

UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM

Magdalena Strus

Charakterystyka wybranych bakterii kwasu mlekowego, jako podstawa do wyboru probiotyków nowej generacji.

PRACA DOKTORSKA

Bibl. Medyczna CM UJ



1816003602

Promotor: Prof. dr med. hab. Piotr Heczko.

Kraków 1999

Serdecznie dziękuję

Szanownemu Panu Prof. dr med. hab. Piotrowi Heczko

*za cenne wskazówki, wszechstronną pomoc i opiekę okazaną przy realizacji
mojej pracy doktorskiej.*

Magdalena Strus

Podziękowania

Pragnę wyrazić swoją wdzięczność za pomoc w wykonaniu i przygotowaniu ostatecznej wersji niniejszej rozprawy następującym osobom:

- * Pani Docent Jolancie Zakrzewskiej-Czerwińskiej z Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN,*
- * Panu Profesorowi Lorenzowi Morelliemu z Instytutu Mikrobiologii Katolickiego Uniwersytetu w Piacenzy we Włoszech,*
- * Pani Profesor Annie Przondo-Mordarskiej i Pani Mgr Danucie Rurańskiej-Smutnickiej z Katedry Mikrobiologii Akademii Medycznej we Wrocławiu,*
- * Pani Profesor Felicji Meisel-Mikołajczyk i Pani Mgr Hannie Pituch z Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej Akademii Medycznej w Warszawie.*

Spis treści:

I. <u>Rozdział:</u> <u>Wstęp.</u>	6
II. <u>Rozdział:</u> <u>Medyczne wykorzystanie bakterii kwasu mlekowego.</u>	8
1. Przywracanie naturalnego składu flory przewodupokarmowego po przebytych, ostrych zakażeniach żołądkowo-jelitowych.	8
2. Przywracanie naturalnego składu flory układu pokarmowego po doustnym podaniu antybiotyków.	10
3. Przywracanie naturalnego składu flory układu pokarmowego zachwianego działaniem czynników stresowych.	11
4. Dieta, a bakterie kwasu mlekowego.	11
III. <u>Rozdział:</u> <u>Definicja probiotyków.</u>	13
IV. <u>Rozdział:</u> <u>Cel pracy.</u>	15
V. <u>Rozdział:</u> <u>Taksonomia bakterii kwasu mlekowego.</u>	16
1. Wprowadzenie.	16
2. Materiały.	18
3. Metody określenia przynależności rodzajowej i gatunkowej bakterii kwasu mlekowego.	18
3.1. Podstawowe metody fenotypowe.	18
3.2. Szczegółowe metody fenotypowe (biochemiczne).	20
3.3. Metody molekularne.	20
4. Wyniki wraz z omówieniem.	22
VI. <u>Rozdział:</u> <u>Antagonistyczne właściwości wybranych bakterii z rodzaju Lactobacillus.</u>	29
1. Wprowadzenie.	29
2. Materiały.	31
3. Metody określające antagonistyczne właściwości bakterii z rodzaju Lactobacillus:	33
3.1. Metoda krążkowa.	33
3.2. Metoda podwójna.	34
3.3. Metoda słupkowa.	34

4.	Wyniki wraz z omówieniem.	36
4.1.	Porównanie trzech metod badania antagonizmu. . .	36
4.2.	Badanie zakresu właściwości antagonistycznych zebranych bakterii z rodzaju <i>Lactobacillus</i>	41
VII.	<u>Rozdział: Określenie właściwości powierzchniowych badanych bakterii z rodzaju <i>Lactobacillus</i>.</u>	47
1.	Wprowadzenie.	47
2.	Materiały.	48
3.	Metody określania właściwości powierzchniowych bakterii z rodzaju <i>Lactobacillus</i>	49
3.1.	Testy hemaglutynacji.	49
3.2.	Badanie hydrofobowości powierzchni.	49
3.2.1.	Test agregacji w soli (SAT).	49
3.2.2.	Test bakteryjnego powinowactwa do ksylenu.	49
3.3.	Test na produkcję śluzu.	50
3.4.	Badania siły przylegania (adherencji) bakterii z rodzaju <i>Lactobacillus</i> do komórek ustroju ludzkiego. . .	50
3.5.	Badanie powierzchni za pomocą mikroskopu elektronowego.	51
4.	Wyniki wraz z omówieniem.	52
VIII.	<u>Rozdział: Badanie wrażliwości wybranych szczepów <i>Lactobacillus</i> na sok żołądkowy i sole żółci.</u>	57
1.	Wprowadzenie.	57
2.	Materiały.	58
3.	Metody:	58
3.1.	Oporność bakterii z rodzaju <i>Lactobacillus</i> na pH soku żołądkowego.	58
3.2.	Oporność bakterii z rodzaju <i>Lactobacillus</i> na sole żółci.	58
4.	Wyniki wraz z omówieniem.	59
IX.	<u>Rozdział: Dyskusja.</u>	60
X.	<u>Rozdział: Wnioski.</u>	66
XI.	<u>Rozdział: Streszczenie.</u>	67
XII.	<u>Rozdział: Piśmiennictwo.</u>	69

I. Rozdział: Wstęp.

Bakterie kwasu mlekowego (Lactic Acid Bacteria), w skrócie nazywane LAB, to od dawna znana grupa bakterii naturalnie zasiedlająca różne środowiska: spotkać je można w sfermentowanych produktach mlecznych, kiszonych warzywach i owocach.

U człowieka wchodzi w skład prawidłowej flory przewodu pokarmowego, narządu rodnego, oraz występują na skórze, w jamie ustnej, a także pojawiają się w mleku matki i kale niemowląt kilka dni po porodzie (Salminen i Deighton, 1992, Kasper, 1996).

Bakterie kwasu mlekowego obejmują dużą, heterogenną grupę Gram-dodatnich, katalazo-ujemnych, niesporujących bakterii. W ich skład wchodzi mało znane rodzaje *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, pewne gatunki *Streptococcus*, *Enterococcus*, rzadko spotykane *Weissella*, *Carnobacterium* i *Tetragenococcus*, a przede wszystkim rodzaj *Lactobacillus*, będący głównym przedmiotem niniejszej pracy (Klein i wsp. 1998).

Charakterystyczną cechą bakterii kwasu mlekowego jest zdolność do fermentacji węglowodanów z wytworzeniem głównie kwasu mlekowego, a ponadto, w mniejszych ilościach różnych innych, kwaśnych metabolitów, takich jak: kwas octowy, etanol, dwutlenek węgla, mrówczan, bursztynian. Jeśli produkowane są wyłącznie pochodne kwasu mlekowego, wówczas bakterie te określamy jako homofermentacyjne. Natomiast, gdy fermentacja kończy się wytworzeniem nie tylko kwasu mlekowego, ale dodatkowo innych produktów, wówczas zaliczamy takie gatunki do heterofermentacyjnych lub względnie heterofermentacyjnych (Orla-Jensen, 1919, Klein i wsp. 1998).

Od przeszło 3 tysięcy lat ludzie bezwiednie wykorzystywali fermentacyjne właściwości bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. Na przykład górale kaukascy, cieszący się dobrym stanem zdrowia, swoją codzienną dietę wzbogacali o sfermentowane produkty mleczne. Rosyjski uczyony Ilia Miecznikow w pracy opublikowanej w 1908 roku doszedł do wniosku, że zarówno doskonałe zdrowie, jak i długość życia górale ci zawdzięczają właśnie bakteriom z rodzaju *Lactobacillus*, tzw. „dobrym bakteriom” - jak je wówczas określił. Wtedy spostrzeżenia te wynikały jedynie z jego obserwacji i intuicji, nie były bowiem efektem badań naukowych (Miecznikow, 1908).

Przez ponad pół wieku intensywnego rozwoju mikrobiologii lekarskiej zupełnie zapomniano o bakterjach kwasu mlekowego. Wzrost zainteresowania składem prawidłowej flory ustroju ludzkiego, jaki nastąpił przed kilkunastu laty, w naturalny sposób spowodował gwałtowny, ilościowy przyrost doniesień naukowych, również na temat bakterii kwasu mlekowego (Salminen i wsp. 1993).

Przewód pokarmowy stanowi złożony ekosystem, którego składniki pozostają między sobą w stanie dynamicznej równowagi. U człowieka w 1 gramie treści jelitowej zawarte jest ponad 10^{11} komórek drobnoustrojów reprezentujących ponad 500 gatunków bakterii. Wraz z treścią pokarmową, codziennie do naszego organizmu wnikają znaczne liczby drobnoustrojów, z czego zdecydowana większość wydalana jest na zewnątrz w wyniku naturalnego pasażu jelitowego. Tylko niewielka część mikroorganizmów, jako tzw. lokalna flora, na stałe kolonizuje nabłonek przewodu pokarmowego.

Większość bakterii bytujących w jelicie grubym człowieka to niesporujące beztlenowce należące do rodzajów *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*. Występują tu także, w mniejszych ilościach, laseczki *Clostridium* oraz beztlenowe i tlenowe paciorkowce, głównie z grupy D (*Enterococcus*) oraz pałeczki *Enterobacteriaceae*. Tak więc laseczki z rodzaju *Lactobacillus* w przewodzie pokarmowym zdrowego człowieka nie stanowią dominującej grupy bakterii. Ich obecność jednak zarówno w górnym jak i dolnym odcinku przewodu pokarmowego, nie wyłączając śluzówki żołądka, jest uważana za szczególnie pożądaną (Finegold i wsp. 1983, Mikelsaar i Maendar, 1993).

II. Rozdział: Medyczne wykorzystanie bakterii kwasu mlekowego.

Liczba doniesień naukowych mówiących o nowych możliwościach wykorzystania bakterii z rodzaju *Lactobacillus* do celów medycznych, szczególnie w ostatnich latach, jest imponująca. Przeprowadzone badania kliniczne wykazały, że bakterie kwasu mlekowego odbudowują, a następnie utrzymują prawidłowy skład mikroflory człowieka, po zadziaaniu na niego wielu wewnętrznych i zewnętrznych czynników, do których zaliczyć możemy przede wszystkim, za Fullerm i Gibsonem (1998):

- ostre (bakteryjne, lub wirusowe) zakażenia jelitowe,
- środki farmakologiczne, w szczególności antybiotyki,
- różne postacie stresu,
- dietę.

Ze względu na zdolność do produkowania aktywnych substancji (kwasy organiczne, substancje hamujące podobne do bakteriocyn, lantynbiotyki, nadtlenek wodoru), działających antagonistycznie na większość bakterii chorobotwórczych, uważa się, że w niedalekiej przyszłości bakterie LAB mogą stać się naturalną, biologiczną alternatywą dla powszechnego i zbyt szerokiego stosowania antybiotyków, tym bardziej, że preparaty zawierające żywe bakterie kwasu mlekowego, mogą być przyjmowane bez obawy ich przedawkowania i niepożądanego, ubocznego działania (Fuller, 1991).

1. Przywracanie naturalnego składu flory przewodu pokarmowego po przebytech, ostrych zakażeniach żołądkowo-jelitowych.

Do najczęstszych czynników chorobotwórczych, wywołujących ostre zakażenia przewodu pokarmowego, zaliczyć możemy: enteropatogenne szczepy *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, różne gatunki *Shigella*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori*, oraz rotawirusy. Problem biegunek w sposób szczególny dotyczy wcześniaków, noworodków i niemowląt, ze względu na gwałtowny przebieg i ograniczone możliwości przeprowadzenia terapii antybiotykowej. Natura sama wyposażyła nas w niezwykle prężne mechanizmy, chroniące przed niekontrolowanym wzrostem chorobotwórczych bakterii przewodu pokarmowego. Oprócz enzymów zawartych w ślinie, niskiego pH soku żołądkowego, również bakterie kwasu mlekowego, stanowiące lokalną florę przewodu pokarmowego przyczyniają się do jego obrony przed zakażeniami,

wytwarzając liczne, specyficzne, antybakteryjne substancje, a także aktywnie konkurując z patogenami jelitowymi o receptory na powierzchni śluzówek przewodu pokarmowego (colonisation resistance) (Salminen i wsp. 1993).

Już w latach sześćdziesiątych podjęto pierwsze próby leczenia bakteriami kwasu mlekowego zwierząt doświadczalnych zakażonych *Salmonella enteritidis*. Wyniki były bardzo obiecujące. Zwierzęta karmione jogurtem zawierającym żywe bakterie z rodzaju *Lactobacillus*, wykazywały mniejszą śmiertelność i większe przyrosty masy ciała w porównaniu z innymi z grupy kontrolnej (cyt za: Gorbach, 1990). Kolejne badania przeprowadzono już na dzieciach hospitalizowanych z powodu ostrej biegunki, wywołanej przez enteropatogenne szczepy *Escherichia coli* odporne na szereg antybiotyków. Dzieci podzielono na dwie grupy. Jednej podawano w diecie większe ilości jogurtu zawierającego *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus lactis* i *Lactobacillus bulgaricus*, zaś drugiej - zestaw leków przeciwbiegunkowych. Wyniki jednoznacznie wskazywały, że dzieci otrzymujące wyłącznie jogurt szybciej powracały do zdrowia. Przebieg biegunki był u nich łagodniejszy, a czas jej trwania krótszy (Sandine i wsp. 1972).

W 1991r. Isolauri i współpracownicy zastosowali szczep *Lactobacillus rhamnosus* GG, w celu leczenia rotawirusowych biegunek u dzieci. Przebadano 71 dzieci w wieku 4-45 miesięcy, hospitalizowanych z powodu biegunki rotawirusowej, dzieląc je na trzy grupy. Pierwszej podano *Lactobacillus rhamnosus* GG w produktach mlecznych, drugiej grupie tę samą ilość tego samego szczepu, lecz w formie zloofilizowanej, a trzeciej jogurt zawierający inne, martwe (pasteryzowane) bakterie kwasu mlekowego. Testowane bakterie były dodawane do normalnej diety, pozbawionej wszelkich innych produktów mlecznych, dwa razy dziennie przez pięć dni. W dwóch pierwszych grupach wyraźnie zmniejszyła się częstotliwość biegunek, a przebieg ich był łagodniejszy. Autorzy sugerują więc możliwość modyfikowania przebiegu biegunek rotawirusowych drogą dodawania *Lactobacillus rhamnosus* do normalnej diety pacjentów (Isolauri i wsp. 1991).

W 1989r. Bhatia i współpracownicy opublikowali pracę, z której wynika, że w warunkach *in vitro*, bakterie z gatunku *Lactobacillus acidophilus* w sposób aktywny hamują wzrost *Helicobacter pylori*. Pojawiło się więc pytanie, czy bakterie kwasu mlekowego nie staną się w przyszłości biologiczną bronią w leczeniu chorób wrzodowych o etiologii bakteryjnej, tym bardziej, że jest to grupa bakterii, która dobrze toleruje niskie pH soku żołądkowego (Bhatia i wsp. 1989). Potwierdzeniem słuszności takiego postępowania są prace Cocconier (1998) oraz Kabira (1997) wykazujące skuteczne działanie *Lactobacillus* wobec *Helicobacter pylori* *in vivo* i *in vitro* (Cocconier i wsp. 1998; Kabir i wsp. 1997).

Black, zajmujący się praktycznym wykorzystaniem bakterii kwasu mlekowego, udowodnił, że niektóre szczepy LAB mają zdolność do znacznego łagodzenia ostrych objawów tzw. „biegunki podróżnych” - choroby dotyczącej ludzi gwałtownie zmieniających strefy geograficzne i dietę. Szacuje się, że około 6 milionów ludzi tylko w 1985 roku zostało dotkniętych tą chorobą. Wywołują ją głównie enterotoksyczne szczepy *Escherichia coli*, które po stresie związanym z podróżą i spadkiem odporności, namnażają się w jelicie człowieka, przekraczając próg chorobotwórczości (Black, 1989).

Wymieniona powyżej praca wykazała, w oparciu o kontrolowane badania kliniczne, dużą skuteczność bakterii z rodzaju *Lactobacillus* w leczeniu i profilaktyce „biegunki podróżnych”. Autorzy zalecają więc przyjmowanie zarówno przed podróżą, jak i w czasie jej trwania, jogurtów zawierających żywe bakterie kwasu mlekowego.

2. Przywracanie naturalnego składu flory układu pokarmowego po doustnym podaniu antybiotyków.

Każde podanie antybiotyków, a szczególnie tych o szerokim zakresie działania, niszczy nie tylko mikroorganizmy chorobotwórcze, ale przede wszystkim znacznie zaburza lokalną biocenozę przewodu pokarmowego. U większości pacjentów prowadzi to do wystąpienia objawów tzw. biegunki poantybiotykowej, której przebieg może być w znacznym stopniu złagodzony za pomocą bakterii z grupy kwasu mlekowego, podanych na krótko po zakończeniu kuracji antybiotykowej. Po zniszczeniu flory przez antybiotyk następuje przywieranie przyjmowanych, wyselekcjonowanych szczepów LAB do uwolnionych receptorów nabłonka jelitowego. Tym samym zmniejsza się możliwość kolonizacji jelita przez inne bakterie, chorobotwórcze dla przewodu pokarmowego (Grahm i wsp. 1996).

W ostatnich latach dużo uwagi poświęca się coraz częściej występującym, klinicznym przypadkom rzekomobłoniastego zapalenia jelita grubego. Etiologia tej jednostki chorobowej wynika z nadmiernego stosowania głównie klindamycyny, ale i innych antybiotyków, powodujących zwiększenie liczby *Clostridium difficile* i jego toksyn w jelicie grubym człowieka. Gorbach wraz z współpracownikami przez kilkanaście dni podawali *Lactobacillus rhamnosus* GG 14 pacjentom z objawami rzekomobłoniastego zapalenia jelita grubego. Po zakończonej kuracji odnotowano zarówno zmniejszenie ilości toksyn wykrywanych w kale, jak rów-

niez wyraźne złagodzenie objawów rzekomobłoniastego zapalenia jelit. Ponadto u 10 z 14 pacjentów objętych doświadczeniem nie zaobserwowano ponownego nawrotu choroby (Gorbach i wsp. 1987).

3. Przywracanie normalnego składu flory układu pokarmowego zachwanianym działaniem czynników stresowych.

Bakterie LAB przywracają normalny skład flory układu pokarmowego zaburzonego działaniem różnych czynników stresowych, do których zaliczamy między innymi radioterapię u kobiet, skierowaną głównie na okolice brzucha i miednicy. Wywołuje ona miejscowe stany zapalne w świetle jelita, objawiające się zwiększeniem ilości śluzu, podwyższeniem pH i spadkiem populacji wielu bakterii, w tym szczególnie bakterii kwasu mlekowego. Te jakościowe i ilościowe zmiany składu flory prowadzą w konsekwencji do uwolnienia się receptorów na powierzchni komórek jelita, które są następnie szybko zajmowane przez typowe, bakteryjne czynniki wywołujące ostre biegunki i inne zaburzenia żołądkowo-jelitowe. Przeprowadzone badania kliniczne wykazały, że podanie np. *Lactobacillus acidophilus* w diecie, w trakcie i po radioterapii, znacznie łagodzi dolegliwości ze strony przewodu pokarmowego (Salminen i wsp. 1988).

4. Dieta a bakterie kwasu mlekowego.

Duże zainteresowanie naukowców budzą ostatnio próby włączenia bakterii kwasu mlekowego do diety osób cierpiących na nietolerancję laktozy. Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* wytwarzają β -galaktozydazę - enzym rozkładający zawartą w mleku laktozę do D-glukozy i D-galaktozy. Działanie β -galaktozydazy polega nie tylko obniżeniu ilości laktozy w spożywanym produkcie, ale przyczynia się także do metabolizowania tego cukru w jelicie chorej osoby przez kilka godzin po spożyciu produktu, zawierającego żywe bakterie z rodzaju *Lactobacillus* (McDonough i wsp. 1987). Obecnie uważa się, że do poprawy stanu trawienia laktozy u osób cierpiących na nietolerancję tego cukru, wystarczy podawanie produktów mlecznych zawierających aktywny enzym β -galaktozydazę pochodzenia drobnoustrojowego (Kuhn i wsp. 1996).

Ponadto udowodniono, że biochemiczne przemiany różnych produktów żywnościowych zachodzące w trakcie bakteryjnego procesu fermentacji powodują:

- zwiększenie przyswajalności wolnych aminokwasów z białek pokarmowych zawartych w naszej codziennej diecie,
- zwiększenie przyswajalności takich pierwiastków jak: Ca, Zn, Fe;

- wzrost zawartości niektórych witamin.

Zaobserwowano bowiem, że warzywa poddawane procesowi fermentacji z użyciem bakterii LAB stają się bogatym źródłem wolnych pierwiastków, szybciej i łatwiej absorbowanych przez organizmy wyższe. Ponadto, dzięki tym bakteriom, zwiększa się również zawartość niektórych witamin, takich, jak ryboflawina i kwas foliowy, co może być szczególnie wykorzystywane w tzw. dietach niskokalorycznych (Conway 1989, Deguchi i wsp. 1985, Tanaka i wsp. 1980, Tottalardona i wsp. 1993).

Duże nadzieje wiąże się ostatnio z wynikami badań przeprowadzonych w warunkach *in vitro*, wykazującymi wpływ niektórych szczepów *Lactobacillus acidophilus* na dekonjugację soli żółci i asymilację cholesterolu (Walker i Gilliland, 1993). Wyniki tych doświadczeń mogły sugerować, że bakterie LAB, obecne w świetle jelita, wychwytyją cholesterol, nie dopuszczając do jego absorpcji do krwiobiegu. W trakcie dalszych, bardziej szczegółowych badań okazało się jednak, że działanie bakterii kwasu mlekowego wcale nie polega na bezpośrednim wychwytywaniu cholesterolu, lecz na ich zdolności do dekonjugacji soli żółci, których brak w świetle jelita utrudnia absorpcję cholesterolu (Klaver i van der Meer, 1993). W badaniach na zwierzętach doświadczalnych próbowano wykazać zależność pomiędzy stężeniem cholesterolu, a dietą wzbogaconą o fermentowane produkty mleczne. Obniżenie poziomu cholesterolu wykazano u szczurów (Pulusani i Rao, 1983), królików (Thakur i Jha, 1981), oraz świń (Gilliland i wsp. 1985). Bardzo ciekawą była próba obniżenia stężenia cholesterolu u kur, u których przez 48 godzin stosowano dietę wzbogaconą o zliofilizowany szczep *Lactobacillus acidophilus*. Stężenie cholesterolu obniżyło się w jajach o 18%, a w surowicy kur aż o 55% (Haddadin i wsp. 1996). Niestety, jak na razie, nie udało się uzyskać podobnie obiecujących wyników w doświadczeniach przeprowadzonych na pacjentach z podwyższonym poziomem cholesterolu. Tłumaczy się to błędami popełnionymi w trakcie przeprowadzonych badań klinicznych.

III Rozdział. Definicja probiotyków.

Trwała i ilościowo istotna obecność wybranych bakterii kwasu mlekowego w mikroflorze naszego organizmu jest zatem szalenie pożądana. Lekarze, mikrobiolodzy, oraz praktycy zajmujący się żywieniem człowieka zgodnie zalecają przyjmowanie wraz z pokarmem tylko takich bakterii kwasu mlekowego, których właściwości są bardzo dobrze poznane i ściśle zdefiniowane jako tzw. właściwości probiotyczne.

Posługując się definicją Fullera (1991) ogólnie można powiedzieć, że:

Probiotyki to żywe, bakteryjne dodatki do żywności, stymulujące i poprawiające funkcjonowanie przewodu pokarmowego gospodarza.

Wymagania stawiane szczepom probiotycznym są bardzo wysokie; a mianowicie powinny one:

1. pochodzić ze zdrowej mikroflory ludzkiego organizmu,
2. posiadać precyzyjnie określony rodzaj i gatunek, potwierdzony najnowszymi badaniami molekularnymi,
3. wykazywać wyjątkową, antagonistyczną aktywność wobec typowych patogenów przewodu pokarmowego,
4. posiadać zdefiniowane właściwości powierzchniowe i adherencyjne, potwierdzone za pomocą badań przeprowadzonych przy użyciu hodowli tkankowej,
5. wykazywać oporność na sok żołądkowy i sole żółci,
6. potwierdzać swoje probiotyczne działanie w prawidłowo przeprowadzonych badaniach klinicznych.

Na świecie jest zaledwie kilkanaście, dobrze scharakteryzowanych szczepów probiotycznych, z czego większość należy do grupy bakterii kwasu mlekowego. (Tabela1). Probiotyki są szczególnie rozpowszechnione w niektórych, wysoko rozwiniętych krajach. Tak na przykład w Japonii od lat stosuje się preparat parafarmaceutyczny pod nazwa handlową Yacult, który zawiera szczepy *Lactobacillus casei* o ściśle zdefiniowanych właściwościach, potwierdzonych badaniami klinicznymi.

W USA i Finlandii w powszechnym użyciu są różne preparaty probiotyczne zawierające *Lactobacillus rhamnosus*, nazwany inicjałami swojego odkrywcy Goldina Gorbacha, *Lactobacillus GG*.

W Polsce jak do tej pory mało wiadomo na temat probiotyków, a preparaty krajowe, dostępne w naszych aptekach zawierają szczepy z rodzaju *Lactobacillus* o wątpliwych i słabo zdefiniowanych właściwościach probiotycznych.

Tabela 1 Szczepy drobnoustrojów o właściwościach probiotycznych zastosowane w praktyce.

Szczep	Działania udokumentowane badaniami klinicznymi
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LC1	Stymulacja odpowiedzi immunologicznej, działanie adjuwancyjne w szczepionkach doustnych, adhezja do nabłonka jelita ludzkiego, ustalanie równowagi mikroflory jelitowej
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFO 1748	Zapobieganie biegunkom i innym niepożądanym działaniom po radioterapii i po leczeniu antybiotykami, leczenie zaparć, obniżanie poziomu enzymów w kale
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	Leczenie i zapobieganie biegunkom po zakażeniach rotawirusami, leczenie nawrotowych biegunek spowodowanych przez <i>Clostridium difficile</i> , zapobieganie ostrym biegunkom bakteryjnym, łagodzenie przebiegu choroby Crohn'a, antagonistka bakterii związanych z próchnicą zębów, zapobieganie nawrotowym zapaleniom pochwy
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	Hamujący wpływ na rozwój powierzchniowego raka pęcherza i jelita grubego
<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Brak wyraźnego działania przeciwbiegunkowego, brak stymulacji układu odpornościowego, brak wpływu na enzymy kałowe
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Leczenie biegunki rotawirusowej, przywracanie równowagi flory jelitowej, właściwości przeciwwrzodowe, eliminacja <i>Helicobacter pylori</i>
<i>Bifidobacterium breve</i>	Właściwości przeciwwrzodowe
<i>Lactobacillus gasseri</i> (ADH)	Obniżanie poziomu enzymów kałowych, kolonizacja przewodu pokarmowego
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Kolonizacja przewodu pokarmowego
<i>Saccharomyces boulardi</i>	Zapobieganie biegunkom podróźnych, zapobieganie i leczenie biegunek spowodowanych przez <i>C. difficile</i>
Mieszanina <i>L. casei</i> GR-1 i <i>L. Fermentum</i> B-54	Adhezja do ludzkiego nabłonka moczowego, zapobieganie nawrotowym zapaleniom dróg moczowych
Mieszanina <i>L. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>S. thermophilus</i> i <i>L. bulgaricus</i>	Zapobieganie biegunkom

IV. Rozdział: Cel pracy.

Celem niniejszej pracy było utworzenie kolekcji szczepów *Lactobacillus*, a następnie dokonanie wyboru tych z nich, które spełniałyby warunki stawiane probiotykom nowej generacji.

Przy realizacji powyżej obranego celu posłużono się kolejno postępującymi etapami selekcji:

1. Bakteriom kwasu mlekowego określono dokładną przynależność taksonomiczną.
2. Szczepom bakterii tylko z rodzaju *Lactobacillus*, wybranym w pierwszym etapie, oznaczono właściwości antagonistyczne.
3. Najbardziej aktywne szczepy zostały poddane szczegółowej charakterystyce pod kątem cech powierzchniowych i adherencyjnych.
4. Szczepom z rodzaju *Lactobacillus*, wybranym w trzecim etapie, oznaczono stopień oporności na pH soku żołądkowego i sole żółci.

Obrany powyżej sposób postępowania miał na celu stopniowe zawężenie liczby badanych szczepów z rodzaju *Lactobacillus*, a następnie dokonanie wyboru tych z nich, które w sposób optymalny spełniałyby wymagania stawiane bakteriom probiotycznym.

Zatem niniejsza rozprawa składa się z czterech odrębnych tematów przedstawionych w formie samodzielnych rozdziałów, zakończonych wspólną dyskusją.

V. Rozdział: Taksonomia bakterii kwasu mlekowego.

1. Wprowadzenie.

Rodzaj *Lactobacillus* obejmuje bakterie Gram-dodatnie, katalazo-ujemne, niesporujące o wydłużonym, laseczkowatym kształcie, niekiedy zbliżonym bardziej do pałeczek, a nawet do kulistych ziarenkowców. Ich kształt jest uzależniony od fazy wzrostu komórek, podłoża wzrostowego i poszczególnych gatunków. W warunkach naturalnych są w stanie namnażać się w środowisku roślinnym i zwierzęcym w temperaturze od 20° do 53° C (optymalna temperatura wynosi 30° - 40° C), najchętniej na podłożu bogatym w węglowodany, o dużym zakwaszeniu, wynoszącym optymalnie około pH 5.0. Jednak równie dobrze znoszą bardzo niskie pH soku żołądkowego wynoszące 1.5, skąd były izolowane.

Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* rosną w warunkach tlenowych, beztlenowych, jak i mikroaerofilnych (w atmosferze z zawartością 5% dwutlenku węgla). Według podstawowego podręcznika klasyfikacji bakterii Bergey'a (Sneath, 1986) gatunek *Lactobacillus* podzielono na trzy podstawowe grupy: *Thermobacterium*, *Streptobacterium* i *Betabacterium*.

Thermobacterium - (bezwzględnie homofermentacyjne) rosną w temperaturze 15°C, nie produkują gazu z glukozy. Rozkładają 6-węglowe cukry wytwarzając jedynie kwas mlekowy. W grupie *Thermobacterium* możemy wyróżnić następujące, podstawowe gatunki: *Lactobacillus delbrueckii*, *L. bulgaricus*, *L. lactis*, *L. leichmanii* - ich DNA jest homologiczne w 80%. Oprócz nich można w tej grupie wydzielić drugi kompleks, do którego zalicza się takie gatunki jak: *Lactobacillus acidophilus*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*. Zgodność ich DNA nie jest tak wyraźna, co zdecydowanie utrudnia klasyfikację.

Streptobacterium - (gatunki względnie heterofermentacyjne) rosną już w temperaturze 15°C. Produkują, lub też nie, gaz z glukozy, gdyż fermentację przeprowadzają w dwojaki sposób. Podobnie jak *Thermobacterium* rozkładają 6-węglowe cukry tylko do kwasu mlekowego, lub (podobnie jak *Betabacterium*) rozkładają je do kwasu mlekowego, octowego, etanolu i dwutlenku węgla. Podstawowe gatunki, które ze względu na podobieństwo zostały zaliczone do tej grupy to: *Lactobacillus plantarum*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. pseudoplantarum*, a ponad to *L. sake* i *L. curvatus*. Jest to jednak grupa zdecydowanie niejednorodna.

Betabacterium - (bezwzględnie heterofermentacyjne) - do tej grupy zaliczamy gatunki *Lactobacillus* o różnych wymaganiach temperaturowych, które produkują gaz z glukozy, gdyż fermentują heksozy z wytworzeniem kwasu mlekowego,

kwasu octowego, etanolu i dwutlenku węgla, zaś pentozy do kwasu mlekowego i octowego. Jednymi z ważniejszych gatunków zaliczanych do tej grupy są *Lactobacillus reuteri*, czy *L. fermentum*.

Ta tradycyjna klasyfikacja, oparta jedynie na cechach fenotypowych, okazała się być nie wystarczającą do szczegółowego rozróżniania gatunków *Lactobacillus* występujących w ustroju ludzkim. Dlatego też w ostatnich latach rozwinięto badania taksonomiczne z zastosowaniem metod molekularnych. Podstawę do różnicowania gatunków stanowi badanie homologii DNA na podstawie hybrydyzacji DNA-DNA (Kandler i Weiss, 1986). Do metod najczęściej stosowanych w praktyce należy zaliczyć hybrydyzację z zastosowaniem swoistej sondy DNA skierowanej na pewne sekwencje genomu badanej komórki. Ta metoda umożliwia wykorzystywanie tylko swoistych, krótkich sekwencji zamiast całego genomu. W ten sposób można uniknąć preparatyki DNA i przeprowadzać hybrydyzację nawet bakterii rosnących w formie kolonii. Obecnie najczęściej wykorzystuje się sondy skierowane wobec 16S lub 23S rRNA, gdyż te cząsteczki zawierają najbardziej konserwatywne sekwencje w całym genomie bakterii i występują w komórce w licznych kopiach. Zastosowano je w celu różnicowania *Lactobacillus* z różnych nisz ekologicznych (Hertel i wsp. 1991, Hensiek i wsp. 1992), czy odróżniania od siebie nowych gatunków w obrębie dawnego kompleksu *Lactobacillus acidophilus*, który obecnie zawiera następujące gatunki: *L. acidophilus sensu stricto*, *L. crispatus*, *L. amylovorus*, *L. gallinarum*, *L. gasseri* i *L. johnsonii* (Klein i wsp. 1998).

2. Materiały.

W celu utworzenia kolekcji szczepów bakterii kwasu mlekowego pochodzących z normalnej flory ludzkiego organizmu nawiązano współpracę z dwoma ośrodkami. Były nimi: Oddział Ginekologii i Położnictwa Zespołu Zakładów Opieki Zdrowotnej Zarządu Służby Zdrowia Ministerstwa Spraw Wewnętrznych i Administracji Kraju w Krakowie, oraz Przychodnia Ginekologiczna Zespołu Opieki Zdrowotnej dla Szkół Wyższych w Krakowie.

Kwalifikacji kobiet i dzieci, od których pobierano wymazy, dokonywał lekarz na podstawie oceny ich stanu zdrowia i przeprowadzonego wywiadu, wykluczając te osoby, u których wcześniej przeprowadzono kurację antybiotykową.

Materiałami, z których dokonywano izolacji bakterii kwasu mlekowego były: kał zdrowych noworodków karmionych mlekiem matki, oraz wymazy z pochwy zdrowych kobiet. Pobierano je na specjalne podłoża transportowe (Port-A-Cul firmy BBL) i w ciągu 24 godzin wysiewano po wieloboku na stałe, standardowe podłoże wzrostowe MRS (Rogosa i wsp. 1951). W skład tego podłoża wchodził wyciąg mięsny, wyciąg drożdżowy, glukoza, Tween 80 i składniki buforujące. Posiane płytki MRS inkubowano przez 24-72 godziny w temperaturze 37°C w warunkach ściśle beztlenowych, z wykorzystaniem anaerostatów firmy bioMerieux z generatorami gazu o składzie $H_2 + CO_2$ firmy Linegal Chemicals GmbH.

Na agarowym podłożu MRS typowe bakterie kwasu mlekowego wyrastały w postaci białych, szarych, a czasami kremowych kolonii z połyskiem. Bakterie te w oparciu o kilka podstawowych metod fenotypowych wstępnie klasyfikowano jako należące do rodzaju *Lactobacillus*, a następnie poddano je dalszej, szczegółowej identyfikacji gatunkowej na podstawie cech biochemicznych. Ponadto przynależność taksonomiczna wybranych szczepów *Lactobacillus* została zweryfikowana za pomocą hybrydyzacji DNA/DNA.

3. Metody określania przynależności rodzajowej i gatunkowej bakterii kwasu mlekowego.

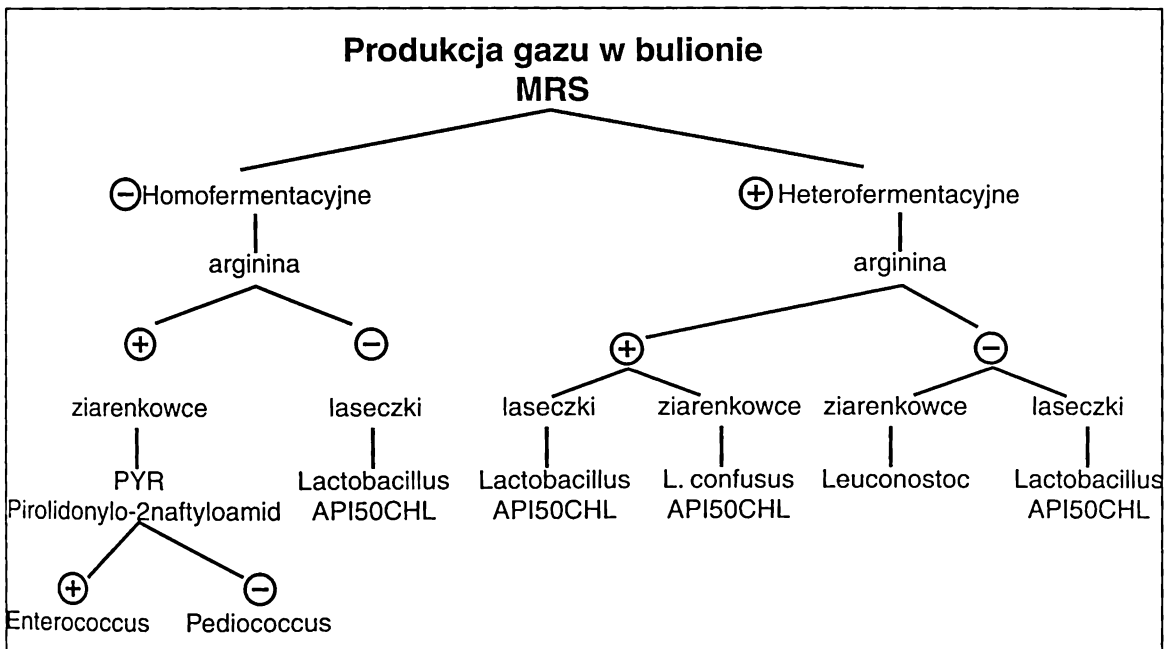
3.1. Podstawowe metody fenotypowe.

W celu oznaczenia przynależności badanych bakterii do rodzaju *Lactobacillus* posłużono się uproszczonym schematem klasyfikacji wg. Mackey'a i wsp. (1993), który opierał się o następujące własności fenotypowe:

- morfologię mikroskopową. Oceniano ją na podstawie preparatów barwionych metodą Grama i nie barwionych, oglądanych w mikroskopie kontrastowo-fazowym,

- test na obecność katalazy. Na kolonie badanych szczepów, wyrosłe na stałym podłożu MRS, nalewano po kropli świeżo przygotowanego roztworu wody utlenionej (3%) i oceniano produkcję gazu,
- test na wykrywanie produkcji gazu z glukozy. Przeprowadzono go hodując w temperaturze 37°C badane szczepy w probówkach z płynnym podłożem MRS, zawierającym rurki Durhama. Wydzielany gaz gromadził się w rurkach po upływie 24 godzin,
- hydroliza argininy. Badanie to przeprowadzono hodując szczepy *Lactobacillus* na bulionie MRS zawierającym 1%-argininy i czerwień fenolową jako wskaźnik. Po upływie 24 godzin inkubacji szczepy hydrolizujące argininę zmieniały kolor podłoża na żółty,
- zdolność do wzrostu w 15°C. Badane szczepy hodowano na bulionie MRS w specjalnym inkubatorze o stałej temperaturze 15°C przez 72 godziny, oceniając wzrost jako zmętnienie podłoża.

Rycina 1. Podstawowy schemat klasyfikacji bakterii kwasu mlekowego wg. Mackey'a



3.2. Szczegółowe metody fenotypowe (biochemiczne).

Właściwości biochemiczne bakterii z rodzaju *Lactobacillus* określono za pomocą testów wykazujących fermentację 50 cukrów i aminocukrów. W tym celu posłużono się gotowym zestawem testów API 50 CHL firmy bioMerieux. Test ten przeprowadzono zgodnie z zaleceniem producenta, a wyniki analizowano za pomocą komputerowego systemu, przeznaczonego do klasyfikacji bakterii kwasu mlekowego Apilab Plus, opracowanego również przez firmę bioMerieux (API System, La Balme les Grottes, Francja).

Metody fenotypowe pozwoliły na pogrupowanie zebranych szczepów w gatunkowo i rodzajowo zgodne zbiory, z których wybrano po kilku przedstawicieli w celu potwierdzenia poprawności tej klasyfikacji przy użyciu metod biologii molekularnej. Ponadto w celu określenia homogenności zebranych szczepów wykonano analizę dendrytyczną opartą na 50 cechach uzyskanych w trakcie badań za pomocą testów API 50 CHL. W tym celu zastosowano metodę eliminacji wektorów przystosowaną do obiektów opisywanych przez cechy jakościowe (Pociecha i wsp. 1988).

3.3. Metody molekularne.

Wybrane szczepy *Lactobacillus* reprezentujące różne grupy taksonomiczne, odpowiadające gatunkom określonym za pomocą metod fenotypowych, poddano kontrolnemu badaniu przynależności taksonomicznej za pomocą hybrydyzacji DNA metodą dot-blot. W tym celu z badanych szczepów wyekstrahowano chromosomowe DNA za pomocą trawienia lizozymem i proteinazą K i precypitacji izopropanolem. Chromosomowe DNA badanych szczepów umieszczone na filtrach nylonowych podawano hybrydyzacji ze znakowaną digoksygeniną sondą DNA skierowaną przeciwko konserwatywnym fragmentom DNA szczepów wzorcowych, a produkt hybrydyzacji obserwowano za pomocą zestawu do chemiluminescencji i rejestrowano na błonie filmowej (Lucchini i wsp. 1999). Badania przeprowadzono w Instytucie Mikrobiologii Wydziału Rolnego Katolickiego Uniwersytetu w Piacenza we Włoszech dzięki współpracy z Panem Profesorem Lorenzo Morellim.

Analizę polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) genów rRNA niektórych szczepów *Lactobacillus* przeprowadzono za pomocą metody sond oligonukleotydowych o sekwencjach komplementarnych do rybosomalnego RNA. W celu uzyskania charakterystycznych dla danego szczepu fragmentów restrykcyjnych, wyizolowany, genomowy DNA poddano trawieniu enzymem restrykcyjnym Hind III. Powstałe fragmenty DNA rozdzielono elektroforetycznie, a następnie

przeniesiono na filtr nylonowy i poddano hybrydyzacji przez noc w temperaturze 68°C z fragmentem 16S rDNA wyznakowanym digoksygeniną - 11 - dUTP. Wynik hybrydyzacji uwidoczniło na kliszy rentgenowskiej (Zakrzewska - Czerwińska i wsp. 1992). Badania przeprowadzono w Zakładzie Mikrobiologii Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu dzięki uprzejmości Pani Docent J. Zakrzewskiej - Czerwińskiej.

4. Wyniki wraz z omówieniem.

4.1. W hodowlach pobranych materiałów prowadzonych na selektywnym agarze MRS stwierdzano obecność kolonii typowych dla bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. W wielu przypadkach dalsze posiewy pojedynczych kolonii uzyskanych z hodowli wyjściowej, ujawniły obecność wariantów różniących się zabarwieniem, a niekiedy także i wielkością kolonii. Można było również zaobserwować pojedyncze kolonie składające się z sektorów o różnym zabarwieniu i powierzchni (Rycina 2). Zjawisko to uwidaczniało się najczęściej po hodowli trwającej nie krócej niż 72 godziny. Aby uzyskać czyste hodowle szczepów o jednorodnej morfologii kolonii, kilkakrotnie powtarzano próbę rozdzielania szczepów, rozsiewając je po wieloboku, aż do momentu uzyskania jednorodnej hodowli, którą zamrażano.

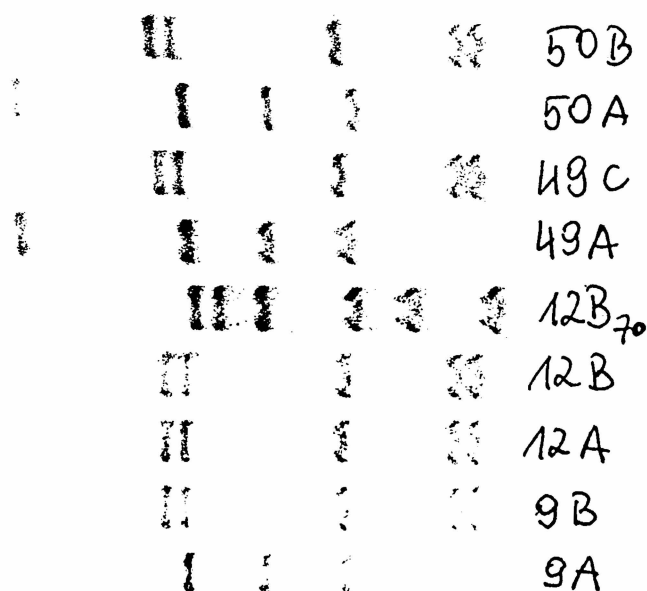
Proces mrożenia szczepów w -70°C okazał się być równocześnie metodą sprawdzającą prawidłowe rozdzielanie mieszaniny form morfologicznych. Zauważono bowiem, że pewne hodowle szczepów, które wydawały się być homogenne, po zamrożeniu do -70°C i rozmrożeniu, ponownie ujawniały swoją morfologiczną różnorodność. Prawdopodobnie zarówno czynnik fizyczny, jakim było mrożenie, i/lub chemiczny, jakim był dodatek 10% glicerolu do podłoża służącego do przechowywania szczepów, w sposób istotny wpływały na powierzchnie bakterii, rozrywając ich wzajemne wiązania i rozluźniając zwarty kompleks.

Rycina 2. Kolonie *Lactobacillus* wykazujące zjawisko koagregacji.



4.2. Aby sprawdzić, czy morfologicznie różne kolonie należą na pewno do dwóch lub więcej, odmiennych genetycznie szczepów *Lactobacillus*, czy też reprezentują warianty morfologiczne tego samego klonu, wybranym parom szczepów wykonano analizę polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RLFP) genów rRNA. Wyniki jednoznacznie wykazały, że szczepy oznaczone tym samym numerem, a różniące się zabarwieniem kolonii (tzw. „żółte” lub „białe”), charakteryzują się odmiennym układem prążków, co potwierdza ich różną strukturę genetyczną (Rycina 3). Tak więc były one traktowane jako osobne szczepy, co wyróżniano literami następującymi po liczbie oznaczającej numer kolejnej hodowli wyjściowej.

Rycina 3. Analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RLFP) genów rRNA wybranych par szczepów *Lactobacillus*



4.3. Badanie przynależności taksonomicznej wyizolowanych szczepów bakterii kwasu mlekowego za pomocą podstawowego schematu identyfikacyjnego wykazało, że spośród 115 szczepów tylko 19 nie należało do rodzaju *Lactobacillus* (Tabela 2).

Tabela 2. Wstępne badanie przynależności taksonomicznej wyizolowanych szczepów bakterii kwasu mlekowego za pomocą podstawowego schematu różnicującego.

Rodzaj	Grupa	Liczba szczepów
Lactobacillus	I. Thermobacterium - bezwzględnie homofermentacyjne	31
Lactobacillus	II. Streptobacterium - względnie heterofermentacyjne	19
Lactobacillus	III. Betabacterium - bezwzględnie heterofermentacyjne	46
Leuconostoc		2
niezidentyfikowane		17
Razem		115

Zdecydowana większość szczepów należała do wszystkich trzech grup *Lactobacillus*.

Natomiast identyfikacja gatunkowa przeprowadzona za pomocą 50 odczynów fermentacji cukrów i aminocukrów dała odmienny obraz (Tabela 3), wskazujący na rozbieżności pomiędzy zastosowanymi metodami, jako że aż 77 szczepów zakwalifikowanych do gatunków *L. rhamnosus*, *L. plantarum* i *L. paracasei* musiałyby należeć do grupy *Streptobacterium*, podczas, gdy szczepów należących do tej grupy oznaczonych według metody podstawowej było tylko 19. Ponadto aż 36 szczepów nie udało się w pewny sposób zakwalifikować do żadnego z gatunków rodzaju *Lactobacillus*. Takie rozbieżności pomiędzy metodami opartymi na badaniu cech fenotypowych są stwierdzane przez autorytety w dziedzinie taksonomii bakterii kwasu mlekowego (Klein i wsp. 1998, Kandler i Weiss, 1986), co powoduje konieczność weryfikacji przynależności taksonomicznej szczepów *Lactobacillus* o cechach probiotycznych za pomocą metod molekularnych.

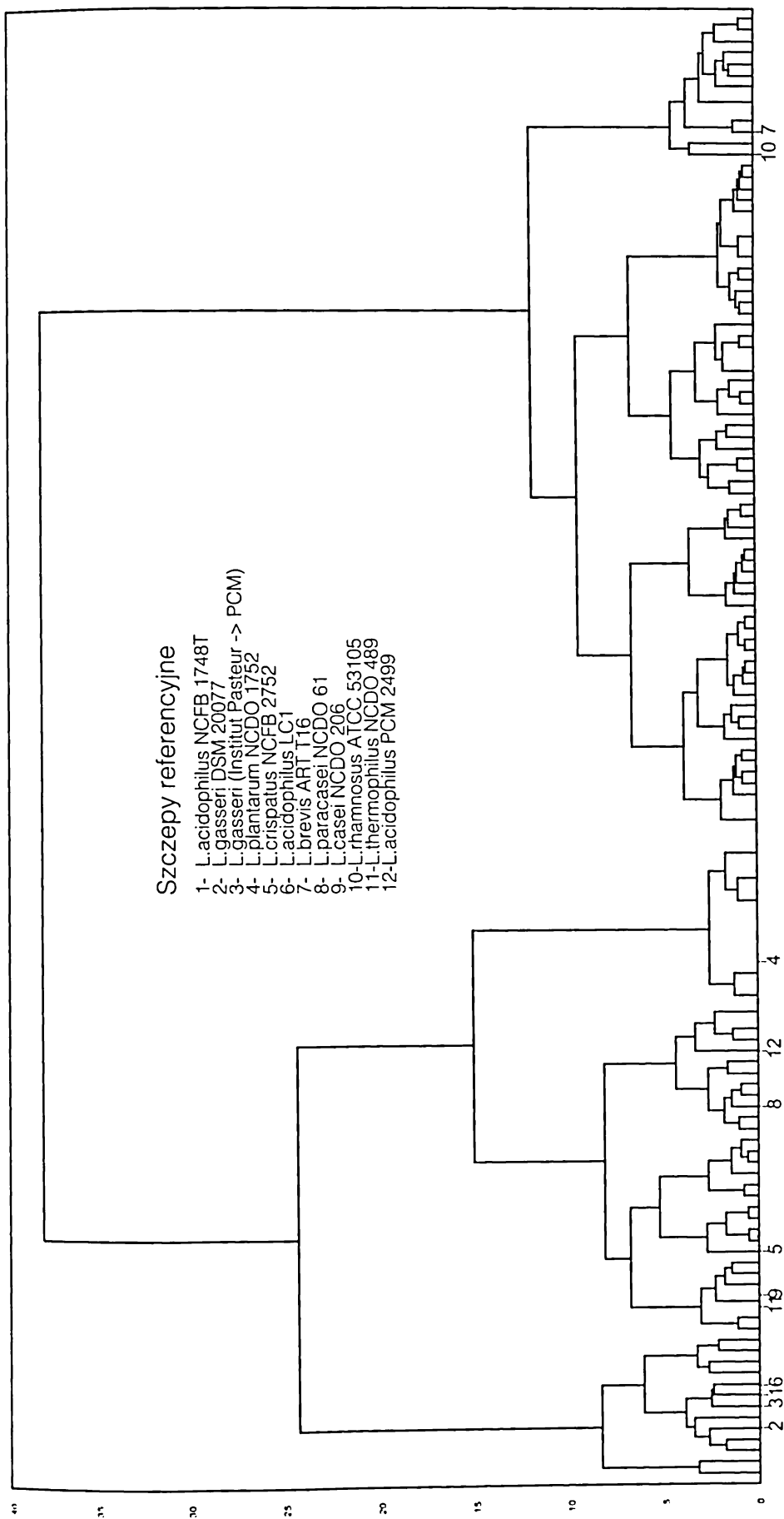
Tabela 3. Klasyfikacja badanych szczepów *Lactobacillus* za pomocą zestawów API 50 CHL

Gatunek	Liczba szczepów
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	40
<i>Lactobacillus plantarum</i>	32
<i>Lactobacillus paracasei</i>	5
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1
niezidentyfikowane gatunki <i>Lactobacillus</i>	36
Razem	112

4.4. Traktując wynik fermentacji każdego z 50 cukrów występujących w zestawie API 50 CHL jako niezależną, jakościową cechę różnicującą, wykonano analizę pokrewieństwa pomiędzy badanymi szczepami *Lactobacillus* za pomocą metody dendrytycznej (rycina 4).

Uzyskany dendrogram wskazuje na znaczną homogenność badanych szczepów, podzielonych na dwa wyraźnie różne, dominujące zespoły, które mogą reprezentować rzeczywiste gatunki *Lactobacillus*.

4.5. Jak wynika z badań potwierdzających pozycję taksonomiczną wybranych szczepów metodą hybrydyzacji DNA, szczepy *Lactobacillus* reprezentujące największe, homogenne zespoły w analizie podobieństwa opartej na metodach fenotypowych, należały do kilku różnych gatunków *Lactobacillus*, jak uwidoczniło to w Tabeli 4.



Rycina 4. Dendrogram przedstawiający rozkład podobieństwa wybranych szczepów *Lactobacillus* w oparciu o cechy biochemiczne (API 50 CHL)

Tabela 4. Wyniki badania przynależności gatunkowej wybranych szczepów *Lactobacillus* metodą hybrydyzacji DNA/DNA

Szczep Nr:	Gatunek	Pochodzenie
7A	<i>L.fermentum</i>	pochwa ludzka
7B	<i>L.plantarum</i>	pochwa ludzka
9A	<i>L.fermentum</i>	pochwa ludzka
9B	<i>L.plantarum</i>	pochwa ludzka
12A	<i>L.gasseri</i>	pochwa ludzka
12B	<i>L.fermentum</i>	pochwa ludzka
12C	<i>L.fermentum</i>	pochwa ludzka
42A	<i>L.fermentum</i>	pochwa ludzka
42B	<i>L.casei</i>	pochwa ludzka
49A	<i>L.salivarius</i>	pochwa ludzka
49B	<i>L. acidophilus</i>	pochwa ludzka
49C	<i>L.fermentum</i>	pochwa ludzka
65A	<i>L.fermentum</i>	pochwa ludzka
71A	<i>L.plantarum</i>	pochwa ludzka
78A	<i>L.plantarum</i>	pochwa ludzka
78B	<i>L.fermentum</i>	pochwa ludzka
96	<i>L.plantarum</i>	pochwa ludzka
133A	<i>L.fermentum</i>	pochwa ludzka
133B	<i>L.fermentum</i>	pochwa ludzka
KL20B	<i>L. acidophilus</i>	jelito noworodka
KL37C	<i>L.rhamnosus</i>	jelito noworodka
KL53A	<i>L.rhamnosus</i>	jelito noworodka
KL59D	<i>L.paracasei</i>	jelito noworodka

4.6. Przeprowadzona klasyfikacja taksonomiczna bakterii z rodzaju *Lactobacillus* pozwoliła również zanalizować częstość występowania poszczególnych gatunków tego rodzaju w dwóch ekosystemach ludzkiego organizmu: przewodzie pokarmowym noworodków i pochwie kobiet. W przewodzie pokarmowym częściej niż inne gatunki z rodzaju *Lactobacillus* występowały: *Lactobacillus rhamnosus*, *L. acidophilus* i *L. paracasei*. Natomiast w składzie mikroflory pochwy dominowały następujące gatunki: *Lactobacillus fermentum*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. salivarius* i *L. acidophilus*.

Lactobacillus acidophilus był gatunkiem izolowanym z dużo mniejszą częstotliwością niż należałoby tego oczekiwać, opierając się na tradycyjnych poglądach o jego udziale w biocenozie pochwy. Może to wynikać albo ze zmiany metod i kryteriów oznaczania tego gatunku, lub też z przemian zachodzących w mikroflorze pochwy pod wpływem wielu czynników, także i cywilizacyjnych.

VI. Rozdział. Antagonistyczne właściwości wybranych bakterii z rodzaju Lactobacillus.

1. Wprowadzenie:

W organizmie zdrowego człowieka, bakterie zasiedlające tę samą niszę ekologiczną wyznaczają między sobą pewien stan równowagi. Aby nie dopuścić do niekontrolowanego, liczbowego przyrostu jednych drobnoustrojów względem drugich, bakterie produkują liczne substancje chemiczne, działające jak inhibitory wzrostu innych mikroorganizmów (Tagg i wsp. 1976). Do substancji tych zaliczyć możemy:

- I. niskocząsteczkowe produkty metabolizmu takie jak amoniak, nadtlenek wodoru, kwas mlekowy, kwas octowy,
- II. tak zwane „klasyczne” antybiotyki, jak bacytracyna i polimyksyna B, syntetyzowane na drodze wieloenzymatycznych szlaków metabolicznych,
- III. małe peptydy o działaniu antybiotycznym syntetyzowane w rybosomach jako prekursorzy i następnie modyfikowane posttranslacyjnie (np. lantyny i mikrocyliny),
- IV. białkowe antybiotyki o ciężarze cząsteczkowym rzędu około 50.000-100.000 daltonów, które obecnie są określane jako bakteriocyny (np. kolicyny),
- V. enzymy bakteriolityczne typu muramidazy (np. enzymy typu lizozymu),
- VI. białkowe egzotoksyny (np. hemolizyny, lecytynazy),
- VII. defektywne cząsteczki bakteriofagów (niektóre pyocyny).

Szczególne bogactwo tych aktywnych substancji uwidacznia się wśród populacji bakterii zasiedlających nisze ekologiczne o dużej, zarówno jakościowej, jak i ilościowej liczbie drobnoustrojów. W licznych publikacjach zajmujących się tym zagadnieniami, dużo uwagi poświęca się takim substancjom, które w swoim antybakteryjnym działaniu przypominają działanie antybiotyków, takie jak np. bakteriocyny, czy substancje hamujące, podobne do bakteriocyn.

Bakteriocyny produkowane są głównie przez bakterie Gram-ujemne jako aktywne biologicznie, białkowe substancje działające na blisko spokrewnione szczepy tego samego rodzaju, a nawet gatunku. Dzięki obecności swoistych receptorów na powierzchni wrażliwych bakterii dochodzi do adsorpcji ściśle określonych bakteriocyn, które wytwarzają pory w ścianie komórkowej bakterii, przez które wypływają niskocząsteczkowe substancje, takie jak elektrolity zawar-

te w cytoplazmie, co w konsekwencji prowadzi do zniszczenia komórki. Szczepy wytwarzające bakteriocyny mają jednocześnie geny zabezpieczające je przed samounicestwieniem (Hoover i Steenson, 1993).

Bakterie Gram-dodatnie również produkują pewne substancje hamujące, przy czym nie posiadają one cech bakteriocyn, gdyż są peptydami działającymi w dużo szerszym zakresie, niż obręb tego samego rodzaju, czy gatunku, a ponadto nie wymagają obecności swoistych receptorów na powierzchni wrażliwych bakterii. Dlatego też Tagg (1991) zaproponował nazwać je „substancje hamujące podobne do bakteriocyn” (BLIS=bakteriocin-like inhibitory substances).

Bakterie kwasu mlekowego kolonizując przewód pokarmowy w sposób naturalny, zmuszone zostały również do wykształcenia szeregu właściwości, ułatwiających im kontrolowanie innych, konkurencyjnych populacji drobnoustrojów, przy czym siła tego oddziaływania jest różna dla różnych bakterii kwasu mlekowego (Ballongue, 1993). We wcześniejszej literaturze poświęconej bakteriom kwasu mlekowego uważano, że antybakteryjne właściwości tych bakterii w głównej mierze wynikają z produkcji bakteriocyn, jednak ze względu na fakt, że są to bakterie Gram-dodatnie, określenie bakteriocyny zastępuje się obecnie pojęciem BLIS. Są to substancje hamujące podobne do bakteriocyn produkowane przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus*, które zostały częściowo scharakteryzowane jako małe lub duże peptydy, a nawet białka, czy też lantynybiotyki. Lantynybiotyki (np. nizyna, lactocin S) to małe peptydy zawierające aminokwasy posiadające wbudowane atomy siarki (lantionina i beta-metylo-lantionina) (Hoover i Steenson 1993, Sahl, 1991). Ich zakres działania jest stosunkowo wąski, ograniczony do tego samego lub pokrewnych gatunków, ale kilka z nich wykazuje działanie na *Staphylococcus aureus*, *Clostridium* i *Enterococcus* (lactacin F, plantaricin A). Absolutna większość scharakteryzowanych substancji hamujących produkowanych przez *Lactobacillus* pochodzi z szczepów wyizolowanych z żywności, szczególnie warzyw i owoców, zatem wydaje się mieć znaczenie dla bakterii zasiedlających nisze glebowe i roślinne (Klaenhammer i wsp. 1991).

Oprócz powyżej wymienionych substancji, bakterie z rodzaju *Lactobacillus* produkują szereg aktywnych metabolitów, takich jak: kwas mlekowy, octowy i inne bliżej nieokreślone kwasy tłuszczowe, oraz nadtlenuk wodoru (Ballongue i wsp. 1993, Yang i wsp. 1997).

Produkcja nadtlenuku wodoru była rozważana jako mechanizm hamowania patogennej flory bakteryjnej pochwy przez bytujące w tej samej niszy ekologicznej bakterie z rodzaju *Lactobacillus*. Bakterie te ze względu na brak katalazy, mogły akumulować w otaczającym środowisku nie rozłożony nadtlenuk wodoru.

Mechanizm działania nadtlenu wodoru miał polegać na niszczącym wpływie uwolnionych rodników tlenowych (Kandler i Weiss, 1986). Według innej hipotezy (Jack i wsp. 1990), nadtlenek wodoru powinien powodować redukcję tiocyjanów zawartych w płynach tkankowych do hipotiocyjanów, które są toksyczne dla wielu drobnoustrojów. W ostatnich latach udział nadtlenu wodoru w mechanizmach antagonizacyjnych *Lactobacillus* nie jest przedmiotem szczególnej uwagi.

2. Materiały.

Materiałem do badań były bakterie z rodzaju *Lactobacillus* przechowywane w temperaturze -70°C na szklanych kulkach zawieszonych w płynnym podłożu MRS z dodatkiem 10% glicerolu. W trakcie rozmrażania kulki (4-5) z opłaszczonym na nich szczepem *Lactobacillus* przenoszono na płytki ze stałym podłożem MRS, a następnie inkubowano je w temperaturze 37°C , w warunkach ściśle beztlenowych z wykorzystaniem anaerostatów firmy bioMerieux z generatorami gazu $\text{H}_2 + \text{CO}_2$ firmy Lineal Chemicals GmbH. Po upływie 72 godzin pojedyncze kolonie *Lactobacillus* zawieszano w 2,5 ml płynnego podłoża MRS i dalszą, 18 godzinną inkubację przeprowadzano w tych samych, powyżej opisanych warunkach. Ponadto posłużono się, jako wzorcami, następującymi szczepami: *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus acidophilus* LC1, *Lactobacillus casei* Shirota, a także wykorzystano inne szczepy *Lactobacillus* zaliczone do bakterii produkcyjnych.

Tak przygotowane bakterie z rodzaju *Lactobacillus*, określane jako tzw. bakterie antagonizyczne testowano wobec wybranych drobnoustrojów wskaźnikowych.

Grupę drobnoustrojów wskaźnikowych stanowiły tlenowe i beztlenowe czynniki patogene ludzkiego przewodu pokarmowego. Do tlenowych bakterii wskaźnikowych, zaliczono Gram-ujemne pałeczki: *Salmonella enteritidis*, *Shigella sonnei* i enteropatogeny szczep *Escherichia coli*, wywołujące ostre biegunki i inne dolegliwości ze strony przewodu pokarmowego. Pałeczki pochodziły z kolekcji zebranej w latach 1995/96 w Państwowym Zakładzie Higieny. Ponadto do tlenowych bakterii wskaźnikowych zaliczono również Gram-dodatnie ziarenkowce: *Staphylococcus aureus* i *Enterococcus faecalis*, pochodzące z kolekcji własnej Instytutu.

Beztlenową grupę bakterii wskaźnikowych stanowiły: *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Helicobacter pylori* i *Clostridium difficile*, pochodzące z materiałów klinicznych badanych w trakcie bieżącej diagnostyki Zakładu Mikrobio-

logii Centrum Zdrowia Dziecka oraz Katedry Mikrobiologii Lekarskiej Akademii Medycznej we Wrocławiu i Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej Akademii Medycznej w Warszawie.

Tlenowe bakterie wskaźnikowe hodowano w optymalnych warunkach, to znaczy na bulionowym podłożu Mueller-Hintona (MH) (Difco) przez 24 godziny, w temperaturze 37°C. Po inkubacji, 1 oczko ezy przenoszono do 5 ml czystego bulionu MH i ponownie inkubowano przez 4-8 godzin w temperaturze 37° C w łaźni wodnej. Stężenie wskaźnikowych bakterii tlenowych doprowadzono do gęstości 0.5 według skali Mc Farland'a, rozcieńczając hodowlę solą fizjologiczną. Następnie 0.1 ml takiego inokulum przenoszono na podłoże stałe MH i rozprowadzono je po powierzchni płytki wacikiem.

Beztlenowe bakterie wskaźnikowe hodowano na odpowiednich podłożach wzrostowych. Dla *Helicobacter* i *Campylobacter* był to agar Brucella (Difco) z dodatkiem krwi ludzkiej (lub końskiej), heminy oraz witaminy K1, a dla *Clostridium difficile* - Columbia Agar firmy bio-Merieux z dodatkiem 5 % krwi baraniej. Inkubowano je w warunkach beztlenowych (*Clostridium difficile*) lub mikroaerofilnych (*Helicobacter* i *Campylobacter*) stosując odpowiednie generatory atmosfery firmy bio-Merieux przez 48-72 godziny, a następnie bakterie zawieszano w soli fizjologicznej, starając się doprowadzić gęstość zawiesiny do 3.0 w skali Mc Farland'a. Objętość 0.1 ml tej zawiesiny rozprowadzono na powierzchni płytek z odpowiednimi, powyżej opisanymi, agarowymi podłożami wzrostowymi.

Tak przygotowane hodowle antagonistycznych szczepów z rodzaju *Lactobacillus* i bakterii wskaźnikowych służyły następnie do określania występujących pomiędzy nimi zależności za pomocą następujących, poniżej opisanych, metod.

3. Metody badania antagonistycznych właściwości bakterii z rodzaju *Lactobacillus*.

Zaproponowano wiele metod wykrywania antagonistycznych właściwości bakterii. Większość z nich jest oparta na mechanizmie dyfuzji różnych substancji hamujących w żelu. Zarówno produkty fermentacji glukozy, obniżające znacznie pH podłoża, substancje podobne do bakteriocyn, jak też nadtlenek wodoru, mają możliwość równomiernego rozprzestrzeniania się w środowisku żelowym. Wybór stałych podłoży do badania antagonizmu nie był przypadkowy, udowodniono bowiem, że LAB produkują większą ilość substancji hamujących na podłożach stałych, czy półstałych, niż w podłożach płynnych (Hoover i Steenson, 1993).

Ogólnie metody badania antagonizmu oparte na dyfuzji w żelu dzielą się na bezpośrednie (jednoczasowe) i opóźnione (Hoover i Steenson, 1993, Tagg i wsp. 1976). Metody bezpośrednie polegają na równoczesnym wzroście zarówno szczepów testowych (antagonistycznych), czyli w przypadku niniejszej rozprawy, bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, jak też i bakterii wskaźnikowych, prowadzonym na tym samym podłożu i w tych samych warunkach inkubacji. W metodach opóźnionych, wzrost, w najbardziej optymalnych dla siebie warunkach, rozpoczynają szczepy antagonistyczne, a po upływie 24-48 godzin, czyli z opóźnieniem, rozpoczyna się wzrost bakterii wskaźnikowych na odpowiednich podłożach i w najkorzystniejszych dla nich warunkach.

Częściej wykorzystywanymi metodami określającymi stopień i zakres antagonizmu bakterii kwasu mlekowego są takie techniki opóźnione, jak: metoda krążkowa według Mc Groarty i Reida (1988), czy metoda podwójna według Spelhauga i Harlandera (1989).

3.1 Metoda krążkowa.

Badania z wykorzystaniem tej metody zostały przeprowadzone według opisu McGroarty i Reida (1988), a polegały na nasyceniu jałowego, czczego krążka bibułowego o średnicy 9 mm 18-godzinną, bulionową hodowlą badanego szczepu antagonistycznego w objętości 5 μ l. Nasycone krążki nakładano kolejno (po dwa), na płytkę posianą uprzednio szczepem wskaźnikowym. Następnie płytki umieszczano w lodówce w temperaturze 4° C na 3 godziny, po czym inkubowano je w najbardziej optymalnych warunkach wzrostowych, dostosowanych do wymagań bakterii wskaźnikowych. Miarą zahamowania wzrostu bakterii wskaźnikowych były średnice stref zahamowania wzrostu wokół krążków nasyconych bakteriami antagonistycznymi (podane w mm).

3. 2. Metoda podwójna.

W tym przypadku posłużono się klasyczną metodą podwójną według Spelhauga i Harlandera (1989). Płynną, 18 godzinną hodowlę badanych bakterii antagonistycznych nakładano, w formie kropli o objętości 5 μ l, na powierzchnię płytki z 10 ml agaru MRS, a następnie inkubowano je przez kolejne 18 godzin w temperaturze 37°C w warunkach beztlenowych. Wyrośnięte na powierzchni agaru MRS bakterie z rodzaju *Lactobacillus* zalewano 10 ml rozpuszczonego i ochłodzonego do temperatury 56°C drugiego podłoża, umożliwiającego wzrost bakterii wskaźnikowych. Po zestaleniu powierzchnię płytki posiewano, drogą wymazu, płynną hodowlą bakterii wskaźnikowych rozcieńczonych do gęstości 0.5 według skali Mc Farland'a. Inkubację przeprowadzano w warunkach optymalnych dla wzrostu bakterii wskaźnikowych (określonych powyżej). Wyniki uzyskiwano w formie stref zahamowania wokół kropli bakterii antagonistycznych i odczytywano je, mierząc średnice stref w mm.

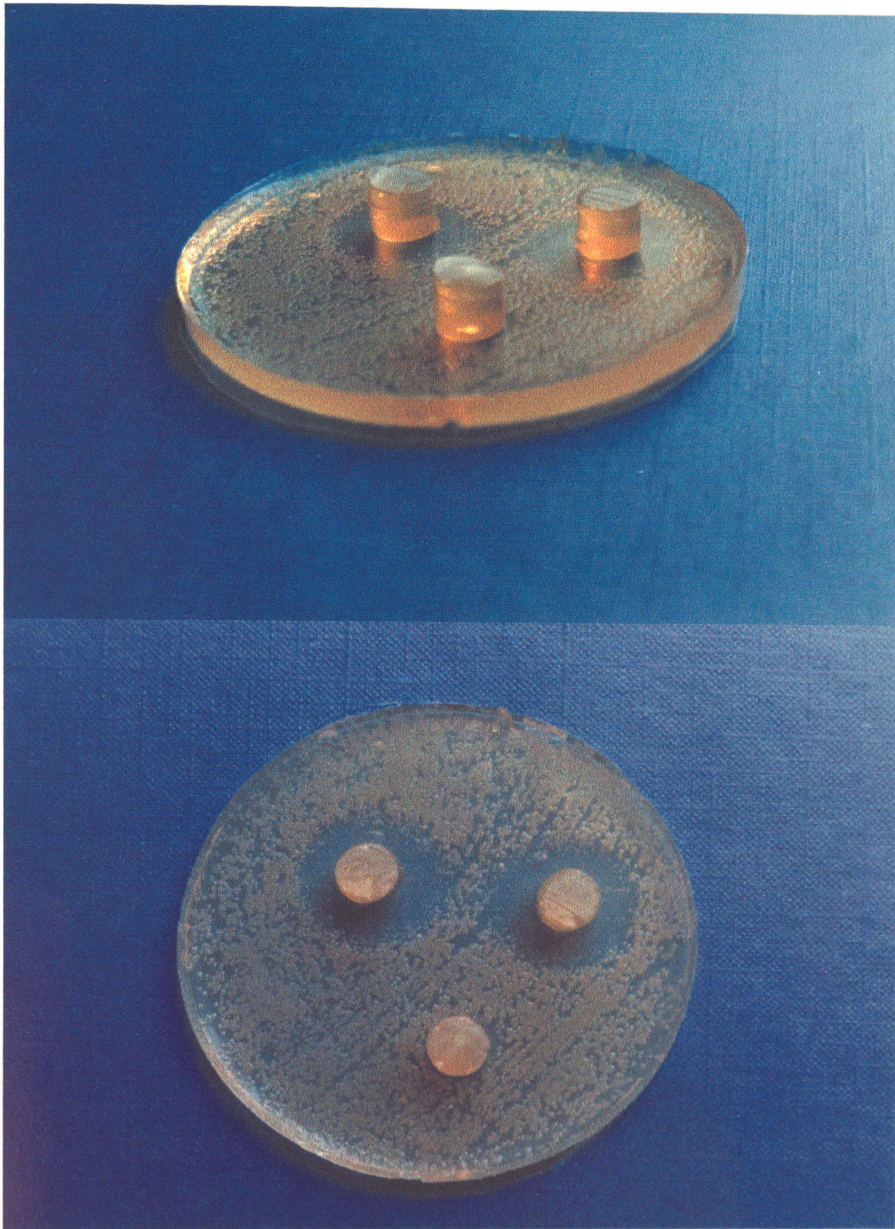
W trakcie badania właściwości antagonistycznych posłużono się początkowo wyżej opisanymi metodami, jednak ze względu na wyniki trudności (omówione poniżej), w ramach tej pracy została zaproponowana, opracowana i wdrożona nowa metoda tzw. słupkowa (Strus, 1998).

3.3. Metoda słupkowa.

Bakterie antagonistyczne z rodzaju *Lactobacillus* hodowano w temperaturze 37° C, w warunkach beztlenowych na płytkach z podłożem stałym MRS (OXOID) o objętości 40 ml. Po upływie 18 godzin inkubacji, w płytkach agarowych wycinano korkoborem okrągłe słupki o średnicy 9 mm, które po 3 nakładano na płytki z naniesionymi, za pomocą wymazu, bakteriami wskaźnikowymi, po czym umieszczano je na 4 godziny w lodówce w temperaturze 4°C (za wyjątkiem bakterii beztlenowych). Dalszą inkubację przeprowadzano w temperaturze 37°C przez 24-72 godziny w warunkach tlenowych, mikroaerofilnych, lub też beztlenowych w zależności od wymagań bakterii wskaźnikowych. Po inkubacji wokół słupka powstawała strefa zahamowania wzrostu bakterii wskaźnikowych, której średnicę w mm przyjmowano, jako miarę stopnia antagonizmu (patrz Rycina 5).

Ponadto, w trakcie niektórych doświadczeń, mierzono pH pozostałej wokół wyciętego krążka powierzchni agaru MRS, posługując się automatycznym pHmetrem firmy Hanna-Instruments, wyposażonym w specjalną elektrodę do pomiaru pH powierzchni stałych.

Rycina 5. Słupkowa metoda badania antagonistycznego działania bakterii z rodzaju *Lactobacillus* na szczepy wskaźnikowe.



W celu porównania przydatności opisanych powyżej metod badania antagonizmu wybrano trzy szczepy bakterii wskaźnikowych tj. *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* i *Staphylococcus aureus*, a następnie zbadano ich wrażliwość na działania losowo wybranych szczepów *Lactobacillus*, stosując równolegle metody: krążkową, podwójną i słupkową. Badania powtórzono trzykrotnie. W oparciu o wyływające z tego porównania wnioski (Wyniki wraz z omówieniem punkty: 4.1.1 - 4.1.6) wybrano jedną, najbardziej optymalną metodę, którą posłużono się do oznaczenia antagonistycznych właściwości bakterii z rodzaju *Lactobacillus* wobec wszystkich bakterii wskaźnikowych, zarówno tlenowych, jak i beztlenowych.

4. Wyniki wraz z omówieniem:

4.1. Porównanie trzech metod badania antagonizmu.

Wyniki opracowano w formie tabel i wykresów.

Tabela 5. Porównanie stref zahamowania wybranych bakterii z rodzaju *Lactobacillus* wobec *Staphylococcus aureus* za pomocą metod: krążkowej, podwójnej i słupkowej.

Szczep Nr	Metoda krążkowa					Metoda podwójna					Metoda słupkowa				
	BADANIE					BADANIE					BADANIE				
	I	II	III	Średnia	O.S.	I	II	III	Średnia	O.S.	I	II	III	Średnia	O.S.
2B	7	8	5	6.67	1.53	8	8		8.00	0.00	10	6	11	9.00	2.65
7A	7	6	6	6.33	0.58	7	4		5.50	2.12	10	7	9	8.67	1.53
8A	8	8	9	8.33	0.58	7	7		7.00	0.00	7	7	9	7.67	1.15
8B	10	8	7	8.33	1.53	6	3		4.50	2.12	7	4	9	6.67	2.52
9A	7	8	8	7.67	0.58	3	3		3.00	0.00	9	6	10	8.33	2.08
9B	8	6	5	6.33	1.53	4	2		3.00	1.41	11	8	9	9.33	1.53
13A	8	8	5	7.00	1.73	6	4		5.00	1.41	8	4	6	6.00	2.00
16A	9	8	6	7.67	1.53	7	4		5.50	2.12	7	6	8	7.00	1.00
26A	10	8	6	8.00	2.00	5	3		4.00	1.41	12	6	6	8.00	3.46
30A	7	8	10	8.33	1.53	7	4		5.50	2.12	9	6	10	8.33	2.08
31B	7	6	10	7.67	2.08	5	5		5.00	0.00	9	6	11	8.67	2.52
32B	8	5	12	8.33	3.51	6	3		4.50	2.12	9	5	9	7.67	2.31
41B	5	2	5	4.00	1.73	9	5		7.00	2.83	9	5	10	8.00	2.65
42B	10	5	6	7.00	2.65	5	5		5.00	0.00	7	7	7	7.00	0.00
65A	9	6	6	7.00	1.73	10	5		7.50	3.54	9	6	8	7.67	1.53
71A	8	6	10	8.00	2.00	10	4		7.00	4.24	10	6	9	8.33	2.08
KL37C	7	6	5	6.00	1.00	2	9		5.50	4.95	3	1	0	1.33	1.53
78B	8	0	5	4.33	4.04	3	1		2.00	1.41	10	5	7	7.33	2.52
81A	6	3	7	5.33	2.08	5	0		2.50	3.54	7	4	5	5.33	1.53
95	10	10	1	7.00	5.20	4	3		3.50	0.71	8	3	12	7.67	4.51
96	10	5	6	7.00	2.65	5	2		3.50	2.12	9	12	14	11.67	2.52
133B	8	3	8	6.33	2.89	8	5		6.50	2.12	9	6	10	8.33	2.08
154	1	0	0	0.33	0.58	6	0		3.00	4.24	7	7	11	8.33	2.31
L.C1	0	3	2	1.67	1.53	6	6		6.00	0.00	5	5	5	5.00	0.00
L.1752	8	8	10	8.67	1.15	9	3		6.00	4.24	8	7	9	8.00	1.00
L.Shir.	5	1	4	3.33	2.08	5	3		4.00	1.41	7	6	6	6.33	0.58