperaturi. Ukupna DNK je taložena centrifugiranjem, a zatim je talog totalne DNK ispran hladnim 75% etanolom, centrifugiran na 13000 rpm tokom 2 min isušen na 42°C. Nakon sušenja, DNK je resuspendovana u 50 μ l bidestilovane vode. RNK iz uzorka je odstranjivana dodavanjem RNaze (10 mg/ml) i inkubacijom uzorka na 37°C u trajanju od 30 min. Izolovana DNK je čuvana na temperaturi od -20°C.

3.5. Izolacija plazmidne DNK iz *Escherichia coli* DH5a

Izolacija plazmidne DNK iz *E. coli* je rađena je po modifikovanoj metodi „JETSTAR Plasmid Kit-MINI“ (Genomed, GmbH, Austrija). Talog ćelija (3 ml) iz logaritamske kulture bakterija ($OD_{600}=0,6-0,8$) je opran u TEN puferu i resuspendovan u 200 μ l E1 rastvora (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA pH 8,0) sa RNazom finalne koncentracije 100 μ g/ml. Nakon resuspendovanja u E1 je rađena ćelijska liza dodavanjem 200 μ l rastvora E2 (200 mM NaOH, 1% SDS), uz lagano mešanje. Neutralizacija je rađena dodavanjem 200 μ l rastvora E3 (3 M K-acetat, pH 5,5) uz intenzivno mešanje. Smeša je zatim centrifugirana na 13000 rpm tokom 10 min, na sobnoj temperaturi. Dobijeni supernatant je prebacivan u nove mikrotube i dodavano je 200 μ l smeše fenol-hloroforma uz intenzivno mešanje u trajanju od 1 min. Posle

centrifugiranja na 13000 rpm tokom 2 min na sobnoj temperaturi gornja faza je prebacivana u nove mikrotube, a DNK iz rastvora je precipitirana dodavanjem jednog volumena 2-propanola i centrifugiranjem na 13000 rpm tokom 20 min na sobnoj temperaturi. Uzorak je zatim ispiran hladnim etanolom (75%, - 20°C) i centrifugiran na 13000 rpm tokom 2 min na sobnoj temperaturi, a talog je nakon odstranjivanja etanola sušen i resuspendovan u 30 µl bidestilovane vode. RNK je odstranjivana inkubacijom uzorka sa 1 µl RNaze (10 mg/ml) na 37°C u trajanju od 30 min. Uzorci plazmidne DNK su čuvani na -20°C do korišćenja.

3.6. Lančana reakcija polimeraze „PCR“

U cilju molekularne identifikacije ispitivanih enterokoka, kao i radi determinacije virulentnih karakteristika enterokoka, metodom PCR su umnožavani DNK fragmenti korišćenjem specifičnih prajmera (Tabela 4). Umnožavanje fragmenata ukupne DNK PCR metodom rađeno je tako što je pripremljena reakciona smeša finalne zapremine od 30 µl koja sadrži: 22.8 µl bidestilovane vode, 3 µl 1 x reakcioni pufer KAPA Taq Buffer A sa 1,5 mM magnezijum hloridom, 0,6 µl dNTP smeše (po 200 µM za svaki dNTP), 1 µl prajmera (svaki po 2,5 µM) i 0,2 µl 1U KAPA Taq DNA polimeraze (Kapa Biosystems, Inc., Boston, SAD) i 2 µl DNK.

PCR reakcije su rađene po sledećem programu: početna denaturacija na 94°C tokom 5 min, umnožavanje DNK fragmenata u 30 ciklusa: denaturacija na 94°C tokom 30 s, vezivanje prajmera 30 s na različitim temperaturama (Tabela 4); polimerizacija lanaca, na 72°C tokom 30 s i poslednji ciklus, polimerizacija na 72°C tokom 7 min. Dobijeni PCR produkti su nakon prečišćavanja, pri čemu je korišćen kit za prečišćavanje PCR produkata (QIAquick PCR Purification KIT/250 (QIAGEN GmbH, Hilden, Nemačka) sekvencirani u centru za sekvenciranje Macrogen, Amsterdam, Holandija. Dobijene sekvence su poređene korišćenjem NCBI baze podataka, BLAST programom za pretraživanje homologne nukleotidne sekvence (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Tabela 4. Spisak prajmera korišćenih u ovoj studiji za umnožavanje prokariotskih gena.

Geni	Sekvenca prajmera	bp ^a	T°C ^b	Referenca
<i>hylN</i>	5'-ACAGAAGAGCTGCAGGAAATG-3' 5'-GACTGACGTCCAAGTTTCCAA-3'	276	56	Vankerckhoven i sar. (2004)
<i>agg</i>	5'-AAGAAAAAGAAGTAGACCAAC-3' 5'-AAACGGCAAGACAAGTAAATA-3'	1553	54	Eaton i Gasson (2001)
<i>cylA</i>	5'-TGGATGATAGTGATAGGAAGT-3' 5'-TCTACAGTAAATCTTTCGTCA-3'	517	58	Eaton i Gasson (2001)
<i>esp</i>	5'-TTGCTAATGCTAGTCCCAGACC-3' 5'-GCGTCAACACTTGCATTGCCGAA-3'	933	58	Eaton i Gasson (2001)
<i>efaA^{fs}</i>	5'-GACAGACCCTCACGAATA-3' 5'-ATGTCATCATGTGTAGTA-3'	705	56	Eaton i Gasson (2001)
<i>efaA^{fm}</i>	5'-AACAGATCCGCATGAATA-3' 5'-CATTTTCATCATCTGATAGTA-3'	735	56	Eaton i Gasson (2001)
<i>fsrA</i>	5'-ATGAGTGAACAAATGGCTATTTA-3' 5'-CTAAGTAAGAAATAGTGCCTTGA-3'	740	43	Nakayama i sar. (2002)
<i>fsrB</i>	5'-GGGAGCTCTGGACAAAGTATTATCTAACCG-3' 5'-TTGGTACCCACACCATCACTGACTTTTGC-3'	566	43	Nakayama i sar. (2002)
<i>fsrC</i>	5'-ATGATTTTGTTCGTTATTAGCTACT-3' 5'-CATCGTTAACAACCTTTTTTACTG-3'	1343	43	Nakayama i sar. (2002)
<i>gelE</i>	5'-CGGAAGGCGTTACTGTTGAT-3' 5'-GAGCCATGGTTTCTGGTTGT-3'	957	46	Popović i sar. (2018)
<i>sprE</i>	5'-TTGAGCTCCGTTTCTGCGAAAGTCATTC-3' 5'-TTGGTACCGATTGGGGAACCAGATTGACC-3'	591	58	Nakayama i sar. (2002)
<i>I6S</i>	5'-GAGAGTTTGATCCTGGC 3'			Jovicic i sar.
<i>rRNK</i>	5'-AGGAGGTGATCCAGCCG-3'	1500	55	(2009)

Napomena: a- bazni parovi; b- temperatura vezivanja prajmera.

3.7. Horizontalna gel elektroforeza DNK

Horizontalna gel elektroforeza molekula DNK je rađena na horizontalnim agaroznim gelovima. Gelovi su napravljeni otapanjem 1% agaroze (Sigma, Štajnhajm, Nemačka) u 1 x TAE puferu (40 mM Tris acetat i 1 mM EDTA) uz dodavanje etidijum bromida (0,5 µg/ml). Elektroforeza je vršena pri konstantnom naponu od 1-10 V/cm gela na sobnoj temperaturi. Veličine DNK fragmenata određivana je na osnovu poređenja u pokretljivosti DNK fragmenata poznatih veličina (GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder) (Fermentas UAB, Vilnius, Litvanija) na istom agaroznom gelu.

3.8. Metode procene bezbednosnog statusa enterokoka

3.8.1. Test hemolitičke aktivnosti

Hemolitička aktivnost sojeva je rađena po metodi Valenzuela i sar. (2009). Sojevi enterokoka su kultivisani na Kolumbija krvnom agaru (Oxoid, Bejzinstouk, Velika

Britanija) koji je sadržao 5% defibrilisane konjske krvi 48 sati na 37°C. Pozitivnim reakcijama smatrale su se providne zone oko kolonija (liza eritrocita) koje su ukazivale na produkciju β -hemolizina, odnosno svetlo-zelena zona usled prelaska hemoglobina u methemoglobin zbog α -hemolize.

3.8.2. Test želatinazne aktivnosti

Sposobnost sojeva enterokoka da sintetišu želatinazu je rađena po metodi Lopes i sar. (2006). Uzorak prekončne kulture (10 μ l) je nanesen na čvrstu podlogu koja sadrži: pepton (5 g/l), kvašćev ekstrakt (3 g/l), želatin (Kemika, Zagreb, Hrvatska) (15 g/l) i agar (17 g/l), pH 7. Nakon inkubacije 48 sati na 37°C, šolje su prelivene zasićenim rastvorom amonijum sulfata (550 g/l). Sinteza želatinaze je detektovana formiranjem prozračnog prstena oko nanete kulture.

3.8.3. Test mikrodilucije

Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) antibiotika je rađeno pomoću testa mikrodilucije u GM17 medijumu. U komercijalno pripremljene bunariće na mikrotitar ploči (Sarstedt, Nimbrecht, Nemačka) u kojima se nalaze rastuće koncentracije antibiotika rastvorenih u 180 μ l GM17 medijuma je dodato 20 μ l odgovarajuće prekončne kulture.

Tabela 5. Osetljivost na antibiotike prema pravilima CLSI

Antibiotik	Prelomna koncentracija osetljivosti na antibiotik
Ampicilin	16 μ g/ml
Vankomicin	32 μ g/ml
Gentamicin	500 μ g/ml
Eritromicin	8 μ g/ml
Tetraciklin	16 μ g/ml
Hloramfenikol	32 μ g/ml
Linezolid	8 μ g/ml
Rifampicin	4 μ g/ml
Ciprofloksacin	4 μ g/ml
Levofloksacin	8 μ g/ml

Inokulisane mikrotitar ploče su inkubirane aerobno 24 sata na 37°C, a rezultati su tumačeni prema standardima koje propisuje Institut za kliničke i laboratorijske standarde CLSI

(Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015). Za MIK je uzeta najniža koncentracija antibiotika za koju se u bunariću ne detektuje rast bakterija. Minimalne inhibitorne koncentracije su date u Tabeli 5.

3.8.4. Test formiranja biofilma

Sposobnost sojeva da formiraju biofilm na abiotičkoj podlozi je testirana po modifikovanoj metodi Macovei i sar. (2009). U komercijalno pripremljenje bunariće na mikrotitar ploči (Sarstedt, Nimbrecht, Nemačka) je dodato 180 µl GM17 medijuma i 20 µl prekonoćne kulture enterokoka, odnosno 10^6 ćelija. Inokulisane mikrotitar ploče su inkubirane aerobno na 37°C tokom 24 sata. Nakon inkubacije, ploče su oprane tri puta PBS puferom i osušene 1 sat na 37°C. Nakon sušenja je dodato 200 µl 0,1% kristal ljubičaste boje (HIMedia, Mumbai, Indija). Bojenje je trajalo 1 sat na 37°C nakon čega je izvučena boja, ploča je osušena 1 sat na 37°C i tri puta oprana u PBS puferu. Nakon ispiranja kristal-ljubičasta boja je rastvorena u rastvoru etanol : aceton (80% : 20%) i merena je absorbanca na 595 nm korišćenjem spektrofotometra Plate Reader Infinite 200 pro (MTX Lab Systems, Beč, Austrija). Eksperimenti su rađeni u tri ponavljanja u tri nezavisna eksperimenta, a rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost tri nezavisna eksperimenta ($OD_{595nm} < 0,2$ = nemaju sposobnost formiranja biofilm, $0,2-0,7$ = slaba sposobnost formiranja biofilm, $0,71-1,4$ = jaka sposobnost formiranja biofilma, $> 1,4$ = veoma jaka sposobnost formiranja biofilma).

3.9. Metode procene probiotičkih karakteristika enterokoka

3.9.1. Test preživljavanja enterokoka u simuliranim uslovima gastrointestinalnog trakta

Preživljavanje sojeva enterokoka nakon prolaska kroz simulirane uslove gastrointestinalnog trakta (GIT) je testirano po prethodno opisanoj metodi Sánchez i sar. (2010). Prekonoćne kulture testiranih bakterija, gajenih u GM17 medijumu, su oborene na 2050 x g tokom 15 minuta, oprane tri puta u 0,85% natrijum hloridu i deset puta koncentrovane u 0,85% natrijum hloridu. Nakon toga, suspenzije bakterija su deset puta razblažene u želudačnom soku (Tabela 6) i inkubirane 90 minuta na 37°C uz mešanje na 200

rpm. Potom su suspenzije centrifugirane na 2050 x g tokom 15 minuta i ćelijski pelet je resuspendovan u dvanaestopalačnom soku (Tabela 6) i inkubirane dodatnih 10 minuta na 37°C u CO₂ inkubatoru (5% CO₂). Na kraju, oborene ćelije su resuspendovane u crevnom soku (Tabela 6) i inkubirane 120 minuta na 37°C u CO₂ inkubatoru. Određivanje broja preživelih bakterija je rađeno kako pre tretmana u simuliranim uslovima GIT-a (100 µl suspenzije) tako i nakon svake faze prolaska kroz simulirane uslove GIT-a. Serijska razblaženja su pravljena u rastvoru 0,85% natrijum hlorida i nanošeno je po 100 µl razblaženja -4, -5 i -6 na GM17 agar. Petri šolje su inkubirane 24 sata na 37°C i rezultat je predstavljen kao broj formiranih kolonija (engl. colony-forming unit, CFU) u mililitru CFU/ml. Izračunat je procenat preživljavanja nakon svake faze u odnosu na početni broj bakterija (% CFU/ml tretiranih bakterija / % CFU/ml početnog broja bakterija) x 100. Eksperimenti su rađeni u tri ponavljanja u tri nezavisna eksperimenta.

Tabela 6. Korišćeni rastvori u simuliranim uslovima preživljavanja gastrointestinalnog trakta.

Želudačni sok	Dvanaestopalačni sok	Crevni sok
125 mM natrijum hlorid, 7 mM kalijum hlorid, 45 mM natrijum bikarbonat, 0,3% pepsina (Sigma) puferisan sa HCl do pH 2	1% goveđe žuči (Sigma) puferisan sa 10 N natrijum hidroksidom do pH 8	0,3% goveđe žuči, 0,1% pankreasa u prahu ("Pancreas acetone powder porcine Type I", Sigma), pH 8

3.9.2. Test vezivanja enterokoka za imobilisani mucin, kolagen i fibronektin

Testovi vezivanja enterokoka za imobilisani mucin, kolagen i fibronektin rađeni su po modifikovanoj metodi koju su uspostavili Miljković i sar. (2015). Komercijalno pripremljeni bunarići na mikrotitar ploči (Sarstedt, Nimbrecht, Nemačka) su obloženi sa 200 µl svinjskog želudačnog mucina tipa II (Sigma, Štajnhajm, Nemačka) rastvorenog u 1% PBS u koncentraciji 1 mg/ml za ispitivanje vezivanja za mucin, sa 200 µl kolagena tipa I iz repa pacova (BD Bioscience, Nju Džerzi, SAD) rastvorenog u 0,1 M sirćetnoj kiselini u koncentraciji 100 µg/ml za ispitivanje vezivanja za kolagen i sa 200 µl fibronektina humanog porekla (Serva, Hajdelberg, Nemačka) rastvorenog u PBS u koncentraciji 100 µg/ml za ispitivanje vezivanja za fibronektin i inkubirani na 4°C preko noći (prosečno 20 sati inkubacije). Kao kontrola su korišćeni neobloženi bunarići (200 µl PBS). Iz svih bunarića je izvučen sadržaj, a zatim su oprani dva puta PBS puferom nakon čega je dodato 200 µl 2% goveđeg serum albumina (BSA) (Serva) rastvorenog u PBS puferu. Nakon inkubacije u

trajanju od 1 sata na 37°C uz lagano mešanje (100 rpm), bunarići su oprani PBS puferom i dodato je po 100 µl testiranih bakterijskih suspenzija (10^8 CFU/ml) prethodno opranih i resuspendovanih u PBS puferu. Nakon inkubacije u trajanju od 2 sata na 37°C, bunarići su oprani tri puta PBS puferom. Potom je u bunariće dodato po 100 µl 0,5 % Triton X-100 i ploče su inkubirane u trajanju od 10 min na 37°C. Zatim je uziman sadržaj bunarića, napravljena serija razblaženja u PBS i alikvoti iz -3, -4, 5, -6 razblaženja (10 µl) su u triplikatu naneti na GM17 čvrstu podlogu. Vezivanje za mucin, kolagen i fibronektin je prikazano kao procenat vezanih bakterija za mucin, kolagen i fibronektin u odnosu na broj bakterija sa kojim se ušlo u eksperiment.

3.9.3. Kultivacija HT29-MTX ćelijske linije

Vezivanje enterokoka je praćeno na ćelijskoj liniji poreklom iz kancera debelog creva HT29-MTX (ATCC HTB-38), dobijenoj od Dr T. Lesuffleur, Lesuffleur i sar. (1990). HT29-MTX ćelijska linija je gajena na 37°C u 5% CO₂ inkubatoru u DMEM medijumu (engl. Dulbecco's Modified Eagle's medium) u koji je dodat 10% goveđi fetalni serum (engl. Fetal Bovine Serum, FBS) (Sigma) i mešavina antibiotika (Sigma): 100 U/ml penicilin, 100 µg/ml streptomycin i 100 µg/ml gentamicina. Intestinalne ćelije su zasejane u ploče sa 24 bunara i korišćene su za eksperimente adhezije kada su dostigle konfluentnost (13 ± 1 dan) u stanju jednoslojnog epitela. Nakon što su dostigle konfluentnost (1×10^6), ćelije su isprane u PBS-u i bile su spremne za testiranje.

3.9.4. Test vezivanja enterokoka za HT29-MTX

Da bi se ispitala sposobnost vezivanja enterokoka za HT29-MTX ćelijsku liniju, nakon dostizanja konfluentnosti, ćelije su tretirane sojevima enterokoka u odnosu 1:10 (eukariotske ćelije : prokariotske ćelije) po metodi Živković i sar. (2016). Pre samog tretmana, 100 µl prekončne kulture enterokoka su oborene centrifugiranjem na 13000 rpm tokom 10 minuta na sobnoj temperaturi, ćelije su oprane 3 puta u PBS i resuspendovane u 500 µl DMEM medijuma bez antibiotika. Nakon tretmana u trajanju od 1 h na 37°C u 5% CO₂ inkubatoru, ćelije su 3 puta oprane sa PBS-om kako bi se uklonile ćelije koje se nisu

adherirale za površinu HT29-MTX ćelija, a zatim su HT29-MTX ćelije tretirane sa 500 ml rastvora Tripsin-EDTA (Torlak, Beograd, Srbija) kako bi se odvojile sa površine komercijalnih bunarića u kojima su rasle. Zatim je uzeto 100 μ l sadržaja bunarića, napravljena serija razblaženja u PBS i alikvoti iz -4, -5, -6 razblaženja (10 μ l) su u triplikatu naneti na GM17 čvrstu podlogu. Vezivanje za HT29-MTX je prikazano kao procenat vezanih bakterija za HT29-MTX u odnosu na broj bakterija sa kojim se ušlo u eksperiment. Eksperimenti su rađeni u tri ponavljanja u tri nezavisna eksperimenta.

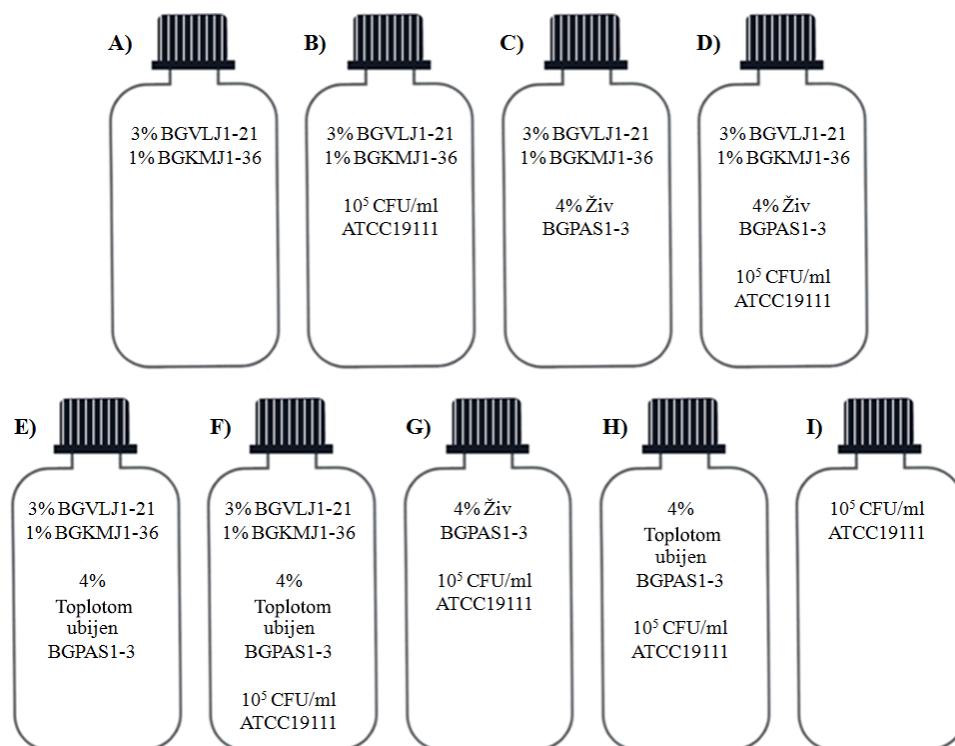
3.10. Metode probiotičke karakterizacije *Enterococcus faecium* BGPAS1-3

3.10.1. Test antimikrobnog delovanja *Enterococcus faecium* BGPAS1-3

Ispitivanje antimikrobne aktivnosti *Enterococcus faecium* BGPAS1-3 je rađeno metodom difuzionog testa sa bunarićima (Lozo i sar. 2004). U Petri šolje su razlivenne podloge u tankom sloju i ostavljene da se osuše i očvrstnu na vazduhu u sterilnim uslovima. Na čvrste podloge su postavljeni bunarići (Ø5mm) i prelivene su u tankom sloju odgovarajućim medijumom sa nižim sadržajem agara. U takav medijum sa nižim sadržajem agara je inokulisano $10^6 - 10^7$ ćelija indikator soja po 1 ml medijuma. Za ispitivanje antimikrobnog spektra delovanja *En. faecium* BGPAS1-3, upotrebljeni su indikator sojevi laktobacila, laktokoka, enterokoka i druge patogene bakterije navedene u Tabeli 3. U napravljene bunariće je sipano 50 μ L prekonocne kulture *En. faecium* BGPAS1-3, supernatant kulture *En. faecium* BGPAS1-3 oslobođenog od ćelija filtriranjem kroz sterilne filtere 0,22 μ m (Sartorius) i tri puta oprane i resuspendovane ćelije *En. faecium* BGPAS1-3 u PBS. Uz ivicu bunarića, sterilnim čačkalicama je stavljen kristal pronaze E. Inkubacija se odvijala na temperaturama optimalnim za rast indikator soja. Prisustvo antimikrobnog jedinjenja proteinske prirode je detektovano na osnovu pojave svetle zone oko bunarića, osim na mestu gde je nanesen kristal pronaze E.

3.10.2. Određivanje broja *Listeria monocytogenes* ATCC19111 ćelija u modelu proizvodnje jogurta sa dodatkom živog i toplotom ubijenog soja *En. faecium* BGPAS1-3

Model jogurta je napravljen korišćenjem *Streptococcus thermophilus* BGKMJ1-36 i *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* BGVLJ1-21 sa dodatkom živog i toplotom ubijenog BGPAS1-3 korišćenjem sterilisanog 12% mleka u prahu. Nakon sterilizacije mleka na 110°C tokom 20 minuta i hlađenja na 42°C inokulacija je urađena u sledećim kombinacijama: A- 3% *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* BGVLJ1-21 i 1% *Streptococcus thermophilus* BGKMJ1-36; B- 3% *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* BGVLJ1-21, 1% *Streptococcus thermophilus* BGKMJ1-36 i 10⁵ CFU/ml *L. monocytogenes* ATCC19111; C- 3% *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* BGVLJ1-21, 1% *Streptococcus thermophilus* BGKMJ1-36 i 4% živog BGPAS1-3; D- 3% *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* BGVLJ1-21, 1% *Streptococcus thermophilus* BGKMJ1-36, 4% živog BGPAS1-3 i 10⁵ CFU/ml *L. monocytogenes* ATCC19111; E- 3% *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* BGVLJ1-21, 1% *Streptococcus thermophilus* BGKMJ1-36 i 4% toplotom ubijenog BGPAS1-3; F- 3% *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* BGVLJ1-21, 1% *Streptococcus thermophilus* BGKMJ1-36, 4% toplotom ubijenog BGPAS1-3 i 10⁵ CFU/ml *L. monocytogenes* ATCC19111; G- 4% živog BGPAS-3 i 10⁵ CFU/ml *L. monocytogenes* ATCC19111; H- 4% toplotom ubijenog BGPAS1-3 i 10⁵ CFU/ml *L. monocytogenes* ATCC19111; i I- 10⁵ CFU/ml *L. monocytogenes* ATCC19111 (Slika 7). Varijante od A do F inkubirane su 5h na 42°C do pojave gruš, izuzev varijanti G, H i I čija je fermentacija prekinuta na petom satu, iako nije došlo do pojave gruš. Na kraju, sve varijante su skladištene na temperaturi od 4°C tokom 14 dana. Broj ćelija *L. monocytogenes* ATCC19111 praćen je tokom celog perioda ispitivanja, sledećom dinamikom: 0. dan – pre početka fermentacije, odmah nakon dodatka jogurtne kulture, živog i toplotom ubijenog BGPAS1-3 i *L. monocytogenes* ATCC19111; 1. dan – nakon skladištenja modela jogurta na temperaturi 4°C tokom 24 h; 7. dan – nakon skladištenja modela jogurta na temperaturi 4°C tokom 7 dana; i 14. dan – nakon skladištenja modela jogurta na temperaturi 4°C tokom 14 dana. Za određivanje broja *L. monocytogenes* je korišćen Oxford agar, na temperaturi inkubacije od 37°C tokom 24 h u aerobnim uslovima. Sve analize su urađene u tri ponavljanja.



Slika 7: Model proizvodnje jogurta.

3.10.3. Kultivacija i diferencijacija Caco-2 ćelijske linije

U cilju ispitivanja efekta živog i toplotom ubijenog *En. faecium* BGPAS1-3 korišćene su ćelije humanog epitelijskog kolorektalnog adenokarcinoma, Caco-2 (ATCC HTB-37). Ćelije su gajene na 37°C u 5% CO₂ inkubatoru u obogaćenom DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) medijumu. Ćelije su po odmrzavanju iz tečnog azota gajene u flaskovima površine 75 cm² (T-75, Sarstedt, Nimbrecht, Nemačka) i pasažirane na 70% konfluentnosti (jednom nedeljno). Da bi se ćelije odlepile sa površine flaska korišćen je 0,25% tripsin u PBS-u koji je sadržao 1mM EDTA (Torlak, Beograd, Srbija). Nakon formiranja jednog sloja konfluentnih ćelija, Caco-2 ćelije su ostavljene 21 dan kako bi se omogućila diferencijacija. Tokom diferencijacije u trajanju od 21 dan, svaka tri dana se menjao medijum. Nakon 21. dana ćelije su bile diferencirane i spremne za ispitivanje efekata bakterijskih frakcija (Roselli i sar. 2006).

3.10.4. Testovi adhezije i invazije *Listeria monocytogenes* ATCC19111 na diferenciranim Caco-2 ćelijama u kombinaciji sa živim i toplotom ubijenim *Enterococcus faecium* BGPAS1-3

Da bi se ispitaio ovaj zaštitni efekat, prekonodne bakterijske kulture *L. monocytogenes* ATCC19111 i *En. faecium* BGPAS1-3 i prethodno pripremljene toplotom ubijene ćelije BGPAS1-3 (Materijal i metode: 3.3.) su isprane tri puta u PBS i resuspendovane u 0,5 ml DMEM medijuma. Diferencirane Caco-2 ćelije (1×10^6) su tretirane u odnosu 1:10 (eukariotske ćelije : prokariotske ćelije) sa *L. monocytogenes* ATCC19111, živim ili toplotom ubijenim BGPAS1-3. Tri različita testa su urađena na diferenciranim Caco-2 ćelijama: 1) u testu kompeticije suspenzije živih ili toplotom ubijenih ćelija BGPAS1-3 i *L. monocytogenes* ATCC19111 su istovremeno inkubirane na diferenciranim Caco-2 ćelijama tokom 1 h na 37°C u 5% CO₂ inkubatoru; 2) u testu zamene *L. monocytogenes* ATCC19111 je inkubirana na diferenciranim Caco-2 ćelijama tokom 1 h na 37°C u 5% CO₂ inkubatoru, zatim su ćelije oprane 3 puta sa PBS i dodatno tretirane živim ili toplotom ubijenim BGPAS1-3 tokom 2 h na 37°C u 5% CO₂ inkubatoru; 3) u testu isključivanja ćelije Caco-2 su tretirane živim ili toplotom ubijenim BGPAS1-3 tokom 2 h na 37°C u 5% CO₂ inkubatoru, isprane tri puta sa PBS i dodatno tretirane tokom 1 h sa *L. monocytogenes* ATCC19111. Kao kontrole su se koristile Caco-2 ćelije koje su tretirane samo sa *L. monocytogenes* ATCC19111 tokom 1 h, živim ćelijama BGPAS1-3 tokom 1 h i 2 h ili temperaturom ubijenim ćelijama BGPAS1-3 tokom 1 h i 2 h. Nakon svih testova diferencirane Caco-2 ćelije su tri puta oprane sa PBS puferom kako bi se uklonile ćelije koje nisu adherirale za površinu Caco-2 ćelija, a zatim su Caco-2 ćelije tretirane sa 500 µl rastvora Tripsin-EDTA (Torlak, Beograd, Srbija) kako bi se odvojile sa površine komercijalnih bunarića u kojima su rasle. Deo odvojenih ćelija (100 µl) je korišćen za analizu adhezije *L. monocytogenes* ATCC 19111 za površinu Caco-2 po metodi Živković i sar. (2016), dok je drugi deo ćelija (100 µl) koji je korišćen za analizu invazije *L. monocytogenes* ATCC 19111 tretiran gentamicinom (500 µg/ml) u trajanju od 30 minuta kako bi se ubile ekstracelularne *L. monocytogenes* ATCC 19111 (Jaradat i Bhunia, 2003). Nakon toga, Caco-2 su isprane tri puta u PBS-u i lizirane pomoću 500 ml hladnog 0,1% Triton X-100 kako bi se oslobodila ćelije *L. monocytogenes* koje su ušle u ćelije. Nakon liziranja ćelija, napravljena je serija razblaženja koja su utrljana na BHI agar. % invazije je izračunat kao (CFU/ml *L. monocytogenes* ATCC 19111 koje su ušle u Caco-2 ćelije / CFU/ml dodatih *L. monocytogenes* ATCC 19111) x 100. Broj adheriranih *L. monocytogenes*

ATCC 19111 je izražen kao % adhezije = (CFU/ml ukupan broj prebrojanih *L. monocytogenes* ATCC 19111 - CFU/ml koje su ušle u Caco-2 ćelije) x 100.

Od ostatka Caco-2 ćelija (300 μ l), koje nisu iskorišćene u testu adhezije i invazije, su izolovane ukupne RNK i proteini i uskladištene na -80°C za kvantitativni PCR u realnom vremenu i na -20°C za Western blot analizu.

3.10.5. Izolovanje ukupne RNK iz Caco-2 ćelija

Izolacija ukupne RNK iz Caco-2 ćelija, urađena je prema protokolu koji su opisali Lukić i sar. (2013). U zaleđene na -80°C mikrotube je dodato je 500 μ l denaturišućeg rastvora koji se sastojao iz: 25 mM natrijum citrata, 4 M guanidin tiocijanata, 0,5% natrijumove soli N-lauroilsarkozina i 0,1 M 2-merkaptetanola. U nastavku postupka izolacije RNK uzorci su sve vreme držani na ledu. Nakon dodavanja denaturišućeg pufera, ćelije su dodatno homogenizovane automatskom pipetom. Nakon homogenizacije je dodato 500 μ l kiselog fenola (pH=4), 50 μ l 2 M natrijum acetata (pH=4) i 100 μ l hloroforma. Homogenati ćelija su intezivno mešani do smanjenja viskoziteta u mikrotube i ostavljeni na ledu 20 minuta. Smeša je centrifugirana na 13000 rpm tokom 20 minuta na 4°C (5417R, Eppendorf) i po završetku centrifugiranja 500 μ l gornje faze je prebačeno u nove mikrotube. RNK je precipitirana na -20°C u trajanju od 1 h dodatkom 500 μ l 2-propanola, a zatim je centrifugirana na 13000 rpm u trajanju od 20 minuta na 4°C . Nakon toga je RNK resuspendovana u 75% hladnog etanola i smeša centrifugirana na 13000 rpm u trajanju od 20 minuta na 4°C . Talog je osušen na 37°C 10 minuta i resuspendovan u 20 μ l bidestilovanoj vodi bez RNaza. Koncentracija izolovane RNK kao i čistoća uzorka su određene na Nanovue Plus spektrofotometru (GE Healthcare, Bakingemšir, Ujedinjeno Kraljevstvo). Izolovana RNK je čuvana na -80°C .

3.10.6. Reakcija reverzne transkripcije

Reverzna transkripcija (RT) ili sinteza komplementarne DNK (engl. complementary DNA, cDNK) je izvedena prema upustvima proizvođača enzima (Thermo Scientific, Voltam, Masačusets, SAD). U reakciji reverzne transkripcije kao početna matrica je korišćena RNK izolovana iz Caco-2 ćelija (200 ng). U mikrotube, pored određene koncentracije RNK koja je

dobijena dodavanjem bidestilovane vode do finalne zapremine od 10 μ l, je dodato 100 pmola nasumičnih heksamera finalno rastvorenih u 3 μ l. Finalna zapremina smeše je bila 13 μ l i inkubirana je na 65°C u trajanju od 5 minuta u cilju denaturisanja sekundarnih struktura RNK molekula i ohlađena na 4°C. Zatim je u reakciju dodato 7 μ l sledećih komponenti: 4 μ l 1 \times reakcionog pufera, 2 μ l 1 mM dNTP smeše, 0,5 μ l 20 U RiboLock ribonukleaznog inhibitora i 0,5 μ l 200 U RevertAid H Minus reverzne transkriptaze, do konačne zapremine od 20 μ l. Reakcija reverzne transkripcije je urađena po sledećem programu: 10 min na 25°C, 60 min na 42°C i 10 min na 70°C. Kako bi se proverilo da li je uzorak kontaminiran genomskom DNK, za svaki uzorak je postavljena reakcija bez reverzne transkriptaze. Sintetisane cDNK, kao i odsustvo kontaminacije genomskom DNK je provereno PCR-om. Reakciona smeša sastojala se iz: 23,2 μ l bidestilovane vode, 3 μ l 1 \times reakcionog pufera, 1 μ l 10 pmola prajmera za konstitutivno eksprimiran gen (β -aktin), 0,6 μ l 0,2 mM dNTP (Thermo Scientific), 0,2 μ l 1 U Kapa Taq DNK Polimeraze (Kapa Biosystems) i 1 μ l sintetisane cDNK ili 1 μ l kontrolnog uzorka koji nije sadržao enzim reverznu transkriptazu. PCR program bio je urađen po sledećem programu: početna denaturacija DNK na 95°C tokom 5 minuta, zatim 30 ciklusa koja su se sastojala iz denaturacije DNK na 95°C tokom 30 s, hibridizacije prajmera na 55°C tokom 30 s i sinteze fragmenata na 72°C tokom 30 s. PCR program završen je sintezom nedovršenih fragmenata na 72°C u trajanju od 7 min. Umnoženi PCR produkti su provereni na 1% agaroznom gelu. Gelovi su pravljeni rastvaranjem agaroze u 1 \times TAE puferu uz dodavanje etidijum bromida. Elektroforeza je tekla pri konstantnom naponu od 80 V. Veličina umnoženih DNK fragmenata određena je pomoću DNK standarda. PCR i reakcije reverzne transkripcije su urađene u Gene AmpR System 2 700 (Applied Biosystems, Foster Siti, Kalifornija, SAD) aparatu.

3.10.7. Kvantitativna reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu „qPCR“

Sintetisana cDNK je razblažena 10 x i korišćena je za kvantifikaciju ekspresije gena metodom kvantitativnog PCR-a (engl. quantitative PCR, qPCR). Konačna zapremina reakcije iznosila je 10 μ l i sadržala je 5 μ l 1 \times KAPA SYBR FAST Universal Master Mix (Kapa Biosystems), 1 μ l 4 pmola prajmera, 0,8 μ l bidestilovane vode, 0,2 μ l Rox Low Reference boje i 2 μ l cDNK matrice. cDNK je umnožena aparatom 7500 Real Time System (Applied Biosystems) po sledećem programu: aktivacija enzima na 95°C tokom 3 minuta i 40 ciklusa

na 95°C tokom 15 s i na 60°C tokom 60 s. Korišćeni prajmeri prikazani su u Tabeli 7. Količina cDNK i efikasnost prajmera su određeni u testu apsolutne kvantifikacije. Korišćena su desetostruka razblaženja cDNK (od 1/10 do 1/10000). U testu relativne kvantifikacije, ekspresija gena je izračunata po formuli $2^{-\Delta\Delta C_t}$ gde vrednost $\Delta\Delta C_t$ (C_t , prazna vrednost ciklusa) predstavlja razliku između ΔC_t željenog uzorka i ΔC_t uzorka koji je definisan kao kalibrator. Vrednost ΔC_t predstavlja razliku između C_t vrednosti dobijene za ciljani gen i C_t vrednosti dobijene za konstitutivno eksprimirani gen (β -aktin, unutrašnja kontrola) (Livak i Schmittgen, 2001). Kao kalibratori postavljene su netretirane Caco-2 ćelije.

Tabela 7. Spisak prajmera korišćenih u ovoj studiji za umnožavanje eukariotskih gena

Geni	Sekvenca prajmera	Referenca
<i>TLR2</i>	5'-TGAGCTGCCCTTGCAGATAC-3' 5'-TGCAAGCAGGATCCAAAGGA-3'	Popović i sar. (2019)
<i>TLR4</i>	5'-GGATTTACACCTCCACGCA-3' 5'-GGTCAGAGCGTGATAGCGAG-3'	Popović i sar. (2019)
<i>MyD88</i>	5'-CAGTTGCCGATCTCCAAGT-3' 5'-GTCTCCTCCACATCCTCCCT-3'	Popović i sar. (2019)
<i>IL-8</i>	5'-ACACAGAGCTGCAGAAATCAGG-3' 5'-GGCACAAACTTTTCAGAGACAG-3'	Angrisano i sar. (2010)
<i>TGF-β</i>	5'-CCGGGTTATGCTGGTTGTACAG-3' 5'-AAGGACCTCGGCTGGAAGTGG-3'	Dragicevic i sar. (2017)
<i>Klaudin</i>	5'-TCACACATACCCTGTCAGGCT-3' 5'-ATGGCCTCTCTTGGCCTCCAA-3'	Elamin i sar. (2012)
<i>β-aktin</i>	5'-TCAGTAACAGTCCGCCTAGAAGCA-3' 5'-TTGCTGACAGGATGCAGAAGGAGA-3'	Lee i sar. (2015)

3.10.8. Metoda Western blot

Po završetku tretmana Caco-2 ćelije su čuvane na -80°C u mikrotubama. Ukupni proteini iz Caco-2 ćelija su ekstrahovani pomoću 200 μ l RIPA (engl. RadioImmunoPrecipitation Assay) pufera (50 mM Tris-HCl pH=7,4, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,25% natrijum dezoksiholat) kome je neposredno pre upotrebe dodat proteinazni inhibitor (Roche, Bazel, Švajcarska) i 1 mM PMSF (engl. Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride) (Sigma-Aldrich) u cilju sprečavanja degradacije proteina. Suspenzije Caco-2 ćelija u RIPA puferu su inkubirane tokom 1 h na ledu, nakon čega su centrifugirane na 12000 rpm tokom 15 min na 4°C (5417R, Eppendorf) i supernatanti su sakupljeni za dalju analizu. Koncentracija proteina je određena spektrofotometrijski primenom Bradford-ovog reagensa (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, SAD). Za konstruisanje standardne krive korišćene su poznate koncentracije albumina goveđeg seruma (BSA) u opsegu 1-20 mg/ml. Absorbanca je merena na 595 nm na UltroSpec 3300 pro aparatu (Amersham Bioscience, Velika Britanija).

Intenzitet dobijene plave boje direktno je proporcionalan koncentraciji proteina u uzorcima. Ista količina proteina svakog uzorka (20 µg) resuspendovana je u 2 × Laemmli puferu (4% SDS, 20% glicerol, 10% 2-merkaptoetanol, 0,004% bromfenol plavo i 125 mM Tris HCl, pH=6,8) i uzorci su inkubirani na 95°C tokom 5 min. Razdvajanje proteina u uzorcima izvršeno je na osnovu molekulske mase tehnikom SDS-poliakrilamidne gel elektroforeze (SDS-PAGE). Pravljen je diskontinuiran sistem gelova koji se sastojao od gela za koncentrisanje i gela za razdvajanje. Gel za koncentrisanje sadržao je: 7% akrilamid/bisakrilamid, 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1% SDS, 0,07% amonijum persulfat i 0,1% TEMED. Komponente gela za razdvajanje bile su: 12% akrilamid/bisakrilamid, 375 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1% SDS, 0,07% amonijum persulfat i 0,1% TEMED. Pufer za elektroforezu sastojao se iz 25 mM Trisa pH 8,3, 186 mM glicina i 0,1% SDS-a. Elektroforeza je tekla pri konstantnoj struji od 20 mA. Razdvojeni proteini preneti su na nitroceluloznu membranu promera 0,2 µm (GE Healthcare) primenom aparature za vlažni transfer (Bio-Rad Mini trans-blot system, Bio-Rad Laboratories) prema uputstvu proizvođača. Nakon transfera proteina, membrane su inkubirane preko noći na 4°C u 5% rastvoru obranog mleka u TBST (engl. Tris Buffered Saline-Tween-20) puferu (50 mM Tris-HCl, pH 7,4; 150 mM NaCl i 0,05% Tween-20). Na ovaj način je sprečeno nespecifično vezivanje antitela za membranu. Pozicija željenog proteina na membrani određena je primenom smeše proteina poznate molekulske mase (engl. Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder) (Thermo Scientific). Sledećeg dana, membrane su inkubirane na sobnoj temperaturi tokom 2 h sa sledećim antitelima: anti-GAPDH iz zeca (engl. glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) kao endogena kontrola (1:1000; Thermo Fischer Scientific) i anti-klaudin iz zeca (1:2000; Thermo Fischer Scientific). Membrane su potom isprane 3 puta u trajanju od 15 minuta TBST puferom. Nakon ispiranja, membrane su inkubirane 1 h na sobnoj temperaturi sa sekundarnim kozjim IgG antitelima obeležnim peroksidazom rena (engl. HorseRadish Peroxidase, HRP): anti-zečjim antitelom (1:10000, Thermo Scientific). Posle 3 ispiranja u trajanju od 15 min u TBST-u na membrane je nanet ECL supstrat (engl. Enhanced ChemiLuminescence, Immobilon Western, Merck Milipore) za HRP u trajanju od jednog minuta. Emitovana svetlost je zabeležena na rendgenskom filmu i intenzitet hemiluminiscence je direktno proporcionalan količini proteina vezanog za membranu. Denzitometrijska analiza ekspresije proteina urađena je primenom ImageJ softvera. Ekspresija klaudina izražena je relativno u odnosu na GAPDH.

3.11. Metode ispitivanja imunomodulatornog potencijala toplotom ubijenog *Enterococcus faecium* BGPAS1-3 *in vitro*

3.11.1. Eksperimentalne životinje

Za *in vitro* eksperimente korišćeni su mužjaci pacova Wistar soja težine 200-250 grama koji su uzgajani na farmi Vojnomedicinske akademije u Beogradu. Životinje su nakon preuzimanja i odlaganja u sobu za rad sa eksperimentalnim životinjama anestetizirane korišćenjem tiopental injekcija BP500 (Rotexmedica GmbH Arzneimittelwerk, Tritau, Nemačka) intraperitonealno u dozi 100 mg/kg. Nakon anestetiziranja, životinje su bile žrtvovane i iz njih su izolovani mezenterični limfni čvorovi. Sve eksperimentalne procedure odobrene su od strane Etičke komisije ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije (broj dozvole 119-01-5/14/2017-09).

Za *in vivo* eksperimente su korišćene ženke pacova genetički visokosrodnog soja Dark Aguti (DA), starosti od 2 do 3 meseca. Životinje su dobijene iz uzgajališta Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ i čuvane pod standardnim uslovima bez ograničenja pristupa hrani i vodi. Svi eksperimenti su odobreni od strane Etičkog komiteta Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ u Beogradu, (broj dozvole 03-10/15).

3.11.2. Izolovanje ćelija mezenteričnih limfnih čvorova i uspostavljanje primarne ćelijske kulture

Za ispitivanje imunomodulatornog potencijala toplotom ubijenog BGPAS1-3 korišćene su ćelije izolovane iz mezenteričnih limfnih čvorova (MLČ) mužijaka Wistar pacova težine 200-250 grama. Nakon žrtvovanja životinja izvađeni su MLČ i iz njih su izolovane ćelije. Tkivo je homogenizovano u obogaćenom DMEM medijumu potiskivanjem i filtriranjem kroz mrežice promera 70 µm. Dobijena suspenzija je centrifugirana 1800 rpm u trajanju 6 minuta, a dobijene ćelije su resuspendovane u RPMI-1640 medijumu sa dodatkom 10% fetalnog telećeg seruma i antibiotika penicilina i streptamicina (kompletni medijum) i prebrojane. Ćelije MLČ su dalje korišćene za uspostavljanje kulture ćelija u kojoj su nespecifično stimulisane konkanavalinom A (KonA, Pharmacia, Upsala, Švedska) i tretirane

toplotom ubijenim BGPAS1-3, peptidoglikanom BGPAS1-3 ili peptidoglikanom bez teihoične kiseline BGPAS1-3 u odnosu 1:10 (eukariotske ćelije : prokariotske ćelije).

3.11.3. Merenje metaboličke aktivnosti testom MTT

U cilju procene uticaja različitih tretmana na metaboličku aktivnost ćelija iz MLC je korišćen MTT test prema protokolu koji je opisao Mosmann (1983). Test se zasniva na redukciji žute tetrazolijumske boje [3-(4,5dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijum bromid] (Serva) dehidogenazama iz mitohondrija u ljubičasto obojene kristale formazana. Po završenom tretmanu, u Caco-2 ćelije je dodato 200 µl medijuma za kultivaciju sa dodatkom 0,5 mg/ml MTT, dok u suspenzije ćelija MLC je dodato 0,5 mg/ml MTT u već postojeći medijum. Nakon inkubacije od 4 h u CO₂ inkubatoru, nastali formazan je rastvoren dodatkom rastvora koji sadrži 10% SDS (engl. Sodium Dodecyl Sulfate) i 0,01 M HCl. Absorbancija je merena spektrofotometrom (Plate Reader Infinite 200 pro, MTX Lab Systems, Beč, Austrija) na 570 nm. Intenzitet dobijene ljubičaste boje je direktno proporcionalan metaboličkoj aktivnosti ćelija. Rezultati su predstavljeni kao procenat (%) metaboličke aktivnosti ćelija u odnosu na kontrolu, odnosno netretirane ćelije.

3.11.4. Merenje citotoksičnosti tretmana testom LDH

Za određivanje citotoksičnosti različitih tretmana korišćen je test LDH (engl. Lactate DeHydrogenase) primenom komercijalnog kita za merenje citotoksičnosti (Cytotoxicity Assay Kit, Thermo Scientific). Test se zasniva na merenju aktivnosti oslobođene laktat dehidrogenaze iz mrtvih ćelija. Aktivnost oslobođene laktat dehidrogenaze je merena u supernatantima kultura prema uputstvima proizvođača. Absorbancija je merena na 450 nm u spektrofotometru (Plate Reader Infinite 200 pro, MTX Lab Systems, Beč, Austrija). Vrednost absorbancije je obrnuto proporcionalna citotoksičnom efektu tretmana.

3.11.5. Merenje produkcije citokina testom ELISA

Koncentracija citokina u supernatantima ćelijskih kultura mezenteričnih limfnih čvorova je određivana primenom ELISA testa. ELISA test (engl. Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) predstavlja enzimsku imunološku metodu koja je korišćena kako bi se odredila koncentracija IFN- γ , IL-10 i IL-17 citokina u tretmanima toplotom ubijenog BGPAS1-3 i ćelija mezenteričnih limfnih čvorova. Postupak izvođenja testa je obavljen prema protokolima proizvođača, DuoSet ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, SAD). Ukratko, prvi korak je podrazumevao oblaganje bunarića ploča sa odgovarajućim primarnim antitelom, specifičnim za određeni citokin, u razblaženju preporučenom od strane proizvođača, u rastvoru PBS preko noći. Nakon inkubacije, ploče su ispirane tri puta rastvorom 0.05% Tween-20 u PBS (TPBS). Blokiranje slobodnih mesta na ploči (da bi se sprečilo nespecifično vezivanje antigena ili antitela za detekciju) je rađeno rastvorom 10% BSA u PBS puferu (BPBS). Nakon ponovnog ispiranja, uzorci i standardi (rastvori poznatih, opadajućih koncentracija citokina) su nanošeni (50 μ L u bunariće) i ploče su inkubirane 2 h na sobnoj temperaturi. Zatim je ponovljeno ispiranje rastvorom TPBS i dodato je antitelo za detekciju vezanih citokina (antitelo za detekciju) obeleženog biotinom odgovarajućeg razblaženja u TPBS. Nakon 1 h, ploče su ispirane i dodat je rastvor streptavidin (reaguje sa biotinom vezanim za antitelo za detekciju) konjugovanog HRP, 30 min na sobnoj temperaturi. Ploče su ponovo ispirane tri puta i dodato je po 50 μ L tetrametil benzidina, TMB supstrata za HRP. Po razvijanju boje reakcija je prekinuta sa 50 μ L 2 M H₂SO₄, a apsorbancija je merena na 450 nm korišćenjem spektrofotometra Plate Reader Infinite 200 pro (MTX Lab Systems, Beč, Austrija). Količina citokina (ng/ml) određivana je korišćenjem standardne krive dobijene na osnovu vrednosti apsorbancije za standarde.

3.12. Metode ispitivanja imunomodulatornog potencijala toplotom ubijenog *Enterococcus faecium* BGPAS1-3 in vivo

3.12.1. Imunizacija životinja

Za imunizaciju životinja je korišćen homogenat kičmene moždine (HKM) u PBS puferu emulgovan istom količinom kompletnog Freundovog adjuvansa (engl. Complete Freund's Adjuvant, CFA) (Difco, Detroit, SAD) koji se sastojao iz 5 mg/ml toplotom

ubijenih i liofilizovanih bakterija *Mycobacterium tuberculosis* H37 RA. Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis (EAE) je indukovan intradermalnom injekcijom po 100 μ L encefalitogene emulzije u zadnje šape pacova (Stanisavljević i sar. 2018).

3.12.2. Primena toplotom ubijenog *Enterococcus faecium* BGPAS1-3 na Dark Agouti pacovima *in vivo*

Nakon imunizacije, pacovi su bili tretirani 30 dana trajanja eksperimenta sa dnevnom dozom 10^9 ćelija toplotom ubijenog BGPAS1-3 koji je bio rասuspendovan u 120 ml vode koju su pacovi pili.

3.12.3. Evaluacija kliničke slike eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa

Klinička slika razvoja EAE je praćena svakodnevno od dana imunizacije životinje, a stepen težine bolesti je izraćavan kroz skalu od 0 do 4 na sledeći naćin: 0- odsustvo klinićkih manifestacija bolesti; 1- atonija repa; 2- pareza zadnjih ekstremiteta; 3- paraliza zadnjih ekstremiteta i 4- moribundno stanje ili smrt životinje. Stepeni 2 i 3 su često bili udrućeni sa inkontinencijom urina i fecesa. U slućaju kada su neurološki znaci bili slabije izraćeni od tipićnih za odrećeni stepen, korišćene su i intermedijarne vrednosti (npr. jedan i po za vrlo blago izraćenu parezu zadnjih ekstremiteta) (Stanisavljević i sar. 2018).

3.12.4. Elektroforeza u gradijentu denaturišućeg agensa (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE analiza)

Ukupna bakterijska DNK iz zamrznutih uzoraka fecesa imunizovanih DA pacova izolovana je korišćenjem ZR Fecal DNA Mini PrepTM (Zimo Research, Ervaj, Kalifornija, SAD) prema uputstvu proizvođaća. Izolovana DNK korišćena je za PCR-DGGE analizu za dobijanje detaljnog pregleda raznolikosti bakterija u uzorcima korišćenjem univerzalnog seta prajmera F-968-GC-f i R-1401-r specifićnog za V6-V8 region gena za 16S rRNK (Zoetenda i sar. 1998), seta prajmera koji se vezuju za regione gena za 16S rRNK specifićne za laktobacile Lab-0159-f i Uni-0515-GC-r (Heilig i sar. 2002) i seta prajmera specifićnih za

Bifidobacteria Bif 164-f i Bif 662-CG-r (Satokari i sar. 2001) (Tabela 8). Umnožavanje je rađeno u smeši finalne zapremine 30 μ l koja je sadržala: 23,7 μ l bidestilovane vode, 3 μ l 1 x reakcioni pufer KAPA Taq Buffer A sa 1,5 mM magnezijum hloridom, 0,6 μ l dNTP smeše (po 200 μ M za svaki dNTP), 1 μ l prajmera bez CG (svaki po 2,5 μ M), 0,5 μ l prajmera sa CG (svaki po 2,5 μ M) i 0,2 μ l 1U KAPA Taq DNA polimeraze (Kapa Biosystems, Inc., Boston, SAD) i 1 μ l DNK. PCR reakcija izvedena je korišćenjem aparata GeneAmp 2700 PCR Cycler (Applied Biosystems, SAD) tokom 35 ciklusa pri sledećim uslovima: početna denaturacija DNK na 94°C tokom 5 min, denaturacija DNK na 94°C tokom 30 s, vezivanje prajmera na 56°C tokom 20 s, sinteza produkata na 68°C tokom 40 s i sinteza nedovršenih produkata na 68°C tokom 7 min. Neposredno nakon završene reakcije, PCR produkti pomešani su sa bojom za nanošenje 6 \times Loading Dye Solution (Thermo Scientific) u odnosu 3:1 i 15 μ l smeše naneto je na gel sa gradijentom denaturišućeg agensa. Gelovi su sadržali rastvor akrilamid:bisakrilamid 19:1 (40%) i gradijent uree i formamida od 30% do 60% za Lab-0159-f i Uni-0515-GC-r, od 45% do 55% za Bif 164-f i Bif 662-CG-r i od 40% do 80% za F-968-GC-f i R-1401-r. Uzorci na gelu su razdvajani tokom 16 h na 85 V pri temperaturi od 60°C u 1 x TEA puferu (40 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8, 20 mM sirćetna kiselina) u aparatu DGGE-2001 (C.B.S. Scientific, San Dijego, SAD). Obrada gelova nakon elektroforeze urađena je u skladu sa uputstvima Lukić i sar. (2013). Gelovi su fiksirani 20 min u 10% etanolu i 0,5% glacijalnoj sirćetnoj kiselini. Zatim su 10 min bojani u rastvoru 0,1% srebro nitrata. Razvijanje je vršeno sve do pojave vidljivih traka u 1,5% rastvoru natrijum hidroksida, 0,1% natrijum borhidridu (NaBH₄) i 0,048% formaldehidu. Razvijeni gelovi su fotografisani. DNK fragmenti od interesa su isečeni iz gela, stavljani su u mikrotube od 1,5 ml gde je dodato 50 μ l sterilne bidestilovane vode. Gel je usitnjen teflonskim tučkom nakon čega je suspenzija inkubirana 10 min na 98°C (Lukić i sar. 2013). Nakon inkubacije suspenzije su vorteksovane i centrifugirane 13000 rpm tokom 2 min i supernatanti su korišćeni za dalju analizu. Sa 10 μ l supernatanta urađena je PCR reakcija sa prajmerima F-968-GC-f i R-1401-r, Lab-0159-f i Uni-0515-GC-r i Bif 164-f i Bif 662-CG-r kao u prethodnom koraku.

Dobijeni PCR produkti prečišćeni su na već opisan način (Materijal i metode, 3.7. Lančana reakcija polimeraze „PCR“) i ligirani su u pJET1.2/blunt vektor (Thermo Fisher Scientific, MA, SAD) po uputstvima proizvođača. Ligirani konstrukti su transformisani u rubidijumske kompetentne *E. coli* DH5 α ćelije (Hanahan, 1983). Ukupna zapremina ligacione smeše (20 μ l) dodata je pripremljenim kompetentnim DH5 α ćelijama (200 μ l),

nakon čega su ćelije inkubirane na ledu 60 min uz povremeno blago mešanje. U sledećem koraku ćelije su izložene toplotnom šoku na 42°C u trajanju od 90 s i neposredno posle smeštene na led. Posle 5 min inkubacije na ledu, ćelijama je dodat LB medijum za regeneraciju nakon čega su ćelije regenerisane 1 h na 37°C uz kontinuirano mešanje. Bakterijska suspenzija je utrljana na čvrste selektivne LA podloge sa 100 µg/ml ampicilina. Transformanti sa insertom su selektovani nakon 24 h aerobne inkubacije na 37°C kao bele kolonije u skladu sa uputstvima proizvođača pJET1.2/blunt vektora (Thermo Fisher Scientific). Bele kolonije su zasejane u tečni LB medijum sa 100 µg/ml ampicilina i iz prekonoćne kulture su izolovani plazmidi pomoću GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, MA, SAD). Sekvenciranje izolovanih pJET1.2/blunt vektora sa ligiranim PCR produktima urađeno je pJET1.2 parom prajmera (Macrogen Europe Service, Amsterdam, Holandija). Pretraživanje i anotacija sekvenci urađena je korišćenjem BLAST alata dostupnim na <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

Tabela 8. Spisak prajmera korišćen za PCR-DGGE

Prajmer	Sekvenca prajmera	Referenca
U968-GC-f	5' CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAA CGC GAA GAA CCT TAC 3'	Zoetenda i sar. (1998)
L1401-r	5' GCG TGT GTA CAA GAC CC 3'	
Lab-0159-f	5' GGA AAC AG (A/G) TGC TAA TAC CG 3'	
Uni-0515GC-r	5' CGC CGG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAT CGT ATT ACC GCG GCT GCT 3'	Heilig i sar. (2002)
Bif662-GC-r	5' CGC CCG CG CGC GCC GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC ACC GTT ACA CCG GGA A 3'	Satokari i sar. (2001)
Bif164-f	5' GGG TGG TAA TGC CGG ATG 3'	

3.13. Statistička obrada rezultata

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna devijacija. Statističke obrade i grafički prikazi dobijenih rezultata su urađeni pomoću softverskog paketa Graphpad Prism 7 (Graphpad, San Diego, SAD). Od statističkih testova korišćeni su: Studentov t-test za poređenje kontrolne i test grupe i jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) praćena Tukey *post hoc* testom za poređenje više eksperimentalnih grupa. Statistička značajnost je obeležena *** za $p < 0.001$, ** za $p < 0.005$, * za $p < 0.05$.

4. REZULTATI

4.1. Odabir i identifikacija sojeva roda *Enterococcus*

Ova studija obuhvatila je analizu bakterija iz roda *Enterococcus* izolovanih iz autohtonih fermentisanih mlečnih proizvoda sa područja Zapadnog Balkana, bez dodatka komercijalnih starter kultura. Klasičnim mikrobiološkim metodama izolovano je 636 prirodnih izolata enterokoka iz svežeg mleka, sireva, kajmaka i milerama proizvedenih od nekuvanog kravljeg i kozijeg mleka, uzorkovanih u ruralnim delovima Republike Srbije, Bosne i Hercegovine i Republike Hrvatske (Terzić-Vidojević i sar. 2015).



Slika 8: Lokaliteti fermentisanih mlečnih proizvoda korišćenih za izolaciju enterokoka. Mapa je preuzeta i adaptirana sa sajta <https://www.bing.com/maps>. 1- Prigorje i Bilogorsko-Podravski region, Republika Hrvatska; 2- Travnik, Bosna i Hercegovina; 3- Pale, Bosna i Hercegovina; 4- Zlatar, Republika Srbija; 5- Golija, Republika Srbija; 6- planinski region Istočne Srbije, Republika Srbija; 7- region Južne Morave, Republika Srbija; 8- Pirot, Republika Srbija; 9- Vlasinsko jezero, Republika Srbija.

Za dalja ispitivanja odabrano je ukupno 75 sojeva enterokoka senzitivnih i intermedijerno rezistentnih na antibiotike, prema metodi disk difuzije, izolovanih iz sireva proizvedenih u planinskom regionu Golije (BGGO), planinskom regionu Stare Planine, u blizini Vlasinskog jezera (BGVL2a) i grada Pirot (BGPT2, BGPT3 i BGPT5), regionu Južne Morave (BGAL3), planinskom regionu Istočne Srbije (BGBU1 i BGRE2), iz svežeg mleka i sireva iz planinskog regiona Zlatara (BGZLM1, BGZLS30 i BGZLS45). Takođe, enterokoke

su izolovane iz sireva, milerama i kajmaka iz planinskog regiona u blizini Travnika, Bosna i Hercegovina (BGTRS1, BGTRS7, BGTRS10, BGTRM1, BGTRM7, BGTRM10, BGTRK4 i BGTRK10), iz sireva u planinskom regionu u blizini Pala, Bosna i Hercegovina (BGPAS1), iz sireva u planinskom regionu Prigorje, Republika Hrvatska (ZG1 i ZG2) i Bilogorsko-Podravskom region, Republika Hrvatska (ZG4) (Slika 8).

Za dalju identifikaciju 75 enterokokalnih sojeva, korišćena je metoda umnožavanja i analize nukleotidne sekvence gena za 16S rRNK. Poređenjem rezultata nakon sekvenciranja, korišćenjem NCBI baze podataka, pokazano je da 50 sojeva pripada vrsti *En. durans*, 15 sojeva vrsti *En. faecium*, 6 sojeva vrsti *En. faecalis*, 3 soja vrsti *En. italicus* i jedan soj pripada vrsti *En. hirae* (Prilog 1).

4.2. Ispitivanje bezbednosnog statusa enterokoka

Da bi se ispitao bezbednosni status enterokoka kao živih mikroorganizama i njihove potencijalne upotrebe u biomedicini i veterini, odabrani sojevi enterokoka su testirani na produkciju hemolizina i želatinaze, osetljivosti na antibiotike testom mikrodilucije i prisustva gena koje kodiraju virulentne determinante u genomu PCR metodom.

4.2.1. Ispitivanje hemolitičke i želatinazne aktivnosti

U cilju ispitivanja bezbednosnog statusa enterokoka, ispitivana je hemolitička i želatinazna aktivnost 75 sojeva. Nakon inkubacije na krvnom agaru na 37°C tokom 48 h, pokazano je da 14 ispitivanih sojeva ima alfa hemolitičku aktivnost, dok ostali sojevi ne formiraju zone hemolize (Tabela 9). Enterokoke sa beta hemolitičkom aktivnošću nisu detektovane. Želatinaznu aktivnost je pokazalo 5 sojeva nakon inkubacije na želatin agaru na 37°C tokom 48 h i prelivanjem zasićenim rastvorom amonijum sulfata (Tabela 9). U nastavku studije ispitivano je samo 56 sojeva koji nisu pokazali hemolitičku niti želatinaznu aktivnost.

Tabela 9. Sojevi enterokoka koji imaju hemolitičku i želatinaznu aktivnost.

Hemolitička aktivnost		Želatinazna aktivnost
<i>En. durans</i> BGPT3-30	<i>En. durans</i> BGTRM1-52	<i>En. durans</i> BGG011-41
<i>En. faecium</i> BGPT5-1P	<i>En. durans</i> BGTRM7-33	<i>En. durans</i> BGTRS7-67
<i>En. durans</i> BGTRS1-10	<i>En. durans</i> BGTRM7-40	<i>En. durans</i> ZG1-18
<i>En. durans</i> BGTRS1-20	<i>En. italicus</i> BGTRK1-35	<i>En. durans</i> ZG2-8
<i>En. durans</i> BGTRS1-29	<i>En. faecalis</i> ZG2-9	<i>En. durans</i> ZG2-20
<i>En. durans</i> BGTRS1-49	<i>En. faecalis</i> ZG2-13	
<i>En. durans</i> BGTRM1-42	<i>En. durans</i> ZG4-19	

4.2.2. Ispitivanje osetljivosti na antibiotike

U prethodnoj studiji koju su uradili Terzić-Vidojević i sar. (2015) osetljivost sojeva enterokoka na različite antibiotike utvrđena je korišćenjem modifikovanog testa disk-difuzije. Svih 56 testiranih sojeva enterokoka bili su osetljivi ili intermedijerno rezistentni na ispitivane antibiotike. Da bi se utvrdio stepen osetljivosti, na osnovu prethodnih preliminarnih rezultata testa disk-difuzije, u nastavku istraživanja u okviru ove teze urađen je test mikrodilucije, a rezultati su tumačeni prema preporukama CLSI, 2015. Rezultati pokazuju da je prisutna visoka učestalost rezistencije na ciprofloksacin (27 sojeva), dok su u manjoj meri testirani sojevi rezistentni na gentamicin (6 sojeva) (Tabela 10). U nastavku istraživanja ispitivano je samo 23 soja koji ne poseduju rezistenciju na antibiotike.

Tabela 10. Sojevi rezistentni na ciprofloksacin i gentamicin prema preporukama CLSI, 2015.

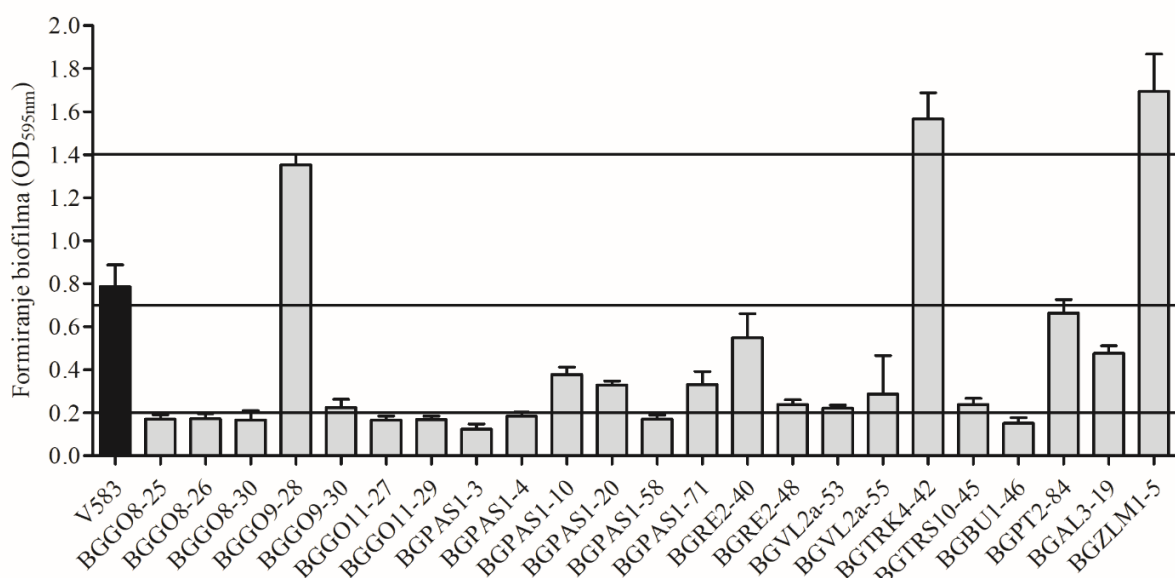
Ciprofloksacin ($\geq 4 \mu\text{g/ml}$) ^a		Gentamicin ($\geq 500 \mu\text{g/ml}$) ^b	
<i>En. durans</i> BGG01-43	<i>En. faecium</i> BGG07-19	<i>En. durans</i> BGTRM7-39	<i>En. durans</i> BGG01-11
<i>En. durans</i> BGG01-44	<i>En. durans</i> BGG011-38	<i>En. durans</i> BGTRM7-43	<i>En. durans</i> BGVL2a-54
<i>En. durans</i> BGG01-48	<i>En. durans</i> BGVL2a-50	<i>En. durans</i> BGTRM7-47	<i>En. durans</i> BGAL3-13
<i>En. durans</i> BGG02-47	<i>En. durans</i> BGZLS30-21	<i>En. faecalis</i> BGTRM10-21	<i>En. durans</i> BGAL3-16
<i>En. durans</i> BGG02-48	<i>En. faecium</i> BGZLS30-22	<i>En. italicus</i> BGTRK4-35	<i>En. durans</i> BGAL3-23
<i>En. durans</i> BGG05-35	<i>En. faecalis</i> BGZLS45-5	<i>En. durans</i> BGTRK10-29	<i>En. durans</i> BGBU1-40
<i>En. faecium</i> BGG05-13	<i>En. faecalis</i> BGZLS45-13	<i>En. durans</i> ZG2-1	
<i>En. durans</i> BGG06-32	<i>En. faecalis</i> BGZLS45-20	<i>En. faecium</i> BGPAS1-2	
<i>En. durans</i> BGG06-15	<i>En. durans</i> BGTRS7-54	<i>En. faecium</i> BGPAS1-48	

Napomena : a- prelomna tačka (engl. breakpoint) minimalne inhibitorne koncentracije ciprofloksacina i b-gentamicina prema preporukama CLSI, 2015.

4.2.3. Ispitivanje formiranja biofilma

Ispitivanje sposobnosti formiranja biofilma, odnosno afiniteta vezivanja za plastiku, analizirano je za 23 odabrana soja. Na osnovu rezultata, sojevi se mogu podeliti u četiri

grupe. Prvu grupu čini sojevi BGG08-25, BGG08-26, BGG08-30, BGG011-27, BGG011-29, BGPAS1-3, BGPAS1-4, BGPAS1-58 i BGBU1-46 ($OD_{595nm} < 0,2$) koji nemaju sposobnost formiranja biofilma, drugu grupu čine sojevi BGG09-30, BGPAS1-10, BGPAS1-20, BGPAS1-71, BGRE2-40, BGRE2-48, BGVL2a-53, BGVL2a-55, BGTRS10-45, BGPT2-84 i BGAL3-19 koji pokazuju slab afinitet vezivanja za plastiku, odnosno imaju slabu mogućnost formiranja biofilma ($OD_{595nm} 0,2 - 0,7$), trećoj grupi pripao je soj BGG09-28 čija je sposobnost formiranja biofilma slična soju V583 koji je korišćen kao pozitivna kontrola i ima jaku sposobnost formiranja biofilma ($OD_{595nm} 0,4 - 1,4$), dok sojevi BGTRK4-42 i BGZLM1-5 pokazuju veoma jaku sposobnost formiranja biofilma ($OD_{595nm} > 1,4$) (Slika 9).



Slika 9. Formiranje biofilma na plastičnoj površini. Optička gustina (engl. optical density, OD) je merena na 595 nm i rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost tri nezavisna eksperimenta u tri ponavljanja \pm standardna devijacija. Interpretacija rezultata: $< 0,2$ = nemaju sposobnost formiranja biofilma, $0,2 - 0,7$ = slaba sposobnost formiranja biofilma, $0,71 - 1,4$ = jaka sposobnost formiranja biofilma, $> 1,4$ = veoma jaka sposobnost formiranja biofilma.

4.2.4. Analiza prisustva gena za faktore virulencije

U ispitivanju prisustva gena koji kodiraju različite faktore virulencije korišćena je PCR metoda. Ukupna DNK izolovana iz analiziranih sojeva služila je kao matrica u PCR reakcijama sa prajmerima izvedenim na osnovu nukleotidne sekvence gena za hijaluronidazu (*hylN*), citolizin aktivirajući protein (*cylA*), želatinazu (*gelE*), serinsku proteazu (*sprE*), agregacioni faktor (*agg*), enterokokalni površinski protein (*esp*), antigen specifičan za

endokarditis (*efaA^{fs}* i *efaA^{fm}*), kao i gena u okviru *fsr* operona odgovornih za formiranje biofilma, regulatora odgovora (*fsrA*), signalnog peptide (*fsrB*) i histidin kinase (*fsrC*) (Tabela 11).

Tabela 11. Prisustvo virulentnih determinanti u genomu ispitivanih sojeva.

Vrsta i soj	Adhezini				Formiranje biofilma				Enzimi		
	<i>agg</i>	<i>Esp</i>	<i>efaA^{fs}</i>	<i>efaA^{fm}</i>	<i>fsrA</i>	<i>fsrB</i>	<i>fsrC</i>	<i>gelE</i>	<i>spreE</i>	<i>cyIA</i>	<i>hyIN</i>
<i>En. durans</i> BGG08-25											
<i>En. durans</i> BGG08-26											
<i>En. durans</i> BGG08-30											
<i>En. faecium</i> BGG09-28											
<i>En. durans</i> BGG09-30											
<i>En. faecium</i> BGG011-27											
<i>En. faecium</i> BGG011-29											
<i>En. faecium</i> BGPAS1-3											
<i>En. faecium</i> BGPAS1-4											
<i>En. faecium</i> BGPAS1-10											
<i>En. faecium</i> BGPAS1-20											
<i>En. faecium</i> BGPAS1-58											
<i>En. faecium</i> BGPAS1-71											
<i>En. durans</i> BGRE2-40											
<i>En. hiraе</i> BGRE2-48											
<i>En. durans</i> BGVL2a-53											
<i>En. durans</i> BGVL2a-55											
<i>En. italicus</i> BGTRK4-42											
<i>En. durans</i> BGTRS10-45											
<i>En. durans</i> BGBU1-46											
<i>En. durans</i> BGPT2-84											
<i>En. durans</i> BGAL3-19											
<i>En. faecium</i> BGZLM1-5											

Napomena: Osenčene oblasti predstavljaju prisustvo odgovarajućih gena

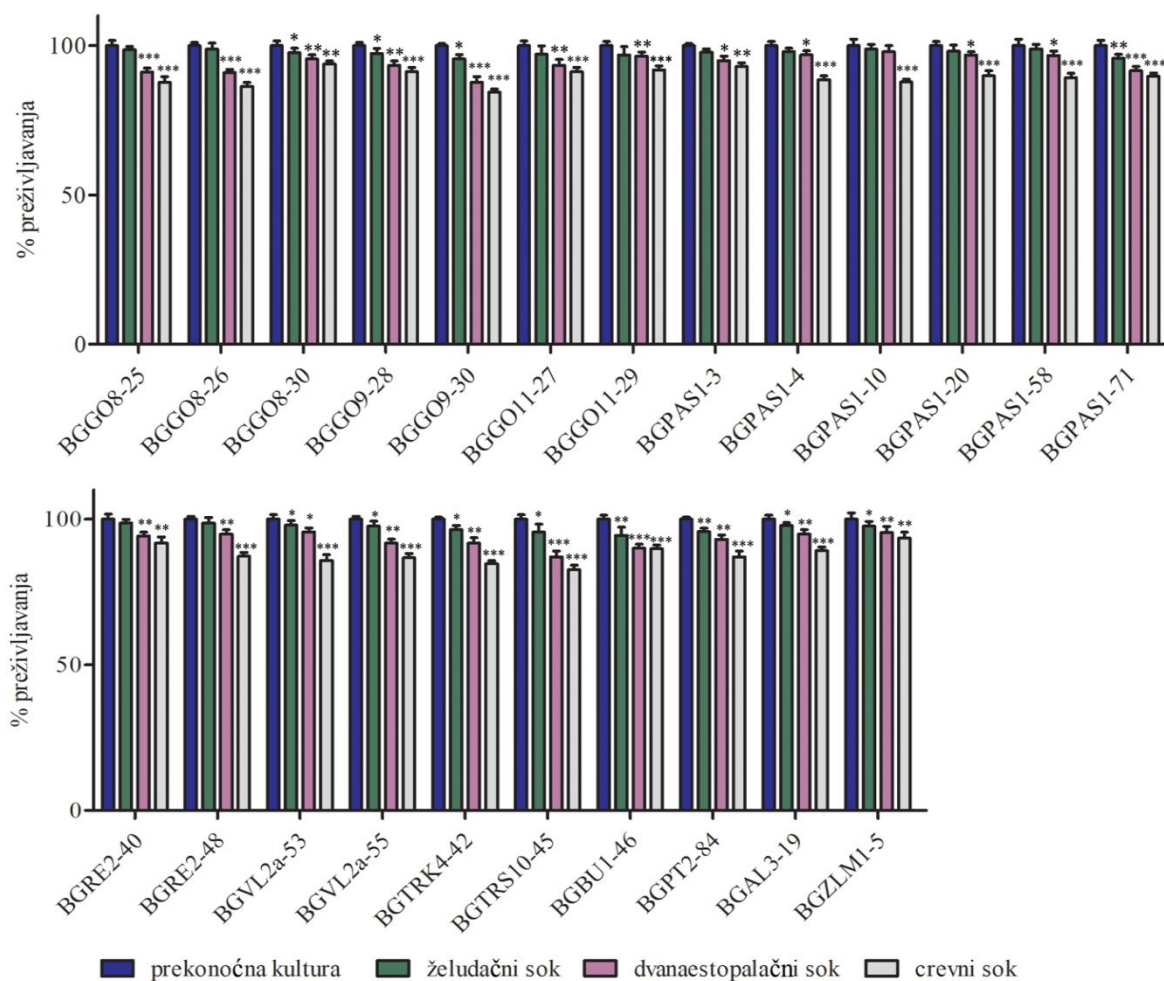
Na osnovu rezultata prisustva gena koji kodiraju različite faktore virulencije u genomu ispitivanih enterokoka, može se uočiti visoka zastupljenost gena koji kodiraju adhezine, agregacioni faktor (17 sojeva), enterokokalni površinski protein (13 sojeva), antigen specifičan za endokarditis (*efaA^{fs}* - 16 sojeva i *efaA^{fm}* - 8 sojeva), dok je prisustvo gena u okviru *fsr* operona sporadično prisutno, *fsrA* 7 sojeva, *fsrB* 2 soja i *fsrC* 3 soja. Geni koji kodiraju želatinazu su prisutni kod 5 sojeva, dok je kod 13 sojeva pokazano prisustvo gena za serinsku proteazu. Nije pronađeno prisustvo gena koji kodiraju hijaluronidazu i citolizin aktivirajući protein.

4.3. Ispitivanje probiotičkih osobina odabranih sojeva enterokoka

Za ispitivanje probiotičkih osobina odabrana su 23 soja koji nemaju hemolitičku i želatinaznu aktivnost i koji su osetljivi na deset klinički relevantnih antibiotika. Među odabranim sojevima, izabrani su i sojevi koji imaju sposobnost formiranja biofima i prisutne gene čiji su proteinski produkti odgovorni za kolonizaciju domaćina. Ispitivano je preživljavanje sojeva u simuliranim uslovima gastrointestinalnog trakta (GIT), vezivanje za mucin, kolagen i fibronektin, kao i za HT29-MTX ćelije i antimikrobna aktivnost.

4.3.1. Ispitivanje preživljavanja enterokoka u simuliranim uslovima gastrointestinalnog trakta

Jedan od kriterijuma za selekciju probiotika jeste sposobnost da prežive nepovoljne uslove gastrointestinalnog trakta. U tom cilju, testirano je preživljavanje 23 odabrana soja enterokoka u simuliranim uslovima GIT. Rezultati su predstavljeni kao procenat preživelih ćelija nakon svake etape ispitivanja u odnosu na ukupan broj ćelija sa kojima je započet test. Preživljavanje je rađeno kao simulacija prolaska 10^8 ćelija enterokoka u 10% obranom mleku kroz nepovoljne uslove želudačnog soka koji je sadržao 0,3% pepsina pri pH 2 u trajanju od 90 minuta na 37°C u aerobnim uslovima. Nakon inkubacije u želudačnom soku rezultati ukazuju da ispitivani sojevi dobro preživljavaju nepovoljne uslove želudačnog soka i da je preživljavanje bakterija u odnosu na početni broj između 98,8% i 94,4% ($\pm 1,3\%$). Zatim su enterokokalne suspenzije podvrgnute nepovoljnim uslovima koji simuliraju osobine dvanaestopalačnog soka koji se sastojao od 1% goveđe žuči pH 8, u trajanju od 10 minuta na 37°C u anerobnim uslovima. Po završetku ove etape ispitivanja rezultati ukazuju da je izlaganje visokoj koncentraciji žučnih soli smanjilo broj enterokoka u odnosu na početni broj kao i u odnosu na broj preživelih nakon želudačnog soka (procenat preživelih bakterija je 87,1% - 97,9% $\pm 2,9\%$). Dalje su inkubirane u crevnom soku koji se sastojao iz 0,3% goveđe žuči i 0,1% pankreatina pri pH 8, tokom 2 h na 37°C. Nakon inkubacije u crevnom soku procenat preživelih bakterija je 82,7% - 92,9% $\pm 3,0\%$ (Slika 11).

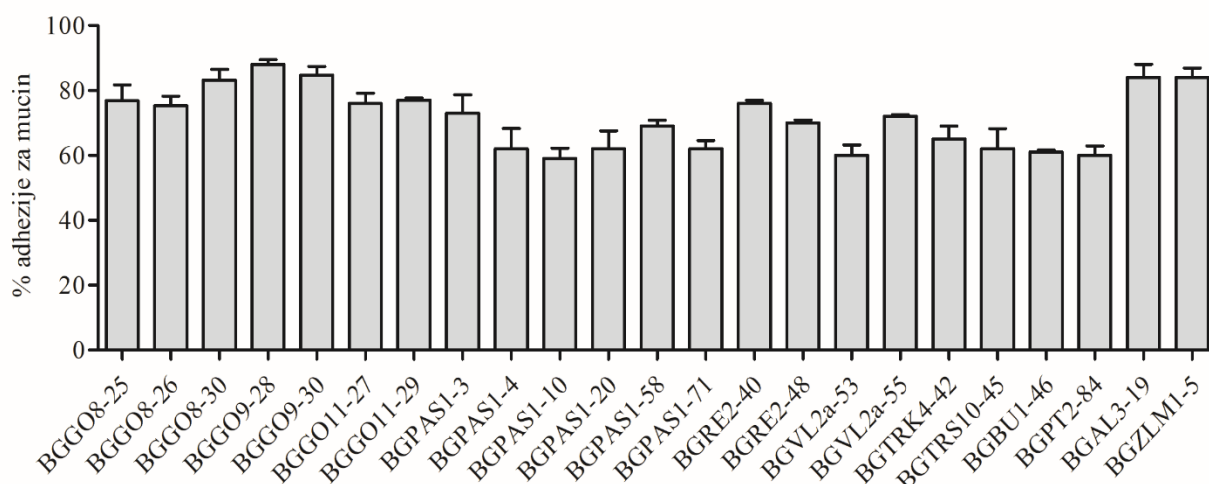


Slika 11. Preživljavanje enterokoka u simuliranim uslovima gastrointestinalnog trakta. Rezultati su predstavljani kao procenat preživelih ćelija nakon svake etape ispitivanja u odnosu na ukupan broj ćelija sa kojim je započeto testiranje. Jednofaktorska ANOVA i Tukey *post hoc* test su korišćeni za poređenje tretmana (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$).

4.3.2. Ispitivanje vezivanja enterokoka za imobilisani mucin

Imajući u vidu da nakon preživljavanja nepovoljnih uslova GIT probiotički sojevi moraju da se vežu za mukus creva da bi ostvarili efekat na intestinalne ćelije domaćina, cilj je bio da se ispita sposobnost enterokoka da se vežu za imobilisani mucin tipa II poreklom iz creva svinja. Interakcija između imobilisanog mucina i 10^8 ćelija enterokoka je rađena u trajanju od 90 min na 37°C . Rezultati su predstavljani kao procenat vezanih ćelija za imobilisani mucin u odnosu na ukupan broj ćelija sa kojim se započelo ispitivanje. Nakon završenog testa, rezultati ukazuju da se enterokoke vezuju za mucin u proseku $71,4\% \pm 3,1\%$

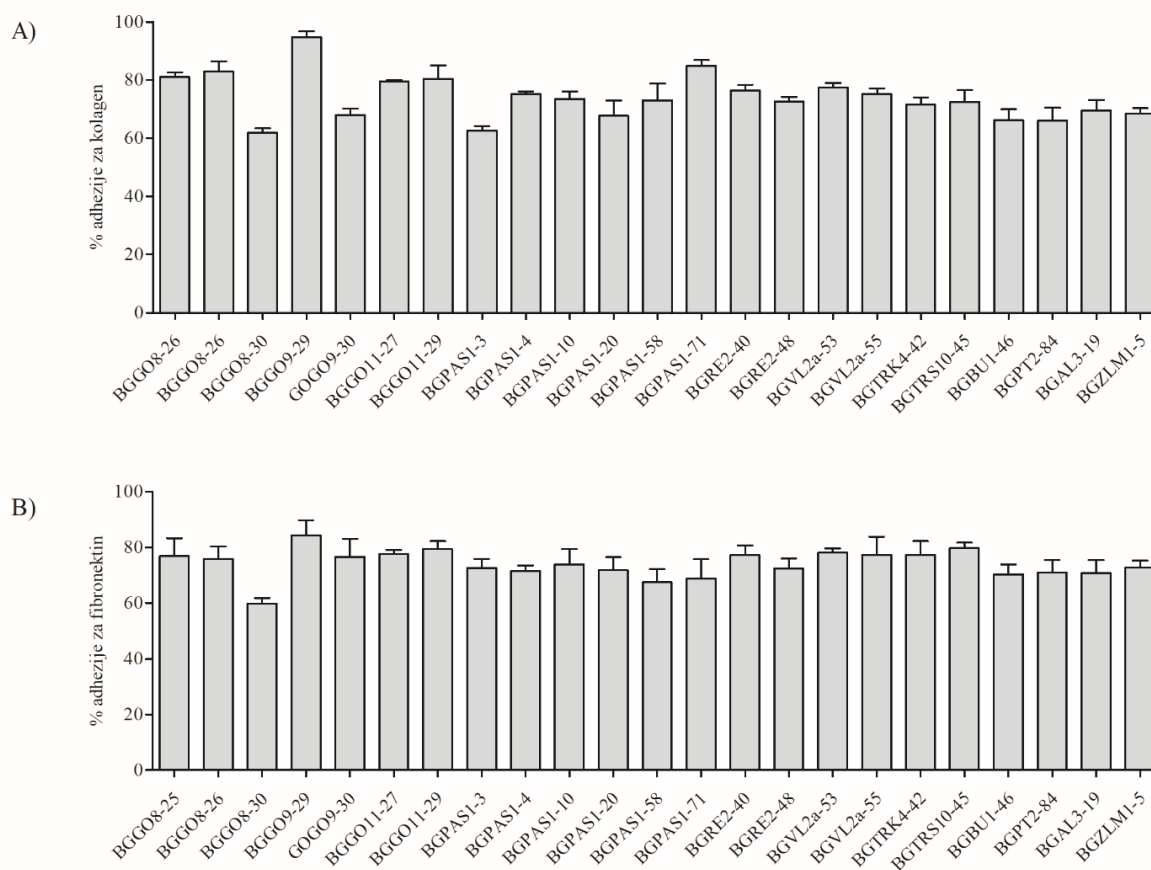
(Slika 12). Najniži afinitet vezivanja je imao *En. faecium* BGPAS1-10 ($59,1\% \pm 3,2\%$), dok se *En. faecium* BGGO9-28 vezivao sa najvišim afinitetom ($88,1\% \pm 1,5\%$).



Slika 12. Vezivanje enterokoka za mucin. Rezultati su predstavljeni kao procenat vezanih ćelija za imobilisani mucin tipa II poreklom iz creva svinja u odnosu na ukupan broj ćelija sa kojim je započeto ispitivanje.

4.4.3. Ispitivanje vezivanja enterokoka za imobilisani kolagen i fibronektin

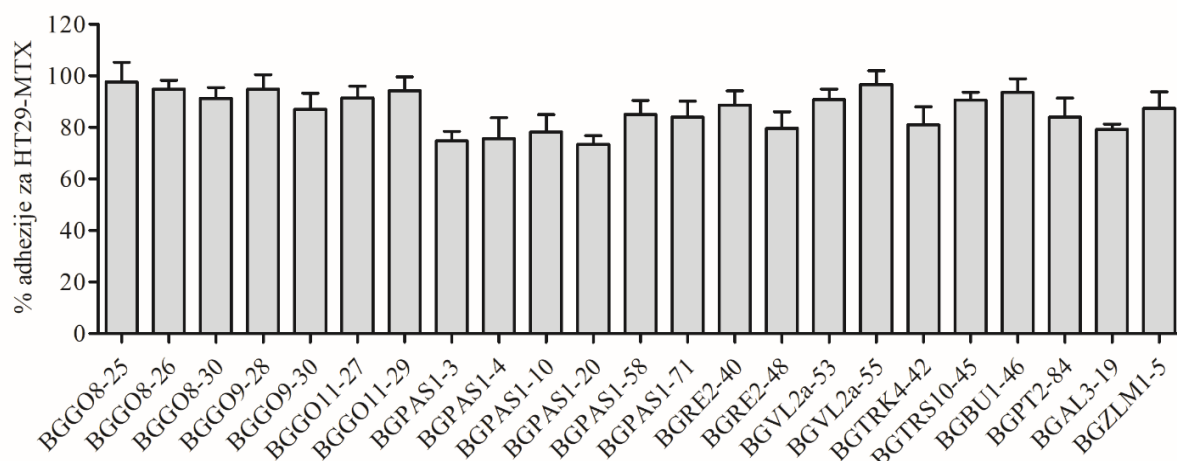
S obzirom da su kolagen i fibronektin dve najzastupljenije komponente EĆM, testirana je sposobnost vezivanja za imobilisani kolagen i fibronektin. Rezultati ovog ispitivanja su predstavljeni kao procenat vezanih u odnosu na naneti broj ćelija (Slika 13). Primećen je sličan trend vezivanja svih analiziranih enterokoka za kolagen ($74,1\% \pm 4,1\%$) kao i fibronektin ($73,9\% \pm 2,7\%$). U oba slučaja, najmanji afinitet vezivanja je imao *En. durans* BGGO8-30 ($59,8\% \pm 2,1\%$ za kolagen i $61,8\% \pm 1,5\%$ za fibronektin), dok se *En. faecium* BGGO9-28 vezivao sa najvećim afinitetom ($84,5\% \pm 5,3\%$ za kolagen i $94,7\% \pm 2\%$ za fibronektin).



Slika 13. Vezivanje enterokoka za komponente ekstraćelijskog matriksa, kolagen i fibronektin. Rezultati vezivanja za A) imobilisani kolagen i B) imobilisani fibronektin su predstavljeni kao procenat vezanih u odnosu na početni broj ćelija.

4.3.4. Ispitivanje vezivanja enterokoka za HT29-MTX ćelijsku liniju

U cilju ispitivanja adhezije enterokoka korišćene je ćelijska linija humanih peharastih ćelija gastrointestinalnog epitela HT29-MTX, ćelije koje imaju sposobnost da sekretuju mucin. Rezultati vezivanja enterokoka za HT29-MTX ćelije su predstavljeni kao procenti vezanih bakterija u odnosu na ukupan broj nanetih bakterija (Slika 14). Testirane enterokoke se vezuju za HT29-MTX u proseku $86,7\% \pm 5,4\%$, pri čemu je najmanji afinitet vezivanja imao *En. faecium* BGPAS1-20 ($73,4\% \pm 3,3\%$), dok se *En. durans* BGG08-25 vezivao sa najvećim afinitetom ($97,5\% \pm 4,3\%$).



Slika 14. Vezivanje enterokoka za humane peharaste ćelije gastrointestinalnog epitela HT29-MTX. Rezultati vezivanja enterokoka za HT29-MTX ćelije su predstavljeni kao procenat vezanih bakterija u odnosu na ukupan broj nanetih bakterija.

4.3.5. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti

U cilju ispitivanja antimikrobne aktivnosti na *En. faecalis* BG221, *L. monocytogenes* ATCC19111, *St. aureus* ATCC25923, *Lc. lactis* subsp. *lactis* MN1-596, *E. coli* ATCC25922 i *Salmonella* Enteritidis 654/7E, odabrani enterokokalni sojevi su testirani u difuzionom testu sa bunarićima. Na osnovu rezultata, pri primenjenim uslovima, deset testiranih sojeva je imalo antimikrobni efekat na *En. faecalis* BG221, dok su samo BGPAS1-3 i BGZLM1-5 imali antimikrobni efekat na *L. monocytogenes* ATCC19111. Ispitivani sojevi nisu pokazali antimikrobnu aktivnost na *St. aureus* ATCC25923 i *Lc. lactis* subsp. *lactis* MN1-596 kao ni na Gram-negativne patogene *E. coli* ATCC25922 i *Salmonella* Enteritidis 654/7E (Tabela 12).

Tabela 12. Antimikrobni potencijal odabranih enterokoka.

Testirani sojevi	<i>En. faecalis</i> BG221	<i>L. monocytogenes</i> ATCC19111	<i>St. aureus</i> ATCC25923	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MN1-596	<i>E. coli</i> ATCC25922	<i>Salmonella</i> Enteritidis 654/7E
BGGO8-25	■					
BGGO8-26	■					
BGGO8-30						
BGGO9-28						
BGGO9-30	■					
BGGO11-27						
BGGO11-29	■	■				
BGPAS1-3	■	■				
BGPAS1-4						
BGPAS1-10						
BGPAS1-20	■					
BGPAS1-58						
BGPAS1-71						
BGRE2-40	■					
BGRE2-48						
BGVL2a-53	■					
BGVL2a-55						
BGTRK4-42						
BGTRS10-45	■					
BGBU1-46						
BGPT2-84						
BGAL3-19						
BGZLM1-5	■	■				

Napomena: Zasenčena polja predstavljaju antimikrobnu aktivnost enterokoka.

4.4. Probiotička karakterizacija *Enterococcus faecium* BGPAS1-3

Za probiotičku karakterizaciju izabran je soj *En. faecium* BGPAS1-3 koji je izolovan iz mladog sira iz ruralnog područja u okolini grada Pale, Bosna i Hercegovina. BGPAS1-3 nema hemolitičku i želatinaznu aktivnost, osetljiv je na deset antibiotika: ampicilin, vankomicin, gentamicin, eritromicin, tetraciklin, hloramfenikol, linezolid, rifampicin, ciprofloksacin i levofloksacin i ne formira biofilm. Ispitivanjem probiotičkih karakteristika pokazano je da BGPAS1-3 preživljava u nepovoljnim uslovima GIT, da se vezuje za mucin i proteine EĆM sa velikim afinitetom i ima antimikrobni efekat na *En. faecalis* BG221 i *L. monocytogenes* ATCC19111. Pored ispitivanja potencijalnog probiotičkog potencijala živog soja, a uzimajući u obzir kontroverzni status enterokoka, kao i radi boljeg razumevanja efekta

bakterijske ćelije na eukariotske ćelije, u daljim ispitivanjima pored živih ćelija, koristile su se i toplotom ubijene ćelije *En. faecium* BGPAS1-3 na 100°C tokom 30 minuta.

4.4.1. Ispitivanje antimikrobnog delovanja *Enterococcus faecium* BGPAS1-3

U cilju ispitivanja spektra delovanja antimikrobnog jedinjenja *En. faecium* BGPAS1-3, difuzionim testom sa bunarićima, testirana je antimikrobna aktivnost na laktobacile, laktokoce, enterokoce, najčešće patogene bakterije koje se mogu naći u hrani i višestruko rezistentne patogene (Tabela 13).

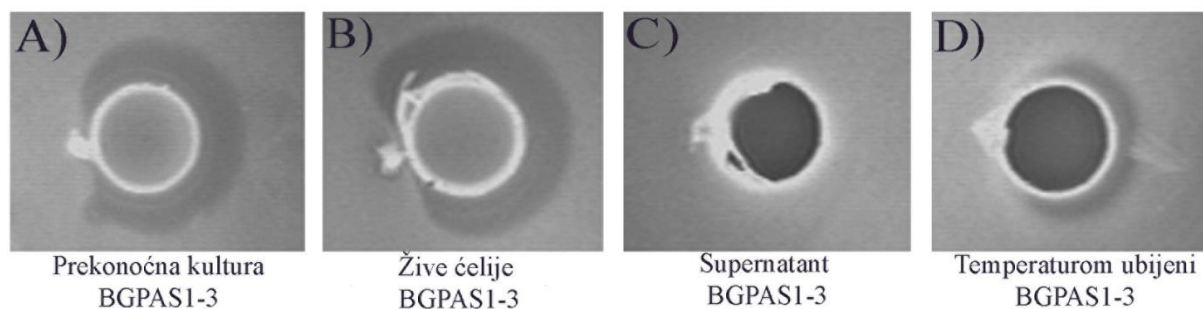
Tabela 13. Spektar antimikrobnog delovanja *En. faecium* BGPAS1-3.

Indikatorski soj		Indikatorski soj	
<i>Streptococcus pneumoniae</i> P173	-	<i>Streptococcus mutans</i> BGSF1	-
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC19111	+	<i>Enterococcus faecalis</i> BG221	+
<i>Streptococcus pyogenes</i> A2941	-	<i>Streptococcus agalactiae</i> B165	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	-	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MN1-596	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	-	<i>Salmonella</i> Enteritidis 654/7E	-
<i>Bacillus cereus</i> ATCC11778	-	<i>Enterococcus faecalis</i> V583	-
<i>Bacillus subtilis</i> 168	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Ni9	+
<i>Enterococcus faecium</i> DDE3	-	<i>Achromobacter xylooxidans</i> MS4	-
<i>Streptococcus thermophilus</i> BGKMJ1-36	-	<i>Acinetobacter baumannii</i> 6077/12	+
<i>Erwinia carotovora</i>	+	<i>Chromobacterium violaceum</i> CV026	+
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> BGVLJ1-21	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MMA83	-

Napomena: „+“ - ima antimikrobnu aktivnost, „-“ - nema antimikrobnu aktivnost.

Na osnovu rezultata spektra delovanja antimikrobnog jedinjenja *En. faecium* BGPAS1-3, prikazanih u Tabeli 13, može se zaključiti da antimikrobno jedinjenje BGPAS1-3 ima široki spektar delovanja. Proteinska priroda antimikrobnog jedinjenja je potvrđena testom sa kristalom pronaze E koji je nanet pored bunarčića. U prisustvu kristala pronaze E dolazi do degradacije proteina i pored bunarčića dolazi do pojave polumesečastog izgleda zone inhibicije usled odsustva antimikrobne aktivnosti (Slika 15). Ovim testom je potvrđeno da soj *En. faecium* BGPAS1-3 sintetiše antimikrobno jedinjenje proteinske prirode, izuzev u slučaju *Klebsiella pneumoniae* Ni9 za čiji je antimikrobni potencijal odgovorno neko malo ogransko jedinjenje. Na kraju, da bi se utvrdilo da li se antimikrobno jedinjenje oslobađa u supernatant kulture ili je vezano za ćeliju, testirani su supernatant kulture BGPAS1-3 iz kog su

odstranjene sve ćelije filtriranjem kroz sterilne filtere 0,22 μm (Sartorius), i tri puta oprane i resuspendovane ćelije BGPAS1-3 u PBS-u. Uz bunariće sa kristalima pronaze E u koji je nanesen supernatant kulture BGPAS1-3 nije se pojavila karakteristična polumesečasta zona inhibicije, dok se uz bunariće sa kristalima pronaze E u koje je naneta suspenzija ćelija javlja karakteristična polumesečasta zona (Slika 15). Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da je antimikrobno jedinjenje proteinske prirode vezano za ćeliju.

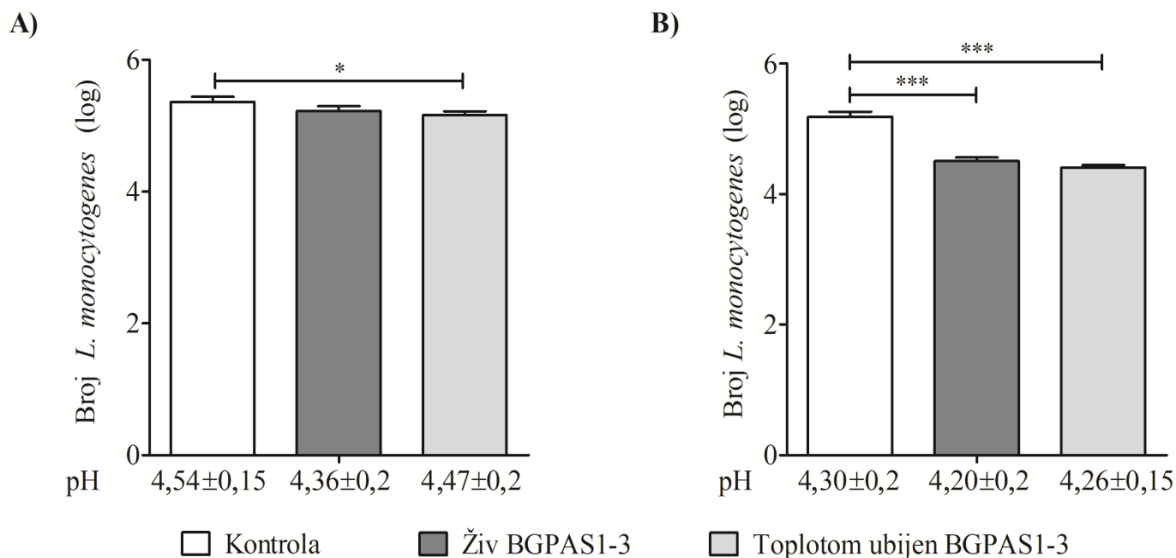


Slika 15. Antimikrobna aktivnost BGPAS1-3. Na slici je prikazana antimikrobna aktivnost prekonoćne kulture BGPAS1-3 (A), živih ćelija BGPAS1-3 (B), supernatanta BGPAS1-3 (C) i temperaturom ubijenih ćelija BGPAS1-3 (D) na *Listeria monocytogenes* ATCC19111.

4.4.2. Efekat živog i toplotom ubijenog BGPAS1-3 na rast *Listeria monocytogenes* ATCC19111 u modelu proizvodnje jogurta

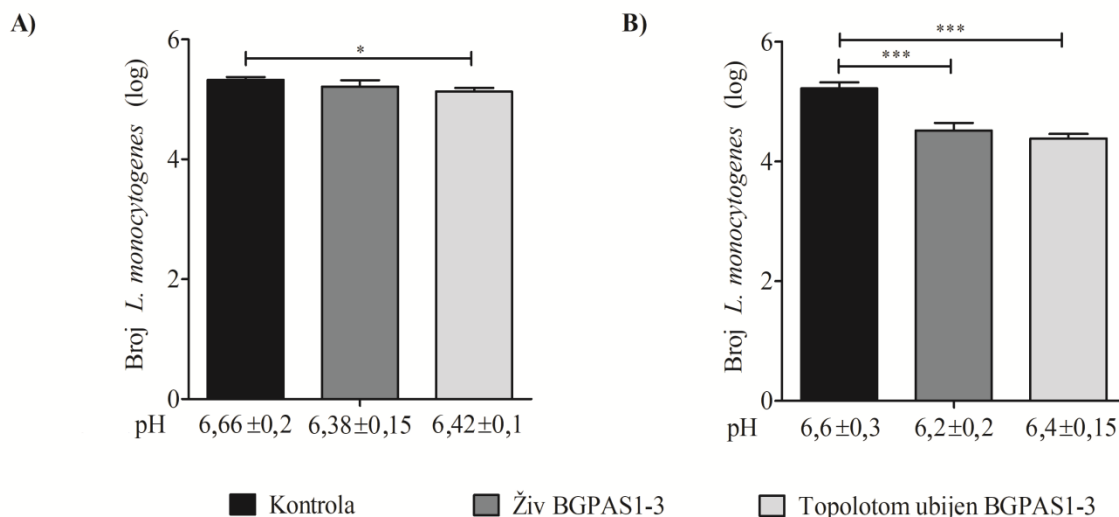
S obzirom da je *En. faecium* BGPAS1-3 pokazao antilisterijski efekat u difuzionom testu u bunarićima, dalje testiranje bilo je usmereno na ispitivanje njegove antilisterijske aktivnosti u modelu proizvodnje jogurta. U svim varijantama modela jogurta, početni broj ćelija *L. monocytogenes* ATCC19111 bio je 10^5 CFU/ml. Rast *L. monocytogenes* ATCC19111 praćen je u sledećim tačkama procesa: 0. dan – pre početka fermentacije, odmah nakon dodatka jogurtne kulture i živog ili toplotom ubijenog BGPAS1-3; 1. dan – nakon skladištenja modela jogurta na temperaturi 4°C tokom 24 h; 7. dan – nakon skladištenja modela jogurta na temperaturi 4°C tokom 7 dana; i 14. dan – nakon skladištenja modela jogurta na temperaturi 4°C tokom 14 dana. Tokom 5 h fermentacije na 42°C se ne menja broj ćelija *L. monocytogenes* ATCC19111 ni u jednoj od varijanti u odnosu na inokulisani broj od 10^5 CFU/ml (varijanta I) (Grafik nije prikazan). U toku prva 24 h skladištenja na 4°C, u varijanti C broj ćelija *L. monocytogenes* ATCC19111 bio je nepromenjen (Δ 0,1 - 0,14 log/ml), dok se u varijanti D beleži smanjenje broja ćelija *L. monocytogenes* ATCC19111 za

0,2 – 0,25 log/ml. Trend smanjenja broja *L. monocytogenes* ATCC19111 se nastavlja i tokom 7 dana skladištenja modela sistema jogurta na temperaturi od 4°C u varijanti C za 0,65 - 0,68 log/ml i u varijanti D za 0,70 - 0,78 log/ml (Slika 16).



Slika 16. Broj *L. monocytogenes* ATCC19111 u modelu proizvodnje jogurta u varijantama B, C i D nakon prvog i sedmog dana skladištenja na 4°C. Slika A predstavlja broj *L. monocytogenes* ATCC19111 nakon prvog dana. Slika B predstavlja broj *L. monocytogenes* ATCC19111 nakon sedmog dana. Rezultati su predstavljeni kao log srednje vrednosti tri nezavisna eksperimenta u tri ponavljanja ± standardna devijacija. Jednofaktorska ANOVA i Tukey *post hoc* test su korišćeni za poređenje tretmana (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$). KMJ1-36/BGVLJ1-21/*L. monocytogenes* predstavlja varijantu B, KMJ1-36/BGVLJ1-21/*L. monocytogenes*/živ BGPAS1-3 predstavlja varijantu C, KMJ1-36/BGVLJ1-21/*L. monocytogenes*/toplotom ubijen BGPAS1-3 predstavlja varijantu D.

U varijanti sistema modela jogurta G broj *L. monocytogenes* ATCC19111 tokom prvih 24 h nije se značajno smanjio, dok se u varijanti H broj *L. monocytogenes* ATCC19111 smanjio za 0,22 – 0,28 log/ml. Trend smanjenja broja *L. monocytogenes* ATCC19111 tokom skladištenja 7 dana na 4°C se nastavio kako u varijanti G (0,65 – 0,73 log/ml) tako i u varijanti H (0,75 – 0,82 log/ml) (Slika 17).



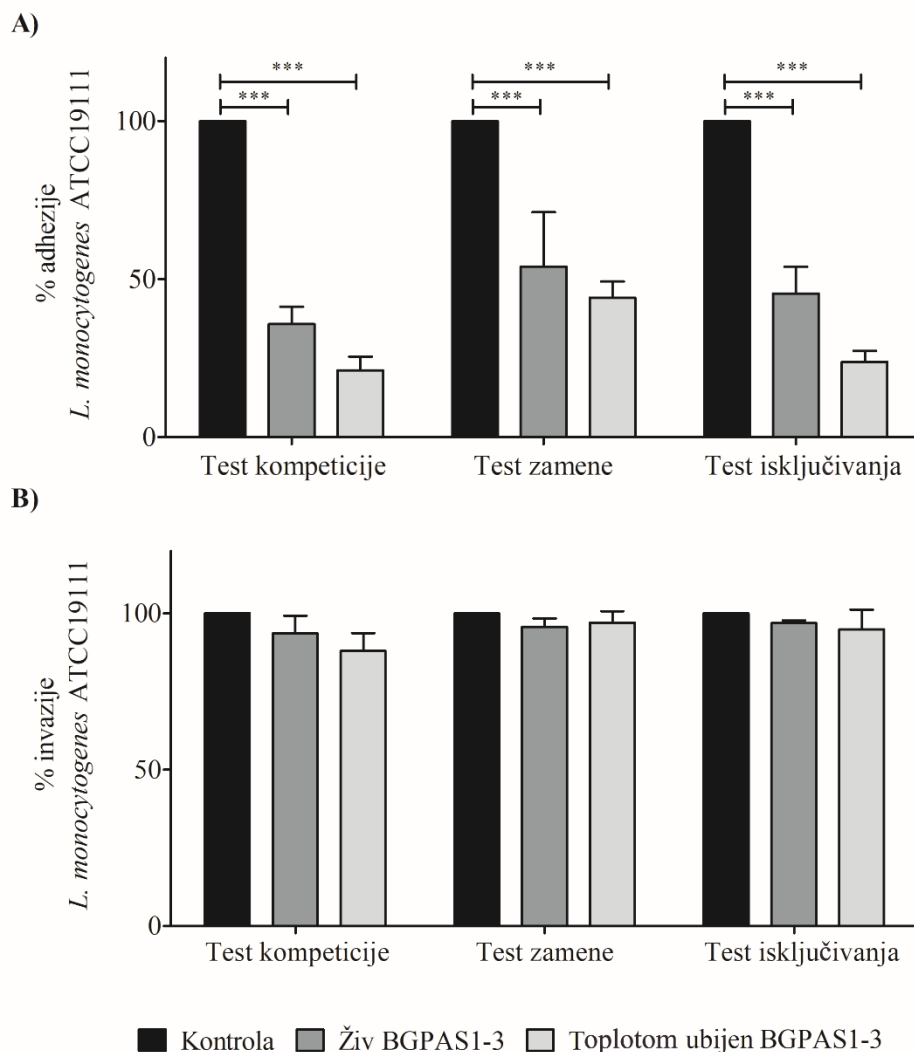
Slika 17. Broj *L. monocytogenes* ATCC19111 u modelu proizvodnje jogurta u varijantama G, H i I nakon prvog i sedmog dana skladištenja na 4°C. Slika A predstavlja broj *L. monocytogenes* ATCC19111 nakon prvog dana. Slika B predstavlja broj *L. monocytogenes* ATCC19111 nakon sedmog dana. Rezultati su predstavljeni kao log srednje vrednosti tri nezavisna eksperimenta u tri ponavljanja ± standardna devijacija. Jednofaktorska ANOVA i Tukey *post hoc* test su korišćeni za poređenje tretmana (* p<0,05; *** p<0,001). *L. monocytogenes* predstavlja varijantu I, *L. monocytogenes*/živ soj BGPAS1-3 predstavlja varijantu G, *L. monocytogenes*/toplotom ubijen BGPAS1-3 predstavlja varijantu H.

Nakon 14 dana skladištenja na 4°C nije detektovana *L. monocytogenes* ATCC19111 s obzirom da je pH bila između 4,15 i 4,0. Sagledavajući ceo proces proizvodnje model sistema jogurta, evidentno je da u varijanti B nije bilo antilisterijske aktivnosti (negativna kontrola), dok je u svi ostalim varijantama detektovana antilisterijska aktivnost. U varijanti I, od početka do kraja procesa beleži se nepromenjen broj ćelija *L. monocytogenes* ATCC19111, u odnosu na početni broja (10^5 CFU/ml).

4.4.3. Efekat živog i toplotom ubijenog BGPAS1-3 na adheziju i invaziju *Listeria monocytogenes* ATCC19111 na diferenciranim Caco-2 ćelijama

Nakon dobijanja rezultata u *in vitro* modelima sa bunarićima i proizvodnji jogurta, sledeći cilj je bio da se ispita efekat živog i toplotom ubijenog BGPAS1-3 na adheziju i invaziju *L. monocytogenes* ATCC19111 na diferenciranim Caco-2 ćelijama. U skladu sa tim, urađeno je brojanje *L. monocytogenes* ATCC19111 koje su se tokom 1 h infekcije bez

prisustva živog ili toplotom ubijenog BGPAS1-3 (pozitivna kontrola) vezale za površinu diferenciranih Caco-2, kao i koje su ušle u ćeliju.

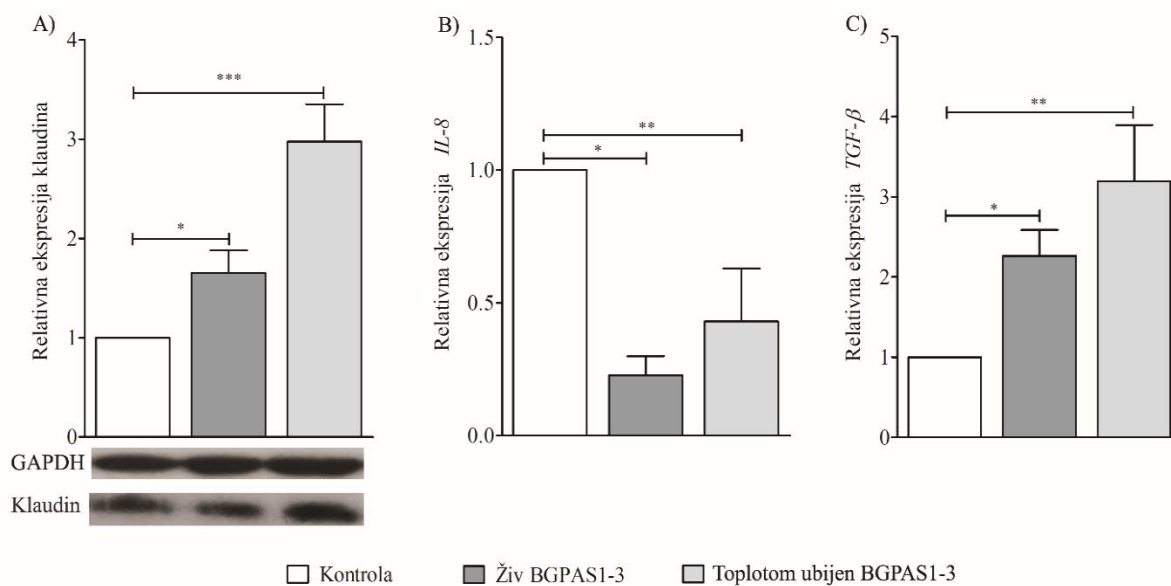


Slika 18. Efekat živog i toplotom ubijenog BGPAS1-3 na adheziju i invaziju *L. monocytogenes* ATCC19111 za diferencirane Caco-2 ćelije. Na graficima je prikazan broj ćelija *L. monocytogenes* ATCC19111 koji se A) vezao za diferencirane Caco-2 ćelije i B) koji je ušao u diferencirane Caco-2 ćelije, u testovima kada su BGPAS1-3 i *L. monocytogenes* ATCC19111 koninkubirane istovremeno na Caco-2 ćelijama (test kompeticije), Caco-2 ćelije su prvo inficirane sa *L. monocytogenes* ATCC19111, a nakon toga tretirane sa BGPAS1-3 (test zamene), Caco-2 ćelije su prvo tretirane sa BGPAS1-3, a nakon toga inficirane sa *L. monocytogenes* ATCC19111 (test isključivanja). Rezultati adhezije (Slika A) i invazije (Slika B) za diferencirane Caco-2 ćelije predstavljeni su kao procenat vezanih u odnosu na početni broj ćelija. Jednofaktorska ANOVA i Tukey *post hoc* test su korišćeni za poređenje tretmana (***) $p < 0,001$). Kontrola predstavlja procenat *L. monocytogenes* ATCC19111 koji se vezao ili ušao u diferencirane Caco-2 ćelije bez prethodnog ili naknadnog tretiranja sa živim ili temperaturom ubijenim BGPAS1-3 tokom vremena koje odgovara svakom pojedinačnom testu.

Ukoliko se za površinu diferenciranih Caco-2 ćelija tokom 1 h infekcije vezalo 100% *L. monocytogenes* ATCC19111, tokom istovremene koinkubacije *L. monocytogenes* ATCC19111 sa živim BGPAS1-3 (test kompeticije) došlo je do smanjenja na $64,2\% \pm 5,5\%$, odnosno do smanjenja na $78,9\% \pm 4,4\%$ sa toplotom ubijenim BGPAS1-3. Sa druge strane, u testu zamene gde su Caco-2 ćelije nakon infekcije *L. monocytogenes* ATCC19111 u trajanju od 1 h tretirane sa živim i toplotom ubijenim BGPAS1-3 tokom 2 h, broj *L. monocytogenes* ATCC19111 koji se vezao za površinu diferenciranih Caco-2 ćelija bio je smanjen na $54,5\% \pm 8,8\%$ u tretmanu sa živim BGPAS1-3, odnosno $76,3\% \pm 3,5\%$ sa toplotom ubijenim BGPAS1-3. U testu isključivanja broj *L. monocytogenes* ATCC19111 koji se vezao za Caco-2 ćelije nakon tretmana sa živim ili toplotom ubijenim BGPAS1-3 je bio $53,6\% \pm 4,9\%$ i $55,9\% \pm 5,2\%$ redom (Slika 18a). Živ i toplotom ubijen BGPAS1-3 ne utiču na invaziju *L. monocytogenes* ATCC19111 u odnosu na netretirane inficirane Caco-2 ćelije (Slika 18b).

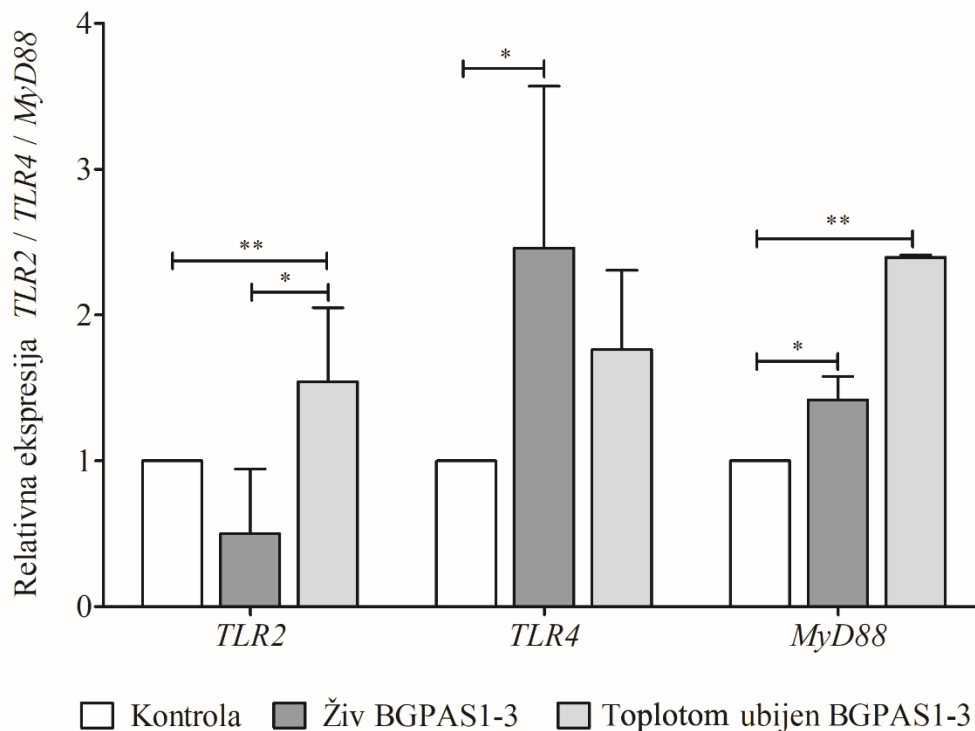
4.4.4. Efekat živog i toplotom ubijenog BGPAS1-3 na Caco-2 ćelije: ekspresija proteina čvrstih veza, IL-8 i TGF- β

Da bi se pretpostavio efekat živog i toplotom ubijenog BGPAS1-3 na osobine epitelnih ćelija važne za odgovor domaćina na crevne infekcije, testirali smo efekat BGPAS1-3 na ekspresiju proteina čvrstih veza (klaudina), IL-8 i TGF- β na modelu diferenciranih epitelnih ćelija poreklom od adenokarcinoma, Caco-2. Tretman diferenciranih Caco-2 ćelija sa živim i toplotom ubijenim BGPAS1-3 stimuliše nivo ekspresije klaudina na nivou iRNK i proteina (Slika 19a). Nivo ekspresije *IL-8* iRNK nakon tretmana je smanjen (Slika 19b), dok je nivo ekspresije *TGF- β* iRNK bio povećan (Slika 19c).



Slika 19: Efekat živog i toplotom ubijenog BGPAS1-3 na ekspresiju A) kladina, B) *IL-8* i C) *TGF-β* u diferenciranim Caco-2 ćelijama. Ćelije su tretirane sa živim i toplotom ubijenim BGPAS1-3 u trajanju od 2 h. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti tri nezavisna eksperimenta u triplicatu ± standardna devijacija. Jednofaktorska ANOVA i Tukey *post hoc* test su korišćeni za poređenje tretmana (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$).

Da bi se ispitaio potencijalni mehanizam kojim živi i toplotom ubijeni BGPAS1-3 dovode do promene u ekspresiji ovih molekula, praćeni su nivoi ekspresije *TLR2*, *TLR4* i *MyD88* iRNK. Nakon tretmana diferenciranih Caco-2 ćelija živim BGPAS1-3 nivo ekspresije *TLR2* iRNK je bio nepromenjen u odnosu na netretirane Caco-2 ćelije, dok je tretman toplotom ubijenim BGPAS1-3 stimulisao nivo ekspresije *TLR2* iRNK. Nasuprot tome, tretmani živim ili toplotom ubijenim BGPAS1-3 stimulisali su nivo ekspresije *MyD88* iRNK, dok je živ BGPAS1-3 povećao ekspresiju *TLR4* iRNK (Slika 20).

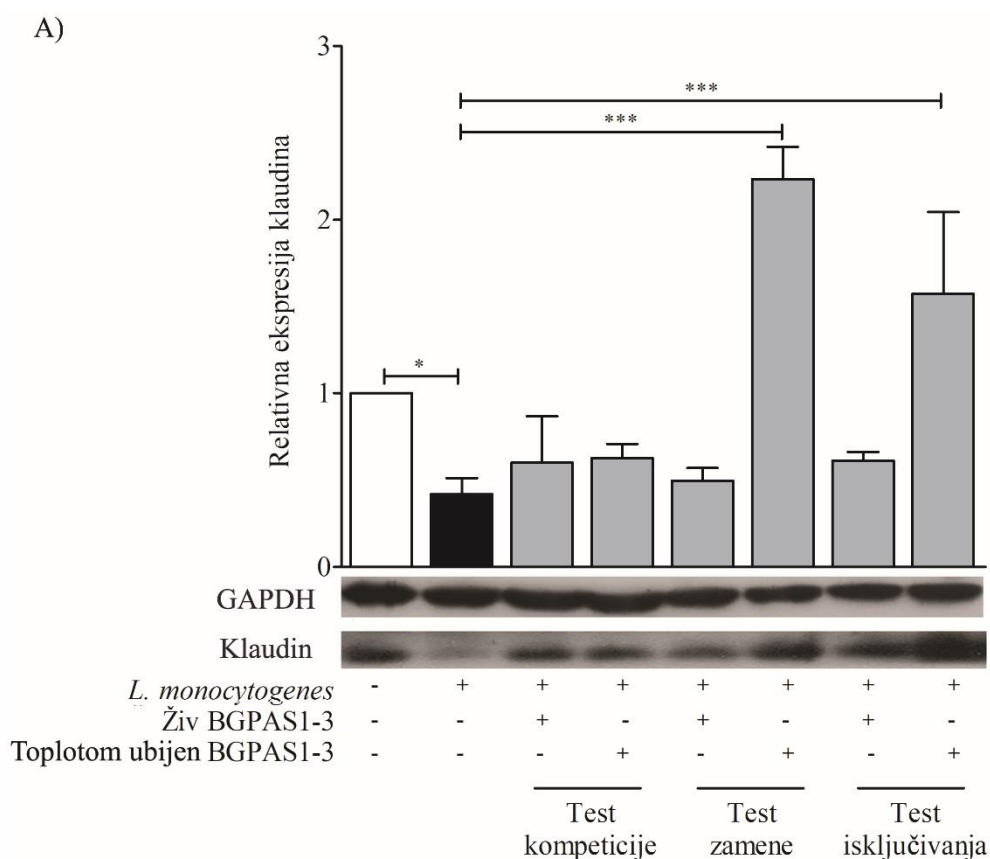


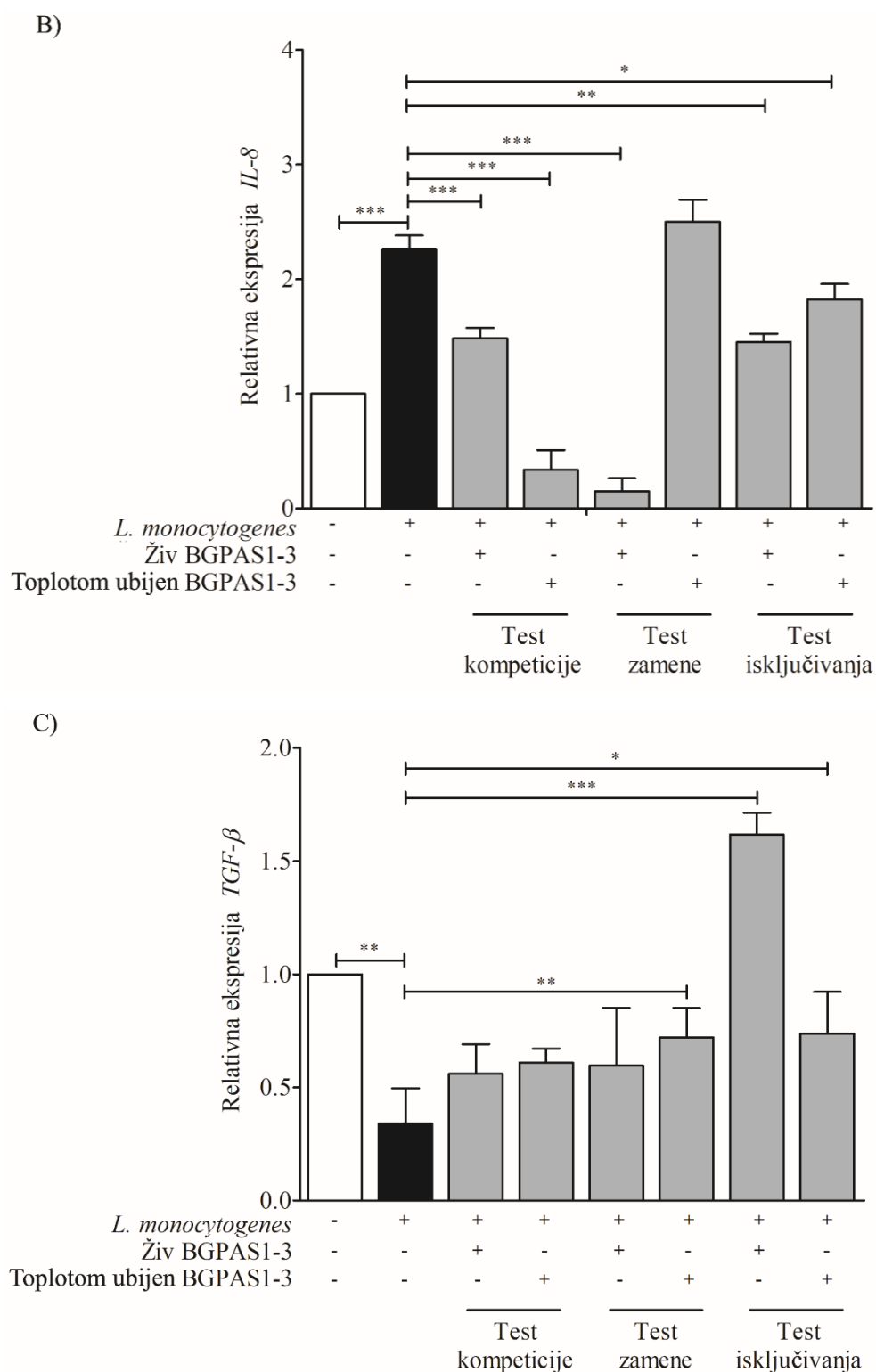
Slika 20. Efekat živog i toplotom ubijenog BGPAS1-3 na ekspresiju *TLR2*, *TLR4* i *MyD88* iRNK u diferenciranim Caco-2 ćelijama. Ćelije su tretirane sa živim i toplotom ubijenim BGPAS1-3 u trajanju od 2 h. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti tri nezavisna eksperimenta u triplikatu \pm standardna devijacija. Jednofaktorska ANOVA i Tukey *post hoc* test su korišćeni za poređenje tretmana (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$).

4.4.5. Efekat živog i toplotom ubijenog BGPAS1-3 na modelu infekcije *Listeria monocytogenes* ATCC19111 diferenciranih Caco-2 ćelija

Da bi se ispitao efekat živog i toplotom ubijenog BGPAS1-3 na modelu *in vitro* infekcije *L. monocytogenes* ATCC19111, tretmani su postavljeni kao na već opisan način (Materijal i metode 3.10.4.). Tokom infekcije Caco-2 ćelija sa *L. monocytogenes* ATCC19111 u trajanju od 1 h, smanjen je nivo ekspresije klaudina, i na nivou iRNK, i na proteinskom nivou. U različitim tretmanima sa živim ili toplotom ubijenim BGPAS1-3 nivo ekspresije klaudina i na novou iRNK i na nivou proteina nije promenjen, izuzev u testu zamene sa toplotom ubijenim BGPAS1-3 i u testu isključivanja sa toplotom ubijenim BGPAS1-3 gde dolazi do povećanja nivoa ekspresije klaudina i na novou iRNK i na nivou proteina (Slika 21a). Nivo ekspresije *IL-8* iRNK je bio povećan nakon infekcije sa *L. monocytogenes* ATCC19111, dok je tokom različitih tretmana sa živim ili toplotom ubijenim BGPAS1-3 uočeno smanjenje nivoa ekspresije *IL-8* iRNK u odnosu na nivo izmeren u

prisustvu same *L. monocytogenes* ATCC19111, odnosno nivo *IL-8* iRNK ostao je na nivou kao kod netretiranih Caco-2 ćelija. Interesantno je da je samo u slučaju infekcije Caco-2 ćelija *L. monocytogenes* ATCC19111 i naknadnim izlaganjem ćelija toplotom ubijenim BGPAS1-3 (test zamene) nivo ekspresije *IL-8* iRNK ostao nepromenjen u odnosu na ekspresiju ovog citokina u prisustvu same *L. monocytogenes* ATCC19111 (Slika 21b). Infekcija diferenciranih Caco-2 *L. monocytogenes* ATCC19111 dovela je do smanjenja nivoa ekspresije *TGF-β* iRNK, dok toplotom ubijeni BGPAS1-3 u test zamene i test isključivanja dovodi do povećanog nivoa *TGF-β* iRNK na nivo kod netretiranih Caco-2 ćelija. U slučaju predtretmana Caco-2 ćelija živim BGPAS1-3 u testu isključivanja ekspresija *TGF-β* iRNK značajno je veća i od nivoa ekspresije u netretiranim Caco-2 ćelijama (Slika 21c).

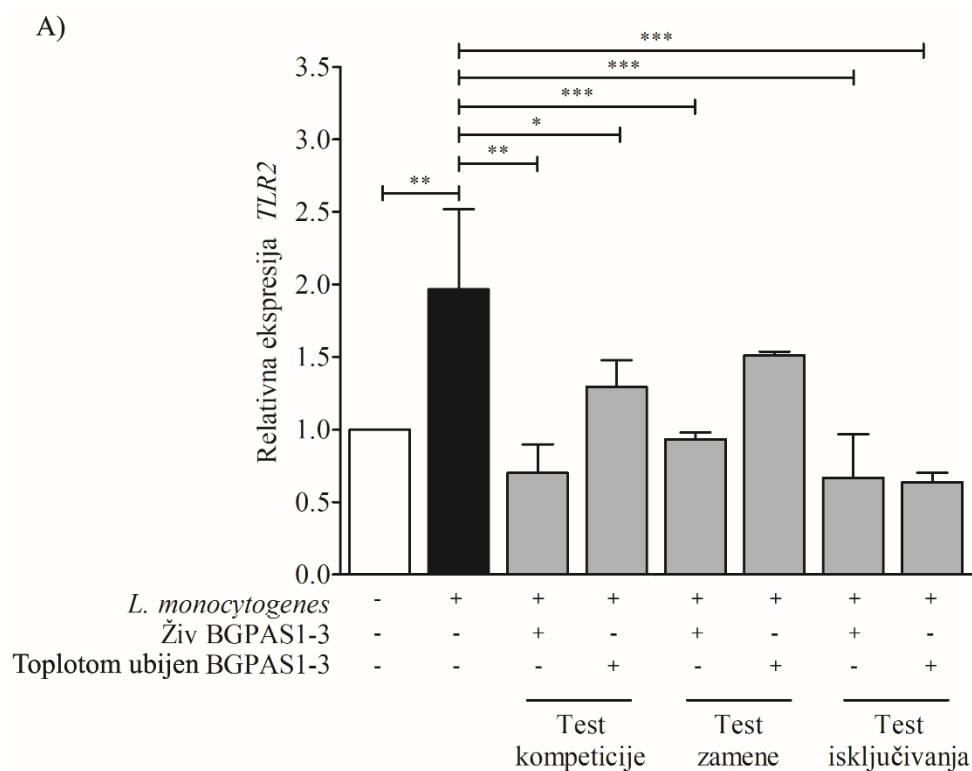


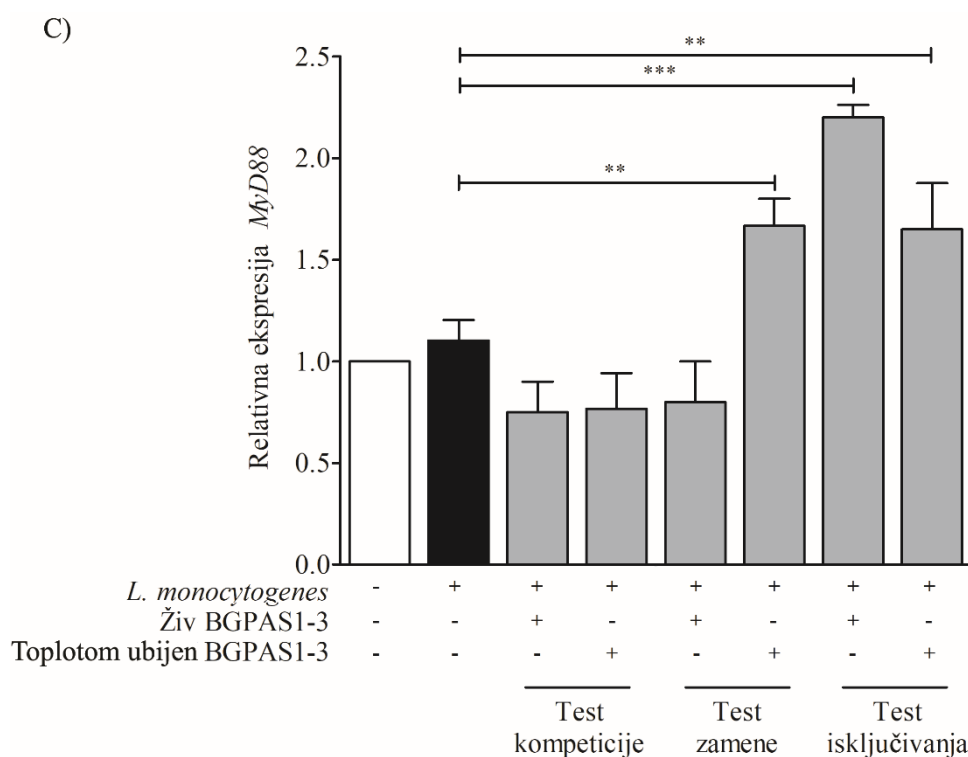
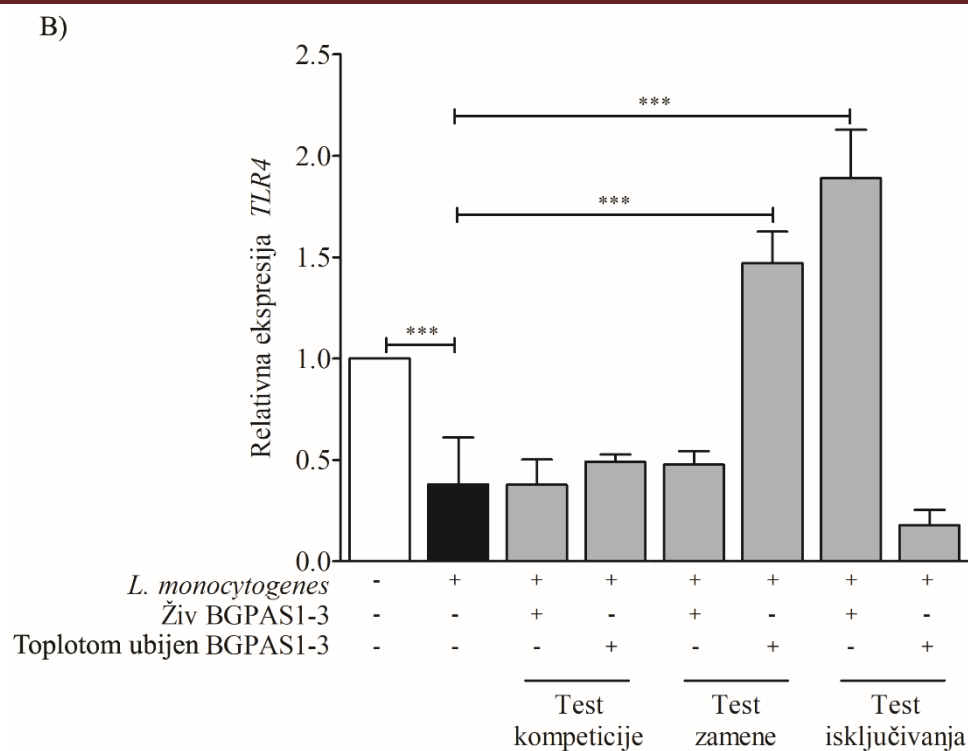


Slika 21. Efekat *L. monocytogenes* ATCC19111, živog i toplotom ubijenog BGPAS1-3 na ekspresiju A) kladina, B) *IL-8* i C) *TGF-β* iRNK u diferenciranim Caco-2 ćelijama u testovima kompeticije, zamene i isključivanja. Tri različita testa su urađena na diferenciranim Caco-2 ćelijama: 1) kompeticija živih ili toplotom ubijenih ćelija BGPAS1-3 i *L. monocytogenes* ATCC19111 na diferenciranim Caco-2 ćelijama tokom 1 h; 2) test zamene, *L. monocytogenes* ATCC19111 je inkubirana na diferenciranim Caco-2 ćelijama tokom 1 h, zatim su ćelije oprane 3 puta sa PBS i tretirane živim ili toplotom ubijenim BGPAS1-3 tokom 2 h; 3) test

isključivanja, Caco-2 ćelije tretirane su živim ili toplotom ubijenim BGPAS1-3 tokom 2 h, isprane 3 puta sa PBS i tretirane tokom 1 h sa *L. monocytogenes* ATCC19111. Kao kontrole koristile su se Caco-2 ćelije koje su tretirane samo sa *L. monocytogenes* ATCC19111 tokom 1 h. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti tri nezavisna eksperimenta u triplicatu \pm standardna devijacija. Jednofaktorska ANOVA i Tukey *post hoc* test su korišćeni za poređenje tretmana (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$).

Da bi se ispitao potencijalni molekularni mehanizam delovanja BGPAS1-3 na Caco-2 inficirane *L. monocytogenes* ATCC19111, praćeni su nivoi ekspresije *TLR2*, *TLR4* i *MyD88* iRNK. Infekcija diferenciranih Caco-2 ćelija sa *L. monocytogenes* ATCC19111 stimuliše ekspresiju *TLR2* iRNK. Nivo *TLR2* iRNK je bio smanjen u svim tretmanima, izuzev kada su Caco-2 ćelije tretirane sa toplotom ubijenim BGPAS1-3 u testu zamene kada je nivo iRNK za ovaj molekul ostao nepromenjen (Slika 22a). S druge strane, infekcija diferenciranih Caco-2 ćelija sa *L. monocytogenes* ATCC19111 dovodi do smanjenja ekspresije *TLR4* iRNK, dok je ekspresija iRNK za ovaj receptor povećana u Caco-2 ćelijama tretiranim sa živim BGPAS1-3 u testu zamene ili toplotom ubijenim BGPAS1-3 u testu isključivanja (Slika 22b). Dodatno, nivo ekspresije *MyD88* iRNK ostao je nepromenjen u Caco-2 ćelijama nakon infekcije sa *L. monocytogenes* ATCC19111, dok do povećanja ekspresije ove iRNK dovodi toplotom ubijeni BGPAS1-3 u testu zamene i živi i toplotom ubijenim BGPAS1-3 u testu isključivanja (Slika 22c).





Slika 22. Efekat *L. monocytogenes* ATCC19111, živog i toplotom ubijenog BGPAS1-3 na ekspresiju A) *TLR2*, B) *TLR4* i C) *MyD88* iRNK u diferenciranim Caco-2 ćelijama u testovima kompeticije, zamene i isključivanja. Tri različita testa su urađena na diferenciranim Caco-2 ćelijama: 1) kompeticija živih ili toplotom ubijenih ćelija BGPAS1-3 i *L. monocytogenes* ATCC19111 na diferenciranim Caco-2 ćelijama, 2) test zamene, *L. monocytogenes* ATCC19111 je inkubirana na diferenciranim Caco-2 ćelijama, zatim su ćelije oprane 3 puta sa PBS i tretirane živim ili toplotom ubijenim BGPAS1-3 i 3) test isključivanja, Caco-2 ćelije tretirane su živim

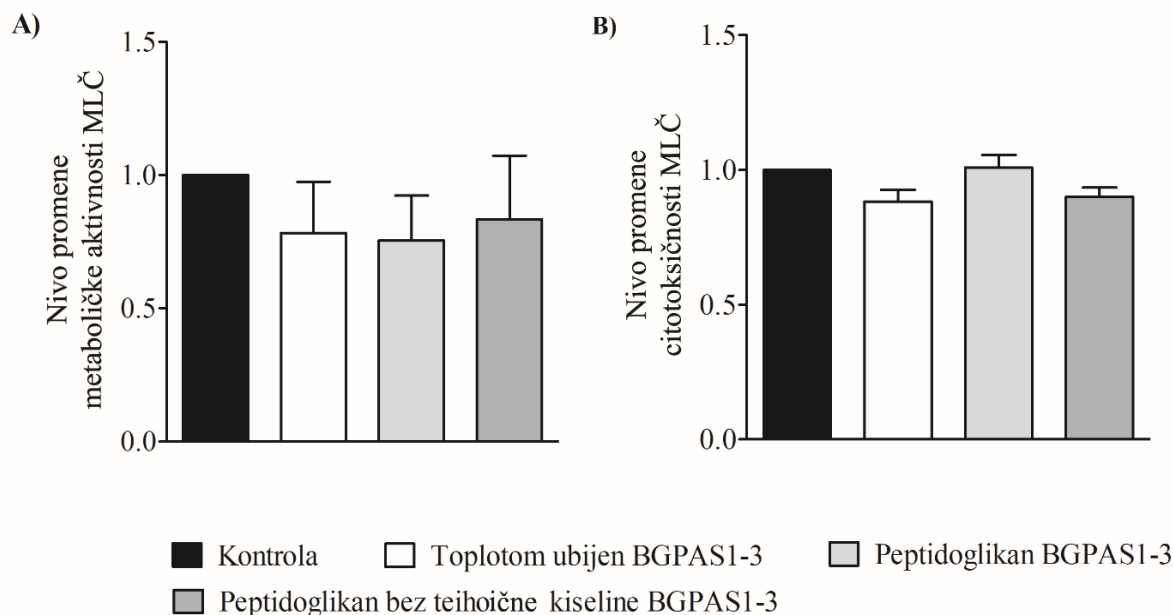
ili toplotom ubijenim BGPAS1-3, isprane 3 puta sa PBS i tretirane sa *L. monocytogenes* ATCC19111. Kao kontrole koristile su se Caco-2 ćelije koje su tretirane samo sa *L. monocytogenes* ATCC19111 kao i neteretirane Caco-2 ćelije. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti tri nezavisna eksperimenta u triplicatu \pm standardna devijacija. Jednofaktorska ANOVA i Tukey *post hoc* test su korišćeni za poređenje tretmana (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$).

4.5. Ispitivanja imunomodulatornog potencijala toplotom ubijenog *Enterococcus faecium* BGPAS1-3 u modelu *in vitro*

Uzimajući u obzir da se temperaturom ubijen BGPAS1-3 pokazao kao dobra alternativa korišćenju živih bakterija, sledeći cilj je bio da se ispita njegova uloga u modulaciji imunskog odgovora. Kao *in vitro* model ispitivanja korišćene su ćelije mezenteričnih limfnih čvorova (MLČ) izolovanih iz mužjaka Wistar pacova. Pored celih ćelija temperaturom ubijenog BGPAS1-3, korišćene su i frakcije peptidoglikana i peptidoglikana bez teihoične kiseline, s obzirom da je pokazano da u zavisnosti od različitih uslova životne sredine u kojima određeni soj enterokoka živi dovodi do izmenjenog efekta ovih molekula na ćelije domaćina.

4.5.1. Uticaj BGPAS1-3 na metaboličku aktivnost ćelija mezenteričnih limfnih čvorova

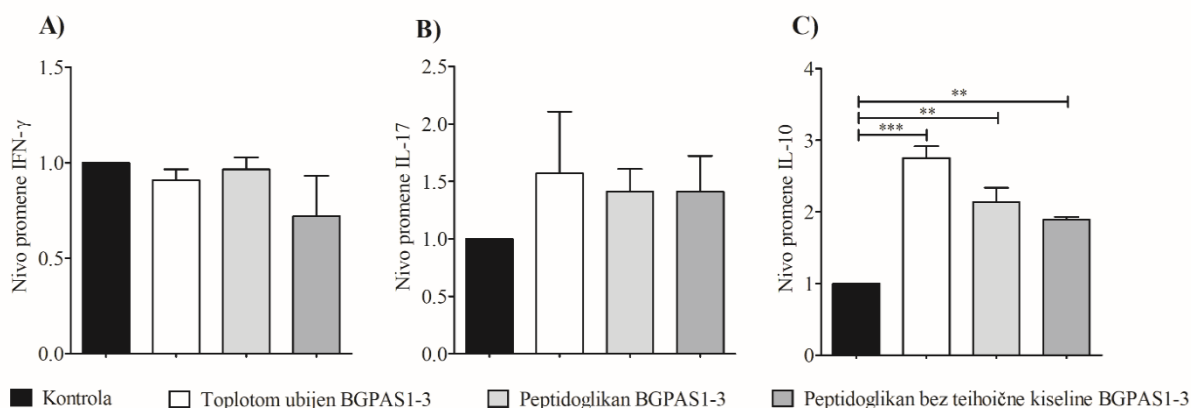
S obzirom da toplotom ubijeni soj poseduje mnogobrojne molekulske obrasce povezane sa mikroorganizmima (engl. microorganism-associated molecular patterns, MAMP), u nastavku istraživanja ispitivali smo njegov imunomodulatorni profil. U ovom smislu korišćene su ćelije MLČ koje su tretirane konkanavalinom A (KonA), nespecifičnim stimulatorom imunskih ćelija, što je široko prihvaćen *in vitro* model inflamacije. Na početku ovih ispitivanja, ispitivano je da li toplotom ubijeni BGPAS1-3, kao i frakcije peptidoglikana i peptidoglikana bez teihoične kiseline BGPAS1-3 u odnosu 1:10 (eukariotska ćelija : prokariotska ćelija) tokom 72 h utiču na vijabilnost i/ili metaboličku aktivnost ovih imunskih ćelija. U ovim ispitivanjima pokazano je da ispitivane frakcije ne menjaju metaboličku aktivnost (Slika 23a) i nisu citotoksične (Slika 23b) u testiranim odnosima.



Slika 23. Uticaj toplotom ubijenog BGPAS1-3, peptidoglikana BGPAS1-3 i peptidoglikana bez teihoične kiseline BGPAS1-3 na metaboličku aktivnost i vijabilost ćelija mezenteričnih limfnih čvorova. Metabolička aktivnost praćena je (A) MTT testom, a vijabilnost ćelija i (B) LDH testom. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti nivoa promene \pm standardna devijacija. Ćelije su stimulisane sa konkanavalinom A i tretmani su trajali 72 h.

4.5.2. Uticaj toplotom ubijenog BGPAS1-3 na produkciju citokina ćelija mezenteričnih limfnih čvorova

Imajući u vidu da su creva bitno mesto za modulaciju imunskog sistema, sledeći cilj je bio da se ispita efekat toplotom ubijenih ćelija BGPAS1-3, peptidoglikana i peptidoglikana bez teihoične kiseline na KonA-stimulisanim MLC u odnosu 1:10 (eukariotska ćelija : prokariotska ćelija). Rezultati su pokazali da je produkcija IFN- γ i IL-17, pro-inflamacijskih citokina ostala nepomenjena u odnosu na netretirane KonA-stimulisane MLC ćelije (Slika 24a i 24b). U tretmanima toplotom ubijenim BGPAS1-3, peptidoglikanom i peptidoglikanom bez teihoične kiseline, produkcija IL-10 je povećana u odnosu na netretirane KonA-stimulisane MLC ćelije (Slika 24c).



Grafik 14. Uticaj toplotom ubijenog BGPAS1-3, peptidoglikana BGPAS1-3 i peptidoglikana bez teihoične kiseline BGPAS1-3 na produkciju citokina ćelija mezenteričnih limfnih čvorova. Ćelije su stimulisane sa konkanavalinom A i različitim frakcijama toplotom ubijenog BGPAS1-3. Nakon 72 h su sakupljeni supernatanti i u njima je ELISA testom merena koncentracija citokina. Rezultati su predstavljani kao srednje vrednosti nivoa promene sekrecije citokina \pm standardna devijacija. Jednofaktorska ANOVA i Tukey *post hoc* test su korišćeni za poređenje tretmana (** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$).

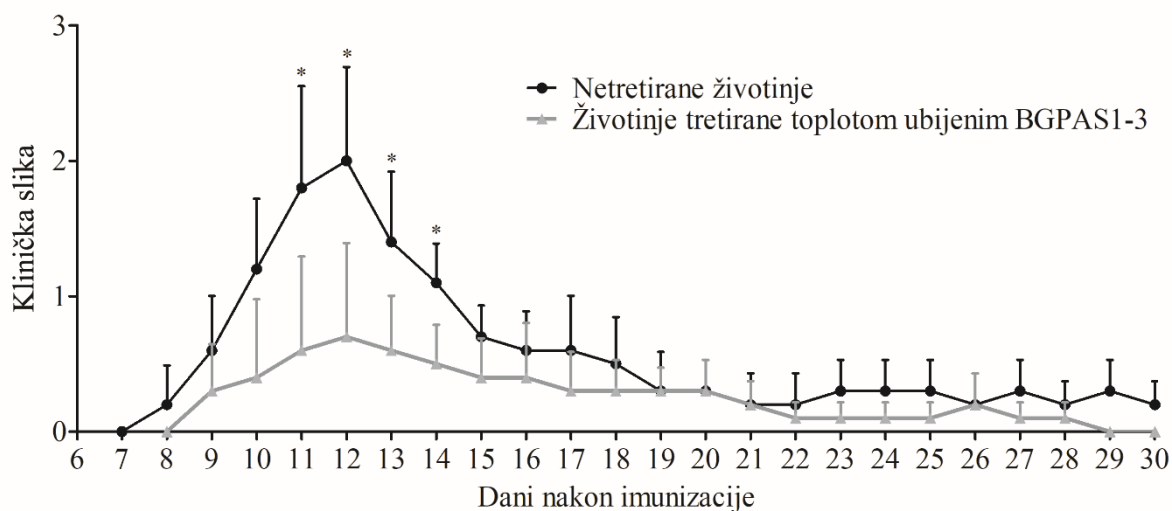
4.6. Ispitivanje imunomodulatornog potencijala toplotom ubijenog *Enterococcus faecium* BGPAS1-3 u modelu *in vivo*

Uzimajući u obzir prethodne rezultate dobijene u modelima *in vitro* gde je toplotom ubijeni BGPAS1-3 doveo do povećanja ekspresije kladina i $TGF-\beta$ iRNK i smanjenja ekspresije $IL-8$ iRNK u diferenciranim Caco-2 ćelijama, kao i povećane produkcije IL-10 kod KonA-stimuliranih MLC ćelija, što je sve ukazalo na potencijalni imunosupresivni i protektivni efekat ovog soja, sledeći cilj bio je da se ispita efekat toplotom ubijenih ćelija na *in vivo* modelu inflamacijske bolesti. Kao *in vivo* model ispitivanja efekta toplotom ubijenog BGPAS1-3 izabran je eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis (EAE), najčešće korišćen životinjski model multiple skleroze (MS).

4.6.1. Efekat toplotom ubijenog BGPAS1-3 na klinički tok eksperimentalnog autoimuskog encefalomijelitisa

U cilju utvrđivanja efekta toplotom ubijenog BGPAS1-3 na klinički tok EAE, ženke Dark Agouti (DA) pacova su imunizovane emulzijom homogenata kičmene moždine (HKM)

i kompletnog Frojndovog adjuvansa (CFA) i 5 mg/ml toplotom ubijenih i liofilizovanih bakterija *Mycobacterium tuberculosis* H37 RA i svaki dan su pile vodu u kojoj je bio resuspendovan toplotom ubijeni BGPAS1-3 tokom 30 dana ogleda (10^9 ćelija po jednom pacovu dnevno). Praćen je klinički tok bolesti. Rezultati su pokazali da primena toplotom ubijenog BGPAS1-3 utiče na klinički tok bolesti ublažavajući simptome u početnim fazama bolesti, na vrhuncu bolesti (Slika 25). Ovi rezultati ukazuju da *in vivo* primena toplotom ubijenog BGPAS1-3 u modelu EAE poseduje terapijski učinak u početnim fazama bolesti.

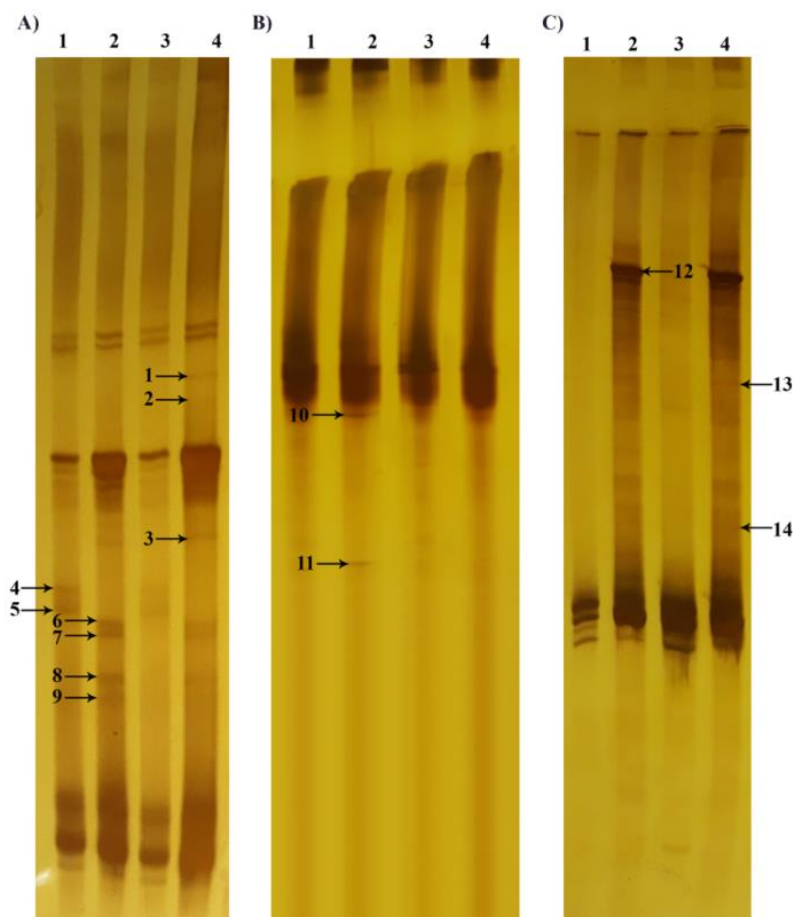


Slika 25. Efekat toplotom ubijenog BGPAS1-3 na klinički tok EAE ženki DA pacova. Ženke DA pacova imunizovane su sa HKM + CFA + *Mycobacterium tuberculosis* H37 RA što je dovelo do ispoljavanja simptoma nalik multiploj sklerozi. Kontrolna grupa životinja pila je samo vodu, dok je eksperimentalna grupa pila toplotom ubijen BGPAS1-3 rastvoren u vodi (10^9 ćelija/pacovu dnevno). Klinička slika bolesti praćena je od 7. do 30. dana. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti ($n=5$ pacova po grupi) \pm standardna devijacija. * $p < 0.05$ predstavlja statističku značajnost u odnosu na kontrolu.

4.6.2. Efekat toplotom ubijenog BGPAS1-3 na mikrobiom imunizovanih ženki Dark Agouti pacova

S obzirom da je pokazano da imunomodulatorne terapije mogu da dovedu do ključnih promena u sastavu mikrobiote, u nastavku je ispitivan efekat ćelija toplotom ubijenog BGPAS1-3 na mikrobiom imunizovanih ženki DA pacova. Izolovana DNK iz fecesa imunizovanih pacova korišćena je kao matrica za dobijanje detaljnog pregleda bakterijske raznolikosti korišćenjem seta prajmera za deo gena za 16S rRNK specifičan za laktobacile, univerzalnog seta prajmera specifičnih za V6-V8 region gena za 16S rRNK i seta prajmera

specifičnih za gen za 16S rRNK roda *Bifidobacterium*. Klonirano je i sekvencirano ukupno 14 jedinstvenih DNK fragmenata, 9 DNK fragmenata dobijenih prajmerima specifičnim za laktobacile, 2 DNK fragmenta dobijena univerzalnim prajmerima i 3 DNK fragmenta dobijene prajmerima specifičnim za bifidobakterije (Slika 26).



Slika 26. Efekat toplotom ubijenog BGPAS1-3 na mikrobiom imunizovanih ženki DA pacova. Elektroforeza u gradijentu denaturišućeg agensa DNK fragmentana dobijenih upotrebom A) seta prajmera za laktobacile, B) univerzalnih prajmera i C) seta prajmera za rod *Bifidobacterium*. Svaka kolona na gelu predstavlja DNA izolovanu iz fecesa cele grupe. Kolona 1 predstavlja grupu pacova (1. dan imunizacije) koja je imunizovana i kasnije nije tretirana sa BGPAS1-3; kolona 2 predstavlja grupu pacova (30. dan nakon imunizacije) koja je imunizovana i nije tretirana sa BGPAS1-3; kolona 3 predstavlja grupu pacova (1. dan imunizacije) koja je imunizovana i kasnije je tretirana sa BGPAS1-3, kolona 4 predstavlja grupu pacova pacova (30. dan nakon imunizacije) koja je imunizovana i tretirana 30 dana sa 10^9 ćelija toplotom ubijenim BGPAS1-3 po pacovu. Trake označene od 1 do 14 su isečene, klonirane i sekvencirane.

Analizom sekvenci specifičnih DNK fragmenata (Prilog 2) utvrđeno je da je *Lb. intestinalis* prisutan samo na početku tretamana (kod još uvek zdravih životinja) dok nije detektovan 30. dana nakon imunizacije niti u kontrolnoj grupi niti u grupi koja je bila toplotom ubijena BGPAS1-3. Interesantno je da su *Lb. murinus* i *En. hirae* prisutne samo u

uzorcima fecesa imunizovanih životinja koje su 30 dana tretirane toplotom ubijenim BGPAS1-3, a nisu prisutni u kontrolnoj grupi. Korišćenjem univerzalnih prajmera pokazano je da se *Shuttleworthia satelles* i *Muribaculum intestinale* pojavljuju samo 30. dan u fecesima kontrolnih imunizovanih životinja koje nisu tretirane sa toplotom ubijenim BGPAS1-3. Analizom sekvenci dobijenih umnožavanjem prajmerima specifičnim za rod *Bifidobacterium* pokazano je prisustvo *Bifidobacterium pseudolongum* samo u fecesima kontrolnih i tretiranih životinja 30 dana nakon imunizacije (Tabela 14).

Tabela 14. Identitet bakterija na osnovu klonova dobijenih iz DGGE fragmenata nakon sekvenciranja.

Prajmeri	Broj trake na gelu	1. dan kontrola	1. dan tretman	30. dan kontrola	30. dan tretman	Bakterijska vrsta
Laktobacilusni prajmeri	1				+	<i>Lactobacillus murinus</i>
	2				+	<i>Enterococcus hirae</i>
	3			+	+	<i>Clostridium straminisolvens</i>
	4	+	+			<i>Lactobacillus intestinalis</i>
	5	+	+			<i>Lactobacillus intestinalis</i>
	6			+	+	<i>Enterococcus asini</i>
	7			+	+	<i>Enterococcus asini</i>
	8			+	+	<i>Lactobacillus gasseri</i>
	9			+	+	<i>Lactobacillus gasseri</i>
Univerzalni prajmeri	10			+		<i>Shuttleworthia satelles</i>
	11			+		<i>Muribaculum intestinale</i>
<i>Bifidobacteria</i> Prajmeri	12			+	+	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>
	13			+	+	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>
	14			+	+	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>

Napomena: + predstavlja prisustvo specifične trake na gelu

5. DISKUSIJA

Enterokoke su rod bakterija koje su se prilagodile različitim okruženjima i preživljavaju nepovoljne uslove sredine u kojoj se nalaze. Naseljavaju gastrointestinalni trakt životinja, od insekata do čoveka i smatra se da su kolonizovale gastrointestinalni trakt naših zajedničkih kopnenih predaka omogućavajući im varenje hrane i zaštitu od invazije potencijalnih patogena (Lebreton i sar. 2017). Zbog ove svoje osobine enterokoke predstavljaju značajan izvor jedinjenja koja potencijalno mogu imati koristan efekat na domaćina u smislu zaštite od patogena i održavanja funkcije imunskog sistema, te mogu biti iskorišćene u prevenciji i tretmanu različitih bolesti domaćina (ljudi i životinja). Pre dve decenije enterokoke nisu smatrane patogenim bakterijama, već relativno bezopasnim, sa malim potencijalom za infekciju ljudi (Chenoweth i Schaberg, 1990). Međutim, poslednjih godina sve je veći broj sojeva sa patogenim potencijalom zbog čega je neophodno ispitati korelaciju između učestalosti pojedinih molekula kod određenih sojeva ovog roda u potencijalu ovih bakterija za patogenezu kao i mehanizme transfera virulentnih osobina enterokoka.

Pored mehanizama kojima enterokoke GIT-a doprinose zdravstvenom statusu domaćina, pojedini sojevi proizvode različita organska jedinjenja zbog kojih se koriste kao starter kulture koje doprinose organoleptičkim karakteristikama fermentisanih proizvoda. Visok diverzitet enterokoka je opisan u fermentisanim mlečnim proizvodima koji se od davnina koriste u ishrani ljudi posebno u Mediteranskim zemljama zbog čega ovi proizvodi mogu predstavljati značajan izvor bakterija sa potencijalno korisnim osobinama, a istovremeno nižom virulentnošću u odnosu na enterokoke izolovane iz drugih staništa (Eaton i Gasson, 2001; Anderson i sar. 2016). U istraživanjima čiji su rezultati deo ove doktorske disertacije ispitivane su osobine sojeva enterokoka izolovanih iz mlečnih proizvoda sa područja Zapadnog Balkana, fermentisanih na tradicionalni način, bez dodataka komercijalnih starter kultura, koje su sastavni deo kolekcije mikroorganizama Laboratorije za molekularnu mikrobiologiju, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu. S obzirom da su ciljevi ove doktorske disertacije bili da se ispituju probiotička i imunomodulatorna svojstva enterokoka iz ovih izvora, kao i učestalost genetičkih determinanti virulencije i osobina i njihovo moguće poreklo, u ovom istraživanju su iz laboratorijske kolekcije odabrani sojevi roda *Enterococcus* za koje je prethodno pokazano da nisu rezistentni na antibiotike prema disk difuzionom testu. Pored ispitivanja

probiotičkog i imunomodulatornog potencijala enterokoka, ispitivan je i virulentni potencijal prirodnih sojeva kako bi se utvrdila bezbednost ispitivanih sojeva i mogućnost dalje upotrebe ovih sojeva za humanu i animalnu primenu.

5.1. Virulentni potencijal enterokoka

Bolničke infekcije kao što su endokarditis, bakteremije i infekcije urinarnog trakta su sve češće uzrokovane enterokokama, pretežno sojevima vrsta *En. faecalis* i u manjoj meri *En. faecium*. Tok infekcije domaćina podrazumeva više različitih koraka kojima prethodi kolonizacija za kojom sledi izbegavanje specifičnih i nespecifičnih odbrambenih mehanizama domaćina. U skladu s tim kod enterokoka je opisano više faktora virulencije od značaja za svaki od koraka razvoja infekcije (Franz i sar. 1999). Poznato je da enterokoke proizvode veliki broj različitih adhezina na površini ćelije, sintetišu toksine i mogu da nose veći broj determinanti rezistencije na antibiotike (Arias i Murray, 2012). Sticanje faktora virulencije omogućava bakterijama da prežive i da uspešno opstaju i da se šire u kompetitivnom okruženju (Kitamoto i sar. 2016).

Važne karakteristike enterokoka su hemolitička i želatinazna aktivnosti (Banwo i sar. 2013). Rezultati naših ispitivanja su pokazali da 14 od 75 sojeva enterokoka (18,7%) izolovanih iz mleka i različitih fermentisanih mlečnih proizvoda pokazuje hemolitičku aktivnost. Među sojevima koji ispoljavaju ovu aktivnost su pripadnici svih ispitivanih vrsta osim *En. hirae*, a najveća zastupljenost unutar vrste je kod *En. faecalis* (2 od 6 sojeva) i *En. italicus* (1 od 3 soja), dok se pokazalo da *En. faecium* ima najmanju zastupljenost sojeva sa ovom virulentnom osobinom (1 od 15 sojeva). Soares-Santos i sar. (2015) pokazali su da je 52% ispitivanih sojeva izolovanih iz hrane ima hemolitičku aktivnost. Beta hemolitička aktivnost najzastupljenija je kod kliničkih izolata (33%), dok je najniža uočena kod izolata iz hrane (6%) (Semedo i sar. 2003). Želatinaznu aktivnost poseduje samo 5 od 50 sojeva (10%) *En. durans*, dok kod ostalih ispitivanih vrsti nije detektovana ova virulentna osobina. Tokom ispitivanja ove virulentne osobine Soares-Santos i sar. (2015) pokazali su da 39% ispitivanih enterokoka ima želatinaznu aktivnost. Sa druge strane, 58% kliničkih izolata i 27% enterokoka izolovanih iz fecesa zdravih osoba poseduje želatinaznu aktivnost (Coque i sar. 1995). Postoji veliki broj studija na različitim životinjskim modelima kao i u kliničkim studijama koje su jasno pokazale povezanost ekspresije hemolizina (citolizina) i povećane

toksičnosti infekcija uzrokovanih enterokokama (Van Tyne i sar. 2013). Takođe, želatinaza kao ekstracelularna metalo-endopeptidaza koja je uključena u hidrolizu želatina, kolagena i drugih bioaktivnih peptida, povećava patogenost u životinjskom modelu, što potvrđuje njegovu ulogu u virulentnosti. Zbog ovakve visoke korelacije između bakterija koje ispoljavaju aktivnosti ovih enzima i učestalosti ovih bakterija u infekcijama, postoji razmuna pretpostavka o patogenosti ispitivanih sojeva koji ispoljavaju aktivnost bilo hemolitičku ili želatinaznu zbog čega su isključeni iz dalje karakterizacije.

Pored produkcije prethodno navedenih fakotra virulencije, najveća prepreka korišćenju enterokoka u ishrani i dodacima za ljude i životinje je pojava otpornosti na antibiotike kod ovih bakterija. Zapravo, virulentnost enterokoka je pojačana njihovom čestom otpornošću na antibiotike koji se često koriste u medicini ili veterini, što čini takve bakterije efikasnim oportunistima u bolničkim infekcijama (Fisher i Phillips, 2009). Iako test disk difuzije ima mnoge prednosti u odnosu na druge metode kao što su jednostavnost, niski troškovi, sposobnost testiranja velikog broja mikroorganizama i antimikrobnih agenasa i lako se tumače dobijeni rezultati, nedostaci ove metode su preciznost prilikom određivanja tačne koncentracije antibiotika kao i loše *in vitro* i *in vivo* korelacije (Balouiri i sar. 2016). Zbog toga je u ovim istraživanjima prilikom bezbednosne procene sojeva urađen i mikrodiluzioni test čime su određene minimalne inhibitorne koncentracije testiranih antibiotika, a rezultati tumačeni prema preporukama Instituta za kliničke i laboratorijske standarde. Iako je za svih 75 sojeva prethodno određeno da su osetljivi na antibiotike, prema rezultatima dobijenim metodom disk difuzije (Terzić-Vidojević i sar. 2015), osetljivost na deset klinički relevantnih antibiotika dodatno je urađena za 56 sojeva enterokoka bez hemolitičke i želatinaze aktivnosti. Samo 23 od 56 sojeva bilo je osetljivo na sve antibiotike, dok je 57% bilo rezistentno samo na ciprofoksacin (27 sojeva) ili samo na gentamicin (6 sojeva). Dakle, iako je veliki broj sojeva osetljiv na sve antibiotike što ukazuje na bezbedan status ovih sojeva, gotovo polovina sojeva enterokoka iz fermentisanim mlečnih proizvoda nosi visoki nivo rezistencije na ciprofoksacin. Rezultati su u skladu sa literaturnim podacima i pokazuju široku upotrebu ovih antibiotika u stočarstvu u regionu Zapadnog Balkana (Fuka i sar. 2017). Ovo je veoma zabrinjavajuće s obzirom da je pokazano da antimikrobni agensi vrše selektivan pritisak ne samo na patogene, već i na komensalne bakterije crevnog trakta ljudi i životinja (van den Bogaard i Stobberingh, 2000). Ovako velika učestalost sojeva bakterija koje nose rezistenciju na ciprofloksacin u proizvodima koje ljudi konzumiraju može se objasniti i time da bakterije mogu bez direktne izloženosti antimikrobnim sredstvima mogu

razmeniti determinante posredstvom horizontalnog transfera gena što im omogućava širenje rezistencije na antibiotike (Cocconcelli i sar. 2003). Ipak, značajan je podatak da nijedan testirani soj nije rezistentan na vankomicin. Rezistencija na vankomicin je od posebnog značaja zbog pojave enterokoka otpornih na vankomicin u bolnicama, koje dovode do ozbiljnih infekcija koje ne mogu biti tretirane konvencionalnom antibiotskom terapijom. S obzirom da je nulta tolerancija prema rezistenciji na antibiotike bila je parametar selekcije sojeva za dalja ispitivanja, sojevi rezistentni na bilo koji od testiranih antibiotika nisu dalje korišćeni u ispitivanjima.

Formiranje biofilma doprinosi bakterijskoj virulenciji omogućavajući im da se vežu za katetere (urinarni i intravaskularni), žučne stentove i silikonske gastrostomske uređaje. Pored toga, biofilmovi doprinose bakterijskoj rezistenciji na antibiotike (Mohamed i sar. 2004) i onemogućavaju fagocitozu, što čini njihovo iskorenjavanje izuzetno teškim. U zreлом biofilmu, bakterijske ćelije mogu tolerisati antibiotike u koncentracijama 10-1000 puta većim od onih potrebnih za ubijanje planktonskih ćelija (Simoes, 2011). U prehrambenoj industriji, biofilm je postao veliki problem, uglavnom zbog činjenice da su mikroorganizmi u opremi za preradu hrane otporni na sredstva za čišćenje i izvore kontaminacije (Lewis, 2001). Međutim, sposobnost komensalnih enterokoka da formiraju biofilm na mukusnom sloju epitela domaćina povezana je sa bržom kolonizacijom i povećanim zadržavanjem u GIT čime ostvaruju direktni pozitivni efekat na ćelije i sprečavaju vezivanje patogenih bakterija (Pometto i Demirci, 2015). Tokom ispitivanja formiranja biofilma odabranih sojeva, u primenjenim uslovima, sposobnost da formira biofilm je imalo 60,8% sojeva, dok 39,2% sojeva nije formiralo biofilm. Većina sojeva koja ne formira biofilm je izolovana iz mlečnih proizvoda sa Golije i sa Pala. Najveći broj sojeva koji formira biofilm pripada *En. durans* (30,4%) i *En. faecium* (21,7%).

Zagađenje životne sredine je rezultat ljudske aktivnosti i demografskih karakteristika sa jedne strane i urbanizacije i industrijalizacije sa druge (Dragicevic i sar. 2010). Rasprostranjeno oslobađanje antibiotika u životnu sredinu usled njihove upotrebe u ljudskoj ili animalnoj medicini, dovelo je povećanog širenja rezistentnih enterokoka u zemljište, vode i hranu (Cabello, 2006). Imajući u vidu prethodno navedeno kao i dobijene rezultate tokom ovog ispitivanja, mogli bismo da pretpostavimo da sojevi izolovani iz fermentisanih proizvoda iz retko naseljenih područja verovatno imaju niži patogeni potencijal, pre svega u smislu nivoa rezistencije na antibiotike.

Neki virulentni geni kao što su agregaciona supstanca, citolizin i želatinaza mogu biti utišani tako da je njihova genotipizacija mnogo pouzdanija od fentotipizacije jer bi takvi geni ostali neotkriveni u *in vitro* stanjima, ali se eksprimiraju *in vivo*, tako da patogeni potencijal takvih sojeva može biti potcenjen (Fuka i sar. 2017). Eaton i Gasson (2001) su pokazali da su faktori virulencije enterokoka prisutni u kliničkim izolatima, izolatima iz hrane i starter kulturama, a zastupljenost je bila najveća među kliničkim sojevima, dok je najniža uočena kod izolata iz startera. Važnu ulogu u kolonizaciji domaćina ima agregacioni faktor (Agg), enterokokalni površinski protein (Esp) i adhezinu slični *En. faecalis* i *En. faecium* antigeni (EfaA^{fs}, EfaA^{fm}). Shodno tome, prisustvo 11 gena koji kodiraju faktore virulencije i potencijalna patogenost sojeva procenjena je pomoću PCR metode. Razlike u učestalosti gena virulentnosti uočene su kod izolata *En. faecalis* i *En. faecium* iz uzoraka od nekuvanog mleka. *En. faecalis* je poznat po tome što sadrži više gena za faktore virulencije nego *En. faecium* (Eaton i Gasson, 2001). Dvadeset i tri soja osetljiva na ispitivane antibiotike su dalje testirani na prisustvo virulentnih gena. Uočeno je da 30,4% sojeva poseduje tri gena koji kodiraju različite faktore virulencije, po 21,7% sojeva sadrži dva, odnosno četiri gena, 17,4% ima pet gena i po 4,3% ispitivanih enterokoka sadrži 6 ili 7 gena koji kodiraju faktore virulencije. Pokazana je visoka zastupljenost gena koji kodiraju adhezine, 73,9% bilo je pozitivno za faktor agregacije, 69,6% imalo je adhezine ćelijskog zida specifične za *En. faecalis*, 56,5% bilo je pozitivno za površinski proteina enterokoka, a 34,8% imalo je adhezine ćelijskog zida specifične za *En. faecium*. U studiji koju su sproveli Soares-Santos i sar. (2015) pokazana je slična zastupljenost faktora virulencije kod enterokoka izolovanih iz hrane. Međutim, Fuka i sar. (2017) pokazali su manju zastupljenost ispitivanih virulentnih faktora kod enterokoka izolovanih iz sira. Različiti proteini na ćelijskoj površini kod probiotičkih bakterija MKB imaju adheziona svojstva i da su povezani sa probiotičkom aktivnošću (Nishiyama i sar. 2016). Zanimljivo je da se podaci koji se odnose na adheziju enterokoka uglavnom zasnivaju na kliničkim izolatima i odnose se na determinante virulencije (Elhadidy i Zahran, 2014). Prisustvo, odnosno odsustvo gena u okviru *fsr* operona može da varira od analiziranog soja (Hashem i sar. 2017). Važno je napomenuti da *cylA* gen koji kodira CylA serinsku proteazu uključenu u aktiviranje citolizina, bakterijskog toksina sa β-hemolitičkim osobinama kod ljudi, kao i *hylN* gen, koji kodira hijaluronidazu, degradativni enzim povezan sa oštećenjem tkiva (Anderson i sar. 2016), nisu otkriveni. Zanimljivo je da aktivnost želatinaze nije detektovana ni u jednom od sojeva pozitivnih na prisustvo *gelE* gena koji je prisutan kod 5 sojeva (21,7%). Rezultati su u skladu sa podacima iz literature koji

sugerišu da *gelE* gen može biti utišan (Franz i sar. 2001). I želatinaza i serinska proteaza su uključene u patogenezu enterokoka obezbeđujući hranljive materije bakterijama razgradnjom tkiva domaćina, ali, takođe imaju ulogu i u formiranju biofilma (Fisher i Phillips, 2009).

5.2. Probiotički potencijal enterokoka

Enterokoke svoju probiotičku ulogu ostvaruju na direktan i indirektan način. Direktni efekat probiotičkog delovanja enterokoka ogleda se u proizvodnji mlečne kiseline i održavanju niske pH vrednosti sredine, koja postaje nepovoljna za mnoge patogene bakterije, kao i proizvodnji raznovrsnih bakteriocina širokog spektra prema Gram-pozitivnim i Gram-negativnim patogenim bakterijama kao konkurentnom isključivanju patogena. Indirektni probiotički efekat enterokoka predstavlja fino balansiranje imunskog odgovora posredovanog imunskim ćelijama, modulaciju humoralnog odgovora kao i poboljšavanje integriteta ćelijske barijere (Iacono i sar. 2011). Da bi se koristile kao probiotici, pored bitne karakteristike da su bezbedni za korišćenje u humanoj i animalnoj medicini, neophodno je i da preživljavaju nepovoljne uslove koji se nalaze u gastrointestinalnom traktu, da se vezuju za epitelne ćelije i da ostvaruju pozitivan efekat na domaćina.

Sposobnost sojeva enterokoka da prežive u simuliranim uslovima gastrointestinalnog trakta je testirana zbog procene preživljavanja nepovoljnih uslova GIT i potencijala kolonizacije, što je preduslov za njihovu upotrebu kao probiotika. U ovom istraživanju testirana su 23 odabrana soja na preživljavanje u kiselim uslovima želuca kao i u simuliranim uslovima intestinuma. Iako je poznato da niska pH vrednost i aktivnost pepsina imaju antimikrobni efekat, dobijena je veoma visoka stopa (94,4 - 99,8%) preživljavanja testiranih sojeva u simuliranoj sredini želuca. Dok je pH u dvanaestopalačnom crevu povoljnija za bakterijsko preživljavanje, prisustvo 1% žučnih soli može imati štetan efekat za bakterije. U simuliranim uslovima dvanaestopalačnog soka stopa preživljavanja je i dalje visoka (87,1 - 97,9%), ali se opaža značajno smanjenje u odnosu na početan broj bakterija. Crevni sok je sadržao manju koncentraciju žučnih soli u odnosu na dvanaestopalačni sok, međutim, 0,1% pankreatina je, verovatno, imalo štetan efekat na preživljavanje enterokoka i preživljava 88,8% enterokoka. Postoje razlike u sposobnosti preživljavanja u simuliranim uslovima GIT kod testiranih vrsta. Ovi nalazi su u saglasnosti sa onima koje su dobili drugi autori što pokazuje veću otpornost na niski pH, veliku koncentraciju žučnih soli i pankreatina kod

enterokoka (Fuka i sar. 2017). Ovako uspešno preživljavanje sojeva enterokoka je i očekivano s obzirom da su one normalni stanovnici creva, a pored sposobnosti da prežive nepovoljne uslove GITa, karakteriše ih i to da se vezuju za ekstraćelijski matriks i epitel, što je važna karakteristika za uspešnu upotrebu kao probiotika. U skladu sa tim u nastavku istraživanja je testirana i sposobnost sojeva za vezivanje za mucin i komponente ekstraćelijskog matriksa kao bitne probiotičke karakteristike enterokoka. Enterokoke poseduju veliki broj adhezina koji im omogućavaju kolonizaciju, kao i kompeticiju sa drugim bakterijama za vezivna mesta na epitelnim ćelijama. Analiziranjem sposobnosti vezivanja enterokoka za mucin, kolagen i fibronektin zapaženo je da su rezultati u korelaciji sa rezultatima dobijeni prilikom vezivanja za HT29-MTX ćelijsku liniju, što govori o njihovom visokom stepenu vezivanja za tkiva domaćina što im potencijalno može omogućiti opstanak u određenim tkivima dovoljno dugo da ispolje svoj eventualni probiotksi efekat. U studiji koju su sprovedi Štyriak i Ljungh, (2003) pokazano da se ispitivane enterokoke vezuju sa visokim afinitetom za mucin i ECM. *En. faecium* BGPAS1-3 se vezivao sa podjednakim afinitetom i za HT29-MTX ($74,8\% \pm 3,7\%$) i za Caco-2 ($71\% \pm 2,5\%$). Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima koji su pokazali da prisustvo površinskih proteina, kao što su Esp, Agg, AggE (Sartingen i sar. 2000; Shankar i sar. 2001; Veljović i sar. 2017), kao i di-glukozil-di-acil-glicerol / lipotehoična kiselina (Sava i sar. 2009), omogućava vezivanje za crevni epitel.

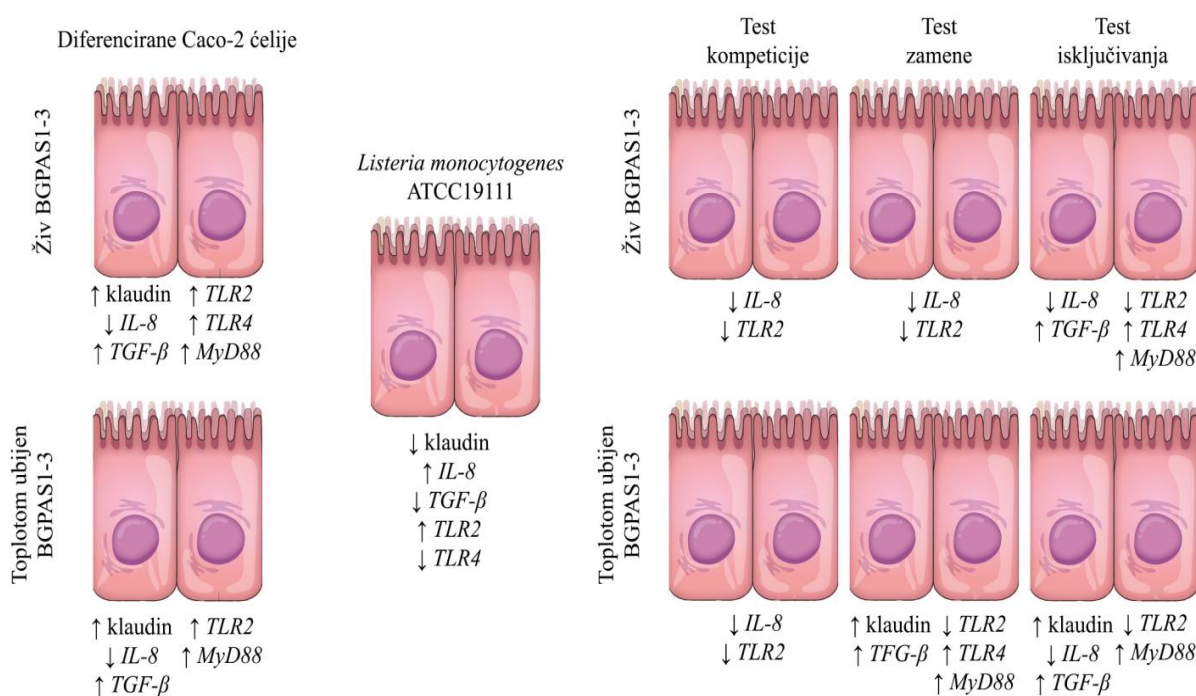
Nakon rezultata koji su ukazali na sposobnost različitih sojeva enterokoka da se vežu za tkiva domaćina, ispitivane su i ostale probiotičke karakteristike. Među sojevima koji ne nose determinante virulencije i osetljivi su na antibiotike testirana je antimikrobna aktivnost na različite patogene kao jedan od direktnih probiotičkih mehanizama. Veliki broj enterokoka sintetiše heterogenu grupu ribozomalno sintetizovanih antimikrobnih peptida ili bakteriocina, poznatih kao enterocini (Moreno i sar. 2006). Uzevši u obzir da su prirodni antimikrobni agensi mogu da se razmatraju kao potencijalni kandidati za zamenu antibiotika u prehrambenoj industriji, njima može da se održava ili smanji broj konkurentnih bakterija (Bemena i sar. 2014). Eksperimentalno su utvrđeni aditivni i/ili sinergistički efekti enterocina u kombinaciji sa drugim antimikrobnim sredstvima koji pružaju nove mogućnosti za efikasniju kontrolu patogena u humano i veterinarskoj medicini (Hammami i sar. 2013). Među prirodnim izolatima enterokoka pronađeni su sojevi koji sintetišu jedan ili više bakteriocina sa širokim inhibitornim spektrom (Giraffa, 2003; Terzić-Vidojević i sar. 2015). *En. faecium* BGPAS1-3 je pokazao antimikrobnu aktivnost protiv *En. faecalis* BG221, *Bacillus subtilis* 168, *Acinetobacter baumannii* 6077/12, *Chromobacterium violaceum*

CV026, *Klebsiella pneumoniae* Ni9, *Erwinia carotovora* i *L. monocytogenes* ATCC19111. Budući da je BGPAS1-3 pokazao snažan antilisterijski efekat, dalje je analiziran efekat ovog soja u modelu proizvodnje jogurta inficiranim *L. monocytogenes* ATCC19111 i na Caco-2 ćelijama inficiranim sa *L. monocytogenes* ATCC19111. Uzimajući u obzir kontroverzni status enterokoka uopšte, kao i činjenice da pojedine efekte žive bakterije mogu da ostvare i njene nežive komponente (šećeri, proteini i kiseline) testiran je i antilisterijski efekat različitih posbiotičkih frakcija koje ne sadrže živ soj BGPAS1-3, kao što je supernatant i toplotom ubijen BGPAS1-3. Bitno je napomenuti da je pored živog BGPAS1-3 samo toplotom ubijena bakterijska ćelija, ali ne i sam supernatant, zadržala deo antilisterijske aktivnosti, što ukazuje da se antimikrobna komponenta nalazi na ćelijskom zidu i da je delimično termostabilna. Ovi rezultati su u skladu sa ranije objavljenim rezultatima gde *Lactobacillus salivarius* BGHO1 (Busarcevic i Dalgalarondo, 2012) i *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. diacetylactis BGBU1-4 (Lozo i sar. 2017) proizvode bakteriocin koji se nalazi na bakterijskoj ćeliji i ne oslobađa se. Proteinska priroda ovog molekula vezanog za ćelije sa antilisterijskim efektom je potvrđena kristalima pronaze E. Antilisterijski efekat živog ili toplotom ubijenog BGPAS1-3 testiran je u modelu proizvodnje jogurta sa *Streptococcus thermophilus* BGKMJ1-36 i *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* BGVLJ1-21. Uočeno je smanjenje broja *L. monocytogenes* ATCC19111 nakon sedam dana skladištenja. Interesantno je da četrnaesti dan nije detektovana *L. monocytogenes* ATCC19111 ni u jednoj varijanti jogurta, pri čemu je pH svih testiranih varijanti bila manja od 4,2. Prethodno je pokazano da pH nepovoljno utiče na rast *L. monocytogenes* (Barker i Park, 2001). Shodno tome, živ i toplotom ubijeni BGPAS1-3 bi mogli potencijalno da se koriste kao suplementi tokom proizvodnje jogurta u svrhu kontrole broja *L. monocytogenes* dok se ne postigne pH koja je nepovoljna za ovoj patogen. Pored ovog testa, testiran je i efekat živog i toplotom ubijenog BGPAS1-3 na sposobnost vezivanja i invazije *L. monocytogenes* ATCC19111 na Caco-2 ćelijskoj liniji. Pokazano je da i živi i toplotom ubijeni BGPAS1-3 snažno inhibira vezivanje *L. monocytogenes* ATCC19111 za diferencirane Caco-2 ćelije tokom kompeticije ($35,8\% \pm 5,5\%$ i $21,1\% \pm 4,4\%$), zamene ($45,5\% \pm 8,4\%$ i $23,7\% \pm 3,5\%$), i isključivanja ($46,4\% \pm 4,9\%$ i $44,1\% \pm 5,2\%$). Iako je pokazano da redukuju vezivanje *L. monocytogenes* ATCC19111, nijedna od frakcija nema sposobnost da smanji invaziju *L. monocytogenes* ATCC19111 u Caco-2 ćelije. Dobro je poznata uloga heparina i heparan sulfata eksprimiranih na epitelnim ćelijama domaćina u vezivanju di-glukozil-di-acil-glicerola / LTA enterokoka sa jedne strane (Sava i sar. 2009) i ActA

listerijskog proteina sa druge strane (Suárez i sar. 2001). Ovi podaci ukazuju na mogućnost da pored jakog direktnog antimikrobnog efekta *En. faecium* BGPAS1-3, smanjenje vezivanja *L. monocytogenes* ATCC19111 za Caco-2 ćelije može biti posledica konkurencije bakterija i bakterijskih molekula za iste adhezione ligande. Bakterijski patogeni, uključujući *L. monocytogenes*, mogu poremetiti transmembranske strukture čvrstih veza i uzrokovati disfunkciju epitelne barijere (Drolia i sar. 2018). Različiti proteini čvrstih veza su multifunkcionalni transmembranski kompleksi uključeni u intestinalnu homeostazu (Zihni i sar. 2016). Klaudini su glavna komponenta barijerne funkcije čvrstih veza i pokazalo se da je smanjena ekspresija u korelaciji sa različitim humanim bolestima (Hadj-Rabia i sar. 2004; Usami i sar. 2006; Lee, 2015). Shodno tome, pokazano je da infekcija *L. monocytogenes* ATCC19111 Caco-2 ćelija snažno smanjuje ekspresiju klaudina na nivou iRNK i proteina. S druge strane, tretman neinficiranih diferenciranih Caco-2 ćelija sa živim ili toplotom ubijenim BGPAS1-3 snažno stimuliše ekspresiju klaudina. U skladu sa takvom zaštitnom ulogom BGPAS1-3, nije bilo značajnog smanjenja ekspresije klaudina kod Caco-2 ćelija inficiranih *L. monocytogenes* ATCC19111 tretiranih različitim frakcijama BGPAS1-3. Zanimljivo je da je samo BGPAS1-3 koji je ubijen toplotom stimulisao ekspresiju ovog molekula kada su Caco-2 ćelije tretirane pre ili posle infekcije sa *L. monocytogenes* ATCC19111. Ovaj efekat na proteine čvrste veze ukazuje na potencijalnu zaštitnu ulogu BGPAS1-3 probiotičkog i/ili postbiotičkog tretmana kako u slučaju prevencije infekcije ili tretmana već nastale crevne infekcije *L. monocytogenes*. Iako je primarna funkcija intestinalnih epitelnih ćelija mehanička zaštita, ove ćelije imaju važnu ulogu u prepoznavanju patogena, što dovodi do njihove aktivacije, a time i do indukcije akutnog imunog odgovora. IL-8 proizvode nekoliko tipova ćelija, uključujući i epitelne ćelije, i on ima važnu ulogu u privlačenju i aktivaciji leukocita, pre svega neutrofila (Onyiah i Colgan, 2016). Štaviše, pokazano je da IL-8 inicira akutni inflamatorni odgovor u listeriozi (Opitz i sar. 2006). U skladu sa tim, infekcija diferenciranih Caco-2 ćelija sa invazivnim *L. monocytogenes* ATCC19111 u ovom ispitivanju, povećala je ekspresiju *IL-8* iRNK. S druge strane, živi i toplotom ubijeni BGPAS1-3 doveli su do smanjenja *IL-8* iRNK u odsustvu infekcije. Ovo je ukazalo na zaštitni efekat BGPAS1-3 na epitelne ćelije creva. Takođe, tretmani Caco-2 ćelija živim ili toplotom ubijenim BGPAS1-3 kao preventiva infekciji ili istovremeno sa infekcijom *L. monocytogenes* ATCC19111 značajno su smanjili nivo ekspresije *IL-8* iRNK u poređenju sa tretmanom samo sa *L. monocytogenes* ATCC19111. S obzirom na važnu ulogu IL-8 u odbrani domaćina od ovog crevnog patogena, ovakav efekat ne bi imao pozitivan uticaj na zaštitu od *L. monocytogenes*.

Međutim, kada su već inficirane Caco-2 ćelije tretirane toplotom ubijenim BGPAS1-3 nivo *IL-8* iRNK koji je indukovala *L. monocytogenes* ATCC19111 ostao je nepromenjen. Uzimajući u obzir bitnu ulogu *IL-8* u efikasnom antilisterijskom odgovoru domaćina, kao i na značaj integriteta crevne barijere, ovaj postbiotik (toplotom ubijen BGPAS1-3) pokazuje potencijal da spreči bakterijsku translokaciju i širenje infekcije *L. monocytogenes* i može se smatrati dovoljno bezbednim tretmanom u slučaju listerioze. Pored važne uloge *IL-8* u antilisterijskoj odbrani domaćina, nekontrolisana infekcija može izazvati poremećaj epitelne barijere (Naydenov i sar. 2013). Zbog toga je istovremena aktivacija imunosupresivnih mehanizama koji kontrolišu infekciju od ključnog značaja za bezopasnu i uspešnu eliminaciju patogena. U tom smislu, *TGF-β* može zaštititi funkciju epitelne barijere tako što sprečava oštećenja epitela usled infekcije regulacijom proteina čvrstih veza (Rachakonda i sar. 2016). Takođe, pokazano je da pretretman *TGF-β* može da spreči disfunkciju epitelne barijere izazvane enterohemoragičnim *E. coli* O157: H7 (Howe i sar. 2005). U skladu sa destruktivnim dejstvom *L. monocytogenes*, infekcija Caco-2 ćelija sa *L. monocytogenes* ATCC19111 smanjila je ekspresiju *TGF-β* iRNK tokom tretmana. Nasuprot tome, tretman neinficiranih Caco-2 ćelija živim ili toplotom ubijenim BGPAS1-3 povećava nivo ekspresije *TGF-β* iRNK. U skladu sa tim, tretman Caco-2 ćelija sa toplotom ubijenim BGPAS1-3 posle infekcije sa *L. monocytogenes* ATCC19111 kao i sa živim ili toplotom ubijenim BGPAS1-3 pre infekcije sa *L. monocytogenes* ATCC19111 značajno je povećao nivo ekspresije *TGF-β* iRNK u poređenju samo sa infekcijom. Imajući u vidu važnu ulogu *TGF-β* u suzbijanju nekontrolisane infekcije i održavanju epitelne barijere creva, ovaj efekat BGPAS1-3 može doprineti zaštiti epitelne barijere tokom listerioze. Fina ravnoteža između odbrambenih odgovora i lokalizacije oštećenja u crevnom tkivu regulisana je istovremenim prepoznavanjem različitih stimulansa poreklom od komensalnih i patogenih mikroorganizama preko odgovarajućih TLR (McClure i Massari, 2014). TLR se dominantno eksprimiraju na imunskim ćelijama, međutim ovi receptori su prisutni i na epitelnim ćelijama i indukuju ćelijsku aktivaciju na MyD88-zavisni ili nezavisni način. Pokazano je da je prepoznavanje peptidoglikana *L. monocytogenes* pomoću TLR2 u zavisnosti od MyD88 potrebno za indukciju urođenog imunog odgovora protiv ovog patogena u modelu infekcije kod miševa (Torres i sar. 2004). Pored toga, pretpostavljeno je da bi TLR4 mogao da ima ulogu u prepoznavanju LTA *L. monocytogenes* na način nezavisan od MyD88 (Edelson i Unanue, 2002). U skladu sa takvom primarnom ulogom TLR, pokazano je da manipulacija ekspresijom TLR pomoću probiotičkih sojeva može modulirati imunski odgovor kod

različitih bolesti (Castillo i sar. 2011; Villena i Kitazawa, 2014; Lépine i de Vos, 2018). Kao što je i očekivano, u ovoj studiji infekcija diferenciranih epitelnih ćelija sa *L. monocytogenes* ATCC19111 stimulisala je ekspresiju *TLR2* iRNK. Pored toga, pokazano je da imuni odgovor na *En. faecium* zavisi od aktivacije *TLR2* (Leendertse i sar. 2008). Interesantno je da je samo toplotom ubijeni BGPAS1-3 stimulisao ekspresiju ovog receptora u Caco-2 ćelijama kako kod neinficiranih tako i kod ćelija nakon infekcije. S druge strane, infekcija Caco-2 ćelija sa *L. monocytogenes* ATCC19111 smanjila je ekspresiju *TLR4* iRNK, i većina tretmana sa BGPAS1-3 nije pokazala mogućnost za prevazilaženje ovog efekta. Pored toga, obrazac promena u ekspresiji *MyD88* iRNK pokazao je korelaciju sa promenama ekspresije iRNK za *TLR* što govori u prilog da najvažniji put kojim BGPAS1-3 ostvaruje svoj indirektni antilisterijski efekat uključuje ove receptore i adaptorski protein *MyD88*. Izraženiji efekat toplotom ubijenog BGPAS1-3 u poređenju sa živim je verovatno rezultat temperaturom indukovanog oslobađanja različitih aktivnih molekula koji potiču iz živih bakterija ili su zaštićeni u 3D strukturama kompleksnih molekula na bakterijskoj površini (Sultana i sar. 2013).



Slika 27. Mehanizam delovanja *L. monocytogenes* ATCC19111, živog i toplotom ubijenog *En. faecium* BGPAS1-3 u diferenciranim Caco-2 ćelijama u testovima kompeticije, zamene i isključivanja.

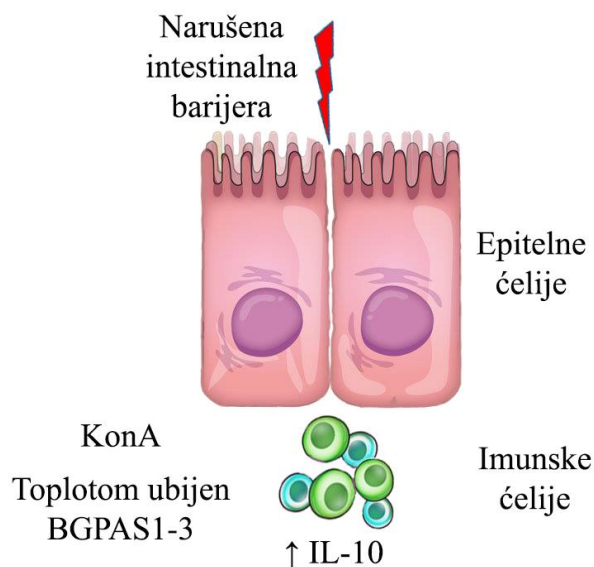
Bakterijska translokacija definisana je kao prolazak živih bakterija iz GIT do vanintestinalnih mesta, kao što je kompleks mezenteričnih limfnih čvorova, jetra, slezina,

bubreg i krvotok. Tri primarna mehanizma koji promovišu bakterijsku translokaciju u životinjskim modelima su: poremećaj ekološke ravnoteže GIT kako bi se omogućio rast patogenih bakterija u crevima, povećana propustljivost intestinalne barijere i izostanak imunske odbrane domaćina (Berg, 1999). U skladu sa prethodnim rezultatima, testiran je efekat toplotom ubijenog BGPAS1-3 na ćelijama mezenteričnih limfnih čvorova. Bakterije na svojoj površini eksprimiraju široku lepezu molekula sa kojima interaguju sa ćelijama domaćina. Ćelije domaćina prepoznaju peptidoglikane i teihoičnu kiselinu koje enterokoke ispoljavaju na površini. U prethodnim studijama pokazano je da enterokoke mogu proizvoditi peptidoglikane različite građe u zavisnosti od uslova sredine što može biti povezano i sa različitim imunomodulatornim efektom različitih sojeva (Chang i sar. 2018). Dodatno, Kaji i sar. (2010) su pokazali da teihoične kiseline mogu imati anti-inflamacijski efekat. U skladu sa ovim da bi se što ispravnije pretpostavio uticaj na imunski sistem domaćina, ispitan je efekat peptidoglikana i peptidoglikana bez teihoične kiseline. Da bi se ispitao efekat ovih frakcija u uslovima inflamacije, ćelije MLC su tretirane sa KonA, istovremeno sa toplotom ubijenim BGPAS1-3, peptidoglikanom BGPAS1-3 ili peptidoglikanom bez teihoične kiseline. Pokazano je da BGPAS1-3 jako indukuje anti-inflamacijski IL-10, dok ne utiču na produkciju pro-inflamacijskih citokina IL-17 i IFN- γ (Slika 28), što ukazuje na potencijalni anti-inflamacijski efekat ovih frakcija BGPAS1-3. Zbog pokazanog zaštitnog uticaja toplotom ubijenog BGPAS1-3 na epitelnu barijeru i u odsustvu infekcije, kao i potencijalno imunosupresivnog efekta, ovaj soj može imati potencijalnu ulogu kod tretmana autoimunskih bolesti, kao što je multipla skleroza. Poznato je da probiotičke bakterije mogu da se koriste kao anti-inflamacijski agensi u hroničnim inflamacijskim stanjima (Lorea Baroja i sar. 2007). Imunomodulatorna svojstva su veoma važna kod probiotičkog delovanja. Veliki broj *in vitro* i *in vivo* studija je analizirao imunomodulatorni efekat različitih vrsta rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Međutim, svega nekoliko ispitivanja je sprovedeno na imunomodulatornim svojstvima enterokoka. Pokazano je da *En. faecium* L5 povećava ekspresiju IL-10 i smanjuje ekspresiju IL-8 u modelu disbioze kod pacova (Tarasova i sar. 2010). Kod indukovanog kolitisa kod pacova, sojevi *En. durans* M4-5 i *En. durans* TN-3 su izazvali značajne anti-inflamacijske efekte i uspostavili obnavljanje crevne mikrobiote (Avram-Hananel i sar. 2010). U studiji na zdravim miševima pokazano je da *En. durans* EP1 ima imunosupresivan efekat i da pokazuje sposobnost da moduliše crevnu mikrobiotu (Carasi i sar. 2017).

Uzimajući u obzir dobijene rezultate i literaturne podatke, ispitan je efekat toplotom ubijenog BGPAS1-3 na *in vivo* modelu encefalomijelitisa kod ženki DA pacova. Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis (EAE) predstavlja životinjski model koji se najčešće koristi za proučavanje imuno-patoloških mehanizama i terapijskih pristupa u multiploj sklerozi. Indukuje se imunizacijom antigena dobijenih iz mijelina u adjuvansu ili prenosom aktiviranih mijelin-specifičnih T ćelija u naivne domaćine. Prvo se javlja induktivna faza, u kojoj su urođene i stečene imunske ćelije stimulirane antigenom na periferiji. Nakon toga sledi faza efektora

koju karakteriše akutna infiltracija imunskih ćelija u centralni nervni sistem (CNS), a kasnije i hronična faza upale i oštećenja aksona (Arellano i sar. 2015). Pozitivna povezanost između povišenih nivoa IFN- γ i demijelinizirajućih lezija u CNS-u u EAE pripisana je ovom citokinu. Kod miševa, pasivna imunizacija zdravih životinja sa encefalitogenim Th1 limfocitima koji produkuju IFN- γ je bila dovoljna da indukuje EAE (Olsson, 1995). Pored IFN- γ , pro-inflamacijski citokin IL-17 odgovoran je za nastanak bolesti koja ispoljava mnogo jaču kliničku sliku nego ona indukovana Th1 ćelijama (Langrish i sar. 2005). Dodatno, pokazano je da pro-inflamacijski citokini kao što su IFN- γ i IL-17 narušavaju epitelnu barijeru i sastav proteina čvrstih veza, što dovodi do povećane paracelularne propustljivosti (Capaldo i Nusrat, 2009).

Neposredno nakon indukcije EAE, ženke pacova su pile 10^9 ćelija toplotom ubijenog soja tokom 30 dana. Pratio se klinički tok bolesti i ustanovljeno je da je grupa pacova kod koje je indukovana EAE i koje su tretirane toplotom ubijenim sojem enterokoka imala blažu kliničku sliku u početnim fazama bolesti i na vrhuncu bolesti. S obzirom da je pokazano da, osim direktnih imunomodulatornih efekata kao i efekata na zaštitu epitelne barijere, modifikacija učestalosti mikroorganizama u mikrobioti creva može značajno uticati na tok bolesti povezanih sa disfunkcijom imunskog sistema, odlučili smo da testiramo da li toplotom ubijeni BGPAS1-3 ima efekat na mikrobiom životinja kojima je indukovana EAE. Interesanto,



Slika 28. Efekat toplotom ubijenog BGPAS1-3 na produkciju citokina ćelija mezenteričnih limfnih čvorova.

Lactobacillus intestinalis se pojavljuje na početku bolesti, a kasnije izostaje u fecesima od 30. dana kod životinja kojima je indukovana EAE što govori u prilog tome da i samo izazivanje bolesti koje dovodi do disfunkcije imunskog sistema menja sastav mikrobioma creva. Takođe, u fecesima samo tretiranih pacova 30. dana javljaju se *Lb. murinus* i *En. hirae*. Berer i sar. 2018. pokazali su da miševi hranjeni celulozom imaju snižene nivoe pro-inflamacijskih citokina, dok su nivoi anti-inflamacijskih citokina povećani u odnosu na grupu miševa koja nije hranjena celulozom. Dodatno, pokazano je da *En. hirae* se dominantno nalazi u fecesima miševa koji su hranjeni celulozom. *Lb. murinus* modulise Th17 kod EAE smanjujući simptome kliničke slike (Konieczna i sar. 2015). Imajući u vidu da se MKB dominantno nalaze u fecesu životinja, bilo je očekivano da se uoči razlika između tretmana i kontrolne grupe, kao i na početku i kraju tretmana. Ovo je u skladu sa rezultatima koji ukazuju da tokom indukcije i toka EAE MKB veliki značaj za tok i razvoj bolesti (Stanisavljević i sar. 2016). U kontrolnoj grupi pacova, 30 dana nakon indukcije bolesti, identifikovane su pomoću univerzalnih prajmera vrste *Shuttleworthia satelles*, za koju ne postoje literaturni podaci da je uključena u patogenezu autoimunskih bolesti i *Muribaculum intestinale*, jedna od najzastupljenijih vrsta u zglobovima kod pacova obolelih od spondiloartritisa. Predpostavlja se da ova vrsta ima veliki potencijal u translokaciji iz creva u druge organe, a samim tim i u indukciji inflamacije (Asquith i sar. 2018).

Rezultati ove doktorske disertacije doprineli su boljem razumevanju probiotičkih i imunomodulatornih karakteristika prirodnih sojeva enterokoka sa područja Zapadnog Balkana. Iako odabrani sojevi enterokoka imaju nizak patogeni potencijal, zbog strogih regulativa o njihovoj upotrebi u biomedicini usled povezanosti sa infekcijama kod ljudi i životinja, neophodno je da se okarakteriše svaki soj ponaosob, kao i mehanizam njegovog delovanja.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata dobijenih u ovoj doktorskoj disertaciji mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Sekvenciranjem gena za 16S rRNK 75 sojeva enterokoka pokazano je da 50 sojeva pripada vrsti *En. durans*, 15 sojeva vrsti *En. faecium*, 6 sojeva vrsti *En. faecalis*, 3 soja vrsti *En. italicus* i jedan soj pripada vrsti *En. hirae*.
2. Od ukupnog broja, 18,7% ispitivanih sojeva su alfa hemolitički. Beta hemolitičke enterokoke nisu detektovane. Želatinoznu aktivnost je pokazalo 6,7% sojeva.
3. Pokazano je prisustvo visoke učestalosti sojeva rezistentnih na ciprofloksacin (48,2%), dok su testirani sojevi u manjoj meri rezistentni na gentamicin (10,7%). Dvadeset i tri soja bilo je senzitivno na deset klinički relevantnih antibiotika.
4. Na osnovu rezultata sposobnosti formiranja biofilma, sojevi BGG08-25, BGG08-26, BGG08-30, BGG011-27, BGG011-29, BGPAS1-3, BGPAS1-4, BGPAS1-58 i BGBU1-46 nemaju sposobnost formiranja biofilma, BGG09-30, BGPAS1-10, BGPAS1-20, BGPAS1-71, BGRE2-40, BGRE2-48, BGVL2a-53, BGVL2a-55, BGTRS10-45, BGPT2-84 i BGAL3-19 slabo formiraju biofilma, BGG09-28 ima jaku sposobnost formiranja biofilma, dok sojevi BGTRK4-42 i BGZLM1-5 pokazuju veoma jaku sposobnost formiranja biofilma.
5. Uočena je visoka zastupljenost gena koji kodiraju agregacioni faktor (17 sojeva), enterokokalni površinski protein (13 sojeva), endokarditis specifični antigen (efA^{fs} - 16 sojeva i efA^{fm} - 8 sojeva), serinsku proteazu (13 sojeva) i želatinazu (5 sojeva). Prisustvo, odnosno odsustvo gena u okviru *fsr* operona varira od analiziranog soja i pokazano je da je kod 7 sojeva prisutan *fsrA*, kod 3 soja *fsrC* i kod 2 soja *fsrB*. U analiziranim sojevima nije detektovano prisustvo gena koji kodiraju hijaluronidazu i citolizin aktivirajući protein.
6. Preživljavanje 23 analiziranih sojeva u u simuliranim uslovima gastrointestinalnog trakta nakon inkubacije u želudačnom soku iznosilo je u proseku 94,4% - 98,8% \pm 1,3%, nakon

dvanaestopalačnog soka 87,1% - 97,9% ± 2,9% dok je u proseku preživljavanje crevnog soka iznosilo 82,7% - 92,9% ± 3,0% u odnosu na početni broj bakterija.

7. Opisan je visok procenat vezivanja testiranih enterokoka za mucin, u proseku 71,4% ± 3,1% pri čemu je namanji afinitet vezivanja imao *En. faecium* BGPAS1-10 (59,1% ± 3,2%), dok se *En. faecium* BGGO9-28 vezivao sa najvećim afinitetom (88,1% ± 1,5%). Primećen je sličan trend vezivanja svih analiziranih enterokoka za kolagen (74,1% ± 4,1%) i fibronektin (73,9% ± 2,7%). U oba slučaja, namanji afinitet vezivanja je imao *En. durans* BGGO8-30 (59,8% ± 2,1% za kolagen i 61,8% ± 1,5% za fibronektin), dok se *En. faecium* BGGO9-28 vezivao sa najvećim afinitetom (84,5% ± 5,3% za kolagen i 94,7% ± 2% za fibronektin).

8. Testirane enterokoke se vezuju za HT29-MTX u proseku 86,7% ± 5,4%, pri čemu je najmanji afinitet vezivanja imao *En. faecium* BGPAS1-20 (73,4% ± 3,3%), dok se *En. durans* BGGO8-25 vezivao sa najvećim afinitetom (97,5% ± 4,3%).

9. Deset testiranih sojeva je imalo antimikrobno dejstvo na *En. faecalis* BG221, dok su BGPAS1-3 i BGZLM1-5 imali antimikrobno dejstvo na *L. monocytogenes* ATCC19111. Ispitivani sojevi nisu pokazali antimikrobnu aktivnost na *St. aureus* ATCC25923 i *Lc. lactis* subsp. *lactis* MN1-596 kao ni na Gram-negativne patogene *E. coli* ATCC25922 i *Salmonella* Enteritidis 654/7E.

10. Antimikrobno jedinjenje soja *En. faecium* BGPAS1-3 je proteinske prirode, termostabilno i vezano za ćeliju. Pokazano je da pored antimikrobnog delovanja na BG221 i ATCC19111 ima antimikrobnu aktivnost i prema *Bacillus subtilis* 168, *Acinetobacter baumannii* 6077/12, *Chromobacterium violaceum* CV026, *Erwinia carotovora* i *Klebsiella pneumoniae* Ni9.

11. U modelu proizvodnje jogurta u toku prva 24 h skladištenja na 4°C, u varijanti koja je sadržala KMJ1-36/BGVLJ1-21/*L. monocytogenes*/toplotom ubijen BGPAS1-3 beleži se smanjeni broja ćelija *L. monocytogenes* ATCC19111 za 0,2 – 0,25 log/ml. Trend smanjenja broja *L. monocytogenes* ATCC19111 se nastavlja i tokom 7 dana skladištenja modela sistema jogurta na temperaturi od 4°C u varijanti sa KMJ1-36/BGVLJ1-21/*L. monocytogenes*/živ BGPAS1-3 za 0,65 - 0,68 log/ml i u varijanti koja je sadržala KMJ1-36/BGVLJ1-21/*L. monocytogenes*/toplotom ubijen BGPAS1-3 za 0,70 – 0,78 log/ml.

12. Tokom testa kompeticije *L. monocytogenes* ATCC19111 sa živim BGPAS1-3 došlo je do smanjenja vezivanja *L. monocytogenes* ATCC19111 za diferenciranje Caco-2 ćelije na $64,2\% \pm 5,5\%$, odnosno do smanjenja na $78,9\% \pm 4,4\%$ sa toplotom ubijenim BGPAS1-3. U testu zamene broj *L. monocytogenes* ATCC19111 koji se vezao za površinu diferenciranih Caco-2 ćelija bio je smanjen na $54,5\% \pm 8,8\%$ u tretmanu sa živim BGPAS1-3, odnosno $76,3\% \pm 3,5\%$ sa toplotom ubijenim BGPAS1-3. Dodatno, u testu isključivanja broj *L. monocytogenes* ATCC19111 koji se vezao za Caco-2 ćelije nakon tretmana sa živim bio je $53,6\% \pm 4,9\%$ ili toplotom ubijenim BGPAS1-3 bio je $55,9 \pm 5,2\%$.

13. Živ i toplotom ubijen BGPAS1-3 ne utiču na invaziju *L. monocytogenes* ATCC19111.

14. Tretman diferenciranih Caco-2 ćelije sa živim i toplotom ubijenim BGPAS1-3 stimuliše nivo ekspresije kladina i na nivou iRNK i proteina. Nivo ekspresije *IL-8* iRNK nakon tretmana je smanjen, dok je nivo ekspresije *TGF- β* iRNK bio povećan.

15. Nakon tretmana diferenciranih Caco-2 ćelija živim BGPAS1-3 nivo *TLR2* iRNK je bio nepromenjen u odnosu na netretirane Caco-2 ćelije, dok je tretman toplotom ubijenim BGPAS1-3 stimulisao nivo *TLR2* iRNK. Nasuprot tome, tretmani živim ili toplotom ubijenim BGPAS1-3 stimulisali su nivo *MyD88* iRNK, dok je živ BGPAS1-3 povećao ekspresiju *TLR4* iRNK.

16. Tokom infekcije Caco-2 ćelija *L. monocytogenes* ATCC19111 u trajanju od 1 h, smanjen je nivo ekspresije kladina, i na nivou iRNK, i na nivou proteina. U različitim tretmanima sa živim ili toplotom ubijenim BGPAS1-3 nivo ekspresije kladina i na novou iRNK i na nivou proteina nije promenjen, izuzev u testu zamene sa toplotom ubijenim BGPAS1-3 i u testu isključivanja sa toplotom ubijenim BGPAS1-3 gde dolazi do povećanja nivoa ekspresije kladina i na novou iRNK i na nivou proteina. Nivo ekspresije *IL-8* iRNK je bio povećan nakon infekcije sa *L. monocytogenes* ATCC19111, dok je tokom različitih tretmana sa živim ili toplotom ubijenim BGPAS1-3 uočeno smanjenje nivoa *IL-8* iRNK u odnosu na nivo izmeren u prisustvu same *L. monocytogenes* ATCC19111, odnosno nivo iRNK ovog citokina ostao je na nivou produkcije kod netretiranih Caco-2 ćelija. U slučaju testa zamene nivo *IL-8* iRNK ostao nepromenjen u odnosu na nivo u prisustvu same *L. monocytogenes* ATCC19111. Infekcija diferenciranih Caco-2 *L. monocytogenes* ATCC19111 dovela je do smanjenja nivoa *TGF- β* iRNK, dok toplotom ubijeni BGPAS1-3 u test zamene i test isključivanja dovodi do

povećanja nivoa ekspresije *TGF-β* iRNK na nivo ekspresije ovog molekula kod netretiranih Caco-2 ćelija. U testu isključivanja ekspresija *TGF-β* iRNK značajno je veća i od nivoa ekspresije u netretiranim Caco-2 ćelijama.

17. Infekcija diferenciranih Caco-2 ćelija sa *L. monocytogenes* ATCC19111 stimuliše ekspresiju *TLR2* iRNK. Nivo ekspresije *TLR2* iRNK je bio smanjen u svim tretmanima, izuzev kada su Caco-2 ćelije tretirane sa toplotom ubijenim BGPAS1-3 u testu zamene kada je nivo iRNK za ovaj molekul ostao nepromenjen. S druge strane, infekcija diferenciranih Caco-2 ćelija sa *L. monocytogenes* ATCC19111 dovodi do smanjenja ekspresije *TLR4* iRNK, dok je ekspresija iRNK za ovaj receptor povećana u Caco-2 ćelijama tretiranim sa živim BGPAS1-3 u testu zamene ili toplotom ubijenim BGPAS1-3 u testu isključivanja. Dodatno, nivo ekspresije *MyD88* iRNK ostao je nepromenjen u Caco-2 ćelijama nakon infekcije sa *L. monocytogenes* ATCC19111, dok do povećanja ekspresija ove iRNK dovodi toplotom ubijeni BGPAS1-3 u testu zamene i živi i toplotom ubijenim BGPAS1-3 u testu isključivanja.

18. Toplotom ubijeni BGPAS1-3 u odnosu 1:10 (eukariotska ćelija : prokariotska ćelija) tokom 72 h ne utiče na vijabilnost i metaboličku aktivnost ćelija MLC.

19. Produkcija pro-inflamacijskih citokina IFN- γ i IL-17 ostala je nepomenjena u odnosu na netretirane KonA-stimulisane MLC ćelije. U tretmanima toplotom ubijenim BGPAS1-3, peptidoglikanom i peptidoglikanom bez teihoične kiseline, produkcija IL-10 je povećana u odnosu na netretirane KonA-stimulisane MLC ćelije.

20. *in vivo* primena toplotom ubijenog BGPAS1-3 u modelu EAE poseduje terapijski učinak u početnim fazama bolesti.

21. Analizom mikrobioma životinja kojima je indukovana EAE dobijeno je da je *Lb. intestinalis* prisutan samo na početku tretmana (kod još uvek zdravih životinja) dok se nije detektovao 30. dana nakon imunizacije niti u kontrolnoj grupi niti u grupi koja je bila toplotom ubijeni BGPAS1-3. *Lb. murinus* i *En. hirae* su prisutne samo u uzorcima fecesa imunizovanih životinja koje su 30 dana tretirane toplotom ubijenim BGPAS1-3, a nisu prisutne u kontrolnoj grupi. Korišćenjem univerzalnih prajmera pokazano je da se *Shuttleworthia satelles* i *Muribaculum intestinale* pojavljuju samo 30. dan u fecesima kontrolnih imunizovanih životinja koje nisu tretirane sa toplotom ubijenim BGPAS1-3.

Analizom sekvenci dobijenih umnožavanjem prajmerima specifičnim za *Bifidobacteria* pokazano je prisustvo *Bifidobacterium pseudolongum* samo u fecesima kontrolnih i tretiranih životinja 30 dana nakon imunizacije.

7. LITERATURA

Ali, L., Goraya, M., Arafat, Y., Ajmal, M., Chen, J. L., and Yu, D. (2017). Molecular mechanism of *quorum-sensing* in *Enterococcus faecalis*: its role in virulence and therapeutic approaches. *International journal of molecular sciences*, 18(5), 960.

An, F. Y., and Clewell, D. B. (2002). Identification of the *cADI* sex pheromone precursor in *Enterococcus faecalis*. *Journal of bacteriology*, 184(7), 1880-1887.

Anderson, A. C., Jonas, D., Huber, I., Karygianni, L., Wölber, J., Hellwig, E., Nicole Arweiler, N., Vach, K., Wittmer, A., and Al-Ahmad, A. (2015). *Enterococcus faecalis* from food, clinical specimens, and oral sites: prevalence of virulence factors in association with biofilm formation. *Frontiers in microbiology* 6:1534.

Andrews, J., Ashby, J., Jevons, G., Marshall, T., Lines, N., and Wise, R. (2000). A comparison of antimicrobial resistance rates in Gram-positive pathogens isolated in the UK from October 1996 to January 1997 and October 1997 to January 1998. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45(3), 285-293.

Angeletti, S., Lorino, G., Gherardi, G., Battistoni, F., De Cesaris, M., and Dicuonzo, G. (2001). Routine molecular identification of enterococci by gene-specific PCR and 16S ribosomal DNA sequencing. *Journal of clinical microbiology*, 39(2), 794-797.

Angrisano, T., Pero, R., Peluso, S., Keller, S., Sacchetti, S., Bruni, C.B., Chiariotti, L., and Lembo, F. (2010). LPS-induced IL-8 activation in human intestinal epithelial cells is accompanied by specific histone H3 acetylation and methylation changes. *BMC microbiology*; 10(1), 172.

Archimbaud, C., Shankar, N., Forestier, C., Baghdayan, A., Gilmore, M. S., Charbonne, F., and Joly, B. (2002). *In vitro* adhesive properties and virulence factors of *Enterococcus faecalis* strains. *Research in Microbiology*, 153, 75-80.

Arellano, G., Ottum, P. A., Reyes, L. I., Burgos, P. I., and Naves, R. (2015). Stage-specific role of interferon-gamma in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Frontiers in immunology*, 6, 492.

Arias, C. A., and Murray, B. E. (2012). The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 10(4), 266.

Arias, C.A., Courvalin, P., and Reynolds, P.E. (2000). *vanC* cluster of vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* BM4174. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 44:1660–6.

Asquith, M., Schleisman, M., Davin, S., Karstens, L., and Rosenbaum, J. T. (2018). FRI0148 A study of microbial translocation in an animal model of spondyloarthritis.

Avram-Hananel, L., Stock, J., Parlesak, A., Bode, C., and Schwartz, B. (2010). *Enterococcus durans* strain M4–5 isolated from human colonic flora attenuates intestinal inflammation. *Diseases of the colon and rectum*, 53(12), 1676-1686.

Balouiri, M., Sadiki, M., and Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 6(2), 71-79.

Banwo, K., Sanni, A., and Tan, H. (2013). Technological properties and probiotic potential of *Enterococcus faecium* strains isolated from cow milk. *Journal of applied microbiology*, 114(1), 229-241.

Barker, C., and Park, S. F. (2001). Sensitization of *Listeria monocytogenes* to low pH, organic acids, and osmotic stress by ethanol. *Applied and Environment Microbiology*; 67(4), 1594-1600.

Begovic, J., Brandsma, J.B., Jovicic, B., Tolinacki, M., Veljovic, K., Meijer, W.C., and Topisirovic, L.J. (2011). Analysis of dominant lactic acid bacteria from artisanal raw milk cheeses produced on the mountain Stara Planina, Serbia. *Archives of biological sciences*, 63, 11-20.

Bell, J. M., Paton, J. C., and Turnidge, J. (1998). Emergence of vancomycin-resistant enterococci in Australia: phenotypic and genotypic characteristics of isolates. *Journal of clinical microbiology*, 36(8), 2187-2190.

Bemena, L. D., Mohamed, L. A., Fernandes, A. M., and Lee, B. H. (2014). Applications of bacteriocins in food, livestock health and medicine. *International journal of current microbiology and applied science*; 3(12), 924-49.

Berer, K., Martínez, I., Walker, A., Kunkel, B., Schmitt-Kopplin, P., Walter, J., and Krishnamoorthy, G. (2018). Dietary non-fermentable fiber prevents autoimmune neurological disease by changing gut metabolic and immune status. *Scientific reports*, 8(1), 10431.

Berg, R.D. (1999). Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. In *Mechanisms in the Pathogenesis of Enteric Diseases 2* (pp. 11-30). Springer, Boston, MA.

Berić, T., Kojić, M., Stanković, S., Topisirović, L., Degrassi, G., Myers, M., Venturi, V., and Fira, D. (2012). Antimicrobial activity of *Bacillus* sp. natural isolates and their potential use in the biocontrol of phytopathogenic bacteria. *Food Technology and Biotechnology*, 50(1), 25-31.

Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llorente, C., and Gil, A. (2012). Probiotic mechanisms of action. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 61(2), 160-174.

Billstrom, H., Lund, B., Sullivan, A., and Nord, C. E. (2008). Virulence and antimicrobial resistance in clinical *Enterococcus faecium*. *International journal of antimicrobial agents*, 32, 374-377.

Boujemaa-Paterski, R., Gouin, E., Hansen, G., Samarin, S., Le Clainche, C., Didry, D., Dehoux, P., Cossart, P., Kocks, C., Carlier, M.F., and Pantaloni, D. (2001). *Listeria* protein ActA mimics WASp family proteins: it activates filament barbed end branching by Arp2/3 complex. *Biochemistry*, 40(38), 11390-11404.

Bourgogne, A., Singh, K. V., Fox, K. A., Plughoft, K. J., Murray, B. E. and Garsin, D. A. (2007). *EbpR* is important for biofilm formation by activating expression of the endocarditis and biofilm-associated pilus operon (*ebpABC*) of *Enterococcus faecalis* OG1RF. *Journal of bacteriology*, 189, 6490–6493.

Budzik, J. M., and Schneewind, O. (2006). Pili prove pertinent to enterococcal endocarditis. *The Journal of clinical investigation*, 116(10), 2582-2584.

Busarcevic, M., and Dalgarrondo, M. (2012). Purification and genetic characterisation of the novel bacteriocin LS2 produced by the human oral strain *Lactobacillus salivarius* BGHO1. *International journal of antimicrobial agents*, 40(2), 127-134.

- Bychowska, A., Theilacker, C., Czerwicka, M., Marszewska, K., Huebner, J., Holst, O., Stepnowski, P., and Kaczyński, Z. (2011). Chemical structure of wall teichoic acid isolated from *Enterococcus faecium* strain U0317. *Carbohydrate research*, 346(17), 2816-2819.
- Cabello, F. C. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental microbiology*, 8(7), 1137-1144.
- Callow, J. A., and Callow, M. E. (2006). Biofilms. *Antifouling Compounds* (pp.141-169). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Capaldo, C. T., and Nusrat, A. (2009). Cytokine regulation of tight junctions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1788(4), 864-871.
- Carasi, P., Racedo, S. M., Jacquot, C., Elie, A. M., Serradell, M., and Urdaci, M. C. (2017). *Enterococcus durans* EP1 a promising anti-inflammatory probiotic able to stimulate sIgA and to increase *Faecalibacterium prausnitzii* abundance. *Frontiers in immunology*, 8, 88.
- Carniol, K., and Gilmore, M. S. (2004). Signal transduction, *quorum-sensing*, and extracellular protease activity in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Journal of bacteriology*, 186(24), 8161-8163.
- Casalta, E., Zennaro, R. (1997). Effect of specific starters on microbiological, biochemical and sensory characteristics of Venaco, a Corsican soft cheese. *Sciences Des Aliments* 17, 79 – 94.
- Castillo, N. A., Perdigón, G., and de LeBlanc, A. (2011). Oral administration of a probiotic *Lactobacillus* modulates cytokine production and TLR expression improving the immune response against *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* infection in mice. *BMC microbiology*, 11(1), 177.
- Centeno, J. A., Menendez, S., Hermida, M. A., Rodriguez-Otero, J. L., (1999). Effects of the addition of *Enterococcus faecalis* in Cebreiro cheese manufacture. *International Journal of Food Microbiology* 48, 97 – 111.

Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A., and Łaniewska-Trokenheim, Ł. (2017). Virulence factors of *Enterococcus* spp. presented in food. *LWT-Food Science and Technology*, 75, 670-676.

Champney, W. S., and Tober, C. L. (1999). Molecular investigation of the postantibiotic effects of clarithromycin and erythromycin on *Staphylococcus aureus* cells. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 43(6), 1324-1328.

Chang, J. D., Wallace, A. G., Foster, E. E., and Kim, S. J. (2018). Peptidoglycan compositional analysis of *Enterococcus faecalis* biofilm by stable isotope labeling by amino acids in a bacterial culture. *Biochemistry*, 57(7), 1274-1283.

Chenoweth, C., and Schaberg, D. (1990). The epidemiology of enterococci. *European journal of clinical microbiology and infectious diseases*, 9(2), 80-89.

Chopra, I., and Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 65(2), 232-260.

Chow J. (2000). Aminoglycoside resistance in enterococci. *Clinical infectious diseases*. 31:586–9.

Clancy, J., Petitpas, J., Dib-Hajj, F., Yuan, W., Cronan, M., Kamath, A. V., Bergeron, J., and Retsema, J. A. (1996). Molecular cloning and functional analysis of a novel macrolide-resistance determinant, *mefA* from *Streptococcus pyogenes*. *Molecular microbiology*, 22(5), 867-879.

CLSI (2015). M100-S25 performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-fifth informational supplement. Wayne, PA: Clinical and laboratory standards institute.

Cocconcelli, P. S., Cattivelli, D., & Gazzola, S. (2003). Gene transfer of vancomycin and tetracycline resistances among *Enterococcus faecalis* during cheese and sausage fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 88(2-3), 315-323.

Collins, J. K., Thornton, G., and Sullivan, G. O. (1998). Selection of probiotic strains for human applications. *International dairy journal*, 8(5-6), 487-490.

Coque, T. M., Patterson, J. E., Steckelberg, J. M., and Murray, B. E. (1995). Incidence of hemolysin, gelatinase, and aggregation substance among enterococci isolated from patients with endocarditis and other infections and from feces of hospitalized and community-based persons. *Journal of infectious diseases*, 171(5), 1223-1229.

Corr, S. C., Hill, C., and Gahan, C. G. (2009). Understanding the mechanisms by which probiotics inhibit gastrointestinal pathogens. *Advances in food and nutrition research*, 56, 1-15.

Cossart, P. (2011). Illuminating the landscape of host–pathogen interactions with the bacterium *Listeria monocytogenes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(49), 19484-19491.

Cossart, P. and Helenius, A. (2014). Endocytosis of viruses and bacteria. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6, a016972.

Costerton, J. W., Stewart, P. S., and Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418), 1318-1322.

Cotter, P., Hill, C., and Ross, R. P. (2005). Food microbiology: bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3(10), 777.

Courvalin P. (2006). Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clinical infectious diseases*. 42:S25–34.

Creti, R., Koch, S., Fabretti, F., Baldassarri, L., and Huebner, J. (2006). Enterococcal colonization of the gastrointestinal tract: role of biofilm and environmental oligosaccharides. *BMC microbiology*, 6(1), 60.

Dahl, A., Iversen, K., Tonder, N., Hoest, N., Arpi, M., Dalsgaard, M., Chehri, M., Soerensen, L., Fanoë, S., Junge, S., Hoest, U., Valeur, N., Lauridsen, T.K., E Fosbol, E., and Bruun, N.E. (2018). 237 Prevalence of infective endocarditis in *Enterococcus faecalis* bacteraemia: a prospective multicenter screening study. *European Heart Journal*, 39(suppl_1), ehy564-237.

Dahlberg, A. C., and Kosikowsky, F. V. (1948). The development of flavor in American Cheddar cheese made from pasteurized milk with *Streptococcus faecalis* Starter1. *Journal of Dairy Science*, 31(4), 275-284.

de Noordhout, C. M., Devleeschauwer, B., Angulo, F. J., Verbeke, G., Haagsma, J., Kirk, M., Havelaar, A., and Speybroeck, N. (2014). The global burden of listeriosis: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 14(11), 1073-1082.

De Vuyst, L., Foulquie Moreno, M. R., and Revets, H. (2003). Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. *International Journal of Food Microbiology*, 84, 299-318

Diaz, L., Kiratisin, P., Mendes, R. E., Panesso, D., Singh, K. V., and Arias, C. A. (2012). Transferable plasmid-mediated resistance to linezolid due to *cfr* in a human clinical isolate of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(7), 3917-3922.

Dobson, A., Cotter, P., Ross, R., and Hill, C. (2012). Bacteriocin production: a probiotic trait?. *Applied and environmental microbiology*, 78(1), 1-6.

Donlan, R. M., and Costerton, J. W. (2002). Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Review*, 15, 167-193.

Dragicevic, S., Milosevic, K., Nestorovic, B., and Nikolic, A. (2017). Influence of the polymorphism C-509T in the *TGFBI* Gene Promoter on the Response to Montelukast. *Pediatric Allergy, Immunology, and Pulmonology*; 30(4), 239-245.

Dragičević, S., Nenadović, S., Jovanović, B., Milanović, M., Novković, I., Pavić, D., and Lješević, M. (2010). Degradation of Topciderska river water quality (Belgrade). *Carpathian journal of Earth and environmental sciences*, 5(2), 177-184.

Dramsi, S., Trieu-Cuot, P., and Bierne, H. (2005). Sorting sortases: A nomenclature proposal for the various sortases of gram-positive bacteria. *Research in Microbiology*, 156, 289-297.

Drider, D., Fimland, G., Héchard, Y., McMullen, L. M., and Prévost, H. (2006). The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiology and molecular biology reviews*, 70(2), 564-582.

Drolia, R., Tenguria, S., Durkes, A.C., Turner, J. R., and Bhunia, A. K. (2018). *Listeria* adhesion protein induces intestinal epithelial barrier dysfunction for bacterial translocation. *Cell host and microbe*, 23(4), 470-484.

Dunny, G. M. (2007). The peptide pheromone-inducible conjugation system of *Enterococcus faecalis* plasmid pCF10: cell–cell signalling, gene transfer, complexity and evolution. *Philosophical transactions of the royal society B: Biological Sciences*, 362(1483), 1185-1193.

Eaton, T. J., and Gasson, M. J. (2001). Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Applied and environmental microbiology*; 67(4), 1628-1635.

Edelson, B. T., and Unanue, E. R. (2002). MyD88-dependent but Toll-like receptor 2-independent innate immunity to *Listeria*: no role for either in macrophage listericidal activity. *The journal of immunology*, 169(7), 3869-3875.

Eijsink, V. G., Axelsson, L., Diep, D. B., Håvarstein, L. S., Holo, H., and Nes, I. F. (2002). Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81(1-4), 639-654.

Elamin, E., Jonkers, D., Juuti-Uusitalo, K., van IJzendoorn, S., Troost, F., Duimel, H., Broers, J., Verheyen, F., Dekker, J., and Masclee, A. (2012). Effects of ethanol and acetaldehyde on tight junction integrity: *in vitro* study in a three dimensional intestinal epithelial cell culture model. *PloS one*, 7(4), e35008.

Elhadidy, M., and Zahran, E. (2014). Biofilm mediates *Enterococcus faecalis* adhesion, invasion and survival into bovine mammary epithelial cells. *Letters in applied microbiology*, 58(3), 248-254.

Elsner, A., Kreikemeyer, B., Braun-Kiewnick, A., Spellerberg, B., Buttaro, B.A., and Podbielski, A. (2002). Involvement of Lsp, a member of the LraI-lipoprotein family in *Streptococcus pyogenes*, in eukaryotic cell adhesion and internalization. *Infection and immunity*, 70(9), 4859-4869.

Fabretti, F., Theilacker, C., Baldassarri, L., Kaczynski, Z., Kropec, A., Holst, O., and Huebner, J. (2006). Alanine esters of enterococcal lipoteichoic acid play a role in biofilm formation and resistance to antimicrobial peptides. *Infection and immunity*, 74(7), 4164-4171.

Facklam, R. R., and Collins, M. D. (1989). Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. *Journal of clinical microbiology*, 27(4), 731-734.

Facklam, R. R., Maria da Gloria, S. C., and Teixeira, L. M. (2002). History, taxonomy, biochemical characteristics, and antibiotic susceptibility testing of enterococci. *The Enterococci* (pp. 1-54). American Society of Microbiology.

Filipic, B., Malesevic, M., Vasiljevic, Z., Lukic, J., Novovic, K., Kojic, M., & Jovcic, B. (2017). Uncovering differences in virulence markers associated with *Achromobacter* species of CF and Non-CF origin. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 224.

Fira, D., Kojic, M., Strahinic, I., Arsenijevic, S., Banina, A., and Topisirovic, L. (2000). Natural isolate *Enterococcus faecalis* BGPM3 produces an inducible extracellular proteinase. *Archives of biological sciences* (Vol. 52, No. 2, pp. 67-76).

Fisher, K., and Phillips, C. (2009). The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*, 155(6), 1749-1757.

Frantz, A. L., Rogier, E. W., Weber, C. R., Shen, L., Cohen, D. A., Fenton, L. A., Bruno, M. E., and Kaetzel, C. S. (2012). Targeted deletion of MyD88 in intestinal epithelial cells results in compromised antibacterial immunity associated with downregulation of polymeric immunoglobulin receptor, mucin-2, and antibacterial peptides. *Mucosal immunology*, 5(5), 501.

Franz, C. M., Holzapfel, W. H., and Stiles, M. E. (1999). Enterococci at the crossroads of food safety?. *International journal of food microbiology*, 47(1-2), 1-24.

Franz, C. M., Stiles, M. E., Schleifer, K. H., and Holzapfel, W. H. (2003). Enterococci in foods -a conundrum for food safety. *International journal of food microbiology*, 88(2-3), 105-122.

Franz, C., Cho, G. Y., and Holzapfel, W. H. (2011). Probiotics: taxonomy and technological features. *Probiotic and prebiotic foods: technology, stability and benefits to human health*, 1-23.

Franz, C., Grube, A., Herrmann, A., Abriouel, H., Stärke, J., Lombardi, A., Tauscher, B., and Holzapfel, W. H. (2002). Biochemical and genetic characterization of the two-peptide bacteriocin enterocin 1071 produced by *Enterococcus faecalis* FAIR-E 309. *Applied and environmental microbiology*, 68(5), 2550-2554.

Franz, C., Muscholl-Silberhorn, A. B., Yousif, N. M., Vancanneyt, M., Swings, J., and Holzapfel, W. H. (2001). Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Applied and Environment Microbiology*; 67(9), 4385-4389.

Franz, C., Van Belkum, M. J., Holzapfel, W. H., Abriouel, H., and Gálvez, A. (2007). Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS microbiology reviews*, 31(3), 293-310.

Fuka, M. M., Maksimovic, A. Z., Tanuwidjaja, I., Hulak, N., and Schloter, M. (2017). Characterization of enterococcal community isolated from an Artisan Istrian raw milk cheese: Biotechnological and safety aspects. *Food technology and biotechnology*, 55(3), 368.

Gajic, O., Kojic, M., Banina, A., and Topisirovic, L. (1999). Characterization of natural isolate *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGMN1-5, a strain producing two bacteriocins, cell wall-associated proteinase and showing clumping phenotype. *Archives of Biological Sciences (Yugoslavia)*. 51:69-78.

Galimand, M., Schmitt, E., Panvert, M., Desmolaize, B., Douthwaite, S., Mechulam, Y., and Courvalin, P. (2011). Intrinsic resistance to aminoglycosides in *Enterococcus faecium* is conferred by the 16S rRNA m5C1404-specific methyltransferase EfmM. *RNA*, 17(2), 251-262.

Gálvez, A., Maqueda, M., Valdivia, E., Quesada, A., and Montoya, E. (1986). Characterization and partial purification of a broad spectrum antibiotic AS-48 produced by *Streptococcus faecalis*. *Canadian Journal of Microbiology*, 32(10), 765-771.

Gálvez, A., Valdivia, E., Abriouel, H., Camafeita, E., Mendez, E., Martínez-Bueno, M., and Maqueda, M. (1998). Isolation and characterization of enterocin EJ97, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* EJ97. *Archives of microbiology*, 171(1), 59-65.

Gandhi, M. and Chikindas, M. L. (2007). *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International journal of food microbiology*; 113, 1–15.

Garau, J. (2008). Other antimicrobials of interest in the era of extended-spectrum β -lactamases: fosfomicin, nitrofurantoin and tigecycline. *Clinical Microbiology and Infection*, 14, 198-202.

Garsin, D. A., Frank, K. L., Silanpää, J., Ausubel, F. M., Hartke, A., Shankar, N., and Murray, B. E. (2014). Pathogenesis and models of enterococcal infection. *Enterococci: From commensals to leading causes of drug resistant infection [Internet]*. Massachusetts eye and ear infirmary.

Gilmore, M. S., Lebreton, F., and van Schaik, W. (2013). Genomic transition of enterococci from gut commensals to leading causes of multidrug-resistant hospital infection in the antibiotic era. *Current opinion in microbiology*, 16(1), 10-16.

Giraffa, G., Carminati, D., and Neviani, E. (1997). Enterococci isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use. *Journal of Food Protection*, 60(6), 732-738.

Gold, H. S., and Moellering, R. C. (1996). Drug therapy-antimicrobial-drug resistance. *New England Journal of Medicine* 335, 1445–1453

Goldenberg, M. M. (2012). Multiple sclerosis review. *Pharmacy and Therapeutics*, 37(3), 175.

Golić, N., Čadež, N., Terzić-Vidojević, A., Šuranská, H., Beganović, J., Lozo, J., Kos, B., Šušković, J., Raspor, P. and Topisirović, L. (2013). Evaluation of lactic acid bacteria and yeast diversity in traditional white pickled and fresh soft cheeses from the mountain regions of Serbia and lowland regions of Croatia. *International journal of food microbiology*, 166(2), 294-300.

Gómez-Llorente, C., Munoz, S., and Gil, A. (2010). Role of Toll-like receptors in the development of immunotolerance mediated by probiotics. *Proceedings of the Nutrition Society*, 69(3), 381-389.

Guardabassi L, and Agersø Y. (2006). Genes homologous to glycopeptide resistance *vanA* are widespread in soil microbial communities. *FEMS Microbiology Letters* 259:221–5.

Guarner, F., and Malagelada J. R. (2003). Gut flora in health and disease. *Lancet*, 361: 512–519.

Günzel, D., and Fromm, M. (2012). Claudins and other tight junction proteins. *Comprehensive Physiology*, 2(3), 1819-52.

Gurtler, V., Mayall, B. C., and Wang, J. (2012). HRM confirmation of *Neisseria gonorrhoeae* in clinical specimens by G→A (position 857) mutation detection in the 16S rRNA gene before sequencing and after *porA* confirmation. *Journal of microbiological methods*, 89(2), 148-152.

Hackbarth, C. J., and Chambers, H. F. (1993). *blaI* and *blaR1* regulate beta-lactamase and PBP 2a production in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 37(5), 1144-1149.

Hadj-Rabia, S., Baala, L., Vabres, P., Hamel-Teillac, D., Jacquemin, E., Fabre, M., Lyonnet, S., Prost, Y., Munnich, A., Hadchouel, M., and Smahi, A. (2004). Claudin-1 gene mutations in neonatal sclerosing cholangitis associated with ichthyosis: a tight junction disease. *Gastroenterology* 127(5), 1386-1390.

Hall, A. E., Gorovits, E. L., Syribeys, P. J., Domanski, P. J., Ames, B. R., Chang, C. Y., Vernachio, J. H., Patti, J. M., and Hutchins, J. T. (2007). Monoclonal antibodies recognizing the *Enterococcus faecalis* collagen-binding MSCRAMM Ace: conditional expression and binding analysis. *Microbial pathogenesis*, 43(2-3), 55-66.

Hammami, R., Fernandez, B., Lacroix, C., and Fliss, I. (2013). Anti-infective properties of bacteriocins: an update. *Cellular and molecular life sciences*, 70(16), 2947-2967.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology*, 166(4), 557-580.

Hancock, L. E. and Perego, M. (2004). The *Enterococcus faecalis* *fsr* two component system controls biofilm development through production of gelatinase. *Journal of bacteriology* 186, 5629–5639.

Harish, K., and Varghese, T. (2006). Probiotics in humans—evidence based review. *Calicut medical journal*, 4(4), e3.

Hashem, Y. A., Amin, H. M., Essam, T. M., Yassin, A. S., & Aziz, R. K. (2017). Biofilm formation in enterococci: genotype-phenotype correlations and inhibition by vancomycin. *Scientific reports*, 7(1), 5733.

Hashimoto, M., Furuyashiki, M., Kaseya, R., Fukada, Y., Akimaru, M., Aoyama, K., Okuno, T., Tamura, T., Kirikae, T., Kirikae, F., Eiraku, N., Morioka, H., Fujimoto, Y., Fukase, K., Takashige, K., Yoichiro Moriya, Y., Kusumoto, S., and Yasuo Suda Y. (2007). Evidence of immunostimulating lipoprotein existing in the natural lipoteichoic acid fraction. *Infection and immunity*, 75(4), 1926-1932.

Hashimoto, M., Tawaratsumida, K., Kariya, H., Kiyohara, A., Suda, Y., Krikae, F., Kirikae, T., and Götz, F. (2006). Not lipoteichoic acid but lipoproteins appear to be the dominant immunobiologically active compounds in *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Immunology*, 177(5), 3162-3169.

Heilig, H., Zoetendal, E.G., Vaughan, E. E., Marteau, P., Akkermans, A., and de Vos, W. M. (2002). Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine by specific amplification of 16S ribosomal DNA. *Applied and Environment Microbiology*; 68, 114–123.

Hendrickx, A. P., Van Schaik, W., and Willems, R. J. (2013). The cell wall architecture of *Enterococcus faecium*: from resistance to pathogenesis. *Future microbiology*, 8(8), 993-1010.

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

Hollenbeck, B. L., and Rice, L. B. (2012). Intrinsic and acquired resistance mechanisms in *Enterococcus*. *Virulence*, 3(5), 421-569.

Holzappel, W. H. N., and Wood, B. J. (2012). The genera of lactic acid bacteria (Vol. 2). Springer Science and Business Media.

Hopwood, D. A., Bibb, J. M., Chater, K. F., Kieser, T., Bruton, C. J., Kieser, H. M., Lydiate, K. M., Smith, C. P., Ward, J. M. Schrepf, H. (1985). Genetic manipulation of *Streptomyces*. A Laboratory Manual. The John Innes Foundation, Norwich, UK.

Hoseinifar, S. H., Mirvaghefi, A., Amoozegar, M. A., Merrifield, D. L., and Ringø, E. (2017). *In vitro* selection of a synbiotic and *in vivo* evaluation on intestinal microbiota, performance and physiological response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. *Aquaculture nutrition*, 23(1), 111-118.

Howe, K. L., Reardon, C., Wang, A., Nazli, A., and McKay, D. M. (2005). Transforming growth factor- β regulation of epithelial tight junction proteins enhances barrier function and blocks enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7-induced increased permeability. *The American journal of pathology*, 167(6), 1587-1597.

Iacono, A., Raso, G. M., Canani, R. B., Calignano, A., and Meli, R. (2011). Probiotics as an emerging therapeutic strategy to treat NAFLD: focus on molecular and biochemical mechanisms. *The Journal of nutritional biochemistry*, 22(8), 699-711.

Irianto, A., and Austin, B. (2002). Probiotics in aquaculture. *Journal of fish diseases*, 25(11), 633-642.

Jackson, C. R., Fedorka-Cray, P. J., and Barrett, J. B. (2004). Use of a genus-and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci. *Journal of clinical microbiology*, 42(8), 3558-3565.

Jaradat, Z. W., and Bhunia, A. K. (2003). Adhesion, invasion, and translocation characteristics of *Listeria monocytogenes* serotypes in Caco-2 cell and mouse models. *Applied and Environmental Microbiology*; 69(6), 3640-3645.

Jensen, L. B., Frimodt-Møller, N., and Aarestrup, F.M. (1999). Presence of *erm* gene classes in gram-positive bacteria of animal and human origin in Denmark. *FEMS Microbiology Letters*, 170(1), 151-158.

Jett, B. D., Huycke, M. M., and Gilmore, M. S. (1994). Virulence of enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*. 7, 462-478.

Joint FAO/WHO expert committee on food additives. Meeting, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, & World Health Organization. (2004). *Evaluation of certain food additives and contaminants: sixty-first report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (Vol. 61). World Health Organization.

- Josse, J., Laurent, F., and Diot, A. (2017). Staphylococcal adhesion and host cell invasion: Fibronectin-binding and other mechanisms. *Frontiers in microbiology*, 8, 2433.
- Jovcic, B., Begovic, J., Lozo, J., Topisirovic, L. and M. Kojic (2009). Dynamic of sodium dodecyl sulfate utilization and antibiotic susceptibility of strain *Pseudomonas* sp. ATCC19151. *Archives of Biological Sciences*; 61, 159-165.
- Jovcic, B., Lepsanovic, Z., Suljagic, V., Rackov, G., Begovic, J., Topisirovic, L., Kojic, M. (2011). Emergence of NDM-1 metallo- β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Serbia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(8): 3929-31.
- Juntunen, M., Kirjavainen, P. V., Ouwehand, A. C., Salminen, S. J., and Isolauri, E. (2001). Adherence of probiotic bacteria to human intestinal mucus in healthy infants and during rotavirus infection. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*; 8: 293–296.
- Kaji, R., Kiyoshima-Shibata, J., Nagaoka, M., Nanno, M., and Shida, K. (2010). Bacterial teichoic acids reverse predominant IL-12 production induced by certain *lactobacillus* strains into predominant IL-10 production via TLR2-dependent ERK activation in macrophages. *The Journal of Immunology*, 184(7), 3505-3513.
- Kapadia, M., and Sakic, B. (2011). Autoimmune and inflammatory mechanisms of CNS damage. *Progress in Neurobiology*; 95, 301–333.
- Kawai, T., and Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology*, 11(5), 373.
- Kearney, H., Altmann, D. R., Samson, R. S., Yiannakas, M. C., Wheeler-Kingshott, C. A. M., Ciccarelli, O., and Miller, D. H. (2015). Cervical cord lesion load is associated with disability independently from atrophy in MS. *Neurology*; 84, 367–373.
- Kitamoto, S., Nagao-Kitamoto, H., Kuffa, P., and Kamada, N. (2016). Regulation of virulence: the rise and fall of gastrointestinal pathogens. *Journal of gastroenterology*, 51(3), 195-205.
- Kohm, A. P., Carpentier, P. A., and Miller, S. D. (2004). Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) by CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. In *Novartis Found. Symp* (Vol. 252, pp. 45-52).

Kolling, Y., Salva, S., Villena, J., and Alvarez, S. (2018). Are the immunomodulatory properties of *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 peptidoglycan common for all Lactobacilli during respiratory infection in malnourished mice?. *PloS one*, *13*(3), e0194034.

Konieczna, P., Schiavi, E., Ziegler, M., Groeger, D., Healy, S., Grant, R., and O'Mahony, L. (2015). Human dendritic cell DC-SIGN and TLR-2 mediate complementary immune regulatory activities in response to *Lactobacillus rhamnosus* JB-1. *PLoS One*, *10*(3), e0120261.

Kreft, Á., Marre, R., Schramm, U., and Wirth, R. (1992). Aggregation substance of *Enterococcus faecalis* mediates adhesion to cultured renal tubular cells. *Infection and immunity*, *60*(1), 25-30.

Kristich, C. J., Li, Y. H., Cvitkovitch, D. G. and Dunny, G. M. (2004). Esp independent biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Journal of bacteriology* *186*, 154–163.

Kühner, D., Stahl, M., Demircioglu, D.D., and Bertsche, U. (2014). From cells to muropeptide structures in 24 h: peptidoglycan mapping by UPLC-MS. *Scientific reports*, *4*, 7494.

Lambrechts, A., Gevaert, K., Cossart, P., Vandekerckhove, J. and Van Troys, M. (2008). *Listeria* comet tails: the actin-based motility machinery at work. *Trends in cell biology*; *18*, 220–227.

Langrish, C. L., Chen, Y., Blumenschein, W. M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J. D and Cua, D. J. (2005). IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *Journal of Experimental Medicine*, *201*(2), 233-240.

Lappin, M. R., Veir, J. K., Satyaraj, E., and Czarnecki-Maulden, G. (2009). Pilot study to evaluate the effect of oral supplementation of *Enterococcus faecium* SF68 on cats with latent feline herpesvirus 1. *Journal of feline medicine and surgery*, *11*(8), 650-654.

Lauková, A., & Czikková, S. (1999). The use of enterocin CCM 4231 in soy milk to control the growth of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology*, *87*(1), 182-182.

Lautenbach, E., Schuster, M. G., Bilker, W. B., and Brennan, P. J. (1998). The role of chloramphenicol in the treatment of bloodstream infection due to vancomycin-resistant *Enterococcus*. *Clinical infectious diseases*, 27(5), 1259-1265.

Leavis, H. L., Bonten, M. J., and Willems, R. J. (2006). Identification of high-risk enterococcal clonal complexes: global dispersion and antibiotic resistance. *Current opinion in microbiology*, 9(5), 454-460.

Leavis, H., Top, J., Shankar, N., Borgen, K., Bonten, M., van Embden, J., and Willems, R. (2004). A novel putative pathogenicity Island linked to *esp* virulence gene of *Enterococcus faecium* and associated with epidemicity. *Journal of Bacteriology*, 186, 672-682.

Lebeer, S., Vanderleyden, J., and De Keersmaecker, S. C. (2010). Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, 8(3), 171.

Lebreton, F., Depardieu, F., Bourdon, N., Fines-Guyon, M., Berger, P., Camiade, S., Leclercq, R., Courvalin, P., and Cattoir, V. (2011). D-Ala-d-Ser *VanN*-type transferable vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*; 55:4606–12.

Lebreton, F., Manson, A. L., Saavedra, J. T., Straub, T. J., Earl, A. M., and Gilmore, M. S. (2017). Tracing the enterococci from paleozoic origins to the hospital. *Cell*, 169(5), 849-861.

Leclercq, R. (2002). Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clinical Infectious Diseases*, 34(4), 482-492.

Lee, S.H. (2015). Intestinal permeability regulation by tight junction: implication on inflammatory bowel diseases. *Intestinal research*, 13(1), 11.

Leendertse, M., Willems, R. J., Giebelen, I. A., van den Pangaart, P. S., Wiersinga, W. J., de Vos, A. F., Florquin, S., Bonten, M., and van der Poll, T. (2008). TLR2-dependent MyD88 signaling contributes to early host defense in murine *Enterococcus faecium* peritonitis. *The Journal of Immunology*, 180(7), 4865-4874.

Lépine, A., and de Vos, P. (2018). Synbiotic effects of the dietary fiber long-chain inulin and probiotic *Lactobacillus acidophilus* W37 can be caused by direct, synergistic stimulation of immune Toll-like receptors and dendritic cells. *Molecular nutrition and food research*, 62(15), 1800251.

Lesuffleur, T., Barbat, A., Dussaulx, E., and Zweibaum, A. (1990). Growth adaptation to methotrexate of HT-29 human colon carcinoma cells is associated with their ability to differentiate into columnar absorptive and mucus-secreting cells. *Cancer research*, 50(19), 6334-6343.

Lewis, K. (2001). Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(4), 999-1007.

Liong, M. T. (2011). Probiotics: Biology, genetics and health aspects. *Microbiology Monographs*. Heidelberg, Springer.

Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4), 402-408.

Lopes, M., Simões, A.P., Tenreiro, R., Marques, J., and Crespo, M. (2006). Activity and expression of a virulence factor, gelatinase, in dairy enterococci. *International journal of food microbiology*, 112(3), 208-214.

Lorea Baroja, M., Kirjavainen, P. V., Hekmat, S., and Reid, G. (2007). Anti-inflammatory effects of probiotic yogurt in inflammatory bowel disease patients. *Clinical and experimental immunology*, 149(3), 470-479.

Lozo, J., Mirkovic, N., O'Connor, P. M., Malesevic, M., Miljkovic, M., Polovic, N., Jovicic, B., Cotter, P. and Kojic, M. (2017). Lactolisterin BU, a novel Class II broad spectrum bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* BGBU1-4. *Applied and Environment Microbiology*; 83(21), e01519-17.

Lozo, J., Vukasinovic, M., Strahinic, I., and Topisirovic, L. (2004). Characterization and antimicrobial activity of bacteriocin 217 produced by natural isolate *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGBUK2-16. *Journal of food protection*, 67(12), 2727-2734.

Lukić, J., Strahinić, I., Milenković, M., Golić, N., Kojić, M., Topisirović, L., and Begović, J., (2013). Interaction of *Lactobacillus fermentum* BGHI14 with rat colonic mucosa: implications for colitis induction. *Applied and Environmental Microbiology*; 79, 5735–44

Macovei, L., Ghosh, A., Thomas, V. C., Hancock, L. E., Mahmood, S., and Zurek, L. (2009). *Enterococcus faecalis* with the gelatinase phenotype regulated by the *fsr* operon and with biofilm-forming capacity are common in the agricultural environment. *Environmental microbiology*, 11(6), 1540-1547.

Maldonado-Barragán, A., Caballero-Guerrero, B., Jiménez, E., Jiménez-Díaz, R., Ruiz-Barba, J. L., and Rodríguez, J. M. (2009). Enterocin C, a class IIb bacteriocin produced by *E. faecalis* C901, a strain isolated from human colostrum. *International journal of food microbiology*, 133(1-2), 105-112.

Marshall, S., Donskey, C., Hutton-Thomas, R., Salata, R. A., and Rice, L. B. (2002) Gene dosage and linezolid resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 46(10):3334– 6.

Mayford, M., and Weisblum, B. (1990). The *ermC* leader peptide: amino acid alterations leading to differential efficiency of induction by macrolide-lincosamide-streptogramin B antibiotics. *Journal of bacteriology*, 172(7), 3772-3779.

McBride, S. M., Coburn, P. S., Baghdayan, A. S., Willems, R. J., Grande, M. J., Shankar, N., and Gilmore, M. S. (2009). Genetic variation and evolution of the pathogenicity island of *Enterococcus faecalis*. *Journal of bacteriology*, 191(10), 3392-3402.

McClellan, K. H., Winson, M. K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S. R., Camara, M., Mavis Daykin, M., Lamb, J., Swift, S., Bycroft, B., Stewart, G., and Williams, P. (1997). *Quorum sensing* and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology*, 143(12), 3703-3711.

McClure, R., and Massari, P. (2014). TLR-dependent human mucosal epithelial cell responses to microbial pathogens. *Frontiers in immunology*; 5, 386.

McDougald, D., Rice, S.A., Barraud, N., Steinberg, P. D., and Kjelleberg, S. (2012). Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nature Reviews Microbiology*, 10(1), 39.

- McFarland, L. V., and Dublin, S. 2008. Meta-analysis of probiotics for the treatment of irritable bowel syndrome. *World journal of gastroenterology*, 14, 2650–2661
- McLauchlin, J. (1990). Human listeriosis in Britain, 1967–1985, a summary of 722 cases. 1. Listeriosis during pregnancy and in the newborn. *Epidemiology and infection*; 104, 181–189.
- McMahon, E. J., Bailey, S. L., Castenada, C. V., Waldner, H., and Miller, S. D. (2005). Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis. *Nature medicine*, 11(3), 335.
- McOsker, C. C., and Fitzpatrick, P. M. (1994). Nitrofurantoin: mechanism of action and implications for resistance development in common uropathogens. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 33(suppl_A), 23-30.
- Menninger, J. R. (1995). Mechanism of inhibition of protein synthesis by macrolide and lincosamide antibiotics. *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology*, 6(3-4), 229-250.
- Miller, M. B., and Bassler, B. L. (2001). *Quorum sensing* in bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, 55(1), 165-199.
- Mills, K. H. (2011). TLR-dependent T cell activation in autoimmunity. *Nature Reviews Immunology*, 11(12), 807.
- Miljkovic, M., Strahinic, I., Tolinacki, M., Zivkovic, M., Kojic, S., Golic, N., and Kojic, M. (2015). AggLb is the largest cell-aggregation factor from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGNJ1-64, functions in collagen adhesion, and pathogen exclusion in vitro. *PLoS One*, 10(5), e0126387.
- Mohamed, J. A., and Huang, D. B. (2007). Biofilm formation by enterococci. *Journal of medical microbiology*, 56(12), 1581-1588.
- Mohamed, J. A., Huang, W., Nallapareddy, S. R., Teng, F. and Murray, B. E. (2004). Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infection and immunity* 72, 3658–3663.
- Mohamed, J. A., Teng, F., Nallapareddy, S. R. and Murray, B. E. (2006). Pleiotrophic effects of 2 *Enterococcus faecalis* *sagA*-like genes, *sagA* and *sagB*, which encode proteins that are

antigenic during human infection, on biofilm formation and binding to collagen type I and fibronectin. *Journal of infectious diseases* 193, 231–240.

Mokoena, M. P. (2017). Lactic acid bacteria and their bacteriocins: Classification, biosynthesis and applications against uropathogens: A mini-review. *Molecules*, 22(8), 1255.

Montanaro, L., Poggi, A., Visai, L., Ravaioli, S., Campoccia, D., Speziale, P., and Arciola, C. R. (2011). Extracellular DNA in biofilms. *The International journal of artificial organs*, 34(9), 824-831.

Moreno, M. F., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., and De Vuyst, L. (2006). The role and application of enterococci in food and health. *International journal of food microbiology*, 106(1), 1-24.

Moslehi-Jenabian, S., Lindegaard, L., and Jespersen, L. (2010). Beneficial effects of probiotic and food borne yeasts on human health. *Nutrients*, 2(4), 449-473.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63.

Nakayama, J., Kariyama, R., and Kumon, H. (2002). Description of a 23.9 kilobase chromosomal deletion containing a region encoding *fsr* genes which mainly determines the gelatinase-negative phenotype of clinical isolates of *Enterococcus faecalis* in urine. *Applied and environmental microbiology*; 68, 3152–3155.

Nallapareddy, S. R., Singh, K. V., Okhuysen, P. C., and Murray, B. E. (2008). A functional collagen adhesin gene, *acm*, in clinical isolates of *Enterococcus faecium* correlates with the recent success of this emerging nosocomial pathogen. *Infection and Immunity*, 76, 4110-4119.

Nallapareddy, S. R., Weinstock, G. M., and Murray, B. E. (2003). Clinical isolates of *Enterococcus faecium* exhibit strain-specific collagen binding mediated by *Acm*, a new member of the MSCRAMM family. *Molecular Microbiology*, 47, 1733-1747.

Naser, S. M., Thompson, F. L., Hoste, B., Gevers, D., Dawyndt, P., Vancanneyt, M., and Swings, J. (2005). Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid

identification of *Enterococcus* species based on *rpoA* and *pheS* genes. *Microbiology*, 151(7), 2141-2150.

Naydenov, N. G., Baranwal, S., Khan, S., Feygin, A., Gupta, P., and Ivanov, A. I. (2013). Novel mechanism of cytokine-induced disruption of epithelial barriers: Janus kinase and protein kinase D-dependent downregulation of junction protein expression. *Tissue barriers*, 1(4), e25231.

Nilsen, T., Nes, I. F., and Holo, H. (2003). Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Applied and environmental microbiology*, 69(5), 2975-2984.

Nishiyama, K., Sugiyama, M., and Mukai, T. (2016). Adhesion properties of lactic acid bacteria on intestinal mucin. *Microorganisms*, 4(3), 34.

Novovic, K., Mihajlovic, S., Vasiljevic, Z., Filipic, B., Begovic, J., and Jovicic, B. (2015). Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from Serbia: revision of CarO classification. *PloS one*, 10(3), e0122793.

Novović, K., Trudić, A., Brkić, S., Vasiljević, Z., Kojić, M., Medić, D., Ćirković, I., and Jovčić, B. (2017). Molecular epidemiology of colistin-resistant, carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Serbia from 2013 to 2016. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(5), e02550-16.

Ochoa, S. A., Escalona, G., Cruz-Córdova, A., Dávila, L. B., Saldaña, Z., Cázares-Domínguez, V., Eslava, C., López-Martínez, B., Hernández-Castro, R., Aquino-Jarquín, G., and Xicohtencatl-Cortés, J. (2013). Molecular analysis and distribution of multidrug-resistant *Enterococcus faecium* isolates belonging to clonal complex 17 in a tertiary care center in Mexico City. *BMC microbiology*, 13(1), 291.

Ogier, J. C., and Serror, P. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: the *Enterococcus* genus. *International journal of food microbiology*, 126(3), 291-301.

Ohland, C. L., and MacNaughton, W. K. (2010). Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 298(6), G807-G819.

Olsson, T. (1995). Critical influences of the cytokine orchestration on the outcome of myelin antigen-specific T-cell autoimmunity in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Immunological reviews*, 144(1), 245-268.

Onyiah, J. C., and Colgan, S. P. (2016). Cytokine responses and epithelial function in the intestinal mucosa. *Cellular and molecular life sciences*, 73(22), 4203-4212.

Opitz, B., Püschel, A., Beermann, W., Hocke, A.C., Förster, S., Schmeck, B., van Laak, V., Chakraborty, T., Suttorp, N., and Hippenstiel, S. (2006). *Listeria monocytogenes* activated p38 MAPK and induced IL-8 secretion in a nucleotide-binding oligomerization domain 1-dependent manner in endothelial cells. *The Journal of Immunology*, 176(1), 484-490.

Oumer, B. A., Gaya, P., Fernandez-Garcia, E., Marciaca, R., Garde, S., Medina, M., Nunez, M., (2001). Proteolysis and formation of volatile compounds in cheese manufactured with a bacteriocin-producing adjunct culture. *Journal of dairy research*, 68(1), 117-129.

Pandey, K. R., Naik, S. R., and Vakil, B. V. (2015). Probiotics, prebiotics and synbiotics-a review. *Journal of food science and technology*, 52(12), 7577-7587.

Park, O. J., Han, J.Y., Baik, J. E., Jeon, J. H., Kang, S. S., Yun, C. H., Oh, J. W., Seo, H. S. and Han, S. H. (2013). Lipoteichoic acid of *Enterococcus faecalis* induces the expression of chemokines via TLR2 and PAFR signaling pathways. *Journal of leukocyte biology*, 94(6), 1275-1284.

Paulsen, I. T., Banerjee, L., Myers, G. S. A., Nelson, K. E., Seshadri, R., Read, T. D., Fouts, D. E., et al. (2003). Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science*, 299(5615), 2071-2074.

Pinto, M., Gómez, M. R., Seifert, S., Watzl, B., Holzapfel, W. H., and Franz, C. (2009). Lactobacilli stimulate the innate immune response and modulate the TLR expression of HT29 intestinal epithelial cells *in vitro*. *International journal of food microbiology*, 133(1-2), 86-93.

Pizarro-Cerdá, J., Kühbacher, A., and Cossart, P. (2012). Entry of *Listeria monocytogenes* in mammalian epithelial cells: an updated view. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(11), a010009.

Pometto III, A. L., and Demirci, A. (2015). *Biofilms in the food environment*. John Wiley and Sons.

Popovic, N., Djokic, J., Brdaric, E., Dinic, M., Terzić-Vidojević, A., Golic, N., and Veljovic, K. (2019). The influence of heat-killed *Enterococcus faecium* BGPAS1-3 on the tight junction protein expression and immune function in differentiated Caco-2 cells infected with *Listeria monocytogenes* ATCC 19111. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 412.

Popović, N., Dinić, M., Tolinački, M., Mihajlović, S., Terzić-Vidojević, A., Bojić, S., Djokić, J., Golić, N., and Veljović, K. (2018). New Insight into biofilm formation ability, the presence of virulence genes and probiotic potential of *Enterococcus* sp. dairy isolates. *Frontiers in microbiology*, *9*, 78.

Prescott, J. F., and Baggot, J. D. (2000). Chloramphenicol, Thiamphenicol, and Florfenicol. *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*, 263-274.

Rabinovich, L., Sigal, N., Borovok, I., Nir-Paz, R. and Herskovits, A. A. (2012). Prophage excision activates *Listeria* competence genes that promote phagosomal escape and virulence. *Cell*; *150*, 792–802.

Rachakonda, G., Vu, T., Jin, L., Samanta, D., and Datta, P. K. (2016). Role of TGF- β -induced Claudin-4 expression through c-Jun signaling in non-small cell lung cancer. *Cellular signalling*, *28*(10), 1537-1544.

Radoshevich, L., and Cossart, P. (2018). *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, *16*(1), 32.

Rice, L. B., Bellais, S., Carias, L.L., Hutton-Thomas, R., Bonomo, R. A., Caspers, P., Page, M.G., Gutmann, L. (2004). Impact of specific *pbp5* mutations on expression of beta-lactam resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob agents chemotherapy* *48*(8):3028-32.

Roberts, M.C. (2005). Tetracycline resistance due to ribosomal protection proteins. *Frontiers In Antimicrobial Resistance* (pp. 19-28). American Society of Microbiology.

Rolfe R.D. (1991). Population dynamics of the intestinal tract; in Blankenship LC (ed): Colonization control of human bacterial enteropathogens in poultry. San Diego, Academic Press, pp 59–75

Roselli, M., Finamore, A., Britti, M. S., and Mengheri, E. (2006). Probiotic bacteria *Bifidobacterium animalis* MB5 and *Lactobacillus rhamnosus* GG protect intestinal Caco-2 cells from the inflammation-associated response induced by enterotoxigenic *Escherichia coli* K88. *British Journal of Nutrition*, 95(6), 1177-1184.

Rozdzinski, E., Marre, R., Susa, M., Wirth, R., and Muscholl-Silberhorn, A. (2001). Aggregation substance-mediated adherence of *Enterococcus faecalis* to immobilized extracellular matrix proteins. *Microbial pathogenesis*, 30(4), 211-220.

Salton, M. R., and Shockman, G. D. (1981). β -Lactam Antibiotics: Mode of Action, new developments, and future prospects. Academic Press.

Sánchez, B., Fernández-García, M., Margolles, A., Clara, G., and Ruas-Madiedo, P. (2010). Technological and probiotic selection criteria of a bile-adapted *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* strain. *International Dairy Journal*, 20(11), 800-805.

Sarantinopoulos, P., Kalantzopoulos, G., and Tsakalidou, E. (2002). Effect of *Enterococcus faecium* on microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Greek Feta cheese. *International Journal of Food Microbiology* 76, 93 – 105.

Sarti, M., Campanile, F., Sabia, C., Santagati, M., Gargiulo, R., and Stefani, S. (2012). Polyclonal diffusion of beta-lactamase-producing *Enterococcus faecium*. *Journal of clinical microbiology*, 50(1), 169-172.

Sartingen, S., Rozdzinski, E., Muscholl-Silberhorn, A., and Marre, R. (2000). Aggregation substance increases adherence and internalization, but not translocation, of *Enterococcus faecalis* through different intestinal epithelial cells *in vitro*. *Infection and immunity*, 68(10), 6044-6047.

Satokari, R. M., Vaughan, E. E., Akkermans, A. D., Saarela, M., and de Vos, W. M. (2001). Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*; 67, 504–513.

Sava, I. G., Heikens, E., and Huebner, J. (2010). Pathogenesis and immunity in enterococcal infections. *Clinical Microbiology and Infection*, 16, 533-540

Sava, I. G., Zhang, F., Toma, I., Theilacker, C., Li, B., Baumert, T. F., Holst, O., Linhardt, R., and Huebner, J. (2009). Novel interactions of glycosaminoglycans and bacterial glycolipids mediate binding of enterococci to human cells. *Journal of Biological Chemistry*, 284(27), 18194-18201.

Sawa, N., Wilaipun, P., Kinoshita, S., Zendo, T., Leelawatcharamas, V., Nakayama, J., and Sonomoto, K. (2012). Isolation and characterization of enterocin W, a novel two-peptide lantibiotic produced by *Enterococcus faecalis* NKR-4-1. *Applied environmental microbiology*, 78(3), 900-903.

Schiffrin, E. J., and Blum, S. (2002). Interactions between the microbiota and the intestinal mucosa. *European journal of clinical nutrition*, 56(S3), S60.

Semedo, T., Santos, M. A., Martins, P., Lopes, M. F. S., Marques, J. J. F., Tenreiro, R., and Crespo, M. T. B. (2003). Comparative study using type strains and clinical and food isolates to examine hemolytic activity and occurrence of the *cyl* operon in enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(6), 2569-2576.

Shah, K. J., Cherabuddi, K., Shultz, J., Borgert, S., Ramphal, R., and Klinker, K. P. (2018). Ampicillin for the treatment of complicated urinary tract infections caused by vancomycin-resistant *Enterococcus* spp (VRE): a single-center university hospital experience. *International journal of antimicrobial agents*, 51(1), 57-61.

Shankar, N., Lockett, C. V., Baghdayan, A. S., Drachenberg, C., Gilmore, M. S., and Johnson, D. E. (2001). Role of *Enterococcus faecalis* surface protein ESP in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. *Infection and immunity*, 69(7), 4366-4372.

Shinabarger, D., Marotti, K., Murray R, Lin, H., Melchior, S., Swaney, S., Dunyak, W., and Buysse (1997). Mechanism of action of oxazolidinones: effects of linezolid and eperezolid on translation reactions. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 41:2132–6.

Sicard, J. F., Le Bihan, G., Vogeleer, P., Jacques, M., and Harel, J. (2017). Interactions of intestinal bacteria with components of the intestinal mucus. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 387.

Sifaoui F, Arthur M, Rice L, and Gutmann L. (2001). Role of penicillin-binding protein 5 in expression of ampicillin resistance and peptidoglycan structure in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45: 2594-7.

Simmons, S. B., Pierson, E. R., Lee, S. Y., and Goverman, J. M. (2013). Modeling the heterogeneity of multiple sclerosis in animals. *Trends in immunology*; 34, 410–422.

Simoës, M. (2011). Antimicrobial strategies effective against infectious bacterial biofilms. *Current medicinal chemistry*, 18(14), 2129-2145.

Soares-Santos, V., Barreto, A. S., and Semedo-Lemsaddek, T. (2015). Characterization of enterococci from food and food-related settings. *Journal of food protection*, 78(7), 1320-1326.

Stanisavljević, S., Dinić, M., Jevtić, B., Đedović, N., Momčilović, M., Đokić, J., Golić, N., Stojković, M. M., and Miljković, Đ. (2018). Gut microbiota confers resistance of Albino Oxford rats to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Frontiers in immunology*, 9.

Stanisavljević, S., Lukić, J., Soković, S., Mihajlovic, S., Mostarica Stojković, M., Miljković, D., and Golić, N. (2016). Correlation of gut microbiota composition with resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis in rats. *Frontiers in microbiology*, 7, 2005.

Strahinic, I., Busarcevic, M., Pavlica, D., Milasin, J., Golic, N., and Topisirovic, L. (2007). Molecular and biochemical characterizations of human oral lactobacilli as putative probiotic candidates. *Oral microbiology and immunology*, 22(2), 111-117.

Suárez, M., González-Zorn, B., Vega, Y., Chico-Calero, I., and Vázquez-Boland, J. A. (2001). A role for ActA in epithelial cell invasion by *Listeria monocytogenes*. *Cellular microbiology*, 3(12), 853-864.

Sultana, R., McBain, A. J., and O'Neill, C. A. (2013). Lysates of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* augment tight junction barrier function in human primary epidermal keratinocytes in a strain-dependent manner. *Applied and Environmental Microbiology*, AEM-00982.

Sutcliffe, J., Grebe, T., Tait-Kamradt, A., and Wondrack, L. (1996). Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 40(11), 2562-2566.

Štyriak, I., and Ljungh, S. (2003). Binding of extracellular matrix molecules by enterococci. *Current microbiology*, 46, 0435-0442.

Tarasova, E., Yermolenko, E., Donets, V., Sundukova, Z., Bochkareva, A., Borschev, I., Suvorova, M., Ilyasov, I., Simanenkov, V., and Suvorov, A. (2010). The influence of probiotic *Enterococcus faecium* strain L5 on the microbiota and cytokines expression in rats with dysbiosis induced by antibiotics. *Beneficial Microbes*, 1(3), 265-270.

Terzic-Vidojevic, A., Mihajlovic, S., Uzelac, G., Veljovic, K., Tolinacki, M., Nikolic, M., Topisirovic, L., and Kojic, M. (2014). Characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Travnik young cheeses, sweet creams and sweet kajmaks over four seasons. *Food microbiology*, 39, 27-38.

Terzic-Vidojevic, A., Tolinacki, M., Nikolic, M., Veljovic, K., Jovanovic, S., Macej, O., and Topisirovic, L. (2013). Artisanal Vlasina raw goat's milk cheese: evaluation and selection of autochthonous lactic acid bacteria as starter cultures. *Food technology and biotechnology*, 51(4), 554.

Terzic-Vidojevic, A., Vukasinovic, M., Veljovic, K., Ostojic, M., and Topisirovic, L. (2007). Characterization of microflora in homemade semi-hard white Zlatar cheese. *International journal of food microbiology*, 114(1), 36-42.

Terzić-Vidojević, A., Mihajlović, S., Uzelac, G., Golić, N., Fira, Đ., Kojić, M., and Topisirović, L. (2014). Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal white brined Golija cows' milk cheeses. *Archives of Biological Sciences*, 66, 179-192.

Terzić-Vidojević, A., Veljović, K., Begović, J., Filipić, B., Popović, D., Tolinački, M., Miljković, M., Kojić, M., and Golić, N. (2015). Diversity and antibiotic susceptibility of autochthonous dairy enterococci isolates: are they safe candidates for autochthonous starter cultures?. *Frontiers in microbiology*, 6, 954.

Theilacker, C., Kaczynski, Z., Kropec, A., Fabretti, F., Sange, T., Holst, O., and Huebner, J. (2006). Opsonic antibodies to *Enterococcus faecalis* strain 12030 are directed against lipoteichoic acid. *Infection and immunity*, 74(10), 5703-5712.

Toh, S. M., Xiong, L., Arias, C. A., Villegas, M. V., Lolans, K., Quinn, J., and Mankin, A. S. (2007). Acquisition of a natural resistance gene renders a clinical strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resistant to the synthetic antibiotic linezolid. *Molecular microbiology*, 64(6), 1506-1514.

Topisirović, Lj., Jovčić, B. (2013). Antibiotici: molekularni mehanizmi delovanja i rezistencije. Beograd: Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.

Torres, D., Barrier, M., Bihl, F., Quesniaux, V. J., Maillet, I., Akira, S., Ryffel, B., and Erard, F. (2004). Toll-like receptor 2 is required for optimal control of *Listeria monocytogenes* infection. *Infection and immunity*, 72(4), 2131-2139.

Töttemeyer, S., Foster, N., Kaiser, P., Maskell, D. J., and Bryant, C. E. (2003). Toll-like receptor expression in C3H/HeN and C3H/HeJ mice during *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* infection. *Infection and immunity*, 71(11), 6653-6657.

Trivedi, K., Cupakova, S., and Karpiskova, R. (2011). Virulence factors and antibiotic resistance in enterococci isolated from food-stuffs. *Veterinarni Medicina*, 56, 352-357

Tsai, C. C., Lin, P. P., and Hsieh, Y. M. (2008). Three *Lactobacillus* strains from healthy infant stool inhibit enterotoxigenic *Escherichia coli* grown *in vitro*. *Anaerobe*, 14(2), 61-67.

Tsilingiri, K., Barbosa, T., Penna, G., Caprioli, F., Sonzogni, A., Viale, G., and Rescigno, M. (2012). Probiotic and postbiotic activity in health and disease: comparison on a novel polarised *ex-vivo* organ culture model. *Gut*, gutjnl-2011.

Tyson, G. H., Sabo, J. L., Rice-Trujillo, C., Hernandez, J., and McDermott, P. F. (2018). Whole-genome sequencing based characterization of antimicrobial resistance in *Enterococcus*. *Pathogens and disease*, 76(2), fty018.

Upadhyaya, P. M., Ravikumar, K. L., and Umopathy, B. L. (2009). Review of virulence factor of *Enterococcus*: An emerging nosocomial pathogen. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 27, 301-305

Usami, Y., Chiba, H., Nakayama, F., Ueda, J., Matsuda, Y., Sawada, N., Komori, T., Ito, A., and Yokozaki, H. (2006). Reduced expression of claudin-7 correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Human pathology*, 37(5), 569-577.

Valenzuela, A. S., ben Omar, N., Abriouel, H., López, R. L., Veljovic, K., Cañamero, M. M., Kojic, M., Topisirovic, L., and Gálvez, A. (2009). Virulence factors, antibiotic resistance, and bacteriocins in enterococci from artisan foods of animal origin. *Food Control*, 20(4), 381-385.

van den Bogaard, A. E., and Stobberingh, E. E. (2000). Epidemiology of resistance to antibiotics: links between animals and humans. *International journal of antimicrobial agents*, 14(4), 327-335.

van Merode, A. E., van der Mei, H. C., Busscher, H. J., and Krom, B. P. (2006). Influence of culture heterogeneity in cell surface charge on adhesion and biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Journal of bacteriology*, 188(7), 2421-2426.

Van Tyne, D., Martin, M. J., and Gilmore, M. S. (2013). Structure, function, and biology of the *Enterococcus faecalis* cytolysin. *Toxins*, 5(5), 895-911.

Vankerckhoven, V., Van Autgaerden, T., Vael, C., Lammens, C., Chapelle, S., Rossi, R., Jabes, D., and Goossens, H. (2004). Development of Multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 4473-4479.

Veljović, K., Popović, N., Miljković, M., Tolinački, M., Terzić-Vidojević, A., and Kojić, M. (2017). Novel aggregation promoting factor AggE contributes to the probiotic properties of *Enterococcus faecium* BGG09-28. *Frontiers in microbiology*, 8, 1843.

Veljović, K., Popović, N., Vidojević, A. T., Tolinački, M., Mihajlović, S., Jovčić, B., & Kojić, M. (2015). Environmental waters as a source of antibiotic-resistant *Enterococcus* species in Belgrade, Serbia. *Environmental monitoring and assessment*, 187(9), 599.

Villani, F., and Coppola, S. (1994). Selection of enterococcal strains for water-buffalo Mozzarella cheese manufacture. *Annali di Microbiologia ed Enzimologia (Italy)*.

Villena, J., and Kitazawa, H. (2014). Modulation of intestinal TLR4-inflammatory signaling pathways by probiotic microorganisms: lessons learned from *Lactobacillus jensenii* TL2937. *Frontiers in immunology*, 4, 512.

Wang, S., Liu, K. U. N., Seneviratne, C. J., Li, X., Cheung, G. S. P., Jin, L., Chu, C. H. and Zhang, C. (2015). Lipoteichoic acid from an *Enterococcus faecalis* clinical strain promotes TNF- α expression through the NF- κ B and p38 MAPK signaling pathways in differentiated THP-1 macrophages. *Biomedical reports*, 3(5), 697-702.

Wehrli, W., Knüsel, F., Schmid, K., and Staehelin, M. (1968). Interaction of rifamycin with bacterial RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 61(2), 667.

Wells J. M. (2011). Immunomodulatory mechanisms of lactabacilli. *Microbial cell factories*; 10(suppl 1):S17.

Werner, G., Fleige, C., Ewert, B., Laverde-Gomez, J. A., Klare, I., and Witte, W. (2010). High-level ciprofloxacin resistance among hospital-adapted *Enterococcus faecium* (CC17). *International journal of antimicrobial agents*, 35(2), 119-125.

Zapun, A., Contreras-Martel, C., and Vernet, T. (2008). Penicillin binding proteins and beta-lactam resistance. *FEMS Microbiology Reviews*; 32:361-85.

Zihni, C., Mills, C., Matter, K., and Balda, M. S. (2016). Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nature reviews Molecular cell biology*, 17(9), 564.

Zoetendal, E. G., Akkermans, A. D., and de Vos, W. M. (1998). Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*; 64, 3854–3859.

Živković, M., Miljković, M. S., Ruas-Madiedo, P., Markelić, M. B., Veljović, K., Tolinački, M., Soković, S., Korać, A., and Golić, N. (2016). EPS-SJ exopolisaccharide produced by the strain *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8 is involved in adhesion to epithelial intestinal cells and decrease on *E. coli* association to Caco-2 cells. *Frontiers in microbiology*, 7,286

8. PRILOZI

8.1. Prilog 1

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGG08-25

ACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGC
 GATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTG
 AGAGAAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTTCGCGACTCGTTGTA
 CCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCAT
 CCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTTGCTAGAGTGCCCAACTGAATG
 ATGGCAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCAC
 GACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTTGCCCCCGAAGGGGAA
 GCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTT
 GCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTT
 GAGTTTCAACCTTGCGGTCGTA
 CCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGC
 AGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGG
 ACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCCACGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGT
 TACAGACCAGAGAGCCGCCTTCGCCAC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGG08-26

ACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGC
 GATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTG
 AGAGAAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTTCGCGACTCGTTGTA
 CCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCAT
 CCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTTGCTAGAGTGCCCAACTGAATG
 ATGGCAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCAC
 GACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTTGCCCCCGAAGGGGAA
 GCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTT
 GCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTT
 GAGTTTCAACCTTGCGGTCGTA
 CCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGC
 AGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGG
 ACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCCACGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGT
 TACAGACCAGAGAGCCGCCTTCGCCAC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGG08-30

ACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGC
 GATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTG
 AGAGAAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTTCGCGACTCGTTGTA
 CCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCAT
 CCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTTGCTAGAGTGCCCAACTGAATG
 ATGGCAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCAC
 GACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTTGCCCCCGAAGGGGAA
 GCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTT
 GCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTT
 GAGTTTCAACCTTGCGGTCGTA
 CCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGC
 AGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGG

ACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGT
TACAGACCAGAGAGCCGCCTTCGCCAC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGG09-28

ACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGGCGTGCTGATCCGC
GATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAACTG
AGAGAAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTTCGCAACTCGTTGTA
CCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCAT
CCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTTGCTAGAGTGCCCAACTGAATG
ATGGCAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCAC
GACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTTGCCCCCGAAGGGGAA
GCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTT
GCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTT
GAGTTTCAACCTTGC GGTCGTA
CTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGC
AGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGG
ACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGT
TACAGACCAGAGAGCCGCCTTCGCCAC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGG09-30

ACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGGCGTGCTGATCCGC
GATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTG
AGAGAAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTTCGCGACTCGTTGTA
CCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCAT
CCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTTGCTAGAGTGCCCAACTGAATG
ATGGCAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCAC
GACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTTGCCCCCGAAGGGGAA
GCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTT
GCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTT
GAGTTTCAACCTTGC GGTCGTA
CTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGC
AGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGG
ACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGT
TACAGACCAGAGAGCCGCCTTCGCCAC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGG011-27

ACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGGCGTGCTGATCCGC
GATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTG
AGAGAAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTTCGCGACTCGTTGTA
CCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCAT
CCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTTGCTAGAGTGCCCAACTGAATG
ATGGCAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCAC
GACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTTGCCCCCGAAGGGGAA
GCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTT
GCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTT
GAGTTTCAACCTTGC GGTCGTA
CTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGC
AGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTAGCACTCATCGTTTACAGCGTGG
ACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGT
TACAGACCAGAGAACC GCCCTCGCCAC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGG011-29

ACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGC
GATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAAGT
AGAGAAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTTCGCGACTCGTTGTACTTC
CCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCAT
CCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTTGCTAGAGTGCCCAACTGAATG
ATGGCAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCAC
GACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTTGCCCCCGAAGGGGAA
GCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTT
GCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTT
GAGTTTCAACCTTGCGGTCGTACTIONCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGC
AGCACTGAATGGCGGAAACACTCAAACACTTAGCACTCATCGTTTACAGCGTGG
AGTACCACGGGGTCTAATCCTGTTTGTCCCCACGCTTTCTAGCATCAGCGTCGGT
TACAAACGAAATAACAGCCTTCGTCAC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGPAS1-3

ACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGC
GATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAAGT
AGAGAAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTTCGCAACTCGTTGTACTTC
CCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCAT
CCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTTGCTAGAGTGCCCAACTGAATG
ATGGCAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCAC
GACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTTGCCCCCGAAGGGGAA
GCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTT
GCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTT
GAGTTTCAACCTTGCGGTCGTACTIONCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGC
AGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGG
ACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCCCCACGCTTTTCGAGCCTCAGCGTCAGT
TACAGACCAGAGAGCCGCCCTCGCCAC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGPAS1-4

ACGGGCGGGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGC
GATTACAACCGATTCCGGCTTCATGCAGGCAAGTTGCAGCCGGCAATCCGAAGT
AAAGAAGCTTTAAAAAATTACCTTACCCTCGCGACTTCGCAACTCGTTGTACTTC
CCATTGTACCACGTGTGTACCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCAT
CCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTTGCTAAAGTGCCCAACTGAATG
ATGGCAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCAC
GACACGAGCTGACAACAACCATGCACCACCGTCACTTTGCCCCCAAAGGGGAA
GCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAAACCGGGTAAGGTTCTTCGCGTT
GCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTT
GAGTTTCAACCTTGCGGTCGTACTIONCCCCAGGGGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGC
AGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGG
ACTACCAGGGTATCTAATCCGGTTTGTCCCCACCCTTTCAAGCCTCAGCGTCAG
TTACAGACCAAAGAGCCGCCTTCGCCAC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGPAS1-10

ACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGC
 GATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAACTG
 AGAGAAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTTCGCAACTCGTTGACTTC
 CCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCAT
 CCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTTGCTAGAGTGCCCAACTGAATG
 ATGGCAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCAC
 GACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTTGCCCCCGAAGGGGAA
 GCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTT
 GCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTT
 GAGTTTCAACCTTGCGGTCGTACTIONCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGC
 AGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGG
 ACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCCACGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGT
 TACAGACCAGAGAGCCGCCTTCGCCAC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGPAS1-20

ACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGC
 GATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAACTG
 AGAGAAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTTCGCAACTCGTTGACTTC
 CCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCAT
 CCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTTGCTAGAGTGCCCAACTGAATG
 ATGGCAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCAC
 GACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTTGCCCCCGAAGGGGAA
 GCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTT
 GCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTT
 GAGTTTCAACCTTGCGGTCGTACTIONCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGC
 AGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGG
 ACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCCACGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGT
 TACAGACCAGAGAGCCGCCTTCGCCAC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGPAS1-58

ACGGGCGGGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGC
 GATTACAAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCAAGTTGCAGCCTGCAATCCGAACTG
 AAAGAAGCTTTAAAAAATTAGCTTAGCCTCGCGACTTCCCAACTCGTTGACTTC
 CCATTGTACCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCAT
 CCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTTGCTAAAGTGCCCAACTGAATG
 ATGGCAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCAC
 GACACGAGCTGACAACAACCATGCACCACCGGTCACTTTGCCCCCAAAGGGGAA
 GCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCGGGTAAGGTTCTTCGCGTT
 GCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTT
 GAGTTTCAACCTTGCGGTCGTACTIONCCCCAGGGGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGC
 AGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGG
 ACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCCACGCTTTCAGCCTCAGCGTCAGT
 TACAAACCAAAGAGCCGCCTTCGCCAC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGPAS1-71

ACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGC
GATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAACCTG
AGAGAAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTTCGCAACTCGTTGTACTTC
CCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCAT
CCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTTGCTAGAGTGCCCAACTGAATG
ATGGCAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCAC
GACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTTGCCCCCGAAGGGGAA
GCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGGTCTTCCCGTT
GCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTT
GAGTTTCAACCTTGGGGTCGTAATCCCCACGCGGAATGCTTAATGCGTTAGCTGC
AGCACTGAATGGCGGAAACCCTCCAACACTTAGCACTCATCGTTTACAGCGTGGA
CTACCAAGGTATCTAATCCTGCTTGTCTCCCCACGCTTTCGAGCCTCAGCGTCGGTT
ACAAACCAGAAAACCGCCGTCGTCAC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGRE2-40

ACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGC
GATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACCTG
AGAGAAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTTCGCGACTCGTTGTACTTC
CCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCAT
CCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTTGCTAGAGTGCCCAACTGAATG
ATGGCAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCAC
GACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTTGCCCCCGAAGGGGAA
GCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTT
GCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTT
GAGTTTCAACCTTGGGGTCGTAATCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGC
AGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGG
ACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCCACGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGT
TACAGACCAGAGAGCCGCCTTCGCCAC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGRE2-48

ACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGGCCATATTCCTCCTCGGCGTGCTGGACCAC
GATAACCAGCGATTCCGGCTTCATGTGGGCGAGTTGCAGCCTACCATCCGAACCTG
AGAGAAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTTTGCGACTCGTTGTACTTC
CCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCAT
CCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTTGCTGAGTGCCCAACTAAATGA
TGGCAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACG
ACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTTGCCCCCGAAGGGGAAG
CTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTG
CTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTG
AGTTTCAACCTTGGGGTCGTAATCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCA
GCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCTACACTTAGCACTCATCGTTTACAGCGTGGA
TACCACGGTGTCTAATCCTGTTTGTCTCCCCACGCTTTCGAGCCTCAGCGTCGGTTA
CAGACCAGAGAACCGCCGTCGTCAC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGVL2a-53

ACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGC
GATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTG
AGAGAAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTTCGCGACTCGTTGTA
CCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCAT
CCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTTGCTAGAGTGCCCAACTGAATG
ATGGCAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCAC
GACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTTGCCCCCGAAGGGGAA
GCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTT
GCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTT
GAGTTTCAACCTTGCGGTCGTA
CTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGC
AGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGG
ACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCCACGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGT
TACAGACCAGAGAGCCGCCTTCGCCAC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGVL2a-55

ACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGC
GATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTG
AGAGAAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTTCGCGACTCGTTGTA
CCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCAT
CCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTTGCTAGAGTGCCCAACTAAATG
ATGGCAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCAC
GACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTTGCCCCCGAAGGGGAA
GCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTT
GCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTT
GAGTTTCAACCTTGCGGTCGTA
CTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGC
AGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTAGCACTCATCGTTTACAGCGTGG
ACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCCACGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGT
TACAGACCAGAGAGCCGCCTTCGCCAC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGTRK4-42

ACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGC
GATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTG
AGAGAAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTTCGCAACTCGTTGTA
CCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCAT
CCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCGCTAGAGTGCCCAACTAAATG
ATGGCAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCAC
GACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTTGTCCCCGAAGGGAAA
GCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTT
GCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTT
GAGTTTCAACCTTGCGGTCGTA
CTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGC
AGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGG
ACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCCACGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGT
TACAGACCAGAGAGCCGCCTTCGCCAC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGTRS10-45

ACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGC
GATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTG
AGAGAAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTTCGCGACTCGTTGACTTC
CCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCAT
CCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTTGCTAGAGTGCCCAACTGAATG
ATGGCAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCAC
GACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTTGCCCCCGAAGGGGAA
GCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTT
GCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTT
GAGTTTCAACCTTGCGGTCGTACTIONCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGC
AGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGG
ACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCCCCACGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGT
TACAGACCAGAAAGCCGCCTTCGCCAC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGBU1-46

ACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGC
GATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAACTG
AGAGAAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTTCGCAACTCGTTGACTTC
CCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCAT
CCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTTGCTAGAGTGCCCAACTGAATG
ATGGCAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCAC
GACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTTGCCCCCGAAGGGGAA
GCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTT
GCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTT
GAGTTTCAACCTTGCGGTCGTACTIONCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGC
AGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGG
ACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCCCCACGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGT
TACAGACCAGAGAGCCGCCCTTCGCCAC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGPT2-84

ACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGC
GATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTG
AGAGAAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTTCGCGACTCGTTGACTTC
CCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCAT
CCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTTGCTAGAGTGCCCAACTGAATG
ATGGCAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCAC
GACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTTGCCCCCGAAGGGGAA
GCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTT
GCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTT
GAGTTTCAACCTTGCGGTCGTACTIONCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGC
AGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGG
ACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCCCCACGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGT
TACAGACCAGAAAACCGCCGTCGCCAC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGAL3-19

ACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGC
GATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGTAGGGGAGTTGCAGCCTACAATCCGAAGCTG
AGAGAAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTTCGCGACTCGTTGTACTTC
CCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCAT
CCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTTGCTAGAGTGCCCAACTGAATG
ATGGCAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCAC
GACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTTGCCCCCGAAGGGGAA
GCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTT
GCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTT
GAGTTTCAACCTTGCGGTCGTACTIONCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGC
AGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTAGCACTCATCGTTTACAGCGTGG
ACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCCACGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGT
TACAGACCAGAAAACCGCCCTCGCCAC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGZLM1-5

ACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGC
GATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGGGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAAGCTG
AGAGAAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTTCGCAACTCGTTGTACTTC
CCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCAT
CCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTTGCTAGAGTGCCCAACTGAATG
ATGGCAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCAC
GACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTTGCCCCCGAAGGGGAA
GCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTT
GCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTT
GAGTTTCAACCTTGCGGTCGTACTIONCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTATCTGC
AGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTAGCACTCATCGTTTACAGCGTGG
ACTACCACGGGATCTAATCCTGTTTGTCTCCCCACGCTTCTAGCCTCAGCGTCAGT
TACAAACCAGAGAACCGCCTTCGTCAC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGTRK4-35

ACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGC
GATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGTAGGGAGTTGCAGCCTACAATCCGAAGCTGA
GAGAAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTTCGCAACTCGTTGTACTTCC
CATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATC
CCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCGCTAGAGTGCCCAACTAAATGA
TGGCAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACG
ACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTTGTCCCCGAAGGGAAAG
CTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTG
CTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTG
AGTTTCAACCTTGCGGTCGTACTIONCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCA
GCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGG
CTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCCACGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGT
ACAGACCAGAGAGCCGCCTTCGCCAC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGTRK10-29

ACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGC
 GATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTG
 AGAGAAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTTCGCGACTCGTTGACTTC
 CCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCAT
 CCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTTGCTAGAGTGCCCAACTGAATG
 ATGGCAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCAC
 GACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTTGCCCCCGAAGGGGAA
 GCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTT
 GCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTT
 GAGTTTCAACCTTGCGGTCGTACTIONCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGC
 AGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGG
 ACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCACGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGT
 TACAGACCAGAGAGCCGCCTTCGCCAC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGTRS1-10

ACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGC
 GATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTG
 AGAGAAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTTCGCGACTCGTTGACTTC
 CCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCAT
 CCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTTGCTAGAGTGCCCAACTGAATG
 ATGGCAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCAC
 GACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTTGCCCCCGAAGGGGAA
 GCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTT
 GCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTT
 GAGTTTCAACCTTGCGGTCGTACTIONCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGC
 AGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGG
 ACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCACGCTTTCGACCTCAGCGTCAGTTA
 CAGACCAGAGAGCCCCCTCGCCAC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGTRS1-20

ACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGC
 GATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTG
 AGAGAAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTTCGCGACTCGTTGACTTC
 CCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCAT
 CCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTTGCTAGAGTGCCCAACTGAATG
 ATGGCAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCAC
 GACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTTGCCCCCGAAGGGGAA
 GCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTT
 GCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTT
 GAGTTTCAACCTTGCGGTCGTACTIONCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGC
 AGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGG
 ACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCACGCTTTCGACCTCAGCGTCAGTTA
 CAGACCAGAGAGCCCCCTCGCCAC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGG06-32

ACCGTATAACAATCGAAACCGCAGGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTC
GCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
AGGCTACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGA
CACGGCCCAAACCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGA
AAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACT
CTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCT
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG
CAAGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTC
TGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTT
GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT
ATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGG
CTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA
ACGATGAGTGCTAAGTGTGGGAGGGTTTTCCGCC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGG01-11

ACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGC
GATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTG
AGAGAAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTTCGCGACTCGTGTACTTCC
CATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATC
CCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTTGCTAGAGTGCCCAACTGAATGA
TGGCAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACG
ACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTTGCCCCCGAAGGGGAAG
CTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTG
CTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTG
AGTTTCAACCTTGCGGTTCGTAATCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCA
GCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGA
CTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCCACGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTT
ACAGACCAGAGAGCCGCCTTCGCCAC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGG02-47

ACGGGCGGTGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGC
GATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTG
AGAGAAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTTCGCGACTCGTTGACTTC
CCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCAT
CCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTTGCTAGAGTGCCCAACTGAATGA
TGGCAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACG
ACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTTGCCCCCGAAGGGGAAG
CTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTG
CTTCAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGA
GTTTCAACCTTGCGGTTCGTAATCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAG
CACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGA
ACCAGGGTATCTAATCCTGGTTGCTCCCCACGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTA
CAGACCAGAGAGCCGCCTTCGCCAC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGG05-13

ACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTC
GCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
AGGCTACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGA
CACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGA
AAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACT
CTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCT
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAACGTAGGTG
GCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGT
CTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACT
TGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATA
TATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGG
CTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA
ACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGZLS30-22

ACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCG
CGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCATAGC
CGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTA
CGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAAC
GCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAA
CAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGG
CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATT
TATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCG
GCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAG
AGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGT
GGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGA
GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGT
GTTGGAGGGTTTCCGCC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja ZG2-9

ACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGC
GATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAACCTG
AGAGAAGCTTTAAGAGATTTGCATGACCTCGCGGTCTAGCGACTCGTTGACTTC
CCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCAT
CCCCACCTTCCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCGCTAGAGTGCCCAACTAAATG
ATGGCAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCAC
GACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTTGTCCCCGAAGGGAAA
GCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTT
GCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTT
GAGTTTCAACCTTGCGGTCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTTGCTGC
AGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTATCACTCATCGTTTACGGCGTGGA
CTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCTAGCCTCAGCGTCAGTT
ACAGACCAGAGAGCCGCCTTCGCCAC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja ZG2-13

ACGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTC
GCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
AGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGA
CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGA
AAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACT
CTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTATCT
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG
CAAGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTC
TGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAGACT
TGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGACATGCGTATATA
TATGTAGGAGCACCAGTGGGGGAAAGCGGGGTCTCTGGTCTGTGTGTGTCGCTCC
ACGCTCTTAAGCGCGGGGAGCATTAAATAGAAGAGATAGACAGCCTGCTCCACCC
CGTGGGACTACGAATGTTTACTGATTGTTAGGGGCTCCTCCC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGVL2a-50

ACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGC
GATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTG
AGAGAAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTTCGCGACTCGTTGTACTTC
CCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACCTCAT
CCCCACCTTCCTCGGGTTTGTACCGGCAGTCTTGCTAGAGTGCCCAACTTAATG
ATCCCAACTAAGAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCAG
GACAGGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTTGCCCCGAAGGGGAA
GCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTT
GCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGGTCAATTCCTTT
GAGTTTCAACCTTGCGGTCGTACTCCCCAGGCGGACTTGCTTAATGCGTTAGCTG
CAGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTAGCACTCATCGTTTACCCCGTTG
ACTACCACCTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCCACGCTTTCGAGCCTGAGTGTCAGT
TACAGACCAGAGAGCCGCCTTCGCCAC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGTRK1-35

ACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGC
GATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTG
AGAGAAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTTCGCAACTCGTTGTACTTC
CCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCAT
CCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCGCTAGAGTGCCCAACTAAATG
ATGGCAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCAC
GACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTTGTCCCCGAAGGGAAA
GCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTT
GCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTT
GAGTTTCAACCTTGCGGTCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGC
AGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGG
ACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCCACGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGT
TACAGACCAGAGAGCCGCCTTCGCCAC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGPT5-1P

ACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACGCGGGCGTGCTGATCCGCG
ATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTATCCGAACTGAGAG
AAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTTCGCAACTCGTTGTACTTCCCATT
GTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCAC
CTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTTGCTAGAGTGCCCAACTGAATGATGGCA
ACTACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGA
GCTGACGACCCATGCACCACCTGTCACTTTGCCCCCGAAGGGGAAGCTCTATCTC
TAGAGTGGCAAAGAGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTA
CCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTG
CGGTCGTA TCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTGAAGGGC
GGAAACCCTCCAACACTTAGCACTCATCGTTACGGCGTGACTACCAGGGTATCT
AATCCTGTTTGTCTCCCCACGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAG
CCGCCTTCGCCAC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGG05-35

ACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTC
GCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
AGGCTACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGA
CACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGA
AAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAA
CTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCT
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG
CAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTC
TGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCAATTGGAAACTGGGAGACTT
GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT
ATGGAGGAACACCAGTGCCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTA
ACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTG
GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA
ACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGG07-19

ACCGTATAACAATCAAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTC
GCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
AGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGA
CACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGA
AAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAA
CTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCT
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG
CAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTC
TGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCAATTGGAAACTGGGAGACTT
GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT
ATGGAGGAACACCAGTGCCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTA
ACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTG
GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA
ACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGG01-48

ACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTC
GCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGTGAGGTAACGGCTCACCAA
GGCTACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGAC
ACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAA
AGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTC
TGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTA
ACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGC
AAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCT
GATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTG
AGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATA
TGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGC
TCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
CGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGG01-44

ACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTC
GCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
AGGCTACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGA
CACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGA
AAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCT
CTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCT
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG
CAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTC
TGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTT
GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT
ATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGG
CTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
ACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGG06-15

ACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTC
GCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
AGGCTACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGA
CACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGA
AAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCT
CTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCT
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG
CAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTC
TGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTT
GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT
ATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGG
CTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
ACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGG011-38

ACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTC
GCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
AGGCTACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGA
CACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGA
AAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAAC
CTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCT
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG
CAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTC
TGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTT
GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT
ATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGG
CTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA
ACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGG011-41

ACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTC
GCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
AGGCTACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGA
CACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGA
AAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAAC
CTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCT
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG
CAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTC
TGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTT
GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT
ATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGG
CTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA
ACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGG02-48

ACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTC
GCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
AGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGA
CACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGA
AAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAAC
CTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCT
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG
CAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTC
TGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTT
GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT
ATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGG
CTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA
ACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGG01-43

ACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTC
GCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
AGGCTACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGA
CACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGA
AAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAAC
CTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCT
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG
CAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTC
TGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTT
GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT
ATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGG
CTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA
ACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGVL2a-54

ACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTC
GCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
AGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGA
CACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGA
AAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAAC
CTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCT
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG
CAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTC
TGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTT
GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT
ATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGG
CTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA
ACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGPT3-30

ACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTC
GCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
AGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGA
CACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGA
AAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAAC
CTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCT
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG
CAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTC
TGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTT
GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT
ATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGG
CTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA
ACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGPAS1-2

ACCGTATAACAATCAAACCCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTC
GCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
AGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGA
CACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGA
AAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAAC
CTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCT
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG
CAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTC
TGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTT
GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT
ATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGG
CTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA
ACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGPAS1-48

ACCGTATAACAATCAAACCCGCAGGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTC
GCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
AGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGA
CACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGA
AAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAAC
CTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCT
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG
CAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTC
TGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTT
GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT
ATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGG
CTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA
ACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGBU1-40

ACCGTATGACAATCGGAACCCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGGGCGGTCCGGTGTG
TCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAA
GGCGACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGAC
ACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAA
AGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAAC
TGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTA
ACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGC
AAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCT
GATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTG
AGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAATGCGTAGATTATGG
AGGAACCCAGTGGCGAAGCGGCTCTCTGGTCTGTACTGACGCTGAGGCTCGAAG
CGTGGGGAGCAAACAGGATAGATACCCTGGTAGTACGCCGTAACGATGAGTGCT
AGTGTGGAGGGTTCCGCC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja ZG1-18

ACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTC
GCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
AGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGA
CACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGA
AAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAAC
CTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCT
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG
CAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTC
TGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTT
GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT
ATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGG
CTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA
ACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja ZG2-8

ACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTC
GCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
AGGCTACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGA
CACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGA
AAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAAC
CTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCT
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG
CAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTC
TGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTT
GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT
ATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGG
CTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA
ACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja ZG2-1

ACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTC
TATGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
AGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGA
CACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGA
AAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAAC
CTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCT
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG
CAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTC
TGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTT
GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT
ATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGG
CTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA
ACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGAL3-13

ACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTC
GCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
AGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGA
CACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGA
AAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAAC
CTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCT
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG
CAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTC
TGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTT
GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT
ATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACGTGACGCTGAGG
CTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA
ACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGAL3-23

ACCGTATAACAATCAAACCGCAGGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTC
GCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
AGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGA
CACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGA
AAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAAC
CTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCT
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG
CAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTC
TGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTT
GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT
ATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACGTGACGCTGAGG
CTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA
ACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGZLS30-21

ACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTC
GCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
AGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGA
CACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGA
AAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAAC
CTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCT
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG
CAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTC
TGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTT
GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT
ATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACGTGACGCTGAGG
CTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA
ACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGZLS45-13

ACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTC
GCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
AGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGA
CACGGCCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGA
AAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAAC
CTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACGTAACGTCCTGACGGTATCT
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG
CAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTC
TGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTT
GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT
ATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACGACGCTGAGG
CTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA
ACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGTRS1-29

ACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTC
GCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
AGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGA
CACGGCCCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGA
AAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAAC
CTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCT
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG
CAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTC
TGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTT
GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT
ATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACGACGCTGAGG
CTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA
ACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGTRS1-49

ACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTC
GCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
AGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGA
CACGGCCCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGA
AAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAAC
CTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCT
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG
CAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTC
TGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTT
GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT
ATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACGACGCTGAGG
CTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA
ACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGTRM1-42

ACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCG
CGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGC
CGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTA
CGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAAC
GCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAA
CAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGG
CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATT
TATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCG
GCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAG
AGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGT
GGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGA
GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGT
GTTGGAGGGTTTCCGCC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGTRS7-67

ACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTC
GCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
AGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGA
CACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGA
AAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCT
CTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCT
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG
CAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTC
TGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTT
GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT
ATGGAGGAACACCAGTGCCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGG
CTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA
ACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGTRM7-33

ACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTC
GCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
AGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGA
CACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGA
AAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCT
CTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCT
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG
CAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTC
TGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTT
GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT
ATGGAGGAACACCAGTGCCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGG
CTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA
ACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGTRM7-39

ACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTC
GCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
AGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGA
CACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGA
AAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAAC
CTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCT
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG
CAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTC
TGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTT
GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT
ATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACGTGACGCTGAGG
CTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA
ACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGTRM7-47

ACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTC
GCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
AGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGA
CACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGA
AAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAAC
CTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCT
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG
CAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTC
TGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTT
GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT
ATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACGTGACGCTGAGG
CTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA
ACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGTRM10-21

ACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTC
GCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
AGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGA
CACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGA
AAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAAC
CTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTATCT
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG
CAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTC
TGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTT
GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT
ATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACGTGACGCTGAGG
CTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA
ACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGTRM1-52

ACCGTATAACAATCGAAACCGCAGGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTC
GCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
AGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGA
CACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGA
AAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAAC
CTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCT
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG
CAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTC
TGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTT
GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT
ATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGG
CTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA
ACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGAL3-16

ACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTC
GCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
AGGCTACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGA
CACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGA
AAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAAC
CTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCT
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG
CAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTC
TGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTT
GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT
ATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGC
TCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAA
CGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja ZG4-19

ACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTC
GCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
AGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGA
CACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGA
AAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAAC
CTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCT
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG
CAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTC
TGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTT
GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT
ATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGC
TCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAA
CGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja ZG2-20

ACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTC
TATGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
AGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGA
CACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGA
AAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAAC
CTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCT
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG
CAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTC
TGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTT
GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT
ATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACGTGACGCTGAGG
CTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA
ACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGTRM7-43

ACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTC
GCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
AGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGA
CACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGA
AAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAAC
CTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCT
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG
CAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTC
TGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTT
GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT
ATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACGTGACGCTGAGG
CTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA
ACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGTRM7-40

ACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTC
GCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
AGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGA
CACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGA
AAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAAC
CTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCT
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG
CAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTC
TGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTT
GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT
ATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACGTGACGCTGAGG
CTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA
ACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGTRS7-54

ACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTC
GCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
AGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGA
CACGGCCCAAACCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGA
AAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAAC
CTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCT
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG
CAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTC
TGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTT
GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT
ATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGG
CTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA
ACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGZLS45-5

ACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTC
GCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
AGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGA
CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGA
AAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAAC
CTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTATCT
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG
CAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTC
TGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTT
GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT
ATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGG
CTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA
ACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCC

Parcijalna nukleotidna sekvenca gena za 16S rRNK soja BGZLS45-20

ACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTC
GCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
AGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGA
CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGA
AAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAAC
CTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTATCT
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG
CAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTC
TGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTT
GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT
ATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGG
CTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA
ACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTG

8.2. Prilog 2

Nukleotidna sekvenca DGGE fragmenta 1

AGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGATACCGTCGAAACGTGAACAGTTACTCTCAC
ACACTTTCTTCTCTAACAACAGGGTTTTACGATCCGAAGACCTTCTTCACCCACGC
GGCGTTGCTCCATCAGGCTTTTCGCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCC
GTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATCAACCTCTCAGTTCG
GCTACGCATCATCGCCTTGGTAAGCCTTTACCCACCAACTAGCTAATGCGCCGC
GGGCCATCCAAAAGCGGTAGCATAGCCACCTTTTACATAGTTACCATGCGGTAA
CTATGGTTATG

Nukleotidna sekvenca DGGE fragmenta 2

GTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGATACCGTCAAGGGATGAACAGTTACTCTCATC
CTTGTCTTCTCTAACAACAGAGTTTTACGATCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCG
GCGTTGCTCGGTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCG
TAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATCACCCCTCCAGTCGG
CTATGCATCGTCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCACCCGCG
GGTCCATCCATCAGCGACACCCGAAAGCGCCTTTCAAATCAAACCATGCGGTTT
CGATTGTTATACGGTATTAGCATCTGTTTCCATCTTGCTGAAAA

Nukleotidna sekvenca DGGE fragmenta 3

CCGTTACGTACGAGATCTTCTAGAAGATATCGTATTACCGCGGCTGCTGGCAGC
TAGTTAGCCGGGGCTTCCTTGTTGAGTACCGTCACTTCCTTCGTCCTCAACAACAG
AGCTTTACAACCCGAAAGCCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTGGGTCAGGCTTT
CGCCCATTGCCCAATATTCCTTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGACCGTTTCT
CAGTTCCAATGTGGCCGATCACCTTCTCAGGTCGGCTACCGATCGTCGCCTTGGT
GGGCCGTTACCTCGCCAACTAGCTAATCGGACGCGAACTCACCCCATACCGGATT
GCTCCTTTGACCCAGGATCATGTGACCTCGTGGTCTTATGCGGTATTAGCACCT
GTTTCCATCTTGCTGAA

Nukleotidna sekvenca DGGE fragmenta 4

AGGTCATCTTCTAGGATGATATCATTACTACCGCGGCTGCTGGCAGGTATTTACC
CGGGTCTTTTTGGTTGATTACCGTCAAATATGGGCCAGTTACTACCTCTATCCTTC
TTCACCAACAACAGAGCTTTACCATCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTG
CTCCATCAGGCTTTTCGCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGA
GTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATG
CATCGTCGCCTTGGTAAGCCGTTACCTTACCAACTAGCTAATGCACCGCGGGTCC
ATCCTTTAGCGACAGCTTACGCCGCCTTTTAAGCAATAGCCATGCAACTATTGTT
GTTATCCGGTATTAGCACCTGTTTCCA

Nukleotidna sekvenca DGGE fragmenta 5

ATCTTCTAGAAGATATCGTATTACCGCGGCTGCTGGCAGGTAGTTAGCCGTGACT
TTCTGGTTGATTACCGTCAAGATAGGGGCCAGTTACTACCTCTATCCTTCTTACCA
ACAACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCCATC
AGGCTTTTCGCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGG

CCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCGTC
GCCTTGGTAAGCCGTTACCTTACCAACTAGCTAATGCACCGCGGGTCCATCCTTT
AGCGACAGCTTACGCCGCCTTTTA

Nukleotidna sekvenca DGGE fragmenta 6

ATCTTCTAGAAGATATCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCT
TTCTGGTTAGATACCGTCAAGGGGTGAACATTCTACTCTCACCCTTGTTCTTCTCT
AACAAACAGAGTTTTACGATCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGT
CAGACTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGG
GCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTATGCATCGT
GGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCACCGCGGGTCCATCCTC
AAGTGACGCAAAGCGCCTTTCAA

Nukleotidna sekvenca DGGE fragmenta 7

ATCTTCTAGAAGATTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTT
TCTGGTTAGATACCGTCAAGGGGTGAACATTCTACTCTCACCCTTGTTCTTCTCTA
ACAACAGAGTTTTACGATCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTTGGTC
AGACTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCCCTACTGCTGCTTCCCGTAGGAGTCTGGG
CCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTATGCATCGTG
GCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCACCGCGGGTCCATCCTCA
AGTGACGCAAAGCGCCTTTCAAATCAAATCATGCGATTCTGATTATTATGCGG
TATTAGCATCTGTTTCCATCTTGCTGAA

Nukleotidna sekvenca DGGE fragmenta 8

AGATCTTCTAGAAGATGGAAACAGATGCTAATACCGGATAACAACACTAGACGC
ATGTCTAGAGTTTGAAAGATGGTTCTGCTATCACTCTTGGATGGACCTGCGGTGC
ATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAATGATGCATAGCCGAGTT
GAGAGACTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTACGGGAG
GCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCG
TGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGGTAGTGAAGAAAGATAG
AGGTAGTAACTGGCCTTTATTTGACGGTAATTACTTAGAAAGTCACGGCTAACTA
CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGA

Nukleotidna sekvenca DGGE fragmenta 9

AGATCTTCTAGAAAGATGGAAACAGGGCTAATACCGGATAACAACACTAGACGC
ATGTCTAGAGTTTGAAAGATGGTTCTGCTATCACTCTTGGATGGACCTGCGGTGC
ATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAATGATGCATAGCCGAGTTT
AGAGACTGATCGGCCACATCGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTACGGGAGG
CAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGT
GAGTGAAGAAGGGTTTCGGCCCGTAAAGCTCTGTTGGTAGTGAAGAAAGATAGA
GGTAGTAACTGGCCTTTATTTGACGGTAATTACTTAGAAAGTCACGGCTAACTAC
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGATATCTTGCTGAA

Nukleotidna sekvenca DGGE fragmenta 10

ATCTTCTAGACGATCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCACCGCAGCATGC

TGATCTGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCGTGCAGCCGAGTTGCAGGCTGCAGT
CCGAAGTGCAGACGCCATTTCTGGGGTTCGCTCCGCCTCACGGCTTCGCCTCCCTC
TGTCTGCGTCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGCCATAAGGGGCATGATGATTT
GACGTCATCCCCGCCTTCCTCCGGGTTGTCCCCGGCAGTCTCCCCAGAGTGCCCG
GCTTTATCCGCTGGCTACTGGGAACAGGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCC
AACATCTCACGACACGAGCTGACGACAAC

Nukleotidna sekvenca DGGE fragmenta 11

AGACGATCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCACCGCGCCGTGGCTGATG
CGCGATTACTAGCGAATCCAGCTTCATGGAGTCGGGTTGCAGACTCCAATCCGAA
CTGAGACAGGTTTTCCGGGTTCCGCGCCCCGTCGCGGGGTGGCTTCCCGCTGTACC
TGCCATTGTAACACGTGTGTGCGCCCCGGACGTAAGGGCCGTGCTGATTTGACGTC
ATCCCCGCCTTCCTCACAGCTTGCGCCGGCAGTCCCAGACAGAGTCCTCAGCTTAA
TCTGTTAGCAACTGTGCGTAGGGGTTGCGCTCGTTATGGCACTTAAGCCGACACC
TCACGGCACGAGCTGACGACAACCATGCAGCACCTCGGAAGCGGTCCCGAAGGA
AAGACTGATTTCTC

Nukleotidna sekvenca DGGE fragmenta 12

ATGGGTGGTAATGCCGGATGTTCCACATGAGCGCATGCGAGTGTGGGAAAGGCT
TTTTGCGGCATGGGATGGGGTTCGCGTCCTATCAGCTTGTGGGTGGGGTAACGGCC
TACCAAGGCGTTGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACATTGGGAC
TGAGATACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATG
GGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGCGGGATGGAGGCCTTCGGGTTGTA
AACCGCTTTTGTTC AAGGGCAAGGCACGGTCTTCGGCCGTGTTGAGTGGATTGTT
CGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCA
AGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGT

Nukleotidna sekvenca DGGE fragmenta 13

TGTGGTAATGCCGGATGTTCCACATGAGCGCATGCGAGTGTGGGGAAGGCTTTTT
GCGGCATGGGATGGGGTTCGCGTCCTATCAGCTTGTGGGTGGGGTAACGGCCTACC
AAGGCGTTGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACATTGGGACTGAG
ATACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCG
CAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGCGGGATGGAGGCCTTCGGGTTGTAAACC
GCTTTTGTTC AAGGGCAAGGCACGGTCTTTGGCCGTGTTGAGTGGATTGTTCGAA
TAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAG

Nukleotidna sekvenca DGGE fragmenta 14

TAGAGGATCCACCGTTACACCGGGAATTCCAGTCTCCCCTACCGCACTCAAGCCC
GCCCGTACCCGGCGCGGATCCACCGTTAAGCGATGGACTTTCACACCGGACGCG
ACGAACCGCCTACGAGCCCTTTACGCCAATAAATCCGGATAACGCTTGCACCCT
ACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGCTTATTCGAACAATCCA
CTCAACACGGCCAAAGACCGTGCCCTTGCCTTGAACAAAAGCGGTTTACAACCC
GAAGGCCACCATCCCGCACGCGGCGTGCCTGCATCAGGCTTGTGCCATTGTGCA
ATATTCCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTATCTCAGTCCCAATGT
GGCCGGTCGCCCTCTCAGGCCGGTACCCGTCAACGCCTTGGTAGGCCGTTACCC
CACCAACAAGCTGATAGGACGCGACCCCAT

Biografija autora

Nikola D. Popović je rođen 26. aprila 1988. godine u Beogradu, Republika Srbija. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu (studijska grupa Molekularna biologija i fiziologija) upisao je 2007. godine, a osnovne akademske studije završio je 2013. godine. Master akademske studije upisao je iste godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu (studijska grupa Molekularna biologija i fiziologija, modul Genetičko inženjerstvo i biotehnologija). Master studije završio je 2014. godine odbranom master rada pod nazivom „Molekularne osnove rezistencije na antibiotike enterokoka izolovanih iz voda sa područja Beograda”, koji je uradio u Laboratoriji za molekularnu mikrobiologiju Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu. Godine 2014. upisao je doktorske studije na Biološkom fakultetu (studijski program Molekularna biologija, modul Molekularna biologija prokariota). Nikola D. Popović je izradu doktorske teze otpočeo u Laboratoriji za molekularnu mikrobiologiju Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu na projektu Osnovnih Istraživanja-Biologija OI 173019 „Izučavanje gena i molekularnih mehanizama u osnovi probiotičke aktivnosti bakterija mlečne kiseline izolovanih sa područja Zapadnog Balkana”. Od 2014. godine bio je angažovan na projektu „Razvoj tehnološkog procesa za produkciju tečne fermentisane probiotičke hrane za svinje korišćenjem prirodnih izolata MKB” (451-03-2802 / 2013-16 / 148). Od 2015. godine do 2016. godine, Nikola D. Popović je bio zaposlen na projektu SERBORDISinn, a 2017. godine je angažovan na projektu „Razvoj inovativnog probiotika na bazi MKB za tretman pasa i mačaka obolelih od dijabetesa” (Inovacioni projekat Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, Srbija 391-00-16/2016-16/19, 2016-2017). Od 2017. godine do 2019. godine bio je zaposlen na projektu „Razvoj tehnološkog procesa za produkciju inovativnog probiotičkog proizvoda za prevenciju i tretman intestinalnih infekcija kod životinja” (Projekat 2616, 2017-2019, Inovacion fond). Od aprila 2019. godine je zaposlen na projektu „Retke bolesti: molekularna patofiziologija, dijagnostički i terapijski modaliteti i socijalni, etički i pravni aspekti”. Odlukom Naučnog veća Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo 2017. godine Nikola D. Popović je izabran u zvanje istraživač pripravnik, a 2018. u zvanje istraživač saradnik. U toku dosadašnjeg naučnog rada Nikola D. Popović je objavio pet (5) radova: tri (3) rada u časopisima M21 kategorije i dva (2) rada u časopisima M22 kategorije. Na domaćim i međunarodnim kongresima ima jedanaest (11) saopštenja

štampanih u izvodu. Dobitnik je FEMS stipendije za mlade naučnike u 2016. godini. Član je Udruženja mikrobiologa Srbije i Srpskog društva za molekularnu biologiju.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Никола Д. Поповић

број индекса M3009/2014

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Испитивање пробиотичких и имуномодулаторних карактеристика природних
изолата ентерокока у моделима *in vitro* и *in vivo*

- 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, 12.04.2019.

Никола Поповић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада


Име и презиме аутора Никола Д. Поповић

Број индекса M3009/2014

Студијски програм Молекуларна биологија

Наслов рада Испитивање пробиотичких и имуномодулаторних карактеристика природних изолата ентерокока у моделим *in vitro* и *in vivo*

Ментор др Катарина Вељовић

Потписани/а 

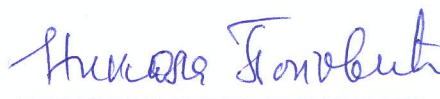
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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.

У Београду, 12.04.2019.

Потпис докторанда



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Испитивање пробиотичких и имуномодулаторних карактеристика природних изолата ентерокока у моделима *in vitro* и *in vivo*

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, 12.04.2019.
Никола Поповић

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. Дозвољава 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. Дозвољава 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. Дозвољава 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.



New Insight into Biofilm Formation Ability, the Presence of Virulence Genes and Probiotic Potential of *Enterococcus* sp. Dairy Isolates

Nikola Popović¹, Miroslav Dinić¹, Maja Tolinački¹, Sanja Mihajlović¹, Amarela Terzić-Vidojević¹, Svetlana Bojić², Jelena Djokić¹, Nataša Golić^{1*} and Katarina Veljović¹

¹ Laboratory for Molecular Microbiology, Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade, Belgrade, Serbia, ² HITTest Doo, Belgrade, Serbia

OPEN ACCESS

Edited by:

David Rodriguez-Lazaro,
University of Burgos, Spain

Reviewed by:

Robin Anderson,
Agricultural Research Service (USDA),
United States
Atte Von Wright,
University of Eastern Finland, Finland

*Correspondence:

Nataša Golić
natasag@imgge.bg.ac.rs

Specialty section:

This article was submitted to
Food Microbiology,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 11 August 2017

Accepted: 12 January 2018

Published: 30 January 2018

Citation:

Popović N, Dinić M, Tolinački M, Mihajlović S, Terzić-Vidojević A, Bojić S, Djokić J, Golić N and Veljović K (2018) New Insight into Biofilm Formation Ability, the Presence of Virulence Genes and Probiotic Potential of *Enterococcus* sp. Dairy Isolates. *Front. Microbiol.* 9:78. doi: 10.3389/fmicb.2018.00078

Enterococci have controversial status due to their emerging role in nosocomial infections and transmission of antibiotic resistance genes, while some enterococci strains are used as probiotics for humans and animals and starter cultures in dairy industry. In order to improve our understanding of factors involved in the safe use of enterococci as potential probiotics, the antibiotic susceptibility, virulence and probiotic traits of 75 dairy enterococci isolates belonging to *Enterococcus durans* (50), *En. faecium* (15), *En. faecalis* (6), *En. italicus* (3), and *En. hirae* (1) were evaluated. The results revealed that ciprofloxacin resistance and biofilm formation are correlated with isolates originated from Golija mountain (Serbia), while gelatinase activity was more common in isolates from Prigorje region (Croatia), pointing to uncontrolled use of antibiotics and anthropogenic impact on dairy products' microbiota in these regions. The virulence genes were sporadically present in 13 selected dairy enterococci isolates. Interestingly, biofilm formation was correlated with higher ability of strains to reduce the adhesion of *E. coli* and *Salmonella* Enteritidis to HT29-MTX cells. To our knowledge this is the first study reporting the presence of the *esp* gene (previously correlated with pathogenesis) in dairy enterococci isolates, mostly associated with the genes involved in adhesion property. Hence, the results of this study revealed that the virulence genes are sporadically present in dairy isolates and more correlated to adhesion properties and biofilm formation, implicating their role in gut colonization rather than to the virulence traits.

Keywords: *Enterococcus* sp., dairy isolates, virulence, biofilm formation, antibiotic resistance, adhesion, pathogen exclusion

INTRODUCTION

Enterococci are the most controversial group of lactic acid bacteria (LAB). *Enterococcus faecalis* and *En. faecium* are found to be the most frequent enterococci species in human infections and represent the third most frequently isolated multidrug resistant nosocomial pathogens from bacteraemia (Soares et al., 2014; Van Tyne and Gilmore, 2017). The virulence factors found in enterococci include gelatinase (GelE) activity, the presence of enterococcal surface protein (Esp), aggregation factor (Agg), hyaluronidase (Hyl), and cytolysin (Cyl, β -hemolysin) (Anderson et al., 2015).

The virulence factors contribute to fitness and persistence of enterococci in nosocomial infections. Enterococci have an extraordinary potential to form biofilm highly resistant to antibiotics, especially in specific environmental conditions, such as urinary tract and oral cavity (Soares et al., 2014). However, the biofilm formation was shown to be more related to the adhesion properties, a desirable probiotic characteristic, than to the virulence genes (Pieniz et al., 2015).

On the other hand, enterococci are commensals in gastrointestinal tract (GIT) as well as important constituents of traditional Mediterranean food of animal origin and contribute to their characteristic taste and flavor (Banwo et al., 2013). Despite of the controversial status, recently the probiotic potential of enterococci has been acknowledged (Franz et al., 2011; Kreuzer et al., 2012; Banwo et al., 2013; Pieniz et al., 2015). Interest in the health-promoting potential of enterococci has significantly increased due to their robustness and ability to survive harsh conditions such as present in the GIT (FAO-WHO, 2016). Other important criteria for probiotics are adhesion to intestinal epithelial cells (IEC) important for colonization of intestinal mucosa, persistence in the intestine and the competitive exclusion of pathogens (FAO-WHO, 2016; Živković et al., 2016).

Our previous results based on analysis of 50 antibiotic resistant enterococci in environmental waters of Belgrade (Serbia) suggested the anthropogenic impact on the spread of antibiotic resistance genes among enterococci in urban surface waters that is most likely attributed to the uncontrolled use of antibiotics (Veljović et al., 2015). However, our work related to dairy enterococci isolates revealed that autochthonous dairy products from the Western Balkan Countries (WBC) region are a rich source of novel enterococci strains with substantial genetic, metabolic and technological potential, although the presence of antibiotic resistance and virulence genes were revealed, pointing out that the determination of the safety status of each potential probiotic enterococci strain is mandatory in order to prevent the potential risks of their administration to humans and animals (Terzić-Vidojević et al., 2015).

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Strains, Media, and Growth Conditions

The 75 previously isolated enterococci dairy isolates belonging to five distinct species were used (Table S1; Terzić-Vidojević et al., 2015). Enterococci were grown in M17 broth (Merck, GmbH, Darmstadt, Germany) supplemented with glucose (0.5% w/v) (GM17) at 37°C. *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* Enteritidis 654/7E and other indicator strains (Table S2) were cultivated in Luria-Bertani broth (LB), containing 0.5% NaCl, 0.5% yeast extract (Torlak, Belgrade, Serbia), and 1% tryptone (Torlak) at 37°C. Corresponding agar plates were prepared by adding agar (1.7% w/v, Torlak) into each broth.

Haemolytic and Gelatinase Activity Assays

Haemolytic activity was determined on Columbia Blood Agar (Oxoid Limited, Hampshire, UK) containing 5% (v/v)

defibrinated horse blood after 48 h of incubation at 37°C (Valenzuela et al., 2009). The phenotypic assay of gelatinase activity was determined on plates agar containing 3% (w/v) gelatin (Difco, Becton Dickinson, New Jersey, United States) (Lopes et al., 2006).

Biofilm Formation

Biofilm formation assay was performed as described previously (Macovei et al., 2009) with minor modifications. Biofilm production was quantified using 0.1% crystal violet (Himedia, Mumbai, India) and measuring absorbance at 595 nm using Plate Reader Infinite 200 pro (MTX Lab Systems, Vienna, Austria).

Susceptibility Testing

Minimal inhibitory concentrations (MICs) were determined by microdilution testing following (CLSI, 2015) criteria. Susceptibility was tested against: ampicillin (8–16 µg/ml), vancomycin (4–32 µg/ml), erythromycin (0.5–8 µg/ml), tetracycline (4–16 µg/ml), ciprofloxacin (1–4 µg/ml), nitrofurantoin (32–128 µg/ml), chloramphenicol (8–32 µg/ml), linezolid (2–8 µg/ml), and gentamicin (>500 µg/ml). Additionally, according to European Food Safety Authority (EFSA, Panel, 2012) guidance for *Enterococcus faecium*, susceptibility of *En. faecium* strains was tested against: ampicillin (1–2 µg/ml), gentamicin (16–32 µg/ml), kanamycin (512–1024 µg/ml), streptomycin (64–128 µg/ml), clindamycin (2–4 µg/ml) and tylosine (2–4 µg/ml). Microdilution tests were performed in GM17 (Merck, GmbH). Cell density was monitored after 24 h incubation at 37°C at 595 nm using Plate Reader Infinite 200 pro (MTX Lab Systems).

PCR Detection of Virulence Determinants

The total DNA of 13 antibiotic-susceptible and without haemolytic and gelatinase activity enterococci strains was used in PCR reactions to detect the presence or absence of genes for virulence determinants. The primer sequences of the target genes, the expected amplicon sizes and annealing temperatures are given in Table S3.

Antimicrobial Activity Assay

Production of antimicrobial compounds produced by enterococci was tested by the deferred antagonism method using various indicator strains (Lozo et al., 2004). Indicator strains used in this assay are listed in Table S2. The presence of bacteriocin-encoding genes was studied by PCR amplification, with primers for well-known enterococcal bacteriocins using total genomic DNA from strains (Table S3).

MTT Assay

The cytotoxicity of enterococci on HT29-MTX cell line was evaluated through a microculture tetrazolium [MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay (Mosmann, 1983). The colonocyte-like cell line HT29-MTX, used in MTT assay, was kindly supplied by Dr. T. Lesuffleur (INSERM UMR S938, Paris, France; Lesuffleur et al., 1990). After 24 h of post seeding (40–60% confluency), different concentrations (ratio 1:1 and 10:1 bacteria: eukaryotic cell) of the filtered supernatants (using 0.22 µm Nalgene syringe filter units,

Sarstedt, Germany) and UV-irradiated non-viable bacterial cells were added to the eukaryotic cells. All treated cells were then incubated for 24 and 48 h. After the treatment, MTT was added at the final concentration of 0.5 mg/ml. The plates were incubated for 4 h in 5% CO₂ at 37°C in dark conditions. Formazan crystals created in MTT-exposed live cells were dissolved by adding 10% sodium-dodecyl sulfate (SDS) in 0.01% HCl. The wells were then incubated at 37°C overnight. Adsorption of the dissolved formazan crystals was measured using Plate Reader Infinite 200 pro at 570 nm. The results were expressed as the percentage of optical density (metabolic activity) compared to the control (cultures of non-treated cells), used as 100% as follows:

Metabolic activity (%) = (O.D. of treated cells / (O.D. of non-treated cells)) × 100.

Survival in Simulated Gastrointestinal Tract

Survival in chemically simulated gastrointestinal tract was performed using an *in vitro* test as described previously (Sánchez et al., 2010). The percentage of survival was calculated from the viable counts recovered after each chemically simulated GIT step with respect to the initial counts (%) = (CFU/mL recovered bacteria / CFU/mL initial bacteria) × 100.

Mucin Adhesion Assay

Mucin adhesion assays were performed in 96-well polystyrene microtitre plates (Tissue Culture Plate, Sarsted, Newton, USA) according to the method of (Valeriano et al., 2014) with minor modifications: The wells of microtitre plates were coated at 4°C for 24 h with 200 μl of porcine stomach mucin type II (Sigma, Germany). Mucin was resuspended (1 mg/ml) in phosphate-buffered saline (PBS) buffer (pH 7.0) and the same volume of PBS was added to control wells. Wells were washed twice with 200 μl PBS and incubated with 100 μl (20 mg/ml) bovine serum albumin (BSA) (Sigma) for 2 h at 4°C. Wells were again washed twice with 200 μl of PBS to remove unbound BSA. Approximately 100 μl of bacterial suspension (10⁸ CFU/ml) was washed and suspended in PBS (pH 7.0) and added to the wells. Plates were incubated at 37°C for 2 h. After incubation, wells were washed three times with 200 μl PBS to remove unbound bacteria. Another 200 μl of 0.5% (v/v) Triton X-100 (Sigma) was then added to isolate attached bacteria. The viable cell count expressed as CFU/ml was determined in all cases by plating on GM17. Percentage adhesion was calculated from the viable counts adherent to the mucin with respect to the initial counts (%) = (CFU/mL recovered bacteria / CFU/mL initial bacteria) × 100.

Adhesion to HT29-MTX Cell Line

For adhesion experiments, 13 ± 1 day-old cellular monolayers of HT29-MTX were used according to Živković et al. (2016). Cellular monolayers were also carefully washed and bacterial suspensions were added at a ratio of about 10:1 (bacteria: eukaryotic cell). Adhesion experiments were carried out for 1 h at 37°C, 5% CO₂. The adhesion was calculated as (%) = (CFU/mL adhered bacteria / CFU/mL added bacteria) × 100.

Pathogen Exclusion Assay

The capability of reference strains *E. coli* ATCC25922 and *Salmonella* Enteritidis 654/7E to adhere to the intestinal epithelium in the presence and absence of enterococci was tested according to Živković et al. (2016). The bacterial suspensions containing *E. coli* or a combination of *E. coli* and enterococci (ratio 1:1) and *Salmonella* Enteritidis or a combination of *Salmonella* Enteritidis and enterococci (ratio 1:1) were independently added to the HT29-MTX monolayers at a ratio of 10:1, (bacteria: eukaryotic cell) and incubated at 37°C, with 5% CO₂ for 1 h. The percentage of adhesion was calculated as follows: 100 × CFU/mL bacteria adhered to HT29-MTX monolayers / total CFU/mL bacteria added (adjusted for dilution). Numbers of bacteria were determined via viable cell count expressed as CFU/ml determined by plating on GM17. To determine the capability of the enterococci to inhibit the adhesion of *E. coli* and *Salmonella* Enteritidis to HT29-MTX monolayers, data were referred to that obtained with the *E. coli* and *Salmonella* Enteritidis alone (i.e., 100% adhesion).

Statistical Analysis

All experiments were designed based on a completely random design and statistical differences in multiple groups were determined by one-way ANOVA followed by multiple mean comparisons Duncan's test. A $p \leq 0.05$ was here considered statistically significant. Data were presented as the mean ± standard deviation of three independent replicates. Rules of association between geographic origin of strains and different phenotypic characteristics were mined as described in Hahsler et al. (2005), using R package "arules." Statistical significance of individual associations were evaluated through "HyperConfidence" measure, and corrected for multiple comparisons according to Benjamini-Hochberg method. DNA 16S sequences of 75 selected strains were aligned with Clustal Omega web tool (McWilliam et al., 2013), pairwise Kimura's 2-parameters distance were calculated as implemented in the R package "ape" (Paradis et al., 2004), and clustered using method "complete linkage." Hierarchical clustering of bacterial phenotypes was based on Jaccard distance, same agglomeration method, and the similarity of two trees was evaluated through Baker's gamma index, using R package "dendextend" (Galili, 2015).

RESULTS AND DISCUSSION

Due to the controversial status of enterococci, the focus of this study was the evaluation of presence of antibiotic resistance, virulence genes, and biofilm formation in 75 previously isolated dairy enterococci from WBC region (Table S1, Figure S1; Terzić-Vidojević et al., 2015) and their correlation with the origin and phylogenetic relatedness. To our knowledge, this is the first study combining data on virulence and probiotic traits in order to improve our understanding of the dairy products as a potential reservoir of virulent strains, as well as the implications for the safety use of dairy enterococci isolates as potential probiotics.

Virulence Traits, Antibiotic Susceptibility and Cytotoxic Effect

The important features of enterococcal virulence are hemolytic and gelatinase activities (Banwo et al., 2013). The results revealed that 14 out of 75 strains (18.7%) exhibit haemolytic activity: 33.3% *En. faecalis* (2 out of 6) and *En. italicus* (1 out of 3), 20% *En. durans* (10 out of 50), and 6.7% *En. faecium* (1 out of 15). *En. hirae* strain did not exhibit haemolytic activity on blood agar plates after 48 h incubation (Table S1). The activity of gelatinase, an extracellular zinc metallo-endopeptidase, able to hydrolyse gelatin, casein and hemoglobin (Koch et al., 2004; Banwo et al., 2013), occurred in 5 out of 50 (10%) *En. durans* isolates (Table S1).

Although all 75 strains were previously determined as antibiotic susceptible, according to the results obtained by disc diffusion method (Terzić-Vidojević et al., 2015), the antibiotic susceptibility to nine of the most clinically relevant antibiotics of 56 enterococci strains without haemolytic and gelatinase activity were additionally tested by microdilution test, according to CLSI. In total, only 23 out of 56 strains were antibiotic susceptible, while 57% were resistant to ciprofloxacin (27 strains) or gentamicin (6 strains). According to EFSA, all previously susceptible *En. faecium* were resistant to low concentration of ampicillin, gentamicin and streptomycin. In general, *Enterococcus* strains were found to be moderately sensitive to streptomycin, gentamicin and ciprofloxacin and are generally regarded as intrinsically resistant to low levels of gentamicin, although a high-level gentamicin resistance was detected in many dairy isolates (Giraffa, 2003; Hummel et al., 2007; Banwo et al., 2013). Hence, the observed high levels of ciprofloxacin and gentamicin resistance among our dairy enterococci isolates are in accordance to literature data and possibly reflect the extensive use of these antibiotics in animal husbandry in WBC region.

The 13 antibiotic susceptible strains were further tested for presence of the virulence genes encoding aggregation factor (*agg*), collagen adhesin (*ace*), cytolyisin (*cylA*), enterococcal surface protein (*esp*), cell wall adhesins (*efaA^{fs}*, and *efaA^{fm}*), gelatinase (*gelE*), hyaluronidase (*hylN*), serine protease (*sprE*), response regulator (*fsrA*), signaling peptide (*fsrB*), and histidine kinase (*fsrC*) (Table 1). Ten strains (76.9%) were positive for the *efaA^{fs}* gene and nine strains (69.2%) were positive for the *agg* gene. Seven strains (53.8%) were positive for the *sprE* gene, while six strains (46.2%) were positive for *esp* and *efaA^{fm}* genes. Three strains (23.1%) were positive for the *fsrA* gene, while two strains (15.4%) were positive for the *gelE* gene. One strain (7.7%) was positive for *fsrC* gene, while *fsrB* gene was not detected.

It is noteworthy that the *cylA* gene encoding CylA serine protease involved in processing and activation of cytolyisin (also called haemolysin), bacterial toxin with β -haemolytic properties in humans, as well as the *hylN* gene, encoding hyaluronidase, degradative enzyme associated with tissue damage (Anderson et al., 2015), were not detected. Interestingly, the gelatinase activity was not detected in any of the strains positive for the presence of the *gelE* gene. The results are in concordance to the literature data suggesting that *gelE* genes could be silent (Franz et al., 2001). The presence of the *gelE* gene was

sporadically correlated with the genes for adhesion properties and serine protease. Both gelatinase and serine protease are involved in enterococcal pathogenesis providing nutrients to the bacteria by degradation of host tissue, but also have the role in biofilm formation (Fisher and Phillips, 2009). The *sprE* gene, encoding serine protease, is located directly downstream and co-transcribed with the *gelE* gene and they are together regulated by quorum-sensing system encoded by the *fsr* (fecal streptococci regulator) locus (Fisher and Phillips, 2009). It was shown previously that virulence genes were more prevalent in clinical than in food isolates (Medeiros et al., 2014). Although, the high percentage of virulence genes in our dairy isolates is in agreement with the results obtained on isolates from raw milk and cheese where high abundances of *asa1*, *gelE*, and *efaA* genes together with high percentage of the strains with haemolytic activity was scored (Moraes et al., 2012).

The intestinal epithelium is delicately responsive to modulations by commensal and pathogenic bacteria and is dependent on the integrity of intestinal epithelial barrier (Howarth and Wang, 2013). In order to determine the possible cytotoxic effects, the HT29-MTX cells were exposed to the supernatants of overnight bacterial cultures (soluble bacterial products), as well as UV-irradiated non-viable bacterial cells (surface bacterial cell molecules) of 13 selected isolates. The results of MTT test showed that none of the tested bacteria, their soluble products and surface molecules significantly affect metabolic activity of HT29-MTX cells in applied conditions. The obtained results suggested that none of the tested dairy isolates exhibit cytotoxic effect on intestinal epithelial barrier indicating possible safe status of the strains (Figure S2).

The Gut Colonization, Adhesion Properties and Biofilm Formation

The gut colonization is the first step in interaction of indigenous bacterial strain with the host. However, in order to be effective in the gut environment the strains should be resistant to conditions present in GIT (Nishiyama et al., 2016). The ability of the 13 antibiotic susceptible strains without haemolytic and gelatinase activity to survive in simulated GIT conditions was tested (Figure S3). Particularly, most of the strains survived well under simulated gastric conditions (94.4–99.8%; Δ log CFU/ml from 0.02 to 0.52) indicating the resistance of the isolates to acidic conditions. The survival rate was either maintained or slightly decreased after the prolonged exposure times to lower bile concentrations (0.3%) (86.1–98.3%; Δ log from -0.02 to 1.03) and pancreatic enzymes (82.7–93.8%; Δ log from -0.51 to 0.89). In general, the mean survival ability of the strains to simulated GIT conditions was observed to be quite high comparable to the previously tested *Lactococcus* sp. and *Lactobacillus* sp. dairy isolates from Western Balkan region (Uroic et al., 2014) pointing to the fact that enterococci species belong to the commensal bacteria in the gut being their regular habitat.

Although adhesion properties of pathogenic bacteria are more intensively studied, various cell-surface proteins in probiotic lactic acid bacteria (LAB) and bifidobacteria are shown to have adhesion properties and they have been associated with probiotic

TABLE 1 | Presence of the virulence genes, genes for biofilm formation and bacteriocin production.

Species/Strain	Adhesins				Biofilm formation				Bacteriocins			
	<i>agg</i>	<i>esp</i>	<i>efaA^{fs}</i>	<i>efaA^{fm}</i>	<i>fsrA</i>	<i>fsrB</i>	<i>fsrC</i>	<i>gelE</i>	<i>spreE</i>	<i>entA</i>	<i>ent1071</i>	<i>bac31</i>
<i>En. durans</i> BGGO8-25			■	■							■	■
<i>En. durans</i> BGGO8-26			■	■							■	■
<i>En. durans</i> BGGO8-30	■	■	■	■					■			
<i>En. durans</i> BGGO9-30			■	■				■	■	■	■	
<i>En. durans</i> BGRE2-40	■		■	■								■
<i>En. hirae</i> BGRE2-48	■		■	■	■							
<i>En. durans</i> BGVL2a-53		■	■	■					■	■		
<i>En. durans</i> BGVL2a-55	■	■	■	■					■	■		
<i>En. italicus</i> BGTRK4-42	■		■	■				■	■	■		
<i>En. durans</i> BGTRS10-45	■	■	■	■			■					
<i>En. durans</i> BGBU1-46	■	■	■	■								
<i>En. durans</i> BGPT2-84	■		■	■					■	■		
<i>En. durans</i> BGAL3-19	■		■	■								

The shaded areas reflect the presence of the respective genes.

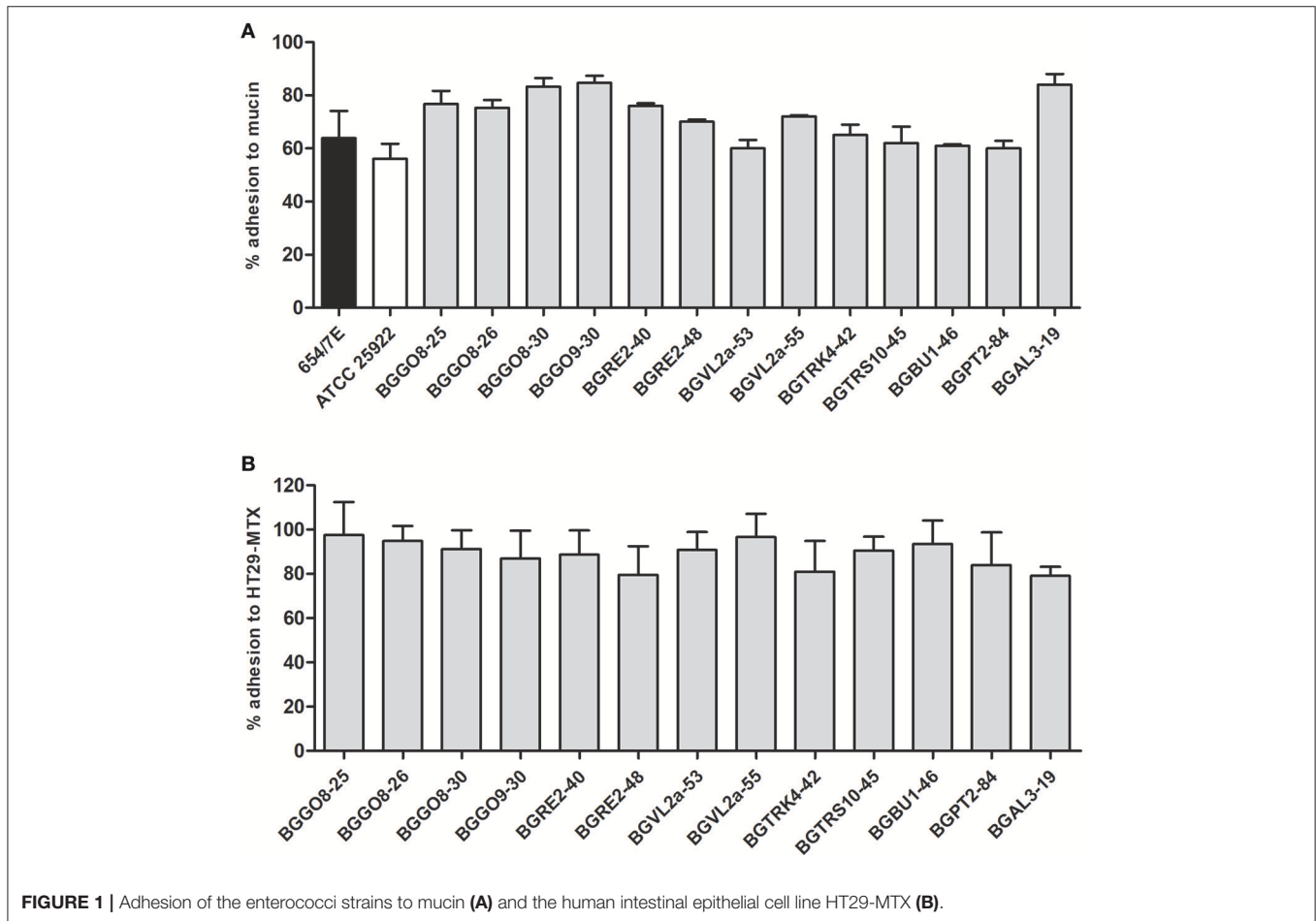
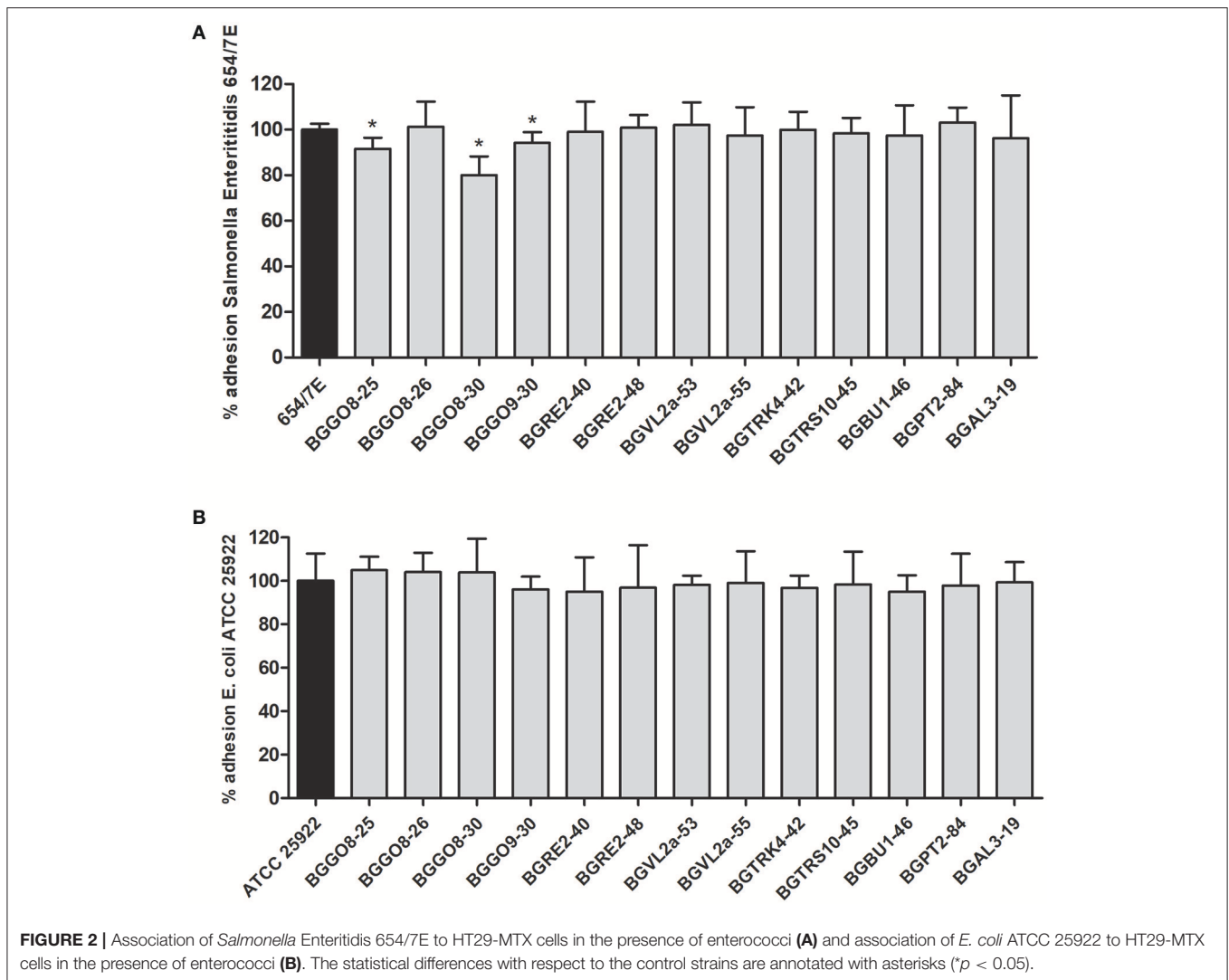


FIGURE 1 | Adhesion of the enterococci strains to mucin (A) and the human intestinal epithelial cell line HT29-MTX (B).

activity (Nishiyama et al., 2016). Interestingly, data related to adhesion of enterococci are mostly based on clinical strains and related to virulence determinants (Elhadidy and Zahran, 2014).

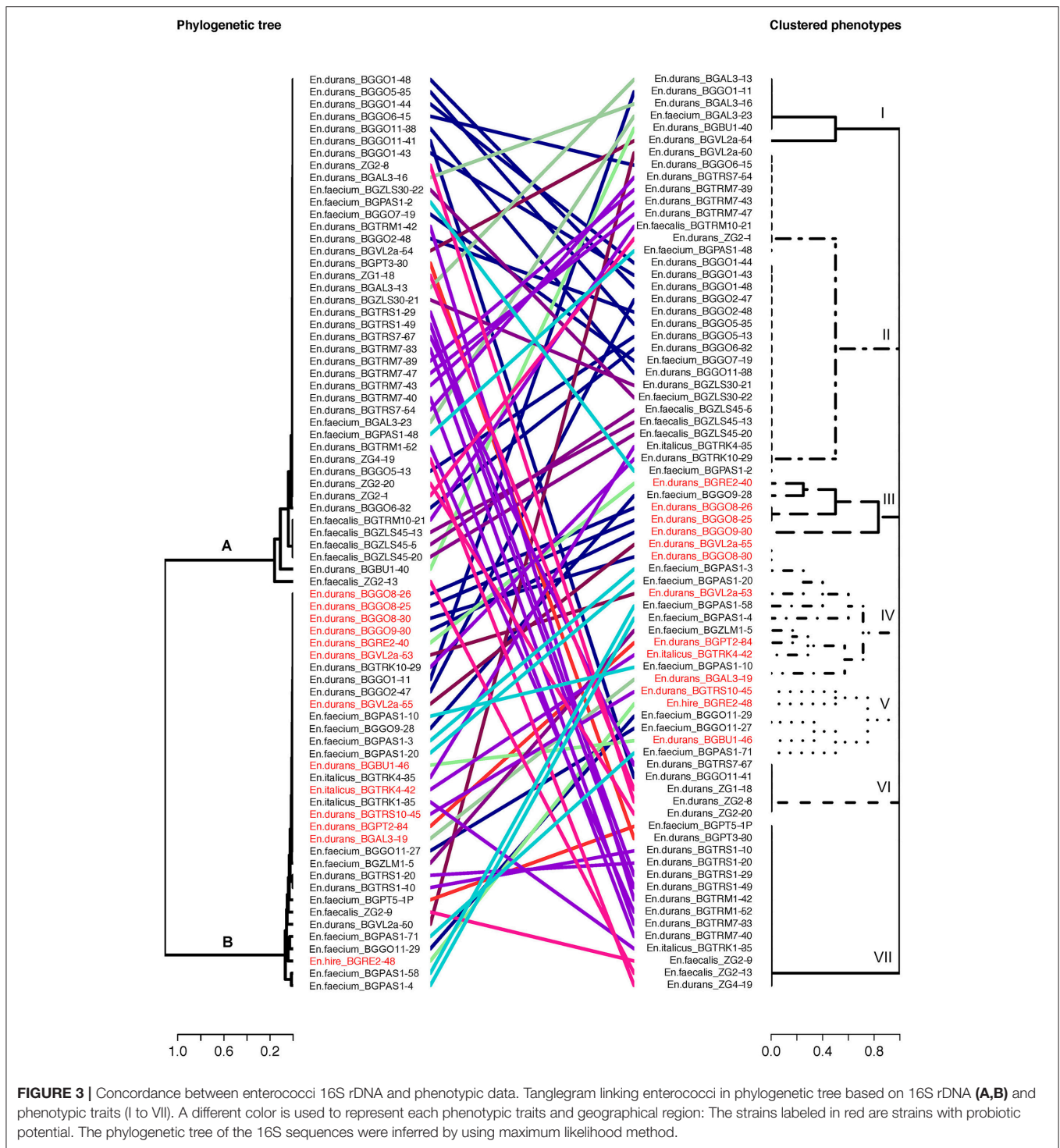
Our results revealed the high ability of 13 enterococci dairy isolates to bind to mucin (with the average value of 71.88% ± 1.61) and to HT29-MTX epithelial cells (average values of



the adhesion to HT29-MTX $88.79\% \pm 2.32$) (Figures 1A,B). Differences in the adhesion were observed among strains. In addition, all 13 isolates exhibit higher relative adhesion to mucin (from 60.6 to 84%) in comparison to *E. coli* ATCC 25922 (56.1%) and *Salmonella* Enteritidis 654/7E (63.9%) (Figure 1A). Interestingly, the majority of tested enterococcal isolates were positive for the *efaA^{fs}* gene (76.9%), the *agg* gene (69.2%), the *esp* gene (46.2%), and the *efaA^{fm}* gene (46.2%), and associated with the adhesion ability. Aggregation substance, encoded by the *agg* gene, is a pheromone-inducible surface glycoprotein involved in bacterial conjugation and facilitating plasmid transfer, as well as adhesion to an array of eukaryotic surfaces (Koch et al., 2004). The *esp* gene encodes extracellular surface protein, a cell-wall-associated protein that promotes adhesion, colonization and evasion of the immune system, and contributes to biofilm formation (Koch et al., 2004). The virulence genes were determined in *En. faecalis* and *En. faecium* strains of food origin, although the *esp* gene was only observed in the isolates from water, vegetables and raw milk (Anderson et al., 2015). There

were no data about the presence of the *esp* gene in isolates of dairy origin (Medeiros et al., 2014). However, in our study the *esp* gene was detected in 6 out of 13 strains (6 *En. durans*). Interestingly, the *esp* gene in these strains was mostly correlated with the *agg*, *efaA^{fs}* and *efaA^{fm}* genes involved in adhesion property of the strains and the *sprE* gene. Moreover, in *En. durans* strains BGPT2-84 and BGAL3-19 the presence of the *esp* gene was correlated with biofilm formation ability. The *ace* gene encoding collagen adhesin was not detected in any of the tested isolates.

Besides, biofilm formation has considerable role in enterococcal infections (Mohamed and Huang, 2007). In this study, 30 out of 75 strains (40%) were able to form biofilm (Table S1). Particularly, the biofilm formation was observed in two out of three *En. italicus* (66.7%), three out of six *En. faecalis* (50%), six out of 15 *En. faecium* (40%), and 19 out of 50 *En. durans* (38%) strains, respectively, while *En. hirae* strain was not able to form biofilm (Table S1). Although some literature data indicated that biofilm formation capacity was higher in clinical and oral isolates than in the food isolates (Anderson



et al., 2015), other authors reported that commensal isolates from human feces exhibit higher biofilm formation ability than endocarditis isolates suggesting that biofilm formation is not exclusively related to the pathogenesis and that it is more associated with adhesion properties, an important feature in gut colonization (Johansson and Rasmussen, 2013; Elhadidy and Zahran, 2014).

Antimicrobial Activity

Finally, the capability to neutralize negative effects of pathogens is one of the crucial beneficial health claims of probiotics. Our results revealed that four *En. durans* strains showed inhibitory effect on *En. faecalis* BG221. No activity was observed against *Salmonella* Enteritidis 654/7E and *E. coli* ATCC 25922. The PCR screening of bacteriocin genes revealed the presence of

three bacteriocin genes *entA*, *ent1071*, and *bac31* in the genomes of studied enterococci strains (Table 1). The results of this study are in agreement with our previous results indicating that natural dairy enterococci isolates from the WBC region are capable of producing bacteriocins (enterocins) with broad spectrum activity (Veljovic et al., 2009; Terzić-Vidojević et al., 2015).

On the other hand, while numerous studies reported the pathogen exclusion by lactobacilli probiotic strains (Živković et al., 2016), the previous results (Rinkinen et al., 2003) indicated that *En. faecium* M74 and *En. faecium* SF273 strains favor the colonization of *Campylobacter jejuni* in dog's intestine, pointing to the additional risk factor for use of enterococci as probiotics. The results obtained in this study revealed that adhesion of *E. coli* ATCC 25922 and *Salmonella* Enteritidis 654/7E to HT29-MTX was reduced in the presence of 10 tested enterococci strains (Figures 2A,B). The lowest adhesion rate (80.1%) of *Salmonella* Enteritidis 654/7E to the HT29-MTX cells was scored in co-incubation with *En. durans* BGG08-30 strain. In addition, BGG09-30 and BGG08-25 slightly reduced the adhesions of *Salmonella* Enteritidis 654/7E to the HT29-MTX cells (94.1 and 91.5%, respectively).

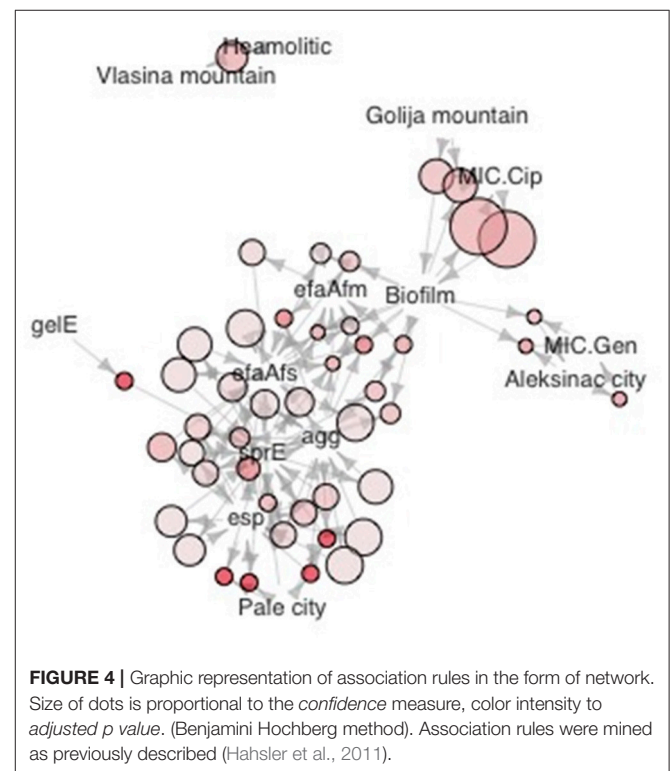
Relationship between Isolates' Origins, Phylogenetic Relatedness and Virulence Traits

Phylogenetic analysis of 16S rDNA sequences separated selected enterococci isolates into two distinct phylogenetic groups A and B generally following the geographic distribution of the isolates (Figure 3). The broad strain diversity correlated with the diverse origin of the isolates probably due to different environmental pressures, similarly to other LAB strains (Giraffa, 2003; Golic et al., 2012). In addition, the strains were clustered based on phenotypic traits using Jaccard dissimilarity measure resulting in seven distinct groups I-VII (Figure 3), comprising the isolates resistant to gentamicin (I), able to form biofilm and resistant to ciprofloxacin (II), the isolates with virulence genes (III, IV, and V), and the isolates with gelatinase (VI) and hemolytic (VII) activity, respectively. The isolates of phylogenetic group A are correlated with four phenotypic groups. Among them, 54.8% isolates are clustered in group II; 21.4% isolates belong to group VII; 11.9% isolates belong to group VI and 11.9% isolates belong to group I. The isolates belonging to phenotypic groups III, IV, and V, clustered on the basis of the presence of virulence genes, are correlated with the phylogenetic group B. Interestingly, majority of the isolates belonging to the phylogenetic group B (23 out of 33 isolates; 69.7%) are denoted as potential probiotic strains (Figure 3, given in red), based on the results of probiotic tests, presented above. The other members of phylogenetic group B belong to groups I (1 out of 33; 3%), II (4 out of 33; 12.1%) and VII (5 out of 33; 15.2%). The majority of isolates from Aleksinac, belongs to group I (75%). Enterococci from dairy products manufactured at Zlatar Mountain are found mainly in group II (83%), while the isolates from dairy products manufactured in Pale are grouped in group IV (62.5%), II (25%), and V (12.5%).

The isolates from Prigorje region belong to groups II (14.3%), VI (43%), and VII (43%). Among all isolates the most persistent phenotypic characteristic is the possibility to produce biofilm with frequency of 0.4. The isolates from Vlasina tend to have more haemolytic properties than it would be expected by pure chance (Figure 4). MIC for gentamicin is associated with dairy products from Aleksinac city, and the same could be said for MIC for ciprofloxacin and Golija Mountain. There is clear co-occurrence of *esp*, *sprE*, *agg*, *efaA^{fs}*, *efaA^{fm}* with biofilm formation, with *esp* and *sprE* notably more present in isolates from Pale city.

The correlation between the two trees (phylogenetic and phenotypic) is statistically significant based on Bakera's gamma correlation coefficient (0.1039904), which suggests that clustering in phenotypic groups is still under strong influence of phylogenetic relatedness. Depending on the method used p values are $p=0.0044$ (bootstrap), $p = 9.4 \times 10^{-8}$ (z-value) and $p < 0.001$ (t-distribution).

In conclusion, to our knowledge, this is the first study combining the data on virulence genes, gelatinase production, haemolytic activity, antibiotic resistance, biofilm production and probiotic features of dairy enterococci isolates, in order to improve our understanding of factors involved in virulence vs. probiotic properties of dairy enterococci. Our results indicate that the virulence genes are sporadically present in tested dairy enterococci isolates and that are not correlated with cytotoxic activity, suggesting that adhesion and biofilm formation are more associated with gut colonization.



AUTHOR CONTRIBUTORS

KV, NG—conception and design of the study; NP—performed the main work; KV, AT-V, and JD—participated in the research—virulence traits, antibiotic susceptibility and cytotoxic effect, antimicrobial activity; KV, JD, and MD—participated in the research—gut colonization, adhesion properties and biofilm formation; SM, MT, SB, and NG—participated in the research—relationship between isolates' origins, phylogenetic relatedness and virulence traits; NG, KV, SM, JD, and MT—analyzed, interpreted and critically revised the data; NP, KV, NG, and SM—prepared the manuscript for submission. All authors finally approved the version to be published.

FUNDING

This work was supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development, Republic of Serbia (Grant number 173019).

REFERENCES

- Anderson, A. C., Jonas, D., Huber, I., Karygianni, L., Wölber, J., Hellwig, E., et al. (2015). *Enterococcus faecalis* from food, clinical specimens, and oral sites: prevalence of virulence factors in association with biofilm formation. *Front. Microbiol.* 6:1534. doi: 10.3389/fmicb.2015.01534
- Banwo, K., Sanni, A., and Tan, H. (2013). Technological properties and probiotic potential of *Enterococcus faecium* strains isolated from cow milk. *J. Appl. Microbiol.* 114, 229–241. doi: 10.1111/jam.12031
- CLSI (2015). *M100-S25 Performance Standards For Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Fifth Informational Supplement*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- du Toit, M., Franz, C. M. A. P., Dicks, L. M. T., and Holzapfel, W. H. (2000). Preliminary characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from pig faeces. *J. Appl. Microbiol.* 88, 482–494. doi: 10.1046/j.1365-2672.2000.00986.x
- Duprè, I., Zanetti, S., Schito, A. M., Fadda, G., and Sechi, L. A. (2003). Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates collected in Sardinia (Italy). *J. Med. Microbiol.* 52, 491–498. doi: 10.1099/jmm.0.05038-0
- Eaton, T. J., and Gasson, M. J. (2001). Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1628–1635. doi: 10.1128/AEM.67.4.1628-1635.2001
- Elhadidy, M., and Zahran, E. (2014). Biofilm mediates *Enterococcus faecalis* adhesion, invasion and survival into bovine mammary epithelial cells. *Lett. Appl. Microbiol.* 58, 248–254. doi: 10.1111/lam.12184
- FAO-WHO (2016). *Probiotics In Food. Health and Nutritional Properties and Guidelines for Evaluation*. Rome: FAO-WHO.
- Fisher, K., and Phillips, C. (2009). The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology* 155, 1749–1757. doi: 10.1099/mic.0.026385-0
- Franz, C. M., Huch, M., Abriouel, H., Holzapfel, W., and Gálvez, A. (2011). Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 151, 125–140. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.014
- Franz, C. M., Muscholl-Silberhorn, A. B., Yousif, N. M., Vancanneyt, M., Swings, J., and Holzapfel, W. H. (2001). Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4385–4389. doi: 10.1128/AEM.67.9.4385-4389.2001

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.00078/full#supplementary-material>

Figure S1 | Localities from where the dairy products samples were collected.

Figure S2 | Metabolic activity of HT29-MTX cells in the presence of *Enterococcus* sp. strains. The values given in the graph representing the mean values of 3 independent experiments \pm standard deviation are expressed in percentages. All experiments were done in triplicates.

Figure S3 | Survival of the *Enterococcus* sp. strains in simulated conditions of the gastrointestinal tract. Overnight—time point at the beginning of the experiment when samples were taken from overnight culture; gastric juice—time point when samples were taken from chemically simulated gastric juice; bile salt juice - time point when samples were taken from chemically simulated bile salt juice; intestinum juice—the time point when samples were taken from chemically simulated intestinal juice. Values represent the means of three experiments.

Table S1 | The list of strains used in this study (origin, haemolytic and gelatinase activity, biofilm formation).

Table S2 | The list of indicator strains used in this study.

Table S3 | List of primers used in this study.

- Galili, T. (2015). dendextend: an R package for visualizing, adjusting and comparing trees of hierarchical clustering. *Bioinformatics* 31, 3718–3720. doi: 10.1093/bioinformatics/btv428
- Giraffa, G. (2003). Functionality of enterococci in dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 88, 215–222. doi: 10.1016/S0168-1605(03)00183-1
- Golic, N., Strahinic, I., Terzic-Vidojevic, A., Begovic, J., Nikolic, M., Tolinacki, M., et al. (2012). Molecular diversity among natural populations of *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus plantarum/paraplantarum* strains isolated from autochthonous dairy products. *Eur. Food Res. Technol.* 234, 627–638. doi: 10.1007/s00217-012-1670-6
- Hahsler, M., Chelluboina, S., Hornik, K., and Buchta, C. (2011). The arules R-package ecosystem: analyzing interesting patterns from large transaction datasets. *J. Mach. Learn. Res.* 12, 1977–1981.
- Hahsler, M., Gruen, B., and Hornik, K. (2005). arules—A computational environment for mining association rules and frequent item sets. *J. Stat. Soft.* 14:15. doi: 10.18637/jss.v014.i15
- Howarth, G. S., and Wang, H. (2013). Role of endogenous microbiota, probiotics and their biological products in human health. *Nutrients* 5, 58–81. doi: 10.3390/nu5010058
- Hummel, A., Holzapfel, W. H., and Franz, C. M. (2007). Characterisation and transfer of antibiotic resistance genes from enterococci isolated from food. *Syst. Appl. Microbiol.* 30, 1–7. doi: 10.1016/j.syapm.2006.02.004
- Johansson, D., and Rasmussen, M. (2013). Virulence factors in isolates of *Enterococcus faecalis* from infective endocarditis and from the normal flora. *Microb. Pathog.* 55, 28–31. doi: 10.1016/j.micpath.2012.09.009
- Koch, S., Hufnagel, M., Theilacker, C., and Huebner, J. (2004). Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. *Vaccine* 22, 822–830. doi: 10.1016/j.vaccine.2003.11.027
- Kreuzer, S., Machnowska, P., Aßmus, J., Sieber, M., Pieper, R., Schmidt, M. F. G., et al. (2012). Feeding of the probiotic bacterium *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 differentially affects shedding of enteric viruses in pigs. *Vet. Res.* 43:58. doi: 10.1186/1297-9716-43-58
- Lesuffleur, T., Barbat, A., Dussaulx, E., and Zweibaum, A. (1990). Growth adaptation to methotrexate of HT-29 human colon carcinoma cells is associated with their ability to differentiate into columnar absorptive and mucus-secreting cells. *Cancer Res.* 50, 6334–6343.

- Lopes, Mde. F., Simões, A. P., Tenreiro, R., Marques, J. J. F., and Crespo, M. T. B. (2006). Activity and expression of a virulence factor, gelatinase, in dairy enterococci. *Int. J. Food Microbiol.* 112, 208–214. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.09.004
- Lozo, J., Vuksanovic, M., Strahinic, I., and Topisirovic, L. (2004). Characterization and antimicrobial activity of bacteriocin 217 produced by natural isolate *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGBUK2-16. *J. Food Prot.* 67, 2727–2734. doi: 10.4315/0362-028X-67.12.2727
- Macovei, L., Ghosh, A., Thomas, V. C., Hancock, L. E., Mahmood, S., and Zurek, L. (2009). *Enterococcus faecalis* with the gelatinase phenotype regulated by the *fsr* operon and with biofilm-forming capacity are common in the agricultural environment. *Environ. Microbiol.* 11, 1540–1547. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.01881.x
- McWilliam, H., Li, W., Uludag, M., Squizzato, S., Park, Y. M., Buso, N., et al. (2013). Analysis tool web services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res.* 41, W597–600. doi: 10.1093/nar/gkt376
- Medeiros, A. W., Pereira, R. I., Oliveira, D. V., Martins, P. D., d'Azevedo, P. A., Van der Sand, S., et al. (2014). Molecular detection of virulence factors among food and clinical *Enterococcus faecalis* strains in South Brazil. *Brazilian J. Microbiol.* 45, 327–332. doi: 10.1590/S1517-83822014005000031
- Mohamed, J., and Huang, D. B. (2007). Biofilm formation by enterococci. *J. Med. Microbiol.* 56, 1581–1588. doi: 10.1099/jmm.0.47331-0
- Moraes, P. M., Perin, L. M., Todorov, S. D., Silva, A., Franco, B. D., and Nero, L. A. (2012). Bacteriocinogenic and virulence potential of *Enterococcus* isolates obtained from raw milk and cheese. *J. Appl. Microbiol.* 113, 318–328. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05341.x
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4
- Nakayama, J., Kariyama, R., and Kumon, H. (2002). Description of a 23.9-kilobase chromosomal deletion containing a region encoding *fsr* genes which mainly determines the gelatinase-negative phenotype of clinical isolates of *Enterococcus faecalis* in urine. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3152–3155. doi: 10.1128/AEM.68.6.3152-3155.2002
- Nilsen, T., Nes, I. F., and Holo, H. (2003). Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2975–2984. doi: 10.1128/AEM.69.5.2975-2984.2003
- Nishiyama, K., Sugiyama, M., and Mukai, T. (2016). Adhesion properties of lactic acid bacteria on intestinal mucin. *Microorganisms* 20:4. doi: 10.3390/microorganisms4030034
- Omar, N., Ben, C., Astro, A., Lucas, R., Abriouel, H., Yousif, N. M. K., et al. (2004). Functional and safety aspects of enterococci isolated from different Spanish foods. *Syst. Appl. Microbiol.* 27, 118–130. doi: 10.1078/0723-2020-00248
- Panel, E. F. (2012). Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA J.* 10:2740. doi: 10.2903/j.efsa.2012.2740
- Paradis, E., Claude, J., and Strimmer, K. (2004). APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics* 20, 289–290. doi: 10.1093/bioinformatics/btg412
- Pieniz, S., de Moura, T. M., Cassenego, A. P. V., Andreatza, R., Frazzon, A. P. G., Camargo, F. A., et al. (2015). Evaluation of resistance genes and virulence factors in a food isolated *Enterococcus durans* with potential probiotic effect. *Food Control* 51, 49–54. doi: 10.1016/j.foodcont.2014.11.012
- Rinkinen, M., Jalava, K., Westermarck, E., Salminen, S., and Ouwehand, A. C. (2003). Interaction between probiotic lactic acid bacteria and canine enteric pathogens: a risk factor for intestinal *Enterococcus faecium* colonization? *Vet. Microbiol.* 92, 111–119. doi: 10.1016/S0378-1135(02)00356-5
- Sánchez, B., Fernández-García, M., Margolles, A., de los Reyes-Gavilán, C. G., and Ruas-Madiedo, P. (2010). Technological and probiotic selection criteria of a bile-adapted *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* Strain. *Int. Dairy J.* 20, 800–805. doi: 10.1016/j.idairyj.2010.06.004
- Soares, R., Fedi, A. C., Reiter, K., Caierão, J., and D'Azevedo, P. (2014). Correlation between biofilm formation and *gelE*, *esp*, and *agg* genes in *Enterococcus* spp. clinical isolates. *Virulence* 5, 634–637. doi: 10.4161/viru.28998
- Terzić-Vidojević, A., Veljović, K., Begović, J., Filipić, B., Popović, D., Tolinački, M., et al. (2015). Diversity and antibiotic susceptibility of autochthonous dairy enterococci isolates: are they safe candidates for autochthonous starter cultures? *Front. Microbiol.* 6:954. doi: 10.3389/fmicb.2015.00954
- Uroic, K., Nikolic, M., Kos, B., Pavunc, A. L., Beganovic, J., Lukic, J., et al. (2014). Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Croatian fresh soft cheese and Serbian white pickled cheese. *Food Technol. Biotechnol.* 52, 232–241.
- Valenzuela, A. S., Omar, N. B., Abriouel, H., López, R. L., Veljovic, K., Ca-amero, M. M., et al. (2009). Virulence factors, antibiotic resistance, and bacteriocins in enterococci from artisan foods of animal origin. *Food Control* 20, 381–385. doi: 10.1016/j.foodcont.2008.06.004
- Valeriano, V. D., Parungao-Balolong, M. M., and Kang, D. K. (2014). *In vitro* evaluation of the mucin-adhesion ability and probiotic potential of *Lactobacillus mucosae* LM1. *J. Appl. Microbiol.* 117, 485–497. doi: 10.1111/jam.12539
- Vankerckhoven, V., Van Autgaerden, T., Vael, C., Lammens, C., Chapelle, S., Rossi, R., et al. (2004). Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *J. Clin. Microbiol.* 42, 4473–4479. doi: 10.1128/JCM.42.10.4473-4479.2004
- Van Tyne, D., and Gilmore, M. S. (2017). Raising the alarm: within-host evolution of antibiotic-tolerant *Enterococcus faecium*. *MBio* 8, e00066–e00017. doi: 10.1128/mBio.00066-17
- Veljovic, K., Fira, D., Terzic-Vidojevic, A., Abriouel, H., Galvez, A., and Topisirovic, L. (2009). Evaluation of antimicrobial and proteolytic activity of enterococci isolated from fermented products. *Eur. Food Res. Technol.* 230:63. doi: 10.1007/s00217-009-1137-6
- Veljović, K., Popović, N., Vidojević, A. T., Tolinački, M., Mihajlović, S., Jovčić, B., et al. (2015). Environmental waters as a source of antibiotic-resistant *Enterococcus* species in Belgrade, Serbia. *Environ. Monit. Assess.* 187:599. doi: 10.1007/s10661-015-4814-x
- Živković, M., Miljković, M. S., Ruas-Madiedo, P., Markelić, M. B., Veljović, K., Tolinački, M., et al. (2016). EPS-SJ exopolysaccharide produced by the strain *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8 is involved in adhesion to epithelial intestinal cells and decrease on *E. coli* association to Caco-2 cells. *Front. Microbiol.* 7:286. doi: 10.3389/fmicb.2016.00286

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Popović, Dinić, Tolinački, Mihajlović, Terzić-Vidojević, Bojić, Djokić, Golić and Veljović. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



The Influence of Heat-Killed *Enterococcus faecium* BGPAS1-3 on the Tight Junction Protein Expression and Immune Function in Differentiated Caco-2 Cells Infected With *Listeria monocytogenes* ATCC 19111

OPEN ACCESS

Edited by:

Maria Laura Gennaro,
Rutgers, The State University
of New Jersey, United States

Reviewed by:

Arun K. Bhunia,
Purdue University, United States
Carmen Wacher,
National Autonomous University
of Mexico, Mexico

*Correspondence:

Jelena Djokić
jelena.djokic@imgge.bg.ac.rs

Specialty section:

This article was submitted to
Infectious Diseases,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 20 November 2018

Accepted: 18 February 2019

Published: 05 March 2019

Citation:

Popović N, Djokić J, Brdarić E,
Dinić M, Terzić-Vidojević A, Golić N
and Veljović K (2019) The Influence
of Heat-Killed *Enterococcus faecium*
BGPAS1-3 on the Tight Junction
Protein Expression and Immune
Function in Differentiated Caco-2
Cells Infected With *Listeria*
monocytogenes ATCC 19111.
Front. Microbiol. 10:412.
doi: 10.3389/fmicb.2019.00412

Nikola Popović, Jelena Djokić*, Emilija Brdarić, Miroslav Dinić, Amarela Terzić-Vidojević, Nataša Golić and Katarina Veljović

Laboratory for Molecular Microbiology, Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

Listeria monocytogenes, the common foodborne pathogenic bacteria species, compromises the intestinal epithelial barrier, leading to development of the listeriosis, a severe disease especially among immunocompromised individuals. *L. monocytogenes* infection usually requires antibiotic treatment, however, excessive use of antibiotics promotes emergence of antibiotic resistance and the destruction of gut microbiota. Probiotics, including lactic acid bacteria (LAB), have been repeatedly proven as an alternative approach for the treatment of various infections. We have analyzed the potential of *Enterococcus faecium* BGPAS1-3, a dairy isolate exhibiting strong direct antilisterial effect, to modulate the response of differentiated Caco-2 intestinal epithelial cells to *L. monocytogenes* ATCC 19111 infection. We showed that the molecule with antilisterial effect is a bacterial cell-wall protein that is highly resistant to the high-temperature treatment. When we tested the antilisterial potential of heat-killed BGPAS1-3, we found that it could prevent tight junction disruption in differentiated Caco-2 monolayer infected with *L. monocytogenes* ATCC 19111, induce antilisterial host response mechanisms, and stimulate the production of protective TGF- β in intestinal epithelial cells. We also showed that the modulation of MyD88 dependent TLR2 and TLR4 pathways by BGPAS1-3 are involved in host response against *L. monocytogenes* ATCC 19111. Since heat-killed BGPAS1-3 possess strong antilisterial effects, such postbiotic could be used as a controllable and safe therapeutic.

Keywords: antilisterial effect, Caco-2 immune response, tight junction, *Enterococcus faecium* BGPAS1-3, heat-killed postbiotic

INTRODUCTION

Production and ripening of fermented products are accompanied with the high risk of contamination by foodborne spoilage and pathogenic bacteria, such as *Listeria monocytogenes*. *L. monocytogenes* can cause a serious disease called listeriosis that can lead to brain infection and death especially among pregnant women, the elderly and immunocompromised individuals (Ramaswamy et al., 2007). This infection begins with ingestion of contaminated food and one of the most critical steps in the course of the infection is the passage through the intestine barrier (Drevets and Bronze, 2008). A multi-protein complex between adjacent epithelial cells named tight junction forms selectively permeable intestinal epithelium barrier, which prevents different pathogens and toxins permeation (Berkes et al., 2003). *L. monocytogenes* expresses various factors, such as invasion protein internalin A (InlA), *Listeria* adhesion protein (LAP) (reviewed in Drolia et al., 2018), protein named InlC (Iretton et al., 2014), that compromise tight junction and other cell membrane protein complexes and form cell membrane pores and protrusions that allow bacteria invasion and multiplication in the host cells. In addition to barrier formation, intestinal epithelial cells are first that sense the presence of pathogens by recognition of different pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) with different pathogen recognition receptors (PRRs), among which the Toll-like receptors (TLRs) are best characterized (Takeda and Akira, 2015). Ligation of these receptors initiates activation of epithelial cells to produce molecules with direct antimicrobial effects and the molecules that induce innate immune responses, which is an indispensable step in the sequence of events leading a successful clearance of the pathogen (Pamer, 2004). One of the most important pro-inflammatory cytokines produced by intestinal epithelial cells is IL-8 responsible for the chemotactic migration and activation of different immune cells at the site of infection (Onyiah and Colgan, 2016). On the other hand, intestinal epithelial cells produce transforming growth factor (TGF)- β , the molecule with prominent immunosuppressive effect (Rochman et al., 2009; Konkler and Chen, 2011) an important role in the maintenance of barrier integrity (Howe et al., 2005).

L. monocytogenes infection usually requires antibiotic treatment. The knowledge that excessive and improper use of antibiotics in human and veterinary medicine is closely related to the emergence of various side-effects such as antibiotic resistance and destruction of gut microbiota (Francino, 2015), forced search for an alternative approach for the treatment of different infections. Probiotics have been repeatedly proven to have the potential of improving host defense against pathogens (Fijan, 2014). As bacteria of the genus *Enterococcus* are mainly ancient and highly evolved members of the different animal intestinal tract as well as plants, soil, water, and various man-made products (Lebreton et al., 2014) it is reasonable to expect that they have developed different mechanisms that enable them struggling for the living space. In accordance with that, some enterococci strains produce one or more broad-spectrum antimicrobial compound(s) and may affect *L. monocytogenes* growth (Achemchem et al., 2006). In addition to antimicrobial

effects, some enterococci could compete with pathogens for cell binding sites (Popovic et al., 2018). Also, enterococci are recognized by different PRRs, that could be used for immune responses modulation (Sparo et al., 2014; Carasi et al., 2017) and regulation of epithelial barrier function (Miyachi et al., 2008). In addition, enterococci are used in the fermentation of dairy and meat products contributing to the ripening and aroma development of certain cheeses or fermented sausages, often those produced in Mediterranean countries (Franz et al., 2003; Morandi et al., 2013).

However, some enterococcal strains are associated with nosocomial infections, bacteremia, urinary tract infections, and endocarditis (Vu and Carvalho, 2011). Often, they can carry multiple antibiotic resistances (Veljovic et al., 2015; Anderson et al., 2017) and virulence factors such as cytolysin (Cyl, β -hemolysin), gelatinase (GelE), hyaluronidase (HylN) (Dworniczek et al., 2003).

As the consequence of such opposite features of different enterococcal strains, these bacteria belong to the most controversial lactic acid bacteria (LAB) (Giraffa and Sisto, 1997; Giraffa, 2003). Considering that, the enterococci represent the source of various biologically active molecules that could be very useful for the resolution of different diseases, but not forgetting their controversial status, the investigation of biological effects of non-live enterococcal preparations named postbiotics, could give a solution. In that aim, we previously isolated enterococci from fermented dairy products and tested their antimicrobial potential (Terzić-Vidojević et al., 2015). *E. faecium* BGPAS1-3 was isolated from traditional fresh soft cheese manufactured in households on a small scale in rural location surrounding Pale mountain city in Bosnia and Herzegovina and was selected for this study due to strong antilisterial effect. We showed that *E. faecium* BGPAS1-3 produces the cell wall protein with strong direct antilisterial effect. Interestingly, the similar direct antilisterial effect is retained after treatment of *E. faecium* BGPAS1-3 with high temperature (heat-killed BGPAS1-3). In addition to this direct antimicrobial effect, we showed that live and heat-killed BGPAS1-3 could prevent tight junction disruption, allows induction of *IL-8* mRNA and stimulate *TGF- β* mRNA expression in differentiated Caco-2 monolayer infected with *L. monocytogenes*.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Strains, Medium, and Growth Conditions

E. faecium BGPAS1-3 from the laboratory collection of the Laboratory of Molecular Microbiology, Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade, Serbia was used in this study. *E. faecium* BGPAS1-3 was grown in M17 broth (Merck, GmbH, Darmstadt, Germany) supplemented with glucose (0.5% w/v) (GM17) at 37°C. *L. monocytogenes* ATCC 19111 was cultivated in Brain heart infusion (BHI) broth (Oxoid, Hampshire, United Kingdom) at 37°C. Corresponding agar plates were prepared by adding agar (1.7% w/v, Torlak, Belgrade, Serbia) into each broth.

Preparation of *E. faecium* BGPAS1-3 Postbiotics

E. faecium BGPAS1-3 was cultured in GM17 broth (Merck) at 37°C under aerobic conditions. The supernatant (SN BGPAS1-3) of the overnight culture (ON) was collected after centrifugation of bacterial cells at 5000 rpm for 10 min, filtrated through 0.22 μm membrane filters and stored at –20°C for further analysis. In order to obtain live and heat-killed BGPAS1-3, bacterial pellet from ON cultures was washed two times with PBS and 10 times concentrated in PBS. Live BGPAS1-3 were used for the analysis of antilisterial activity and the treatment of Caco-2 cells. In order to obtain heat-killed BGPAS1-3 the part of live cells suspension was heated at temperatures of 60°C, 70, 80, 90, and 100°C for 30 min. The treatment of BGPAS1-3 with 100°C for 30 min was sufficient to kill all bacteria so we chose this treatment conditions to obtain heat-killed BGPAS1-3 postbiotic for all further experiments. Obtained heat-killed BGPAS1-3 lots were stored at –20°C for further analysis. In order to determine the number of live bacteria for heat-killed BGPAS1-3 preparation, before the high temperature treatment of bacterial PBS suspension, bacteria were plated on GM17 agar plates and enumerated after 24 h. For the analysis of antilisterial activity, all treatment (ON BGPAS1-3, live BGPAS1-3, SN BGPAS1-3, and heat-killed BGPAS1-3) were prepared from the same number of live bacteria. In all experiments with Caco-2 cells, the cells were treated with heat-killed BGPAS1-3 prepared from live bacteria at multiplicity of infection (MOI) of 10.

PCR Detection of Virulence Determinants

The total DNA of BGPAS1-3 was used in PCR to detect the presence or absence of genes for virulence determinants and genes involved in biofilm formation. The primer sequences of the target genes, the expected amplicon sizes, and annealing temperatures are given in **Table 1**.

Antimicrobial Activity Assay

Efficacy of antimicrobial compounds produced by BGPAS1-3 was tested by the deferred antagonism method using indicator strain *L. monocytogenes* ATCC 19111 (Lozo et al., 2004). The antilisterial effects of ON BGPAS1-3, live BGPAS1-3 cells washed with PBS three times as well as of prepared BGPAS1-3 postbiotics, supernatant (SN) BGPAS1-3 and heat-killed BGPAS1-3. To confirm the production of antimicrobial compounds of proteinaceous nature, crystals of pronase E (Sigma Chemie, GmbH, Germany) were placed close to the edge of the wells. After incubation for 24 h at 37°C a clear zone of inhibition around the well, but not near the pronase E, was taken as a positive signal for bacteriocin production.

Cell Culture and Treatments

Differentiated human intestinal Caco-2 cells were used as an *in vitro* model of the intestinal epithelial barrier. Caco-2 cells were grown in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 μg/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin, and 2 mM L-glutamine (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham,

MA, United States). The cells were maintained in 75 cm² flasks at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Cells were seeded in 24-well plate (approximately 2 × 10⁵ cells/well) and incubated at 37°C. After confluency, cells were left for 21 days to allow differentiation, as previously reported (Roselli et al., 2006).

To test the protective effect of live or heat-killed BGPAS1-3 against adhesion and invasion of *L. monocytogenes* ATCC 19111, both bacterial overnight cultures and previously prepared heat-killed cells were washed in PBS and resuspended in 0.5 ml DMEM in order to treat Caco-2 cells (1 × 10⁶) with BGPAS1-3 (live or heat-killed) and *L. monocytogenes* ATCC 19111 at a MOI of 10.

Three different assays were performed on differentiated Caco-2 cells: (1) for competitive assay, live or heat-killed BGPAS1-3 suspension and *L. monocytogenes* ATCC 19111 suspension was simultaneously added on differentiated Caco-2 cells, and incubated for 1 h at 37°C in a 5% CO₂ incubator; (2) in the displacement assay, the *L. monocytogenes* ATCC 19111 was inoculated onto differentiated Caco-2 cells for 1 h, washed 3 times with PBS prior to 2 h inoculation of live or heat-killed BGPAS1-3; (3) in the exclusion assay, Caco-2 cells were treated with live or heat-killed BGPAS1-3 for 2 h, washed 3 times with PBS prior to 1 h inoculation with *L. monocytogenes* ATCC 19111.

In all assays, the cell cultures were washed three times with PBS to remove the non-adherent bacteria and then cells were detached with Trypsin-EDTA solution (Torlak, Belgrade, Serbia). The part of detached cells was used for adhesion assay of *L. monocytogenes* ATCC 19111 (Zivkovic et al., 2016) and calculated as the % of adhesion = [(CFU/ml a total number of counted bacteria – CFU/ml invaded bacteria)/ CFU/ml added bacteria] × 100. Part of the cells used for invasion analysis was incubated with gentamicin (500 μg/ml) for 30 min in order to kill extracellular adhered bacteria. Thereafter, cells were washed three times in PBS and lysed using 500 μl of cold 0.1% Triton X-100 and plated on BHI agar plates for enumeration of internalized bacteria. The % of invasion was calculated as (CFU/ml invaded bacteria/CFU/ml added bacteria) × 100. From the rest of the cells the total RNA and proteins were isolated, and stored at –80°C for quantitative real-time PCR analysis and at –20°C for Western blot analysis.

Quantitative Real-Time PCR

The total RNA extraction from the Caco-2 cell was performed as previously described (Lukic et al., 2013) with minor modification. Briefly, the Caco-2 cells were lysed in denaturing solution. Thereafter, acid phenol (pH 4) extraction was performed followed by 2-propanol precipitation. Reverse transcription was done using 500 ng of isolated RNA as a template, according to the instructions of the enzyme manufacturer (Thermo Fisher Scientific). Random hexamers (Applied Biosystems, Foster City, CA, United States) and RiboLock RNase inhibitor (Thermo Fisher Scientific) were used in the reactions. Synthesized cDNA was amplified in 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems) using KAPA SYBR Fast qPCR Kit (KAPA Biosystems, Wilmington, MA, United States) under the following

TABLE 1 | List of the primers used in this study.

Genes	Primers	Product size	T°C	Reference
<i>hylN</i>	5'-ACAGAAGAGCTGCAGGAAATG-3' 5'-GACTGACGTCCAAGTTTCCAA-3'	276 bp	56°C	Vankerckhoven et al., 2004
<i>agg</i>	5'-AAGAAAAAGAAGTAGACCAAC-3' 5'-AAACGGCAAGACAAGTAAATA-3'	1553 bp	54°C	Eaton and Gasson, 2001
<i>cylA</i>	5'-TGGATGATAGTAGAGGAAGT-3' 5'-TCTACAGTAAATCTTTTCGTCA-3'	517 bp	58°C	Eaton and Gasson, 2001
<i>esp</i>	5'-TTGCTAATGCTAGTCCCAGACC-3' 5'-GCGTCAACACTTGCATTGCCGAA-3'	933 bp	58°C	Eaton and Gasson, 2001
<i>efaA^{ts}</i>	5'-GACAGACCCTCACGAATA-3' 5'-ATGTCATCATGCTGTAGTA-3'	705 bp	56°C	Eaton and Gasson, 2001
<i>efaA^{fm}</i>	5'-AACAGATCCGCATGAATA-3' 5'-CATTTTCATCATCTGATAGTA-3'	735 bp	56°C	Eaton and Gasson, 2001
<i>fsrA</i>	5'-ATGAGTGAACAAATGGCTATTTA-3' 5'-CTAAGTAAGAAATAGTGCCTTGA-3'	740 bp	43°C	Nakayama et al., 2002
<i>fsrB</i>	5'-GGGAGCTCTGGACAAAGTATTATCTAACCG-3' 5'-TTGGTACCCACACCATCACTGACTTTTGC-3'	566 bp	43°C	Nakayama et al., 2002
<i>fsrC</i>	5'-ATGATTTTGTCTGTTATTAGCTACT-3' 5'-CATCGTTAACAACTTTTTTACTG-3'	1343 bp	43°C	Nakayama et al., 2002
<i>gelE</i>	5'-CGGAAGCGTACTGTTGAT-3' 5'-GAGCCATGGTTTCTGGTTGT-3'	957 bp	46°C	Popovic et al., 2018
<i>sprE</i>	5'-TTGAGCTCCGTTCTGCCGAAAGTCATTC-3' 5'-TTGGTACCGATTGGGGAACCAGATTGACC-3'	591 bp	58°C	Nakayama et al., 2002

conditions: 3 min at 95°C activation, 40 cycles of 15 s at 95°C and 60 s at 60°C. The results were normalized to endogenous control (β -actin) and expressed as relative target abundance using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Primers used in the study are listed in **Table 2**.

Western Blotting

For protein expression analysis the cells were lysed with RadioImmunoPrecipitation Assay buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4; 150 mM NaCl; 1% NP-40; 0.25% sodium deoxycholate) containing Protease inhibitor cocktail tablets (Roche, Basel,

Switzerland) and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, United States), for 30 min on ice. The total protein concentrations were determined using the BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific). Equal amounts of proteins (20 μ g) were separated by 12.5% SDS-PAGE. Electrophoresed proteins were transferred from the gel to a 0.2 μ m nitrocellulose membrane (GE Healthcare) using a Bio-Rad Mini *trans*-blot system (Bio-Rad, Hercules, CA, United States). Immunoblots were blocked in a 5% non-fat dry milk in TBS-Tween (50 mM Tris-HCl, pH 7.4; 150 mM NaCl, and 0.05% Tween-20) overnight at 4°C followed by 2 h incubation at room temperature with the primary antibodies anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (as a loading control; 1:1000; Beijing Dingguo Changsheng Biotechnology Co., Ltd.) and anti-claudin (CLDN-4, 1:1000; Novus Biologicals, United States). The membranes were subsequently washed and incubated with appropriate HRP-conjugated secondary antibodies (goat anti-rabbit; 1:10,000; Thermo Fisher Scientific) for 1 h at room temperature. Proteins were detected by enhanced chemiluminescence (Immobilon Western, Merck Millipore).

Statistical Analysis

All experiments were repeated at least three times independently, and each set of experiments was performed in triplicate. All data are presented as mean values \pm standard deviation from different experiments. One-way ANOVA with the Tukey's *post hoc* test was used to compare multiple groups. Values for $p < 0.05$ or less were considered to be statistically significant. Statistical analysis was carried out and graphs were prepared by using GraphPad Prism 5 software.

TABLE 2 | List of primers used for real time PCR analysis.

Genes	Primers	Reference
<i>TLR2</i>	5'-TGAGCTGCCCTTGACAGATAC-3' 5'-TGCAAGCAGGATCCAAAGGA-3'	This study
<i>TLR4</i>	5'-GGATTTTCACACCTCCACGCA-3' 5'-GGTCAGAGCGTGATAGCGAG-3'	This study
<i>MyD88</i>	5'-CAGTTGCCGGATCTCCAAGT-3' 5'-GTCTCCTCCACATCCTCCCT-3'	This study
<i>IL-8</i>	5'-ACACAGAGCTGCAGAAATCAGG-3' 5'-GGCACAACCTTTTCAGAGACAG-3'	Angrisano et al., 2010
<i>TGF-β</i>	5'-CCGGTTTATGCTGGTTGTACAG-3' 5'-AAGGACCTCGGCTGGAAGTGG-3'	Dragicevic et al., 2017
<i>Claudin</i>	5'-TCACACATACCCTGTCAGGCT-3' 5'-ATGGCCTCTCTGGCCTCCAA-3'	Elamin et al., 2012
<i>Occludin</i>	5'-TCAGGGAATATCCACCTATCACTTCAG-3' 5'-CATCAGCAGCAGCCATGTACTCTTCAC-3'	Elamin et al., 2012
β -actin	5'-TCAGTAACAGTCCGCCTAGAAGCA-3' 5'-TTGCTGACAGGATGCGAAGGAGA-3'	Li et al., 2015

RESULTS AND DISCUSSION

The Controversial Status of the *E. faecium* BGPAS1-3 Strain

Taking into account that mechanisms evolved by different strains of the highly diverse genus *Enterococcus* could be used against various medically important pathogens we previously isolated enterococci from fermented dairy products and tested their physiological properties that contribute to the technological process of fermented food production (Terzić-Vidojević et al., 2015).

In addition to human commensal bacteria, different species of genus *Enterococcus* are well characterized as human pathogens. In order to test the safety use of BGPAS1-3 as live probiotic, the presence of genes encoding different virulence factors in the genome of BGPAS1-3 was tested (Table 3). Enterococci colonize the gastrointestinal tract with adhesion factors binding to mucosal and other epithelial surfaces. In addition to the colonization of commensal bacteria, the adhesion to host tissues is considered a prerequisite for the establishment of infection (Koch et al., 2004). Enterococcal surface protein (encoded by *esp*), wall adhesins (encoded by *efaA^{fs}*, and *efaA^{fm}*), and aggregation substance (encoded by *agg*) are involved in the pathogenesis of *E. faecium* infections (Eaton and Gasson, 2001; Soares et al., 2014). The results of this study revealed the presence of the *esp*, *agg*, *efaA^{fs}*, and *efaA^{fm}* genes in the genome of BGPAS1-3. Although adhesion factors are involved in pathogenesis, our previous study suggested that the presence of the *agg* and *esp* genes positively correlate with characteristics related to probiotic potential (Popovic et al., 2018).

In addition, enterococci can form a biofilm that contributes to colonization and/or virulence. Biofilm is a structured and complex community of microorganisms adhering to the biotic or abiotic surface and is associated with bacterial mutual communication named quorum sensing system. We previously showed that BGPAS1-3 has no ability to form biofilm (Popovic et al., 2018) and now we tested the presence of genes involved in biofilm formation. Genes coding for proteins of the quorum sensing system are located in the *fsr* (fecal streptococci regulator) locus, consisting of the *fsrA*, *fsrB*, and *fsrC* genes. The presence of the complete *fsr* locus, including all three genes is necessary for biofilm formation. Importantly, the strain BGPAS1-3 carries the *fsrA* and *fsrB* genes, but not the *fsrC* gene, that is in

accordance with the inability of this strain to form the biofilm. In general, the *fsr* locus is located next to the genes encoding the gelatinase (*gelE*) and the serine protease (*sprE*) and regulate their expression (Mohamed and Huang, 2007; Hashem et al., 2017). Bacteria that have serine protease and gelatinase activity provide nutrients by hydrolyzing different proteins like gelatin, casein, and hemoglobin (Koch et al., 2004; Banwo et al., 2013) which leads to degradation of host tissue, but also have the role in biofilm formation (Fisher and Phillips, 2009). Interestingly, although we previously showed that the strain BGPAS1-3 does not exhibit gelatinase and protease activity (Popovic et al., 2018), now we showed that this strain carries the *gelE* and *sprE* genes. This inconsistency between genotype and phenotype could be explained by the absence of the intact *fsrC* gene that has been characterized as a positive regulator of the *gelE* (Nakayama et al., 2002; Teixeira et al., 2012).

Further, we tested the presences of the *cylA* gene encoding CylA serine protease which is involved in processing and activation of cytolysin (also called haemolysin), a bacterial toxin with β-haemolytic properties in humans. Also the presence of *hylN* gene, encoding hyaluronidase, a degradative enzyme associated with tissue damage (Semedo et al., 2003) was analyzed. Importantly, the results revealed that none of these genes was detected in the genome of the strain BGPAS1-3 and this result is in accordance with the previously shown absence of hemolytic activity of the strain after 48 h incubation on blood agar plates (Popovic et al., 2018).

The concern that bacteria belonging to *Enterococcus* sp. could act as pathogens increased with the occurrence of high-level resistance to multiple antimicrobial drugs (Hollenbeck and Rice, 2012). Although the strain BGPAS1-3 was previously determined as antibiotic susceptible, according to the results obtained by disc diffusion method (Terzić-Vidojević et al., 2015), and by microdilution test, according to CLSI recommendations, BGPAS1-3 showed resistance to low levels of gentamicin, streptomycin, erythromycin, and ampicillin according to EFSA guidance (Popovic et al., 2018).

Taking into account that postbiotics could mimic the beneficial therapeutic effects of probiotics while avoiding the risk of administering live microorganisms expressing virulence factors, in this study the postbiotic properties of the heat-killed BGPAS1-3 were examined in comparison to live bacteria.

The Strong Antilisterial Activity of the BGPAS1-3 Strain Is Retained After High-Temperature Treatment

Among the natural dairy isolates of the LAB, antibacterial mechanisms with a broad inhibitory spectrum were found in enterococci (Giraffa, 2003; Terzić-Vidojević et al., 2015). In accordance with that, BGPAS1-3 showed antimicrobial activity against *L. monocytogenes* ATCC 19111. Since BGPAS1-3 showed strong antilisterial effect (Figure 1), we further analyzed the effects of this enterococcal strain on Caco-2 cells infected with *L. monocytogenes* ATCC 19111. Considering the controversial status of enterococci, we tested the antilisterial effects of different fractions containing no BGPAS1-3 live cells such as filtrated

TABLE 3 | Presence of virulence genes and the genes for biofilm formation.

Biofilm formation					Adhesins				Enzyme	
<i>fsrA</i>	<i>fsrB</i>	<i>fsrC</i>	<i>gelE</i>	<i>sprE</i>	<i>esp</i>	<i>agg</i>	<i>efaA^{fs}</i>	<i>efaA^{fm}</i>	<i>hylN</i>	<i>cylA</i>
■	■		■	■	■	■	■	■		

The shaded areas reflect the presence of the respective genes. *fsrA*, response regulator; *fsrB*, signaling peptide; *fsrC*, histidine kinase; *gelE*, gelatinase; *sprE*, serine protease; *esp*, enterococcal surface protein; *agg*, aggregation substance; *efaA^{fs}*, cell wall adhesins (endocarditis specific antigen) expressed by *E. faecalis*; *efaA^{fm}*, gene coding cell wall adhesins (endocarditis specific antigen) expressed by *E. faecium*; *hylN*, hyaluronidase; *cylA*, cytolysin activator.

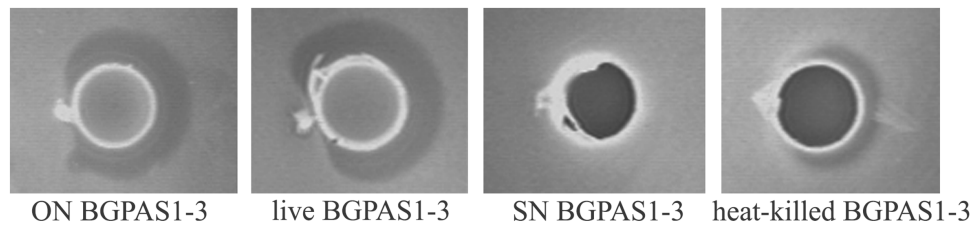


FIGURE 1 | Direct antilisterial effect of overnight culture (ON) BGPAS1-3, live BGPAS1-3 cells, supernatant (SN) BGPAS1-3 and heat-killed BGPAS1-3 of *Enterococcus faecium* BGPAS1-3 was tested. The zone of *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 growth inhibition around the well was taken as the positive signal of antimicrobial compounds production/activity. The confirmation of the proteinaceous nature of antimicrobial compounds is seen as a detectable growth at the edge of the inhibitory zone where the dot of pronase E crystals was placed.

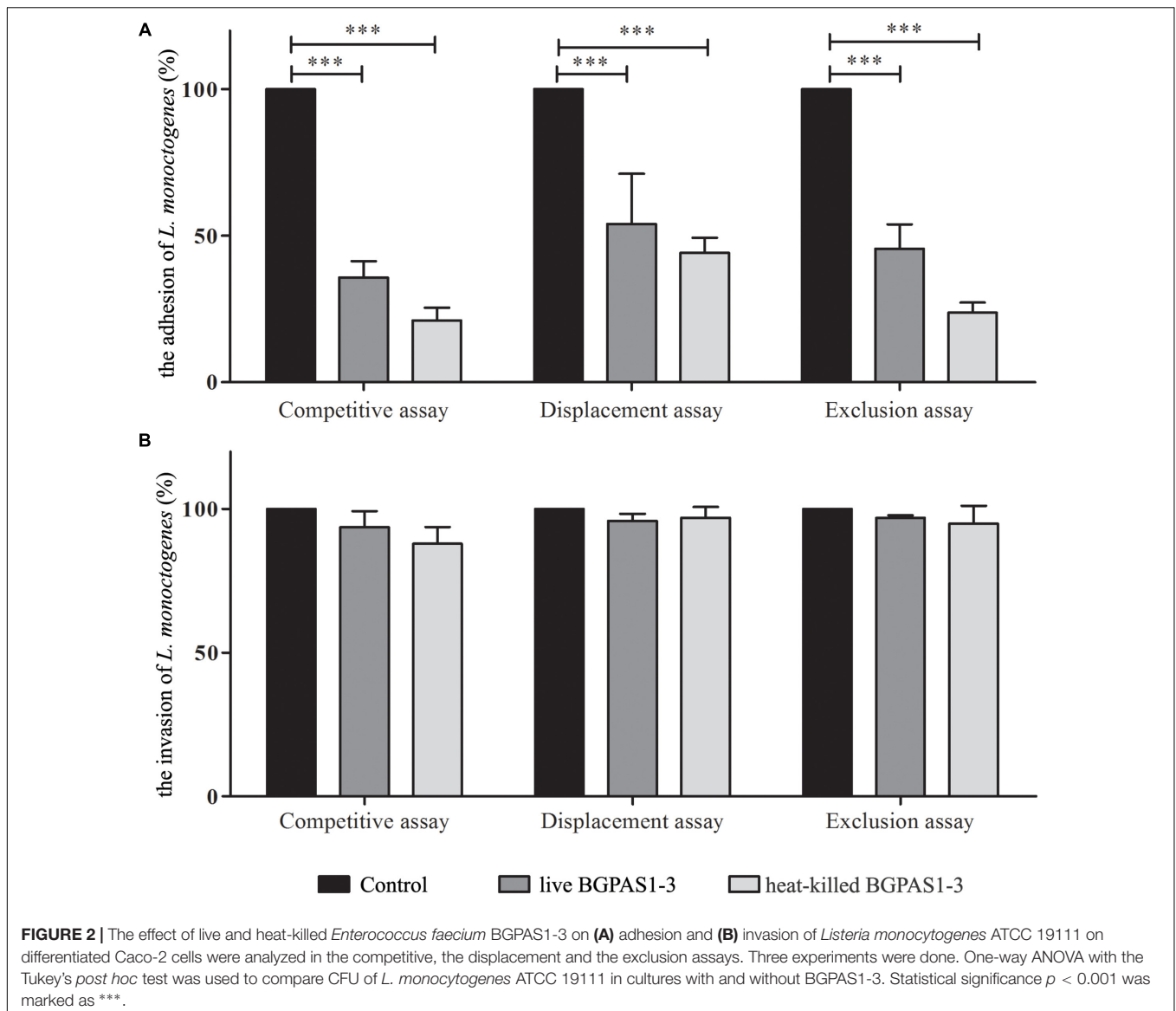
SN (obtained by filtration with 0.22 μm membrane filters) and heat-killed BGPAS1-3 cells. Importantly, only heat-killed BGPAS1-3 retained part of the antilisterial activity as live strain pointing out that the cell wall components contribute to this effect. Importantly, we showed that the molecule with direct antilisterial effect in this fraction is protein partially resistant on high-temperature treatment. This results are in accordance with the previously published results of our group that *Lactobacillus salivarius* BGHO1 (Busarcevic and Dalgalarondo, 2012) and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. diacetylactis BGBU1-4 (Lozo et al., 2017) produce bacteriocin in cell-attached form that only could be separated from bacterial cells extract and not from supernatant. Proteinaceous nature of this cell-attached molecule with antilisterial effect has been confirmed by crystals of pronase E. These cell-attached bacteriocins as well as heat-killed BGPAS1-3 were shown to be thermostable and to retain antimicrobial activity over long periods of storage.

Thus, we compared the effects of this fraction with the effects of live BGPAS1-3 on antilisterial response of Caco-2 cells. In addition to the production of antimicrobial molecules, it was shown that adhesion of enterococci to intestinal epithelial cells enables their colonization on the intestinal mucosa and therefore limits the overgrowth of pathogens (Jin et al., 2000). Our previous study indicated that enterococci isolated from dairy products are able to adhere to the surface of intestinal epithelial cells (Popovic et al., 2018). In this study, we showed that about 70% of applied BGPAS1-3 adheres to Caco-2 cells after 2 h of co-cultivation. These results are in accordance with the results related to the other enterococcal surface proteins, such as Esp, Agg, AggE (Sartingen et al., 2000; Shankar et al., 2001; Veljović et al., 2017), as well as di-glucosyl-di-acyl-glycerol/lipoteichoic acid (LTA) (Sava et al., 2009), which allow binding to the intestinal epithelium. Considering that, we assessed the effectiveness of live or heat-killed BGPAS1-3 on adhesion and invasion ability of *L. monocytogenes* ATCC 19111. We found that live or heat-killed BGPAS1-3 strongly inhibited adhesion of *L. monocytogenes* ATCC 19111 to differentiated Caco-2 cells during competition ($35.8\% \pm 5.5$ and $21.1\% \pm 4.4$), exclusion ($45.5\% \pm 8.4$ and 23.7 ± 3.5), and displacement (46.4 ± 4.9 and $44.1\% \pm 5.2$) (Figure 2A). Although live and heat-killed BGPAS1-3 have shown to reduce *L. monocytogenes* ATCC 19111 adhesion, none of the fractions has the ability to reduce the invasion of *L. monocytogenes* ATCC 19111 in Caco-2 cells (Figure 2B).

Well-known role of heparin and heparan sulfate expressed on epithelial host cells in the binding of enterococcal di-glucosyl-di-acyl-glycerol/LTA (Sava et al., 2009) and listerial protein, ActA (Suárez et al., 2001) indicates these molecules as the place of BGPAS1-3 and *L. monocytogenes* ATCC 19111 competition. These data point to the possibility that in addition to the strong direct bactericidal antilisterial effect of BGPAS1-3, a decrease in *L. monocytogenes* ATCC 19111 adhesion on Caco-2 cells could be due to the competition of bacteria and bacterial molecules/components for the same adhesion ligands. Considering these promising results on the potential protective effect of BGPAS1-3 as live probiotic as well as the heat-killed postbiotic in the case of listerial intestinal infection, it would be very interesting to test if these probiotic/postbiotic BGPAS1-3 preparation have the same effect in an animal model of listerial infection.

The Effects of BGPAS1-3 on Antilisterial Response of Caco-2 Cells

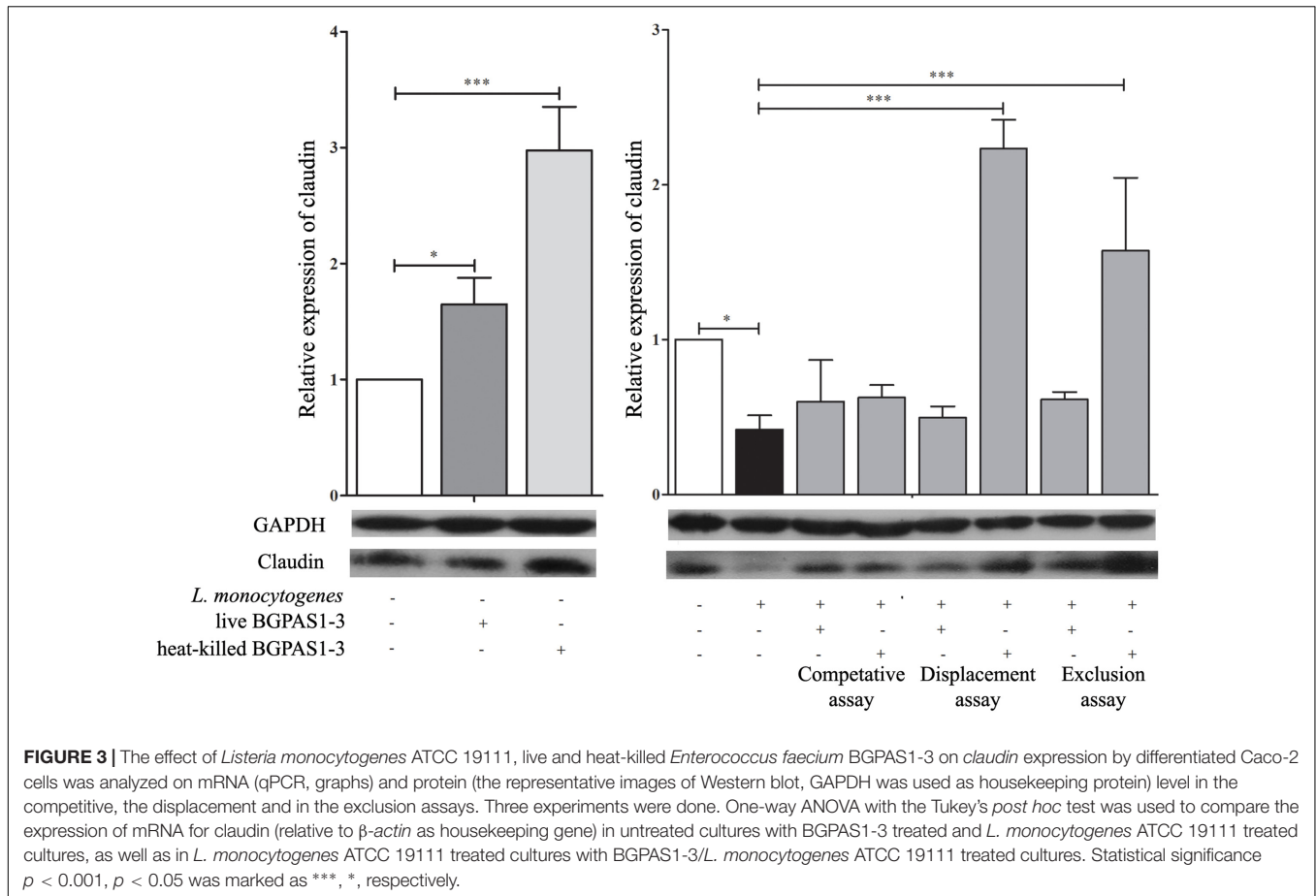
Bacterial pathogens, including *L. monocytogenes*, can disrupt the tight junction transmembrane structures and cause epithelial barrier dysfunction (Drolia et al., 2018). The different tight junction proteins form multifunctional transmembrane complex involved in intestinal homeostasis (Zihni et al., 2016). Claudins are the major determinant of the barrier function of tight junctions and it was shown that decrease in expression is correlated with different human diseases (Hadj-Rabia et al., 2004; Usami et al., 2006; Lee, 2015). Accordingly, we showed that *L. monocytogenes* ATCC 19111 infection of Caco-2 cells strongly decreases claudin expression at mRNA and protein level (Figure 3). On the other hand, treatment of uninfected differentiated Caco-2 cells with live or heat-killed BGPAS1-3 strongly stimulated the expression of claudin. In accordance to such protective role of BGPAS1-3, there was no significant decrease in claudin expression in *L. monocytogenes* ATCC 19111-infected Caco-2 cells treated with various fractions of BGPAS1-3. Interestingly, only heat-killed BGPAS1-3 stimulated the expression of this molecule when Caco-2 cells were treated before or after *L. monocytogenes* ATCC 19111 infection. In addition to claudin we showed that heat-killed BGPAS1-3 has stimulatory effect on expression of mRNA for occludin, another important tight junction protein in Caco-2 cells (Supplementary Figure S1). At the other hand, the infection



with *L. monocytogenes* ATCC 19111 showed no effect on expression of occludin mRNA in Caco-2 cells so we did not analyze the effect of BGPAS1-3 in the infected Caco-2 cells. This effect on tight junction proteins point to the potential protective role of BGPAS1-3 probiotic/postbiotic treatment in the case of intestinal infection. In order to confirm this assumption, it is necessary to examine the impact of these treatments on intestinal barrier function by using the equipment for transepithelial electrical resistance measurement in our further research.

Although the primary function of intestinal epithelial cells is mechanical protection, these cells have an important role in the recognition of pathogen which leads to their activation and consequently to induction of an acute immune response. IL-8 secreted by several cell types, including epithelial cells, has an important role in the attraction and activation of leukocytes (Onyiah and Colgan, 2016). Moreover, it has been shown that

IL-8 initiates an acute inflammatory response in listeriosis (Opitz et al., 2006). In accordance with that, infection of differentiated Caco-2 cells with invasive *L. monocytogenes* ATCC 19111 in our setting increased *IL-8* mRNA expression (Figure 4A). On the other hand, after the exposure of differentiated uninfected Caco-2 cells to live or heat-killed BGPAS1-3, level of *IL-8* mRNA was decreased (Figure 4A). Furthermore, live or heat-killed BGPAS1-3 treatments of Caco-2 cells before *L. monocytogenes* ATCC 19111 infection decreased significantly the level of *IL-8* mRNA expression in comparison to treatment with *L. monocytogenes* ATCC19111 alone. The same results were obtained when the Caco-2 cells were treated simultaneously with live or heat-killed BGPAS1-3 and *L. monocytogenes* ATCC 19111. Interestingly, when *L. monocytogenes* ATCC 19111 infected Caco-2 cells were treated thereafter with heat-killed BGPAS1-3 the level of *IL-8* mRNA induced by *L. monocytogenes* ATCC 19111 remained unchanged (Figure 4A). Taking into account indispensable role



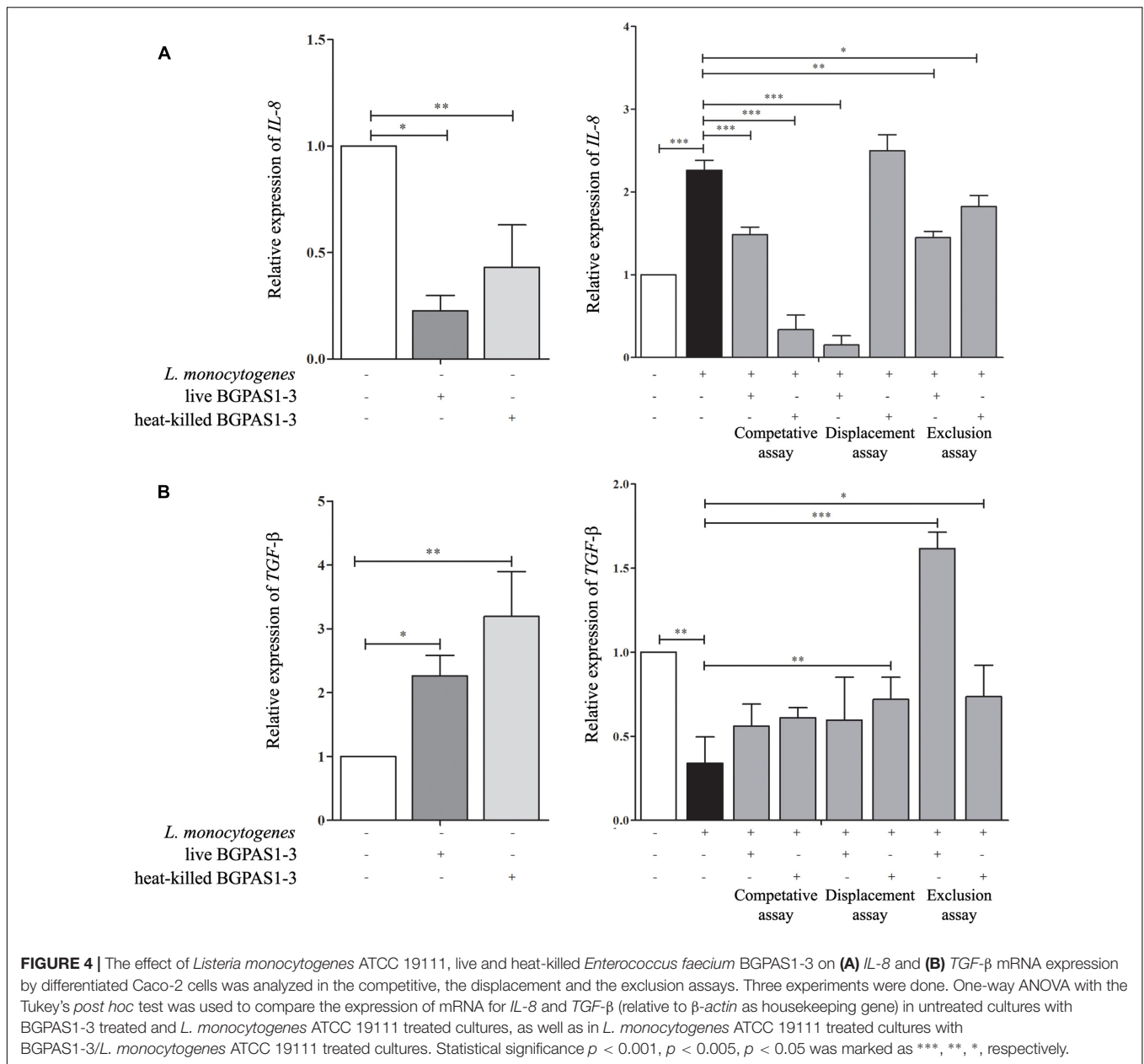
of IL-8 in the effective antilisterial host response, as well as the importance of intestinal barrier integrity, this enterococcal postbiotic exhibits potential to prevent bacterial translocation and spreading of *L. monocytogenes* infection and could be considered as safe enough treatment for listeriosis.

In addition to the important role of IL-8 in antilisterial host defense, the unrestrained inflammation could induce disruption of epithelial barrier (Naydenov et al., 2013). Therefore, the simultaneous activation of immunosuppressive mechanisms that control ongoing inflammation is of crucial importance for the harmless and successful pathogen elimination. In that mean, TGF- β can protect the epithelial barrier function by preventing inflammation-mediated epithelial damage and up-regulating of the tight junction protein claudin-1 (Rachakonda et al., 2016). Also, it was shown that TGF- β pretreatment could protect T84 monolayers against barrier dysfunction induced by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 (Howe et al., 2005). Infection of Caco-2 cells with *L. monocytogenes* ATCC 19111 decreased TGF- β mRNA expression in our experiments (Figure 4B). Oppositely, exposure of uninfected differentiated Caco-2 cells to live or heat-killed BGPAS1-3 elevated level of TGF- β mRNA expression. In accordance to that, the treatment of Caco-2 cells with heat-killed BGPAS1-3 after *L. monocytogenes* ATCC 19111 infection and with live or heat-killed BGPAS1-3 treatment before *L. monocytogenes* ATCC 19111 infection

increased significantly the level of TGF- β mRNA expression in comparison to treatment with *L. monocytogenes* ATCC 19111 alone. Considering the important role of TGF- β in the suppression of unrestrained inflammation and in the maintenance of intestinal epithelial barrier, this effect of BGPAS1-3 postbiotic could contribute to the protection of epithelial barrier function during listeriosis.

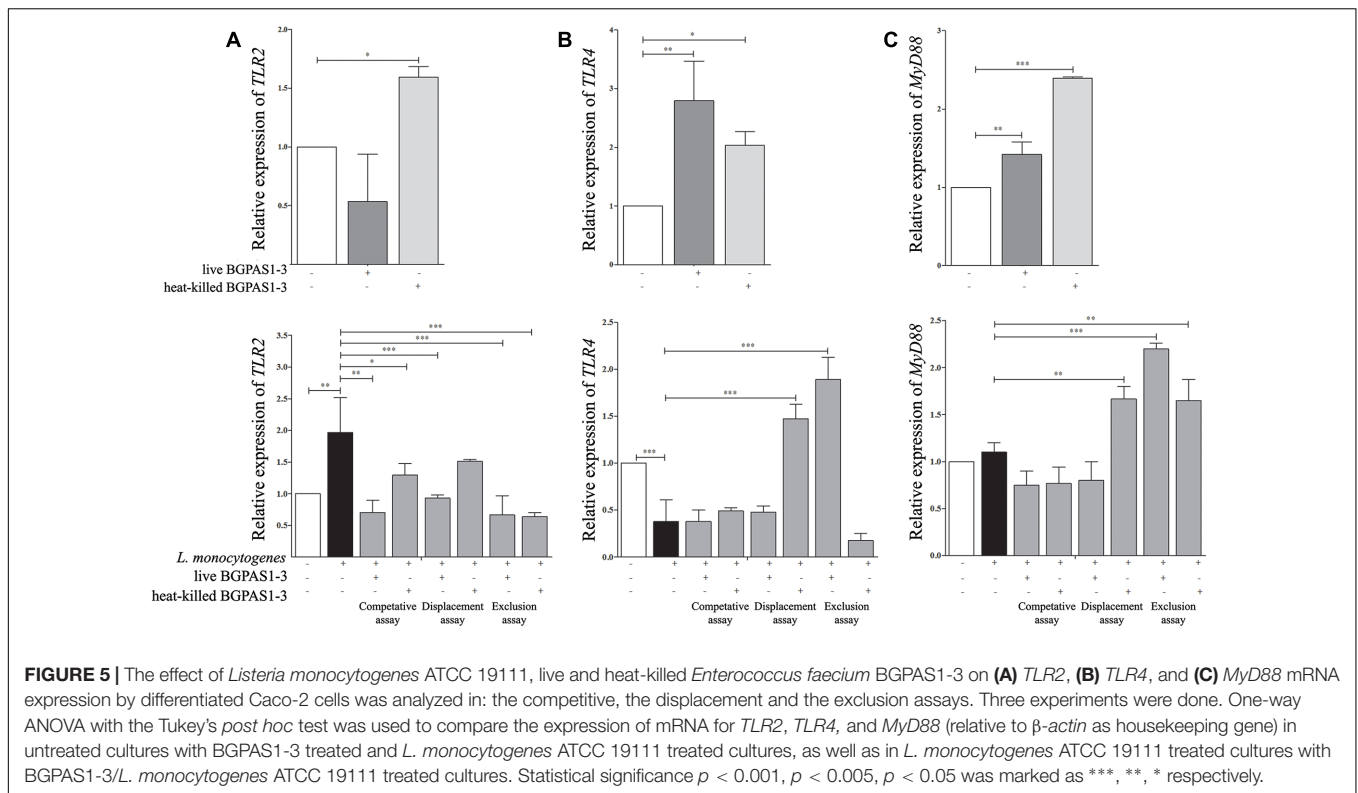
TLR2, TLR4, and MyD88 Are Involved in Modulation of Caco-2 Functions by BGPAS1-3

The fine balance of homeostasis and defense responses in intestinal tissue is regulated with simultaneous recognition of different microbial stimuli by different TLR (McClure and Massari, 2014). TLRs are dominantly expressed by immune cells, but also these receptors are expressed on epithelial cells and induce cell activation in a MyD88-dependent or independent manner. Recognition of *L. monocytogenes* peptidoglycans by TLR2 in MyD88-dependent fashion was shown to be required for induction of innate immune response against this pathogen in mice model of infection (Torres et al., 2004). In addition to this, it is hypothesized that TLR4 might have a role in recognizing surface LTA of live *L. monocytogenes* in the MyD88-independent way (Edelson and Unanue, 2002). In accordance



to such primary role of TLRs, it was shown that manipulation of TLR expression by probiotic strains could modulate the immune response in different diseases (Castillo et al., 2011; Villena and Kitazawa, 2014; Lépine and de Vos, 2018). As we expected, in our study infection of differentiated epithelial cells with *L. monocytogenes* ATCC 19111 stimulated *TLR2* mRNA expression (Figure 5A). In addition to *L. monocytogenes*, the immune response to *E. faecium* was shown to be dependent on TLR2 activation (Leendertse et al., 2008). Interestingly, only heat-killed BGPAS1-3 stimulated expression of this receptor in Caco-2 cells. As a result, the level of *TLR2* mRNA expression was decreased in all treatments, except the unchanged level of this mRNA in the Caco-2 cells treated with heat-killed BGPAS1-3 after *L. monocytogenes* ATCC 19111 infection. On the other hand,

infection of Caco-2 cells with *L. monocytogenes* ATCC 19111 suppressed the *TLR4* mRNA expression. Interestingly, although the treatment of Caco-2 with live or heat-killed BGPAS1-3 alone stimulated the level of *TLR4* mRNA expression, the expression of this receptor increased only in Caco-2 cells treated with live BGPAS1-3 after *L. monocytogenes* ATCC 19111 infection or with heat-killed BGPAS1-3 before *L. monocytogenes* ATCC 19111 infection (Figure 5B). In addition, the pattern of changes in *MyD88* mRNA expression showed a strong correlation with the changes of expression of mRNA for TLRs in cultures (Figure 5C). Thus, stimulation of *TLR2* and suppression of *TLR4* mRNA expression in Caco-2 by *L. monocytogenes* ATCC 19111 infection resulted in an unchanged level of *MyD88* mRNA in comparison to control Caco-2. The stimulation of



MyD88 mRNA expression in Caco-2 treated with BGPAS1-3 was consistent with the stimulation of TLR2 and TLR4 in these cultures. In accordance, expression of *Myd88* mRNA increased significantly with stimulation of both TLRs mRNA expression in Caco-2 cells treated with heat-killed BGPAS1-3 after *L. monocytogenes* ATCC 19111 infection. In addition, stimulation of the only TLR4 in Caco-2 cells treated with live BGPAS1-3 before *L. monocytogenes* ATCC 19111 infection are correlated with the increase in *MyD88* mRNA expression. More pronounced effect of heat-killed BGPAS1-3 in comparison to live bacteria is probably the result of the temperature-induced liberation of different active molecules originating inside live bacteria or sheltered in 3D structures of complex molecules on the bacterial surface. Another research group (Sultana et al., 2013) previously described similar mechanisms.

CONCLUSION

Considering that heat-killed BGPAS1-3 possess strong direct antilisterial effect, simultaneously allowing the induction of immune mechanisms important for antilisterial host response and stimulates the production of protective TGF- β in intestinal epithelial cells, we assume that the application of this enterococcal postbiotic in the case of listerial infection could significantly contribute to *L. monocytogenes* clearance with minimum harmful effects on host organism. In addition to soluble bacterial products, heat-killed bacteria could be considered as postbiotic that could be used as a more controllable and safer therapeutics.

DATA AVAILABILITY

All datasets generated for this study are included in the manuscript and/or the **Supplementary Files**.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

KV, NG, and JD conceived and designed the study. NP and JD performed the main work. AT-V participated in the research-virulence traits, antibiotic susceptibility, and antimicrobial activity. NP, KV, and JD participated in the research Caco2 cell culture experiments. MD and EB performed and analyzed western blot and qPCR. All authors finally approved the version to be published.

FUNDING

This work was supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development, Serbia (Grant No. 173019).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.00412/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Achemchem, F., Abrini, J., Martinez-Bueno, M., Valdivia, E., and Maqueda, M. (2006). Control of *Listeria monocytogenes* in goat's milk and goat's jben by the bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* F58 strain. *J. Food Prot.* 69, 2370–2376. doi: 10.4315/0362-028X-69.10.2370
- Anderson, D. J., Jenkins, T. C., Evans, S. R., Harris, A. D., Weinstein, R. A., Tamma, P. D., et al. (2017). The role of stewardship in addressing antibacterial resistance: stewardship and infection control committee of the antibacterial resistance leadership group. *Clin. Infect. Dis.* 64(Suppl. 1), S36–S40. doi: 10.1093/cid/ciw830
- Angrisan, T., Pero, R., Peluso, S., Keller, S., Sacchetti, S., Bruni, C. B., et al. (2010). LPS-induced IL-8 activation in human intestinal epithelial cells is accompanied by specific histone H3 acetylation and methylation changes. *BMC Microbiol.* 10:172. doi: 10.1186/1471-2180-10-172
- Banwo, K., Sanni, A., and Tan, H. (2013). Technological properties and probiotic potential of *Enterococcus faecium* strains isolated from cow milk. *J. Appl. Microbiol.* 114, 229–241. doi: 10.1111/jam.12031
- Berkes, J., Viswanathan, V. K., Savkovic, S. D., and Hecht, G. (2003). Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation. *Gut* 52, 439–451. doi: 10.1136/gut.52.3.439
- Busarcevic, M., and Dalgalarro, M. (2012). Purification and genetic characterization of the novel bacteriocin LS2 produced by the human oral strain *Lactobacillus salivarius* BGHO1. *Int. J. Antimicrob. Agents* 40, 127–134. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2012.04.011
- Carasi, P., Racedo, S. M., Jacquot, C., Elie, A. M., Serradell, M. L., and Urdaci, M. C. (2017). *Enterococcus durans* EP1 a promising Anti-inflammatory probiotic able to stimulate sIgA and to increase *Faecalibacterium prausnitzii* abundance. *Front. Immunol.* 8:88. doi: 10.3389/fimmu.2017.00088
- Castillo, N. A., Perdigon, G., and de Moreno de LeBlanc, A. (2011). Oral administration of a probiotic *Lactobacillus* modulates cytokine production and TLR expression improving the immune response against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in mice. *BMC Microbiol.* 11:177. doi: 10.1186/1471-2180-11-177
- Dragicevic, S., Milosevic, K., Nestorovic, B., and Nikolic, A. (2017). Influence of the polymorphism C-509T in the TGFBI gene promoter on the response to montelukast. *Pediatr. Allergy Immunol. Pulmonol.* 30, 239–245. doi: 10.1089/pep.2017.0770
- Drevets, D. A., and Bronze, M. S. (2008). *Listeria monocytogenes*: epidemiology, human disease, and mechanisms of brain invasion. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 53, 151–165. doi: 10.1111/j.1574-695X.2008.00404.x
- Drolia, R., Tenguria, S., Durkes, A. C., Turner, J. R., and Bhunia, A. K. (2018). *Listeria* adhesion protein induces intestinal epithelial barrier dysfunction for bacterial translocation. *Cell Host Microbe* 23, 470–484. doi: 10.1016/j.chom.2018.03.004
- Dworniczek, E., Kuzko, K., Mroz, E., Wojciech, L., Adamski, R., Sobieszczanska, B., et al. (2003). Virulence factors and *in vitro* adherence of *Enterococcus* strains to urinary catheters. *Folia Microbiol.* 48, 671–678. doi: 10.1007/BF02993477
- Eaton, T. J., and Gasson, M. J. (2001). Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1628–1635. doi: 10.1128/AEM.67.4.1628-1635.2001
- Edelson, B. T., and Unanue, E. R. (2002). MyD88-dependent but Toll-like receptor 2-independent innate immunity to *Listeria*: no role for either in macrophage listericidal activity. *J. Immunol.* 169, 3869–3875. doi: 10.4049/jimmunol.169.7.3869
- Elamin, E., Jonkers, D., Juuti-Uusitalo, K., van Ijzendoorn, S., Troost, F., Duimel, H., et al. (2012). Effects of ethanol and acetaldehyde on tight junction integrity: *in vitro* study in a three dimensional intestinal epithelial cell culture model. *PLoS One* 7:e35008. doi: 10.1371/journal.pone.0035008
- Fijan, S. (2014). Microorganisms with claimed probiotic properties: an overview of recent literature. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 11, 4745–4767. doi: 10.3390/ijerph110504745
- Fisher, K., and Phillips, C. (2009). The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology* 155, 1749–1757. doi: 10.1099/mic.0.026385-0
- Francino, M. P. (2015). Antibiotics and the human gut microbiome: dysbioses and accumulation of resistances. *Front. Microbiol.* 6:1543. doi: 10.3389/fmicb.2015.01543
- Franz, C. M., Stiles, M. E., Schleifer, K. H., and Holzapfel, W. H. (2003). Enterococci in foods—a conundrum for food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 88, 105–122. doi: 10.1016/S0168-1605(03)00174-0
- Giraffa, G. (2003). Functionality of enterococci in dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 88, 215–222. doi: 10.1016/S0168-1605(03)00183-1
- Giraffa, G., and Sisto, F. (1997). Susceptibility to vancomycin of enterococci isolated from dairy products. *Let. Appl. Microbiol.* 25, 335–338. doi: 10.1046/j.1472-765X.1997.00241.x
- Hadj-Rabia, S., Baala, L., Vabres, P., Hamel-Teillac, D., Jacquemin, E., Fabre, M., et al. (2004). Claudin-1 gene mutations in neonatal sclerosing cholangitis associated with ichthyosis: a tight junction disease. *Gastroenterology* 127, 1386–1390. doi: 10.1053/j.gastro.2004.07.022
- Hashem, Y. A., Amin, H. M., Essam, T. M., Yassin, A. S., and Aziz, R. K. (2017). Biofilm formation in enterococci: genotype-phenotype correlations and inhibition by vancomycin. *Sci. Rep.* 7:5733. doi: 10.1038/s41598-017-05901-0
- Hollenbeck, B. L., and Rice, L. B. (2012). Intrinsic and acquired resistance mechanisms in *Enterococcus*. *Virulence* 3, 421–569. doi: 10.4161/viru.21282
- Howe, K. L., Reardon, C., Wang, A., Nazli, A., and McKay, D. M. (2005). Transforming growth factor-beta regulation of epithelial tight junction proteins enhances barrier function and blocks enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7-induced increased permeability. *Am. J. Pathol.* 167, 1587–1597. doi: 10.1016/S0002-9440(10)61243-6
- Ireton, K., Rigano, L. A., Polle, L., and Schubert, W. D. (2014). Molecular mechanism of protrusion formation during cell-to-cell spread of *Listeria*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4:21. doi: 10.3389/fcimb.2014.00021
- Jin, L., Marquardt, R., and Zhao, X. (2000). A strain of *Enterococcus faecium* (18C23) inhibits adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 to porcine small intestine mucus. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4200–4204. doi: 10.1128/AEM.66.10.4200-4204.2000
- Koch, A. W., Manzur, K. L., and Shan, W. (2004). Structure-based models of cadherin-mediated cell adhesion: the evolution continues. *Cell Mol. Life Sci.* 61, 1884–1895. doi: 10.1007/s00018-004-4006-2
- Konkel, J. E., and Chen, W. (2011). Balancing acts: the role of TGF-beta in the mucosal immune system. *Trends Mol. Med.* 17, 668–676. doi: 10.1016/j.molmed.2011.07.002
- Lebreton, F., Willems, R. J., and Gilmore, M. S. (2014). “*Enterococcus* diversity, origins in nature, and gut colonization,” in *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*, eds M. S. Gilmore, D. B. Clewell, Y. Ike, and N. Shankar (Boston, MA: Massachusetts Eye and Ear Infirmary).
- Lee, S. H. (2015). Intestinal permeability regulation by tight junction: implication on inflammatory bowel diseases. *Intest. Res.* 13, 11–18. doi: 10.5217/ir.2015.13.1.11
- Leendertse, M., Willems, R. J., Giebelen, I. A., van den Pangaart, P. S., Wiersinga, W. J., de Vos, A. F., et al. (2008). TLR2-dependent MyD88 signaling contributes to early host defense in murine *Enterococcus faecium* peritonitis. *J. Immunol.* 180, 4865–4874. doi: 10.4049/jimmunol.180.7.4865
- Lépine, A. F., and de Vos, P. (2018). Synbiotic effects of the dietary fiber long-chain inulin and probiotic *Lactobacillus acidophilus* W37 can be caused by direct, synergistic stimulation of immune toll-like receptors and dendritic cells. *Mol. Nutr. Food Res.* 62:1800251. doi: 10.1002/mnfr.201800251
- Li, X., Xu, M., Liu, M., Ji, Y., and Li, Z. (2015). TNF-alpha and IL-6 inhibit apolipoprotein A-IV production induced by linoleic acid in human intestinal Caco2 cells. *J. Inflamm.* 12:22. doi: 10.1186/s12950-015-0069-0
- Lozo, J., Mirkovic, N., O'Connor, P. M., Malesevic, M., Miljkovic, M., Polovic, N., et al. (2017). Lactolisterin BU, a novel Class II broad spectrum bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. diacetylactis BGBU1-4. *Appl. Environ. Microbiol.* 83:e01519-17. doi: 10.1128/AEM.01519-17
- Lozo, J., Vukasinovic, M., Strahinic, I., and Topisirovic, L. (2004). Characterization and antimicrobial activity of bacteriocin 217 produced by natural isolate *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGBUK2-16. *J. Food Prot.* 67, 2727–2734. doi: 10.4315/0362-028X-67.12.2727
- Lukic, J., Strahinic, I., Milenkovic, M., Golic, N., Kojic, M., Topisirovic, L., et al. (2013). Interaction of *Lactobacillus fermentum* BGHI14 with rat colonic mucosa: implications for colitis induction. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 5735–5744. doi: 10.1128/AEM.01807-13
- McClure, R., and Massari, P. (2014). TLR-dependent human mucosal epithelial cell responses to microbial pathogens. *Front. Immunol.* 5:386. doi: 10.3389/fimmu.2014.00386

- Miyachi, E., Morita, H., Okuda, J., Sashihara, T., Shimizu, M., and Tanabe, S. (2008). Cell wall fraction of *Enterococcus hirae* ameliorates TNF-alpha-induced barrier impairment in the human epithelial tight junction. *Lett. Appl. Microbiol.* 46, 469–476. doi: 10.1111/j.1472-765X.2008.02332.x
- Mohamed, J. A., and Huang, D. B. (2007). Biofilm formation by enterococci. *J. Med. Microbiol.* 56, 1581–1588. doi: 10.1099/jmm.0.47331-0
- Morandi, S., Silveti, T., and Brasca, M. (2013). Biotechnological and safety characterization of *Enterococcus lactis*, a recently described species of dairy origin. *Antonie Van Leeuwenhoek* 103, 239–249. doi: 10.1007/s10482-012-9806-z
- Nakayama, J., Kariyama, R., and Kumon, H. (2002). Description of a 23.9-kilobase chromosomal deletion containing a region encoding *fsr* genes which mainly determines the gelatinase-negative phenotype of clinical isolates of *Enterococcus faecalis* in urine. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3152–3155. doi: 10.1128/AEM.68.6.3152-3155.2002
- Naydenov, N. G., Baranwal, S., Khan, S., Feygin, A., Gupta, P., and Ivanov, A. I. (2013). Novel mechanism of cytokine-induced disruption of epithelial barriers: Janus kinase and protein kinase D-dependent downregulation of junction protein expression. *Tissue Barriers* 1:e25231. doi: 10.4161/tisb.25231
- Onyiah, J. C., and Colgan, S. P. (2016). Cytokine responses and epithelial function in the intestinal mucosa. *Cell Mol. Life Sci.* 73, 4203–4212. doi: 10.1007/s00018-016-2289-8
- Opitz, B., Püschel, A., Beermann, W., Hocke, A. C., Förster, S., Schmeck, B., et al. (2006). *Listeria monocytogenes* activated p38 MAPK and induced IL-8 secretion in a nucleotide-binding oligomerization domain 1-dependent manner in endothelial cells. *J. Immunol.* 176, 484–490. doi: 10.4049/jimmunol.176.1.484
- Pamer, E. G. (2004). Immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 812–823. doi: 10.1038/nri1461
- Popovic, N., Dinic, M., Tolinacki, M., Mihajlovic, S., Terzic-Vidojevic, A., Bojic, S., et al. (2018). New insight into biofilm formation ability, the presence of virulence genes and probiotic potential of *Enterococcus* sp. dairy isolates. *Front. Microbiol.* 9:78. doi: 10.3389/fmicb.2018.00078
- Rachakonda, G., Vu, T., Jin, L., Samanta, D., and Datta, P. K. (2016). Role of TGF- β -induced Claudin-4 expression through c-Jun signaling in non-small cell lung cancer. *Cell. Signal.* 28, 1537–1544. doi: 10.1016/j.cellsig.2016.07.006
- Ramaswamy, V., Cresence, V. M., Rejitha, J. S., Lekshmi, M. U., Dharsana, K. S., Prasad, S. P., et al. (2007). *Listeria*—review of epidemiology and pathogenesis. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 40, 4–13.
- Rochman, Y., Spolski, R., and Leonard, W. J. (2009). New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 480–490. doi: 10.1038/nri2580
- Roselli, M., Finamore, A., Britti, M. S., and Mengheri, E. (2006). Probiotic bacteria *Bifidobacterium animalis* MB5 and *Lactobacillus rhamnosus* GG protect intestinal Caco-2 cells from the inflammation-associated response induced by enterotoxigenic *Escherichia coli* K88. *Br. J. Nutr.* 95, 1177–1184. doi: 10.1079/BJN20051681
- Sartingen, S., Rozdzinski, E., Muscholl-Silberhorn, A., and Marre, R. (2000). Aggregation substance increases adherence and internalization, but not translocation, of *Enterococcus faecalis* through different intestinal epithelial cells *in vitro*. *Infect. Immun.* 68, 6044–6047. doi: 10.1128/IAI.68.10.6044-6047.2000
- Sava, I. G., Zhang, F., Toma, I., Theilacker, C., Li, B., Baumert, T. F., et al. (2009). Novel interactions of glycosaminoglycans and bacterial glycolipids mediate binding of enterococci to human cells. *J. Biol. Chem.* 284, 18194–18201. doi: 10.1074/jbc.M901460200
- Semedo, T., Santos, M. A., Martins, P., Lopes, M. F. S., Marques, J. J. F., Tenreiro, R., et al. (2003). Comparative study using type strains and clinical and food isolates to examine hemolytic activity and occurrence of the *cyl* operon in enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2569–2576. doi: 10.1128/JCM.41.6.2569-2576.2003
- Shankar, N., Lockatell, C. V., Baghdayan, A. S., Drachenberg, C., Gilmore, M. S., and Johnson, D. E. (2001). Role of *Enterococcus faecalis* surface protein ESP in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. *Infect. Immun.* 69, 4366–4372. doi: 10.1128/IAI.69.7.4366-4372.2001
- Soares, R. O., Fedi, A. C., Reiter, K. C., Caierão, J., and d’Azevedo, P. A. (2014). Correlation between biofilm formation and *gelE*, *esp*, and *agg* genes in *Enterococcus* spp. clinical isolates. *Virulence* 5, 634–637. doi: 10.4161/viru.28998
- Sparo, M., Delpech, G., Batistelli, S., and Basualdo, J. A. (2014). Immunomodulatory properties of cell wall extract from *Enterococcus faecalis* CECT7121. *Braz. J. Infect. Dis.* 18, 551–555. doi: 10.1016/j.bjid.2014.05.005
- Suárez, M., González-Zorn, B., Vega, Y., Chico-Calero, I., and Vázquez-Boland, J. A. (2001). A role for ActA in epithelial cell invasion by *Listeria monocytogenes*. *Cell Microbiol.* 3, 853–864. doi: 10.1046/j.1462-5822.2001.00160.x
- Sultana, R., McBain, A. J., and O’Neill, C. A. (2013). Lysates of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* augment tight junction barrier function in human primary epidermal keratinocytes in a strain-dependent manner. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 4887–4894. doi: 10.1128/AEM.00982-13
- Takeda, K., and Akira, S. (2015). Toll-like receptors. *Curr. Protoc. Immunol.* 109, 14.12.1–14.12.10. doi: 10.1002/0471142735.im1412s109
- Teixeira, N., Santos, S., Marujo, P., Yokohata, R., Iyer, V. S., Nakayama, J., et al. (2012). The incongruent gelatinase genotype and phenotype in *Enterococcus faecalis* are due to shutting off the ability to respond to the gelatinase biosynthesis-activating pheromone (GBAP) quorum-sensing signal. *Microbiology* 158, 519–528. doi: 10.1099/mic.0.055574-0
- Terzić-Vidojević, A., Veljović, K., Begović, J., Filipić, B., Popović, D., Tolinački, M., et al. (2015). Diversity and antibiotic susceptibility of autochthonous dairy enterococci isolates: are they safe candidates for autochthonous starter cultures? *Front. Microbiol.* 6:954. doi: 10.3389/fmicb.2015.00954
- Torres, D., Barrier, M., Bihl, F., Quesniaux, V. J., Maillat, I., Akira, S., et al. (2004). Toll-like receptor 2 is required for optimal control of *Listeria monocytogenes* infection. *Infect. Immun.* 72, 2131–2139. doi: 10.1128/IAI.72.4.2131-2139.2004
- Usami, Y., Chiba, H., Nakayama, F., Ueda, J., Matsuda, Y., Sawada, N., et al. (2006). Reduced expression of claudin-7 correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Hum. Pathol.* 37, 569–577. doi: 10.1016/j.humpath.2005.12.018
- Vankerkhoven, V., Van Autgaerden, T., Vael, C., Lammens, C., Chapelle, S., Rossi, R., et al. (2004). Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *J. Clin. Microbiol.* 42, 4473–4479. doi: 10.1128/JCM.42.10.4473-4479.2004
- Veljović, K., Popović, N., Miljković, M., Tolinački, M., Terzić-Vidojević, A., and Kojić, M. (2017). Novel aggregation promoting factor AggE contributes to the probiotic properties of *Enterococcus faecium* BGG09-28. *Front. Microbiol.* 8:1843. doi: 10.3389/fmicb.2017.01843
- Veljovic, K., Popovic, N., Vidojevic, A. T., Tolinacki, M., Mihajlovic, S., Jovcic, B., et al. (2015). Environmental waters as a source of antibiotic-resistant *Enterococcus* species in Belgrade, Serbia. *Environ. Monit. Assess.* 187:599. doi: 10.1007/s10661-015-4814-x
- Villena, J., and Kitazawa, H. (2014). Modulation of intestinal TLR4-inflammatory signaling pathways by probiotic microorganisms: lessons learned from *Lactobacillus jensenii* TL2937. *Front. Immunol.* 4:512. doi: 10.3389/fimmu.2013.00512
- Vu, J., and Carvalho, J. (2011). *Enterococcus*: review of its physiology, pathogenesis, diseases and the challenges it poses for clinical microbiology. *Front. Biol.* 6:357. doi: 10.1007/s11515-011-1167-x
- Zihni, C., Mills, C., Matter, K., and Balda, M. S. (2016). Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 564–580. doi: 10.1038/nrm.2016.80
- Zivkovic, M., Miljkovic, M. S., Ruas-Madiedo, P., Markelic, M. B., Veljovic, K., Tolinacki, M., et al. (2016). EPS-SJ exopolysaccharide produced by the strain *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8 is involved in adhesion to epithelial intestinal cells and decrease on *E. coli* association to Caco-2 cells. *Front. Microbiol.* 7:286. doi: 10.3389/fmicb.2016.00286

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Popović, Djokić, Brdarić, Dinić, Terzić-Vidojević, Golić and Veljović. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.