

In vitro tesztrendszer alkalmazása probiotikus baktériumtörzsek szelektálására

Kulcsszavak: probiotikum, *Lactobacillus*, epesav, gyomorsav, RAPD-PCR, autoaggregáció

1. ÖSSZEFOGLALÁS

Vizsgálataink célja olyan *in vitro* módszerek értékelése volt, amelyekkel egyszerűen és hatékonyan lehet feltételezetten probiotikus baktériumtörzseket szelektálni. A szóba jöhető eljárások közül a következőket teszteltük: szelektív táptalajon való tenyésztés, Gram-festés, kataláz-próba, hemolízis-, klonalitás-, aggregációs képesség-, gyomorsavtűrés- és epesavtűrés-vizsgálat. Kísérleteinkbe Erdélyben előállított nyers juhtej-, aludttej- és juhsajt-mintákból izolált, összesen 217 db baktériumtörzset vontunk be. A hemolizáló és a probiotikumokra nem jellemző Gram-negatív, valamint kataláz-pozitív fenotípust mutató izolátumokat kizártuk a vizsgálatokból. Az egyed szintű polimorfizmusok feltárására alkalmas RAPD-PCR vizsgálatok eredményei alapján összesen 34 klónosztályt és 57 egyedi RAPD mintázattal rendelkező törzset különböztettünk meg. Az így leszűkített 34 klónosztályból egy-egy törzset kiválasztottunk, majd teszteltük azok aggregációs képességét, továbbá sav-, és epesav-tűrését. Összesen hat izolátumnál mértük a probiotikus törzsekre jellemzően magas, 70% feletti aggregációs értéket. A savval vagy epesavval kiegészített szilárd táptalaj felületén végzett jelenlét-hiány vizsgálatok során sikerült több, kimondottan sav- és epesav-tűrő törzset is szelektálnunk. Eredményeink alapján kiválasztottuk a további tesztekbe – pl. antibiotikum-rezisztencia és antimikrobiális aktivitás vizsgálatokba – bevonandó izolátumokat.

¹ Magyar Tejgazdasági Kísérleti Intézet Kft.

² Széchenyi István Egyetem, Mezőgazdaság- és Élelmiszer-tudományi Kar, Élelmiszer-tudományi Tanszék

³ Széchenyi István Egyetem, Wittmann Antal Növény-, Állat- és Élelmiszer-tudományi Multidiszciplináris Doktori Iskola

2. Bevezetés

A probiotikumok élő mikroorganizmusok, amelyek megfelelő mennyiségben alkalmazva jótékonyan befolyásolják a gazdaszervezet egészségét [1, 2]. Számos feltételnek kell eleget tenniük ahhoz, hogy a probiotikus jelzőt viselhessék. Egyebek mellett fokozott tűrőképességgel szükséges rendelkezniük a különféle testfolyadékokkal (gyomorsav, epesavak, emésztőenzimek) szemben és adhéziós képességük révén, a bélhámshóvet sejtjeihez kötődve stabilizálniuk kell a bélmikrobiótát [3].

Az egészségre jótékony hatást kifejtő probiotikus termékek iránt világszerte növekvő igény mutatkozik, legyen szó akár humán táplálkozásról akár haszonállatok takarmányozásáról. Az Európai Unió 2006-tól betiltotta az antibiotikumok hozamfokozó célból történő alkalmazását [4], ezt követően kerültek még inkább a figyelem középpontjába a probiotikumok.

Évről-évre nagyszámú baktériumtörzset izolálnak azzal a céllal, hogy egészségre gyakorolt előnyös hatásait kiaknázzák. A komplex és költséges állatkísérleteket meg kell előznie egy *in vitro* vizsgálatokból álló szelekciós rendszernek, amellyel egyszerűen, gyorsan és költséghatékonyan kiválaszthatók azok a törzsek – a több száz vagy akár több ezer izolátum közül –, amelyek remélhetőleg probiotikusnak bizonyulnak majd az *in vivo* kísérletek során [5, 6, 7].

Az elmondottak alapján, munkánk célja olyan *in vitro* mérési módszerek kidolgozása és értékelése volt, amelyekkel gyorsan és hatékonyan lehet baktériumtörzsek klasszikus mikrobiológiai jellemzőit, klonalitását, aggregációs képességét, valamint gyomorsavval és epesavval szembeni ellenállóságát vizsgálni. Arra a kérdésre kerestük a választ, hogy az általunk vizsgált nagyszámú izolátum között találhatók-e klónok és potenciálisan előnyös (akár probiotikus) tulajdonságokkal rendelkező törzsek, melyeket érdemes további *in vitro* vizsgálatokba bevonni. Azt is vizsgáltuk, hogy a tesztrendszer jól működik-e, avagy az egyes lépéseket esetleg szükséges optimalizálni, továbbá, hogy milyen sav- és epesav-koncentrációkat képesek az egyes törzsek tolerálni, ill. az aggregáció-vizsgálat, a sav- és epesav-tűrés eredményei között van-e bármiféle összefüggés. Ennek megfelelően, az *in vitro* tesztek közül az alábbi vizsgálati módszerekkel kapott eredményeket mutatjuk be közleményünkben:

- Klasszikus mikrobiológiai vizsgálatok (szelektív táptalajon történő tenyésztés és telepmorfológia megállapítása, Gram-festés és azt követő mikroszkópos vizsgálat, kataláz-próba, hemolízis-vizsgálat)
- Klonalitásvizsgálat RAPD-PCR módszerrel
- Autoaggregáció-vizsgálat
- Savval vagy epesavval kiegészített szilárd táptalaj felületén végzett jelenlét–hiány vizsgálat

3. Anyagok és módszerek

3.1. Baktériumtörzsek izolálása, tenyésztése, tartósítása és tárolása

Vizsgálatainkat Erdélyben előállított nyers juhtej-, aludttej- és juhsajt-mintákból izolált baktériumtörzsekkel végeztük. A termékek természetes mikrobiotával rendelkeztek, gyártásukhoz nem használtak fel kereskedelmi forgalomból származó starterkultúrákat. A sajtok előállításához borjúgyomorból készítették oltót a juhászok. A cél olyan, nagyhatékonyságú probiotikus törzsek izolálása volt, amelyek később felhasználhatók lesznek probiotikus termékek fejlesztéséhez. A 217 db izolátum és a kontroll törzsek felélesztése, ill. tenyésztése az 1. táblázatban közölt paraméterek szerint történt.

1. táblázat. A kísérletekbe bevont saját izolálású és kontroll baktériumtörzsek felélesztésének és tenyésztésének körülményei

Törzs	Tápleves	Táptalaj	Inkubálási körülmények
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	MRS leves (pH = 6,2)	MRS agar (pH = 6,2)	37 °C, 72 óra, anaerob
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5	MRS leves (pH = 6,2)	MRS agar (pH = 6,2)	37 °C, 72 óra, anaerob
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> ATCC 49775	CASO leves	CASO agar	37 °C, 24 óra, aerob
E1–E92 izolátumok	MRS leves (pH = 6,2)	MRS–CC agar*	37 °C, 72 óra, anaerob
E93–E217 izolátumok	MRS leves (pH = 5,4)	MRS agar (pH = 5,4)	37 °C, 72 óra, anaerob

* Clindamycinnel és ciprofloxacinnal kiegészített De Man–Rogosa–Sharpe agar

Az izolátumok tartósítása és tárolása glicerines törzsoldatban történt. 3 ml táplevesbe belemostunk egy oltókacccsal, MRS–CC agar, ill. MRS pH 5,4 agar felületéről levett törzset, majd inkubáltuk a törzs igényeinek megfelelően. A felszaporított tenyészetből krio (fagyasztó) csőbe adagoltunk 300 µl-t, 900 µl 60%-os glicerindatot adtunk hozzá, vortexeltük és cseppfolyós nitrogénben fagyasztottuk kb. 30 mp-ig. A tárolás -80 °C-on történt, ultramély-fagyasztóban.

3.2. A szelektív tenyésztés körülményei, tápközegei és elkészítésük

3.2.1. Fiziológiás sóoldat

A decimális hígítási sor előállításához használt hígítófolyadékhoz 8,5 g NaCl-ot és 1 g triptont mértünk be, majd 1 L desztillált vízben feloldottuk. A kémcsövekbe 9,3 ml-t adagoltunk, majd 121 °C-on 15 percig autoklávban sterilizáltuk.

3.2.2. Foszfát-puffer (PBS) oldat

Egy liter desztillált vízhez analitikai mérlegen mértük be az alábbi anyagokat: 80 g nátrium-kloridot, 2 g kálium-kloridot, 14,4 g dinátrium-hidrogén-foszfát-12-hidrátot és 2,4 g kálium-dihidrogén-foszfátot. Mágneses keverővel segítettük az oldódást, majd, amikor az oldat szemcsementessé vált, 121 °C-on, 15 percen át autoklávban sterilizáltuk. Az így elkészült oldat tízszeres töménységű PBS-nek felelt meg, vagyis a további felhasználáshoz hígítani kellett az alábbiak szerint: 900 ml desztillált vízhez adunk 100 ml 10 × PBS oldatot. Megfelelő elegyítést követően használatra kész volt az 1 × PBS oldat.

3.2.3. De Man–Rogosa–Sharpe (MRS) agar és leves (pH = 6,2)

Kereskedelmi forgalomban kapható MRS levesből (VWR, Radnor, PA, USA), ill. MRS agarból (VWR) a gyártó által ajánlott mennyiséget analitikai pontossággal bemértük, majd desztillált vízben feloldottuk, mágneses keverővel oldódásig kevertettük. A kívánt pH-értéket ($6,2 \pm 0,2$) 1 M HCl-oldattal állítottuk be. Ezt követően a tápközegeket autoklávban, 121°C-on, 15 percig sterilizáltuk.

3.2.4. MRS agar (pH = 5,4)

Az MRS agart (VWR) a gyártó utasításait követve előkészítettük, majd a pH-értékét 1 M HCl-oldattal beállítottuk 5,4-re, végül autoklávban sterilizáltuk standard paraméterek mellett (121 °C, 15 perc).

3.2.5. Clindamycinnel és ciprofloxacinnal kiegészített MRS agar (MRS–CC)

Az MRS–CC agar az alap MRS agaron kívül két, autoklávban nem sterilizálható antibiotikum-törzsoldatot is tartalmazott. Az egyik törzsoldat elkészítéséhez 10 ml desztillált vízben 2,0 mg clindamycin-hydrocloridot (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), a másikhoz pedig 10 ml mennyiségű desztillált vízben 20,0 mg ciprofloxacin-hydrocloridot (Sigma Aldrich) oldottunk fel. Ezután 0,22 µm pórusátmérőjű membránszűrőn (Millipore, Burlington, MA, USA) átszűrtük az antibiotikum-törzsoldatokat steril, csavaros kupakkal ellátott Erlenmeyer lombikokba. A 45 °C-ra lehűtött MRS agarhoz aseptikus körülmények között 0,1 ml clindamycin- és 1,0 ml ciprofloxacin-törzsoldatot adtunk steril, egyszer használatos pipettával (Greiner Bio-One Hungary, Mosonmagyaróvár, Magyarország). Így a clindamycin végleges koncentrációja az alap MRS agarban 0,1 mg/l, a ciprofloxaciné pedig 10,0 mg/l lett.

3.2.6. CASO agar

A CASO-agart (VWR) és CASO-levest (VWR) a gyártó utasításait követve készítettük el. A sterilizálás standard paraméterek mellett, 121 °C-on 15 percig, autoklávban történt.

3.2.7. Anaerob tenyésztés

Az anaerob körülményeket a következőképpen biztosítottuk a vizsgálatok során: AnaeroPack Rectangular tégelyben (Merck, Darmstadt, Németország), GENbox anaerob só (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Franciaország) hozzáadásával inkubáltuk az agarlemezeket. Az anaerob körülmények fennállásáról a Microbiologic Aerotest indikátor (Merck) fehérről kék színre való változása adott tájékoztatást.

3.3. Klasszikus mikrobiológiai vizsgálatok

3.3.1. Telepmorfológia vizsgálata

A felélesztett törzsek makromorfológiai jellemzőit feljegyeztük. Megfigyeltük többek között a telepek méretét, színét, felületi tulajdonságait (fényes, matt) és a telepek szélének kialakítását (szabályos, szabálytalan, csipkézett).

3.3.2. Gram-festés

Zsírtalanított tárgylemezre egy csepp desztillált vizet cseppentettünk, amiben egy szoliter telepet elszuszpendáltunk. A megszáradt kenetet 2 percig kristályibolya oldattal festettük, majd 1 percig lugol-oldattal kezeltük. Ezt követően desztillált vízzel öblítettük, majd fél percig dekolorizáló oldattal kezeltük a mintát, amely a Gram-negatív sejtekből kivonta a festéket a Gram-pozitívokból viszont nem. Ismét desztillált vizes öblítés következett, majd szafarinnal kontrasztfestést végeztünk 1 percen keresztül. Azután desztillált vizes öblítés következett és hagytuk megszáradni a keneteket, melyeket fénymikroszkóppal (Axio Scope, Carl Zeiss, Oberkochen, Németország), különböző nagyításokban vizsgáltunk meg. A Gram-festés elvégzése azért fontos, mert a potenciális probiotikus tulajdonságokkal bíró tejsavbaktérium törzsek a Gram-pozitív mikrobák közé tartoznak.

3.3.3. Kataláz-próba

Vannak kataláz enzimet termelő mikroorganizmusok, amelyek a mérgező hatású hidrogén-peroxidot vízre és oxigénre képesek bontani ($2 \text{H}_2\text{O}_2 = 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$). Annak érdekében, hogy megbizonyosodjunk izolátumaink kataláz-termeléséről, a tárgylemezre egy kacsnyit tettünk az egy telepre szélesztett friss tenyészetekből, és ezekre 3%-os H_2O_2 -t cseppentettünk. Pozitív esetben a telepek elkezdtek jól láthatóan pezsegni. Pozitív kontrollnak *S. aureus* ATCC 49775 törzset használtunk, amely erős pezsgéssel jelezte a kataláz működését. A kataláz-pozitív törzsek biztosan nem alkalmas probiotikumnak.

3.3.4. Hemolízis-vizsgálat

A hemolízis-vizsgálatok során a frissen felélesztett törzsekből egy-egy telepet vittünk tovább Columbia véres agarra (Biolab Zrt., Budapest, Magyarország). 37 °C-on végzett 24 órás anaerob inkubáció után értékeltük az eredményeket. Pozitív kontrollnak ebben az esetben is *S. aureus*-t használtunk, amely 5% juhvéres táptalajon β -hemolízist mutat.

3.4. Klonalításvizsgálat

A baktériumtörzsekből Chelex 100 Resin (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) felhasználásával bakteriális DNS-t izoláltunk, a gyártó által megadott protokoll alapján. A polimeráz-láncreakcióhoz 1,5 ml-es Eppendorf-csőbe összemértük a reakcióelegyet, amely tartalmazta a Red Taq 2 mM MgCl_2 Master Mixet (VWR), az általunk választott, 1254 nevű primert (Bio-Science, Budapest, Magyarország), a molekuláris biológiai tisztaságú AccuGENE vizet (Lonza, Basel, Svájc) és a mintát (baktériumtörzsek DNS templátja). A minták vizsgálatát RAPD-PCR módszerrel végeztük, Mastercycler PCR (Eppendorf, Hamburg, Németország) berendezés RAPD_03 programjával, melynek paraméterei a **2. táblázat**ban láthatók.

2. táblázat. A RAPD-PCR módszer paraméterei

Lépés	Hőmérséklet (°C)	Idő
1.	95	2 min
2.	94	20 sec
3.	38	20 sec
4.	72	1 min
5.	72	5 min
6.	10	∞

A 2. és a 4. lépés közötti folyamat 40 alkalommal játszódott le. A program lefutását követően, a felsokszorozott DNS-molekulákat gélelektroforézissel tettük láthatóvá és értékelhetővé. A gélelektroforézishez 1%-os agarózgél készítettünk. Bemértünk 0,6 g agarózt (VWR) és 60 ml $1\times$ TBE TRIS-bórecetsav-oldatban feloldottuk. Az oldatot a teljes elegyedésig forraltuk. Kézzel melegre hűtöttük és hozzáadtunk 6 μ l DNS ECO Safe festékkoldatot (Pacific Image Electronics, Torrance, CA, USA). Közben mágneses keverőn kevertettük, majd gél-töntöttünk. A visszahűlt és festékkel ellátott gél-t a tálcába öntöttük. Megszilárdulás után a tálcát behelyeztük az elektroforézis tankba, amelyet előzőleg feltöltöttünk gélelektroforézis pufferrel ($1\times$ TBE-oldat), majd eltávolítottuk a gélfésűt. Az egyes zsebekbe vittük fel a RAPD-PCR reakciótermékeket.

3.5. Autoaggregáció vizsgálata

Az alkalmazott vizsgálati módszer DEL RE és mtsai [8] kutatásain alapult, kisebb módosításokkal. A saját izolátumokat és a kontroll törzseket 37 °C-on, 18 óráig, anaerob körülmények között inkubáltuk, 6,2 pH-értékű MRS levesben. Ezután a mintákat centrifugáltuk (Eppendorf Centrifuge 5804 R) $2426 \times g$ -n, 6 percig.

A felülszót leöntöttük, 1×PBS-oldatból 50 ml-t mértünk a baktériumpelletekre, majd vortexeltük őket (10 sec). Ismét centrifugálás, a felülszó leöntése és a pellet visszavétele következett 1×PBS-oldatba. Vortexelés után szűkített (semi-micro) küvettékba (Greiner Bio-One Hungary) mértünk 900 µl 1×PBS-t és 100 µl sejtszuszpenziót. Az optikai denzitást 600 nm-es hullámhosszon mértük, BioMate 160 UV-Vis spektrofotométerrel (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA), majd az OD₆₀₀ értékeket standardizáltuk, 0,2-re állítottuk minden egyes mintánál, hogy a mérési eredmények összehasonlíthatóak legyenek. A beállított értékeket OD₆₀₀ méréssel visszaellenőriztük. Megfelelő értékek esetén 4–4 ml baktériumszuszpenziót adagoltunk ki steril Wassermann-csövekbe, melyeket mintánként A, B és C jellel láttunk el annak érdekében, hogy a három technikai ismétlés biztosítva legyen. Az így elkészített mintákat Wassermann-csövekben, szobahőmérsékleten, aerob módon inkubáltuk a vizsgálat ideje alatt. Az optikai denzitás méréseket a 0., az 5. és a 24. órában végeztük. Az egyes mérési időpontokban 200–200 µl-t vettünk ki a baktériumszuszpenzió felső részéből széles végű pipettaheggyel (Axygen, Union City, CA, USA), majd 800 µl 1×PBS-oldattal hígítottuk, szűkített küvettában. Mindhárom mérési időpontban mindegyik betűjellel ellátott minta OD₆₀₀ értékét háromszor mértük, majd ezekből számoltunk aggregációs százalékot, a García-Cayuela és mtsai [9] által megadott képlet alapján:

$$[1 - (A_{\text{mérési időpont}} / A_0) \times 100],$$

ahol: $A_{\text{mérési időpont}}$: a sejtszuszpenzió abszorbancia-értéke az adott mérési időpontban (5 h, 24 h); A_0 : a sejtszuszpenzió abszorbancia-értéke 0 h időpontban.

Az autoaggregáció értékelésére jelenleg nincs egységesen kialakított rendszer. Del Re és mtsai [8] vizsgálataik során a >80% aggregációs értékkel rendelkező törzseket jól aggregálódó izolátumoknak minősítették, míg a <10% értéket mutató törzseket nem aggregálódónak tekintették.

3.6. Sav- és epesav-tűrés vizsgálata

3.6.1. A vizsgálatához szükséges savas és epés táptalajok

A savtűrés vizsgálatához az MRS táptalajt (VWR) előírás szerint előkészítettük, majd 121 °C-on, 15 percig, autoklávban sterilizáltuk. Ezt követően, aszeptikus körülmények között, 1 M HCl-oldattal a következő értékekre állítottuk be a pH-t: 6,0; 5,5; 5,0; 4,0; 3,0. A 45 °C-ra visszahűtött steril táptalajokkal négyzet alakú Petri-csészékbe (Greiner Bio-One Hungary) lemezeket öntöttünk. A 6,0-os pH-értékű MRS táptalaj töltötte be a kezelés nélküli tápközeg szerepét.

Az epesavtűrés teszteléséhez az MRS táptalajt (VWR) a gyártó utasításai alapján készítettük elő. A sterilizálás (121 °C-on, 15 perc) után 45 °C-ra visszahűtött alap agarokhoz a sertésepet (Sigma Aldrich) 0,45 µm pórusátmérőjű membránszűrővel (Thermo Fisher Scientific) sterilre szűrve adagoltuk. A kiegészítést úgy hajtottuk végre, hogy a táptalajban az epe végleges koncentrációja 0%, 0,1%; 0,2% és 0,5% legyen. Az epét nem tartalmazó MRS agar töltötte be a negatív kontroll szerepét.

3.6.2. Törzsesztés és optikai denzitás (OD) mérés

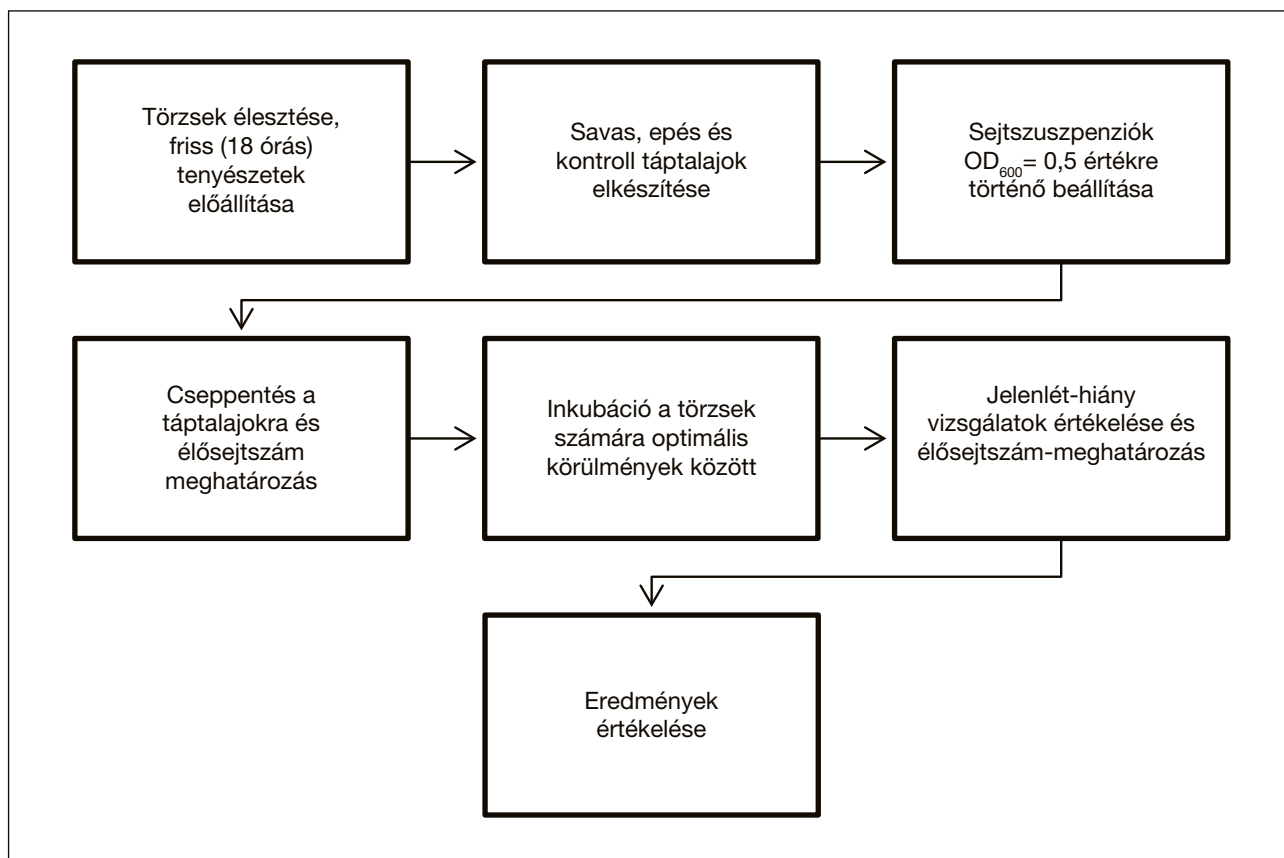
A baktériumtörzseket 6,2-es pH-értékű MRS levesben élesztettük fel, 37 °C-os, 18 órás, anaerob inkubáció eredményeként. A felszaporodott tenyészetek a Falcon cső alján több-kevesebb pelletet képeztek, mindezt értékeljük. A tenyészeteket centrifugáltuk (2426 × g, 6 perc, szobahőmérséklet) (Eppendorf Centrifuge 5804 R). A felülszót leöntöttük és 1×PBS-oldatba vettük vissza a mintákat. Rövid (10 sec) vortexelés után újra centrifugálás és a felülszó ismételt leöntése következett. Az 1×PBS oldatba való visszavétel után 10 sec vortexelés következett, majd a szuszpenzió tízszeres hígításának optikai denzitás értékét mértük meg BioMate 160 UV-Vis spektrofotométerrel (Thermo Fisher Scientific), 600 nm-en. A mérést követően egységesen 0,5-es OD₆₀₀ értékű szuszpenziókat készítettünk. A pontosság érdekében visszamértük a beállított sejtsűrűségű szuszpenziók OD₆₀₀ értékeit.

3.6.3. Jelenlét-hiány vizsgálat

Az OD₆₀₀ = 0,5 értékű sejtszuszpenziókból 18 (9 technikai × 2 biológiai ismétlés) × 10 µl-t cseppentettünk az eltérő pH-értékű és epesav-tartalmú táptalajok felületére, majd a 3.2.7. alfejezetben ismertetettek szerint 37°C-on, 48 óráig inkubáltuk a lemezeket.

3.6.4. Epesav- és sósavkezelés folyamata

A vizsgált baktériumtörzseket a táptalajhoz hozzáadott ágensek alapján epesav- és sósav-kezelésnek vetettük alá. Negatív kontrollként epét és sósavat sem tartalmazó, 6,0-os pH-értékű MRS táptalajok szolgáltak. A vizsgálatok menetét az **1. ábra** szemlélteti.



1. ábra. Epesav- és sósavkezelés folyamatábrája

3.6.5. Leoltás és élősejtszám-meghatározás

A saját izolátumok és a kontroll baktériumtörzsek tenyészetéből is decimális hígítási sort készítettünk, majd az egyes hígítási tagokból 100–100 µl-t szélesztettünk el 6,0-os pH-értékű MRS agarlemezek felületén. Az így elkészített lemezeket 37 °C-on, 72 óráig, anaerob körülmények között inkubáltuk. Az inkubációs idő letelte után telepszámlálást végeztünk.

4. Eredmények és értékelésük

4.1. Klasszikus mikrobiológiai vizsgálatok

A klasszikus mikrobiológiai vizsgálatok célja az volt, hogy a Gram-negatív, a kataláz-pozitív és a hemolizáló törzseket kiszelektáljuk. E módszerek alkalmazásával a 217 db izolátumból ki tudtunk szűrni olyanokat, amelyek nem feleltek meg a probiotikumok kritériumainak. A teljesség igénye nélkül, a **3. táblázat**ban látható a klasszikus mikrobiológiai vizsgálatok eredményei alapján megfelelő jellemzőkkel rendelkező néhány törzs, melyeket a későbbi vizsgálatokba (aggregáció, savtűrés és epesavtűrés vizsgálata) is bevontunk.

3. táblázat. Törzsek főbb jellemzői, klasszikus mikrobiológiai vizsgálatok eredményei alapján

Törzs	Telepmorfológia*	Gram-festés	Kataláz-próba	Hemolízis-vizsgálat
E10	Apró, fehér, krémes felületű, szabálytalan telep	Gram+ pálcák	Negatív	Negatív
E15	Nagy, fehér, hópehelyszerű telep	Gram+ pálcák	Negatív	Negatív
E66	Nagy, fehér, csipkés szélű, szabálytalan, matt telep	Gram+ pálcák	Negatív	Negatív
E92	Nagy, fehér, szabályos, matt telep	Gram+ pálcák	Negatív	Negatív
E173	Nagy, fehér, csipkés szélű, szabálytalan, matt telep	Gram+ pálcák	Negatív	Negatív
E198	Nagy, fehér, vajszerű, szabálytalan, matt telep	Gram+ pálcák	Negatív	Negatív
E216	Apró, fehér, krémes felületű, vajszerű, szabálytalan telep	Gram+ pálcák	Negatív	Negatív
LA-5	Nagy, fehér, szabályos, krémes felületű telep	Gram+ pálcák	Negatív	Negatív

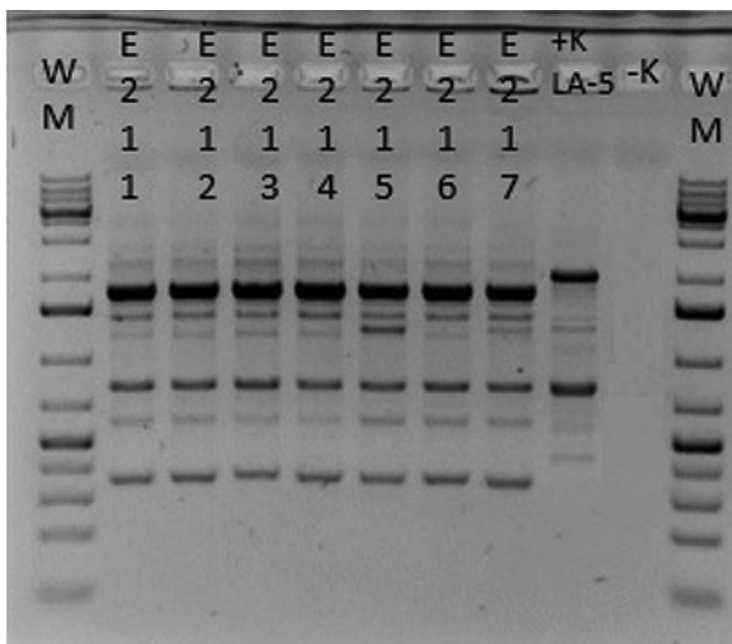
*A telepmorfológia vizsgálata 6,2-es pH-értékre beállított MRS agaron kifejlődött törzsekkel történt.

A 217 db izolátum közül 25 db kataláz-pozitív és 29 db Gram-negatív törzset azonosítottunk. Ezeket a klonalitásvizsgálat után a klónosztályokból és a klónosztályba nem illő egyedi törzsek közül is kizártuk. Egyetlen törzs sem hemolizált véresagaron, így jöllehet ez a vizsgálat nem segített szűkíteni a nagy mintaszámot, a probiotikus törzsek biztonságosságának megítéléséhez feltétlenül szükséges volt elvégezni.

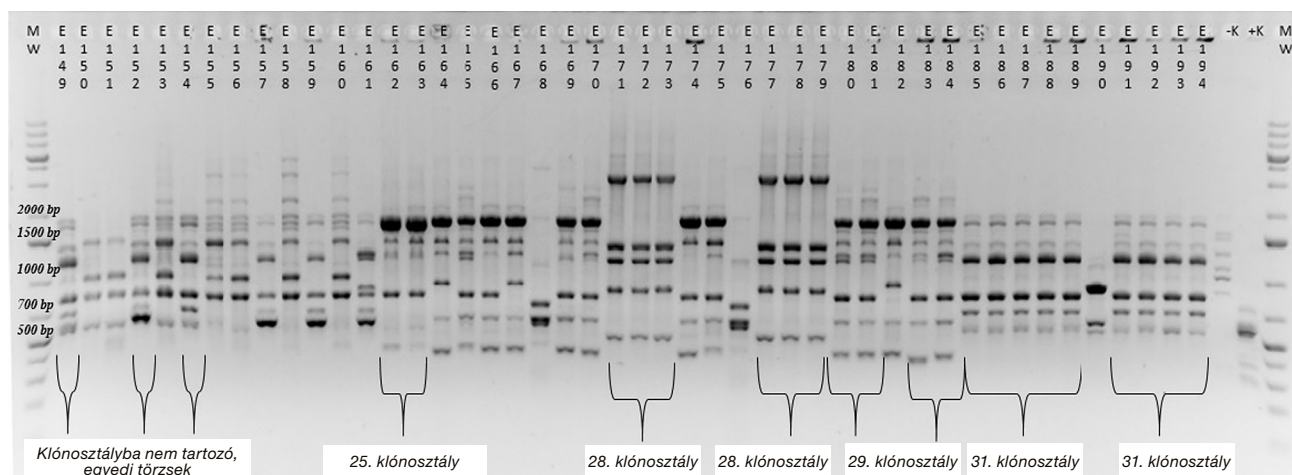
Sedlačková és mtsai [10] a mi munkacsoportunk gyakorlata szerint szintén csak a Gram-pozitív, pálcika alakú és kataláz-negatív izolátumokat vonták be további *in vitro* vizsgálataikba. Tanulmányukban összesen 59 db Gram-pozitív és kataláz-negatív törzset különítettek el, melyek közül 7 db-ot nyerstejből, 12 db-ot pedig nyers tehéntejből készített sajtból izoláltak. A telepmorfológia hasonlóknak bizonyult a *L. acidophilus* LA-5 alkotta telepekéhez.

4.2. Klonalitásvizsgálat

A RAPD-PCR vizsgálatok párhuzamosan zajlottak a klasszikus mikrobiológiai vizsgálatokkal. Az egyedi RAPD mintázatok alapján a 217 db törzset 34 klónosztályba soroltuk, ezek közül a 34. klónosztály gélfotója látható a **2. ábrán**; a **3. ábrán** pedig több klónosztályt és egyedi törzseket is bemutatunk.



2. ábra. A 34. klónosztály tagjainak klonalitásvizsgálata
(minták: E211–E217, pozitív kontroll: *Lactobacillus acidophilus* LA-5, negatív kontroll: desztillált víz, molekuláris marker: WM; Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder)



3. ábra. Több klónosztály és egyedi törzsek gélfotója
(minták: E149–E194, pozitív kontroll: E31, negatív kontroll: desztillált víz, molekuláris marker: WM; Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder)

A vizsgálatok során 57 db egyedi törzset találtunk, amelyek nem voltak klónosztályokba sorolhatók, így az izolátumok köre 91 db-ra szűkült a klonalitásvizsgálatok eredményei alapján. A klasszikus mikrobiológiai vizsgálati módszerekkel kizártuk a Gram-negatív és a kataláz-pozitív izolátumokat, így összesen 34 db klónosztály és 37 db klónosztályba nem sorolható, egyedi törzs maradt, összesen 71 db izolátumra szűkítve a kiindulási elemszámot. Ez nagyban segítette a preszelekciót, hiszen a törzseknek csak kevesebb mint a harmada (32,7%) maradt fenn a szűrőn. Mivel a RAPD-PCR vizsgálatok eredményei erősen függenek a laboratóriumi körülményektől, a módszer precíz kivitelezése kiemelt fontosságú az eredmények reprodukálhatósága szempontjából [11]. Az alkalmazott 1254-es primer lehetővé tette a RAPD-PCR vizsgálatok során a hasonló mintázatú izolátumok összehasonlítását. Ez egybecseng Torriani és mtsai [12] állításával, miszerint az 1254-es primer kiválóan alkalmazható *L. delbrueckii* törzsek közötti polimorfizmusok felderítésére.

4.3. Autoaggregáció vizsgálata

A további vizsgálatok során a klónosztályba nem sorolható egyedi törzsekkel (37 db) nem foglalkoztunk, ezért az aggregáció-vizsgálathoz a 34 db klónosztály mindegyikéből egy-egy baktériumtörzset kiválasztva folytattuk az *in vitro* teszt sorozatot. Célunk az volt, hogy jól aggregálódó (5 órás inkubáció után: >70%, ill. 24 órás inkubációt követően: >80%) és nem aggregálódó (<25%) törzseket találjunk, melyeket a további sav- és epesav-tűrési kísérletekbe be tudunk vonni. Azt feltételeztük, hogy a jól aggregálódó törzsek nagyobb valószínűséggel lehetnek probiotikusak, így esetlegesen a sav- és epesav-kezelést is jobban tolerálják.

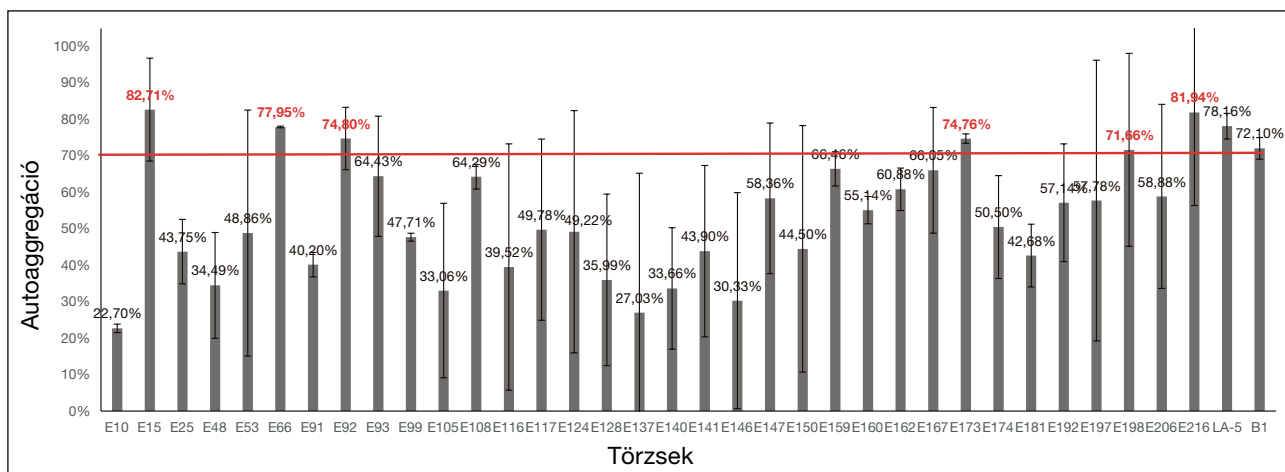
Az aggregációs vizsgálat méréseit 0, 5 és 24 óra elteltével végeztük. Az 5. óra utáni vizsgálat mellett Kos és mtsainak [13] eredményei alapján döntöttünk, akik azt tapasztalták, hogy már 5 óra elteltével erősen autoaggregálódott a *L. acidophilus* M92. A szerzők MRS-levesben tenyésztették teszt törzsüket, mert így megmaradtak az aggregációt lehetővé tevő egyes sejtfelszíni fehérjék [13].

A 34 db törzset két biológiai ismétléssel vizsgáltuk. Találtunk a kezelés 5. órájában 70% feletti aggregációs értéket mutató izolátumokat, szám szerint 6 db-ot (E15, E66, E92, E173, E198, E216). A pozitív kontrollként alkalmazott *L. acidophilus* LA-5 és ATCC 4356 törzsek szintén jól aggregálódtak (rendre 78,2%, ill. 72,1%) (4. ábra).

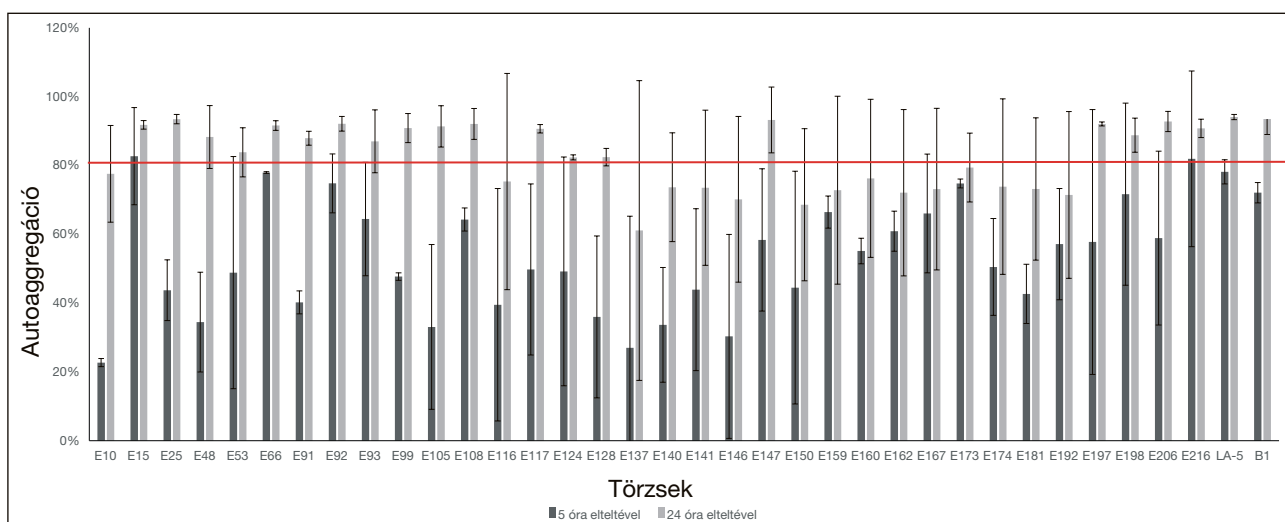
Említést érdemel, hogy a jól aggregálódó törzsek szabad szemmel is tisztán látható pelletet képeztek a Wassermann-csövek alján, a szuszpenzió felső része pedig kitisztult. Ugyanerre a megállapításra jutottak García-Cayuela és mtsai [9], akik 126 db *L. plantarum* törzset izoláltak nyerstejből készített sajt mintákból, és MRS levesben előzetesen szabad szemmel értékelték a törzsek aggregációs (szedimentációs) képességét, melynek alapján hópehelyszerű aggregátumok megjelenéséről számoltak be. Az autoaggregációs vizsgálatba 14 db törzset vontak be, az optikai denzitás méréseket 2, 6, 20 és 24 óra után végezték. A legnagyobb autoaggregációs értékeket (28,5–59,5%) 1 nap elteltével észlelték. Az értékek az idő előrehaladtával növekedtek, azonban törzsenként eltérő módon. Az általuk közölt aggregációs százalékokhoz képest mi nagyobb értékeket (>75%) mértünk 5 órás inkubálás után.

Xu és mtsai [14] probiotikus és patogén törzsek önaggregációs képességét tesztelték. A 2 órás inkubáció után kapott eredmények arról tanúskodtak, hogy három törzs (*Bifidobacterium longum* B6, *L. rhamnosus* GG és *L. brevis* KACC 10553) teljesített jól, 40-50% közötti aggregációs százalékokkal. Tuo és mtsai [15] 22 db *Lactobacillus* törzs aggregációs képességét vizsgálták 5 órás, 37 °C-os inkubációt követően, és 24,2-41,4%-os értékeket kaptak. Pozitív kontrollként *L. rhamnosus* GG-t használtak, amely 41,4%-os aggregációs értékével a legjobban teljesítő törzs volt.

Az erdélyi és a kontroll törzsek autoaggregációs vizsgálatának összesített (5 és 24 órás inkubálás utáni) eredményeit a 5. ábra szemlélteti. Megállapítottuk, hogy 24 órás inkubálás után minden egyes törzs nagyobb értéket ért el az 5 órás eredményéhez képest. A kontrollként használt probiotikus *L. acidophilus* LA-5 és a jól aggregálódó fenotípussal rendelkező *L. acidophilus* ATCC 4356, szakirodalmi adatokkal egyezően, 24 óra után is kiválóan teljesített (94,1% ill. 93,5%). A 34 db klónosztályba tartozó törzsek közül 19 db 80% felett aggregálódott. A beállított módszerünk tehát alkalmasnak bizonyult a jól és a nem jól aggregálódó izolátumok elkülönítésére. Prabhurajeshwar és Chandrakanth [16] joghurtokból izolált laktobacillus törzsek 24 órás autoaggregációs vizsgálata során a mi eredményeinknél kisebb értékeket (39,4-52,0%) mértek.



4. ábra. A saját izolátumok és a kontroll törzsek autoaggregáció-vizsgálatának eredménye, 5 órás inkubálás után [Az adatok 2 biológiai × 3 technikai ismétlés átlag ± szórás értékeit jelölik; a vízszintes piros vonal a jól aggregálódó (>70%) törzsek kiszűrését teszi lehetővé]



5. ábra. A saját izolátumok és a kontroll törzsek autoaggregáció-vizsgálatának eredménye, 5 órás és 24 órás inkubálás után [Az adatok 2 biológiai × 3 technikai ismétlés átlagértékeit jelölik; a vízszintes piros vonal a jól aggregálódó (>80%) törzsek kiszűrését teszi lehetővé]

4.4. Sav- és epesav-tűrés vizsgálata

A sav- és epesav-tűrés vizsgálatához az 5 óra inkubáció után jól aggregálódó 6 db törzset (E15, E66, E92, E173, E198, E216) használtuk, pozitív kontrollként pedig a *L. acidophilus* LA-5 szolgált, mely utóbbi törzs probiotikus, megfelelőek az aggregációs mutatói és korábban hasonló vizsgálatokban már jól szerepelt [17]. Ezen kívül, a saját izolátumok közül az E10-es, kevésbé jó aggregációs képességgel (22,7%) rendelkező törzset is bevontunk vizsgálatainkba, hogy megállapíthassuk, van-e összefüggés a jó aggregálódás, ill. a sav- és epesav-tűrés között.

Az eredményeket 48 órás inkubálást követően olvastuk le. A táptalaj felületére inokulált 10 µL térfogatú baktériumszuszpenzió-cseppek helyén telepek növekedését vagy a szaporodás hiányát észleltük. Azt bíráltuk el szabad szemmel, hogy a törzsek képesek voltak-e a savval, ill. epével kiegészített és a kontroll táptalajok felületén jól látható mértékben elszaporodni (jelenlét-hiány vizsgálat). Arra kerestük a választ, hogy egyrészt mekkora sav- és epesav-koncentrációt képesek tolerálni az egyes törzsek, másrészt van-e összefüggés az aggregálódó képesség és a sav-, ill. epesav-tűrés között. Eredményeinket a 4. és az 5. táblázatban szemléltettjük.

4. táblázat. Savval kiegészített szilárd tápközeg felületén végzett jelenlét-hiány vizsgálat eredményei*

Törzs	MRS agar pH-értéke				
	6,0	5,5	5,0	4,0	3,0
E10 izolátum	+++	++	++	++	0
E15 izolátum	+++	+++	+++	+++	0
E66 izolátum	+++	+++	+++	+++	0
E92 izolátum	+++	+++	+++	+++	0
E173 izolátum	+++	+++	+++	+++	0
E198 izolátum	+++	+++	+++	+++	0
E216 izolátum	+++	+++	+++	+++	0
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5	+++	+++	+++	++	0

* n = 18 (9 párhuzamos × 2 ismételés).

0: nincs szaporodás, +: gyenge szaporodás, ++: közepes mértékű szaporodás, +++: jól látható, erőteljes szaporodás.

5. táblázat. Epesavval kiegészített szilárd tápközeg felületén végzett jelenlét-hiány vizsgálat eredményei*

Törzs	MRS agar			
	0%	0,1%	0,2%	0,5%
	sertésepeével kiegészítve			
E10 izolátum	+++	+	0	0
E15 izolátum	+++	+++	+++	+++
E66 izolátum	+++	+++	+++	+++
E92 izolátum	+++	+++	+++	+++
E173 izolátum	+++	+++	+++	+++
E198 izolátum	+++	+++	+++	+++
E216 izolátum	+++	++	++	++
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5	+++	+++	++	+

* n = 18 (9 párhuzamos × 2 ismételés).

0: nincs szaporodás, +: gyenge szaporodás, ++: közepes mértékű szaporodás, +++: jól látható, erőteljes szaporodás.

Látható, hogy a *L. acidophilus* LA-5 a 6,0-os, 5,5-es, 5,0-ös és 4,0-es pH-értékű MRS táptalajokon és a 0,1%, valamint 0,2% epesav-tartalmú MRS táptalajokon megfelelően szaporodott, tehát jó sav- és közepes epesav-tűrőnek bizonyult. A 0,5% epét tartalmazó táptalajon már gyenge növekedést mutatott a kontrolltörzs. A legsavasabb (pH = 3,0) MRS tápközegen se a kontroll, se a vizsgált erdélyi törzsek nem képeztek telepeket, előszelekczióra tehát a 4,0-es és a 3,0-as pH-értékű szilárd tápközegek bizonyultak megfelelőnek.

Pan és mtsai [18] csecsemők székletéből izolált *L. acidophilus* NIT törzset tartottak glicin-sósav pufferben (pH: 2,0; 3,0; 4,0) 1, 2, ill. 3 órán keresztül. A kezelés után a baktériumpelletet reszuszpendálták és a megfelelő hígítási tagokból MRS agarlemezek felületén 20 µL szuszpenziót szélesztettek el. Azt tapasztalták, hogy 3 óra kezelés után a *L. acidophilus*-sejteknek mindössze 10%-a maradt életben. Jóllehet a mi vizsgálataink nem ugyanebben a kísérleti elrendezésben zajlottak, az eredmények magyarázatul szolgálhatnak arra, hogy a *L. acidophilus* a 3,0-as pH-értékű táptalajunkon miért nem képzett telepeket. Vargás és mtsai [19] 3% savófehérje-izolátum adagolásával érték el, hogy a *Streptococcus thermophilus* ST-M5 és a *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LB-12 maximális számban élje túl a savkezelést. Valente és mtsai [20] célja az volt, hogy felmérjék tradicionális brazil sajtokból izolált tejsavbaktérium-törzsek (*L. plantarum* B7 és *L. rhamnosus* D1) *in vitro* és *in vivo* probiotikus potenciálját. Mindkét törzs közepes mértékben tolerálta a 0,3% ökörepét 12 óra inkubáció elteltével. A mesterséges emésztőnedvekkel (pH: 2,0 és 3 g/L pepszin) szemben a B7 és a D1 izolátum is ellenállónak bizonyult [20].

Az epesavas sók fiziológiás koncentrációja 0,3% és 0,5% között változik az emésztőtraktusban [21], ezért választottuk legnagyobb epekoncentrációnak a 0,5%-ot. A nevezett szerző szintén hozzáadott táptalajához 0,3, 0,5, 1,0, ill. 2,0% epesavas sót, majd a törzskultúra 10 µL-ét juttatta a tápközeg felületére. Ugyan nem *Lactobacillus*, hanem nyers tehén- és kecsketejből, valamint tradicionális kefirből izolált *Lactococcus* törzsekkel dolgozott, vizsgálati rendszere mégis hasonlított a miénkhez. A *Lactococcus lactis* törzsek nem tolerálták az alkalmazott epesav-koncentrációk egyikét sem.

Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a kiválasztott izolátumok többnyire jól tolerálták a 0,5%-os epesav-jelenlétet, ami viszont nem volt igaz az E10 jelű törzsrre, amely még a legkisebb (0,1%) epekoncentráció mellett is csak alig szaporodott. Az E10 izolátum gyenge aggregációs képessége jó savtűréssel és gyenge epesavtűréssel társult. A *L. acidophilus* LA-5 kontrolltörzs gyengén ugyan, de még a 0,5% epét tartalmazó táptalajon is szaporodott. Az alkalmazott eljárás során a törzsek nemcsak pár óráig voltak kitéve a pusztító hatású összetevőknek, hanem 48 órán keresztül érintkeztek azokkal. Említést érdemel, hogy a destruktív ágensek negatív hatásait a tápközeghez adagolt savófehérjeporral lehet mérsékelni [19]. A savval és epesavval kiegészített szilárd táptalaj felületén végzett jelenlét–hiány vizsgálat viszonylag gyors módszernek tekinthető, mert a szükséges táptalajok könnyen elkészíthetők, a táptalaj felületére történő cseppentés gyorsan kivitelezhető, így az eredmények rövid időn belül rendelkezésre állnak.

5. Következtetések

A probiotikus baktériumtörzsek szelektálására alkalmas *in vitro* tesztrendszer néhány elemének kidolgozására irányuló törekvésünk sikeresnek bizonyult. Az itt bemutatott lépéseket nem feltétlenül szükséges tovább finomítani, mert jelenleg is képesek nagy elemszámú izolátumhalmazok előszelektálására. Noha az 1254-es primer jó választásnak bizonyult, a későbbi klonáltságvizsgálatok során érdemes lesz más primerekkel is elvégezni a RAPD-PCR reakciót. Az aggregációs vizsgálatok, valamint a sav- és epesav-tűrés tesztek eredményei között pozitív összefüggés mutatkozott, mindazonáltal az izolált törzsek probiotikus tulajdonságainak tényszerű megállapításához további *in vitro* vizsgálatokra és *in vivo* állatkísérletekre van szükség. A jelenleginél is nagyobb szelekció érdekében érdemesnek tűnik a tesztrendszert egyéb elemekkel kiegészíteni, pl. antibiotikumrezisztencia- vagy antimikrobiális aktivitás-vizsgálatokkal.

6. Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönik az EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00008 azonosítószámú, „Innovatív tudományos műhelyek a hazai agrár felsőoktatásban” című projekt és az EFOP-3.6.1-16-2016-00024 azonosítószámú, „Intelligens szakosodást szolgáló fejlesztések az Állatorvostudományi Egyetem és a Széchenyi István Egyetem Mezőgazdaság- és Élelmiszer-tudományi Karának együttműködésében” című projekt anyagi támogatását.

7. Irodalom

- [1] Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S., Calder, P.C., Sanders, M.E. (2014): The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* 11 pp. 506-514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- [2] Fijan, S., Frauwallner, A., Varga, L., Langerholc, T., Rogelj, I., Lorber, M., Lewis, P., Povalej-Bržan, P. (2019): Health professionals' knowledge of probiotics: an international survey. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 16 pp. 3128. <https://doi.org/10.3390/ijerph16173128>
- [3] Szakály, S. (2004): Probiotikumok és Humánegészség. Vissza a Természethez! Magyar Tejgazdasági Kísérleti Intézet, Mosonmagyaróvár.
- [4] European Parliament, Council of the European Union (2003): Regulation (EC) no. 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. *Official Journal of the European Union* L268 pp. 29-43.
- [5] Papadimitriou, K., Zoumpopoulou, G., Folligné, B., Alexandraki, V., Kazou, M., Pot, B., Tsakalidou, E. (2015): Discovering probiotic microorganisms: in vitro, in vivo, genetic and omics approaches. *Frontiers in Microbiology* 6 pp. 58. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00058>
- [6] Williams, C.F., Walton, G.E., Jiang, L., Plummer, S., Garaiova, I., Gibson, G.R. (2015): Comparative analysis of intestinal tract models. *Annual Review of Food Science and Technology* 6 pp. 329-350. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022814-015429>
- [7] Antal, O., Némethné Szerdahelyi, E., Takács, K. (2020): In vitro humán emésztési modellek alkalmazása a táplálkozástudomány területén (Application of in vitro human digestion models in the field of nutrition science). *Élelmiszervizsgálati Közlemények - Journal of Food Investigation* 66 pp. 3141-3157.
- [8] Del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli, M., Palenzona, D. (2000): Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Letters in Applied Microbiology* 31 pp. 438-442. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00845.x>
- [9] García-Cayuela, T., Korany, A.M., Bustos, I., de Cadiñanos, L.P.G., Requena, T., Peláez, C., Martínez-Cuesta, M.C. (2014): Adhesion abilities of dairy *Lactobacillus plantarum* strains showing an aggregation phenotype. *Food Research International* 57 pp. 44-50. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.010>

- [10] Sedláčková, P., Horáčková, Š., Shi, T., Kosová, M., Plocková, M. (2015): Two different methods for screening of bile salt hydrolase activity in *Lactobacillus* strains. *Czech Journal of Food Sciences* 33 pp. 13-18. <https://doi.org/10.17221/299/2014-CJFS>
- [11] Pereszlenyi, K. (2019): Tejsavbaktériumok genetikai azonosságának vizsgálata molekuláris markerekkel. Szakdolgozat. Széchenyi István Egyetem, Mosonmagyaróvár.
- [12] Torriani, S., Zapparoli, G., Dellaglio, F. (1999): Use of PCR-based methods for rapid differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* subsp. *lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 65 pp. 4351-4356. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.10.4351-4356.1999>
- [13] Kos, B., Šuško, J., Vuković, S., Šimpraga, M., Frece, J., Matošić, S. (2003): Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology* 94 pp. 981-987. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01915.x>
- [14] Xu, H., Jeong, H.S., Lee, H.Y., Ahn, J. (2009): Assessment of cell surface properties and adhesion potential of selected probiotic strains. *Letters in Applied Microbiology* 49 pp. 434-442. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02684.x>
- [15] Tuo, Y.F., Yu, H.L., Ai, L.Z., Wu, Z.J., Guo, B.H., Chen, W. (2013): Aggregation and adhesion properties of 22 *Lactobacillus* strains. *Journal of Dairy Science* 96 pp. 4252-4257. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6547>
- [16] Prabhurajeshwar, C., Chandrakanth, K. (2019): Evaluation of antimicrobial properties and their substances against pathogenic bacteria in vitro by probiotic lactobacilli strains isolated from commercial yoghurt. *Clinical Nutrition Experimental* 23 pp. 97-115. <https://doi.org/10.1016/j.clnex.2018.10.001>
- [17] Süle, J., Varga, L., Varga, K., Hatvan, Z., Kerényi, Z. (2022) Probiotikus baktériumtörzsek szelektálására alkalmas kísérleti rendszer egyes elemeinek kidolgozása (Developing basic elements of an experimental system for selection of probiotic bacterial strains). *Magyar Állatorvosok Lapja* 144 (közlésre benyújtva).
- [18] Pan, X.D., Chen, F.Q., Wu, T.X., Tang, H.G., Zhao, Z.Y. (2009): The acid, bile tolerance and antimicrobial property of *Lactobacillus acidophilus* NIT. *Food Control* 20 pp. 598-602. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.08.019>
- [19] Vargas, L.A., Olson, D.W., Aryana, K.J. (2015): Whey protein isolate improves acid and bile tolerances of *Streptococcus thermophilus* ST-M5 and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* LB-12. *Journal of Dairy Science* 98 pp. 2215-2221. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8869>
- [20] Valente, G.L.C., Acurcio, L.B., Freitas, L.P.V., Nicoli, J.R., Silva, A.M., Souza, M.R., Penna, C.F.A.M. (2019): Shortcommunication: In vitro and in vivo probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* B7 and *Lactobacillus rhamnosus* D1 isolated from Minas artisanal cheese. *Journal of Dairy Science* 102 pp. 5957-5961. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15938>
- [21] Yerlikaya, O. (2019): Probiotic potential and biochemical and technological properties of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* strains isolated from raw milk and kefir grains. *Journal of Dairy Science* 102 124-134. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14983>