



**Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Lekarski**

Monika Brzychczy-Włoch

**BADANIA NAD WŁAŚCIWOŚCIAMI WARUNKUJĄCYMI UDZIAŁ
BAKTERII Z RODZAJU *BIFIDOBACTERIUM*
WE FLORZE LUDZKIEGO PRZEWODU POKARMOWEGO.**

Praca doktorska

Promotor: **Prof. Dr hab. med. Piotr B. Heczko**

Pracę wykonano w Katedrze Mikrobiologii CM UJ

Kierownik jednostki: **Prof. Dr hab. med. Piotr B. Heczko**

Kraków, 2005

Składam Serdeczne Podziękowania:

Szanownemu Panu Profesorowi Dr hab. med. Piotrowi B. Heczko
za umożliwienie przygotowania rozprawy doktorskiej
oraz za opiekę naukową.

Współpracownikom
z Zakładu Bakteriologii Katedry Mikrobiologii CM UJ
za okazaną życzliwość.

SPIS TREŚCI

I.	WSTĘP - OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA RODZAJU	1
	<i>BIFIDOBACTERIUM</i>	
I.1.	KLASYFIKACJA	1
I.2.	MORFOLOGIA	3
I.3.	WYSTĘPOWANIE	3
I.4.	WYMAGANIA WZROSTOWE	3
I.5.	CHARAKTERYSTYKA BIOCHEMICZNA I METABOLIZM	5
I.6.	BUDOWA GENOMU ORAZ WYSTĘPOWANIE PLAZMIDÓW	5
I.7.	UDZIAŁ W PRZEWODZIE POKARMOWYM CZŁOWIEKA	7
I.8.	KONCEPCJA PROBIOZY	10
I.9.	DZIAŁANIE SZKODLIWE	13
II.	CELE PRACY	17
III.	DROGI KOLONIZACJI NOWORODKÓW KARMIONYCH MLEKIEM	18
	MATKI PRZEZ BAKTERIE Z RODZAJU <i>BIFIDOBACTERIUM</i>	
III.1.	WPROWADZENIE	18
III.2.	MATERIAŁY I METODY	20
	III.2.1. Schemat pobierania materiałów od pacjentek i ich dzieci	20
	III.2.2. Transport materiałów i hodowla bakterii	21
III.3.	WYNIKI WRAZ Z ICH OMÓWIENIEM	21
IV.	UTWORZENIE KOLEKCJI SZCZEPÓW Z RODZAJU	24
	<i>BIFIDOBACTERIUM</i>	
IV.1.	WPROWADZENIE	24
IV.2.	MATERIAŁY I METODY	25
	IV.2.1. Pobieranie i transport materiałów	25
	IV.2.2. Hodowla, izolacja i przechowywanie szczepów	25
IV.3.	WYNIKI WRAZ Z ICH OMÓWIENIEM	26
V.	OKREŚLANIE PRZYNALEŻNOŚCI RODZAJOWEJ I GATUNKOWEJ	29
	BAKTERII Z RODZAJU <i>BIFIDOBACTERIUM</i>	
V.1.	WPROWADZENIE	29
V.2.	MATERIAŁY I METODY	32
	V.2.1. Bakterie	32
	V.2.2. Metody fenotypowe	32
	a) Testy podstawowe	32
	b) Wystandaryzowane testy biochemiczne - profile fermentacyjne	34
	V.2.3. Metody genotypowe	35
	a) Identyfikacja bakterii z rodzaju <i>Bifidobacterium</i> za pomocą metody PCR	35
	b) Identyfikacja bakterii z rodzaju <i>Bifidobacterium</i> za pomocą fluorescencyjnej hybrydyzacji <i>in situ</i> - FISH	41
V.3.	WYNIKI WRAZ Z ICH OMÓWIENIEM	43
	V.3.1. Metody fenotypowe	43
	V.3.2. Metody genotypowe	48
	a) Identyfikacja bakterii z rodzaju <i>Bifidobacterium</i> za pomocą reakcji PCR	48
	b) Identyfikacja bakterii z rodzaju <i>Bifidobacterium</i> za pomocą fluorescencyjnej hybrydyzacji <i>in situ</i> – FISH	51

VI.	ANTAGONISTYCZNE DZIAŁANIE BAKTERII Z RODZAJU <i>BIFIDOBACTERIUM</i>	52
VI.1.	WPROWADZENIE	52
VI.2.	MATERIAŁY I METODY	55
VI.2.1.	Bakterie antagonistyczne	55
VI.2.2.	Bakterie wskaźnikowe	56
VI.2.3.	Badanie właściwości antagonistycznych metodą słupkową	57
VI.3.	WYNIKI WRAZ Z ICH OMÓWIENIEM	57
VII.	WŁAŚCIWOŚCI POWIERZCHNIOWE BAKTERII Z RODZAJU <i>BIFIDOBACTERIUM</i>	68
VII.1.	WPROWADZENIE	68
VII.2.	MATERIAŁY I METODY	71
VII.2.1.	Bakterie	71
VII.2.2.	Metody określania właściwości powierzchniowych	71
a)	Badanie hydrofobowości powierzchni	71
a.1)	Test na autoaglutynację	71
a.2)	Test agregacji w soli (SAT)	72
b)	Badanie produkcji śluzu	72
c)	Badanie adherencji do linii komórkowych Caco-2 i HT-29	73
VII.3.	WYNIKI WRAZ Z ICH OMÓWIENIEM	75
VIII.	OPORNOŚĆ BAKTERII Z RODZAJU <i>BIFIDOBACTERIUM</i> NA SOLE ŻÓŁCI	83
VIII.1	WPROWADZENIE	83
VIII.2	MATERIAŁY I METODY	84
VIII.2.1.	Bakterie	84
VIII.2.2.	Oznaczanie oporności na sole żółci	85
VIII.3	WYNIKI WRAZ Z ICH OMÓWIENIEM	85
IX.	OPORNOŚĆ BAKTERII Z RODZAJU <i>BIFIDOBACTERIUM</i> NA WYBRANE ANTIBIOTYKI	88
IX.1.	WPROWADZENIE	88
IX.2.	MATERIAŁY I METODY	90
IX.2.1.	Bakterie	90
IX.2.2	Oznaczanie oporności na antybiotyki metodą dyfuzji krążkowej	90
IX.3.	WYNIKI WRAZ Z ICH OMÓWIENIEM	91
X.	DYSKUSJA	102
XI.	WNIOSKI	112
XII.	STRESZCZENIE	113
	SUMMARY	115
XIII.	PODŁOŻA MIKROBIOLOGICZNE	117
XIV.	WYKAZ PRODUCENTÓW ODCZYNNIKÓW I PODŁOŻY ZASTOSOWANYCH W TEJ PRACY	119
XV.	SPIS TABEL I RYCIN	120
XV. 1.	TABELE	120
XV. 2.	RYCINY	121
XVI.	PIŚMIENNICTWO	125

I. WSTĘP - OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA RODZAJU *BIFIDOBACTERIUM*

I. 1. KLASYFIKACJA

Bakterie, które obecnie zaliczamy do rodzaju *Bifidobacterium*, zostały po raz pierwszy wyizolowane z kału noworodków karmionych mlekiem matki w Instytucie Pasteura w 1899 roku przez Tissier'a i zidentyfikowane jako *Bacillus bifidus communis*. Pod względem morfologicznym były to Gram-dodatnie, niesporujące laseczki, o bardzo nietypowych rozgałęzionych komórkach, nie posiadające zdolności poruszania się. Niemalże w tym samym czasie, bo 1900 roku Moro we Włoszech odkrywając te bakterie, zaliczył je do istniejącego już wówczas rodzaju *Lactobacillus*. Zgodność taksonomiczną próbował wprowadzić kolejny mikrobiolog, Holand, który zaproponował dla nich nazwę *Lactobacillus bifidus*. Przez wiele kolejnych lat bakterie te były więc włączane do rodzaju *Lactobacillus* i dopiero w 1935 roku Eggerth wydzielił w taksonomii nowy rodzaj, któremu nadał nazwę *Bifidobacterium* [1, 2, 3, 4, 5]. Słuszność tego podziału potwierdziły nowe, jak na ówczesne czasy, metody taksonomiczne oparte głównie na właściwościach biochemicznych, które pomogły udowodnić, że poszczególne gatunki tych polimorficznych bakterii nie można zaliczać do rodzaju *Lactobacillus*, ponieważ w inny sposób fermentują cukry. Zawierają bowiem enzym fruktozo-6-fosforano-fosfoketolazę (ang. Fructose-6-Phosphate-PhosphoKetolase - F6PPK), który nie występuje u żadnych innych, morfologicznie zbliżonych bakterii [2, 6, 7].

Taksonomia rodzaju *Bifidobacterium* jest wciąż sprawą dyskusyjną i budzącą wiele kontrowersji. Do tej pory opisano trzydzieści sześć gatunków *Bifidobacterium* kolonizujących organizm człowieka, zwierzęta, lub występujących w środowisku naturalnym. Często przedstawiciele tego rodzaju błędnie zaliczani są do bakterii kwasu mlekowego (ang. Lactic Acid Bacteria - LAB), z powodu wytwarzania kwasu mlekowego jako jednego z produktów fermentacji glukozy. Obecnie, za prawidłowe uważa się zaliczenie rodzaju *Bifidobacterium* do rodziny *Actinomycetaceae*, według następującej klasyfikacji [2, 8, 9].

Królestwo: *Prokaryotae*

Gromada: *Firmicutes* (Bakterie Gram-dodatnie)

Klasa: *Thallobacteria* (Bakterie rozgałęzione)

Rodzina: *Actinomycetaceae*

Rodzaj: *Bifidobacterium*

Gatunki: Kolonizujące człowieka

1. *B. adolescentis* [10]; próbki kału od dorosłych
2. *B. angulatum* [11]; próbki kału od dorosłych
3. *B. bifidum* [12]; próbki kału od dzieci i dorosłych, pochw

4. *B. breve* [10] syn.: *B. parvolulorum*; próbki kału od dzieci, pochwa
5. *B. catenulatum* [11]; próbki kału od dzieci i dorosłych, pochwa
6. *B. denticolens* [13]; jama ustna
7. *B. dentium* [11]; jama ustna, próbki kału od dorosłych
8. *B. gallicum* [14]; próbki kału od dorosłych
9. *B. infantis* [10] syn.: *B. liberorum* lub *B. lactentis*; próbki kału od dzieci, pochwa
10. *B. inoptinatum* [13]; jama ustna
11. *B. longum* [10]; próbki kału od dzieci i dorosłych, pochwa
12. *B. pseudocatenulatum* [15]; próbki kału od dzieci
13. *B. scardovii* [16]; próbki kału od dorosłych

Gatunki: Występujące w środowisku naturalnym i żywności

1. *B. lactis* [17, 18]; sfermentowane mleko
2. *B. minimum* [2]; ścieki
3. *B. subtile* [2]; ścieki
4. *B. thermacidophilum* subsp. *thermacidophilum* [19]; odpady

Gatunki: Kolonizujące zwierzęta

1. *B. animalis* [20]; odchody szczurów, kurcząt, królików i cieląt
2. *B. asteroides* [21]; pszczoły
3. *B. boum* [15]; żwacz i odchody świń
4. *B. choerinum* [15]; odchody świń
5. *B. coryneforme* [21]; pszczoły
6. *B. cuniculi* [15]; odchody królików
7. *B. gallinarum* [22]; odchody kurcząt
8. *B. indicum* [21]; pszczoły
9. *B. magnum* [23]; odchody królików
10. *B. merycicum* [24]; żwacz
11. *B. pseudolongum* subsp. *pseudolongum* [20]; odchody szczurów, kurcząt, świń i cieląt
12. *B. pseudolongum* subsp. *globosum* [25]; odchody szczurów, kurcząt, świń i cieląt, żwacz
13. *B. psychraerophilum* [26]; odchody świń
14. *B. pullorum* [27]; odchody kurcząt
15. *B. ruminantium* [24]; żwacz
16. *B. saeculare* [28]; odchody królików
17. *B. suis* [29]; odchody świń
18. *B. thermacidophilum* subsp. *porcinum* [30]; odchody świń

19. *B. thermophilum* [20] syn.: *B. ruminale*; odchody kurcząt, świń i cieląt

W błonie cytoplazmatycznej szczepów *Bifidobacterium* znajdują się izozymy różnych enzymów (np. transaldolazy), które w rozdziale elektroforetycznym wykazują przynależność do czterech różnych grup, umożliwiając tym samym, rozróżnienie badanych gatunków na cztery grupy: szczepy ludzkie, zwierzęce, pszczele oraz środowiskowe [31].

I. 2. MORFOLOGIA

Rodzaj *Bifidobacterium* charakteryzuje się bardzo dużym polimorfizmem pod względem kształtu komórek, które w zależności od gatunku mogą być: krótkie, regularne, cienkie z zaokrąglonymi końcami; ziarniakowate; wydłużone o różnie rozgałęzionych zakończeniach lub z charakterystycznymi dla nich zgrubieniami na jednym lub obu końcach komórki. W preparacie wykonanym według metody Grama, bakterie te barwią się Gram-dodatnio lub Gram-chwiejnie i układają się w rozmaity sposób: pojedynczo; w układy przypominające swym kształtem palisadę lub literę „V”, „Y”, „X”; w łańcuszki złożone z wielu komórek; a także w agregaty przypominające gwiazdę [2, 5].

Nazwa *Bifidobacterium* sugeruje, że bakterie te występują w rozdwojonej formie. To może być jednak bardzo mylące w początkowej identyfikacji wyizolowanych szczepów, gdyż np. jeden gatunek *B. bifidum* w zależności od warunków hodowli i rodzaju zastosowanych podłoży, może występować w rozmaitych formach, od bardzo małych do wielkich, z różnym stopniem rozgałęzienia komórek [2, 5].

Pod względem morfologii szczepy *Bifidobacterium* mogą być mylone z bakteriami należącymi do takich rodzajów jak: *Lactobacillus*, *Actinomyces*, *Propionibacterium* i *Eubacterium* [32, 33].

I. 3. WYSTĘPOWANIE

Bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* wchodziły w skład naturalnej mikroflory organizmu człowieka, występując szczególnie licznie w przewodzie pokarmowym, a także w jamie ustnej i narządzie rodny kobiet. Występowanie jakościowe, jak i ilościowe różnych gatunków *Bifidobacterium* w organizmie zależy zarówno od miejsca kolonizacji, wieku gospodarza, jak i spożywanej przez niego diety (Tabela 1, 2 i 3). Bakterie te kolonizują również przewód pokarmowy różnych zwierząt, m.in: pszczoł, świni, bydła, królików, kurcząt i szczurów. Spotykane są także w środowisku, m. in.: w gnijącym błocie lub ściekach [2, 5, 34].

I. 4. WYMAGANIA WZROSTOWE

Bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* to auksotrofy o zróżnicowanych wymaganiach pokarmowych. Większość szczepów do prawidłowego wzrostu wymaga ryboflawiny, cysteiny

i kwasu pantotenowego. Niektóre gatunki potrzebują dodatkowo kwasu nikotynowego, tiaminy, pirydoksyny, kwasu p-aminobenzoowego, a także czynników wzrostu oraz zasad kwasów nukleinowych [5, 35]. Większość gatunków potrafi wykorzystywać sole amonu jako źródło azotu, jednakże niektóre gatunki izolowane od zwierząt nie mogą rosnąć bez dostępu azotu organicznego [1, 5].

Wykazano, że obecność tak zwanych czynników bifidogennych (ang. bifidogenic factors) znacznie wpływa na zwiększenie populacji *Bifidobacterium* we florze ludzkiego przewodu pokarmowego. Czynniki te są definiowane jako komponenty, zazwyczaj o charakterze węglowodanowym, które przechodzą przez przewód pokarmowy człowieka w postaci niezmienionej i docierają do jelita grubego lub ślepego, gdzie są następnie metabolizowane przez bakterie z rodzaju *Bifidobacterium*, stanowiąc dla nich źródło energii. Czynniki bifidogenne w świetle najnowszych koncepcji mogą być wykorzystywane jako prebiotyki, czyli produkty nie ulegające strawieniu w przewodzie pokarmowym człowieka, stymulujące jednocześnie wzrost i aktywność jednego lub większej liczby gatunków bakterii korzystnie oddziałujących na organizm gospodarza [36].

Badania kliniczne wykazały dziesięciokrotny wzrost populacji bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* występujących w jelicie grubym człowieka po wzbogaceniu diety osób badanych w fruktooligosacharydy w dawce 15 g/dzień. Zaobserwowano również wzrost uwalniania kwasów tłuszczowych, spadek pH o 0.3 jednostki oraz redukcję liczby bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* z 1×10^8 do 4×10^7 j.t.k. (j.t.k. - jednostki tworzące kolonie, ang. c.f.u. - colony forming units) na gram treści jelitowej [36].

Wykazano, że niektóre składniki, takie jak N-acetyloglukozamina oraz wybrane białka stymulują wzrost gatunku *B. bifidum* w warunkach *in vitro* [2, 37]. Gatunek ten jest jednym z dominujących składników flory przewodu pokarmowego niemowląt, szczególnie tych, które są karmione mlekiem matki. Obecność *Bifidobacterium* w tym ekosystemie związana jest z ich wysokim wymaganiem w stosunku do N-acetyloglukozaminy (ang. bifidus factor), która występuje w mleku ludzkim, brak jej natomiast w mleku krowim [37, 38].

Optymalna temperatura wzrostu dla *Bifidobacterium* to 37 - 41°C. Minimalna temperatura wzrostu mieści się w granicach 25 - 28°C, zaś temperatura maksymalna, w której potrafią rosnąć tylko nieliczne gatunki kolonizujące zwierzęta, to 43 - 45°C [2].

Optymalne pH dla rozwoju tych bakterii mieści się w przedziale wartości pomiędzy 6.5 - 7.0. Zahamowanie wzrostu następuje w pH o wartości 4.5 - 5.0, a także 8.0 - 8.5 [2].

Pod względem wymagań gazowych rodzaj *Bifidobacterium* zaliczany jest do bezwzględnych beztlenowców, jednakże okazuje się, że wrażliwość na obecność tlenu w środowisku jest różna w zależności od gatunku lub szczepu. Zaobserwowano, że niektóre

gatunki izolowane od zwierząt, takie jak: *B. globosum*, *B. thermophilum* oraz *B. suis* są aerotolerancyjne, niemniej jednak do wzrostu potrzebują atmosfery zawierającej co najmniej 10% dwutlenku węgla [2, 5, 39].

I. 5. CHARAKTERYSTYKA BIOCHEMICZNA I METABOLIZM

Większość gatunków *Bifidobacterium* jest katalazo-ujemna, za wyjątkiem *B. indicum* oraz *B. asteroides*, które w atmosferze zawierającej tlen (mieszanina: 90% powietrza i 10% CO₂) są katalazo-dodatnie. Bakterie te potrafią rozkładać amoniak i wykorzystują go jako źródło azotu, nie są jednak w stanie zredukować azotanów [2, 40].

Do rodzaju *Bifidobacterium* należą bakterie o fermentacyjnym metabolizmie węglowodanów. Kluczowym enzymem biorącym udział w tym szlaku biochemicznym jest fruktozo-6-fosforano-fosfoketolaza (ang. Fructose-6-Phosphate PhosphoKetolase - F6PPK). Produktami tych przemian są kwas octowy i kwas mlekowy w teoretycznych proporcjach 3:2 [4, 41].

Heterofermentacja glukozy przebiega zgodnie z równaniem:



Fermentacja ta odbywa się w szlaku fosfoketolazowym, gdyż *Bifidobacterium* nie posiadają ani aldozy, ani dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej, wykorzystują natomiast fosfoketolazy, które rozszczepiają fosfo-6-fosforan i ksylulozo-3-fosforan, odpowiednio: do acetylofosforanu i erytrozo-4-fosforanu lub aldehydu 3-fosfoglicerynowego, a końcowym produktem rozkładu heksozy jest kwas octowy i kwas mlekowy [38, 42].

I. 6. BUDOWA GENOMU ORAZ WYSTĘPOWANIE PLAZMIDÓW

Poznanie budowy genomu bakterii stało się możliwe dzięki wprowadzeniu do mikrobiologii metod z zakresu genetyki molekularnej. Jednym z najczęściej stosowanych parametrów, wykorzystywanym do określania ewolucyjnego podobieństwa pomiędzy poszczególnymi rodzajami, jest określenie molekularnej zawartości zasad (w procentowym odsetku) guaniny (G) i cytozyny (C) w całej ilości DNA izolowanego z komórki [43]. Genomowa zawartość par G+C w DNA bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* waha się w granicach 57.2 - 64.2 mol % ze średnią wartością 60.1 mol %. Odróżnia to bakterie należące do tego rodzaju od innych bakterii, z którymi często *Bifidobacterium* są mylone. I tak na przykład, bakterie z rodzaju *Lactobacillus* zawierają w swoim genomie 33.0 - 52.5 mol % par zasad G+C, zaś bakterie z rodzaju *Propionibacterium* 66.4 - 70.4 mol % [1, 2, 5].

Udowodnienie pokrewieństwa genetycznego stanowi najlepszą podstawę do sporządzenia filogenetycznego schematu klasyfikacji bakterii. W roku 1970 Scardovi i wsp. oraz Crociani i wsp. opublikowali dane dotyczące pokrewieństwa pomiędzy wybranymi gatunkami

Bifidobacterium. W tym celu przeprowadzili hybrydyzację DNA 179 szczepów reprezentujących 13 różnych gatunków *Bifidobacterium*. Metoda ta pozwoliła na wykrycie podobieństw oraz homologii pomiędzy poszczególnymi sekwencjami polinukleotydowymi w DNA badanych szczepów. Uzyskane wyniki wykazały, że rodzaj *Bifidobacterium* pomimo stosunkowo dużego podobieństwa pod względem cech fenotypowych, nie jest aż tak homogeny pod względem genetycznym, jak by na to wskazywały dane dotyczące genomowej zawartości par zasad G+C (57.2 - 64.2 mol %). Wyniki te sugerują dużą różnorodność ewolucyjną w rodzaju *Bifidobacterium*. W badaniach tych wykazano między innymi, że: *B. bifidum* i *B. adolescentis* należą do dwóch różnych genetycznie grup; *B. bifidum* biotyp A i B są bardzo blisko spokrewnione, podobnie jak cztery biotypy *B. adolescentis*; gatunki *B. dentium*, *B. angulatum*,

B. pseudocatenulatum i *B. catenulatum* trudne do odróżnienia od *B. adolescentis* na podstawie wzoru fermentacji, są pod względem genetycznym różne, zarówno od siebie nawzajem, jak i od *B. adolescentis*; z kolei *B. longum* i *B. infantis* są bardzo blisko spokrewnione ze sobą, gdyż wykazują aż 50% homologii; podobnie *B. breve* i *B. infantis* z 40 - 50% homologii [44, 45].

Pod koniec lat 90-tych XX wieku oszacowano wielkość genomu dla całego rodzaju *Bifidobacterium*, przy czym nie wykazano znaczących różnic w jego wielkości pomiędzy poszczególnymi gatunkami. Badania wykonano przy użyciu metody PFGE (ang. Pulsed Field Gel Electrophoresis) na 25 szczepach *Bifidobacterium*, reprezentujących siedem gatunków: *B. angulatum*, *B. catenulatum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. breve*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. adolescentis*. Wykazano, że wielkość genomu *Bifidobacterium* mieści się w przedziale wartości 1.5 - 2.1 Mb, z czego 1.8 Mb to najczęściej spotykany rozmiar. W porównaniu z innymi rodzajami bakterii należącymi do rodziny *Actinomycetaceae*, np.: *Streptomyces* 6.5 - 8.2 Mb, *Corynebacterium glutamicum* 2.98 Mb, wielkość genomu *Bifidobacterium* jest stosunkowo duża [46, 47, 48].

Wykazanie obecności plazmidów w komórkach bakterii jest bardzo interesujące, między innymi ze względu na konsekwencje jakie niesie za sobą ich obecność. Plazmidy przyczyniają się do wzrostu zmienności genetycznej i ewolucyjnej mikroorganizmów. Z występowaniem plazmidów związane jest posiadanie przez bakterie takich cech jak: oporność na antybiotyki, produkcja toksyn i bakteriocyn, modyfikacja zjadliwości bakterii oraz wzrost zdolności metabolicznych. Poza tym, plazmidy mogą być przekazywane na szeroką skalę innym mikroorganizmom na drodze transformacji, transdukcji lub koniugacji. Plazmidy obok kodowania i przenoszenia informacji genetycznej mają również znaczenie podczas identyfikacji różnych szczepów bakterii oraz są wykorzystywane do typowania molekularnego (ang. molecular fingerprinting). Pod względem budowy plazmidy to koliste cząsteczki DNA o podwójnej helisie, replikujące się niezależnie od replikacji chromosomów. Ich masa

cząsteczkowa mieści się w granicach 3×10^6 - 1×10^8 Da, co wystarcza na zakodowanie 5 - 160 polipeptydów o przeciętnej długości [42, 43, 49, 50].

Sgorbati i wsp. w 1982 roku przeprowadzili badania na 1461 szczepach, reprezentujących 24 gatunki *Bifidobacterium*, w których to wykazali obecność plazmidów tylko u czterech z pośród badanych gatunków (20% z badanych). Plazmidy udało się im wyizolować od: *B. longum* - dominujący gatunek w przewodzie pokarmowym człowieka; *B. pseudolongum* syn. *B. globosum* - najczęściej izolowany gatunek z przewodu pokarmowego różnych kręgowców; *B. asteroides* i *B. indicum* - gatunki izolowane wyłącznie z przewodu pokarmowego pszczoł. Ponadto wykazali, że gatunek: *B. longum* posiadał plazmidy zakwalifikowane do trzynastu modeli, tworzących w rozdziale elektroforetycznym charakterystyczny wzór (1.25 - 9.5 MDa); *B. globosum* posiadał plazmidy należące do każdej z trzech kategorii wagowych (13.5, 24.5 i 46 MDa); *B. asteroides* posiadał czternaście typów plazmidów, które pod względem strukturalnym bardzo różniły się pomiędzy sobą (1.2 - 22 MDa); oraz 60% z badanych szczepów *B. indicum* wykazywało obecność jednego plazmidu (22 MDa) [2, 49, 50]. Z kolei badania prowadzone przez Iwata i wsp. w 1989 roku wykazały obecność plazmidów u 40% badanych szczepów *B. bifidum*, istnienie których podważał Sgorbati i wsp. [34, 51].

Jak do tej pory nie wiadomo jeszcze, jakie cechy fenotypowe są związane z występowaniem plazmidów w komórkach *Bifidobacterium*. Wykazano, że szczepy *B. longum* po naświetlaniu promieniami UV lub po zastosowaniu mitomycyny uwalniają cząsteczki faga, jednak nie jest to związane z ich składem plazmidowym [2].

I. 7. UDZIAŁ W PRZEWODZIE POKARMOWYM CZŁOWIEKA

Przewód pokarmowy człowieka stanowi bardzo złożony ekosystem, w skład którego wchodzi ponad 400 gatunków bakterii, z których 99% stanowią bakterie bezwzględnie beztlenowe, między innymi zaliczane do rodzajów: *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium* i względnie beztlenowe, takie jak rodzaj *Lactobacillus*, a tylko 1% to bakterie tlenowe, między innymi: *E. coli* i *Streptococcus* [4, 52]. Liczba bakterii beztlenowych zależy od miejsca ich występowania i osiąga w okrężnicy i jelicie krętym liczbę 10^{10} - 10^{12} j.t.k./g treści jelitowej [53]. Przedstawiciele *Bifidobacterium* rzadko są spotykani w żołądku, w jelicie czczym występują w ilości 0 - 10^3 j.t.k./g treści, w jelicie krętym jest ich 10^3 - 10^7 j.t.k./g, zaś w okrężnicy 10^8 - 10^{12} j.t.k./g. [34, 53, 54, 55].

Skład jakościowy i ilościowy mikroflory przewodu pokarmowego człowieka jest determinowany wiekiem, stanem zdrowia, sposobem żywienia, jak również cechami osobniczymi oraz warunkami środowiska. Tak bogaty zespół mikroorganizmów prezentuje ogromny potencjał katalityczny w organizmie człowieka, którego skutki mogą nieść zarówno korzyść jak i mogą stanowić zagrożenie dla zdrowia gospodarza (Ryc. 1) [53].

Rola bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* w przewodzie pokarmowym nie jest jak dotąd dobrze poznana, ale uważa, że mogą one oddziaływać w korzystny sposób na organizm gospodarza za pomocą wielu mechanizmów.

Udowodniono, że *Bifidobacterium* wykazują silne działanie antagonistyczne względem innych patogennych mikroorganizmów. Istnieją dwie hipotezy, tłumaczące to zjawisko. Pierwsza z nich mówi o tzw. oporności kolonizacyjnej i kompetycyjnym wykluczaniu patogenów dzięki wiązaniu się *Bifidobacterium* z receptorami komórek wyściełających jelita oraz dzięki współzawodniczeniu o składniki pokarmowe. Druga hipoteza mówi, że za antagonistyczne działanie *Bifidobacterium* odpowiada obniżenie pH środowiska na skutek produkcji kwasu mlekowego i octowego przez te bakterie. Niska kwasowość hamuje wzrost niektórych mikroorganizmów, szczególnie bakterii beztlenowych oraz zwiększa perystaltykę jelit, co umożliwia usunięcie potencjalnych patogenów [34, 56].

W 1990 roku Meghrousy wykazał, że niektóre szczepy *Bifidobacterium* są zdolne do produkcji substancji o właściwościach antybakteryjnych przypominających swą budowę oraz działaniem bakteriocyny. Z komórek *B. bifidum* 1452 wyizolowano związek nazwany „Bifidin”, który wykazywał stabilność w 100°C przez 30 minut, oraz w pH 4.8 do 5.5, poza tym dawał pozytywną reakcję ninhydrynową, był zbudowany głównie z fenyloalaniny i kwasu glutaminowego, a także wykazywał właściwości antybakteryjne względem *Micrococcus flavus* oraz *Staphylococcus aureus* [34, 57, 58].

Nektóre szczepy *Bifidobacterium* potrafią modyfikować receptory obecne na komórkach nabłonkowych wyściełających jelita. Rezultatem tego może być zablokowanie przylegania i wiązania się z śluzówką jelit potencjalnie patogennych mikroorganizmów, które wykorzystują w tym celu te receptory [58].

Poza tym, *Bifidobacterium* przyspieszają dojrzewanie enterocytów, a tym samym, zwiększają prędkość różnicowania się i odnawiania śluzówki pokrywającej jelita [34].

Bakterie te mają również znaczący wpływ na układ immunologiczny człowieka związany z przewodem pokarmowym (ang. Gastrointestinal Associated Lymphoid Tissue - GALT). Wykazano, że *B. longum* ma zdolność wzmacniania bariery immunologicznej, dzięki oddziaływaniu zarówno na odpowiedź humoralną jak i komórkową gospodarza [34, 59].

Przedstawiciele rodzaju *Bifidobacterium*, jako jedne z nielicznych bakterii kolonizujących przewód pokarmowy człowieka, mają zdolność do fermentowania oligosacharydów. Przykładem tych związków jest: galakto-oligosacharyd, frukto-oligosacharyd, malto-oligosacharyd, gento-oligosacharyd, ksyllo-oligosacharyd oraz laktuloza [36]. Związki te, nazywane czynnikami bifidogennymi (ang. bifidogenic factors), są konwertowane do krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (ang. Short Chain Fatty Acids - SCFA), takich jak:

kwasy mlekowy, octowy, masłowy, propionowy. SCFA dostarczają energii po wchłonięciu z jelit i spalaniu w wątrobie oraz mięśniach, jak również są substratem energetycznym dla nabłonka jelitowego. Poza tym regulują prawidłową perystaltykę i ruchy robaczkowe jelit, a także działają przeciwbiegunkowo, gdyż ułatwiają wchłanianie wody i jonów sodu z przewodu pokarmowego człowieka [60, 61, 62].

Rodzaj *Bifidobacterium* ma także duże znaczenie odżywcze, gdyż bakterie należące do niego syntetyzują pewne związki wykorzystywane przez organizm człowieka. Gatunki takie jak:

B. breve, *B. infantis*, *B. longum*, *B. bifidum*, *B. adolescentis* są zdolne do produkcji następujących witamin: tiaminy (B1), ryboflawiny (B2), pirydoksyny (B6), kwasu foliowego (B9), kobalaminy (B12), kwasu askorbinowego (C), kwasu nikotynowego (PP) oraz biotyny (H) [34, 63, 64, 65]. Poza tym bakterie te syntetyzują niektóre aminokwasy, między innymi: alaninę, walinę i treoninę. Schell i wsp. w 2002 roku wykazali, że gatunek *B. longum* posiada geny odpowiedzialne za syntezę 19 aminokwasów [48]. *Bifidobacterium* produkują także izomer L+ kwasu octowego, który w całości jest metabolizowany przez człowieka. Co więcej, w badaniach prowadzonych na zwierzętach laboratoryjnych wykazano, że bakterie te zwiększają przyswajalność jonów wapnia, magnezu, cynku i żelaza [34, 65]

Bifidobacterium uczestniczą w zmniejszeniu nietolerancji na laktozę pochodzącą z produktów mlecznych, dzięki rozkładaniu jej na glukozę i galaktozę. Dlatego też są często wykorzystywane w produkcji produktów mlecznych zalecanych szczególnie osobom cierpiącym na nietolerancję laktozy [34].

Rodzaj *Bifidobacterium* wzmacnia także metabolizm białek i aminokwasów spożywanych wraz z dietą. Bakterie te posiadają aktywną fosfatazę fosfoproteinową, dzięki której, poprzez rozkład kazeiny, zwiększają absorpcję białek z mleka ludzkiego [65].

Bifidobacterium mają zdolność do dekonjugacji kwasów żółciowych, do redukcji nitrozoamin oraz do zmniejszenia rozkładu azotanów [34].

Wykazano, że spożywanie produktów mlecznych poddanych fermentacji i dodatkowo wzbogaconych bakteriami z rodzaju *Bifidobacterium*, prowadzi do zmniejszenia stężenia cholesterolu obecnego w surowicy. Podanie pacjentom z hypercholesteriemią sfermentowanego mleka z dodatkiem *Bifidobacterium* w ilości 10^9 j.t.k./g, obniżyło poziom całkowitego cholesterolu z 3 do 1.5 g/ml [34].

Na podstawie badań prowadzonych w ciągu ostatnich dwudziestu lat, głównie na zwierzętach laboratoryjnych, wykazano, że bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* posiadają właściwości przeciwnowotworowe, zabezpieczające przed powstaniem nowotworów zarówno jelita grubego jak i innych narządów. Zahamowanie rozwoju raka wątroby u myszy potwierdzono w przypadku gatunków *B. longum* i *B. infantis*. To działanie antykancerogenne

może być wynikiem: (1) ukierunkowanej supresji prokancerogenów, poprzez blokowanie niektórych enzymów, takich jak: β -glukoronidaza, azoreduktaza i nitroreduktaza, katalizujących reakcje przemiany prokancerogenów w kancerogeny (potwierdzono to w badaniach klinicznych prowadzonych na ludziach w przypadku gatunku *B. bifidum*); (2) aktywacji układu immunologicznego gospodarza; (3) redukcji pH wewnątrz jelit [34, 65, 66, 67].

Bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* mogą wykazać skuteczność, zarówno w prewencji, jak i leczeniu zaburzeń układu pokarmowego. Bakterie te były stosowane w przypadku biegunek o różnym podłożu np. biegunka poantybiotykowa, biegunki wywołane przez rotawirusy oraz tzw. biegunki podróżnych, a także przy wzdęciach i w przewlekłych zaparciach szczególnie częstych u osób starszych jak i u kobiet w ciąży, jednakże ich wartość wymaga udokumentowanych kontrolowanych badań klinicznych [34, 54, 55, 68, 69].

I. 8. KONCEPCJA PROBIOZY

Ogromne znaczenie w utrzymaniu zdrowia i prawidłowego funkcjonowania organizmu człowieka ma zarówno nabłonek, działający jak naturalna bariera dla patogenów, antygenów i toksyn (obecność ścisłych połączeń pomiędzy komórkami, sekrecja śluzu, produkcja przeciwciał klasy IgA oraz wielu antybakteryjnych substancji, takich jak laktoferryne), jak również naturalna mikroflora, zasiedlająca powierzchnie nabłonkowe i zapewniająca tym samym tzw. „oporność kolonizacyjną” [43, 70, 71, 72]. W momencie zniszczenia komórek nabłonkowych lub zachwiania równowagi prawidłowej mikroflory, zakłóceniu ulegają mechanizmy obronne organizmu oraz wzrasta przepuszczalność śluzówek, co powoduje inwazję patogenów, a w konsekwencji zakażenie [73].

Korzystny wpływ prawidłowej flory jelitowej na czynność przewodu pokarmowego oraz przemiany ogólnoustrojowe jest szeroko poznany (m.in. synteza witamin, uczestnictwo w procesach trawienia i wchłaniania, ochrona przed patogenami i ich toksynami, pobudzanie układu immunologicznego oraz działanie antykancerogenne). To wielokierunkowe, korzystne oddziaływanie prawidłowej flory bakteryjnej na czynność jelit sprawiło, że w ostatnich latach znacznie wzrosło zainteresowanie profilaktyką i terapią chorób przewodu pokarmowego przez przywrócenie równowagi mikrobiologicznej organizmu [52, 74, 75, 76]. Korzystny efekt można osiągnąć poprzez podanie preparatów w skład których wchodzi żywe mikroorganizmy, tzw. probiotyki, jak również, poprzez podanie substancji stymulujących rozwój naturalnej mikroflory gospodarza, tzw. prebiotyków, których przykładem może być fruktooligosacharyd (FOS), lub transgalaktozydaza. Stosuje się również specjalnie spreparowane mieszaniny złożone z probiotyków, jak i prebiotyków, nazywane synbiotykami [73, 76, 77, 78, 79, 80]. Naturalnym wzorcem synbiotyku jest pokarm kobiecy, gdyż zawiera obok bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* znaczną ilość oligosacharydów (średnio 15.5 g/l) [61, 81]. Rozważa się również użycie nie tylko

całych żywych mikroorganizmów jako probiotyków, ale także odpowiednio zabitych szczepów bakterii, a nawet tylko niektórych fragmentów wyizolowanych z ich komórek np. kwasów lipotejchowych [82].

Już w 1892 roku Döderlein wskazał na ochronne działanie bakterii kolonizujących pochwę, dzięki wydzielaniu przez nie kwasu mlekowego [83]. Z kolei w 1908 Miecznikow wykazał, że użycie pewnych gatunków bakterii, może mieć zastosowanie zarówno profilaktyczne, jak i lecznicze w przypadku niektórych chorób nękających człowieka [84].

Termin probiotyk pochodzi z języka greckiego i oznacza „dla życia”. Po raz pierwszy termin ten użyli Lilley i Stillwel w 1965 roku do opisu substancji wytwarzanych przez mikroorganizmy, stymulujących wzrost zwierząt i człowieka. Fuller w 1989 roku zdefiniował probiotyki jako „żywe, mikrobiologiczne uzupełnienie pokarmu”, które wywiera korzystny efekt na organizm gospodarza, przez podniesienie jego równowagi mikrobiologicznej [85, 86, 87, 88]. Obecnie probiotyki definiuje się jako pojedyncze lub złożone hodowle żywych mikroorganizmów, które wprowadzone do organizmu, wywołują korzystny efekt przez przywrócenie równowagi miejscowej mikroflory [73, 81].

Pomimo bezpiecznego stosowania już od ponad 3 tysięcy lat w diecie człowieka sfermentowanych produktów mlecznych, dopiero w latach 60-tych XX wieku podjęto pierwsze próby leczenia ludzi odpowiednimi produktami zawierającymi szczepy bakterii probiotycznych [82]. Wobec wzrastającej liczby powikłań w przebiegu antybiotykoterapii od lat 70-tych obserwujemy rozwój wiedzy i profilaktyki w zakresie stosowania probiotyków [67, 81].

Aby dany szczep bakterii został uznany za probiotyk powinien spełniać określone wymagania:

1. Zgodność gatunkowa - probiotyki stosowane dla ludzi powinny być ludzkiego pochodzenia, gdyż probiotyki izolowane od zwierząt i zastosowane u człowieka są znacznie mniej efektywne [88].
2. Precyzyjne określenie rodzaju i gatunku, potwierdzone najnowszymi badaniami molekularnymi [88, 89].
3. Zdolność do przeżycia w niekorzystnych warunkach przewodu pokarmowego bądź moczowo-płciowego, a zatem podwyższona oporność na niskie pH, na obecność żółci, lub różnego typu kwasy organiczne [82, 90, 91, 92].
4. Zdolność do adherencji (przylegania) do komórek nabłonkowych gospodarza i śluzu je pokrywającego; kolonizacja oraz stabilizacja naturalnej mikroflory [88, 91, 93, 94, 95, 98].
5. Stymulowanie odpowiedzi ze strony układu immunologicznego człowieka [59, 92, 96].

Wykazano pobudzanie odpowiedzi zapalnej przez niektóre szczepy probiotyczne, na drodze aktywacji komórek NK i makrofagów (wydzielanie TNF-a i IL-1), a także poprzez

zwiększenie ekspresji genów dla IL-8, TNF- α i GM-CSF, pobudzanie limfocytów do produkcji INF- γ oraz stymulację odpowiedzi humoralnej ustroju (wzrost produkcji IgA wydzielniczej) [67, 97, 98, 99].

6. Aktywność antagonistyczna w stosunku do drobnoustrojów patogennych polegająca na produkcji substancji antagonistycznych, hamujących ich rozwój. Wśród tych związków za najważniejsze uważa się: kwasy organiczne, aldehyd octowy, nadtlenek wodoru oraz bakteriocyny [73, 92, 100, 101].
7. Całkowity brak patogenności szczepów probiotycznych w stosunku do organizmu gospodarza. Nie wytwarzanie substancji toksycznych, związków mutagennych lub kancerogennych oraz nie wywoływanie reakcji alergicznych w organizmie człowieka [88, 92].
8. Potwierdzone działanie probiotyczne w prawidłowo przeprowadzonych badaniach klinicznych [88, 92].

Bakterie probiotyczne, szczególnie z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, znalazły szerokie zastosowanie, zarówno w przemyśle spożywczym (między innymi w produkcji jogurtów, różnego rodzaju serów, kapusty kiszanej), jak i farmaceutycznym (produkcja preparatów zawierających szczepy wybranych bakterii) [3, 52].

Probiotyki można stosować profilaktycznie, w celu zapobiegania kolonizacji organizmu gospodarza przez drobnoustroje patogenne, jak i leczniczo w celu przywrócenia naturalnego składu mikroflory, między innymi: po przebytych zakażeniach jelitowych, po terapii antybiotykowej, po zadziałaniu tak zwanych czynników stresowych, w biegunkach noworodków oraz w tak zwanych biegunkach podróżnych, w przypadku infekcji wywołanych przez bakterie z rodzaju *Shigella* lub *Salmonella* oraz w trakcie przewlekłego zaparcia. Probiotyki są również wykorzystywane w celu zmniejszenia objawów nietolerancji na laktozę lub innych alergii pokarmowych. Korzystny wpływ probiotyków możliwy jest także w przypadku stanów zapalnych pochwy, w chorobach wątroby spowodowanych przez nadużywanie alkoholu oraz w niektórych chorobach nowotworowych [82, 88, 90, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112].

Na świecie jest zaledwie kilkanaście, dobrze scharakteryzowanych szczepów probiotycznych, z czego większość należy do grupy bakterii kwasu mlekowego. Najczęstsze gatunki to: *Lactobacillus acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. reuteri*, *Bifidobacterium adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum*, *B. infantis*, *Streptococcus thermophilus* oraz *Saccharomyces boulardii* [113, 114].

Probiotyki są szczególnie rozpowszechnione w niektórych, wysoko rozwiniętych krajach. Na przykład w Japonii od lat stosuje się preparat parafarmaceutyczny firmy Yacult, który zawiera szczep Shirota, należący do gatunku *Lactobacillus casei* o ściśle zdefiniowanych

właściwościach, potwierdzonych badaniami klinicznymi. W USA i Finlandii w powszechnym użyciu są różne preparaty probiotyczne firmy Valio, zawierające szczep *Lactobacillus* GG, nazwany inicjałami odkrywców (Goldin i Gorbach), należący do gatunku *Lactobacillus rhamnosus*. W Szwajcarii firma Nestle wzbogaca swoje produkty szczepem *L. johnsonii* LC-1, zaś w Szwecji Biogaia Biologics wykorzystuje szczep *L. reuteri* [36, 102].

Od kilku lat prowadzone są badania nad pewnymi wyselekcjonowanymi szczepami bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* w celu wykazania i potwierdzenia ich dobroczynnego wpływu na organizm gospodarza. W przeprowadzonych randomizowanych badaniach klinicznych z podwójnie ślepą próbą i placebo, udało się potwierdzić korzystne działanie szczepów *B. bifidum* (BB 4007) oraz *B. breve* YIT (4010 BBG) na organizm człowieka. Szczepy te przyczyniają się do wyleczenia choroby wrzodowej, poprzez stymulację komórek ściany żołądka do syntezy tzw. nabłonkowego czynnika wzrostu i zasadowego czynnika pobudzającego wzrost fibroblastów. Poza tym udowodniono ich udział w leczeniu biegunek rotawirusowych oraz w przywracaniu równowagi flory jelitowej [99, 115, 116].

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

Polski rynek farmaceutyczny posiada w swojej ofercie następujące preparaty zawierające w swym składzie bakterie z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*:

1. Lakcid, Lakcid forte [Biomed-Lublin] - liofilizowana zawiesina bakterii *L. rhamnosus*,
2. Lacidofil [Merk] - liofilizowana zawiesina bakterii *L. acidophilus* oraz *L. rhamnosus*.
3. Lactovaginal [Biomed S.A.] - liofilizowana zawiesina bakterii *L. rhamnosus*
4. Laciurn [Zdrovit] - liofilizowana zawiesina bakterii *L. plantarum*
5. Nutrilac [Agropharm] - liofilizowana zawiesina bakterii *L. rhamnosus*
6. Nutriplant [Agropharm] - liofilizowana zawiesina bakterii *L. plantarum*
7. Trilac [Allergon AB] - liofilizowana zawiesina bakterii *L. acidophilus*, *L. delbreckii* subsp. *bulgaricus* oraz *B. bifidum* [117].

I. 9. DZIAŁANIE SZKODLIWE

O szkodliwy wpływ na organizm gospodarza podejrzewa się jeden z gatunków *Bifidobacterium* początkowo klasyfikowany jako *Actinomyces eriksoni*, później *Bifidobacterium ericsoni*, a ostatecznie zidentyfikowany jako *B. dentium*. Prawdopodobnie gatunek ten jest oportunistycznym patogenem wchodzącym w skład mikroflory jamy ustnej. Został on wyizolowany z ropni płuc, z płynu opłucnowego oraz ze zmian próchnicznych, a także z kału dorosłych oraz z pochwy. Inne gatunki z rodzaju *Bifidobacterium*, takie jak: *B. longum*, *B. adolescentis* i *B. breve* są sporadycznie izolowane z materiałów klinicznych pobieranych

z ropni lub zakażeń dróg moczowych, a ich patogenność nie została jak do tej pory udowodniona [2, 31, 40, 118].

Niektóre szczepy należące do gatunków: *B. bifidum*, *B. longum* i *B. infantis* potrafią rozkładać ludzką mucynę dzięki obecności sialidazy, β -galaktozydazy, β -N-acetylglikoz-aminidazy, β -N-acetylgalaktozaminidazy, arylostazy i α -glukozydazy [37]. Mucyna jest glikoproteiną ($1.8-16 \times 10^6$ Da) budującą śluz pokrywający śluzówkę jelit. Monosacharydy powstałe na skutek rozkładu mucyny stymulują wzrost *Bifidobacterium*, jednakże mogą również stymulować wzrost bakterii potencjalnie patogennych, które same nie potrafią jej rozłożyć. Proces ten może również osłabić ochronną rolę mucyny w stosunku do jelit. Szacuje się, że około 1% bakterii wchodzących w skład prawidłowej flory jelit potrafi zdegradować mucynę [36, 48].

Tabela 1: Materiały biologiczne, z których wyizolowano trzynaście gatunków *Bifidobacterium* kolonizujących organizm człowieka [2, 13, 16, 31].

Nr	Gatunek	Materiał
1	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	kał noworodków i dorosłych, wymaz z pochwy
2	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	kał noworodków i dorosłych, ścieki
3	<i>Bifidobacterium infantis</i> synonim <i>B. liberorum</i> lub <i>B. lactentis</i>	kał noworodków, wymaz z pochwy
4	<i>Bifidobacterium breve</i> synonim: <i>B. parvolulorum</i>	kał noworodków, wymaz z pochwy, ścieki
5	<i>Bifidobacterium longum</i>	kał noworodków i dorosłych, wymaz z pochwy, ścieki
6	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	kał noworodków i dorosłych, wymaz z pochwy, ścieki
7	<i>Bifidobacterium dentium</i>	kał noworodków i dorosłych, wymaz z pochwy, wymaz z jamy ustnej
8	<i>Bifidobacterium angulatum</i>	kał dorosłych, ścieki
9	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	kał noworodków, ścieki
10	<i>Bifidobacterium gallicium</i>	kał dorosłych
11	<i>Bifidobacterium inoptinatum</i>	wymaz z jamy ustnej
12	<i>Bifidobacterium denticolens</i>	wymaz z jamy ustnej
13	<i>Bifidobacterium scardovii</i>	kał dorosłych

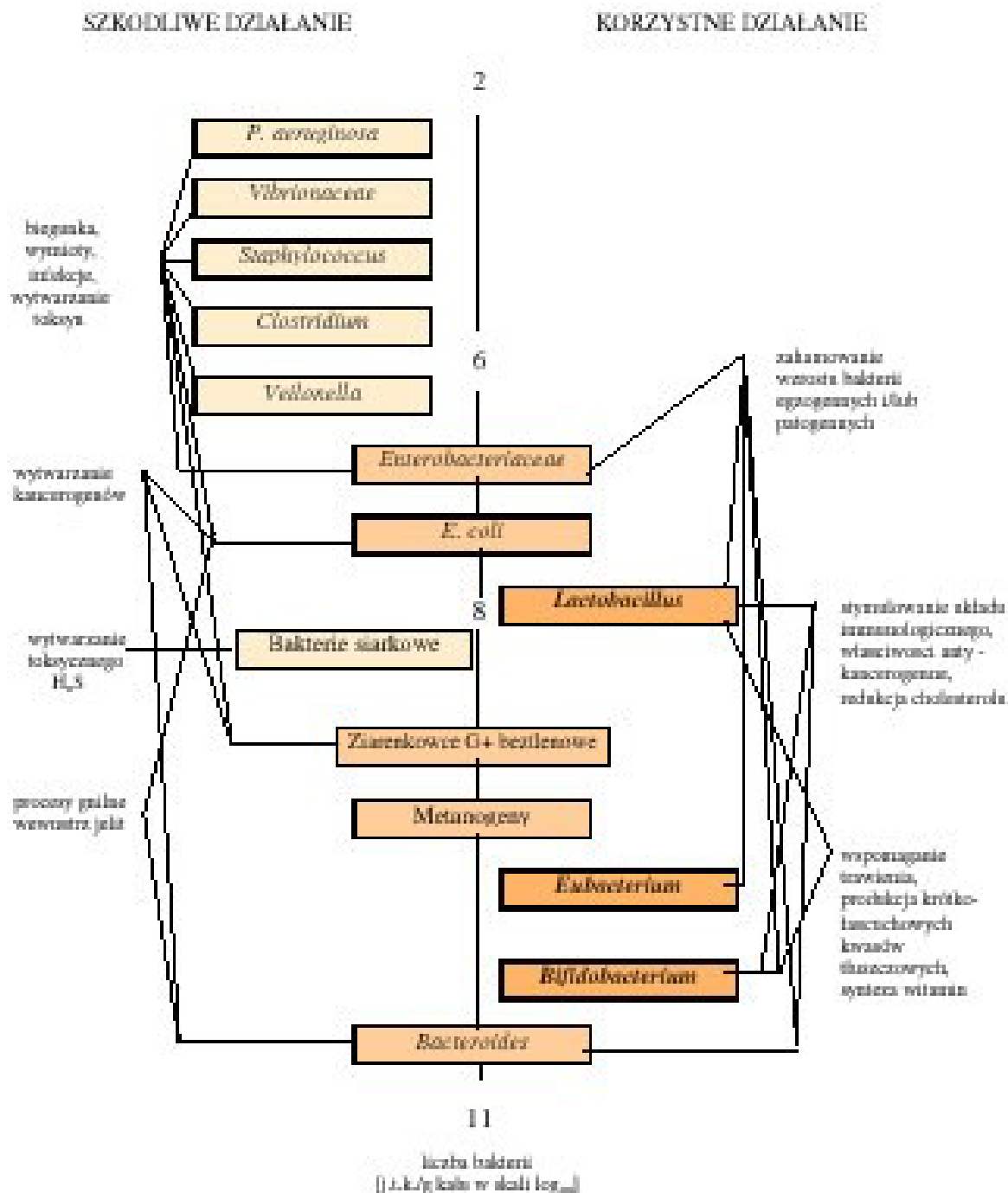
Tabela 2: Występowanie bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* w organizmie człowieka [2, 13, 31].

Miejsce występowania		Gatunek
Jama ustna		<i>Bifidobacterium dentium</i> <i>Bifidobacterium inoptinatum</i> <i>Bifidobacterium denticolens</i>
Jelito cienkie		<i>Bifidobacterium</i> sp.
Okrężnica	Dziecko	<i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Bifidobacterium longum</i> <i>Bifidobacterium infantis</i> <i>Bifidobacterium breve</i> <i>Bifidobacterium dentium</i> <i>Bifidobacterium catenulatum</i> <i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>
	Dorosły	<i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Bifidobacterium longum</i> <i>Bifidobacterium adolescentis</i> <i>Bifidobacterium angulatum</i> <i>Bifidobacterium catenulatum</i> <i>Bifidobacterium dentium</i>
Pochwa		<i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Bifidobacterium infantis</i> <i>Bifidobacterium breve</i> <i>Bifidobacterium dentium</i> <i>Bifidobacterium catenulatum</i> <i>Bifidobacterium longum</i>
Szyjka macicy		<i>Bifidobacterium</i> sp.

Tabela 3: Występowanie gatunków *Bifidobacterium* w ludzkiej okrężnicy w zależności od wieku [2].

Populacja	Gatunek
Noworodki karmione mlekiem matki	<i>Bifidobacterium longum</i> <i>Bifidobacterium infantis</i> <i>Bifidobacterium breve</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i>
Noworodki karmione sztucznym pokarmem	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i>
Dzieci	<i>Bifidobacterium infantis</i> <i>Bifidobacterium breve</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Bifidobacterium longum</i>
Dorośli w wieku średnim	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Bifidobacterium longum</i>
Dorośli w podeszłym wieku	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> <i>Bifidobacterium longum</i>

Ryc. 1: Występowanie dominujących grup bakterii jelitowych o potencjalnie szkodliwym lub korzystnym oddziaływaniu [86].



II. CELE PRACY

Celem niniejszej rozprawy było:

1. Utworzenie kolekcji szczepów bakterii pochodzenia ludzkiego należących do rodzaju *Bifidobacterium*.
2. Określenie przynależności taksonomicznej badanych szczepów wchodzących w skład utworzonej kolekcji przy pomocy metod fenotypowych (podstawowych i szczegółowych) oraz genotypowych (PCR, FISH) i ich porównanie.
3. Zbadanie zakresu właściwości antagonistycznych badanych szczepów *Bifidobacterium*, względem drobnoustrojów patogennych dla przewodu pokarmowego, a także gatunków wchodzących w skład jego naturalnej mikroflory.
4. Oznaczenie właściwości powierzchniowych bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*, takich jak: hydrofobowość, produkcja śluzu oraz zdolności przylegania do komórek linii komórkowych Caco-2 i HT-29, będących odpowiednikiem ludzkich enterocytów.
5. Określenie stopnia oporności badanych szczepów *Bifidobacterium* na różne stężenia soli kwasów żółciowych.
6. Zbadanie wrażliwości szczepów pochodzących z utworzonej kolekcji na niektóre powszechnie stosowane antybiotyki.

III. DROGI KOLONIZACJI NOWORODKÓW KARMIONYCH MLEKIEM MATKI PRZEZ BAKTERIE Z RODZAJU *BIFIDOBACTERIUM*

III. 1. WPROWADZENIE

Z badań nad wczesną kolonizacją noworodków wynika, że w chwili rozpoczęcia porodu jego jama ustna oraz przewód pokarmowy są jałowe. Jednak od tego momentu powierzchnia ciała człowieka oraz błony śluzowe jam ciała mają stały kontakt ze środowiskiem zewnętrznym i narażone są na kolonizację przez różne drobnoustroje, między innymi: bakterie, wirusy i grzyby. Już w czasie porodu oraz w pierwszych godzinach życia, następuje kolonizacja noworodka mikroorganizmami pochodzącymi z dróg rodnych, skóry oraz jamy ustnej matki, a także z pokarmu, powietrza oraz rąk personelu medycznego. Nabywanie flory bakteryjnej polega na sukcesywnym zasiedlaniu przez mikroorganizmy miejsca ich potencjalnej kolonizacji. Pierwsze zasiedlające mikroorganizmy, nazywane gatunkami pionierskimi, w przeciągu czasu zostają zastąpione przez florę ostateczną [45, 119].

Wiele gatunków mikroorganizmów można wyizolować z kału noworodków już pierwszego dnia ich życia, przy czym bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* można wykryć już drugiego dnia po porodzie [31, 120, 121].

Istnieje wiele kontrowersji na temat pochodzenia bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* w przewodzie pokarmowym noworodków. Jako ich potencjalne źródło, z którym dziecko może mieć kontakt w czasie porodu, podawany jest odbyt matczyny. Być może jest to prawdą w sytuacjach oddalonych od nowoczesnej opieki zdrowotnej, jednakże w szpitalach z wysokim poziomem higieny źródło to wydaje się być mało prawdopodobne. Drugim, znacznie bardziej prawdopodobnym źródłem kolonizacji noworodków przez szczepy *Bifidobacterium* jest pochwa matki [31]. Wielokrotnie wykazano, że najbardziej istotny wpływ na wczesną kolonizację noworodków ma sposób porodu. Dzieci urodzone siłami natury są w sposób dominujący skolonizowane bakteriami z rodzaju *Bifidobacterium*, w przeciwieństwie do dzieci urodzonych przez cesarskie cięcie, u których to w początkowym okresie życia dominują bakterie z rodzaju *Bacteroides* [121].

Badania epidemiologiczne sugerują, że występuje lokalne środowiskowe źródło *Bifidobacterium* w każdym nowoczesnym szpitalu położniczym. Dowodem na to jest fakt, że zarówno dzieci urodzone w sposób naturalny, jak i dzieci urodzone przez cesarskie cięcie oraz dzieci karmione mlekiem matki lub produktami je zastępującymi, wszystkie z nich w obrębie jednego szpitala są skolonizowane tymi samymi gatunkami *Bifidobacterium* [32].

Zaobserwowano, że nabywanie tych mikroorganizmów może u niektórych noworodków być opóźnione, u innych zaś mogą się one w ogóle nie pojawić nawet do drugiego miesiąca życia. Na podstawie tych danych stwierdzono, że istnieje indywidualny „czynnik dziecięcy”

(ang. baby factor), który determinuje obecność lub brak *Bifidobacterium* u noworodków, co może być związane z dojrzałością ich przewodu pokarmowego, ponieważ zaobserwowano, że u dzieci przedwcześnie urodzonych następuje wstrzymanie tej kolonizacji [31].

B. bifidum, *B. infantis*, *B. longum* oraz *B. breve* są najczęściej spotykanymi gatunkami izolowanymi z kału noworodków. Inne gatunki takie jak: *B. adolescentis* oraz *B. pseudocatenulatum* są znacznie rzadziej spotykane u noworodków, natomiast kolonizują szczególnie osoby w podeszłym wieku [32, 122, 123]. Już w 1967 roku Gorbach i wsp. wykazali, że starsi ludzie są w znacznie mniejszym stopniu skolonizowani bakteriami z rodzaju *Bifidobacterium* niż dzieci [124].

Noworodki często zawierają w swoim przewodzie pokarmowym dwa lub trzy różne gatunki *Bifidobacterium*, jednakże, jak się okazuje na podstawie wspomnianych już wcześniej badań, wszystkie dzieci urodzone w jednym oddziale posiadają te same dominujące gatunki, co sugeruje, że szczepy *Bifidobacterium* mogą być przenoszone pomiędzy dziećmi w danej klinice na rękach personelu medycznego. Skład gatunków *Bifidobacterium* występujących w przewodzie pokarmowym jest dynamiczny i może się zmieniać, np. niektóre gatunki zanikają, a następnie pojawiają się ponownie w przeciągu czasu, na co wpływ ma prawdopodobnie: zmiana diety, środowisko domowe, odpowiednia higiena oraz inne, bliżej nieokreślone tzw. „czynniki gospodarza” (ang. host factors) [31].

Raz ustanowione bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* stają się stałym składnikiem flory kałowej niemowląt karmionych mlekiem matki, jak i sztucznym pokarmem. W stanie stabilizacji flory kałowej, który następuje około pierwszego miesiąca po narodzinach, w przewodzie pokarmowym dzieci karmionych mlekiem matczynym, bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* dominują, osiągając poziom 10^{10} - 10^{11} j.t.k./g treści jelitowej i znacząco przewyższają swą liczbą ilość innych bakterii beztlenowych [32, 121]. Obserwacje prowadzone na grupie 12 noworodków karmionych mlekiem matki przez pierwszy rok życia, wykazały stałą dominację bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* nad innymi mikroorganizmami. Zaobserwowano również różnice w składzie flory jelitowej u noworodków z tak zwanych „ciąży donoszonych”, w porównaniu z dziećmi przedwcześnie urodzonymi. U dzieci donoszonych dominowały bakterie należące do omawianego rodzaju, których często brakowało u wcześniaków [1, 121].

Różnorodność flory jamy ustnej oraz przewodu pokarmowego noworodków zależy w dużej mierze do substancji egzogennych dostarczanych wraz z dietą dziecka. U dzieci karmionych spreparowanym pokarmem, w stosunkowo większej liczbie występują bakterie z rodzaju *Bacteroides* oraz *E. coli*, niż u dzieci karmionych tylko mlekiem matczynym, u których dominują bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* [31, 32, 125].

Przypuszcza się, że zaburzenia kolonizacji w wieku niemowlęcym mogą być przyczyną różnego rodzaju chorób układu pokarmowego, między innymi: chorób zanikowych jelit, a także martwiczego zapalenia jelit [45, 111, 119, 121, 126].

III. 2. MATERIAŁY I METODY

Materiały do badań mikrobiologicznych pobrano od ośmiu matek i ich dzieci z Oddziału Ginekologiczno - Położniczego Szpitala Klinicznego Ministerstwa Zdrowia i Administracji Kraju w Krakowie (współpraca nawiązana w ramach projektu Nr 4PO5F01299C z Komitetu Badań Naukowych). Materiały pobierane były od zdrowych kobiet i ich zdrowych dzieci karmionych piersią. Kwalifikacji osób dokonywał lekarz na podstawie oceny stanu zdrowia pacjentek, wykluczając jednocześnie te, które do trzech miesięcy przed porodem były poddane antybiotykoterapii.

III. 2. 1. Schemat pobierania materiałów od pacjentek i ich dzieci

1. Materiały pobierane od matek w dniu przyjęcia do szpitala (przed porodem)

Symbol 10: wymaz ze skóry okolicy okołosutkowej ⇒ skóry nie przemywano alkoholem

Symbol 11: mleko matki (siara) ⇒ przed pobraniem skórę przemywano alkoholem

2. Materiały pobierane w trakcie akcji porodowej i zaraz po jej zakończeniu

Symbol 12: materiał pobrany z pochwy przed pęknięciem pęcherza płodowego

Symbol 13: materiał pobrany z pochwy po pęknięciu pęcherza płodowego

Symbol 14: wymaz ze skóry okolicy klatki piersiowej matki ⇒ skóry nie przemywano alkoholem

Symbol 20: materiał z jamy ustnej noworodka, pobrany w trakcie zabiegu odsysania

Symbol 22: smółka (jeśli dziecko oddało przy porodzie)

Symbol 24: wymaz ze skóry twarzy dziecka (policzki) w dniu narodzin ⇒ skóry nie przemywano alkoholem

3. Materiały pobierane po porodzie

3. 1. Materiały pobierane w pierwszej dobie po porodzie

Symbol 15: mleko matki (po rozpoczęciu karmienia piersią) ⇒ przed pobraniem skórę przemywano alkoholem

Symbol 16: materiał pobrany ze skóry okolicy okołosutkowej matki (po rozpoczęciu karmienia piersią) ⇒ skóry nie przemywano alkoholem

Symbol 21: wymaz z jamy ustnej dziecka po jednodniowym karmieniu piersią

Symbol 22: smółka (o ile dziecko nie oddało smółki przy porodzie)

Symbol 23: kał noworodka, który był już kilkakrotnie karmiony piersią

3. 2. Materiały pobierane w dniu wypisu ze szpitala

Symbol 25: wymaz ze skóry twarzy (policzki) dziecka w ostatnim dniu pobytu w szpitalu

⇒ skóry nie przemywano alkoholem

III. 2. 2. Transportowanie materiałów i hodowla bakterii

Materiały umieszczano w specjalnych podłożach transportowych Port-A-Cul [BBL]. Następnie, w ciągu 24 godz. od pobrania, materiały wysiewano metodą redukcyjną na stałe podłoże BL - Glucose Liver Agar zalecane do namnażania bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* [127]. Hodowlę bakterii przeprowadzano w 37°C w warunkach beztlenowych, w anaerostatach z generatorami gazu $H_2 + CO_2$ firmy Linegal Chemicals GmbH lub w systemie do hodowli bakterii beztlenowych N_2 Modular Atmosphere Controlled System [Don Whitley Scientific Limited] przez 48 godz. Wyizolowane szczepy bakterii poddawano następnie identyfikacji mikrobiologicznej przy zastosowaniu metod fenotypowych i genotypowych (patrz: Rozdział V).

III. 3. WYNIKI Z ICH OMÓWIENIEM

W toku przeprowadzonych badań okazało się, że liczba wyizolowanych szczepów *Bifidobacterium* w pobranych materiałach była stosunkowo niewielka, gdyż na 96 materiałów, pobranych z różnych miejsc od ośmiu matek i ich dzieci wyizolowano i oznaczono zaledwie 17 szczepów *Bifidobacterium* [Tabela 4].

Wysiewanie pobranych materiałów w kierunku *Bifidobacterium* przy pomocy metody redukcyjnej, okazało się nie do końca właściwe. W późniejszej pracy z tymi bakteriami wykazano, że znacznie lepsze efekty otrzymywano po wysianiu materiałów metodą kolejnych rozcieńczeń, która to dawała możliwość wyizolowania znacznie większej liczby różnych pod względem morfologicznym kolonii, a co za tym idzie, nie pomijania tych, które występowały w niewielkiej ilości w badanym materiale.

Kolejnej przyczyny takich wyników należy dopatrywać się prawdopodobnie w fakcie, iż bakterie należące do omawianego rodzaju, dominują w składzie naturalnej flory przewodu pokarmowego noworodków dopiero około siódmego dnia życia [110], a w niniejszym badaniu materiały były pobierane od dzieci przeważnie w trzech pierwszych dobach życia.

Tym niemniej podjęto próbę określenia dróg kolonizacji ośmiu noworodków przez bakterie z rodzaju *Bifidobacterium*. W tym celu rozpatrzono różne możliwości dróg kolonizacji dzieci: przez kontakt bezpośredni, drogą pokarmową oraz z niewiadomych źródeł. Zwrócono też uwagę na ewentualną kolonizację matki przez dziecko oraz na brak kolonizacji dziecka florą matki. W celu określenia dróg kolonizacji ośmiu badanych noworodków przez szczepy bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*, porównywano każdorazowo 8 niezależnych par matka - dziecko.

Rozważane drogi kolonizacji noworodków przez szczepy *Bifidobacterium*:

- 1. Kolonizacja poprzez kontakt bezpośredni**
 - a) Przejście przez kanał rodny:** bakterie kolonizujące pochwę i izolowane z jamy ustnej, skóry policzków i smółki dziecka (materiały pobrane w dniu narodzin).
 - b) Położenie dziecka na brzuchu matki:** bakterie kolonizujące skórę klatki piersiowej matki i izolowane ze skóry policzków dziecka w dniu narodzin.
- 2. Kolonizacja drogą pokarmową**
 - a) Ze skóry matki:** bakterie kolonizujące skórę okolic okołosutkowych matki i izolowane z jamy ustnej dziecka po jednodniowym karmieniu, ze smółki i kału noworodka.
 - b) Z mleka matki:** bakterie obecne w mleku matki i izolowane z jamy ustnej dziecka po jednodniowym karmieniu, ze smółki i kału noworodka.
- 3. Przeniesienie bakterii z dziecka na matkę:** bakterie kolonizujące jamę ustną dziecka po jednodniowym karmieniu i izolowane ze skóry okolic okołosutkowych matki.
- 4. Kolonizacja dziecka z niewiadomych źródeł:** bakterie kolonizujące dziecko nie wyizolowane z materiałów pobranych od matki, izolowane ze skóry twarzy dziecka, z jamy ustnej oraz z kału noworodków.
- 5. Brak kolonizacji dziecka florą matki:** bakterie kolonizujące matkę, a nie wyizolowane z materiałów pobranych od dziecka.

Na podstawie otrzymanych wyników wykazano, że kolonizacja noworodków przez bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* odbywa się między innymi poprzez kontakt bezpośredni z matką, a mianowicie w czasie porodu przy przejściu przez kanał rodny, a następnie drogą pokarmową bakterie te przekazywane są wraz z pokarmem matki.

Kolonizację pochwy przez bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* wykazano u trzech (37,5%) na osiem badanych matek. Z kolei, tylko u jednej pacjentki (12,5%) potwierdzono występowanie tych bakterii w pokarmie. Zastanawiającym jest fakt, iż u 7 na 8 badanych noworodków wykazano kolonizację przez szczepy *Bifidobacterium*, których to nie udało się wyizolować od ich matek (*Bifidobacterium* sp., *B. bifidum*, *B. longum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. adolescentis*). Być może jest to potwierdzeniem teorii, która mówi o lokalnym środowiskowym źródle szczepów *Bifidobacterium* obecnym w każdym nowoczesnym szpitalu położniczym [32]. Możliwe, że wykazana kolonizacja była efektem zabiegów opiekuńczych personelu medycznego, z którym dzieci miały kontakt, a wyizolowane szczepy mogły pochodzić od innych dzieci obecnych wówczas na Oddziale.

Tabela 4: Kolonizacja ośmiu pacjentek i ich dzieci przez bakterie z rodzaju *Bifidobacterium*.
 Gatunek oznaczony przy wykorzystaniu metody PCR z zastosowaniem gatunkowo specyficznych starterów.

Numer pary: matka-dziecko	MATKA							DZIECKO					
	10-skóra z okolicy okołosutkowej przed porodem	14- skóra okolicy klatki piersiowej po porodzie	16-skóra z okolicy między-piersiowej po rozpoczęciu karmienia	11-mleko matki przed rozpoczęciem karmienia (siara)	15-mleko matki po rozpoczęciu karmienia	12-pochwa przed pęknięciem pęcherza płodowego	13-pochwa po pęknięciu pęcherza płodowego	24-skóra twarzy dziecka w dniu narodzin	25-skóra twarzy dziecka w dniu wypisu	20- jama ustna tuż po porodzie	21- jama ustna po jednodziennym karmieniu piersią	22- smółka noworodka	23- kał noworodka
1									<i>B. bifidum</i> <i>Bifidobacterium</i> sp.			Brak materiału	
2								<i>B.cathenu-latum</i>					
3					<i>Bifidobacterium</i> sp.	Brak materiału						<i>Bifidobacterium</i> sp	
4							Brak materiału						<i>B. bifidum</i> <i>B. longum</i>
5						Brak materiału	<i>Bifidobacterium</i> sp.						<i>B. breve</i>
6						<i>Bifidobacterium</i> sp.		Brak materiału	Brak materiału	<i>B. bifidum</i> <i>B. adole-scentis</i> <i>Bifidobacterium</i> sp.		<i>B. bifidum</i>	
7						<i>B. longum</i>				<i>B. adole-scentis</i>			
8								Brak materiału	Brak materiału		<i>B. longum</i>		

IV. UTWORZENIE KOLEKCJI SZCZEPÓW Z RODZAJU *BIFIDOBACTERIUM*

IV. 1. WPROWADZENIE

Mimo dużego rozpowszechnienia bakterii beztlenowych w organizmie człowieka izolacja, hodowla i identyfikacja bakterii należących do rodzaju *Bifidobacterium* jest skomplikowana i czasochłonna, dlatego też przeprowadzają ją tylko nieliczne, wyspecjalizowane laboratoria mikrobiologiczne.

W celu zapewnienia możliwie najlepszych warunków, do prawidłowo przeprowadzonej izolacji, powinny zostać spełnione następujące warunki:

1. Pobieranie i przesyłanie materiałów musi odbywać się w warunkach beztlenowych lub przy ograniczonym dostępie tlenu.
2. Posiew powinien odbywać się pod stałą osłoną gazu obojętnego, bądź przy krótkotrwałym wystawieniu na działanie powietrza.
3. Podłoża używane do hodowli powinny być świeżo przygotowane lub przechowywane w warunkach beztlenowych.
4. Należy zastosować odpowiednią metodykę hodowli, która powinna być prowadzona w mieszaninie gazów obojętnych przy równoczesnej kontroli warunków beztlenowych.
5. Izolacja pojedynczych kolonii musi być wykonana przy jak najkrótszym wystawieniu na działanie powietrza [128, 129].

Podczas sporządzania nowych pożywek lub udoskonalania już istniejących, ważne jest zachowanie odpowiedniego składu i proporcji związków wymaganych do wzrostu *Bifidobacterium*, uwzględniając w tym również: potencjał oksydo-redukcyjny, czynniki wzrostowe oraz antybakteryjne substancje wstrzymujące namnażanie się spokrewnionych gatunków bakterii, m.in.: *Lactobacillus*, *Propionibacterium* oraz *Actinomyces* [35].

Obecnie wciąż brakuje optymalnego podłoża, selektywnie namnażającego gatunki bakterii należące do omawianego rodzaju. Po raz pierwszy w 1956 roku Petuerly zaproponował podłoże hodowlane dla *Bifidobacterium* zawierające laktozę, amoniak, cysteinę, biotynę oraz kwas pantotenowy. Dwa lata później Gyllenberg i Carlberg wykazali, że ryboflawina oraz zasady kwasów nukleinowych są niezbędnymi składnikami pokarmowymi dla niektórych gatunków *Bifidobacterium*, niezbędnymi do ich prawidłowego wzrostu [35].

Rekomendowane podłoża służące do namnażania bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* to: Schaedler Anaerobe Agar, Tomato-Juice Agar, MRS Agar (de Man, Rogosa, Sharpe), Beerens Agar, Raffinose-Bifidobacterium (RB) Agar oraz bardzo bogate w składniki odżywcze składane podłoże Glucose Liver Agar - BL [120, 127, 130, 131, 132].

Niestety, wymienione podłoża nie są selektywne dla rodzaju *Bifidobacterium*, w związku z czym nie są przydatne do jego wybiórczej izolacji i namnażania. Na pożywkach tych rosną

także bakterie z rodzajów: *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus* i *Enterococcus*, wynikiem czego jest konieczność badania wszystkich typów morfologicznych kolonii obecnych na danej płycie, co znacznie wydłuża czas identyfikacji *Bifidobacterium* [2, 35].

Obecnie uważa się, że podłoże BL jest najbardziej optymalnym podłożem namnażającym bakterie z rodzaju *Bifidobacterium*. Zostało ono opisane po raz pierwszy przez Ochi i wsp. (1964), następnie przez Mitsuoka i wsp. (1965) i ostatecznie zmodyfikowane przez Teraguchi i wsp. (1978) [120, 127].

Niedawno zaproponowanym podłożem hodowlanym dla bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* jest agar Wilkins-Chalgren zawierający w swoim składzie 100 mg/l mupirocyny. Podłoże to ma umożliwiać izolację i liczenie szczepów *Bifidobacterium* między innymi z produktów mlecznych, natomiast wzrost szczepów *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* i *Streptococcus* jest wstrzymywany przez dodany do pożywki antybiotyk [133].

Bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* hodowane w płynnym podłożu rosną najczęściej w postaci jednorodnej zawiesiny lub w formie osadu na dnie probówki (Ryc. 2). Hodowane zaś na podłożu stałym rosną przeważnie jako gładkie, wypukłe kolonie, o regularnych brzegach, w kolorze kremowym lub białym, często połyskujące o delikatnej konsystencji (Ryc. 3) [2].

IV. 2. MATERIAŁY I METODYKA

IV. 2. 1. Pobieranie i transport materiałów

W ramach współpracy ze Szpitalem MSWiA w Krakowie (umowa nr 4PO5F01299C z Komitetu Badań Naukowych), mając na celu powiększenie tworzonej kolekcji, podjęto próbę izolacji szczepów *Bifidobacterium* z kału zdrowych noworodków karmionych mlekiem matki. Kwalifikacji dzieci dokonywał lekarz na podstawie oceny stanu zdrowia, wykluczając te, które z powodu infekcji poddano terapii antybiotykowej.

Materiały umieszczane były w probówkach z podłożem transportowo-wzrostowym „Anaeromedium T” [BIOMED]. Skład podłoża zapewniał właściwe środowisko do przeżycia bakterii bezwzględnie beztlenowych w próbkach kału, których transport nie trwał dłużej niż 10 godzin.

IV. 2. 2. Hodowla, izolacja i przechowywanie szczepów

W celu podniesienia skuteczności izolacji bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*, pobrane materiały były wysiewane przy pomocy metody kolejnych rozcieńczeń na stałe, bardzo bogate w składniki odżywcze podłoże składane Glucose Liver Agar - BL [127]. Wydłużono także czas inkubacji płytek do 72 godz. w 37°C w warunkach ściśle beztlenowych z wykorzystaniem anaerostatów firmy bioMérieux z generatorami gazu H_2+CO_2 firmy Lineal Chemicals GmbH.

W celu oznaczenia przynależności taksonomicznej wyizolowanych szczepów bakterii, poddawano je klasyfikacji z wykorzystaniem metod fenotypowych lub genotypowych (patrz: Rozdział V).

Szczepy zaklasyfikowane do rodzaju *Bifidobacterium* przechowywano następnie na szklanych kulkach zawieszonych w płynnym podłożu BL z dodatkiem 15% glicerolu w temp. -70°C.

IV. 3. WYNIKI Z ICH OMÓWIENIEM

Pomimo początkowych trudności z hodowlą, izolacją i identyfikacją bakterii należących do rodzaju *Bifidobacterium*, utworzono kolekcję liczącą 84 szczepy. Symbole poszczególnych szczepów, materiały z których zostały wyizolowane oraz ich pochodzenie zebrano w jednej tabeli (Tabela 5).

W skład utworzonej kolekcji szczepów z rodzaju *Bifidobacterium* wchodziły:

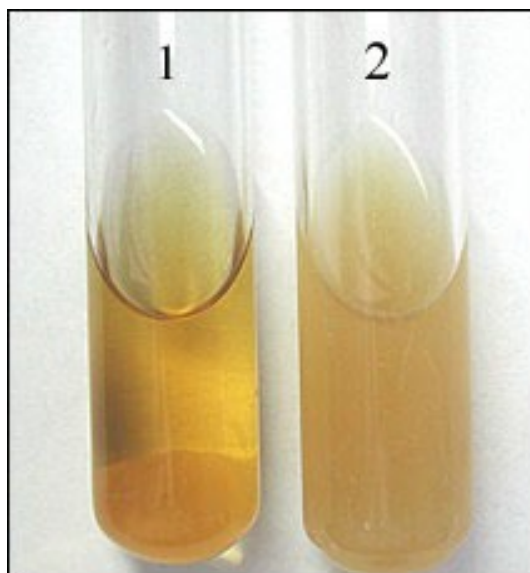
1. Szczepy wzorcowe sześciu gatunków reprezentujących rodzaj *Bifidobacterium* otrzymane z niemieckiej kolekcji - DSMZ [Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, GmbH]:
 - *B. adolescentis* DSMZ 20083 (Ryc. 4)
 - *B. animalis* DSMZ 20104 (Ryc. 5)
 - *B. breve* DSMZ 20213 (Ryc. 6)
 - *B. longum* DSMZ 20219 (Ryc. 7)
 - *B. bifidum* DSMZ 20456 (Ryc. 8)
 - *B. gallinarum* DSMZ 20670 (Ryc. 9)
2. Szczepy należące do kolekcji własnej Katedry Mikrobiologii CM UJ.
3. Szczepy wyizolowane z materiałów pobranych od ośmiu matek i ich dzieci (patrz: Rozdział III) z Oddziału Ginekologiczno - Położniczego Szpitala Klinicznego Ministerstwa Zdrowia i Administracji Kraju w Krakowie (współpraca nawiązana w ramach Projektu Nr 4PO5F01299C z Komitetem Badań Naukowych).
4. Szczepy wyizolowane z kału zdrowych noworodków karmionych mlekiem matki z Oddziału Ginekologiczno - Położniczego Szpitala Klinicznego Ministerstwa Zdrowia i Administracji Kraju w Krakowie (współpraca nawiązana w ramach projektu Nr 4PO5F01299C z Komitetu Badań Naukowych).

Tabela 5, część 1: Pochodzenie szczepów bakterii należących do rodzaju *Bifidobacterium* wchodzących w skład utworzonej kolekcji.

Nr	Szczep <i>Bifidobacterium</i>	MATERIAŁ	POCHODZENIE
1	20083	Liofilizat <i>B. adolescentis</i>	Kolekcja DSMZ
2	20104	Liofilizat <i>B. animalis</i>	Kolekcja DSMZ
3	20213	Liofilizat <i>B. breve</i>	Kolekcja DSMZ
4	20219	Liofilizat <i>B. longum</i>	Kolekcja DSMZ
5	20456	Liofilizat <i>B. bifidum</i>	Kolekcja DSMZ
6	20670	Liofilizat <i>B. gallinarum</i>	Kolekcja DSMZ
7	L III/5	Lactobif	Kolekcja własna Kat. Mikrob.CM
8	L III/7	Lactobif	Kolekcja własna Kat. Mikrob.CM
9	L IV	Lactobif	Kolekcja własna Kat. Mikrob.CM
10	B/K	Kał noworodka	Kolekcja własna Kat. Mikrob.CM
11	40 B	Kał noworodka	Szpital MSWiA Kraków
12	20 B	Kał noworodka	Szpital MSWiA Kraków
13	3/1	Kał noworodka	Szpital MSWiA Kraków
14	33 B	Kał noworodka	Szpital MSWiA Kraków
15	7/4	Kał noworodka	Szpital MSWiA Kraków
16	2/3	Kał noworodka	Szpital MSWiA Kraków
17	39 B	Kał noworodka	Szpital MSWiA Kraków
18	13/E/2	Kał noworodka	Szpital MSWiA Kraków
19	30 A	Kał noworodka	Szpital MSWiA Kraków
20	40 C	Kał noworodka	Szpital MSWiA Kraków
21	3	Kał noworodka	Szpital MSWiA Kraków
22	I/15/2	Mleko matki	Szpital MSWiA Kraków
23	III/15/2	Mleko matki	Szpital MSWiA Kraków
24	III/23/5/a	Kał noworodka	Szpital MSWiA Kraków
25	III/23/5/b	Kał noworodka	Szpital MSWiA Kraków
26	V/23/1	Kał noworodka	Szpital MSWiA Kraków
27	V/23/4	Kał noworodka	Szpital MSWiA Kraków
28	II/23/2	Kał noworodka	Szpital MSWiA Kraków
29	KI K/1	Kał noworodka	Szpital MSWiA Kraków
30	KI K/ 2	Kał noworodka	Szpital MSWiA Kraków
31	KI K/ 3	Kał noworodka	Szpital MSWiA Kraków
32	KI 20 D	Kał noworodka	Szpital MSWiA Kraków
33	KI 3/ I	Kał noworodka	Szpital MSWiA Kraków
34	KI 6 B	Kał noworodka	Szpital MSWiA Kraków
35	KI 1	Kał noworodka	Szpital MSWiA Kraków
36	KI 27 A	Kał noworodka	Szpital MSWiA Kraków
37	KI 7	Kał noworodka	Szpital MSWiA Kraków
38	KI 35 D	Kał noworodka	Szpital MSWiA Kraków
39	KI 30 C	Kał noworodka	Szpital MSWiA Kraków
40	KI 57 D	Kał noworodka	Szpital MSWiA Kraków
41	KI 31 A	Kał noworodka	Szpital MSWiA Kraków
42	KI 31 B	Kał noworodka	Szpital MSWiA Kraków

Tabela 5, część 2: Pochodzenie szczepów bakterii należących do rodzaju *Bifidobacterium* wchodzących w skład utworzonej kolekcji.

Nr	Szczep <i>Bifidobacterium</i>	MATERIAŁ	POCHODZENIE
43	Kl 33 C	Kał noworodka	Szpital MSWiA Kraków
44	Kl 2 A	Kał noworodka	Szpital MSWiA Kraków
45	Kl 29 E	Kał noworodka	Szpital MSWiA Kraków
46	Kl 38 C	Kał noworodka	Szpital MSWiA Kraków
47	Kl 13 D	Kał noworodka	Szpital MSWiA Kraków
48	Kl 39 B	Kał noworodka	Szpital MSWiA Kraków
49	Kl 25 A	Kał noworodka	Szpital MSWiA Kraków
50	Kl 36 A	Kał noworodka	Szpital MSWiA Kraków
51	Kl 36	Kał noworodka	Szpital MSWiA Kraków
52	Kl 26 B	Kał noworodka	Szpital MSWiA Kraków
53	Kl 30 A	Kał noworodka	Szpital MSWiA Kraków
54	Kl 66 A	Kał noworodka	Szpital MSWiA Kraków
55	Kl 23 E	Kał noworodka	Szpital MSWiA Kraków
56	Kl 28 a	Kał noworodka	Szpital MSWiA Kraków
57	Kl 1 B	Kał noworodka	Szpital MSWiA Kraków
58	Kl 63 A	Kał noworodka	Szpital MSWiA Kraków
59	Kl 66 C	Kał noworodka	Szpital MSWiA Kraków
60	Kl 36 B	Kał noworodka	Szpital MSWiA Kraków
61	Kl 59 A	Kał noworodka	Szpital MSWiA Kraków
62	2/1	Kał noworodka	Kolekcja własna Kat. Mikrob.CM
63	3/3	Kał noworodka	Kolekcja własna Kat. Mikrob.CM
64	37	Wymaz ze skóry twarzy dziecka	Szpital MSWiA Kraków
65	9	Wymaz z jamy ustnej dziecka	Szpital MSWiA Kraków
66	38 a	Wymaz ze skóry twarzy dziecka	Szpital MSWiA Kraków
67	38 b	Wymaz ze skóry twarzy dziecka	Szpital MSWiA Kraków
68	34	Kał noworodka	Szpital MSWiA Kraków
69	36	Smółka	Szpital MSWiA Kraków
70	35	Wymaz z jamy ustnej dziecka	Szpital MSWiA Kraków
71	13 a	Wymaz z jamy ustnej dziecka	Szpital MSWiA Kraków
72	13 b	Wymaz z jamy ustnej dziecka	Szpital MSWiA Kraków
73	39	Smółka	Szpital MSWiA Kraków
74	40	Mleko matki	Szpital MSWiA Kraków
75	24	Kał noworodka	Szpital MSWiA Kraków
76	8 a	Wymaz z jamy ustnej dziecka	Szpital MSWiA Kraków
77	5	Wymaz z pochwy matki	Szpital MSWiA Kraków
78	23	Kał noworodka	Szpital MSWiA Kraków
79	pK 1	Kał noworodka	Szpital MSWiA Kraków
80	pK 3	Kał noworodka	Szpital MSWiA Kraków
81	pK 5	Kał noworodka	Szpital MSWiA Kraków
82	Kl M/1	Kał noworodka	Szpital MSWiA Kraków
83	Kl M/3	Kał noworodka	Szpital MSWiA Kraków
84	Kl M/5	Kał noworodka	Szpital MSWiA Kraków



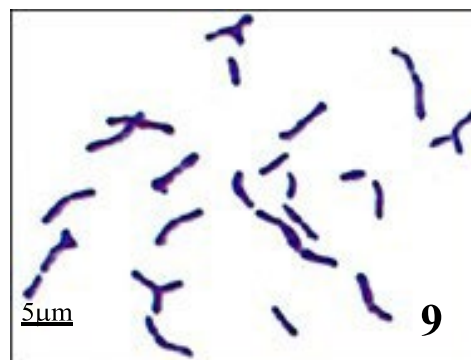
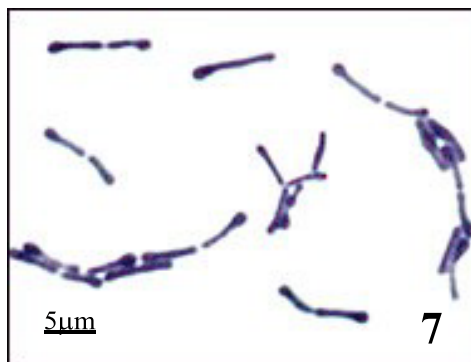
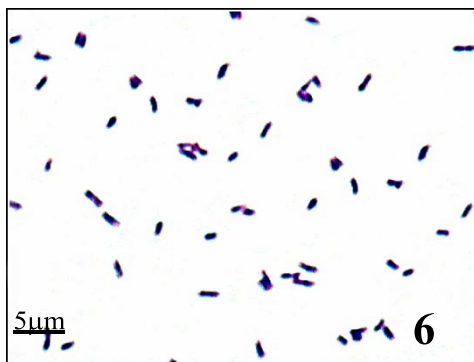
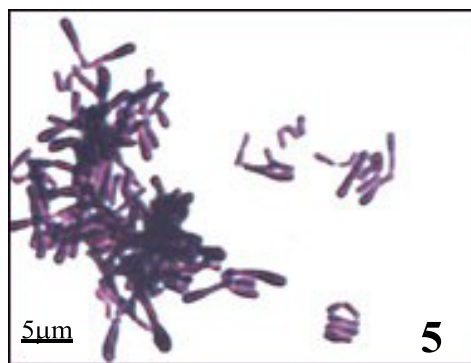
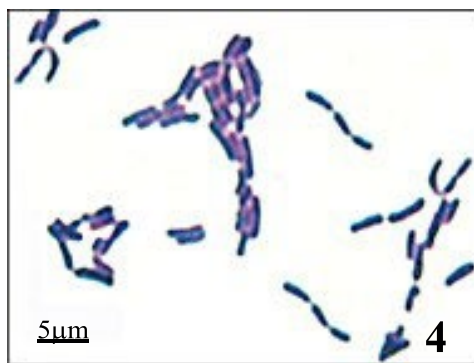
Ryc 2: Przykład wzrostu bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* w płynnym podłożu BL - Glucose Liver [127].

Wzrost w postaci: **1** - osadu na dnie probówki, **2** - jednorodnej zawiesiny.



Ryc. 3: Przykład wzrostu bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* na stałym podłożu BL - Glucose Liver Agar [127].

Wzrost w postaci gładkich, wypukłych kolonii, o regularnych brzegach, w kolorze kremowym lub białym, połyskujących o delikatnej konsystencji.



Ryc. 4 - 9: Obraz mikroskopowy szczepów wzorcowych reprezentujących rodzaj *Bifidobacterium*. 4 - *B. adolescentis* 20083 DSMZ, 5 - *B. animalis* 20104 DSMZ, 6 - *B. breve* 20213 DSMZ, 7 - *B. longum* 20219 DSMZ, 8 - *B. bifidum* 20456 DSMZ, 9 - *B. gallinarum* 20670 DSMZ.

Hodowla prowadzona przez 24 godziny w płynnym podłożu BL - Glucose Liver [127]. Preparaty barwione według metody Grama, oglądane pod immersją w mikroskopie świetlnym [Olympus].

V. OKREŚLANIE PRZYNALEŻNOŚCI RODZAJOWEJ I GATUNKOWEJ BAKTERII Z RODZAJU *BIFIDOBACTERIUM*

V. 1. WPROWADZENIE

Identyfikacja bakterii należących do rodzaju *Bifidobacterium* jest skomplikowana i czasochłonna. Chociaż istnieje wiele metod wykorzystywanych w tym celu, opartych na badaniu cechach fenotypowych, to właściwie tylko wyniki testów molekularnych wydają się być naprawdę wiarygodne.

Najstarszą, a zarazem najbardziej kontrowersyjną metodą odróżniania bakterii należących do rodzaju *Bifidobacterium* z pośród innych bakterii beztlenowych zasiedlających przewód pokarmowy człowieka, jest metoda polegająca na badaniu pH medium hodowlanego z namnożonym w nim szczepem. Metoda ta zakłada, że wartość pH zależy od rozkładu różnych cukrów przez dane mikroorganizmy i jest charakterystyczna dla określonego rodzaju bakterii [134].

Kluczowym enzymem biorącym udział w przemianach metabolicznych, charakterystycznym dla całego rodzaju *Bifidobacterium* jest fruktozo-6-fosforano-fosfoketolaza (ang. Fructose-6-Phosphate PhosphoKetolase - F6PPK). Test oparty na oznaczaniu obecności tego enzymu, umożliwia zidentyfikowanie wszystkich bakterii należących do rodzaju *Bifidobacterium* spośród innych bakterii beztlenowych. Wytworzenie się fosforanu acetylu z fruktozo-6-fosforanu przejawia się pojawieniem czerwono-fioletowego barwnika (maksimum absorpcji 505nm), co wskazuje na zajście reakcji katalizowanej przez ten enzym [2, 6, 7, 41, 135, 136].

Kolejna metoda identyfikacji bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* wykorzystuje chromatografię gazową. Metoda ta stosowana jest do określenia składu chemicznego oraz metabolitów badanych mikroorganizmów, a następnie ich klasyfikacji. Jednakże, w przypadku *Bifidobacterium* analiza metabolitów oraz wytwarzanych gazów nie jest zbyt przydatna w identyfikacji, ponieważ kwas mlekowy i octowy są głównymi produktami końcowymi szlaków metabolicznych wszystkich gatunków należących do tego rodzaju [134].

W celu identyfikacji gatunkowej bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* można wykorzystać metodę polegającą na oznaczeniu wzoru elektroforetycznego białek. Rozdział ten przeprowadza się w żelu poliakrylamidowym. Cząsteczki białek poruszają się z prędkością, zależną głównie od ich masy, zaś droga, jaką przebywają jest w określonym zakresie odwrotnie proporcjonalna do logarytmu ich masy. Jednakże, korzystając z tej metody, należy posiadać dużą bazę wyników, z którymi to otrzymany wzór musi zostać porównany [134, 137].

Obecnie na rynku brak jest stosunkowo prostych w wykonaniu, niedrogich, a jednocześnie dokładnych testów, opartych na badaniu cech fenotypowych, stosowanych do

identyfikacji bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*. Często wykorzystywanymi w tym celu, nie zawsze jednak z sukcesem, są następujące zestawy: Anaerobe ID Kit wchodzący w skład systemu BBL Cristal Identification [Becton Dickinson], API 20A i rapid ID 32A wchodzące w skład systemu API [bioMérieux] [123, 138].

Identyfikacja bakterii prowadzona w oparciu o cechy genotypowe związana jest bezpośrednio ze strukturą ich aparatu genetycznego. Metody opierające się na analizie DNA chromosomalnego lub plazmidowego, dają szybką i jednoznaczną identyfikację badanych szczepów. Do metod genetycznych zaliczamy między innymi: metodę PCR (ang. Polymerase Chain Reaction) - reakcja łańcuchowa polimerazy, hybrydyzację, analizę plazmidów, analizę chromosomalnego DNA, rybotypowanie, oraz metodę PFGE (ang. Pulsed Field Gel Electrophoresis) - elektroforeza w zmiennym polu elektrycznym [139, 140, 141, 142].

Najbardziej użyteczną metodą z zakresu biologii molekularnej wykorzystywaną do identyfikacji gatunkowej bakterii należących do rodzaju *Bifidobacterium* jest opracowana w połowie lat 80-tych metoda PCR [143, 144, 145, 146, 147, 148, 149]. Technika ta jest obecnie najlepiej wystandaryzowaną metodą, dzięki zastosowaniu gatunkowo specyficznych starterów, komplementarnych do fragmentu mniejszej podjednostki rybosomu bakteryjnego 16S rRNA kodującego sekwencje o różnym stopniu zmienności. W celu jej przeprowadzenia należy najpierw wyizolować badane DNA, a następnie poddać go amplifikacji w obecności określonych starterów. Metoda ta pozwala na powielenie dowolnej sekwencji DNA o długości od kilkuset do kilku tysięcy nukleotydów. Warunkiem przeprowadzenia tej syntezy jest znajomość sekwencji otaczającej powielany fragment, tak, aby można było syntetyzować komplementarne startery o długości ok. 20 nukleotydów. Każdy cykl reakcji składa się z trzech etapów: termicznej denaturacji powielanego DNA (ok. 90°C), asocjacji starterów z matrycą (40-60°C) i polimeryzacji DNA (72°C). Wszystkie etapy zachodzą w jednej probówce, w której znajdują się: matryca, trifosforany nukleotydów, nadmiar starterów oraz termostabilna polimeraza DNA. Wynik odczytywany jest po przeprowadzeniu elektroforezy w żelu agarozowym, przez porównanie badanych próbek z próbą wzorcową stanowiącą kontrolę pozytywną oraz z kontrolą negatywną. Metoda PCR charakteryzuje się bardzo wysoką czułością i specyficznością oraz krótkim czasem wykonania [89, 137, 150].

Kolejną metodą, która znalazła zastosowanie w identyfikacji *Bifidobacterium* jest metoda hybrydyzacji. Technika ta została opracowana przez E. Southern'a w 1975 roku w celu identyfikacji określonego fragmentu DNA [89, 137, 151].

Wyróżniamy dwa główne typy hybrydyzacji: hybrydyzacja na filtrach nylonowych lub nitrocelulozowych oraz hybrydyzacja *in situ* [89].

Zespół Welling'a w 1995 roku jako pierwszy wykorzystał metodę hybrydyzacji *in situ*, z zastosowaniem sondy znakowanej fluorescencyjnie (ang. Fluorescent *In Situ* Hybridization - FISH) do identyfikacji rodzajowej *Bifidobacterium* [152].

Omawiana technika wykorzystuje zjawisko renaturacji kwasów nukleinowych, tj. łączenia się dwóch jednoniciowych komplementarnych łańcuchów w formy dwuniciowe tzw. hybrydy, w których to jedną nić stanowi badany fragment DNA lub RNA, a drugą sonda molekularna o znanej sekwencji opatrzona znacznikiem [153].

Wyróżnia się trzy cechy decydujące o użyteczności metody FISH:

1. Wysoka czułość definiowana jako najkrótszy odcinek DNA możliwy do detekcji (1-5 pz).
2. Wysoka rozdzielczość definiowana jako najmniejsza odległość w tysiącach par zasad pomiędzy dwoma identyfikowanymi odcinkami DNA, które mogą być zaobserwowane pod mikroskopem (komórki metafazowe 1-3 Mb).
3. Możliwość równoczesnej identyfikacji wielu różnych sond (do 12) [154].

Technika FISH charakteryzuje się wysoką czułością i specyficznością. Obecnie ma ona coraz większe zastosowanie w diagnostyce i identyfikacji mikrobiologicznej, co jest możliwe, między innymi, dzięki: zastosowaniu sond oligonukleotydowych rodzajowo specyficznych, komplementarnych do fragmentu mniejszej podjednostki rybosomu bakteryjnego 16S rRNA kodującego sekwencje o różnym stopniu zmienności, a także dzięki stosunkowo prostej analizie wyników przeprowadzanej przy zastosowaniu wysokiej klasy mikroskopów fluorescencyjnych, kamer CCD rejestrujących obraz widziany pod mikroskopem oraz komputera z odpowiednim oprogramowaniem. Jednakże, należy pamiętać, że hybrydyzacja *in situ* to metoda skomplikowana i pracochłonna, a w zależności od rodzaju materiału i sondy metodyka postępowania może znacznie się różnić [137, 155].

Warto jeszcze wspomnieć o metodzie, która służy do określania stopnia genetycznego podobieństwa badanych szczepów. Metoda ta opiera się na analizie polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych genomowego DNA, czyli tak zwanych RFLP (ang. Restriction Fragment Length Polymorphism). W metodzie tej zawiesinę bakterii unieruchamia się w bloczkach agarozowych, które po poddaniu lizie i odbiałczaniu, zatrzymują chromosomalne DNA. Bloczki agarozowe chronią DNA przed fragmentacją oraz ułatwiają manipulację na próbkach. Następnie DNA zostaje strawione, za pomocą specyficznej dla danego rodzaju bakterii rzadko tnącej endonukleazy restrykcyjnej, która rozpoznaje długie sekwencje nukleotydowe i generuje fragmenty restrykcyjne o różnej ruchliwości elektroforetycznej. Tak przygotowane DNA w formie bloczka umieszcza się w dołkach żelu agarozowego, a następnie rozdziela elektroforetycznie w zmiennym polu elektrycznym PFGE (ang. Pulsed Field Gel Electrophoresis). PFGE umożliwia rozdział DNA od kilkuset do 10 mln par zasad. Technika ta,

jest wysoce efektywna i charakteryzuje się dużą powtarzalnością oraz czytelnością wyników, które otrzymuje się w postaci łatwych do porównania wzorów prążkowych [145, 156, 157].

V. 2. MATERIAŁY I METODYKA

V. 2. 1. Bakterie

Szczepy które identyfikowano jako należące do *Bifidobacterium* pochodziły z wcześniej przygotowanej puli szczepów izolowanych z różnych materiałów biologicznych, między innymi z: mleka matki, pochwy, smółki oraz kału noworodków. Szczepy te były przechowywane na szklanych kulkach w bulionie BL z dodatkiem 15% glicerolu w temp. -70°C. W celu ożywienia bakterii, szklane kulki (4-5) z opłaszczonym na nich szczepem przenoszono do 2 ml płynnego podłoża BL, a następnie inkubowano w 37°C przez 48 godz. w warunkach ściśle beztlenowych z wykorzystaniem anaerostatów firmy bioMerieux z generatorami gazu H₂+CO₂ firmy Linegal Chemicals GmbH.

V. 2. 2. Metody fenotypowe

a) Testy podstawowe

Badanie tolerancji na tlen

Hodowle płynne wysiewano metodą redukcyjną na stałe podłoża BL - Glucose Liver Agar, uzyskując pojedyncze kolonie, które następnie izolowano na różnego typu podłoża różnicujące, w tym na: podłoże BL używane do hodowli *Bifidobacterium*, podłoże Columbia Blood Agar służące jako kontrola tlenowa, podłoże Mac Conkey'a stosowane do hodowli bakterii z rodziny *Enterobacteriace* oraz na podłoże MRS - de Man, Rogosa, Sharpe wykorzystywane w namnażaniu bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. Podłoża BL i MRS umieszczano w warunkach beztlenowych z wykorzystaniem anaerostatów firmy bioMérieux z generatorami gazu H₂+CO₂ firmy Linegal Chemicals GmbH i inkubowano przez 24 godz. w 37°C. Podłoża Colombia Blood Agar oraz Mac Conkey'a pozostawiano w warunkach tlenowych w 37°C przez 24 godz.

Barwienie metodą Grama

Bakterie charakteryzujące się brakiem wzrostu w warunkach tlenowych oraz dobrze rosnące na podłożu BL, poddawano następnie ocenie morfologii pojedynczych komórek w preparatach barwionych według metody Grama. Preparaty oglądano w mikroskopie świetlnym firmy Olympus, stosując obiektyw immersyjny o powiększeniu 100x .

Wzrost w 46°C

Kolejnym testem któremu były poddawane szczepy podejrzewane o przynależność do rodzaju *Bifidobacterium* był test wykazujący obecność lub brak wzrostu w 46°C. Wzrost w tych warunkach termicznych jest charakterystyczny dla bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, z którymi to *Bifidobacterium* są często mylone, natomiast nie obserwuje się go w przypadku ludzkich szczepów *Bifidobacterium* [6, 123, 138]. W celu przeprowadzenia tego testu poszczególne szczepy bakterii wysiewano na stałe podłoże BL, płytki umieszczano w warunkach beztlenowych w temp. 46°C oraz jako kontrolę w 37°C i inkubowano przez 72 godz.

Test na obecność katalazy

Badane szczepy zostały następnie poddane testowi wykazującemu obecność lub brak enzymu katalazy, którego to bakterie należące do rodzaju *Bifidobacterium*, izolowane z organizmu człowieka nie produkują [123, 138]. W tym celu poszczególne szczepy bakterii posiewano na stałe podłoże BL i inkubowano w warunkach beztlenowych przez 24 godz. Następnie przy pomocy kalibrowanej ezy pobierano 10 µl poszczególnych szczepów i zawieszano w 100 µl roztworu 15% H₂O₂ z 1% Tween [Sigma]. Pojawienie się bąbelków powietrza było wynikiem reakcji katalazy z H₂O₂ i oznaczane było jako reakcja pozytywna, natomiast ich brak był oznaczany jako reakcja negatywna.

Test na wykrywanie fruktozo-6-fosforano-fosfoketolazy (F6PPK)

Test oparty na oznaczaniu obecności enzymu fruktozo-6-fosforano-fosfoketolaza (ang. Fructose-6-Phosphate-PhosphoKetolase - F6PPK), umożliwiał zidentyfikowanie wszystkich szczepów *Bifidobacterium* spośród innych bakterii beztlenowych [2, 6, 7, 41, 123, 135, 136, 138].

Odczynniki

1. 0,05M bufor fosforanowy pH 6.5 z dodatkiem 500 mg/l cysteiny [LOBA]
2. Roztwór zawierający 6 mg/ml NaF [POCH] i 10 mg/ml jodooctanu sodu lub potasu [FLUKA]
3. Chlorowodorek hydroksylaminy [POCH] o stężeniu 13.9 g/100 ml wody, świeżo neutralizowany za pomocą NaOH [POCH] do pH 6.5
4. 15% w/o roztwór kwasu trójchlorooctowego [POCH]
5. 4M HCl [POCH]
6. 5% roztwór w/o FeCl₃ · 6H₂O w 0,1M HCl [POCH]
7. Roztwór fruktozo-6-fosforanu (sól sodowa, 70% czystości) [FLUKA] 80 mg/ml wody
8. Płynne podłoże BL [127]

Przeprowadzenie testu

Komórki bakteryjne uzyskane ze wzrostu w 10 ml bulionu BL przemywano dwukrotnie buforem **1** i zawieszano w 1,0 ml tego samego buforu. Komórki rozrywano ultradźwiękami przez 15 min. w 4°C przy użyciu Ultrasonic Cleaner o mocy 310W [Polsonic]. W czasie dezintegracji komórek unikano przegrzania próbek, ponieważ ciepło mogło zainaktywować enzym F6PPK. Następnie dodawano po 0,25 ml odczynników **2** i **7**. Po 30 min. inkubacji w 37°C reakcję zatrzymywano przez dodanie 1,5 ml odczynnika **3**. Po 10 min. inkubacji w temp. pokojowej dodawano po 1,0 ml odczynników **4** i **5**. Na tym etapie mieszaninę można było pozostawić w temp. pokojowej przed końcowym dodaniem 1,0 ml odczynnika barwnego **6**. Po dodaniu odczynnika **6** próbkę mieszało się przez odwracanie. Wytworzenie się fosforanu acetylu z fruktozo-6-fosforanu przejawiało się pojawieniem czerwono-fioletowego barwnika z maksimum absorpcji przy długości fal 505 nm. Każde natychmiastowe pojawienie się czerwono-fioletowej barwy uważane było za wynik dodatni. Próbkę bez fruktozo-6-fosforanu służyła jako kontrola negatywna do porównania zabarwienia. Kolor wzrastał z upływem czasu, a cząsteczki barwnika osiadały na dnie próbki.

b) Wystandaryzowane testy biochemiczne - profile fermentacyjne

Właściwości biochemiczne badanych szczepów określono przy użyciu specjalnych, wystandaryzowanych zestawów. Uzyskane wyniki miały posłużyć do identyfikacji gatunkowej badanych szczepów. W tym celu wykorzystano zestawy: API 50CH, API 20A, rapid ID 32A [bioMérieux] oraz Anaerobe ID Kit [Becton Dickinson]. Testy te przeprowadzano zgodnie z zaleceniami producentów, a wyniki analizowano za pomocą komputerowych programów, przeznaczonych do klasyfikacji badanych bakterii, opracowanych przez poszczególne firmy.

Zestawy typu API

Z systemu API przetestowano zestawy: API 50CH z podłożem 50CHL (Ryc. 10), API 20A (Ryc. 11) oraz rapid ID32A (Ryc. 12) [bioMérieux]. Składały się one odpowiednio z 49, 20 oraz 29 mikroprobówek zawierających odwodnione substraty o zdefiniowanej ilości, które po napełnieniu zawiesiną bakterii i poddaniu inkubacji w warunkach beztlenowych przez określony czas, obrazowały zachodzące reakcje biochemiczne (fermentacja, asymilacja, oksydacja), objawiające się zmianą zabarwienia substratów.

Ponieważ identyfikacja wykonana przy pomocy omawianych zestawów w oparciu o firmowe programy identyfikacyjne była bardzo niezadawalająca, skorzystano ze specjalnie stworzonego przez Gavini i wsp. (2001) programu komputerowego „The numerical phenotypic identification system” (Ryc. 13), umożliwiającego identyfikację gatunkową bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*. Program ten był udostępniony przez Internet (<http://kounou.lille.inra.fr>) na

specjalną prośbę skierowaną do jego Autorów. Jego baza danych została stworzona w oparciu o ponad 600 wyników z zestawów API oraz w oparciu o ponad 400 wyników z hybrydyzacji DNA-DNA. Chcąc uzyskać wynik identyfikacji, należało każdej z 78 badanych, w testach API 50CH oraz rapid ID32A, reakcji nadać wartość od zera, gdy brak było widocznej zmiany zabarwienia substratu (badana reakcja nie zaszła), do trzech, gdy zmiana ta była wyraźnie widoczna (badana reakcja zaszła w sposób całkowity). Następnie program ten sumował wszystkie cząstkowe wyniki razem i umożliwiał identyfikację gatunkową badanego szczepu, określając przy tym stopień prawdopodobieństwa z jakim została ona wykonana. Identyfikacja mieszcząca się w przedziale wartości od 0,990 do 1 uznawana była za bardzo dobrą. Natomiast wyniki niższe od 0,990 uznawano za wątpliwe [123].

Skala wyników:

- 0 - brak reakcji; brak jakiejkolwiek zmiany zabarwienia badanej mikroprobówki 1
- minimalna reakcja; niewielka zmiana zabarwienia badanej mikroprobówki
- 2 - cząstkowa reakcja; niecałkowita zmiana zabarwienia badanej mikroprobówki
- 3 - pełna reakcja; wyraźna i jednoznaczna zmiana zabarwienia badanej mikroprobówki

System BBL Cristal Identification

Kolejnym zestawem wykorzystanym do identyfikacji *Bifidobacterium*, był Anaerobe ID Kit (Ryc. 14) wchodzący w skład systemu BBL Cristal Identification [Becton Dickinson]. Zestaw ten opierał się na zminiaturyzowanych i wystandaryzowanych próbach biochemicznych, w których to przemianom podlegało 29 fluorogennych oraz chromatogennych substratów. W celu przeprowadzenia identyfikacji, poszczególne mikroprobówki napełniano zawiesiną bakterii i inkubowano 4 godz. w warunkach beztlenowych w 37°C. Wyniki badanych reakcji (fermentacja, oksydacja, degradacja, hydroliza), w których wykorzystane były fluorogenne substraty, oceniano w oparciu o obecność lub brak fluorescencji, obserwowanej przy użyciu światła UV. Natomiast zajście reakcji z chromogennymi substratami objawiało się zmianą ich zabarwienia. Wyniki poszczególnych reakcji oznaczano znakami (+) i (-), gdzie (+) oznaczał wynik pozytywny, gdy zaszła dana reakcja, zaś (-) wynik negatywny, gdy badana reakcja nie zaszła. Następnie wyniki analizowano za pomocą specjalnego programu komputerowego „Cristal” opracowanego przez firmę Becton Dickinson.

V. 2. 3. Metody genotypowe

a) Identyfikacja bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* za pomocą metody PCR

a. 1) Izolacja genomowego DNA

a. 1. 1) Izolacja DNA przy użyciu mikrokolumnienek

Zestaw przeznaczony do izolacji genomowego DNA [DNA Gdańsk II] wykorzystywał zdolność wiązania się DNA do złóż krzemionkowych w wysokich stężeniach soli chaotropowych. Komórki bakteryjne zostały poddane lizie i degradacji wszystkich białek w odpowiednim buforze lizującym, zawierającym sole chaotropowe i detergenty niejonowe (bufor LT) oraz w obecności proteinazy K. Następnie mieszaninę nakładano na mikrokolumnę ze specjalnym złożem krzemionkowym. DNA przechodzące przez złożę osiadało na nim, podczas gdy zanieczyszczenia przechodziły nie ulegając związaniu. Po wypłukaniu z kolumny resztek zanieczyszczeń, oczyszczone DNA mywano niskojonowymi buforami.

Protokół izolacji genomowego DNA przy użyciu mikrokolumnienek

1. Do probówki 1.5 ml pobierano 1 ml odpowiedniej hodowli bakteryjnej uprzednio namnożonej w 3ml płynnego podłoża BL przez 48 godz. w warunkach ściśle beztlenowych. Hodowlę wirowano (5 min., 10000 rpm), usuwano supernatant, a osad dokładnie zawieszano w 100 µl buforu TE.
2. Dodawano 10 µl roztworu lizozymu o stężeniu 1 mg/ml i inkubowano 10 min. w temp. 37°C.
3. Dodawano 200 µl uniwersalnego bufora lizującego LT oraz 20 µl roztworu proteinazy K.
4. Całość mieszano, a następnie inkubowano 20 min. w temp. 37°C.
5. Przenoszono próbkę do 75°C i inkubowano 5 min.
6. Próbkę intensywnie mieszano 20 sek., a następnie wirowano 3 min. przy 1200 rpm.
7. Pobierano supernatant i nanoszono na mikrokolumnę do oczyszczania genomowego DNA.
8. Wirowano przez 1 min. przy 1200 rpm.
9. Zlewano przesącz i dodawano do kolumny 500 µl roztworu płuczącego A1.
10. Wirowano przez 1 min. przy 1200 rpm.
11. Zlewano przesącz i dodawano do kolumny 300 µl roztworu płuczącego A1.
12. Wirowano przez 2 min. przy 1200 rpm.
13. Osuszano mikrokolumnę, a następnie umieszczano w nowej probówce 1.5 ml i dodawano 200 µl buforu Tris uprzednio ogrzanego do temp. 75°C.
14. Inkubowano próbkę przez 5 min. w temperaturze pokojowej.
15. Wirowano próbkę przez 1 min. przy 1200 rpm.
16. Minikolumnę usuwano, a oczyszczone DNA znajdujące się w probówce przechowywano w 4°C do czasu dalszych analiz.

Odczynniki

1. Bufor TE [DNA Gdańsk II]
2. Lizozym [DNA Gdańsk II]
3. Uniwersalny bufor lizujący LT [DNA Gdańsk II]

4. Proteinaza K [DNA Gdańsk II]
5. Roztwór płuczący A1 [DNA Gdańsk II]
6. Bufor Tris [DNA Gdańsk II]

Oznaczenie wyizolowanego DNA

W celu sprawdzenia, czy izolacja DNA została wykonana prawidłowo przeprowadzano elektroforezę z wykorzystaniem 1% żelu agarozowego z dodatkiem bromku etydydy oraz 0.5x stężonego buforu TBE. Do każdej z rynienek nakładano po 7 μ l wyizolowanego wcześniej DNA w połączeniu z 3 μ l buforu obciążającego, w skład którego wchodził błękit bromofenolowy (0,25g/ml) oraz sacharoza (40%). Elektroforezę przeprowadzano 1.5 godz. przy napięciu 80V.

Obraz przeprowadzonej elektroforezy oglądano przy użyciu systemu Gel Doc 2000 firmy BIO RAD, obejmującego transluminator UV, kamerę do zbierania obrazu oraz program komputerowy „Quantity One”. Obecność prążka DNA genomowego na wysokości ok. 20 tysięcy par zasad wskazywała na prawidłową izolację DNA z danej próbki (Ryc. 15).

Odczynniki

1. Agaroz [SERVA]
2. Bromek etydydy 10 mg/ml [BIO RAD]
3. Bufor TBE (Tris Borad Acid EDTA) 10x stężony [BIO RAD]
4. Błękit bromofenolowy [SERVA]
5. Sacharoza [SERVA]
6. Marker wielkości A/HinDIII [Roche]

a. 1. 2) Izolacja genomowego DNA według Gevers’a

Szczepy *Bifidobacterium*, których DNA nie udało się wyizolować przy użyciu metody kolumnkowej poddano izolacji DNA metodą według Gevers’a [158].

Protokół izolacji genomowego DNA według Gevers’a

1. Badany szczep namnażano w 10 ml podłoża BL i hodowano do fazy logarytmicznego wzrostu: $OD_{600} = 0.5 - 1.0$, przez 18-24 godz.
2. Hodowlę wirowano (3000xg, 10 min, 4°C), a następnie osad zamrażano w -20°C na co najmniej 1 godz.
3. Rozmrażano osad, a następnie przepłukiwano go 1 ml buforu TES i zawieszano w 300 μ l buforu STET.
4. Dodawano 75 μ l buforu do lizy (TES z dodatkiem mutanolizyny 1330 U/ml i lizozymu 40 mg/ml) i inkubowano zawiesinę w 37°C przez 1 godz.

5. Dodawano 40 μ l podgrzanego (37°C) 20% SDS w buforze TE i 5-7 szklanych kulek.
6. Próbkę mieszano przez 60 sek., a następnie inkubowano w 37°C przez 10 min., po czym w 60°C przez 10 min.
7. Dodawano 100 μ l buforu TE i ekstrahowano lizat 1 objętością mieszaniny fenol/chloroform /alkohol izoamylowy (49:49:1).
8. Fazy rozdzielano przez wirowanie (18000xg, 5 min.) przy użyciu probówek Phase Lock Gel Eppendorf [Eppendorf].
9. Fazę wodną ostrożnie mieszano z 70 μ l 5M NaCl i 1ml izopropanolu, a następnie precipitowano DNA na lodzie przez co najmniej 15 min.
10. Osad odwirowywano (20000xg, 30 minut, 4°C) i przepłukiwano zimnym 70% etanolem.
11. Osad DNA suszono i zawieszano w 100 μ l buforu TE z dodatkiem RNA-zy (10 mg/ml), a następnie inkubowano roztwór 10 min. w 37°C. Wyizolowane DNA przechowywano w 4°C do dalszych analiz.

Bufory

Bufor TES: pH = 8.0	Bufor STET: pH = 8.0	Bufor TE: pH = 8.0
6.7% sacharoza	8% sacharoza	10 mM Tris-HCl
50 mM Tris-HCL	5% Triton X-100	1 mM EDTA
1 mM EDTA	50 mM Tris-HCl	
	50 mM EDTA	

Odczynniki

1. Mutanolizyna [Sigma]
2. Lizozym [Sigma]
3. SDS [SERVA]
4. Fenol/chloroform/alkohol izoamylowy [Sigma]
5. Izopropanol [Sigma]
6. Etanol [Polmos]
7. RNA-za [Sigma]
8. Sacharoza [SERVA]
9. Tris-HCl [SERVA]
10. EDTA [Sigma]
11. Triton X-100 [Sigma]

Oznaczenie ilości wyizolowanego DNA

Ilość DNA była mierzona na spektrofotometrze UV/VIS firmy Jasco w zakresie fal 240-300 nm. Jako wynik, uzyskany przy pomocy programu „Spectra Manager” firmy Jasco,

otrzymywano krzywą przedstawiającą zależność absorbancji od długości fali (Ryc. 16). Metoda ta pozwalała na oznaczenie ilości DNA, przeliczając ją z najwyższej wartości OD mierzonej przy długości fali 260 nm.

W celu oznaczenia ilości wyizolowanego DNA skorzystano z wartości dla jednej jednostki absorbancji przy długości fali 260 nm wynoszącej 50 µg/ml DNA.

Przykładowe wyliczenie (dla szczepu *B. longum* 20219 DSMZZ):

$$\begin{aligned} 1 A_{260} &- 50 \mu\text{g/ml DNA} \\ 0.53 A_{260} &- x \mu\text{g/ml DNA} \times \\ &= 26.5 \mu\text{g/ml DNA} \end{aligned}$$

Ponieważ badana próbka była 100x rozcieńczana w celu dokonania pomiaru absorbancji, to ostateczna ilość DNA w analizowanym przypadku wynosiła 2,6 mg/ml. Do dalszych procedur PCR stosowano DNA o stężeniu 50 ng/ml.

Oznaczenie czystości wyizolowanego DNA

Czystość DNA badanej próbki wyznaczano ze stosunku absorbancji mierzonej przy długości fali 260 i 280 nm, wykorzystując następującą zależność: $A_{260}/A_{280} \geq 1.8$

Dla czystego DNA przyjęto, że stosunek tych wartości powinien być większy lub równy 1.8. Jeśli był on mniejszy od wartości 1.8, to wyizolowane DNA posiadało zanieczyszczenia.

a. 2) Amplifikacja PCR

Reakcja amplifikacji DNA została przeprowadzona według metody Matsuki i wsp. [147, 148, 149] z uwzględnieniem własnej modyfikacji.

Gatunkowo specyficzne startery

Gatunkowo specyficzne startery [TIB MOLBIOL] komplementarne do podjednostki 16S rRNA dla sześciu wybranych gatunków *Bifidobacterium* używane do identyfikacji metodą PCR zostały wybrane na podstawie publikacji Matsuki i wsp. [147, 148, 149] (Tabela 6).

Mieszanina reakcyjna

1. Bufor reakcyjny *Delta 2* [DNA Gdańsk II] zawierający: 10 mM TRIS-HCL pH 8.8 w temp. 25°C, 50 mM KCL, 0.1% Triton X-100, 2 mM MgCl_2 .
2. Każdy z czterech trifosforanodeoksynukleotydów (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) w stężeniu 200 µM [DNA Gdańsk II].
3. Odpowiednie startery specyficzne dla danego gatunku w stężeniu 1µM na próbkę (Tabela 6) [TIB MOLBIOL].
4. Termostabilna polimeraza DNA *Tag Delta 2* w stężeniu 0.9U [DNA Gdańsk II].
5. Próbką odpowiedniego DNA, która w kontroli negatywnej była zastępowana wodą destylowaną.

Program amplifikacji

Reakcje amplifikacji przeprowadzano przy użyciu termocyklera PTC-200 firmy MJ Reasearch. Program składał się z jednego cyklu trwającego 5 min. w 94°C, następnie z 35 cykli przeprowadzanych kolejno w 94°C przez 20 sek., w 55°C przez 20 sek. i w 72°C przez 30 sek. oraz ostatecznie z jednego cyklu w 72°C trwającego 5 min. [147, 148, 149].

Tabela 6: Gatunkowo specyficzne startery komplementarne do podjednostki 16S rRNA dla sześciu gatunków *Bifidobacterium*, najczęściej kolonizujących przewód pokarmowy człowieka [147, 148, 149].

Starter	Sekwencja	Gatunek	Wielkość
BiADO-1	5'-CTCCAGTTGGATGCATGTC-3'	<i>B. adolescentis</i>	19 pz
BiADO-2	5'-CGAAGGCTTGCTCCCAGT-3'		18 pz
BiINF-1	5'-TTCCAGTTGATCGCATGGTC-3'	<i>B. infantis</i>	20 pz
BiINF-2	5'-GGAAACCCCATCTCTGGGAT-3'		20 pz
BiBIF-1	5'-CCACATGATCGCATGTGATTG-3'	<i>B. bifidum</i>	21 pz
BiBIF-2	5'-CCGAAGGCTTGCTCCCAAA-3'		19 pz
BiCATg-1	5'-CGGATGCTCCGACTCCT-3'	<i>B. catenulatum</i> (grupa)	17 pz
BiCATg-2	5'-CGAAGGCTTGCTCCCGAT-3'		18 pz
BiBRE-1	5'-CCGGATGCTCCATCACAC-3'	<i>B. breve</i>	18 pz
BiBRE-2	5'-ACAAAGTGCCTTGCTCCCT-3'		19 pz
BiLON-1	5'-TTCCAGTTGATCGCATGGTC-3'	<i>B. longum</i>	20 pz
BiLON-2	5'-GGGAAGCCGTATCTCTACGA-3'		20 pz

Oznaczenie otrzymanego produktu

Produkty amplifikacji były oznaczane przy wykorzystaniu elektroforezy w 1% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny, przeprowadzonej w 0.5x stężonym buforze TBE. Do każdej z rynienek nakładano po 7µl produktu PCR w połączeniu z 3µl buforu obciążającego, w skład którego wchodził błękit bromofenolowy (0.25g) oraz sacharoza (40%). Elektroforezę przeprowadzano przy napięciu 80 V przez 1.5 godz.

Obraz przeprowadzonego rozdziału oglądano przy użyciu systemu Gel Doc 2000 firmy BIO RAD, obejmującego transluminator UV, kamerę do zbierania obrazu oraz program komputerowy „Quantity One”. Obecność produktu PCR o odpowiedniej wielkości par zasad była uznawana z wynik pozytywny przeprowadzonej reakcji.

Odczynniki

1. Agaroz [SERVA]
2. Bromek etydyny 10 mg/ml [BIO RAD]
3. Bufor TBE (Tris Borad Acid EDTA) 10x stężony [BIO RAD]
4. Błękit bromofenolowy [SERVA]
5. Sacharoza [SERVA]
6. Markery wielkości: 100-500 pz, 100-1000 pz [DNA Gdańsk II]

b) Identyfikacja bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* za pomocą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH)

Przygotowanie odczynników do hybrydyzacji

Bufory wykorzystywane do metody FISH przygotowywano zawsze na świeżo, przed wykonaniem danej identyfikacji. W celu wyjałowienia filtrowano je przez sączi o średnicy porów 0.22 µm [Millipore].

Sondy do FISH

Do identyfikacji eubakterii wykorzystano sondę EUB 338 (5'GCT GCC TCC CGT AGG AGT '3) [OliGold] znakowaną na końcach 5' i 3' barwnikiem fluorescencyjnym FITC [159, 160]. Do identyfikacji bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*, wykorzystano rodzajowo-specyficzną sondę Bif 164 komplementarną do fragmentu podjednostki 16S rRNA (5'CAT CCG GCA TTA CCA CCC'3) [OliGold], znakowaną na końcach 5' i 3' barwnikiem fluorescencyjnym Cy3 [152, 159, 161, 162].

Protokół przeprowadzenia hybrydyzacji

Procedurę hybrydyzacji przygotowano w oparciu o metodę zespołu Welling'a [152, 159, 161, 162], uwzględniając własną modyfikację. Pracowano pod komorą sterylnego przepływu „Bio air” [Aura-VF72].

Etapy hybrydyzacji

1. Na szkiełko do hybrydyzacji SuperFrost®Plus [Menzel - Glaser] nakładano badaną próbkę, a następnie suszono w 37°C przez 20 min.
2. Materiał utrwalano 4% paraformaldehydem przez 15 min. w 4°C.
3. Preparat trzykrotnie delikatnie płukano jałowym PBS.
4. Utrwalano 96% alkoholem metylowym przez 10 min. w -20°C (na tym etapie preparaty można było przechowywać przez pewien czas w temperaturze -20°C).
5. Preparat trzykrotnie delikatnie płukano wodą redestylowaną.
6. Na preparat nanoszono 100 µl roztworu lizozymu (1mg/l) i inkubowano 10 min. w 37°C.
7. 5 µl sondy Bif 164 (rozcieńczonej 20x) mieszano z 5 µl sondy EUB 338 (rozcieńczonej 20x) oraz z 40 µl buforu do hybrydyzacji, uprzednio ogrzanego do 50°C. Tak przygotowany roztwór nanoszono na badany preparat i przykrywano szkiełkiem nakrywkowym.
8. Preparaty inkubowano 3 godz. w 50°C w wilgotnej komorze osłoniętej folią aluminiową.
9. Preparat płukano trzykrotnie buforem płuczącym i barwiono DAPI (5 µl barwnika w 45 µl wody redestylowanej) w temperaturze pokojowej przez 2-3 min .

10. Po upływie tego czasu preparat płukano trzykrotnie wodą redestylowaną i suszono w 37°C w ciemności.

Preparaty oglądano w mikroskopie fluorescencyjnym pod immersją wykorzystując sprzęt do wizualizacji FISH [Olympus]: lampa UV, mikroskop z obiektywem immersyjnym, kamera F-View, zestaw filtrów oraz urządzenie do ich zmiany. Zdjęcia wykonywano przy pomocy kamery CCD i komputera ze specjalnym oprogramowaniem do analizy obrazu „AnalySis” [Soft Imaging].

FISH - modyfikacja ilościowa metody

1. 0.5g świeżego kału (przechowywanego do 24 godz. w 4°C) dokładnie homogenizowano w 4.5 ml PBS z 4-5 szklanymi kulkami przez 1 min.
2. Całość mieszano przez 3 min.
3. Próbkę wirowano przez 1 min. przy 1000 rpm.
4. 1 ml supernatantu mieszano z 3 ml 4% paraformaldehydu.
5. Całość inkubowano przez 20 min. - uzyskiwano zawiesinę wyjściową.
6. Jeśli spodziewano się dużej liczby bakterii to zawiesinę rozcieńczano 40x w PBS.
7. Na szkiełko do hybrydyzacji SuperFrost®Plus [Menzel-Glaser] nakładano po 10 µl badanej próbki, na powierzchnię 1 cm² i suszono w 37°C przez 20 min.
8. Następnie przeprowadzano całą procedurę hybrydyzacji według protokołu zamieszczonego powyżej, rozpoczynając od punktu nr 3.
9. Liczbę bakterii zliczano w 20 losowo wybranych polach widzenia, a następnie uśredniano wynik, uzyskując wartość „b”. Liczbę bakterii w odważonej próbce wyliczano ze wzoru: $Lb = b \times 100 \times 17217 \times 120 \times 16.67$, a następnie przeliczano na 1 gram kału.

Bufory i odczynniki

- | | |
|--|---|
| 1. Bufor hybrydyzacyjny | 2. 3 x PBS bufor (100 ml) pH 7.4 |
| 20 mM Tris HCl pH 7.2 [SIGMA] | 2.4 g NaCl [POCH] |
| 0.9 M NaCl [SERVA] | 0.06 g KCl [POCH] |
| 0.1 % SDS [SERVA] | 0.432 g Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O [POCH] |
| | 0.072 g KH ₂ PO ₄ [POCH] |
| 3. PBS bufor (1l) pH 7.4 | 4. 4% paraformaldehyd (50 ml) pH 7.2 |
| 8 g NaCl [POCH] | 2 g paraformaldehydu [POCH] |
| 0.2 g KCl [POCH] | 100 µl 1M NaOH [SIGMA] |
| 1.44 g Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O [POCH] | 100 µl 1 M HCl [POCH] |
| 0.24 g KH ₂ PO ₄ [POCH] | 16.6 ml 3xPBS [POCH] |

5. Bufor płuczący
20 mM Tris HCl pH 7.2 [SIGMA]
0.9 M NaCl [SERVA]

V. 3. WYNIKI WRAZ Z ICH OMÓWIENIEM

V. 3. 1. Metody fenotypowe

Po przeprowadzeniu podstawowych testów służących do wstępnej identyfikacji bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*, do dalszej identyfikacji wybrano te szczepy bakterii, które rosły jedynie w warunkach beztlenowych w temperaturze 37°C. W preparacie wykonanym według metody Grama barwiły się one Gram-dodatnio lub Gram-chwiejnie. Pod względem morfologii były to zgrubiałe laseczki występujące w różnych pleomorficznych formach, często rozdęte na końcach i przypominające swym kształtem litery X, Y i V. Wybrane szczepy nie posiadały aktywnej katalazy oznaczanej w obecności H₂O₂, wykazywały natomiast aktywność enzymu fruktozo-6-fosforano fosfoketolazy.

Dalszą identyfikację prowadzono wykorzystując wystandaryzowane zestawy oparte na reakcjach biochemicznych: API 50CH, API 20A, rapid ID32A [bioMérieux] oraz Anaerobe ID Kit [Becton Dickinson]. W celu sprawdzenia ich przydatności do identyfikacji bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*, poddano im kilkanaście losowo wybranych szczepów pochodzących z utworzonej kolekcji. Wybrane szczepy różniły się pomiędzy sobą morfologią kolonii oraz kształtem i wielkością pojedynczych komórek. Jako wynik spodziewano się otrzymać przyporządkowanie badanych szczepów do poszczególnych gatunków *Bifidobacterium*.

Przy pomocy zestawu API 50CH (Ryc.10) nie udało się przeprowadzić ani gatunkowej, ani nawet rodzajowej identyfikacji badanych szczepów. Zestaw API 20A (Ryc. 11) wykorzystywany powszechnie do identyfikacji bakterii beztlenowych okazał się mało przydatny w identyfikacji bakterii należących do rodzaju *Bifidobacterium*, co przedstawiono w tabeli numer 7. Często szczepy o znanej taksonomii były błędnie klasyfikowane. W niektórych przypadkach nie udało się potwierdzić ich przynależności rodzajowej lub prawdopodobieństwo takiej klasyfikacji było bardzo małe. Z kolei zestaw rapid ID 32A (Ryc. 12) klasyfikował badane szczepy do rodzaju *Bifidobacterium* nie dawał jednak wiarygodnej identyfikacji gatunkowej.

Niemniej jednak, wyniki z powyższych testów znalazły swoje zastosowanie. Posłużyły one do identyfikacji gatunkowej bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* przeprowadzonej przy pomocy programu komputerowego „The numerical phenotypic identification system” dostępnego przez Internet (<http://kounou.lille.inra.fr>) (Ryc. 13). Program ten sumował wszystkie cząstkowe wyniki uzyskane z zestawów API 50CH (Tabela 8) oraz rapid ID 32A (Tabela 9) i umożliwiał identyfikację gatunkową badanych szczepów *Bifidobacterium*, określając przy tym

stopień prawdopodobieństwa z jakim została ona wykonana. Wynik mieszczący się w przedziale wartości od 0,990 do 1,000 był uznawany za bardzo dobry. Wyniki otrzymane dla sześciu szczepów wzorcowych potwierdziły ich przynależność gatunkową z prawdopodobieństwem rzędu 0,990 - 0,999. Metoda ta, wydaje się więc godna polecenia, gdyż przy jej pomocy otrzymano wiarygodne i powtarzalne wyniki. Należy jednak pamiętać, że jest to metoda bardzo czasochłonna oraz kosztowna, a poza tym istnieją duże problemy w połączeniu się z wymaganym programem, którego praca często jest przerywana i który jest udostępniany jedynie na specjalną prośbę skierowaną do jego Autorów.

Kolejnym z przetestowanych zestawów był Anaerobe ID Kit (Ryc. 14) wchodzący w skład systemu BBL Cristal Identification [Becton Dickinson]. W zamieszczonej tabeli numer 10 przedstawiono uzyskane wyniki dla trzech przykładowych szczepów, na podstawie których widać, że przeprowadzony test przyporządkowuje jedynie badane szczepy do rodzaju *Bifidobacterium*, nie daje natomiast ich wiarygodnej identyfikacji gatunkowej.

Tabela 7: Identyfikacja przykładowych szczepów *Bifidobacterium* uzyskana przy pomocy zestawu API 20A [bioMérieux].

			Szczepy <i>Bifidobacterium</i> o znanej taksonomi		
	Nr	Substrat	K1 3/I - <i>B. infantis</i>	K1 57D- <i>B. bifidum</i>	33 B - <i>B. longum</i>
API 20A (odeczyt po 24 godzinach inkubacji)	21	Tryptofan	-	-	-
	2	Ureaza	-	-	-
	3	Glukoza	+	+	+
	4	Mannitol	+	+	-
	5	Laktoza	+	+	+
	6	Sacharoza	+	+	-
	7	Maltoza	+	+	+
	8	Salicyna	+	+	-
	9	Ksyloza	+	+	-
	10	Arabinoza	+	+	+
	11	Żelatyna	-	-	-
	12	Eskulina	+	-	-
	13	Glicerol	+	-	-
	14	Cellobioza	+	-	-
	15	Mannoza	+	+	+
	16	Melezitoza	+	+	-
	17	Raffinoza	+	+	+
	18	Sorbitol	+	-	-
	19	Ramnoza	+	-	-
	20	Trehaloza	+	-	-
WYNIK TESTU			<i>Bifidobacterium</i> sp. 96,5% <i>Actinomyces israeli</i> 3,4%	<i>B. adolescentis</i> 99,9%	<i>Lactobacillus fermentum</i> 84,8% <i>B. adolescentis</i> 15,2%

Tabela 8: Wyniki uzyskane z testu API 50 CH [bioMérieux] dla sześciu wzorcowych szczepów *Bifidobacterium*, wykorzystane do identyfikacji przeprowadzanej przy pomocy programu komputerowego „The numerical phenotypic identification system” dostępnego przez Internet (<http://kounou.lille.inra.fr>).

	Nr	Substrat	Badane szczepy <i>Bifidobacterium</i>					
			<i>B.adolescentis</i> DSMZ 20083	<i>B.animalis</i> DSMZ 20104	<i>B.breve</i> DSMZ 20213	<i>B.longum</i> DSMZ 20219	<i>B.bifidum</i> DSMZ 20456	<i>B.gallinarum</i> DSMZ 20670
API 50 CH (odczyt po 72 godzinach inkubacji)	0	Kontrola	0	0	0	0	0	0
	1	Glicerol	0	0	0	0	0	0
	2	Erytrol	0	0	0	0	0	0
	3	D-arabinoza	0	0	0	0	0	0
	4	L-arabinoza	0	3	0	2	0	3
	5	Ryboza	0	3	3	1	1	3
	6	D-ksyloza	0	3	0	1	0	3
	7	L-ksyloza	0	0	0	0	0	0
	8	Adonitol	0	0	0	0	0	0
	9	β -metylo-D-ksylozyd	0	0	0	0	0	1
	10	Galaktoza	3	3	3	1	1	1
	11	D-glukoza	3	3	3	2	3	3
	12	D-fruktoza	2	2	3	2	3	3
	13	D-mannoza	0	0	3	1	0	2
	14	L-sorboza	0	0	1	0	0	0
	15	Ramnoza	0	0	0	0	0	0
	16	Dulcytol	0	0	0	0	0	0
	17	Inozytol	0	0	0	0	0	0
	18	Mannitol	0	0	3	0	0	0
	19	Sorbitol	3	0	3	0	0	0
	20	α -metylo-D-mannozyd	0	0	0	0	0	0
	21	α -metylo-D-glukozyd	3	1	2	1	1	3
	22	N-acetyl -glukozamina	0	0	2	0	0	0
	23	Amygdalina	3	0	1	0	0	1
	24	Arbutyna	3	0	2	0	0	3
	25	Eskuline	3	3	3	1	0	3
	26	Salicyna	2	1	3	0	0	3
	27	Cellobioza	1	0	3	0	0	3
	28	Maltoza	3	3	3	1	1	0
	29	Laktoza	3	3	3	0	1	0
	30	Melibioza	2	3	3	1	1	3
	31	Sacharoza	0	3	3	1	0	3
	32	Trehaloza	0	0	0	0	0	0
	33	Inulina	0	0	0	0	0	0
	34	Melecytoza	0	0	0	1	0	0
	35	D-rafinoza	3	3	3	1	0	3
	36	Skrobia	0	0	3	0	0	0
	37	Glikogen	0	0	3	0	0	0
	38	Ksylitol	0	0	0	0	0	0
	39	β -gencjioza	0	0	1	0	1	2
	40	D-turanoza	2	1	2	0	0	0
	41	D-liksoza	0	0	1	0	0	0
	42	D-tagatoza	0	0	0	0	0	0
	43	D-frukoza	0	0	0	0	0	0
	44	L-fukoza	0	0	0	0	0	0
	45	D-arabitol	0	0	0	0	0	0
	46	L-arabitol	0	0	0	0	0	0
	47	Glukonian	1	0	0	0	0	0
	48	2 keto-glukonian	0	0	0	0	0	0
	49	5 keto-glukonian	0	0	1	2	2	0

Skala wyników:

- 0 - brak reakcji; brak jakiejkolwiek zmiany zabarwienia badanej mikropróbówki
- 1 - minimalna reakcja; niewielka zmiana zabarwienia badanej mikropróbówki
- 2 - częściowa reakcja; niecałkowita zmiana zabarwienia badanej mikropróbówki
- 3 - pełna reakcja; wyraźna i jednoznaczna zmiana zabarwienia badanej mikropróbówki

Tabela 9: Wyniki uzyskane z testu rapid ID 32A [bioMérieux] dla sześciu wzorcowych szczepów *Bifidobacterium* wykorzystane do identyfikacji przeprowadzanej przy pomocy programu komputerowy „The numerical phenotypic identification system” dostępnego przez Internet (<http://kounou.lille.inra.fr>).

			Badane szczepy <i>Bifidobacterium</i>					
	Nr	TEST	<i>B.adolescentis</i> DSMZ 20083	<i>B.animalis</i> DSMZ 20104	<i>B.breve</i> DSMZ 20213	<i>B.longum</i> DSMZ 20219	<i>B.bifidum</i> DSMZ 20456	<i>B.gallinarum</i> DSMZ 20670
RAPID ID 32A (odczyt po 4 godzinach inkubacji)	1	URE	0	0	0	0	0	0
	2	ADH	0	0	0	0	0	0
	3	GAL	3	3	2	2	2	3
	4	GAL	2	2	3	3	3	2
	5	GP	0	0	0	0	0	0
	6	GLU	2	3	1	2	1	3
	7	GLU	1	1	1	0	0	3
	8	ARA	0	1	0	1	0	2
	9	GUR	0	0	0	0	0	0
	10	NAG	0	0	0	0	3	0
	11	MNE	1	1	3	3	1	3
	12	RAF	1	3	3	3	1	3
	13	GDC	0	0	0	0	0	0
	14	FUC	0	0	0	0	0	2
	15	NIT	0	0	0	0	0	0
	16	IND	0	0	0	0	0	0
	17	PAL	0	0	0	0	0	0
	18	Arg A	3	3	3	3	3	3
	19	Pro A	3	3	3	3	3	3
	20	LGA	1	2	2	2	2	2
	21	PheA	2	3	3	3	3	3
	22	LeuA	1	3	3	3	3	3
	23	PyrA	0	1	0	0	3	3
	24	TyrA	2	3	2	3	3	3
	25	AlaA	1	2	1	2	2	2
	26	GlyA	2	3	3	2	3	3
	27	HisA	2	3	3	2	3	3
	28	GGA	0	1	0	0	0	1
	29	SerA	2	3	3	2	3	3

Skala wyników:

- 0 - brak reakcji; brak jakiejkolwiek zmiany zabarwienia badanej mikroprobówki
- 1 - minimalna reakcja; niewielka zmiana zabarwienia badanej mikroprobówki
- 2 - częściowa reakcja; niecałkowita zmiana zabarwienia badanej mikroprobówki
- 3 - pełna reakcja; wyraźna i jednoznaczna zmiana zabarwienia badanej mikroprobówki

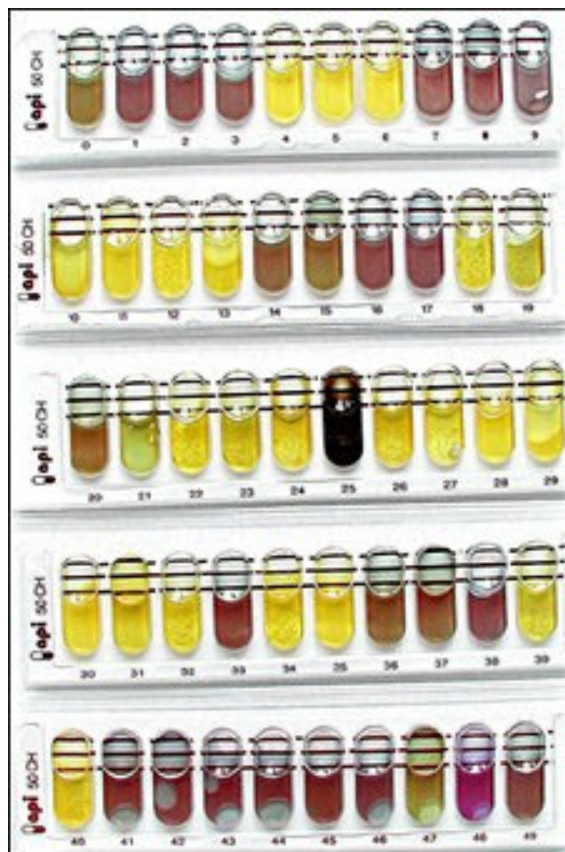
Tabela 10: Identyfikacja przykładowych szczepów *Bifidobacterium* uzyskana przy pomocy zestawu Anaerobe ID Kit wchodzącego w skład BBL Cristal Identification System [Becton Dickinson].

			Szczepy <i>Bifidobacterium</i> o znanej taksonomi		
	Nr	Substrat	20104 DSMZ <i>B. animalis</i>	20213 DSMZ <i>B. breve</i>	K1 13D <i>B. infantis</i>
BBL Cristal Identification System Anaerobe ID Kit (odczyt po 4 godzinach inkubacji)	1	L-arginina-AMC	+	+	+
	2	L-histydyna-AMC	+	+	+
	3	4MU- α -D-mannozyd	-	+	-
	4	L-seryna-AMC	+	+	+
	5	L-isoleucyna-AMC	+	+	-
	6	4MU- mannozyd	-	-	-
	7	Glycyna-AMC	+	+	+
	8	L-alanina-AMC	+	+	+
	9	4MU-N-acetyl-D-galaktozamina	-	-	-
	10	Kwas L-pyrogutaminowy-AMC	-	-	+
	11	L-lizyna-AMC	+	+	+
	12	L-metionina-AMC	+	+	+
	13	4MU-D-celobiopyranozyd	-	-	-
	14	4Mu-D-ksylozyd	+	+	-
	15	L-fenylalanina-AMC	+	+	+
	16	L-leucyna-AMC	+	+	+
	17	Eskozol	-	-	+
	18	Disacharyd	+	+	+
	19	Furanoza	+	+	+
	20	Pyranoza	+	+	+
	21	p-nitrofenyl-D-galaktozyd	+	+	+
	22	p-nitrofenyl-L-galaktozyd	+	+	+
	23	p-nitrofenyl-fosforu	-	-	-
	24	p-nitrofenyl-D-glukozyd	+	+	+
	25	p-nitrofenyl-N-acetylo-glukozamid	-	+	-
	26	L-prolina-p-nitroanilid	+	+	+
	27	p-nitrofenyl-L-fruktozyd	-	-	-
	28	p-nitrofenyl-L-glukozyd	+	+	-
	29	L-alanylo-L-alanino-p-nitroanilid	+	+	-
WYNIK TESTU			<i>B. dentium</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Bifidobacterium</i> sp.

Opis wyników:

+ wynik pozytywny; zaszła badana reakcja

- wynik negatywny; badana reakcja nie zaszła



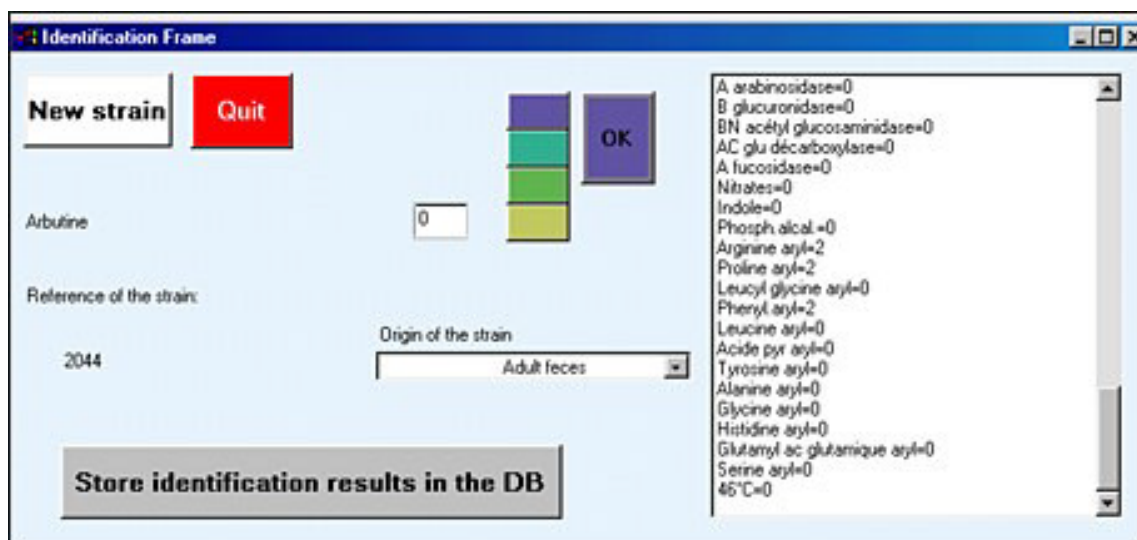
Ryc. 10: Zestaw API 50 CH [bioMérieux]. Wyniki otrzymane dla szczepu *Bifidobacterium* o numerze III/23/5a po 72 godz. inkubacji w temp. 37°C w warunkach beztlenowych.



Ryc. 11: Zestaw API 20A [bioMérieux]. Wyniki otrzymane dla szczepu *Bifidobacterium* o numerze K1 13D po 48 godz. inkubacji w temp. 37°C w warunkach beztlenowych.



Ryc. 12: Zestaw rapid ID 32A [bioMérieux]. Wyniki otrzymane dla szczepu *Bifidobacterium* o numerze K1 66C po 4 godz. inkubacji w temp. 37°C w warunkach tlenowych.



Ryc. 13: Program komputerowy „The numerical phenotypic identification system” dostępny przez Internet (<http://kounou.lille.inra.fr>) wykorzystywany w identyfikacji gatunkowej bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*.



Ryc. 14: 1 - Zestaw Anaerobe ID Kit wchodzący w skład systemu BBL Cristal Microbial Identification [Becton Dickinson]. 2 - BBL Crystal Anaerobe ID Panel po czterogodzinnej inkubacji przeprowadzanej w warunkach beztlenowych.

V. 3. 2. Metody genotypowe

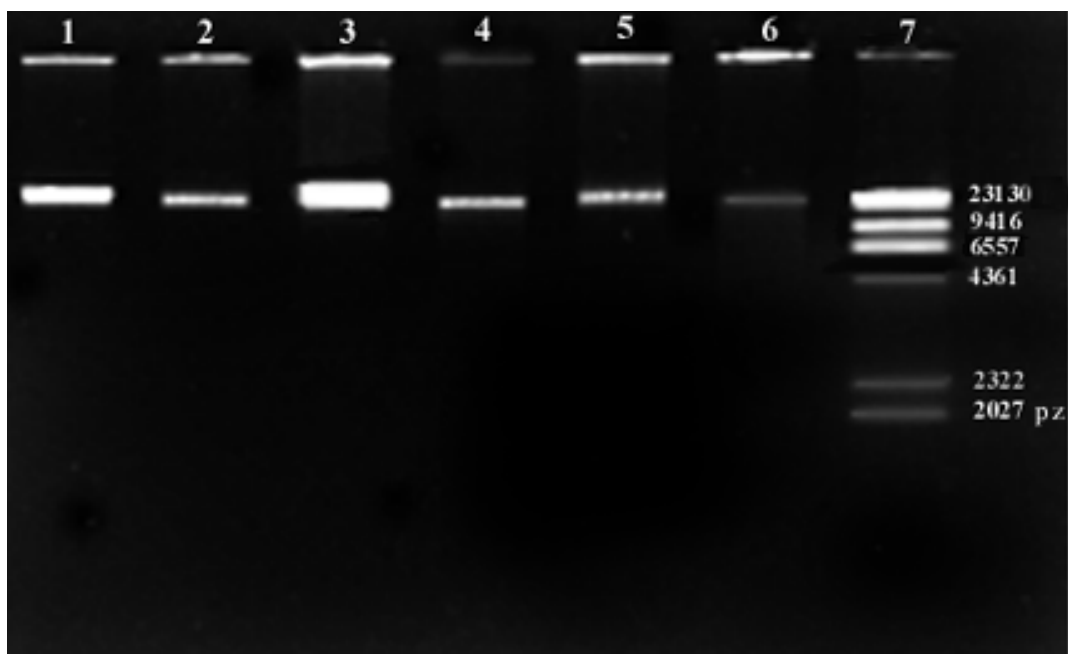
a) Identyfikacja bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* za pomocą reakcji PCR

W celu przeprowadzenia klasyfikacji szczepów *Bifidobacterium* wchodzących w skład utworzonej kolekcji wykorzystano metodę PCR z zastosowaniem gatunkowo specyficznych starterów komplementarnych do fragmentu podjednostki 16S rRNA. Badane szczepy były przyporządkowywane do jednego z sześciu najczęściej występujących w organizmie człowieka gatunków *Bifidobacterium*. Po przeprowadzeniu reakcji PCR z odpowiednimi dla badanego gatunku starterami i wykonaniu elektroforezy odczytywano wynik w oparciu o obecność, lub brak prążka zamplifikowanego produktu o określonej wielkości (Ryc. 17). Dla poszczególnych gatunków wielkość tego produktu wynosiła: *B. adolescentis* 279 pz, *B. bifidum* 278 pz, *B. breve* 288 pz, *B. catenulatum* 289 pz, *B. longum* 831 pz, *B. infantis* 826 pz.

Pozytywny wynik identyfikacji otrzymano dla pięćdziesięciu jeden szczepów, z czego: siedemnaście szczepów należało do gatunku *B. longum*, czternaście do *B. bifidum*, dziewięć do *B. breve*, pięć do *B. infantis* oraz po trzy do *B. adolescentis* i *B. catenulatum* (Tabela 11, Ryc. 18).

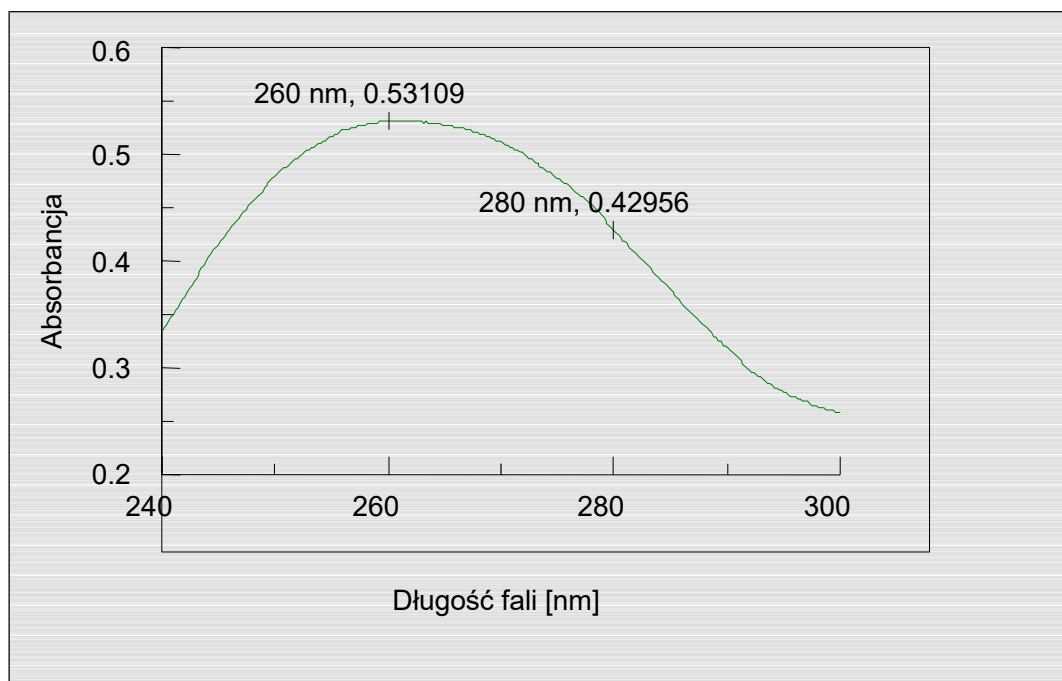
Kolejny numer	<i>B. longum</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>B. breve</i>	<i>B. infantis</i>	<i>B. catenulatum</i>	<i>B. adolescentis</i>
1	20219	20456	20213	K1 3/I	37	20083
2	3/1	39B	3	K1 7	K1 M/3	13b
3	33B	K1 57D	III/15/2	K1 2A	K1 M/1	8a
4	2/3	K1 33C	V/23/4	K1 13D		
5	40C	K1 1B	34	K1 66C		
6	K1 K/1	35	K1 36B			
7	K1 26B	36	III/23/5b			
8	5	38b	II/23/2			
9	23	K1 K/3	7/4			
10	9	KL 6B				
11	24	KL 38C				
12	K1 66A	KL 20B				
13	K1 23E	B/K				
14	K1 27A	30A				
15	KL 28a					
16	KL 59A					
17	13/E/2					
Razem szczepów	17	14	9	5	3	3

Tabela 11: Wyniki gatunkowej identyfikacji dla pięćdziesięciu jeden szczepów bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*, przeprowadzonej przy pomocy metody PCR z zastosowaniem gatunkowo specyficznych starterów komplementarnych do fragmentu podjednostki 16S rRNA.



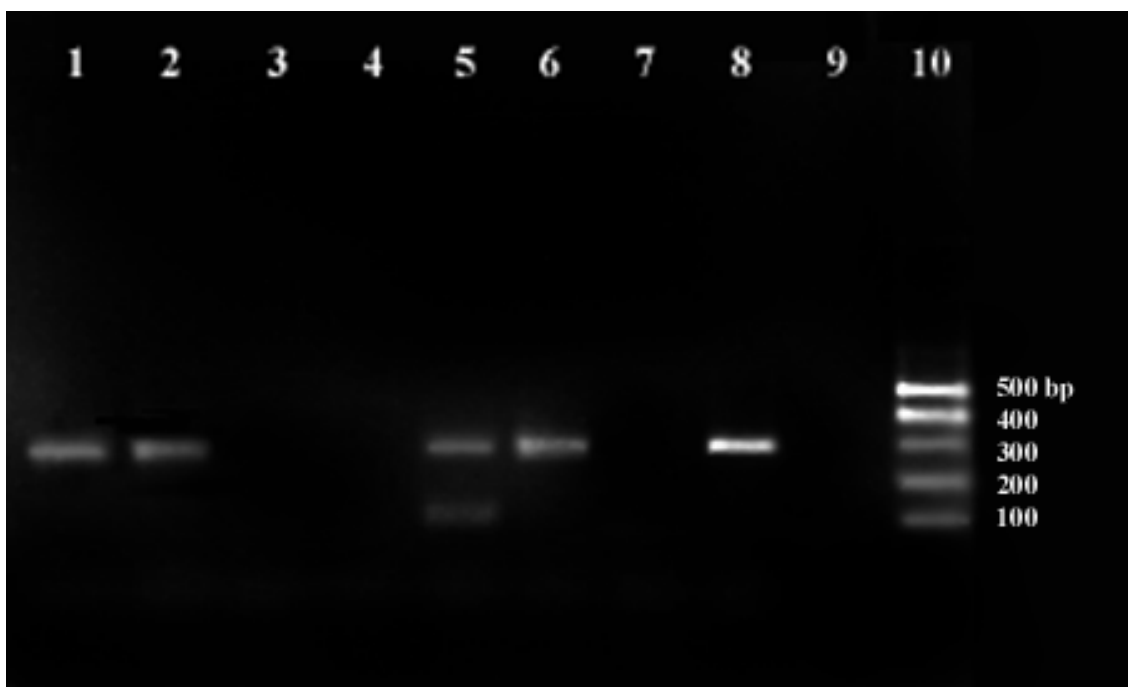
Ryc. 15: Wynik przykładowej elektroforezy (1% żel agarozowy, czas trwania 1.5 godz., napięcie 80V) przeprowadzonej w celu potwierdzenia prawidłowej izolacji DNA wykonanej przy użyciu mikrokolumnienek.

Obraz oglądany przy wykorzystaniu systemu Gel Doc 2000 firmy BIO RAD. Ścieżki: **1 ÷ 6** - próby badane, **7** - marker wielkości λ /HinDIII. Obecność prążka DNA genomowego na wysokości ok. 20 tysięcy pz wskazuje na prawidłową izolację DNA z danego szczepu.



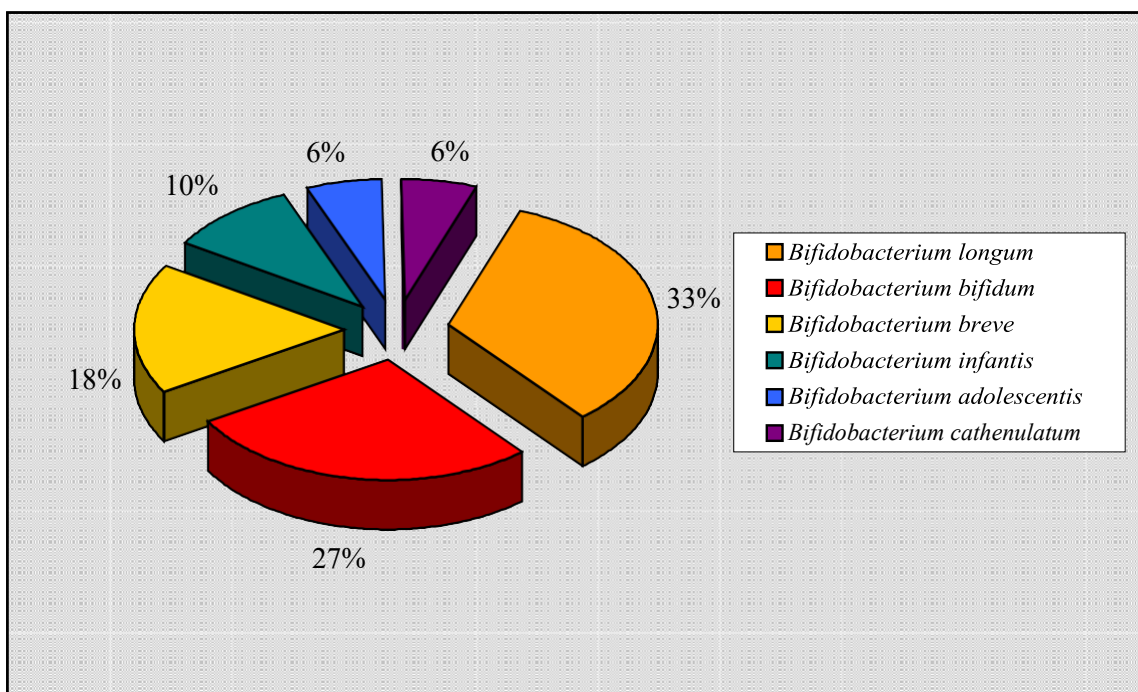
Ryc 16: Rozkład widma gęstości optycznej genomowego DNA wyizolowanego metodą według Gevers'a [158].

Pomiar wykonany przy użyciu spektrofotometru UV/VIS firmy Jasco w zakresie fal 240-300 nm dla szczepu *Bifidobacterium longum* 20219 DSMZ.



Ryc. 17: Identyfikacja gatunkowa *B. bifidum* przeprowadzona przy pomocy reakcji PCR z wykorzystaniem gatunkowo specyficznych starterów komplementarnych do fragmentu podjednostki 16S rRNA (BiBIF-1, BiBIF-2) [147, 148, 149].

Ścieżki: **1** - próba pozytywna, wzorzec *B. bifidum* DSMZ 20456, **2 ÷ 8** - badane szczepy (**2** - 30A, **3** - Kl 27A, **4** - 3/1, **5** - Kl 33C, **6** - Kl 1B, **7** - V/23/4, **8** - B/K), **9** - próba negatywna, **10** - marker wielkości 100-500 pz. Obecność prążka zamplifikowanego produktu na wysokości 278 pz wskazuje na przynależność badanych szczepów do gatunku *B. bifidum*.



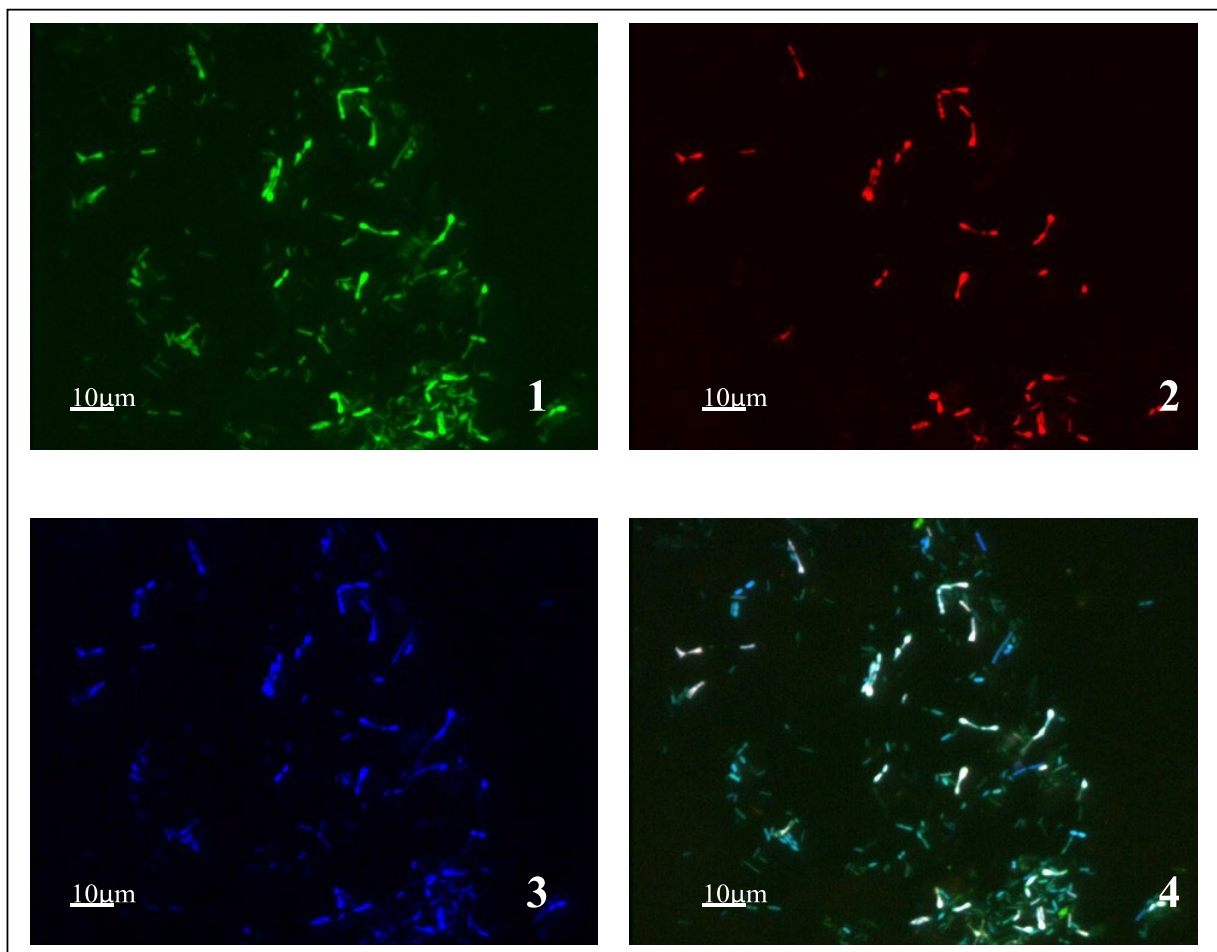
Ryc. 18: Udział procentowy sześciu gatunków *Bifidobacterium* w utworzonej kolekcji. Identyfikacja gatunkowa przeprowadzona przy pomocy reakcji PCR z wykorzystaniem gatunkowo specyficznych starterów komplementarnych do fragmentu podjednostki 16S rRNA.

b) Identyfikacja bakterii należących do rodzaju *Bifidobacterium* za pomocą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH)

Na podstawie otrzymanych wyników wykazano, że metoda FISH jest skuteczna w identyfikacji rodzajowej *Bifidobacterium* zarówno w czystej hodowli jak i w materiałach biologicznych (Ryc. 19). Metoda ta dzięki zastosowaniu rodzajowo specyficznej sondy Bif 164, charakteryzuje się wysoką czułością i specyficznością, a ponad to, jest bardzo szybka, gdyż pozwala na wykrycie obecności bakterii już po 5 godzinach od momentu pobrania materiału.

Przebadano kilka rodzajów materiałów pobranych zarówno od matek, jak i dzieci. Obecność bakterii należących do omawianego rodzaju potwierdzono metodą FISH w: wymazie z pochwy, mleku matki, smółce oraz kale noworodka.

Co więcej, przy wykorzystaniu ilościowej modyfikacji metody FISH [152, 159] oszacowano liczbę bakterii należących do rodzaju *Bifidobacterium* w jednym gramie próbki, przy czym metodę tą zastosowano dla próbek kału pobranych od noworodków. W celu uzyskania wyników, po przeprowadzeniu odpowiedniej procedury, przeliczano ilość bakterii w 20 polach widzenia kamery, a następnie przy pomocy odpowiedniego wzoru wyliczono liczbę bakterii w odważonej próbce. Otrzymaną wartość przeliczano następnie na 1 gram kału. Uzyskane wyniki dla przebadanych próbek mieściły się w przedziale wartości: 6.0×10^8 - 4.0×10^{10} , ze średnią wartością 1.0×10^{10} komórek bakterii na 1 gram kału noworodka.



Ryc. 19: Identyfikacja bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* za pomocą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) z wykorzystaniem rodzajowo specyficznej sondy Bif 164 komplementarnej do podjednostki 16S rRNA.

1 - sonda EUB 338 znakowana FITC, **2** - sonda Bif 164 znakowana Cy3, **3** - DAPI - barwnik fluorescencyjny o wysokim powinowactwie do DNA, **4** - obraz złożony uzyskany z nałożenia trzech obrazów dla poszczególnych barwników.

Preparat wykonany z materiału bezpośredniego, którym był kał noworodka, oglądano pod immersją w mikroskopie fluorescencyjnym firmy Olympus. Zdjęcia wykonano przy użyciu kamery CCD [Olympus] i komputera ze specjalnym programem do analizy obrazu AnalySis [Soft Imaging].

VI. ANTAGONISTYCZNE DZIAŁANIE BAKTERII Z RODZAJU *BIFIDOBACTERIUM*

VI. 1. WPROWADZENIE

Bakterie zasiedlające wspólną niszę ekologiczną w organizmie zdrowego człowieka, wytwarzają pomiędzy sobą stan równowagi. Bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* kolonizując przewód pokarmowy w sposób naturalny, zostały zmuszone do wykształcenia szeregu właściwości, ułatwiających im kontrolowanie innych, konkurencyjnych populacji drobnoustrojów. Antagonistyczne oddziaływanie bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* odbywa się za pomocą wielu mechanizmów. Do najważniejszych z nich można zaliczyć współzawodnictwo o składniki pokarmowe oraz receptory na powierzchni komórek nabłonkowych gospodarza, czyli tzw. „wypieranie kompetycyjne”. Co więcej, niektóre gatunki *Bifidobacterium* potrafią modyfikować receptory obecne na komórkach nabłonkowych, wynikiem czego może być uniemożliwienie przylegania innych mikroorganizmów. Zewnątrzkomórkowe enzymy *Bifidobacterium* mogą degradować specyficzne miejsca wiązania się patogennych bakterii lub ich toksyn. Enzymy te, których przykładem jest glikozydaza, mogą niszczyć receptory znajdujące się na powierzchni lub wewnątrz komórek oraz śluzu, a tym samym eliminują bakterie, które wiążą się z nimi [120].

Aby nie dopuścić do niekontrolowanego, liczbowego przerostu jednych drobnoustrojów względem innych, bakterie produkują różne związki chemiczne, działające jak inhibitory wzrostu. Zdolność bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* do syntezy produktów o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych, w dużym stopniu jest uzależniona od gatunku, ale również od szczepu bakterii. Badania laboratoryjne wykazały duży wpływ czynników zewnętrznych (skład chemiczny podłoża, pH środowiska, temperatura i faza wzrostu mikroorganizmu) na wytwarzanie tego typu związków przez szczepy *Bifidobacterium* [8, 82, 100, 163].

Do najważniejszych substancji o działaniu przeciwdrobnoustrojowym wytwarzanych przez różne rodzaje bakterii zaliczamy:

1. Niskocząsteczkowe produkty metabolizmu takie jak: amoniak, nadtlenuk wodoru, kwas mlekowy, kwas octowy.
2. Tak zwane „klasyczne” antybiotyki (np. bacytracyna i polimyksyna B).
3. Małe peptydy o działaniu antybiotycznym, syntetyzowane w rybosomach jako prekursorzy i następnie modyfikowane posttranslacyjnie (np. lantybiotyki).
4. Białkowe antybiotyki o ciężarze cząsteczkowym rzędu około 50-100 tys. Da określane obecnie jako bakteriocyny (np. kolicyny).
5. Enzymy bakteriolityczne typu muramidazy (np. lizozym).
6. Białkowe egzotoksyny (np. hemolizyna, lecytynaza).
7. Defektywne cząsteczki bakteriofagów (niektóre pyocyny) [8, 164].

Szczególne bogactwo takich aktywnych substancji uwidacznia się wśród populacji bakterii zasiedlających nisze ekologiczne o dużej, zarówno jakościowej, jak i ilościowej liczbie drobnoustrojów.

Grupą bakterii bardzo dobrze scharakteryzowaną pod względem produkowanych przez nią substancji o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych, są bakterie fermentacji mlekowej (ang. Lactic Acid Bacteria - LAB) [165]. W zamieszczonej tabeli przedstawiono produkty ich metabolizmu o działaniu antagonistycznym względem różnych mikroorganizmów (Tabela 12).

Tabela 12: Produkty metabolizmu bakterii fermentacji mlekowej o aktywności przeciwdrobnoustrojowej [165].

Produkt		Zakres aktywności
Kwasy organiczne	Kwas mlekowy	Bakterie gnilne Gram -, niektóre pleśnie.
	Kwas octowy	Bakterie gnilne, rodzaj <i>Clostridium</i> , nieliczne drożdże i pleśnie.
	Kwas 2-pirolidono-5-karboksylowy	Niektóre bakterie Gram - i Gram +.
Enzymy	Układ laktoperoksydaza - nadtlenek wodoru	Mikroorganizmy patogenne, głównie zanieczyszczające mleko i nabiał.
	Lizozym (w przypadku mutantów otrzymanych na drodze rekombinacji DNA)	Bakterie Gram +.
Niskocząsteczkowe produkty przemiany materii	Reuteryna	Szeroki zakres działania w stosunku do bakterii, drożdży i pleśni.
	Diacetyl	Bakterie Gram -.
	Kwasy tłuszczowe	Różne bakterie.
Bakteriocyny		Niektóre bakterie mlekowe, przetrwalniki, bakterie Gram +. Zakres działania zależy od rodzaju bakteriocyny.
Nadtlenek wodoru		Mikroorganizmy patogenne, szczególnie w żywności bogatej w białko.

W większości prac poświęconych omawianemu zagadnieniu, można znaleźć informacje, z których wynika, że działanie antagonistyczne bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* jest związane głównie z wydzielaniem przez nie kwasu mlekowego i octowego. Antybakteryjny wpływ kwasów organicznych może być wynikiem gwałtownego obniżenia pH środowiska poza zakres optymalnej wartości dla wzrostu określonych bakterii i/lub inhibicję aktywności biochemicznej mikroorganizmów przez niezdysocjowane cząsteczki kwasu. Kwas octowy może oddziaływać na błony komórkowe neutralizując potencjał elektrochemiczny komórki. Obecność kwasu

octowego, oprócz obniżania wartości pH podłoża, może powodować denaturację wewnątrzkomórkowych białek oraz redukcję wartości pH wewnątrz komórki, co hamuje wzrost i aktywność mikroorganizmów. Okazało się, że kwas mlekowy w porównaniu z octowym silniej hamuje wzrost różnych drobnoustrojów za wyjątkiem drożdży i pleśni. Jednakże, kwas octowy w obecności kwasu mlekowego wykazuje synergizm w inhibicji wzrostu drożdży i pleśni, a także może oddziaływać na rozwój bakterii z rodzaju *Salmonella*. Produkty fermentacji *Bifidobacterium* i obniżenie pH wydłużają czas trwania fazy logarytmicznej wrażliwych mikroorganizmów. Wiadomo również już od dawna, że pH poniżej 4.6 zabezpiecza produkty pasteryzowane przed rozwojem patogennych organizmów sporujących [165].

U bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* stwierdzono aktywność enzymu aldazy treoninowej. Enzym ten rozszczepia aminokwas treoninę (pochodzącą z rozkładu białek) na aldehyd octowy i glicynę. Aldehyd octowy spełnia istotną rolę w kontrolowaniu wzrostu i w zabezpieczaniu żywności przed niepożądaną mikroflorą. Związek ten obecny w środowisku w ilości 44 ppm. aktywnie hamuje podział komórek *E. coli* [165].

W licznych publikacjach na temat właściwości antagonistycznych bakterii, dużo uwagi poświęca się substancjom, które w swoim antibakteryjnym działaniu przypominają antybiotyki, są to między innymi: bakteriocyny, czy substancje hamujące podobne do bakteriocyn (ang. Bacteriocin-Like Inhibitory Substances - BLIS) [166, 167].

Bakteriocyny produkowane są głównie przez bakterie Gram-ujemne jako aktywne biologicznie, białkowe związki, działające na blisko spokrewnione szczepy tego samego rodzaju, a nawet gatunku. Dzięki obecności swoistych receptorów na powierzchni bakterii dochodzi do adsorpcji ściśle określonych bakteriocyn, powodujących powstawanie porów w ścianie komórkowej wrażliwych bakterii, przez które uciekają niskocząsteczkowe substancje, takie jak elektrolity, co w konsekwencji, prowadzi do zniszczenia komórki. Szczepy wytwarzające bakteriocyny mają jednocześnie geny zabezpieczające je przed samounicestwieniem [166, 167, 168, 169].

Bakterie Gram-dodatnie również produkują pewne substancje hamujące, przy czym nie posiadają one cech bakteriocyn, gdyż są peptydami działającymi w dużo szerszym zakresie. Związki te mogą prowadzić do zahamowania wzrostu innych gatunków bakterii, a ponadto nie wymagają obecności swoistych receptorów na powierzchni wrażliwych komórek. Dlatego też Tagg (1991) zaproponował nazwać je wspólnym terminem „substancje hamujące podobne do bakteriocyn” (BLIS). Pod względem swojej budowy są to małe lub duże peptydy, a nawet białka, czy też lantibiotyki (np. nizyna, lactocin S), czyli małe peptydy zawierające aminokwasy z wbudowanymi atomami siarki [166, 167, 168, 170].

Badania prowadzone przez Meghrousa'a i wsp. (1990) udowodniły, po raz pierwszy, że również niektóre szczepy bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* są zdolne do produkcji substancji podobnych do bakteriocyn, odpowiadających za hamowanie wzrostu bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, *Clostridium* i częściowo *Streptococcus* [57].

Istnieje wiele metod służących do wykrywania antagonistycznych właściwości bakterii. Przeważnie są one oparte na mechanizmie dyfuzji w żelu różnych substancji hamujących wzrost bakterii wskaźnikowych. Do badania antagonizmu stosowane są podłoża stałe, gdyż wykazano, że bakterie produkują większą ilość substancji hamujących podczas hodowania ich na podłożach stałych, lub półpłynnych, niż na podłożach płynnych. Zarówno metabolity pochodzące z fermentacji glukozy, obniżające pH podłoża, substancje podobne do bakteriocyn, jak i np. nadtlenuk wodoru, mogą w równomierny sposób rozprzestrzeniać się w środowisku żelowym [166, 167].

Metody badania antagonizmu oparte na dyfuzji w żelu dzielą się na bezpośrednie (jednoczasowe) i opóźnione. Metody bezpośrednie polegają na równoczesnym wzroście szczepów antagonistycznych, czyli w tym przypadku, bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* oraz bakterii wskaźnikowych. Hodowla obu grup bakterii prowadzona jest równolegle 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, rozpoczynają bakterie wskaźnikowe na odpowiednich, z kolei, dla nich podłożach i w najkorzystniejszych dla nich warunkach [171]. Wśród metod określających stopień i zakres antagonizmu bakterii stosowane są takie techniki opóźnione, jak: metoda krążkowa według McGroarty i Reid'a (1988) [172], metoda podwójna według Spelhaug'a i Harlander'a (1989) [173] oraz dająca najbardziej czytelne i powtarzalne wyniki, metoda słupkowa według Strus (1998) [171].

VI. 2. MATERIAŁY I METODY

VI. 2. 1. Bakterie antagonistyczne

Bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* pochodziły z wcześniej przygotowanej i dokładnie oznaczonej kolekcji bakterii przechowywanych na szklanych kulkach w bulionie BL z dodatkiem 15% glicerolu w temp. -70°C. W celu przeprowadzenia badania szklane kulki (4-5) z opłaszczonym na nich szczepem przenoszono do 2 ml płynnego podłoża BL, a następnie inkubowano w 37°C przez 48 godz. W warunkach ściśle beztlenowych z wykorzystaniem anaerostatów firmy bioMérieux z generatorami gazu H₂+ CO₂ firmy Linegal Chemicals GmbH. Tak przygotowane szczepy bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*, określane jako tzw. bakterie antagonistyczne, testowano wobec wybranych drobnoustrojów wskaźnikowych.

VI. 2. 2. Bakterie wskaźnikowe

Grupę drobnoustrojów wskaźnikowych stanowiły tlenowe i beztlenowe bakterie, będące czynnikami patogennymi ludzkiego przewodu pokarmowego, a także gatunki wchodzące w skład naturalnej mikroflory organizmu człowieka.

Z pośród tlenowych pałeczek Gram-ujemnych, odpowiedzialnych za wywoływanie ostrych biegunk lub innych dolegliwości przewodu pokarmowego przebadano:

1. *Escherichia coli* 25922 - wzorzec z kolekcji ATCC (The American Type Culture Collection).
2. *Shigella sonnei* - szczep z kolekcji PZH (Państwowy Zakład Higieny).
3. *Salmonella enteritidis* - szczep z kolekcji PZH (Państwowy Zakład Higieny).

Ponadto jako bakterie wskaźnikowe przebadano Gram-dodatnie, tlenowe ziarenkowce:

1. *Staphylococcus aureus* - kolekcja własna Katedry Mikrobiologii CMUJ, szczep wyizolowany z mleka matki.
2. *Enterococcus faecalis* - kolekcja własna Katedry Mikrobiologii CMUJ, szczep wyizolowany z pochwy matki.

Grupę bakterii beztlenowych stanowiły:

1. *Propionibacterium acnes* - kolekcja własna Katedry Mikrobiologii CMUJ, szczep wyizolowany z wymazu pobranego ze skóry klatki piersiowej matki noworodka.
2. *Campylobacter coli* - szczep wyizolowany z materiałów klinicznych badanych w trakcie bieżącej diagnostyki Katedry Mikrobiologii Akademii Medycznej we Wrocławiu.
3. *Lactobacillus lactis* - kolekcja własna Katedry Mikrobiologii CMUJ, szczep wyizolowany z wymazu pobranego ze skóry klatki piersiowej matki noworodka.

Tlenowe bakterie wskaźnikowe hodowano w optymalnych dla nich warunkach, to znaczy na podłożu Mueller-Hinton'a (MH) [Difco] namnażając 10 µl hodowli pobranej z podłoża stałego w 5 ml bulionu. Zawiesinę tą inkubowano następnie przez 24 godz., w warunkach tlenowych w 37°C. Z tak przygotowanej hodowli pobierano następnie 10 µl (*E. coli*, *S. enteritidis* i *S. aureus*) lub 20 µl (*S. sonnei* i *E. faecalis*) i przenoszono do 5 ml świeżego, płynnego podłoża MH, w konsekwencji otrzymując gęstość bakterii wskaźnikowych rzędu 1×10^5 j.t.k./ml. Z tak przygotowanych rozcieńczeń pobierano po 100 µl i wysiewano przy użyciu szklanej bagietki na odpowiednie agarowe podłoża wzrostowe: *E. coli*, *S. enteritidis*, *S. sonnei* i *S. aureus* wysiewano na podłoże MH, zaś *E. faecalis* na podłoże MH z dodatkiem 5% odwłóknionej krwi baraniej.

Beztlenowe bakterie wskaźnikowe hodowano na odpowiednich stałych podłożach wzrostowych. Dla *C. coli* było to podłoże Campylobacter Blood Agar [Oxoid], dla *L. lactis* podłoże MRS Agar (de Man, Rogosa, Sharpe) [Oxoid], natomiast dla *P. acnes* podłoże Casman Medium Base [Difco]. Bakterie inkubowano w warunkach beztlenowych (*P. acnes*) lub

mikroaerofilnych (*C. coli* oraz *L. lactis*) przez 48-72 godz., stosując odpowiednie generatory atmosfery firmy bioMérieux. W celu przygotowania właściwego stężenia hodowle poszczególnych szczepów zawieszano w bulionie Scheadler'a [Oxoid], doprowadzając gęstość do około 1×10^8 j.t.k./ml., a następnie pobierano po 100 μ l i rozprowadzano przy użyciu szklanej bagietki na powierzchni, odpowiedniego dla danego gatunku bakterii, podłoża wzrostowego.

Tak przygotowane hodowle szczepów antagonistycznych z rodzaju *Bifidobacterium* i bakterii wskaźnikowych służyły następnie do określenia występujących pomiędzy nimi zależności.

VI. 2. 3. Badanie właściwości antagonistycznych metodą słupkową

W celu oznaczenia zakresu właściwości antagonistycznych badanych szczepów *Bifidobacterium* posłużono się metodą słupkową według Strus (1998) [171].

Badane szczepy antagonistyczne *Bifidobacterium* namnażane w bulionie BL do gęstości ok. 1×10^9 j.t.k./ml, przesiewano przy użyciu jałowych wacików na płytki z podwójną ilością (40ml) agarowego podłoża BL, którego wysokość warstwy wynosiła około 1 cm. Płytki te inkubowano w 37°C, w standardowych warunkach beztlenowych przez 48 godz. Po upływie czasu inkubacji w płytkach agarowych, z wzrostem bakterii, wycinano korkoborem o stałej średnicy (10 mm) okrągłe słupki. Następnie na uprzednio przygotowane płytki z wymazanymi szczepami wskaźnikowymi przenoszono po trzy lub cztery słupki, pochodzące z hodowli różnych szczepów *Bifidobacterium*. Płytki te inkubowano przez 4 godz. w temp. 4°C. Dalszą inkubację przeprowadzano w temp. 37°C, w zależności od wymagań szczepu wskaźnikowego: w warunkach tlenowych przez 18 godz. w przypadku *E. coli*, *S. enteritidis*, *S. sonnei*, *S. aureus* i *E. faecalis* lub w warunkach beztlenowych przez 72 godz. *P. acnes* oraz w warunkach mikroaerofilnych od 18 godz. *L. lactis* do 96 godz. *C. coli* stosując odpowiednie generatory atmosfery firmy bioMérieux. Po inkubacji mierzono średnicę stref zahamowania wzrostu bakterii wskaźnikowych, powstałe wokół słupków ze szczepami antagonistycznymi i podawano ją z uwzględnieniem średnicy słupka w milimetrach [mm].

VI. 3. WYNIKI WRAZ Z ICH OMÓWIENIEM

Zaproponowana metoda słupkowa według Strus (1998) [171], wykorzystana do oznaczenia zakresu właściwości antagonistycznych ok. 80 szczepów *Bifidobacterium*, pozwoliła na bezpośrednie zbadanie bakterii o różnej tolerancji na tlen w jednym systemie agarowym.

Uzyskane wyniki przedstawiono w formie zbiorczej tabeli (Tabela 13) oraz na rycinach (Ryc. 29-36) obrazujących antagonistyczne działanie przykładowych szczepów *Bifidobacterium* względem wszystkich ośmiu szczepów wskaźnikowych: *S. sonnei*, *E. coli*, *S. enteritidis*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *P. acnes*, *C. coli* oraz *L. lactis*.

W celu przeprowadzenia analizy otrzymanych wyników, utworzono sześć przedziałów, ze względu na wielkość powstałej strefy zahamowanego wzrostu szczepów wskaźnikowych. Poszczególne wyniki przyporządkowywano do jednego z sześciu następujących przedziałów: <10 mm, 11-15 mm, 16-20 mm, 21-25 mm, 25-30 mm, >30 mm, a następnie przedstawiono je w formie zbiorczej tabeli (Tabela 14) oraz wykresów (Ryc. 20-27).

Analizując wykresy przedstawiające antagonistyczne działanie bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* na: *E. coli*, *S. enteritidis*, *S. sonnei* i *S. aureus* stwierdzono ich podobieństwo. Wykresy te swoim rozkładem przypominają krzywą Gaussa. Stosunkowo dużo szczepów *Bifidobacterium* charakteryzowało się średnim lub silnym działaniem antagonistycznym względem omawianych bakterii wskaźnikowych. Pozwala to więc przypuszczać, że mechanizmy antagonistycznego działania szczepów *Bifidobacterium* wobec powyższych czterech gatunków bakterii wskaźnikowych opierają się na podobnych zależnościach. Jednakże, w rozważaniach na ten temat, należy prawdopodobnie wykluczyć bakteriocyny, czy raczej substancje podobne do nich (BLIS), gdyż zgodnie z ich definicją, działają tylko w obrębie tego samego, lub co najwyżej pokrewnych gatunków.

Aktywność antagonistyczna szczepów *Bifidobacterium* względem *E. faecalis* była stosunkowo niewielka. Z pośród 79 przebadanych szczepów *Bifidobacterium*, żaden nie wykazywał wyraźnej strefy zahamowania wzrostu o średnicy powyżej 20 mm. Prawdopodobnie mechanizm antagonistycznego działania *Bifidobacterium* wobec *E. faecalis* nie opiera się na produkcji kwasów organicznych, obniżających pH środowiska, gdyż wszystkie badane szczepy *Bifidobacterium* zakwaszały podłoże w porównywalny sposób (3.6 - 4.4 pH), a mimo to ich aktywność wobec *E. faecalis* była zdecydowanie różna. Z racji na bardzo wąski zakres działania bakteriocyn, lub raczej substancji podobnych do nich, trudno również przyjąć, że działanie hamujące *Bifidobacterium* na enterokoki opiera się na tym mechanizmie.

Badane bakterie beztlenowe: *P. acnes* i *C. coli*, były stosunkowo bardzo wrażliwe na działanie większości testowanych szczepów *Bifidobacterium*. Prawdopodobnie w przypadku tych bakterii wskaźnikowych, dochodzi do zahamowania wzrostu w wyniku działania prostych mechanizmów. Można więc przypuszczać, że tymi aktywnymi substancjami działającymi szczególnie na bakterie beztlenowe są kwasy organiczne odpowiedzialne za obniżenie pH. Najprawdopodobniej to właśnie niskie pH środowiska znacznie ogranicza wzrost tych mikroorganizmów. Uzyskane wyniki potwierdzają między innymi badania Pybus'a i wsp. [56] oraz Strus i wsp. [164, 174]. Pybus i wsp. wykazali, na podstawie analizy tempa wzrostu bakterii beztlenowych w zależności od niskiego pH środowiska pochwy, że bakterie beztlenowe są szczególnie wrażliwe na niskie pH. Z kolei Strus i wsp. jako pierwsza zbadała bezpośrednią

aktywność antagonistyczną szczepów z rodzaju *Lactobacillus* wobec bakterii beztlenowych, uzyskując podobne wyniki do wyników otrzymanych w tej pracy.

Żaden z badanych szczepów *Bifidobacterium* nie wykazał aktywności antagonistycznej skierowanej przeciwko mikroaerofilnemu szczepowi wskaźnikowemu *L. lactis*.

W celu sumarycznego przedstawienia właściwości antagonistycznych poszczególnych szczepów *Bifidobacterium*, wchodzących w skład utworzonej kolekcji, skierowanych przeciwko wszystkim przebadanym szczepom wskaźnikowym, uzyskane wyniki zsumowano i zobrazowano na jednym wspólnym wykresie (Ryc. 29), pomijając w analizie te szczepy dla, których nie posiadano kompletu danych. Na podstawie przeprowadzonej analizy wybrano szczepy o najsilniejszych właściwościach antagonistycznych: Kl 13D, V/23/1, 38b, III/15/2, Kl 2A, pK 5 oraz szczepy najmniej aktywne: 20670, 20104, Kl 31A, 20B, Kl 25A i 27.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że zdolność hamowania wzrostu większości bakterii wskaźnikowych, z pominięciem jedynie gatunku *L. lactis*, posiadają wszystkie badane szczepy *Bifidobacterium*. Istnieje zróżnicowanie tej cechy, a efektywność inhibicji wyraźnie zależy od wrażliwości szczepu wskaźnikowego na produkty przemiany materii bakterii antagonistycznych. Poszczególne bakterie wskaźnikowe różniły się pomiędzy sobą wrażliwością na działanie tego samego szczepu *Bifidobacterium*, a także te same szczepy wskaźnikowe były w różnym stopniu wrażliwe na działanie różnych szczepów *Bifidobacterium*.

Chcąc odpowiedzieć na pytanie, który z mechanizmów działania antagonistycznego odgrywa dominującą rolę w obserwowanych zjawiskach, należy najprawdopodobniej odrzucić możliwość działania bakteriocyn, czy raczej substancji podobnych do nich (BLIS), ponieważ, bakterie wskaźnikowe były systematycznie zbyt odległe od rodzaju *Bifidobacterium*.

Wiadomo jest, że szczepy *Bifidobacterium* bytujące w złożonych ekosystemach drobnoustrojów w aktywny sposób kontrolują wzrost innych składników mikroflory. Dzieje się to najprawdopodobniej na drodze kilku nakładających się mechanizmów, a dominacja jednego z nich jest zależna od gatunku bakterii na które one działają. Uzyskane wyniki potwierdzają te szczególne właściwości antagonistyczne badanych szczepów *Bifidobacterium* pochodzących z naturalnej flory organizmu człowieka.

Tabela 13, część 1: Aktywność antagonistyczna badanych szczepów z rodzaju *Bifidobacterium* wobec szczepów wskaźnikowych.

Wyniki z testu wykonanego metodą słupkową, podane jako średnice stref zahamowania wzrostu szczepów bakterii wskaźnikowych, mierzone w milimetrach [mm], uwzględniające średnice słupków ze szczepami *Bifidobacterium* (10mm).

Nr	szczep <i>Bifido- bacterium</i>	Średnice stref zahamowania wzrostu szczepów wskaźnikowych [mm]							
		<i>Escheri- chia coli</i>	<i>Shigella sonnei</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Staphylo- coccus aureus</i>	<i>Entero- coccus faecalis</i>	<i>Propioni- bacterium acnes</i>	<i>Campylo- bacter coli</i>	<i>Lactoba- cillus lactis</i>
KONTROLA: Słupki BL		10	10	10	10	10	10	10	10
1	20083	16	18	12	10	11	24	33	10
2	20104	12	14	10	10	10	18	25	10
3	20213	11	20	10	11	10	17	nb	10
4	20219	17	20	17	14	12	21	40	10
5	20456	13	18	15	14	11	13	34	10
6	20670	10	12	10	10	10	13	15	10
7	L III/5	15	20	16	12	13	27	nb	10
8	L III/7	13	19	17	10	11	29	24	10
9	L IV	13	19	10	13	13	26	22	10
10	B/K	18	18	15	14	17	25	38	10
11	40 B	20	25	15	15	14	16	32	10
12	20 B	10	12	11	10	13	25	20	10
13	3/1	18	21	15	13	14	15	20	10
14	33 B	10	18	10	10	10	20	nb	10
15	7/4	15	19	12	11	11	20	26	10
16	2/3	15	19	14	11	13	31	28	10
17	39 B	nb	nb	nb	nb	nb	15	22	10
18	13/E/2	20	25	15	15	11	15	32	10
19	30 A	15	18	17	14	15	25	23	10
20	40 C	17	25	19	14	15	28	24	10
21	3	17	22	14	14	11	17	32	10
22	I/15/2	12	17	10	10	12	24	32	10
23	III/15/2	22	28	22	20	19	27	18	10
24	III/23/5a	17	20	16	13	14	23	25	10
25	III/23/5b	19	22	16	20	19	28	27	10
26	V/23/1	19	19	18	18	17	28	40	10
27	V/23/4	17	20	19	11	14	15	28	10
28	II/23/2	13	15	13	10	12	24	24	10
29	K1 K/1	17	22	18	16	17	19	nb	10
30	K1 K/2	18	26	21	20	18	15	26	10
31	K1 K/3	17	25	20	19	17	16	18	10
32	K1 20 D	20	20	16	18	20	22	nb	10
33	K1 3/I	13	17	13	14	13	30	16	10
34	K1 6 B	11	17	12	13	14	28	19	10
35	K1 1	17	22	19	12	15	25	30	10
36	K1 27 A	17	27	20	15	15	18	22	10
37	K1 7	20	23	19	18	19	25	16	10
38	K1 35 D	20	21	20	17	18	25	28	10
39	K1 30 C	17	22	17	15	14	28	23	10
40	K1 57 D	12	16	13	14	15	28	15	10
41	K1 31 A	13	16	15	10	14	12	20	10
42	K1 31 B	22	25	23	16	16	18	25	10

Skrót „nb” - nie badano

Tabela 13, część 2: Aktywność antagonistyczna badanych szczepów z rodzaju *Bifidobacterium* wobec szczepów wskaźnikowych.

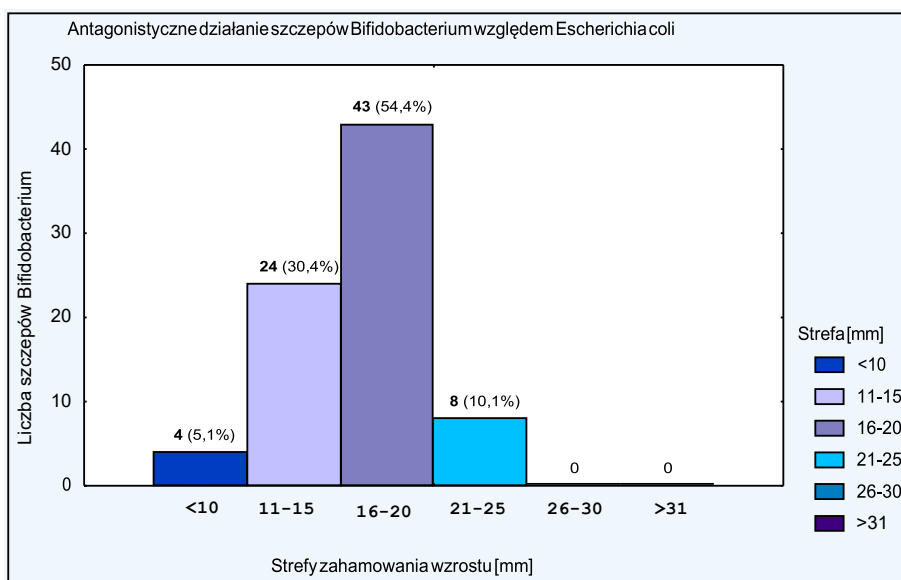
Wyniki z testu wykonanego metodą słupkową, podane jako średnice stref zahamowania wzrostu szczepów bakterii wskaźnikowych, mierzone w milimetrach [mm], uwzględniające średnice słupków ze szczepami *Bifidobacterium* (10mm).

Nr	szczep <i>Bifido- bacterium</i>	Średnice stref zahamowania wzrostu szczepów wskaźnikowych [mm]							
		<i>Escheri- chia coli</i>	<i>Shigella sonnei</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Staphylo- coccus aureus</i>	<i>Entero- coccus faecalis</i>	<i>Propioni- bacterium acnes</i>	<i>Campylo- bacter coli</i>	<i>Lactoba- cillus lactis</i>
43	Kl 33 C	13	17	13	14	13	30	19	10
44	Kl 2 A	21	28	22	15	17	21	32	10
45	Kl 29 E	18	21	20	20	17	16	32	10
46	Kl 38 C	20	26	20	17	18	21	25	10
47	Kl 13 D	21	28	26	19	18	25	34	10
48	Kl 39 B	17	26	21	15	16	18	25	10
49	Kl 25 A	13	15	14	10	12	15	25	10
50	Kl 36 A	20	26	20	18	18	20	30	10
51	Kl 36	16	19	18	17	16	20	28	10
52	Kl 26 B	18	25	16	17	16	24	28	10
53	Kl 30 A	14	14	14	14	14	28	36	10
54	Kl 66 A	20	20	19	17	16	15	27	10
55	Kl 23 E	21	27	23	18	18	23	nb	10
56	Kl 28 a	18	24	20	16	16	22	nb	10
57	Kl 1 B	17	20	17	17	15	20	26	10
58	Kl 63 A	17	23	17	16	15	16	27	10
59	Kl 66 C	19	22	17	20	20	20	27	10
60	Kl 36 B	16	17	15	10	13	15	25	10
61	Kl 59 A	20	22	17	18	18	35	nb	10
62	2/1	13	18	15	13	14	32	nb	10
63	3/3	13	18	13	14	14	33	18	10
64	37	13	16	16	13	14	16	20	10
65	9	20	26	22	17	17	25	27	10
66	38 a	20	24	22	17	17	19	40	10
67	38 b	15	19	18	16	17	30	18	10
68	34	21	23	21	16	18	25	28	10
69	36	14	22	16	15	14	34	26	10
70	35	20	23	23	21	19	25	22	10
71	13 a	17	22	15	17	16	24	nb	10
72	13 b	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
73	39	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
74	40	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
75	24	19	28	24	20	18	16	30	10
76	8 a	13	20	16	15	13	23	nb	10
77	5	16	22	18	16	16	22	nb	10
78	23	18	23	16	20	16	26	26	10
79	pK 1	17	20	19	11	14	nb	nb	10
80	pK 3	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
81	pK 5	24	27	21	22	18	17	27	10
82	Kl M/1	19	20	17	16	14	nb	nb	10
83	Kl M/3	10	18	15	10	10	nb	nb	10
84	Kl M/5	22	25	19	20	14	14	20	10

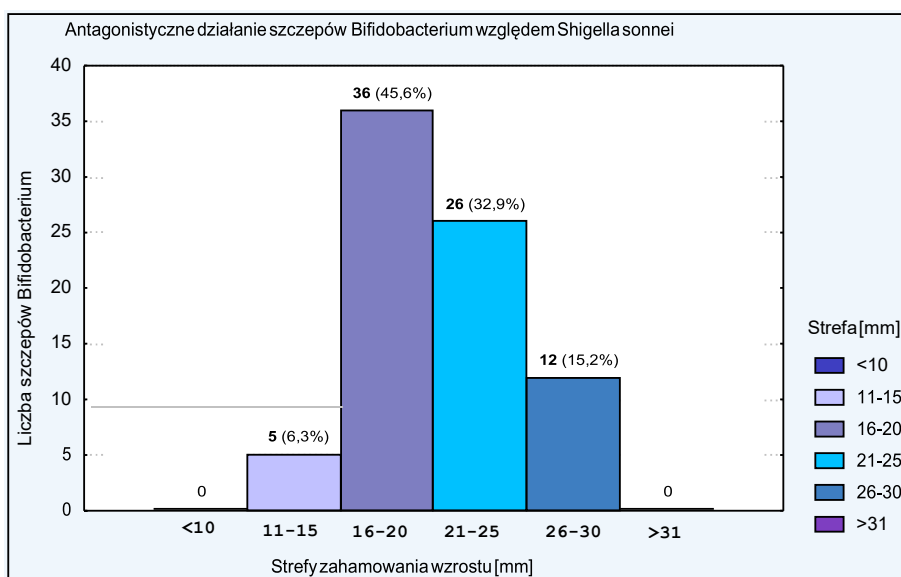
Skrót „nb” - nie badano

Tabela 14: Antagonistyczne działanie badanych szczepów *Bifidobacterium* względem bakterii wskaźnikowych - podział ze względu na wielkość stref zahamowania wzrostu.

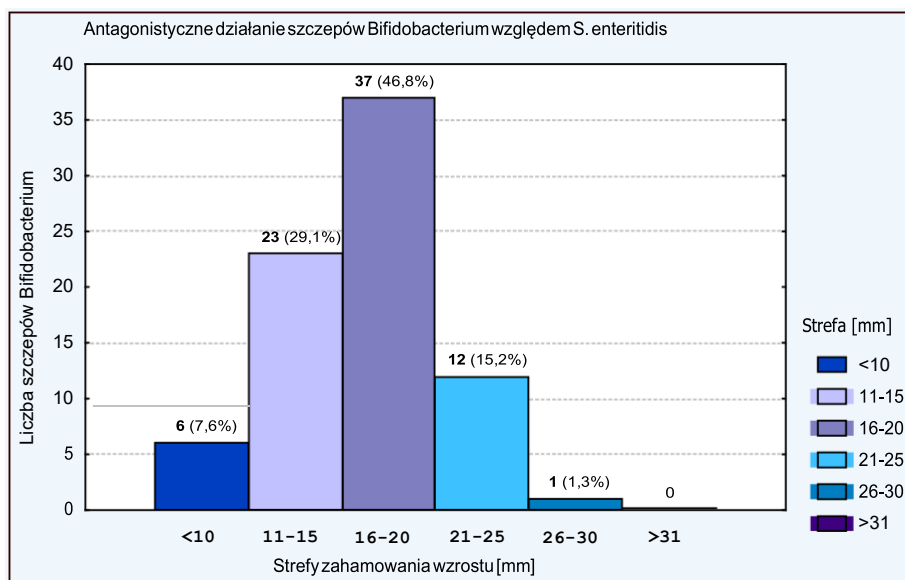
Grupa	Strefy zahamowania wzrostu [mm]	SZCZEPY WSKAŹNIKOWE								Liczba szczepów <i>Bifidobacterium</i>
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Shigella sonnei</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Campylobacter coli</i>	<i>Lactobacillus lactis</i>	
1	<10	4	0	6	12	5	0	0	80	
2	11-15	24	5	23	33	40	12	2	0	
3	16-20	43	36	37	32	34	21	13	0	
4	21-25	8	26	12	2	0	24	16	0	
5	26-30	0	12	1	0	0	15	20	0	
6	>31	0	0	0	0	0	5	14	0	
Suma przebadanych szczepów <i>Bifidobacterium</i>		79	79	79	79	79	77	65	80	



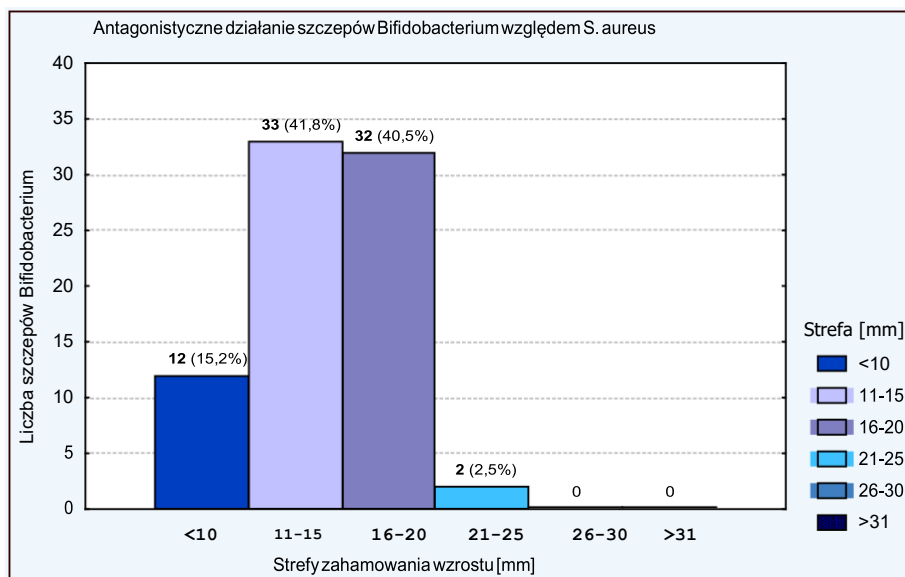
Ryc. 20: Działanie antagonistyczne badanych szczepów z rodzaju *Bifidobacterium* względem szczepu wskaźnikowego *Escherichia coli*.



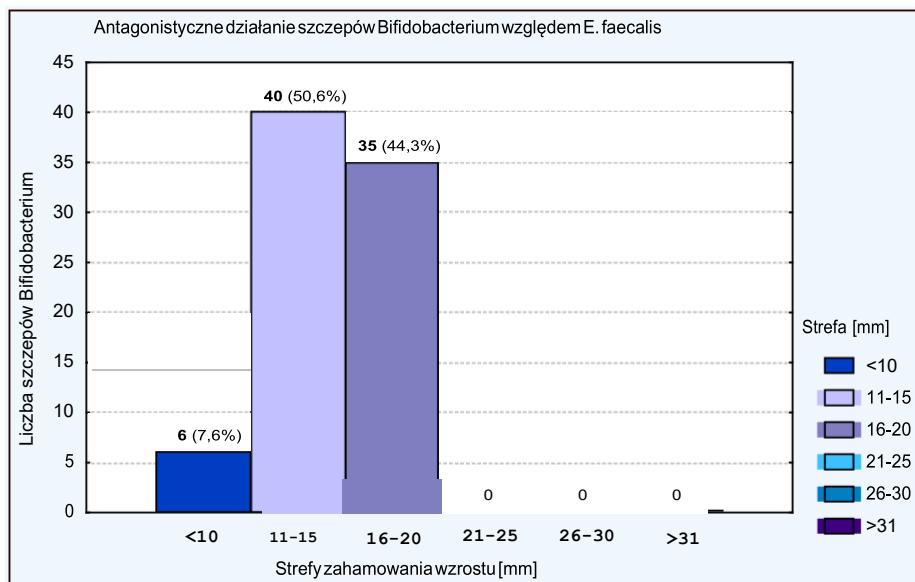
Ryc. 21: Działanie antagonistyczne badanych szczepów z rodzaju *Bifidobacterium* względem szczepu wskaźnikowego *Shigella sonnei*.



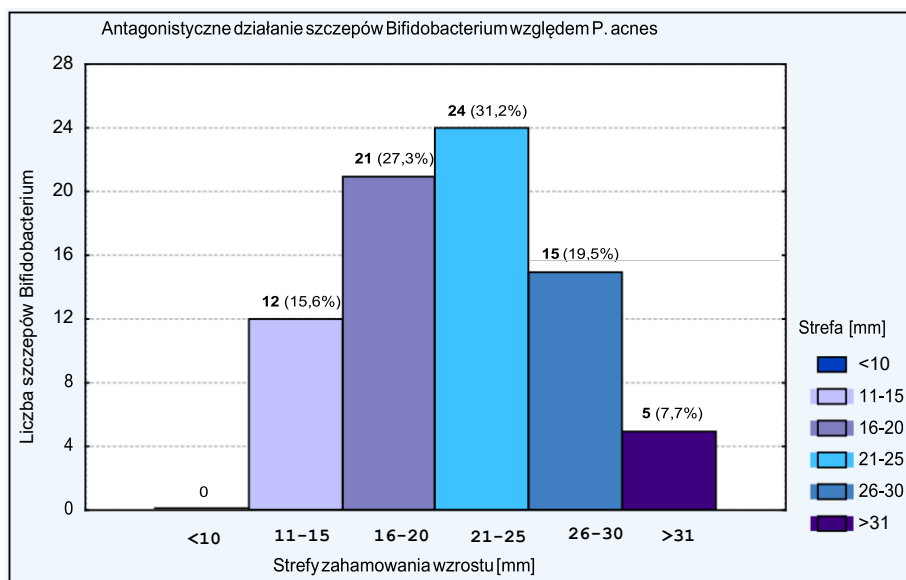
Ryc. 22: Działanie antagonistyczne badanych szczepów z rodzaju *Bifidobacterium* względem szczepu wskaźnikowego *Salmonella enteritidis*.



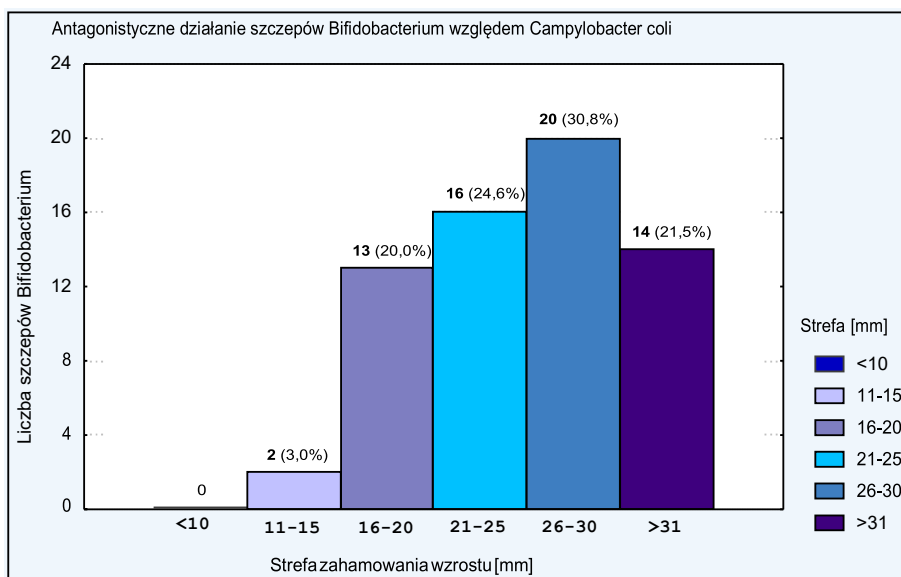
Ryc. 23: Działanie antagonistyczne badanych szczepów z rodzaju *Bifidobacterium* względem szczepu wskaźnikowego *Staphylococcus aureus*.



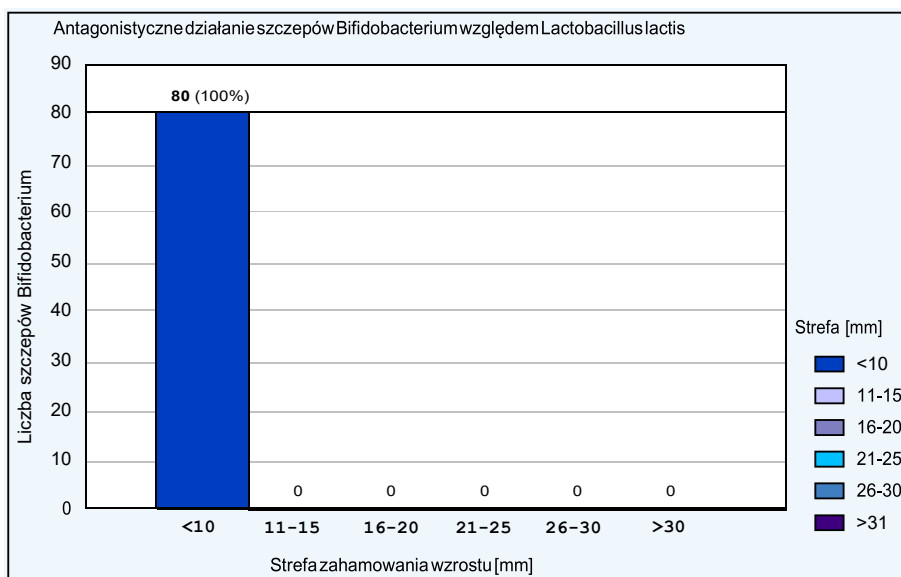
Ryc. 24: Działanie antagonistyczne badanych szczepów z rodzaju *Bifidobacterium* względem szczepu wskaźnikowego *Enterococcus faecalis*.



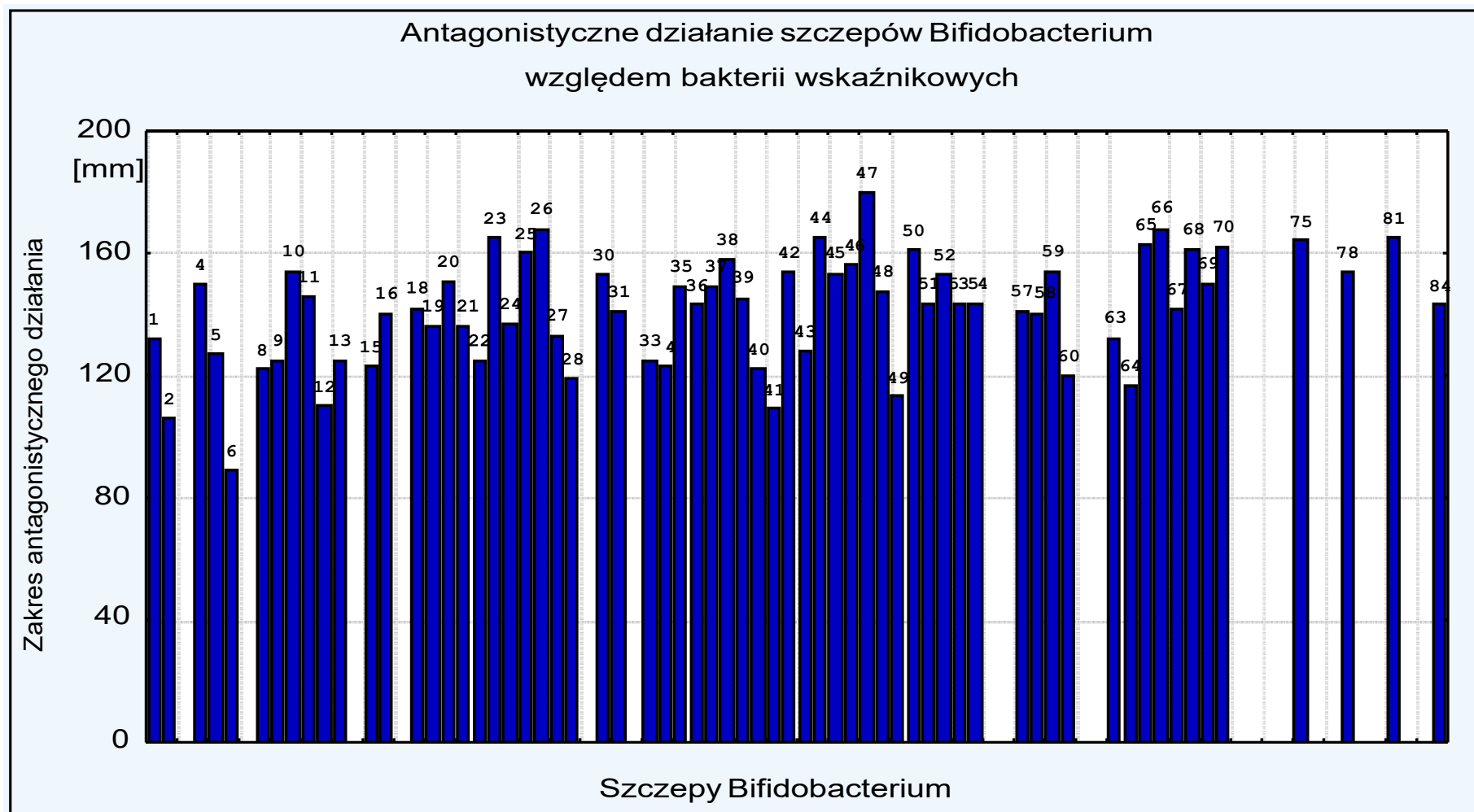
Ryc. 25: Działanie antagonistyczne badanych szczepów z rodzaju *Bifidobacterium* względem szczepu wskaźnikowego *Propionibacterium acnes*.



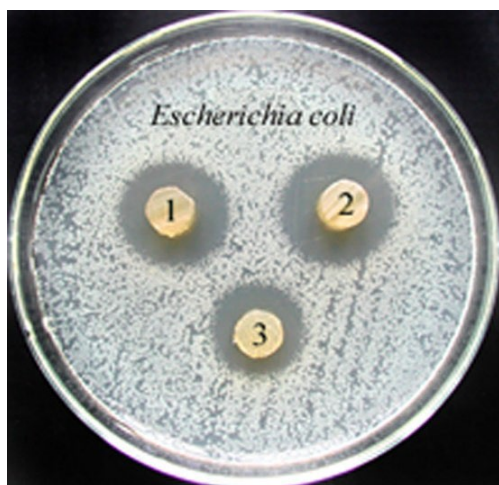
Ryc. 26: Działanie antagonistyczne badanych szczepów z rodzaju *Bifidobacterium* względem szczepu wskaźnikowego *Campylobacter coli*.



Ryc. 27: Działanie antagonistyczne badanych szczepów z rodzaju *Bifidobacterium* względem szczepu wskaźnikowego *Lactobacillus lactis*.



Ryc. 28: Działanie antagonistyczne poszczególnych szczepów z rodzaju *Bifidobacterium*, wchodzących w skład utworzonej kolekcji, względem ośmiu szczepów bakterii wskaźnikowych (*E. coli*, *S. sonnei*, *S. enteritidis*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. acnes*, *C. coli*, *L. lactis*). Słupki przedstawiają sumy średnic zahamowania wzrostu.



Ryc. 29: Przykład antagonistycznego działania szczepów *Bifidobacterium* względem *E. coli* wykazany metodą słupkową.

Badane szczepy:

1 - 20219, 2 - Kl 59A, 3 - 30A



Ryc. 30: Przykład antagonistycznego działania szczepów *Bifidobacterium* względem *Shigella sonnei* wykazany metodą słupkową.

Badane szczepy:

1 - 40B, 2 - Kl 27A, 3 - B/K



Ryc. 31: Przykład antagonistycznego działania szczepów *Bifidobacterium* względem *Salmonella enteritidis* wykazany metodą słupkową.

Badane szczepy:

1 - Kl 36, 2 - Kl 38C, 3 - III/23/5a



Ryc. 32: Przykład antagonistycznego działania szczepów *Bifidobacterium* względem *Enterococcus faecalis* wykazany metodą słupkową.

Badane szczepy:

1 - L III/5, 2 - 40C, 3 - 20B



Ryc. 33: Przykład antagonistycznego działania szczepów *Bifidobacterium* względem *Staphylococcus aureus* wykazany metodą słupkową.

Badane szczepy:

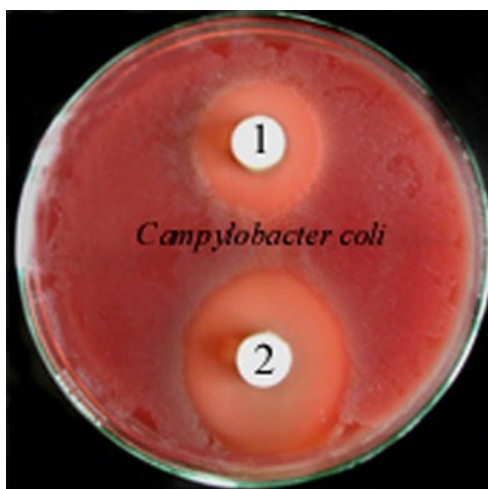
1 - 36, 2 - Kl 35D, 3 - 3/1



Ryc. 34: Przykład antagonistycznego działania szczepów *Bifidobacterium* względem *Propionibacterium acnes* wykazany metodą słupkową.

Badane szczepy:

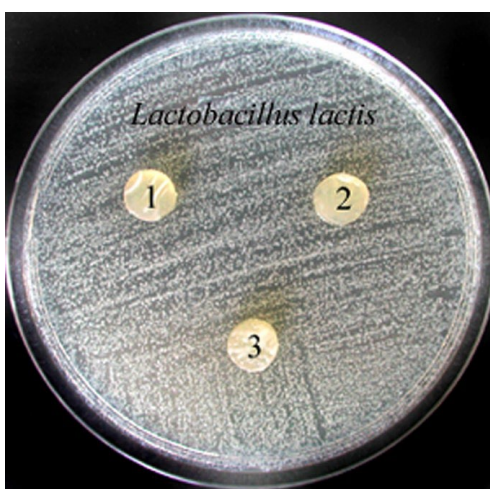
1 - 2/3, 2 - Kl 33C, 3 - 9, 4 - Kl 59A



Ryc. 35: Przykład antagonistycznego działania szczepów *Bifidobacterium* względem *Campylobacter coli* wykazany metodą słupkową.

Badane szczepy:

1 - 37, 2 - KL 36A



Ryc. 36: Przykład antagonistycznego działania szczepów *Bifidobacterium* względem *Lactobacillus lactis* wykazany metodą słupkową.

Badane szczepy:

1 - 20456, 2 - 7/4, 3 - 34

VII. WŁAŚCIWOŚCI POWIERZCHNIOWE BAKTERII Z RODZAJU *BIFIDOBACTERIUM*

VII. 1. WPROWADZENIE

Pierwszym etapem procesu kolonizacji organizmu gospodarza przez mikroorganizmy jest ich przywarcie do nabłonka lub naskórka odpowiedniej niszy ekologicznej, w której zaczną się namnażać. Bakterie dostają się do organizmu człowieka najczęściej przez drogi oddechowe, przewód pokarmowy oraz drogi moczowo-płciowe, gdzie uzyskując kontakt z błonami śluzowymi uruchamiają szereg mechanizmów, wynikiem czego jest ich przyłgnięcie, adhezja, kolonizacja, a nawet inwazja w głąb komórek [175].

Powierzchnia bakterii, dzięki swoim specyficznym właściwościom wytworzonym w ciągu ich rozwoju, służy jako organ, za pomocą którego bakterie mogą lokalizować się w otaczającym je środowisku. W przypadku bakterii współżyjących z makroorganizmami, ich struktury zewnętrzne służą do zakotwiczenia się na powierzchniach ciała gospodarza w celu kolonizacji. Proces ten, z kolei, może prowadzić, albo do wytworzenia się stałej flory danej niszy ekologicznej, albo bezpośrednio do inwazji w głąb ustroju, czyli do zakażenia. Zatem te same mechanizmy, w których uczestniczy powierzchnia bakterii, mogą prowadzić, zarówno do korzystnej dla gospodarza kolonizacji, jak również do niekorzystnego dlań zakażenia [5, 71].

Właściwości powierzchniowe bakterii nie są jeszcze dokładnie poznane i dlatego w pracach badawczych zwykle opisuje się je w sposób cząstkowy. Określa się kilka różnych cech związanych z powierzchnią i jej strukturami, takich jak: zdolność przylegania do komórek gospodarza tzw. adherencja, ładunek powierzchni, strukturę morfologiczną lub antygeny powierzchniowe [71, 176].

Uważa się, że adherencja bakterii do komórek ustroju gospodarza stanowi jeden z ważniejszych elementów opisu aktywności powierzchniowej bakterii. Jest ona niezbędnym, pierwszym etapem procesu kolonizacji błon śluzowych, zarówno bakterii patogennych, jak i tych stanowiących naturalną florę ludzkiego organizmu [71].

Pomimo wielu badań, mechanizm adherencji bakterii kolonizujących błony śluzowe w organizmie człowieka, wciąż nie jest do końca poznany. Jak wykazano, adherencja determinowana jest skomplikowanymi interakcjami pomiędzy hydrofobowością, siłami Van der Waals'a i oddziaływaniami elektrostatycznymi [177, 178]. Obecnie przedstawia się ją jako dwustopniowy proces, w początkowym etapie oparty na niespecyficznym fizyko-chemicznych interakcjach pomiędzy dwoma wzajemnie oddziaływującymi na siebie powierzchniami komórek, a następnie na specyficznym wiązaniu się ich komponent powierzchniowych [179, 93].

Adherencja niespecyficzna definiowana jest jako interakcje wywołane przez właściwości powierzchniowe, takie jak: ładunek elektryczny, krzywizna powierzchni lub wolna energia

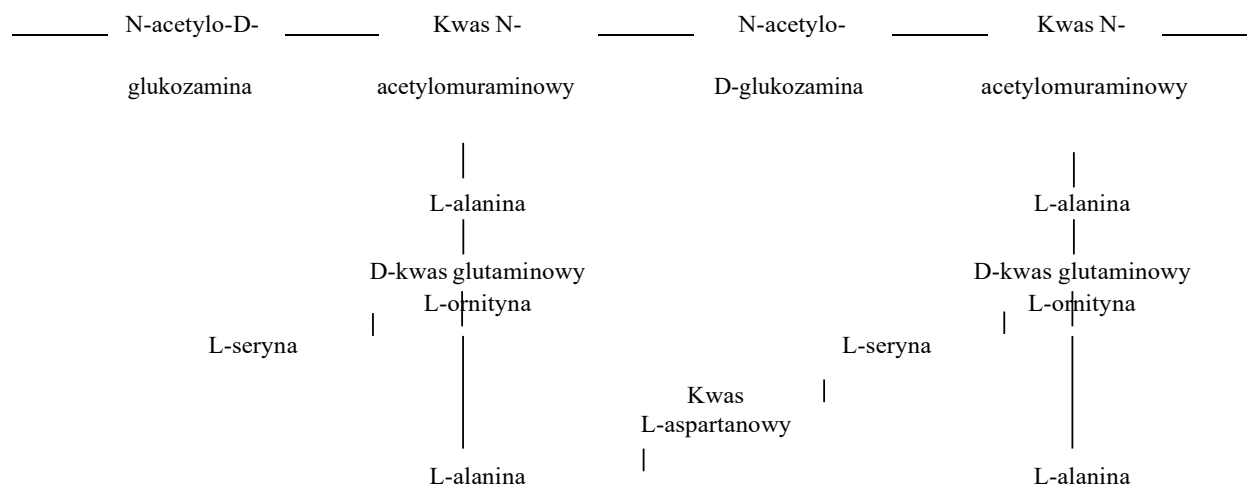
powierzchni [180]. Przykładem adherencji niespecyficznej jest adherencja *Bifidobacterium* do powierzchni szkła [181]. Adherencja specyficzna zachodzi zaś dzięki komplementarnemu wiązaniu się adhezyn bakteryjnych (białkowe lub niebiałkowe struktury) obecnych na powierzchni bakterii z receptorami adhezyjnymi (peptydy lub glikopeptydy) obecnymi na komórkach gospodarza przy pomocy różnego typu wiązań chemicznych, np. wiązań wodorowych, w obecności specyficznych jonów [120, 180].

Początkową, niespecyficzną adherencję tłumaczy teoria stabilności koloidów liofobowych (teoria DLVO - Derjaguin - Landau - Verwey - Overbeek), opisująca zmiany w wolnej energii Gibbsa jako funkcji odległości pomiędzy dwoma, obdarzonymi ładunkiem elektrycznym powierzchniami [178, 181, 182]. W momencie, gdy odległość oddziaływania pomiędzy tymi powierzchniami obniży się do 1.5 nm może nastąpić wiązanie specyficzne. Wówczas adhezyny znajdujące się na powierzchni bakterii komplementarnie wiążą się z receptorami komórek gospodarza. Mechanizm ten opisuje teoria „zamka i klucza”. Siła przylegania zależy od liczby powstałych wiązań, im jest ich więcej, tym mniejsze prawdopodobieństwo, by uległy zerwaniu w tym samym czasie [70, 180].

W momencie, gdy bakteria przyczepi się do podłoża, rozpoczyna się wieloetapowy proces, którego celem jest uformowanie kompleksu wspólnie adherujących mikroorganizmów, tzw. biofilmu. Biofilm ogólnie zdefiniowany jest jako warstwa prokariotycznych lub eukariotycznych komórek, zakotwiczonej w powierzchni podłoża i osadzonej w organicznej macierzy pochodzenia biologicznego [182, 183]. W organizmie człowieka to krytyczny element decydujący o zdrowiu lub chorobie, utworzony przez mikroorganizmy ułożone w jednej lub wielu warstwach, otoczone przez polisacharydy bakterii i macierzy zewnątrzkomórkowej gospodarza, przytwierdzone stosunkowo mocno do powierzchni. Struktura biofilmu jest dynamiczna, a bakterie tworzące go żyją w symbiozie, komunikując się między sobą i oddziałując na siebie w wyniku wielu interakcji [70].

Badania nad budową ściany komórkowej bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* wykazały, że zawiera ona w swym składzie kwas asparanowy, glutaminowy oraz N-acetylmuraminowy, a także ornitynę, serynę, alaninę i N-acetylo-D-glukozaminę (Ryc. 37) [34, 40]. Analiza kwasów tłuszczowych i fosfoglicerydów nie ujawniła istotnych różnic pomiędzy poszczególnymi gatunkami. Istnieją natomiast gatunkowe różnice w składzie aminokwasów budujących białka powierzchniowe, co może być pomocne w identyfikacji gatunkowej, jednakże gatunki blisko spokrewnione, np. *B. longum* i *B. infantis* mogą mieć takie same wiązania krzyżowe (ang. cross- links). Wykazano, że struktura antygenowa *Bifidobacterium* jest kompleksowa i występuje wysoki stopień specyficzności badanych szczepów w reakcjach aglutynacji. Antygeny biorące w tym udział są bardzo stabilne i odporne na wysoką temperaturę [5].

Ryc. 37: Struktura peptydoglikanu gatunku *Bifidobacterium bifidum* [34].



Możliwość oddziaływania bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* jako probiotyków związana jest z ich zdolnością do adherowania do powierzchni nabłonkowych w organizmie człowieka. Adherencja ta może być skutkiem przylegania *Bifidobacterium* do śluzu wydzielanego przez komórki nabłonkowe lub do nich samych [181].

Obecnie przeprowadzane są badania adherencji *Bifidobacterium* w warunkach *in vitro* z wykorzystaniem ustalonych linii komórkowych. Najczęściej w tym celu używa się dwie, dobrze scharakteryzowane, linie komórkowe pochodzące z ludzkich nowotworów okrężnicy: komórki linii Caco-2 charakteryzujące się typowymi cechami dla kolonocytów oraz komórki linii HT-29 będące bardzo dobrym modelem komórek kubkowatych [184].

Obserwacja w mikroskopie skaningowym wykazała, że *Bifidobacterium* adheruje do apikalnej powierzchni mikrokosmków rąbka szczoteczkowego (ang. brush border) enterocytów linii Caco-2 oraz do śluzu wydzielanego przez komórki linii HT-29-MTX, będących mutacją linii HT-29 stale produkującą śluz. Adherencja ta jest niezależna od obecności wapnia i jest kontrolowana przez białkowy czynnik stymulujący adherencje (ang. adhesion-promoting factor). Czynnik ten występuje zarówno w komórkach bakteryjnych, jak i w supernatancie pochodzącym z hodowli *Bifidobacterium*. Brak zdolności do adherowania niektórych szczepów *Bifidobacterium* sugeruje, że czynnik stymulujący adherencje nie wykazuje ekspresji u wszystkich szczepów tego rodzaju [184, 185, 186].

Przeprowadzono bardzo wiele badań poświęconych charakterystyce adhezyn bakterii Gram-ujemnych, w szczególności występujących u gatunku *E. coli*, który jest odpowiedzialny za infekcje dróg moczowych. Okazało się, że adhezyny to fimbrie, filamenty (ang. fuzzy layer), niefimbrialne lektyny powierzchniowe (hemaglutyniny) oraz lektyny zewnątrzkomórkowe rozpoznające swoiste cukry. Obecność adhezyn na powierzchni komórki bakterii nadaje jej

wysoką hydrofobowość [187]. Bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* pochodzące z naturalnej flory, np. z przewodu pokarmowego, również wykazują wysoką hydrofobowość powierzchni, co może wskazywać, że być może wykorzystują te same mechanizmy do kolonizacji śluzówek co patogenne bakterie Gram-ujemne. Uważa się, że bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* mogą przylegać do ludzkich kolonocytów za pomocy struktur powierzchniowych zawierających kwasy teichowe i lipoteichowe związane z peptydoglikanem ściany komórkowej [188]. Proces adherencji przebiega stosunkowo szybko i jest zależny od wielu parametrów, między innymi od: czasu inkubacji bakterii z komórkami docelowymi, liczby i fazy wzrostu badanych bakterii oraz składu i pH podłoża hodowlanego [186].

VII. 2. MATERIAŁY I METODY

VII. 2. 1. Bakterie

Bakterie z rodzaju *Bifidobacterium*, pochodziły z wcześniej przygotowanej i dokładnie oznaczonej kolekcji bakterii przechowywanej na szklanych kulkach w bulionie BL z dodatkiem 15% glicerolu w temperaturze -70°C . W celu przeprowadzenia badania szklane kulki (4-5) z opłaszczonym na nich szczepem przenoszono do 2 ml płynnego podłoża BL, a następnie inkubowano w 37°C przez 48 godz. W warunkach ściśle beztlenowych z wykorzystaniem anaerostatów firmy bioMérieux z generatorami gazu $\text{H}_2 + \text{CO}_2$ firmy Linegal Chemicals GmbH.

VII. 2. 2. Metody określania właściwości powierzchniowych

a) Badanie hydrofobowości powierzchni

a. 1) Test na autoaglutynację

Test autoaglutynacji, wykorzystywany jako wstępna miara hydrofobowości powierzchni, wykazywał zdolność badanych szczepów bakterii do łączenia się ich komórek w środowisku soli fizjologicznej. W celu przeprowadzenia testu, badane szczepy bakterii namnażano na stałym podłożu BL inkubując płytki w standardowych warunkach beztlenowych, w temp. 37°C przez 24 godz. Następnie za pomocą kalibrowanej ezy pobierano 10 μl danego szczepu i zawieszano go w 100 μl soli fizjologicznej (0.9% NaCl) [POCH] wykorzystując w tym celu szkiełko podstawowe. Po zawieszeniu bakterii w NaCl i odczekaniu około 30 sek. obserwowano wynik przeprowadzonej próby. W przypadku, gdy zawiesina bakterii pozostała jednorodna, wynik traktowano jako ujemny (-), natomiast gdy tworzyły się widoczne, zarówno gołym okiem, jak i w mikroskopie, agregaty komórek bakteryjnych, wynik określano za pomocą skali półilościowej, od jednego (+) do trzech (+++).

Skala wyników:

- brak reakcji autoaglutynacji; jednorodna zawiesina bakterii
- + niewielka reakcja autoaglutynacji; pojedyncze, bardzo małe agregaty komórek bakteryjnych
- ++ umiarkowana reakcja autoaglutynacji; stosunkowo dużo, małych agregatów komórek bakteryjnych
- +++ wyraźna reakcja autoaglutynacji; cała zawiesina bakterii ścięta w postaci dużych agregatów

a. 2) Test agregacji w soli (SAT)

Test agregacji w soli SAT (ang. Salt-Aggregation Test) wykonano według Jonsson'a i wsp. (1984) [189], uwzględniając własną modyfikację. Test ten wykazywał zdolność łączenia się komórek bakterii w roztworach siarczanu amonu. W celu przeprowadzenia testu, szczepy bakterii namnażano na stałym podłożu BL inkubując je w warunkach beztlenowych w temp. 37°C przez 24 godz. Następnie za pomocą kalibrowanej ezy pobierano 10 µl danego szczepu i zawieszano go w 100 µl kolejnych wzrastających roztworów siarczanu amonu [POCH] (0.02; 0.05; 0.5; 1.0; 2.0; 4.0 mol/l). Po wymieszaniu zawiesiny bakterii na szkiełku podstawowym i odczekaniu około 30 sek. obserwowano wynik przeprowadzonej próby. W przypadku, gdy zawiesina bakterii pozostała jednorodna, wynik traktowano jako ujemny (-), natomiast gdy tworzyły się widoczne, zarówno gołym okiem, jak i w mikroskopie agregaty komórek bakteryjnych wynik określano jako dodatni (+). Najniższe stężenie siarczanu amonu powodujące agregację komórek badanego szczepu podawano jako wartość SAT [mol/l]. Przyjęto, że szczepy wykazujące wartość SAT<1 cechowały się wysoką hydrofobowością powierzchni, podczas gdy hydrofobowość szczepów o wartości SAT>1 była znacznie mniejsza.

b) Badanie produkcji śluzu

W celu oznaczenia produkcji śluzu (ang. slime) przez badane szczepy *Bifidobacterium*, posłużono się metodą Christensen'a i wsp. (1982, 1985) [190, 191]. Bakterie hodowano w szklanych probówkach z 2 ml płynnego podłoża BL w warunkach beztlenowych przez 24-48 godz. Po zakończonej inkubacji, jałową pipetą, bez dotknięcia ścian probówki, odciągano podłoże BL z namnożoną zawiesiną bakterii, a następnie stopniowo, po ściankach, dodawano 1 ml 0.1% safraniny [POCH]. Następnie, przez około 60 sek. delikatnie obracano probówkę, po czym usuwano barwny roztwór. Probówki stawiano do góry dnem i pozostawiono na kilkanaście minut, aż do wyschnięcia w temperaturze pokojowej. Na ściankach obserwowano pojawienie się różowego biofilmu, który odzwierciedlał zdolność bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* do tworzenia śluzu. Ilość wydzielonego śluzu oceniono w skali półilościowej od (-) do (++++).

Skala wyników:

- brak biofilmu na ściankach probówki; brak agregatów przyczepionych do szkła
- + minimalny biofilm na ściankach probówki; niewielkie i w niedużej ilości agregaty bakteryjne przyczepione do szkła
- ++ stosunkowo duży biofilm na ściankach probówki; niewielkie, ale liczne agregaty bakteryjne przyczepione do szkła
- +++ duży biofilm na ściankach probówki; duże i liczne agregaty bakteryjne przyczepione do szkła
- ++++ bardzo duży biofilm na ściankach probówki; bardzo duże i liczne agregaty bakteryjne przyczepione do szkła

c) Badanie adherencji do linii komórkowych Caco-2 i HT-29

W celu oznaczenia stopnia przylegania (adherencji) szczepów *Bifidobacterium* posłużono się zmodyfikowaną metodą Coconnier (1992, 1997) [163, 192].

Do doświadczenia użyto dwóch linii komórkowych ludzkiego raka okrężnicy: Caco-2 oraz HT-29 o morfologii epitelialnej (pasaż 20-30), które otrzymano z niemieckiej kolekcji DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen.

Hodowla linii komórkowych HT-29 i Caco-2

Hodowlę prowadzono z zastosowaniem podłoża Eagle'a (MEM) wzbogaconego dodatkiem inaktywowanej, płodowej surowicy cielęcej FCS (ang. Faetal Calf Serum), 10% dla linii HT-29 i 20% dla linii Caco-2 oraz 2,5 µg/ml amfoterycyny B, 10 µg/ml neomycyny, 100 j.m./ml penicyliny i 50 µg/ml streptomycyny. Wyjściowa gęstość hodowli wynosiła 2×10^4 komórek/ml. Hodowlę prowadzono na jałowych szkiełkach nakrywkowych w plastikowych płytkach dwunastodołkowych, w temp. 37°C w atmosferze o zwiększonej wilgotności zawierającej 7.5% CO₂, zmieniając podłoże odżywcze co 48 godz. W zależności od linii komórkowej, zgodnie z zaleceniami literaturowymi, płytki inkubowano przez 21 dni w przypadku HT-29 oraz 15 dni Caco-2, aż do uzyskania jednowarstwowej hodowli zróżnicowanych komórek (monolayer) [163, 192].

Przygotowanie badanych szczepów *Bifidobacterium*

Szczepy *Bifidobacterium* hodowano w probówkach z płynnym podłożem BL, w warunkach beztlenowych, w temp. 37°C przez 18 godz. Uzyskaną zawiesinę bakteryjną doprowadzono do gęstości rzędu 1×10^9 j.t.k./ml (4 w skali McFarland'a) rozcieńczając ją podłożem BL. Następnie 1ml przygotowanej hodowli dodawano do 1ml płynu hodowlanego

MEM z dodatkiem 10% FCS, uzyskując końcowe stężenie bakterii około 5×10^8 j.t.k./ml, wyliczone przy pomocy metody kolejnych rozcieńczeń dla przykładowych szczepów *Bifidobacterium*.

Przeprowadzenie testu

Szkiełka z hodowlą linii komórkowych znajdujące się w plastikowych płytkach dwunastodołkowych przemywano dwa razy PBS bez jonów wapnia i magnezu. Następnie do każdego dołka dodawano po 2 ml uprzednio przygotowanej zawiesiny bakteryjnej i inkubowano razem w 37°C przez jedną godzinę w atmosferze 7,5% CO₂, od czasu do czasu lekko poruszając płytką. Po skończonej inkubacji usuwano zawiesinę bakteryjną, a dołki przepłukano pięć razy PBS w celu pozbycia się bakterii nie związanych z tkanką. Całość utrwalano 3,7% formaldehydem przez 30 min., po czym ponownie przemywano PBS. Następnie szkiełka barwiono fioletem krystalicznym przez 3 min., dokładnie opłukiwano i suszono. Po sporządzeniu preparatów mikroskopowych adherencję określono przy użyciu mikroskopu świetlnego z obiektywem immersyjnym x100 [Olympus].

Adherencje bakterii oceniono według standardu wewnętrznego w skali półilościowej od (-) do (++++), odzwierciedlając w ten sposób stopień nasilenia badanego zjawiska, dla trzech możliwych miejsc adherowania bakterii, to jest: wolnych przestrzeni pomiędzy narośniętymi komórkami (szkło), brzegów jednowarstwowej hodowli oraz jednowarstwowej hodowli (monolayer). Dla każdego preparatu zbierano wyniki z 20 losowo wybranych pól widzenia, a następnie je uśredniano.

Opis wyniku:

- brak lub minimalna ilość adherujących bakterii w preparacie
- + pojedyncze i w niewielkiej ilości komórki bakteryjne
- ++ stosunkowo liczne bakterie czasami tworzące małe agregaty
- +++ liczne komórki bakteryjne zebrane w agregaty
- ++++ duże agregaty bakteryjne

Tabela 15: Legenda oceny stopnia przylegania bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* do linii komórkowych Caco-2 i HT-29, utworzona według standardu wewnętrznego.

Stopień adherencji	Liczba komórek bakteryjnych w polu widzenia
-	<10
+	10-30
++	30-50
+++	50-100
++++	>100

Odczynniki

1. Płodowa surowica cielęca (Faetal Calf Serum- FCS) [SIGMA]
2. Podłoże Eagl'a 1959 na solach Earle'a z L-Glutaminą i NaHCO_3 (Minimal Essential Medium- MEM) [Biomed Lublin]
3. Trypsyna 0,25% [Biomed Lublin]
4. PBS (Phosphate Buffered Saline) buforowany roztwór soli fizjologicznej bez jonów wapnia i magnezu [Biomed Lublin]
5. Penicylina, Streptomycyna, Neomycyna i Amfoterycyna B [SIGMA]
6. Alkohol etylowy 96% [Polmos]
7. Formaldehyd 3.7% [SIGMA]
8. Fiolet krystaliczny [Merck]
9. NaCl [POCH]

VII. 3. WYNIKI WRAZ Z ICH OMÓWIENIEM

Opisane powyżej badania nad właściwościami powierzchniowymi bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* przeprowadzono na 84 szczepach pochodzących z utworzonej kolekcji. Wyniki z przeprowadzonych testów zamieszczono w zbiorczej tabeli (Tabela 16).

Z pośród wszystkich przebadanych szczepów 19 posiadało zdolność do autoaglutynacji w 0.9% NaCl, co stanowiło około 23% z badanej grupy bakterii.

Wykazano, że aż 27 szczepów (32,1%) posiadało wartość SAT równą 0.02 mol/l, 12 szczepów (14,3%) posiadało wartość SAT równą 0.05 mol/l, 9 szczepów (10,7%) posiadało wartość SAT równą 0.5 mol/l, 17 szczepów (20,2%) posiadało wartość SAT równą 1.0 mol/l, 17 szczepów (20,2%) posiadało wartość SAT równą 2.0 mol/l i 2 szczepy (2,4%) posiadały wartość SAT równą 4.0 mol/l. Wyniki przedstawiono przy pomocy zbiorczego wykresu (Ryc. 38).

Na 84 przebadane szczepy *Bifidobacterium* tylko dwa (2,4%) nie produkowały śluzu, zaś pozostałe 82 szczepy (87,6%) wydzielaly śluz w różnej ilości, co zostało ocenione przy pomocy półilościowej skali od (+) do (++++). Rozkład otrzymanych wyników wygląda następująco: 16 (19,6%) z pośród badanych szczepów produkowało śluz w ilości ocenionej na (+), 36 (42,8%) na (++) , 24 (28,6%) na (+++) i 6 (7,1%) na (++++). Wyniki przedstawiono na rycinie numer 39.

Oceniając hydrofobowość powierzchni badanych szczepów, w tym zdolność do autoaglutynacji i agregację w siarczanie amonu oraz ich zdolność do produkcji śluzu zauważono pewną istotną zgodność, a mianowicie, że szczepy *Bifidobacterium*, które cechowały się autoaglutynacją i zdecydowanie wysoką hydrofobowością, jednocześnie produkowały największe ilości śluzu, były to między innymi szczepy: 35, 36, 20213, L III/7, 20B i Kl 26B. Odwrotnie, szczepy *Bifidobacterium*, które cechowały się brakiem autoaglutynacji i zdecydowanie małą hydrofobowością, jednocześnie nie produkowały lub produkowały

w niewielkiej ilości śluz. Były to szczepy: Kl 31B, Kl 28a, Kl 59A, 20083, III/23/5a, III/23/5b, Kl 35D, Kl 25A, Kl 66C, Kl 23E i Kl 66C.

Do przeprowadzenia testu określającego zdolność przylegania badanych szczepów *Bifidobacterium* użyto czternastodniowej hodowli linii Caco-2 i dwudziestojednodniowej hodowli linii HT-29. Hodowle te były prowadzone przez tak długi okres czasu zgodnie z zaleceniami literaturowymi tak, aby komórki obu badanych linii osiągnęły pełne zróżnicowanie i dojrzałość [163, 192]. Na podstawie obserwacji stwierdzono, że do niektórych komórek wchodzących w skład jednowarstwowej hodowli (monolayer), bakterie przylegały w znacznie większej liczbie, niż do innych. Sugeruje to, że adherencja może zależeć od ekspresji pewnych receptorów powierzchniowych obecnych na komórkach będących w odpowiedniej fazie wzrostu i zróżnicowania.

Zaobserwowano, że większość z badanych szczepów *Bifidobacterium* adherowało, zarówno do szkła, jak i brzegów tkanek, a stopień tego zjawiska był różny w zależności od badanego szczepu. Ta stosunkowo często obserwowana zdolność szczepów do przylegania do szkła może sugerować, że niekoniecznie badane zjawisko jest wynikiem specyficznego wiązania się receptorów bakteryjnych z receptorami komórkowymi, a jedynie jest efektem bardzo silnych właściwości hydrofobowych badanych szczepów. Prawdopodobnie obserwowane zjawisko to tzw. adherencja niespecyficzna. Z kolei, adherencja do jednowarstwowej hodowli badanych linii komórkowych była rzadziej spotykana i charakteryzowała się mniejszym nasileniem.

Wyniki z przeprowadzonego testu określającego zdolność przylegania szczepów *Bifidobacterium* do obu badanych linii komórkowych, oceniano przy pomocy skali półilościowej od (-) do (++++), i przedstawiono na wspólnym wykresie (Ryc. 40). Brak zdolności do przylegania do linii Caco-2 wykazało dziewięć szczepów *Bifidobacterium* (11,2%), zaś do linii HT-29 osiem szczepów (10%). Adherencję ocenioną na (+) do linii Caco-2 wykazało 23 szczepy (28,7%), zaś do linii HT-29 20 szczepów (25%). Adherencję ocenioną na (++) do linii Caco-2 wykazało 19 szczepów (23,7%), a z kolei do linii HT-29 25 szczepów (31,2%). Adherencję rzędu (+++) do linii Caco-2 wykazało 20 szczepów (25%), zaś do linii HT-29 17 szczepów (21,2%). Zdolność do przylegania do linii Caco-2 ocenioną na (++++), miało 9 szczepów (11,2%), zaś do linii HT-29 10 szczepów (12,5%).

Na podstawie otrzymanych wyników wykazano, że adherencja badanych szczepów bakterii do obu linii komórkowych: HT-29 i Caco-2 jest porównywalna. Jednakże, niektóre szczepy, to jest.: 20670, B/K, 20B, II/15/2, II/23/2, Kl 3/I, Kl 6B, Kl 57D, Kl 39B, 38a, 34 i pK 5 przylegały lepiej do linii Caco-2 niż do linii HT-29, natomiast inne szczepy, takie jak: 20219, Kl 27A, Kl 31A, Kl 13D, Kl 36A, Kl 36, Kl 30A, 2/1, 38b, 36, 24, 5 i 23, lepiej adherowały do linii HT-29 niż do Caco-2.

Zauważone różnice we właściwościach determinujących adhezję do jednej z dwóch linii komórkowych, mogą sugerować wydzielenie się w obrębie rodzaju *Bifidobacterium* epitopów charakteryzujących się swoistym powinowactwem do różnych komórek ludzkiego nabłonka jelitowego.

Po przeanalizowaniu otrzymanych wyników podjęto próbę określenia ogólnej aktywności powierzchniowej poszczególnych szczepów *Bifidobacterium*. W tym celu, wyniki półilościowe otrzymane z testów określających: autoaglutynację, produkcję śluzu oraz przyleganie do linii komórkowych Caco-2 i HT-29, zamieniono na dane ilościowe. I tak, wartość oznaczoną jako minus przyjęto traktować jak 0, wartość (+) jak 1, wartość (++) jak 2, wartość (+++) jak 3 oraz wartość (+++++) jak 4. Następnie, dla każdego szczepu z osobna, zsumowano wyniki z poszczególnych testów, po czym, od otrzymanego wyniku odejmowano wartość SAT uzyskaną z testu na wysalanie w roztworach siarczanu amonu. Otrzymany wynik końcowy określający ogólną aktywność powierzchniową danego szczepu przedstawiono na wspólnym wykresie dla wszystkich przebadanych bakterii, przy czym, pominięto te, dla których nie posiadano kompletu wyników ze wszystkich przeprowadzonych testów (Ryc. 41).

Zauważono pewną istotną zgodność, a mianowicie, szczepy *Bifidobacterium*, które cechowały się autoaglutynacją, wysoką hydrofobowością i dużą produkcją śluzu, wyjątkowo skutecznie przylegały do badanych linii komórkowych. Najbardziej aktywne szczepy pod względem opisanych właściwości, wyjątkowo skutecznie przylegające do badanych linii tkankowych to kolejno: 35, 36, Kl 26B, L III/7, 20456, Kl 20D, Kl 29E, 20213, 40B, Kl 3/I, Kl 30C oraz I/15/2. I odwrotnie, najmniej aktywne szczepy pod względem opisanych właściwości, nie posiadające zdolności adhezji do badanych linii komórkowych to kolejno: Kl 28a, Kl 31B, Kl 35D, Kl 25A, Kl 66A, 3/3, 20083, III/23/5a, III/23/5b, Kl 13D, Kl 66C, Kl 36.

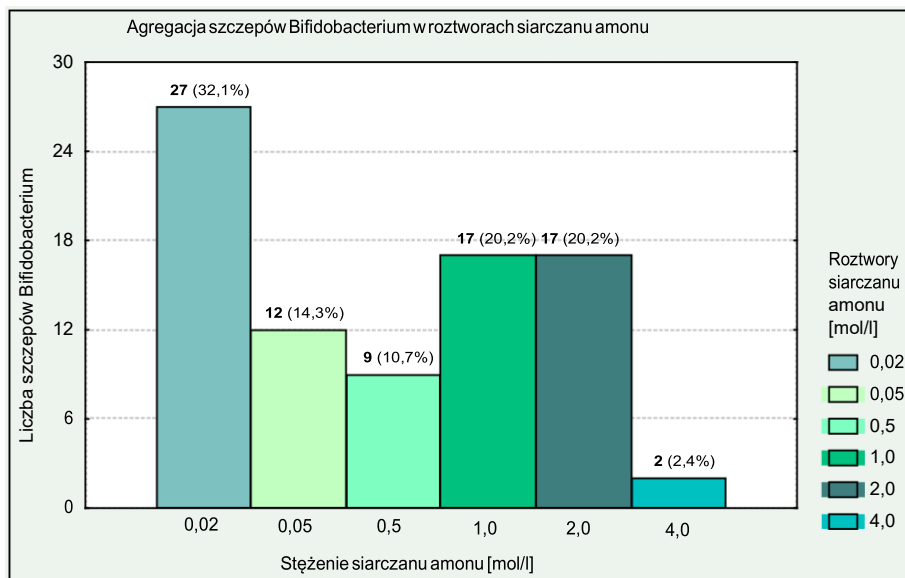
Tabela 16, część 1: Właściwości powierzchniowe szczepów *Bifidobacterium*, w tym: produkcja śluzu (ang. slime), autoaglutynacja, agregacja w roztworach siarczuanu amonu (wartość SAT) oraz adherencja do linii komórkowych Caco-2 i HT-29.

Nr	Szczep <i>Bifidobacterium</i>	PRODUKCJA ŚLUZU (SLIME)	AUTO- AGLUTY- NACJA	WARTOŚĆ SAT (NH ₄) ₂ SO ₄ [mol/l]	ADHERENCJA	
					Caco-2	HT-29
1	20083	+	-	2,00	+	+
2	20104	+++	+	0,02	+++	+++
3	20213	++++	+	0,02	+++	+++
4	20219	++	-	1,00	+	++
5	20456	+++	+	0,02	++++	++++
6	20670	++	-	0,50	+++	++
7	L III/5	+++	-	0,05	+++	+++
8	L III/7	++++	+	0,02	++++	++++
9	L IV	++	-	1,00	+	+
10	B/K	++	-	0,02	+++	++
11	40 B	+++	+	0,02	+++	++++
12	20 B	++++	+	0,02	+++	++
13	3/1	+++	-	0,02	+	+
14	33 B	+++	-	0,05	++	++
15	7/4	+	-	1,00	++	++
16	2/3	+++	-	0,02	+++	+++
17	39 B	+++	+	0,02	+++	+++
18	13/E/2	+	-	1,00	++	++
19	30 A	+++	-	0,05	++	++
20	40 C	+	-	1,00	++	++
21	3	+++	-	0,50	++	++
22	I/15/2	+++	-	0,05	++++	++++
23	III/15/2	++	-	1,00	++	+
24	III/23/5/a	+	-	2,00	+	+
25	III/23/5/b	+	-	2,00	+	+
26	V/23/1	++	-	1,00	++	++
27	V/23/4	+	-	1,00	+	+
28	II/23/2	++	-	0,50	+++	++
29	KI K/1	+++	-	0,02	+++	+++
30	KI K/ 2	+++	-	0,02	+++	+++
31	KI K/ 3	++	-	0,02	++	++
32	KI 20 D	+++	+	0,02	++++	++++
33	KI 3/ I	+++	+	0,02	++++	+++
34	KI 6 B	++	-	2,00	++	+
35	KI 1	++	-	0,50	+	+
36	KI 27 A	++	-	1,00	+	++
37	KI 7	+++	-	0,05	++	++
38	KI 35 D	+	-	2,00	-	-
39	KI 30 C	++	+	0,02	++++	++++
40	KI 57 D	++	-	0,05	++	+
41	KI 31 A	++	-	0,50	+	++
42	KI 31 B	-	-	2,00	-	-

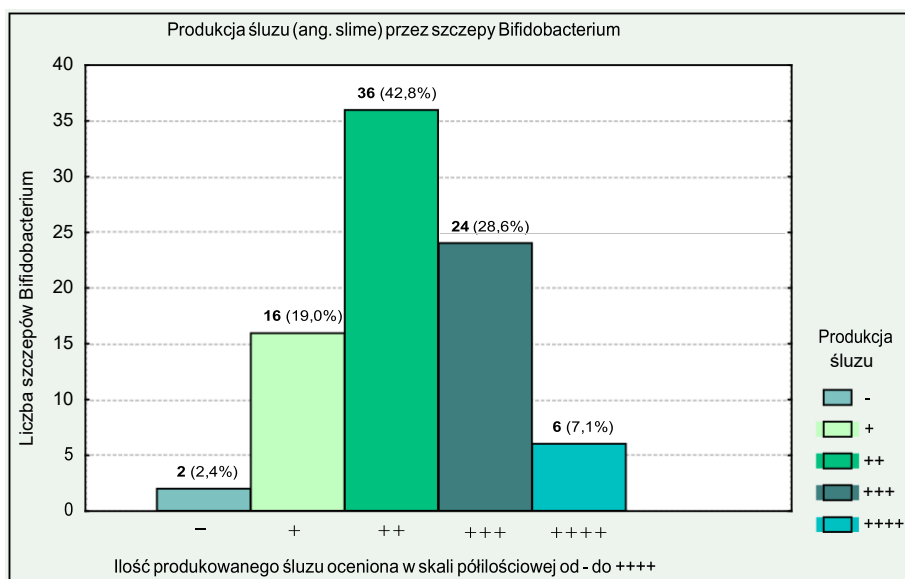
Tabela 16, część 2: Właściwości powierzchniowe szczepów *Bifidobacterium*, w tym: produkcja śluzu, autoaglutynacja (ang. slime), agregacja w roztworach siarczuanu amonu (wartość SAT) oraz adherencja do linii komórkowych Caco-2 i HT-29.

Nr	Szczep <i>Bifidobacterium</i>	PRODUKCJA ŚLUZU (SLIME)	AUTO- AGLUTY- NACJA	WARTOŚĆ SAT (NH ₄) ₂ SO ₄ [mol/l]	ADHERENCJA	
					Caco-2	HT-29
43	Kl 33 C	++	-	1,00	+	+
44	Kl 2 A	++	-	1,00	+	+
45	Kl 29 E	+++	+	0,02	++++	++++
46	Kl 38 C	+	-	1,00	++	++
47	Kl 13 D	++	-	2,00	-	+
48	Kl 39 B	++	-	1,00	+	-
49	Kl 25 A	+	-	2,00	-	-
50	Kl 36 A	+++	-	2,00	+	++
51	Kl 36	++	-	2,00	-	+
52	Kl 26 B	++++	+	0,02	++++	++++
53	Kl 30 A	++	-	2,00	+	+++
54	Kl 66 A	+	-	2,00	-	-
55	Kl 23 E	+	-	2,00	+	+
56	Kl 28 a	+	-	4,00	-	-
57	Kl 1 B	++	-	0,50	++	++
58	Kl 63 A	+++	-	0,05	++	++
59	Kl 66 C	+	-	2,00	+	+
60	Kl 36 B	++	-	2,00	+	+
61	Kl 59 A	+	-	4,00	-	-
62	2/1	++	-	0,50	++	+++
63	3/3	++	-	2,00	-	-
64	37	+	-	0,05	++	++
65	9	++	-	2,00	+	+
66	38 b	++	+	0,02	+++	++
67	38 a	++	-	0,02	+	++
68	34	++	-	0,50	+++	++
69	36	++++	++	0,02	+++	++++
70	35	++++	++	0,02	++++	++++
71	13 a	++	-	0,05	+++	+++
72	13 b	++	-	0,05	nb	nb
73	39	+	-	1,00	+	+
74	40	++	-	0,05	+++	+++
75	24	+++	-	0,02	+	+++
76	8 a	++	-	0,05	+++	+++
77	5	++	-	0,50	++	+++
78	23	+++	+	0,02	+	++
79	pK 1	+++	+	0,02	+++	+++
80	pK 3	+++	+	0,02	+++	+++
81	pK 5	++	-	1,00	++	+
82	Kl M/1	+++	+++	0,02	nb	nb
83	Kl M/3	++	-	1,00	nb	nb
84	Kl M/5	++	-	1,00	nb	nb

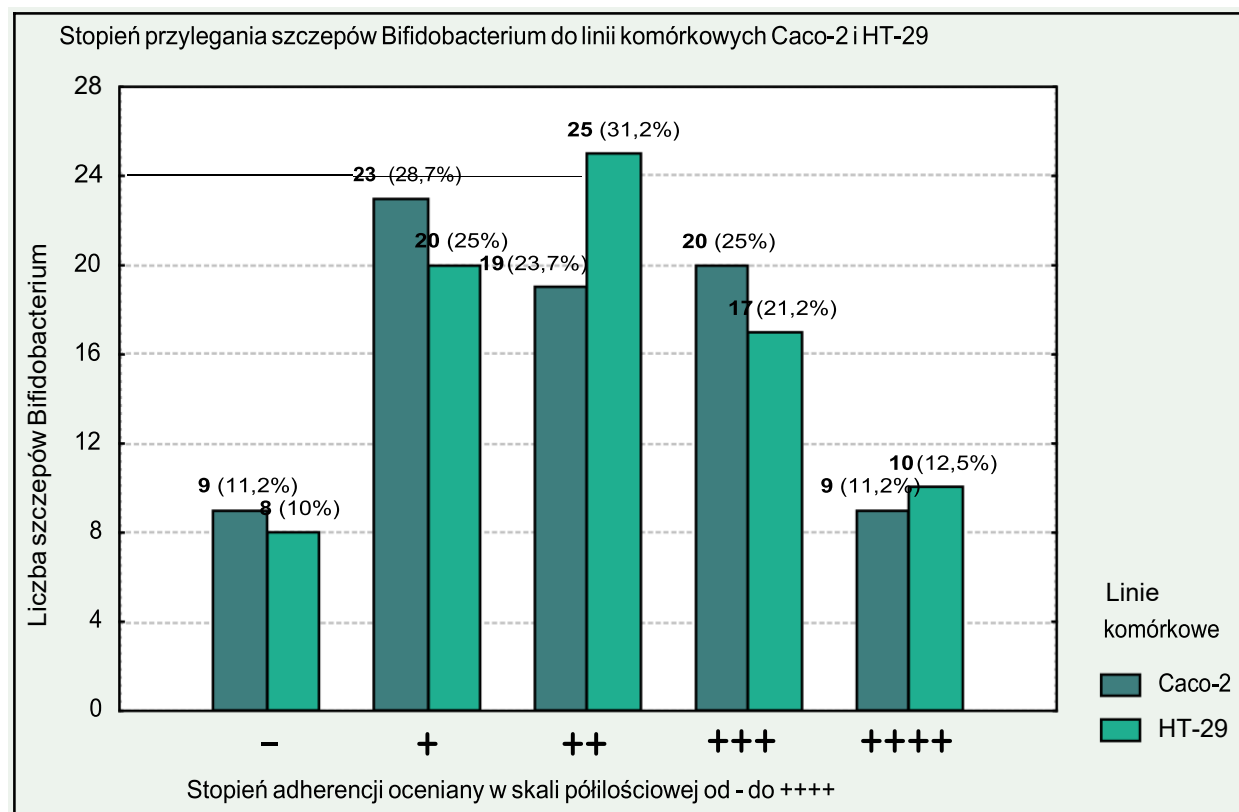
Skrót „nb” - nie badano.



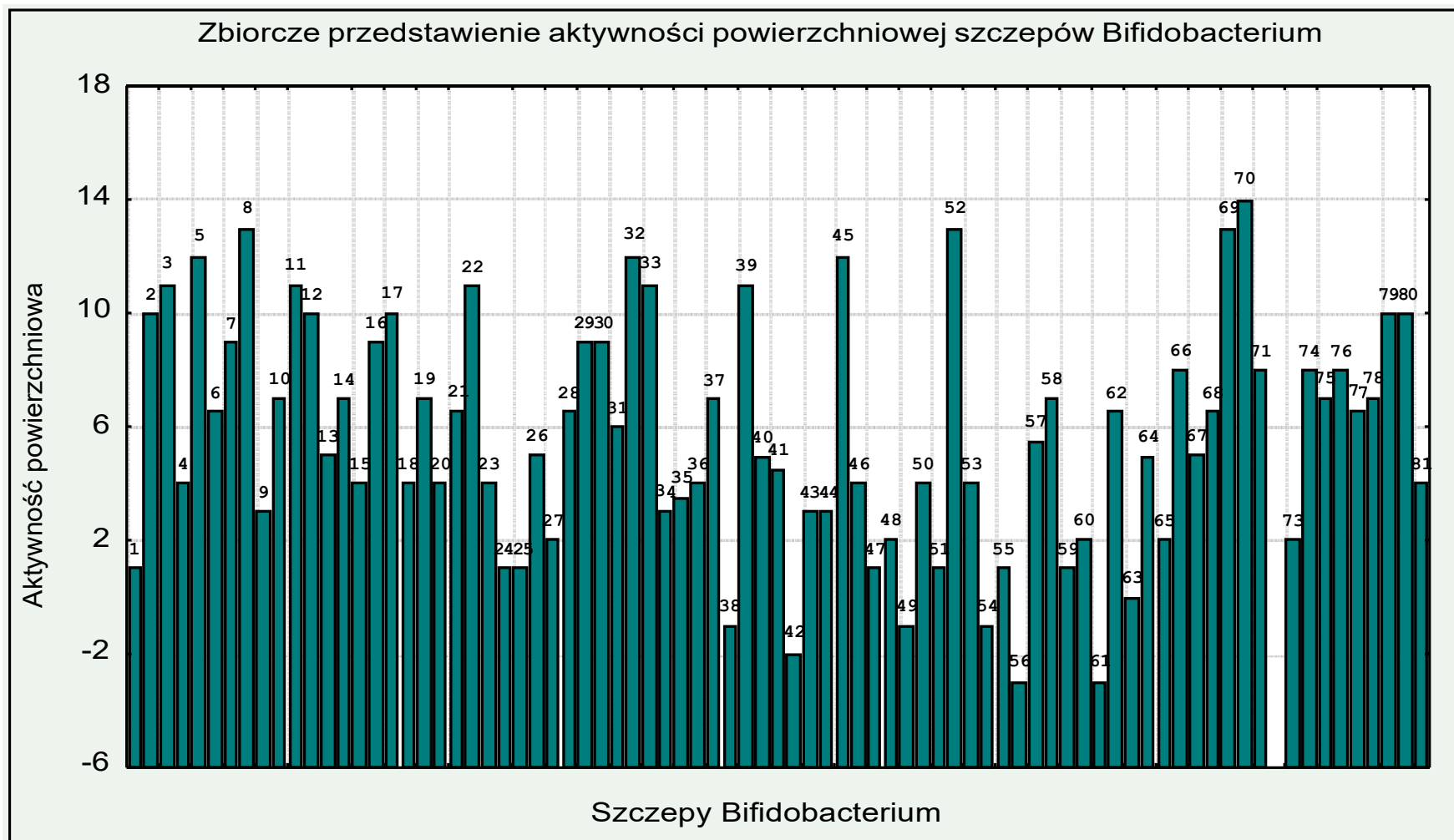
Ryc. 38: Porównanie zdolności do agregacji w roztworach siarczanu amonu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ badanych szczepów z rodzaju *Bifidobacterium*.



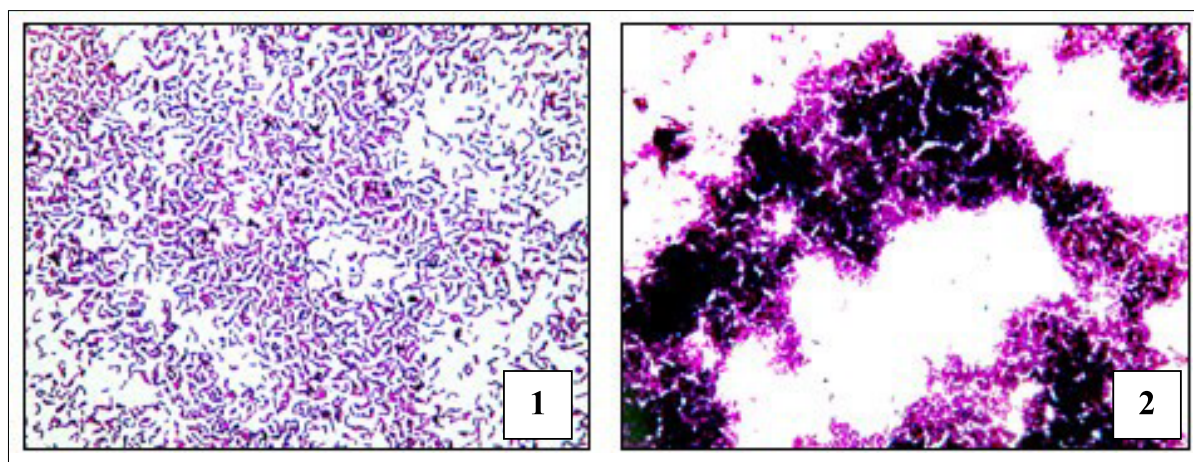
Ryc. 39: Porównanie produkcji śluzu przez badane szczepy z rodzaju *Bifidobacterium*.



Ryc. 40: Porównanie zdolności do przylegania (adherencji) badanych szczepów z rodzaju *Bifidobacterium* do dwóch linii komórkowych: Caco-2 i HT-29.



Ryc. 41: Stopień aktywności powierzchniowej poszczególnych szczepów *Bifidobacterium*, wchodzących w skład utworzonej kolekcji. Aktywność powierzchniową stanowiła suma wyników uzyskanych z przeprowadzonych testów: test na autoaglutynację, test agregacji w soli (SAT), produkcja śluzu, przyleganie do linii komórkowych Caco-2 i HT-29.

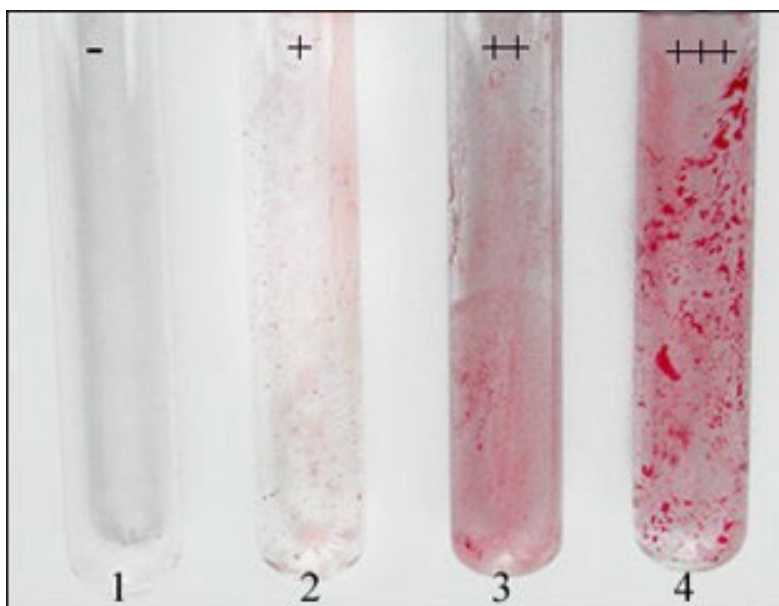


Ryc. 42: Obraz mikroskopowy testu wykazującego zdolność bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* do autoaglutynacji w 0,9% NaCl.

Preparaty wybarwione według metody Grama, oglądane w mikroskopie świetlnym z obiektywem immersyjnym 100x [Olympus].

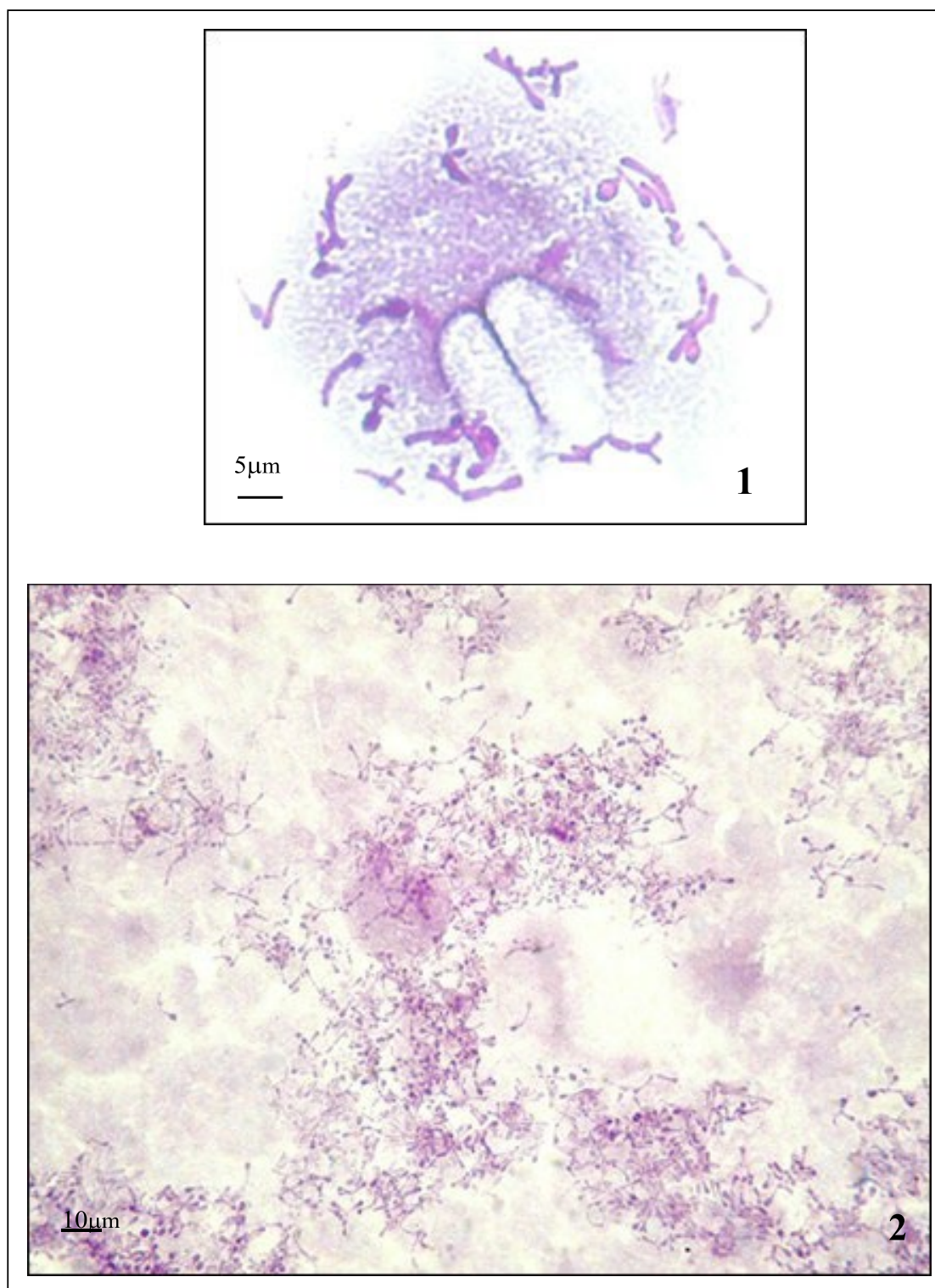
1 - brak autoaglutynacji, szczep wzorcowy *B. adolescentis* 20083 DSMZ,

2 - całkowita aglutynacja, widoczne duże agregaty komórek, szczep wzorcowy *B. breve* 20213 DSMZ.



Ryc. 43: Przykładowe wyniki z testu określającego produkcję śluzu (ang. slime) przez bakterie z rodzaju *Bifidobacterium*.

- 1 brak biofilmu na ściankach probówki; brak jakichkolwiek agregatów przyczepionych do szkła (-); szczep Kl 31B
- 2 minimalny biofilm na ściankach probówki; niewielkie i w niedużej ilości agregaty bakteryjne przyczepione do szkła (+); szczep *B. adolescentis* 20083 DSMZ
- 3 stosunkowo duży biofilm na ściankach probówki; niewielkie, ale w dużej ilości agregaty bakteryjne przyczepione do szkła (++); szczep wzorcowy *B. longum* 20219 DSMZ
- 4 bardzo duży biofilm na ściankach probówki; duże i liczne agregaty bakteryjne przyczepione do szkła (+++); szczep wzorcowy *B. bifidum* 20456 DSMZ



Ryc. 44: Przyleganie (adherencja) wybranych szczepów *Bifidobacterium* do linii komórkowych ludzkiego raka okrężnicy o morfologii epitelialnej.
1 - szczep wzorcowy 20219 DSMZ przylegający do pojedynczej komórki linii HT-29.
2 - szczep K1 26B przylegający w postaci dużych agregatów do pojedynczej warstwy (monolayer) linii komórkowej Caco-2.
 Preparaty barwione według metody Grama. Obraz otrzymany przy użyciu mikroskopu świetlnego firmy Olympus.

VIII. WRAŻLIWOŚĆ BAKTERII Z RODZAJU *BIFIDOBACTERIUM* NA SOLE ŻÓLCI

VIII. 1. WPROWADZENIE

Każdego dnia do ludzkiego organizmu dostają się wraz z pokarmem liczne drobnoustroje, które w większości giną pod wpływem działania naturalnych, fizjologicznych barier obecnych w przewodzie pokarmowym. Poszczególne odcinki przewodu pokarmowego człowieka różnią się pomiędzy sobą m.in. kwasowością środowiska. Najwyższe stężenie kwasów występuje w żołądku, gdzie pH może osiągać wartość nawet 1.5. Niskie pH soku żołądkowego oraz zawarte w nim enzymy trawienne, przede wszystkim pepsyna, stanowią podstawową barierę regulującą ilościowy skład obecnej tam mikroflory. Każde ograniczenie wydzielania soku żołądkowego, czy jego neutralizacja prowadzi natychmiast do ilościowego wzrostu flory bakteryjnej, kolonizującej następnie jelita człowieka [193].

Drugą, ważną barierę fizjologiczną stanowi treść dwunastnicy wraz z eliminującym wiele bakterii działaniem soli kwasów żółciowych i enzymów trzustkowych. Stężenie soli kwasów żółciowych w przewodzie pokarmowym waha się w pewnym przedziale wartości i zależy przede wszystkim od rodzaju diety. Zaraz po spożyciu posiłku, stężenie soli żółci może osiągać poziom od 0,5% do 2,0% (5 - 20 g/l), a następnie stopniowo opada [3, 194]. Pierwszym etapem powstawania soli żółci w przewodzie pokarmowym człowieka jest, wydzielanie przez komórki wątrobowe kwasów żółciowych w postaci związanej z tauryną lub glicyną. Następnie w przewodach żółciowych dochodzi do tworzenie odpowiednich soli po związaniu się tych kwasów z sodem lub potasem. Sole kwasów żółciowych są polarnymi pochodnymi cholesterolu. Związki te są wysoce efektywnymi detergentami, ponieważ ich cząsteczki zawierają zarówno polarne, jak i niepolarne rejony. Sole te, z których najważniejsza u człowieka to glikocholan, stanowią główny składnik żółci [194, 195].

Aby szczepy *Bifidobacterium* mogły skutecznie kolonizować jelito człowieka, muszą być odporne zarówno na wysokie stężenia kwasów żołądkowych, soli kwasów żółciowych, jak i soku trzustkowego, a co za tym idzie, muszą posiadać zdolność przeżycia w niekorzystnych warunkach przewodu pokarmowego. Tylko szczepy posiadające właściwości probiotyczne, są w stanie pokonać naturalne bariery i trwale skolonizować śluzówkę jelit [193, 196]

Szczepy *Bifidobacterium* izolowane zarówno ze środowiska zewnętrznego, jak i z organizmu człowieka, stosunkowo dobrze znoszą niskie pH, ponieważ same bytując w kwaśnym środowisku kwasów mlekowego i octowego wytworzyły mechanizmy przystosowawcze [197].

Badania prowadzone przez Clark'a i wsp. na kilku gatunkach *Bifidobacterium* najczęściej izolowanych z przewodu pokarmowego człowieka (*B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. bifidum*

i *B. longum*), wykazały bardzo dobrą przeżywalność tych bakterii po trzygodzinnej inkubacji w 37% kwasie solnym o wartości pH 3 i 2, a nawet w przypadku gatunku *B. longum* 1 [127].

Wiadomo jest, że pewne rodzaje bakterii, takie jak: *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Peptostreptococcus* oraz *Streptococcus*, stanowiące składnik naturalnej flory jelitowej, potrafią rozkładać sole kwasów żółciowych [36, 104].

Zdolność tą bakterie posiadają dzięki wydzielaniu hydrolazy soli żółci (ang. Bile Salt Hydrolase - BSH). Enzym ten katalizuje hydrolizę glicyny i/lub tauryny z soli kwasów żółciowych. Optimum działania BSH to pH o wartości 5-7 oraz temperatura 40°C. Rola tego enzymu nie jest jeszcze dobrze poznana, ale prawdopodobnie bierze on udział w podnoszeniu stopnia oporności bakterii na toksyczny poziom soli żółci obecnych w przewodzie pokarmowym człowieka [198].

Badania przeprowadzone na ponad 300 szczepach bakterii kwasu mlekowego, reprezentujących gatunki kolonizujące przewód pokarmowy człowieka, oraz izolowanych z produktów mlecznych poddanych fermentacji, wykazały obecność BSH jedynie u szczepów stanowiących składnik naturalnej flory człowieka [198].

Clark i wsp. wykazali, że szczep *B. longum* przeżywał w obecności 4% (40 g/l) soli żółci [199]. Z kolei, Ibrahim i wsp. przebadali szczepy *B. infantis*, *B. bifidum*, *B. breve* i *B. longum* w obecności 0,06% i 0,3% (0,6 g/l i 3 g/l) soli żółci i wykazali w tych warunkach największą przeżywalność gatunku *B. infantis* oraz najmniejszą przeżywalność gatunku *B. longum*. W badaniach tych wszystkie testowane szczepy charakteryzowały się osłabieniem wzrostu w obecności soli żółci. Jednakże, po kilka krotnym pasażowaniu w świeżym podłożu hodowlanym, bez soli żółci, bakterie odzyskiwały swoją aktywność [200].

VIII. 2. MATERIAŁY I METODYKA

VIII. 2. 1. Bakterie

Bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* pochodziły z wcześniej przygotowanej i dokładnie oznaczonej kolekcji bakterii przechowywanych na szklanych kulkach w bulionie BL z dodatkiem 15% glicerolu w temp. -70°C. W celu przeprowadzenia badania szklane kulki (4-5) z opłaszczonym na nich szczepem przenoszono do 2 ml płynnego podłoża BL, a następnie inkubowano w 37°C przez 48 godz. W warunkach ściśle beztlenowych z wykorzystaniem anaerostatów firmy bioMérieux z generatorami gazu H₂ + CO₂ firmy Linegal Chemicals GmbH. Odmrożone szczepy *Bifidobacterium* oraz ich wzorce posiewano następnie metodą redukcyjną na płytki ze stałym podłożem BL i inkubowano w standardowych warunkach beztlenowych w temperaturze 37°C przez 48 godz. Uzyskane w ten sposób pojedyncze kolonie zawieszano w 1ml płynnego podłoża BL i inkubowano w tych samych warunkach przez 24 godz.

VIII. 2. 2. Oznaczanie oporności na sole żółci

W celu oznaczenia oporności badanych szczepów *Bifidobacterium* na sole żółci posłużono się metodą Dashkevicz'a i Feighner'a [201]. Metoda ta polegała na dodaniu do agaru BL barwnika wskaźnikowego - purpury bromokrezolowej [POCH] w ilości 0,17 g/l oraz soli żółci [Oxgal firmy Difco] w pięciu kolejnych stężeniach: 1 g/l, 2 g/l, 5 g/l, 10 g/l i 20 g/l. Na tak przygotowane, stałe podłoża BL posiewano metodą redukcyjną 100 µl hodowli badanych szczepów *Bifidobacterium*, które następnie inkubowano w standardowych warunkach beztlenowych przez 48 godz. Po zakończonej inkubacji kolonie szczepów *Bifidobacterium* odporne na dane stężenie soli żółci nabierały koloru jasno żółtego, jak również podłoże wzrostowe zmieniało swoje zabarwienie z fioletowego na żółte (Ryc. 58).

VIII. 3. WYNIKI WRAZ Z ICH OMÓWIENIEM

Wykorzystując metodę Dashkevicz'a i Feighner'a [201] oznaczono oporność 69 szczepów *Bifidobacterium* na sole żółci w pięciu kolejnych stężeniach: 1, 2, 5, 10 i 20 g/l. Zaproponowane stężenia miały na celu odzwierciedlenie warunków jakie panują w przewodzie pokarmowym człowieka, w którym to stężenie soli żółci waha się w pewnym przedziale wartości. W pierwszej godzinie po posiłku może osiągać poziom od 5-20 g/l, a następnie opada.

Jako wynik podawano najwyższe stężenie soli żółci, nie powodujące zahamowania wzrostu badanego szczepu bakterii, to znaczy takie, na które ten szczep był odporny (Tabela 17).

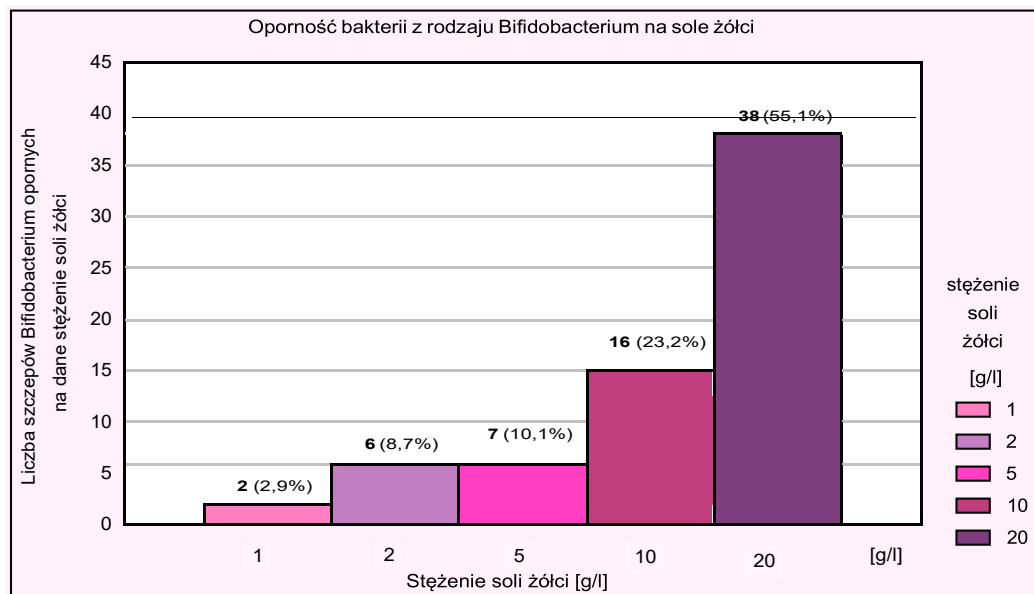
Na podstawie otrzymanych wyników (Ryc. 45) zauważono, że większość, bo aż 38 (55,1%) z spośród badanych szczepów, wykazywało oporność na najwyższe (20 g/l), z zastosowanych, stężenie soli żółci. Wynik ten może świadczyć o doskonałym przystosowaniu się tych bakterii do niesprzyjających warunków panujących w ludzkim przewodzie pokarmowym. Pozostałe wyniki przeprowadzonego testu przedstawiały się następująco: dla dwóch z spośród badanych szczepów (2,9%) najwyższe stężenie soli żółci nie powodujące zahamowania wzrostu wynosiło zaledwie 1 g/l, dla kolejnych sześciu szczepów (8,7%) 2 g/l, dla następnych siedmiu szczepów (10,1%) 5 g/l i dla szesnastu szczepów (23,2%) 10 g/l.

W celu przedstawienia zdolności poszczególnych szczepów *Bifidobacterium* do przeżycia w badanych stężeniach soli żółci, otrzymane wyniki przedstawiono na wspólnym wykresie (Ryc. 46). Szczepy, które przeżywały w najwyższym z badanych stężeniu (20 g/l) soli żółci to: 20104, 20219, L IV, B/K, 40B, 20B, 33B, 40C, V/23/1, V/23/4, Kl K/1, Kl K/3, Kl 3/I, Kl 35D, Kl 30C, Kl 57D, Kl 2A, Kl 29E, Kl 38a, Kl 39B, Kl 26B, Kl 30A, Kl 66A, Kl 23E, Kl 28a, Kl 63A, Kl 36B, 37, 36, 35, 24, 8a, 5, pK Bif1, Kl M/1, Kl M/2 oraz Kl M/3. Z kolei, szczepy, które przeżywały jedynie w najniższym (1 g/l) z badanych stężeń soli żółci to: 20083 oraz 20670.

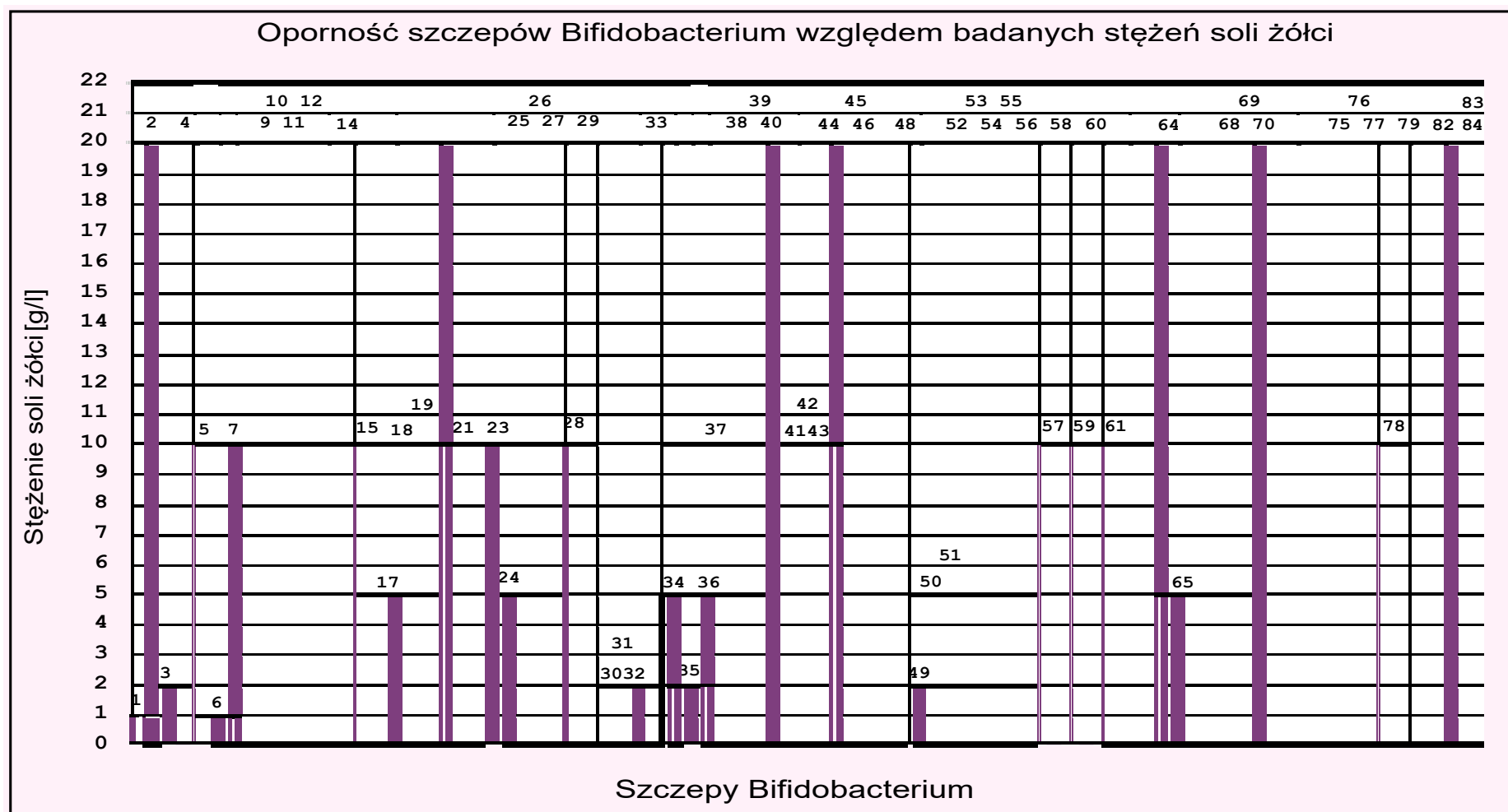
Tabela 17: Tabela przedstawiająca wartość najwyższego z testowanych stężenia soli żółci [g/l], nie powodującego zahamowania wzrostu badanych szczepów bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*.

Szczep <i>Bifidobacterium</i>	Sole żółci [g/l]	Szczep <i>Bifidobacterium</i>	Sole żółci [g/l]	Szczep <i>Bifidobacterium</i>	Sole żółci [g/l]
20083	1	K/ 1	20	Kl 1 B	10
20104	20	K/ 2	2	Kl 63 A	20
20213	2	K/ 3	2	Kl 66 C	10
20219	20	Kl 20 D	2	Kl 36 B	20
20456	10	Kl 3/I	20	Kl 59 A	10
20670	1	Kl 6 B	5	2/1	nb
L III/5	10	Kl 1	2	3/3	nb
L III/7	nb	Kl 27 A	5	37	20
L IV	20	Kl 7	10	9	5
B/K	20	Kl 35 D	20	38 a	nb
40 B	20	Kl 30 C	20	38 b	nb
20 B	20	Kl 57 D	20	34	20
3/1	nb	Kl 31 A	10	36	20
33 B	20	Kl 31 B	10	35	20
7/4	10	Kl 33 C	10	13 a	nb
2/3	nb	Kl 2 A	20	13 b	nb
39 B	5	Kl 29 E	20	39	nb
13/E/2	10	Kl 38 C	20	40	nb
30 A	10	Kl 13 D	nb	24	20
40 C	20	Kl 39 B	20	8 a	20
3	10	Kl 25 A	2	5	20
I/15/2	nb	Kl 36 A	5	23	10
III/15/2	10	Kl 36	5	pK 1	20
III/23/5a	5	Kl 26 B	20	pK 3	nb
III/23/5b	20	Kl 30 A	20	pK 5	nb
V/23/1	20	Kl 66 A	20	Kl M/1	20
V/23/4	20	Kl 23 E	20	Kl M/3	20
II/23/2	10	Kl 28 a	20	Kl M/5	20

Skrót „nb” - nie badano



Ryc. 45: Oporność szczepów *Bifidobacterium* na działanie soli kwasów żółciowych w następujących stężeniach: 1, 2, 5, 10, 20 [g/l].



Ryc. 46: Porównanie oporności testowanych szczepów bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*, względem soli kwasów żółciowych w następujących stężeniach: 1, 2, 5, 10, 20 [g/l].

IX. OPORNOŚĆ BAKTERII Z RODZAJU *BIFIDOBACTERIUM* NA WYBRANE ANTYBIOTYKI

IX.1. WPROWADZENIE

Wprowadzenie antybiotyków w latach czterdziestych XX wieku rozpoczęło nową erę w leczeniu zakażeń, które do tego czasu stanowiły najczęstszą przyczynę zachorowań i śmiertelności [202].

Leki przeciwbakteryjne działają przez hamowanie lub uszkodzenie procesów istotnych dla życia drobnoustrojów, takich jak: biosynteza ściany komórkowej (β -laktamy i glikopeptydy), synteza błony cytoplazmatycznej (polimyksyny), synteza białek (makrolidy, linkozaminy, chloramfenikol, tetracykliny, aminoglikozydy, mupirocyna) oraz synteza lub metabolizm kwasów nukleinowych (chinolony, rifampicyna, nitrofurany). Antybiotyki mogą również modyfikować metabolizm energetyczny komórki bakteryjnej (sulfonamidy, trimetoprim) [202].

Istotą działania antybiotyku jest, jak wiadomo, jego selektywna toksyczność, polegająca na uszkodzaniu procesów życiowych bakterii lub innych chorobotwórczych mikroorganizmów przy jednoczesnym braku wpływu na organizm gospodarza, w którym mikroorganizmy te bytują. Antybiotyk o takim działaniu byłby lekiem idealnym, niestety, antybiotyki poza swoim działaniem na drobnoustroje patogenne wywierają wielokierunkowy wpływ na ustrój człowieka. Od lat znane są niepożądane działania powszechnie stosowanych antybiotyków. Wszystkie antybiotyki, szczególnie te o szerokim zakresie działania, a także leki przeciwnowotworowe zaburzają równowagę ekologiczną organizmu leczonego pacjenta poprzez niszczenie fizjologicznej mikroflory [67, 203].

W latach 70-tych sformułowano koncepcję tzw. wybiórczej dekontaminacji przewodu pokarmowego, której definicję sprecyzował van der Waaij i określił ją jako postępowanie mające na celu podawanie antybiotyków powodujących selektywne hamowanie wzrostu potencjalnie patogennych drobnoustrojów z pozostawieniem symbiotycznych, niechorobotwórczych mikroorganizmów i zachowaniem odporności kolonizacyjnej. Koncepcja ta okazała się być niewykonalną w praktyce, gdyż wszystkie stosowane skojarzenia antybiotyków powodowały najpierw zniszczenie normalnej flory, a dopiero potem czynników patogennych [67].

Wpływ antybiotyków na normalną mikroflorę zależy m.in. od zakresu ich działania i stopnia wchłaniania, w mniejszym zaś stopniu od drogi podania leku. Antybiotyki β -laktamowe, w tym szczególnie ampicylina oraz niektóre cefalosporyny wywierają szczególnie silny wpływ supresyjny na florę jelit. Z kolei makrolidy i tetracykliny w mniejszym stopniu wpływają na mikroflorę przewodu pokarmowego, jedynie klindamycyna silnie redukuje populacje bakterii beztlenowych. Chinolony redukują głównie populacje bakterii z rodziny

Entrobacteriaceae, ale wykazują niewielki wpływ na bakterie beztlenowe. Stwierdzono, że nawet antybiotyki podawane pozajelitowo mogą silnie redukować florę jelit [67].

Oporność bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* na antybiotyki jest szczególnie interesująca nie ze względu na patogenność tych mikroorganizmów, ale ze względu na poznanie zmian, jakie mogą zajść w mikroflorze przewodu pokarmowego po zastosowaniu antybiotykoterapii. Wiadomo jest, że w przypadku prawidłowo rozwiniętej normalnej mikroflory, nawet bardzo duża liczba drobnoustrojów chorobotwórczych może nie doprowadzić do zakażenia i pełnego rozwoju choroby. Jeżeli jednak w wyniku antybiotykoterapii lokalna mikroflora jest zredukowana lub osłabiona, to nawet niewielka liczba bakterii patogennych może spowodować zakażenie i rozwój choroby [67, 203]. Ponieważ bakterie należące do rodzaju *Bifidobacterium* stanowią jeden z głównych składników naturalnej mikroflory jelitowej człowieka, to wyeliminowanie rodzaju tak istotnego dla prawidłowego funkcjonowania organizmu, może spowodować skolonizowanie jelit przez gatunki patogenne, a także konsekwencje wynikające z braku *Bifidobacterium*, np. zmniejszenie ilości krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (masłowy, propionowy) syntetyzowanych przez te bakterie, a potrzebnych dla prawidłowego funkcjonowania kolonocytów [60, 203, 204].

Drugą istotną korzyścią wynikającą z poznania lekooporności *Bifidobacterium* na chemioterapeutyki, jest możliwość ich wykorzystania przy opracowywaniu nowych wybiórczo-namnażających podłoży wzrostowych, które mogłyby być wykorzystane do izolacji tych bakterii z materiałów biologicznych, z produktów mlecznych lub farmaceutycznych [120].

Niedawno zaproponowanym podłożem hodowlanym dla bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* jest agar Wilkins-Chalgren zawierający w swoim składzie 100 mg/l mupirocyny. Twórcy tego podłoża zapewniają, że jest ono wysoce selektywne i umożliwia wzrost wszystkich powszechnie występujących gatunków *Bifidobacterium*, hamując jednocześnie wzrost innych rodzajów bakterii [133].

Według danych literaturowych cały rodzaj *Bifidobacterium* jest wrażliwy na penicylinę G, erytromycynę, ampicylinę, bacytracynę, klindamycynę, wankomycynę, linkomycynę, oleandomycynę, chloramfenikol i nitrofurantoinę. Bakterie te są odporne na neomycynę, streptomycynę, gentamycynę, kanamycynę, polimyksynę B, kwas nalidyksowy i, w przeciwieństwie do innych bakterii beztlenowych, na metronidazol [2, 203, 205].

Mechanizm działania antybiotyków na rodzaj *Bifidobacterium* badali Molenkamp i Veerkamp (1976). Naukowcy ci wykazali, że wstrzymanie syntezy peptydoglikanu przez antybiotyki takie jak: penicylina G, wankomycyna, D-cykloseryna i bacytracyna, powoduje zmniejszenie zawartości glicyny zarówno w białkach błony zewnętrznej, jak i w białkach wewnątrzkomórkowych. Równocześnie z tym następuje wzrost ilości kwasów tłuszczowych

w błonie komórkowej z jednoczesnym ich uwalnianiem. To zakłócenie równowagi pomiędzy stosunkiem lipidów do białek w błonach komórkowych może mieć odbicie w zmianie morfologii komórki [205].

Do określenia wrażliwości bakterii na chemioterapeutyki można wykorzystać różne metody i techniki, min.: metody rozcieńczeniowe w podłożu stałym lub płynnym, metody dyfuzyjne, metody przesiewowe lub metody specjalne [150].

Metoda dyfuzji w agarze (technika Kirby'ego i Bauera) z użyciem krążków bibułowych nasyconych chemioterapeutykami w stężeniach, jakie one osiągają w surowicy, jest powszechnie stosowana w laboratoriach w celach badawczych lub specjalistycznych. Metoda ta podlega pełnej standaryzacji. W metodzie tej antybiotyki dyfundują z krążków bibułowych w głąb stałego podłoża wzrostowego, uprzednio posianego badanym szczepem bakterii. Na podstawie wielkości stref zahamowania wzrostu bakterii określa się ich wrażliwość na dane chemioterapeutyki, posługując się odpowiednimi wartościami standardowymi. Stosowane są dwa standardy interpretacyjne wg ICS (International Collaborative Study) lub wg NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Wyniki badania przedstawiane są jakościowo przez określenie: szczep wrażliwy, średnio wrażliwy, oporny [150, 128].

IX. 2. MATERIAŁY I METODYKA

IX. 2. 1. Bakterie

Bakterie z rodzaju *Bifidobacterium*, pochodziły z wcześniej przygotowanej i dokładnie oznaczonej kolekcji szczepów przechowywanych na szklanych kulkach w bulionie BL z dodatkiem 15% glicerolu w temp. -70°C. W celu przeprowadzenia badania, szklane kulki (4-5) z opłaszczonym na nich szczepem przenoszono do 2 ml płynnego podłoża BL, a następnie inkubowano w 37°C przez 48 godz. w warunkach ściśle beztlenowych z wykorzystaniem anaerostatów firmy bioMérieux z generatorami gazu H₂ + CO₂ firmy Linegal Chemicals GmbH.

IX. 2. 2. Oznaczanie oporności na antybiotyki metodą dyfuzji krążkowej

Odmrożone szczepy *Bifidobacterium* oraz ich wzorce posiewano metodą redukcyjną na płytki ze stałym podłożem BL, a następnie inkubowano w standardowych warunkach beztlenowych w temperaturze 37°C przez 48 godz. Uzyskane w ten sposób pojedyncze kolonie zawieszano w 1ml płynnego podłoża BL i inkubowano w tych samych warunkach przez 24 godz. Następnie przy wykorzystaniu soli fizjologicznej doprowadzano gęstość hodowli do 0.5 według skali McFarland'a. Tak przygotowane zawiesiny bakteryjne rozprawdzano przy użyciu jałowego wacika po całej powierzchni uprzednio przygotowanych płytek ze stałym podłożem BL w objętości 20 ml. Na płytki nakładano krążki nasycone antybiotykami (4 krążki na płytkę), a następnie inkubowano w warunkach beztlenowych w temperaturze 37°C przez 18 - 24 godz.

Po zakończeniu inkubacji mierzono wielkość stref zahamowania wzrostu bakterii, powstałych wokół krążków z testowanym antybiotykiem. Średnice stref podawano w milimetrach [mm], uwzględniając również średnicę krążka równą 6 mm.

Zastosowane krążki antybiotykowe [Oxoid]:

1. CN 10 (Gentamycyna 10µg)
2. VA 30 (Wankomycyna 30µg)
3. E 15 (Erytromycyna 15µg)
4. P 10 (Penicylina G 10µg)
5. MUP 5 (Mupirocyna 5µg)
6. SXT 25 (Kotrymoksazol 25µg)
7. CIP 5 (Ciprofloksacyna 5µg)
8. CXM 30 (Cefuroksym 30µg)

IX. 3. WYNIKI WRAZ Z ICH Z OMÓWIENIEM

Wykorzystując metodę dyfuzji krążkowej przebadano oporność 79 szczepów *Bifidobacterium* pochodzących z utworzonej kolekcji, względem ośmiu wybranych antybiotyków. Uzyskane wyniki podawano w milimetrach, mierząc wielkość średnicy strefy zahamowania wzrostu badanego szczepu powstałej pod wpływem działania danego antybiotyku (Tabela 18).

Z powodu braku norm określających lekooporność rodzaju *Bifidobacterium*, na testowane antybiotyki, uzyskanych wyników nie można było poddać kategoryzacji.

W celu przeanalizowania otrzymanych wyników, utworzono zatem osiem przedziałów ze względu na wielkość powstałej strefy zahamowania wzrostu szczepów *Bifidobacterium*: <7 mm, 7-14 mm, 15-22 mm, 23-30 mm, 31-38 mm, 39-46 mm, 47-54 mm i >54 mm. Uzyskane dla poszczególnych szczepów wyniki przyporządkowywano do jednego z ośmiu przedziałów, a następnie przedstawiono je w formie zbiorczej tabeli (Tabela 19) oraz wykresów obrazujących działanie wybranych chemioterapeutyków na przebadane szczepy (Ryc. 47-54).

Analizując utworzone wykresy stwierdzono, że działanie penicyliny G (10µg), erytromycyny (15µg) i cefuroksymu (30µg) na *Bifidobacterium* było stosunkowo zbliżone do siebie. Antybiotyki te powodowały najczęściej powstanie strefy zahamowania wzrostu, której średnica mieściła się w przedziale wartości 15-54 mm. Z kolei gentamycyna (30µg) i ciprofloksacyna (5µg) dawały strefy zahamowania wzrostu szczepów *Bifidobacterium* o średnicy równej 7-14 mm. Działanie wankomycyny (30µg) na przebadany zestaw bakterii najczęściej powodowało tworzenie strefy zahamowania wzrostu mieszczącej się w jednym

z dwóch przedziałów: <7 mm lub 23-30 mm. Mupirocyna (5µg) i kotrymoksazol (25µg) praktycznie nie tworzyły stref zahamowania wzrostu (strefa <7mm).

Określono także procentowy udział szczepów *Bifidobacterium*, które na skutek działania poszczególnych testowanych antybiotyków, charakteryzowały się powstaniem strefy zahamowania wzrostu wokół krążka nasyczonego antybiotykiem o średnicy większej lub równej 7 mm lub nie tworzyły strefy zahamowania wzrostu o średnicy strefy mniejszej od 7 mm. Rozkład otrzymanych wyników przedstawiono na rycinie numer 55.

W dalszej analizie pominięto wyniki, w których strefa zahamowania wzrostu była mniejsza lub równa od 7 mm i przeprowadzono analizę statystyczną zakresu hamującego działania testowanych antybiotyków względem szczepów *Bifidobacterium*. Na rycinie numer 56 przedstawiono wartości: mediany, dolnych i górnych kwartyli oraz maksima i minima wartości nieodstających dla poszczególnych antybiotyków, wyliczone z wartości średnic stref zahamowania wzrostu szczepów *Bifidobacterium*.

W celu przedstawienia działania testowanych antybiotyków na poszczególne szczepy *Bifidobacterium*, wchodzące w skład utworzonej kolekcji, otrzymane wyniki, w postaci wartości średnic zahamowania wzrostu, zsumowano i przedstawiono na wspólnym wykresie (Ryc. 57), przy czym pominięto te szczepy, dla których nie posiadano kompletu danych. Szczepy charakteryzujące się największą strefą zahamowania wzrostu na skutek działania badanych antybiotyków to: 20456, L III/5, 40C, 3, 39 oraz 40. Szczepy wykazujące najmniejsze strefy zahamowania wzrostu pod wpływem działania badanych antybiotyków to: L III/7, K1 28a, 30A, K1 26B, K1 31A oraz 13a.

Tabela 18, część 1: Oporność badanych szczepów *Bifidobacterium* na wybrane antybiotyki, wykazana za pomocą metody dyfuzji krążkowej Kirby'ego i Bauera. Wyniki podano w milimetrach [mm], mierząc wielkość średnicy zahamowania wzrostu szczepów *Bifidobacterium*, z uwzględnieniem średnic krążków nasyconych antybiotykami (6mm).

Nr	szczep <i>Bifido-bacterium</i>	Użyte antybiotyki							
		Kotrymo-ksazol 25µg	Peni-cylinaG 10µg	Cefuroksym 30µg	Ciprofloksacyna 5µg	Wanko-mycyna 30µg	Mupiro-cyna 5µg	Genta-mycyna 10µg	Erytro-mycyna 15µg
1	20083	6	44	44	26	26	6	7	46
2	20104	6	44	40	15	28	6	6	32
3	20213	6	46	23	11	30	6	12	54
4	20219	6	46	28	14	30	6	15	58
5	20456	8	50	50	38	6	30	6	14
6	20670	6	30	38	12	32	6	8	50
7	L III/5	16	48	46	30	30	6	30	50
8	L III/7	6	18	12	6	6	11	13	23
9	L IV	6	25	20	16	6	12	10	28
10	B/K	6	38	27	13	30	6	19	48
11	40 B	6	15	25	6	6	12	8	25
12	20 B	6	22	6	12	13	22	9	24
13	3/1	6	24	8	13	14	6	7	22
14	33 B	6	40	40	13	28	6	9	54
15	7/4	9	30	30	13	32	6	9	40
16	2/3	6	33	27	13	23	6	8	37
17	39 B	6	35	32	14	25	6	10	36
18	13/E/2	6	40	18	14	28	6	14	50
19	30 A	6	21	6	11	14	6	6	23
20	40 C	8	60	42	24	46	6	20	50
21	3	20	43	40	17	33	6	15	60
22	I/15/2	6	36	28	18	27	6	16	40
23	III/15/2	10	25	20	14	22	6	7	30
24	III/23/5a	6	32	28	13	25	6	9	40
25	III/23/5b	9	35	35	20	23	6	10	36
26	V/23/1	6	30	18	17	6	15	15	33
27	V/23/4	23	40	29	15	30	6	12	40
28	II/23/2	6	30	19	12	24	6	10	36
29	KI K/1	6	23	27	6	6	6	13	30
30	KI K/2	6	23	13	17	30	6	16	27
31	KI K/3	6	30	26	8	22	6	8	35
32	KI 20 D	6	20	27	6	6	13	14	27
33	KI 3/I	6	50	27	6	6	12	12	30
34	KI 6 B	10	46	46	19	29	6	6	44
35	KI 1	6	44	38	10	32	6	11	52
36	KI 27 A	6	30	30	14	24	6	8	37
37	KI 7	6	38	34	17	26	6	9	42
38	KI 35 D	15	40	36	12	30	6	14	44
39	KI 30 C	6	29	29	28	19	6	23	10
40	KI 57 D	6	24	25	17	31	6	17	28
41	KI 31 A	6	20	20	13	15	6	6	9
42	KI 31 B	6	32	27	15	24	6	9	38

Skrót „nb” - nie badano

Tabela 18, część 2: Oporność badanych szczepów *Bifidobacterium* na wybrane antybiotyki, wykazana za pomocą metody dyfuzji krążkowej Kirby'ego i Bauera. Wyniki podano w milimetrach [mm], mierząc wielkość średnicy zahamowania wzrostu szczepów *Bifidobacterium*, z uwzględnieniem średnic krążków nasyconych antybiotykami (6mm).

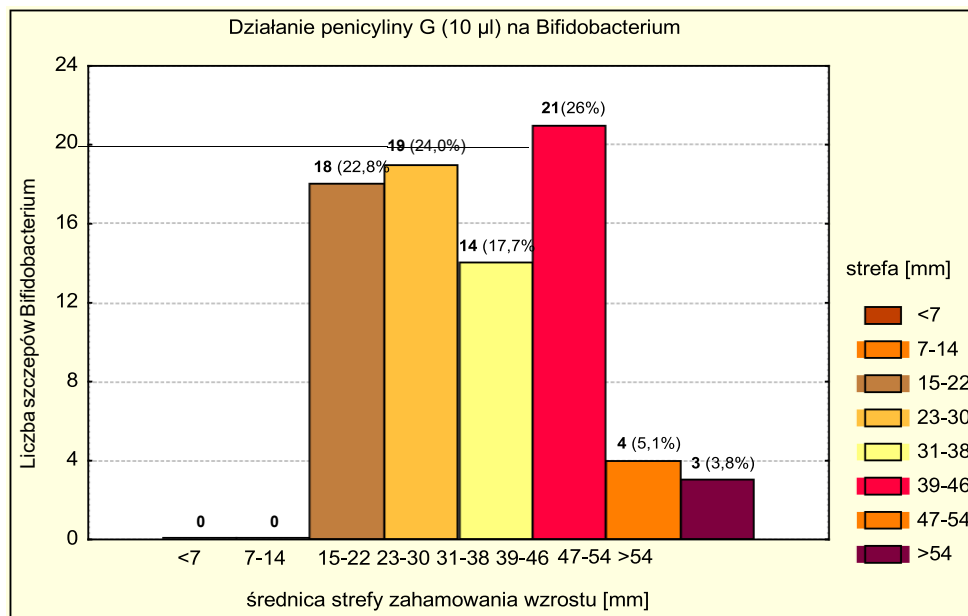
Nr	szczep <i>Bifido-bacterium</i>	Użyte antybiotyki							
		Kotrymo-ksazol 25µg	Peni-cylina G 10µg	Cefuro-ksym 30µg	Ciproflo-ksacyna 5µg	Wanko-mycyna 30µg	Mupiro-cyna 5µg	Genta-mycyna 10µg	Erytro-mycyna 15µg
43	Kl 33 C	6	19	20	6	6	10	7	28
44	Kl 2 A	6	22	8	13	14	23	6	22
45	Kl 29 E	6	45	35	13	32	6	15	47
46	Kl 38 C	6	21	24	6	6	15	10	30
47	Kl 13 D	6	20	27	6	6	15	13	28
48	Kl 39 B	6	40	34	11	26	6	16	42
49	Kl 25 A	6	44	40	11	32	6	10	50
50	Kl 36 A	10	34	32	13	25	6	14	36
51	Kl 36	14	40	38	16	19	6	7	32
52	Kl 26 B	6	18	13	8	6	6	11	27
53	Kl 30 A	6	48	36	12	32	6	24	54
54	Kl 66A	12	36	32	18	26	6	12	40
55	Kl 23 E	6	40	30	6	27	6	12	50
56	Kl 28 a	6	23	10	14	15	6	6	9
57	Kl 1 B	6	24	35	16	31	6	30	48
58	Kl 63 A	6	22	35	6	6	14	16	30
59	Kl 66 C	6	40	46	22	36	8	13	48
60	Kl 36 B	22	45	33	15	32	6	6	51
61	Kl 59 A	6	20	30	6	6	12	12	28
62	2/1	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
63	3/3	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
64	37	24	28	22	32	26	6	13	42
65	9	6	20	20	6	6	13	10	27
66	38 a	6	27	22	18	6	17	10	32
67	38 b	6	18	17	7	6	12	9	28
68	34	13	30	20	13	23	6	10	33
69	36	6	22	28	6	6	12	13	27
70	35	6	44	44	11	24	6	9	40
71	13 a	6	18	6	10	12	6	8	21
72	13 b	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
73	39	6	60	44	50	35	6	32	58
74	40	6	66	46	54	36	9	35	60
75	24	23	32	34	11	24	6	6	45
76	8 a	6	40	36	21	24	6	9	37
77	5	6	35	25	11	6	20	18	30
78	23	22	30	25	14	28	6	11	39
79	pK 1	6	37	16	14	25	6	14	42
80	pK 3	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
81	pK 5	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
82	Kl M/1	26	22	38	8	6	7	16	37
83	Kl M/3	25	40	38	22	25	7	8	40
84	Kl M/5	6	36	35	12	27	6	13	39

Skrót „nb” - nie badano

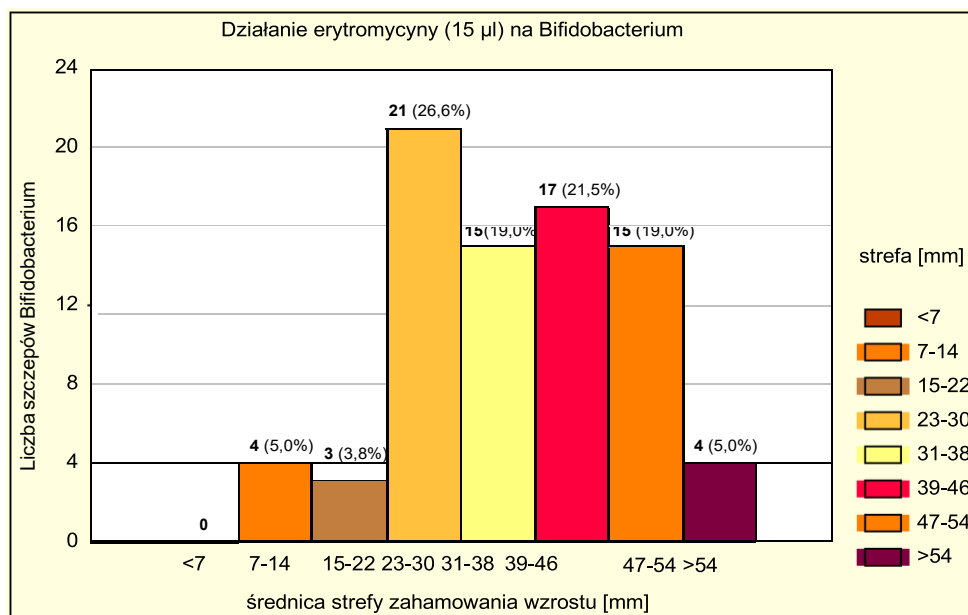
Tabela 19: Działanie ośmiu wybranych antybiotyków na szczepy *Bifidobacterium* - podział ze względu na wielkość średnicy strefy zahamowania wzrostu.

Grupa	Średnica strefy zahamowania wzrostu [mm]	UŻYTE ANTYBIOTYKI							
		Penicylina G 10µg	Erytro- mycyna 15µg	Cefuroksym 30µg	Genta- mycyna 10µg	Ciproflo- ksacyna 5µg	Wanko- mycyna 30µg	Mupirocyna 5µg	Kotrymo- ksazol 25µg
1	<7	0	0	3	9	12	20	56	59
2	7-14	0	4	6	51	38	5	15	10
3	15-22	18	3	13	13	20	6	6	5
4	23-30	19	21	24	4	4	34	2	5
5	31-38	14	15	20	2	2	13	0	0
6	39-46	21	17	12	0	1	1	0	0
7	47-54	4	15	1	0	2	0	0	0
8	>54	3	4	0	0	0	0	0	0
Suma przebadanych szczepów <i>Bifidobacterium</i>		79	79	79	79	79	79	79	79

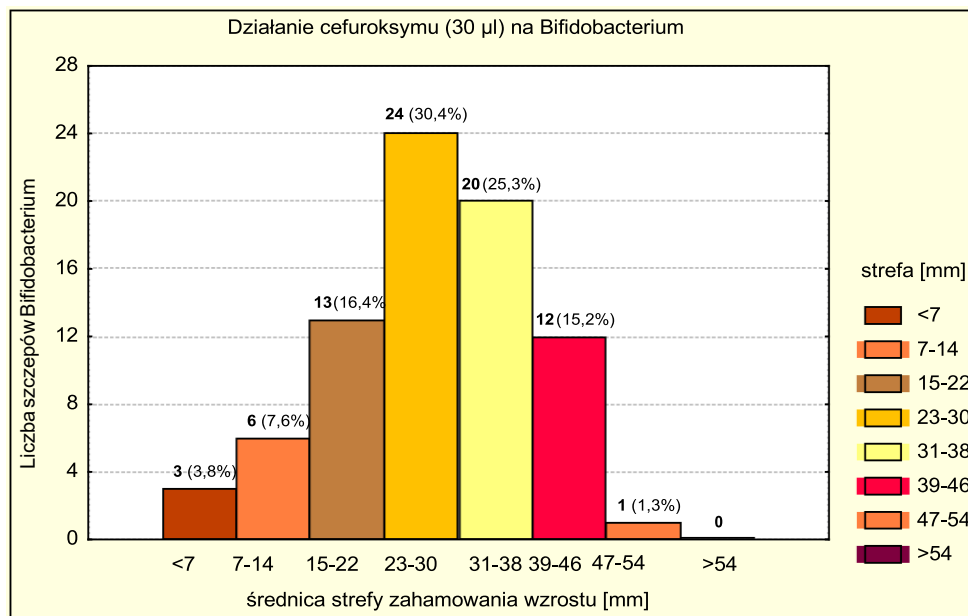
Liczba szczepów *Bifidobacterium*



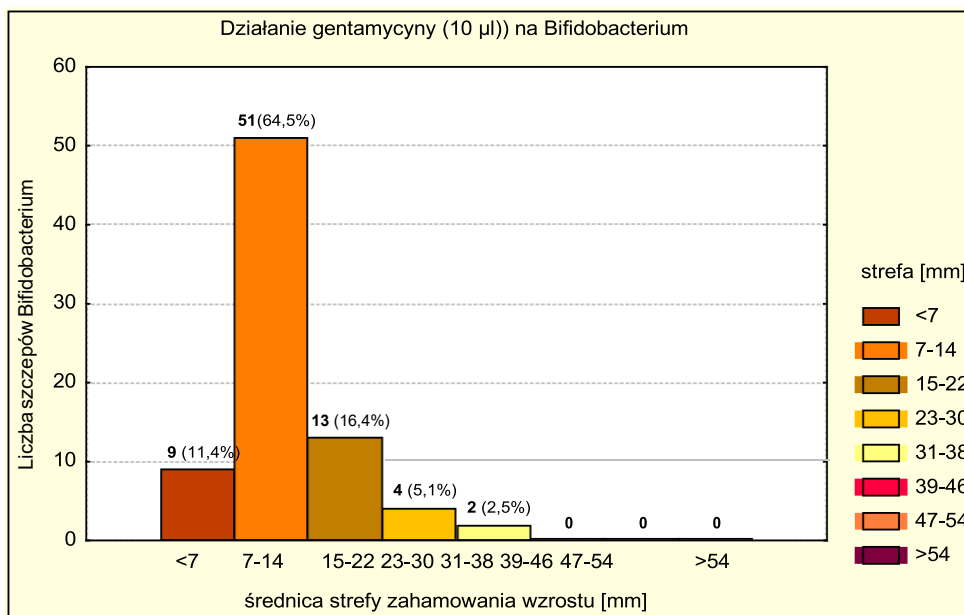
Ryc. 47: Działanie penicyliny G (10 μ l) na szczepy bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*.



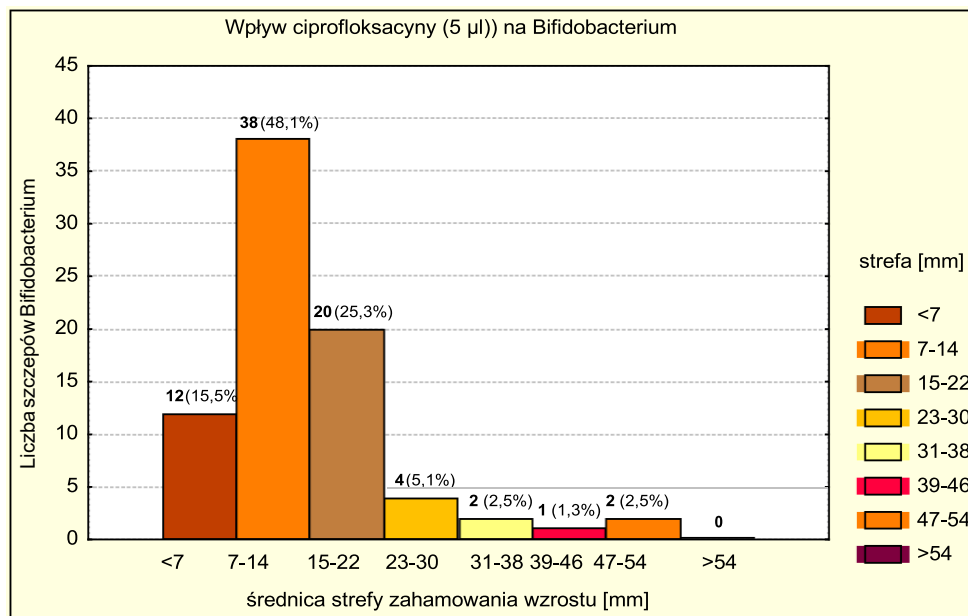
Ryc. 48: Działanie erytromycyny (15 μ l) na szczepy bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*.



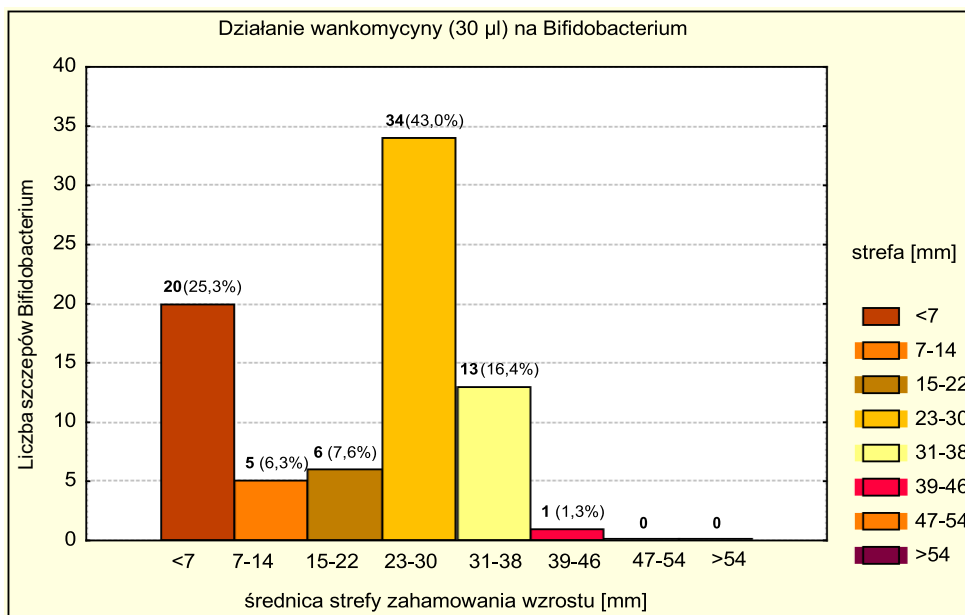
Ryc. 49: Działanie cefuroksymu (30 µl) na szczepy bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*.



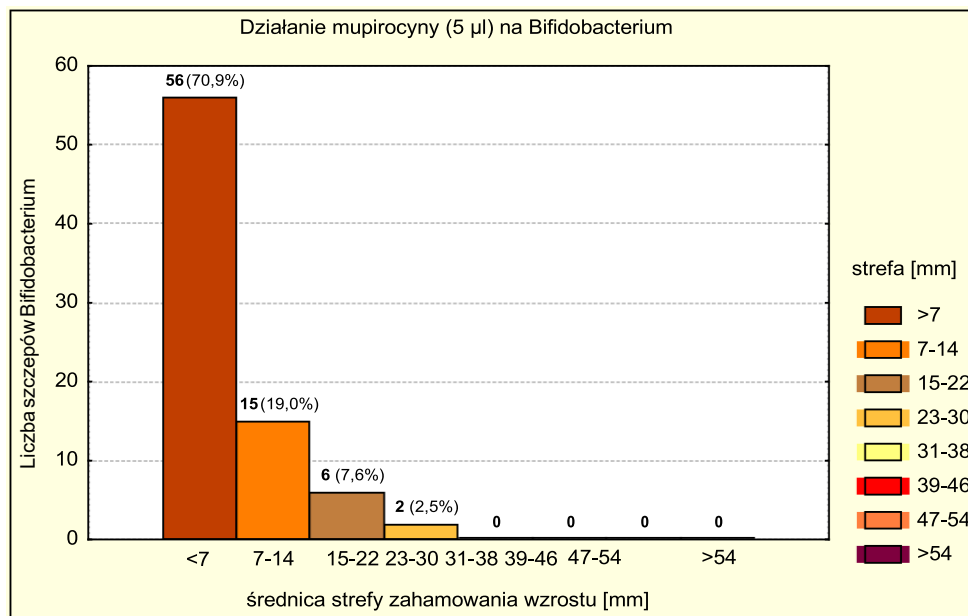
Ryc. 50: Działanie gentamycyny (10 µl) na szczepy bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*.



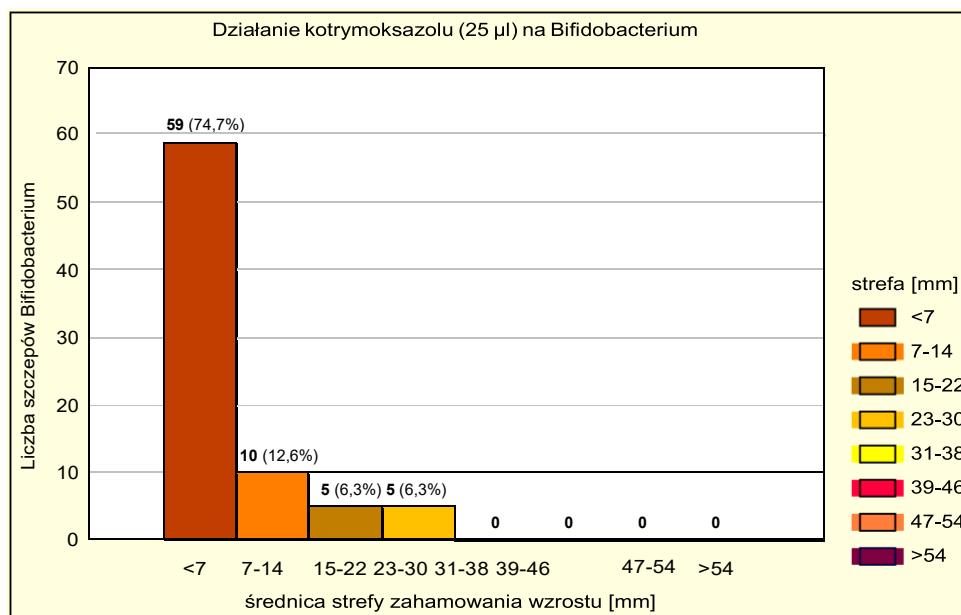
Ryc. 51: Działanie ciprofloksacyny (5 μ l) na szczepy bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*.



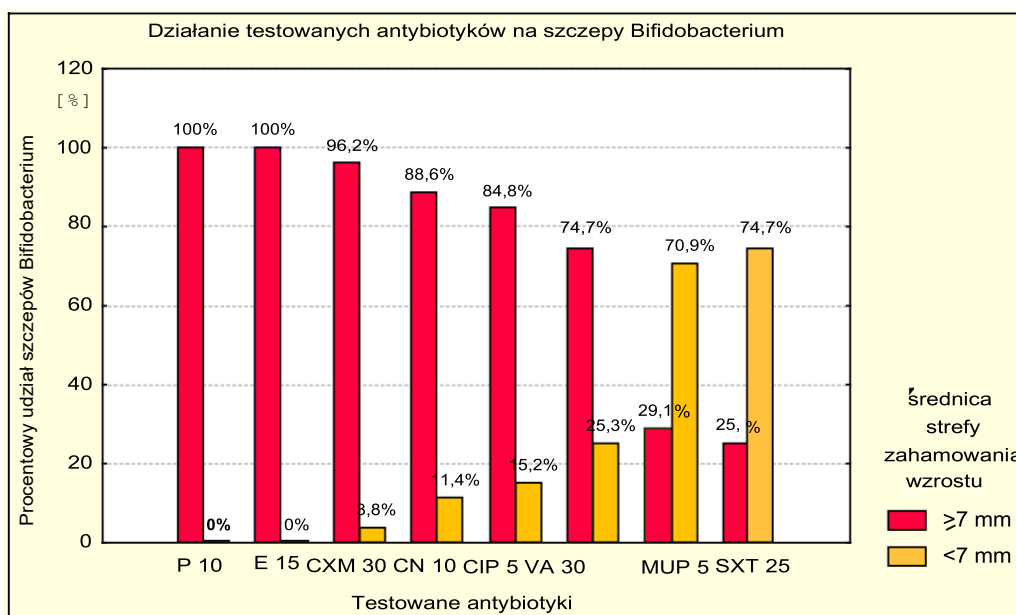
Ryc. 52: Działanie wankomycyny (30 μ l) na szczepy bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*.



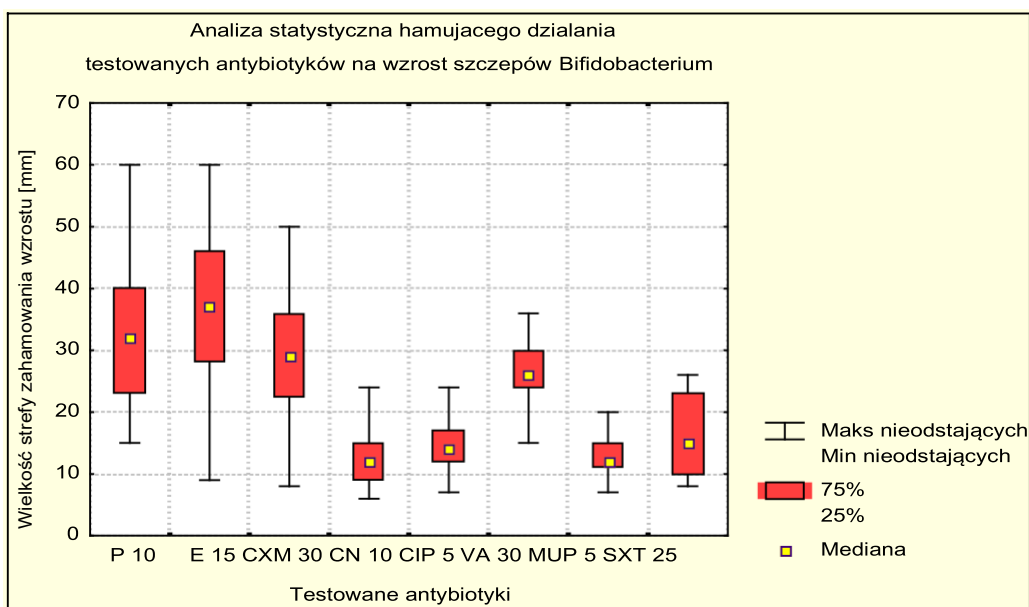
Ryc. 53: Działanie mupirocyny (5 μ l) na szczepy bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*.



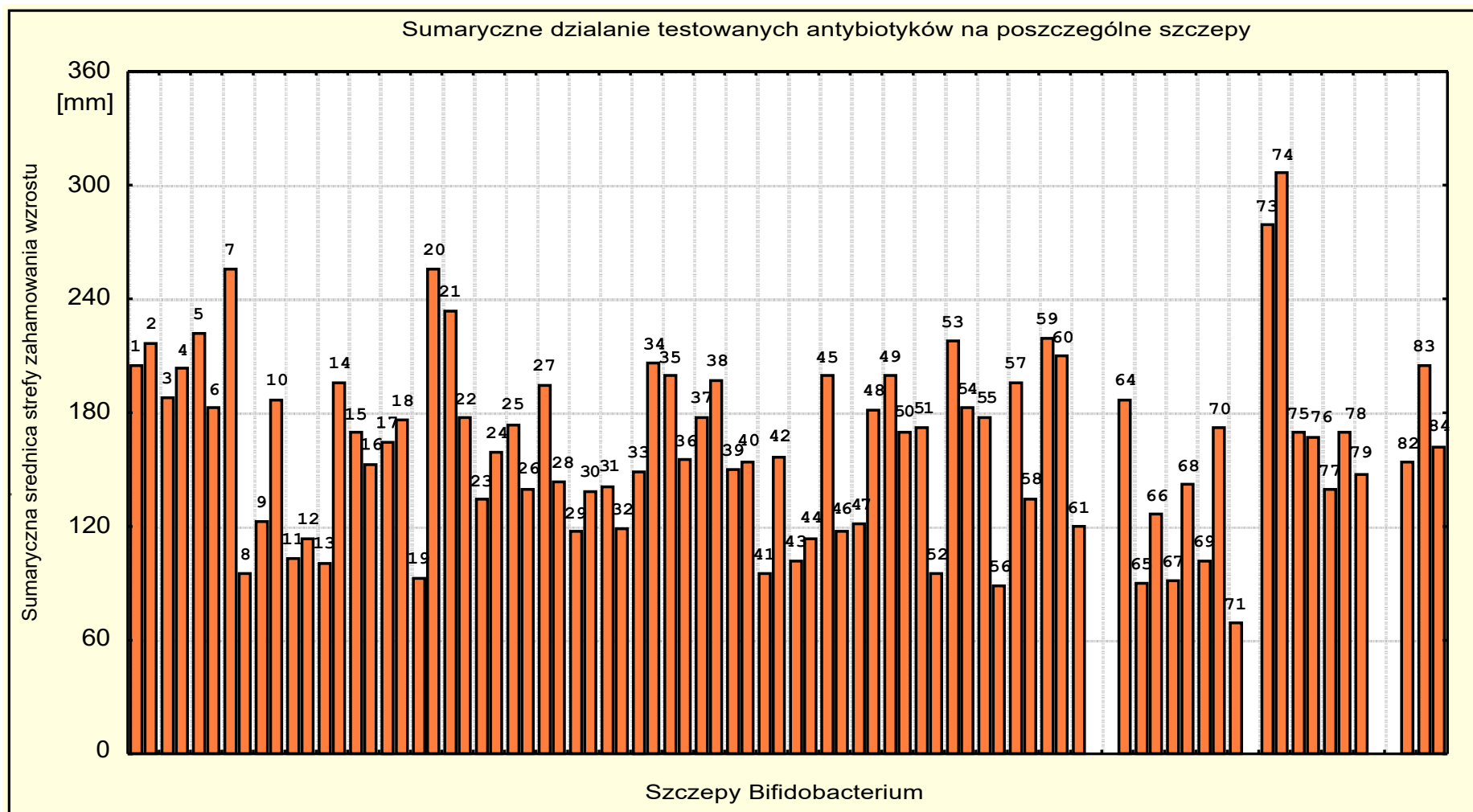
Ryc. 54: Działanie kotrymoksazolu (25 μ l) na szczepy bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*.



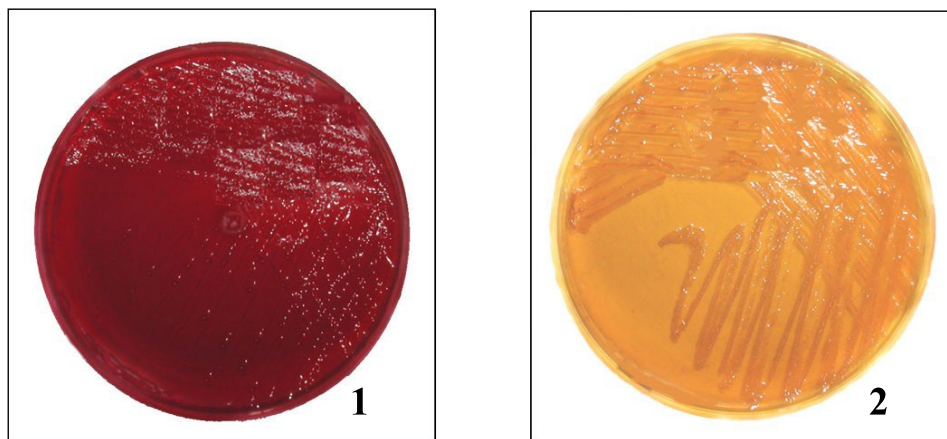
Ryc. 55: Wykres przedstawiający działanie ośmiu zastosowanych antybiotyków na szczepy *Bifidobacterium* - podział ze względu na wielkość średnicy strefy zahamowania wzrostu.



Ryc. 56: Analiza statystyczna hamującego działania ośmiu zastosowanych antybiotyków na wzrost szczepów *Bifidobacterium*.
W przedstawionej analizie uwzględniono jedynie te wyniki, gdzie doszło do powstania strefy zahamowania wzrostu szczepów *Bifidobacterium* większej lub równej 7 mm.

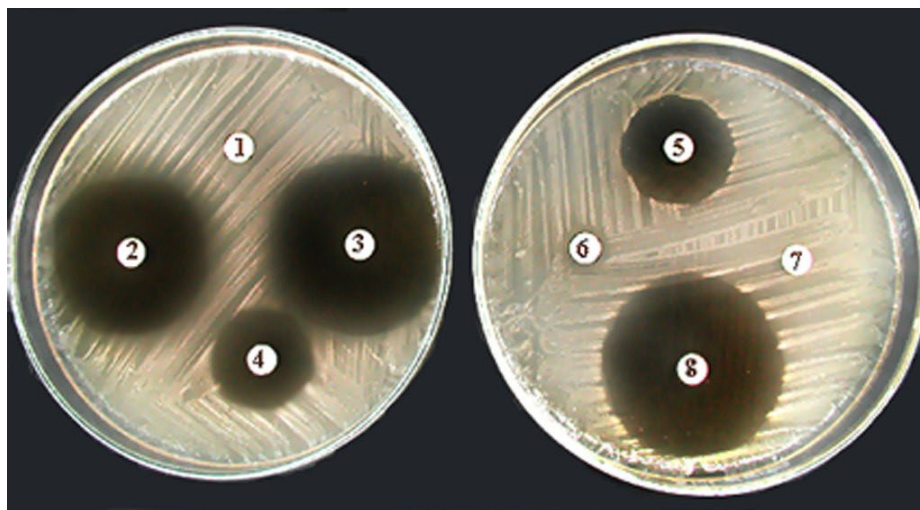


Ryc. 57: Sumaryczne działanie ośmiu wybranych antybiotyków na poszczególne szczepy bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* wchodzące w skład utworzonej kolekcji. Słupki przedstawiają sumy średnic zahamowania wzrostu.



Ryc. 58: Przykładowe wyniki z testu określającego wrażliwość szczepów z rodzaju *Bifidobacterium* na sole kwasów żółciowych.

1 - szczep 20083 DSMZ *B. adolescentis* wrażliwy na stężenie 2 g/l,
2 - szczep 20219 DSMZ *B. longum* oporny na stężenie 20 g/l.



Ryc. 59: Oznaczanie oporności wybranego szczepu *Bifidobacterium* (8a) względem ośmiu testowanych antybiotyków przy pomocy metody dyfuzji krążkowej Kirby'ego i Bauera.

Testowane antybiotyki: **1** - SXT 25μg, **2** - CXM 30μg, **3** - P 10μg, **4** - CIP 5μg, **5** - VA 30μg, **6** - CN 10μg, **7** - MUP 5μg, **8** - E 15μg.

X. DYSKUSJA

W czasie prowadzenia badań, nad właściwościami warunkującymi udział bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* we florze ludzkiego przewodu pokarmowego, poczyniono kilka ciekawych obserwacji skłaniających do ich szerszego przedyskutowania na końcu niniejszej rozprawy.

Istnieje wiele kontrowersji na temat pochodzenia bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* w przewodzie pokarmowym noworodków. Prawdopodobne źródła to głównie pochwa i mleko matki oraz w nielicznych przypadkach odbyt [31]. Wielokrotnie wykazano, że najbardziej istotny wpływ na wczesną kolonizację noworodków ma sposób porodu. Dzieci urodzone siłami natury są w sposób dominujący skolonizowane bakteriami z rodzaju *Bifidobacterium*, w przeciwieństwie do dzieci urodzonych przez cesarskie cięcie, u których to w początkowym okresie życia dominują bakterie z rodzaju *Bacteroides* [121]. Poza tym badania epidemiologiczne sugerują, że istnieje lokalne środowiskowe źródło *Bifidobacterium* w każdym szpitalu położniczym. Dowodem na to miałby być fakt, że zarówno dzieci urodzone w sposób naturalny, jak i przez cesarskie cięcie, dzieci karmione mlekiem matki lub produktami je zastępującymi, wszystkie z nich są w obrębie jednego szpitala skolonizowane tymi samymi gatunkami *Bifidobacterium*, co sugeruje, że szczepy *Bifidobacterium* mogą być przenoszone pomiędzy dziećmi w danej placówce na rękach personelu medycznego [31, 32].

Na początku niniejszej rozprawy, mając możliwość nawiązania współpracy z Oddziałem Ginekologiczno - Położniczym Szpitala Klinicznego Ministerstwa Zdrowia i Administracji Kraju w Krakowie (w ramach projektu Nr 4PO5F01299C z KBN) podjęto próbę przeprowadzenia analizy dróg kolonizacji przez bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* noworodków karmionych mlekiem matki. Grupę badaną stanowiło osiem matek wraz z ich nowo narodzonymi dziećmi.

Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, że kolonizacja noworodków przez *Bifidobacterium* odbywa się między innymi poprzez kontakt bezpośredni z matką, a mianowicie w czasie porodu przy przejściu przez kanał rodny, a następnie bakterie te przekazywane są wraz z mlekiem matki. Kolonizację pochwy przez bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* wykazano u trzech (37,5%) na osiem badanych kobiet. Z kolei, tylko u jednej pacjentki (12,5%) zaobserwowano występowanie tych bakterii w pokarmie. Zastanawiającym jest fakt, iż u 7 na 8 badanych noworodków (87,5%) wykazano kolonizację przez szczepy *Bifidobacterium* należące do takich gatunków, których to nie udało się wyizolować od ich matek. Być może jest to potwierdzeniem teorii, która mówi o lokalnym środowiskowym źródle szczepów *Bifidobacterium* obecnym w każdym szpitalu położniczym. Być może wykazana kolonizacja była efektem opieki przez personel medyczny, z którym dzieci miały kontakt, a wyizolowane szczepy mogły pochodzić od innych dzieci obecnych wówczas na Oddziale.

Identyfikacja bakterii należących do rodzaju *Bifidobacterium* jest bardzo skomplikowana i czasochłonna. Chociaż istnieje wiele metod wykorzystywanych w tym celu, opartych na badaniu cechach fenotypowych, to właściwie tylko wyniki z testów molekularnych wydają się być naprawdę wiarygodne.

Obecnie na rynku brak jest stosunkowo prostego w wykonaniu, niedrogiego, a jednocześnie dającego dokładne wyniki zestawu, opartego na badaniu cech biochemicznych, służącego do identyfikacji gatunkowej bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*. Często wykorzystywanymi w tym celu, nie zawsze jednak z sukcesem, jak wykazano w toku niniejszych doświadczeń, są następujące zestawy: Anaerobe ID Kit [Becton Dickinson], API 20A i rapid ID 32A [bioMérieux]. Natomiast, pomocny w identyfikacji gatunkowej okazał się program „The numerical phenotypic identification system” sumujący wyniki z zestawów API 50 CH oraz rapid ID 32A [bioMérieux] [123]. Niestety program ten był udostępniany przez Internet jedynie na specjalną prośbę skierowaną do jego Autorów. Poza tym jego dużym ograniczeniem był fakt, że umożliwiał on identyfikację jedynie sześciu z spośród trzynastu dotąd poznanych ludzkich gatunków bakterii należących do rodzaju *Bifidobacterium*, takich jak: *B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. dentium* i *B. pseudocatenulatum*. Wyniki uzyskane dla sześciu szczepów wzorcowych, otrzymane przy pomocy tego programu potwierdziły ich przynależność gatunkową. Metoda ta, wydaje się więc godna polecenia, gdyż daje wiarygodne i powtarzalne wyniki. Należy jednak pamiętać, że jest ona bardzo czaso- i pracochłonna oraz kosztowna.

Najbardziej użyteczną metodą z zakresu biologii molekularnej wykorzystaną podczas identyfikacji gatunkowej bakterii należących do rodzaju *Bifidobacterium* była metoda PCR. Technika ta jest obecnie najlepiej wystandaryzowana, dzięki zastosowaniu gatunkowo specyficznych starterów, komplementarnych do fragmentu podjednostki 16S rRNA badanych gatunków bakterii [147, 148, 149]. Pozytywny wynik identyfikacji otrzymano dla pięćdziesięciu jeden szczepów, pochodzących z utworzonej kolekcji, z czego: siedemnaście szczepów należało do gatunku *B. longum*, czternaście do *B. bifidum*, dziewięć do *B. breve*, pięć do *B. infantis* oraz po trzy do *B. adolescentis* i *B. cathenulatum*.

Zastosowanie metody fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH), umożliwiło przeprowadzenie identyfikacji rodzajowej *Bifidobacterium*, zarówno w czystej hodowli jak i w materiałach biologicznych. Metoda ta dzięki zastosowaniu rodzajowo specyficznej sondy Bif 164, charakteryzowała się wysoką czułością i specyficznością, a ponad to była stosunkowo prosta i szybka w wykonaniu - pozwalała na wykrycie obecności bakterii już po 5 godzinach od momentu pobrania materiału. Obecność bakterii należących do omawianego rodzaju potwierdzono metodą FISH w następujących materiałach: wymaz z pochwy, pokarm matki,

smółka oraz kał noworodków. Co więcej, przy wykorzystaniu metody FISH można było określić liczbę bakterii należących do rodzaju *Bifidobacterium* w jednym gramie próbki, przy czym metodę tą zastosowano dla próbek kału pobranych od noworodków. Uzyskane wyniki dla przebadanych próbek mieściły się w przedziale wartości: 6.0×10^8 - 4.0×10^{10} , ze średnią wartością 1.0×10^{10} komórek bakterii na 1 gram kału noworodka. Taka liczba bakterii obecnych w kale noworodków, jest zgodna z wynikami innych badaczy, którzy dzięki zastosowaniu metody FISH wykazali, że bakterie należące do rodzaju *Bifidobacterium* znacząco przewyższają swą liczbą wszystkie inne rodzaje bakterii beztlenowych izolowane z próbek kału [152, 161].

Omawiając kwestię identyfikacji bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* należy jeszcze zwrócić uwagę na jeden istotny fakt. Mianowicie, sama nazwa rodzajowa *Bifidobacterium* sugeruje, że bakterie te występują w podwójnie rozdwojonej formie. Jest to jednak bardzo mylące, gdyż zaobserwowano, że ten sam szczep w zależności od ilości pasaży od momentu odmrożenia, fazy wzrostu, zastosowanego podłoża (np. płynne, stałe) oraz jego jakości, może występować w rozmaitych formach morfologicznych, od bardzo małych do wielkich, z różnym stopniem rozgałęzienia komórek. Te spostrzeżenia są zgodne z obserwacją Scardovi (1986) oraz Noble i wsp. (1998) [2, 5].

Wiadomo jest, że szczepy *Bifidobacterium* bytujące w złożonych ekosystemach drobnoustrojów w aktywny sposób kontrolują wzrost innych składników mikroflory. Dzieje się tak najprawdopodobniej na drodze kilku nakładających się mechanizmów, a dominacja jednego z nich jest zależna od gatunku bakterii na które one działają [8].

Zaproponowana metoda słupkowa według Strus (1998), wykorzystana do oznaczenia zakresu właściwości antagonistycznych badanych szczepów *Bifidobacterium*, pozwoliła na bezpośrednie zbadanie bakterii o różnej tolerancji na tlen w jednym systemie agarowym [164, 171, 174].

W toku przeprowadzonych badań nad właściwościami antagonistycznymi około osiemdziesięciu szczepów *Bifidobacterium* wobec ośmiu wybranych drobnoustrojów wskaźnikowych wykazano, że większość szczepów charakteryzowała się bardzo silnym działaniem antagonistycznym względem: *Propionibacterium acnes* i *Campylobacter coli*, średnim lub silnym działaniem wobec: *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella sonnei* i *Staphylococcus aureus*, stosunkowo małą aktywnością względem *Enterococcus faecalis* oraz zupełnym brakiem działania na *Lactobacillus lactis*.

Uzyskane wyniki są zgodne z wynikami innych badaczy, którzy wykazali antagonistyczne działanie *Bifidobacterium* wobec wielu patogennych gatunków bakterii, m.in.: *Salmonella typhi*, *Shigella* sp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter* sp., *Listeria* sp. i *Vibrio cholerae* [3, 8, 206, 207].

W niniejszej rozprawie wykazano także, że poszczególne bakterie wskaźnikowe różniły się pomiędzy sobą wrażliwością na działanie tego samego szczepu *Bifidobacterium* oraz te same szczepy wskaźnikowe były w różnym stopniu wrażliwe na działanie różnych szczepów *Bifidobacterium*.

Zauważono również, że niektóre szczepy *Bifidobacterium* wykazywały wybitne działanie hamujące wobec tylko jednego gatunku bakterii wskaźnikowych, a inne równolegle hamowały wzrost kilku różnych gatunków bakterii.

Przeprowadzanie doświadczeń nad zakresem antagonistycznego działania bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* w sposób oczywisty prowadzi do rozważań nad mechanizmami tego zjawiska. W większości prac poświęconych antagonizmowi, a wykonanych na przestrzeni wielu lat, możemy znaleźć informacje, z których wynika, że działanie antagonistyczne *Bifidobacterium* jest związane głównie z wydzielaniem kwasów mlekowego i octowego oraz z produkcją substancji podobnych do bakteriocyn [8, 57, 166, 167].

Antybakteryjny wpływ kwasów organicznych może być wynikiem gwałtownego obniżenia pH środowiska, poza zakres optymalnej wartości dla wzrostu określonych bakterii i/lub inhibicję aktywności biochemicznej mikroorganizmów przez niezdisocjowane cząsteczki kwasu. Kwas octowy, jeden z najsilniejszych inhibitorów wśród kwasów organicznych, może oddziaływać na membrany komórkowe neutralizując potencjał elektrochemiczny komórki, może także powodować denaturację wewnątrzkomórkowych białek oraz redukcję wartości pH wewnątrz komórki, co w konsekwencji prowadzi do zahamowania wzrostu i aktywności wrażliwych mikroorganizmów. Co więcej, kwas octowy razem z kwasem mlekowy potęgują swoje działanie, wykazując synergizm w inhibicji mikroorganizmów [165, 206].

W świetle wyników uzyskanych w zaprezentowanej pracy, stwierdzenie, że antagonistyczne działanie szczepów *Bifidobacterium* jest związane głównie z wydzielaniem przez nie kwasów mlekowego i octowego wydaje się być niekompletne i nie do końca słuszne. Z takim podejściem zgadzają się również inni badacze [8, 206]. Mieszanina kwasów mlekowego i octowego produkowana przez te bakterie obniża pH podłoża mniej więcej w podobnym zakresie wynoszącym 3.6 - 4.4, a mimo to zauważa się wyraźne, jakościowe i ilościowe różnice w antagonistycznej aktywności badanych szczepów wobec bakterii wskaźnikowych. Autorzy, którzy określali wpływ działania kwasu mlekowego na tempo wzrostu innych bakterii wykazali, że nie wywierał on specyficznego działania hamującego na większość badanych mikroorganizmów, wrażliwymi na niskie pH środowiska okazały się jedynie niektóre bakterie bezwzględnie beztlenowe [56]. Nasuwa się zatem pytanie, które dzielają niektórzy badacze, czy przypadkiem obok typowych, łatwych do wykrycia i oznaczenia kwasów mlekowego i octowego, bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* nie produkują jeszcze innych,

krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (w tym również lotnych), wydzielanych w różnych ilościach, którym to w szczególności przypisać moglibyśmy tak wszechstronne i tak zróżnicowane antybakteryjne właściwości prezentowane przez niektóre szczepy probiotyczne [120].

Badania prowadzone przez Meghrous'a i wsp. (1990) udowodniły po raz pierwszy, że niektóre szczepy bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* są zdolne do produkcji substancji podobnych do bakteriocyn. Opierając się na doniesieniach naukowych tej grupy można przyjąć, że zakres antybakteryjnego działania znanych i scharakteryzowanych substancji podobnych do bakteriocyn produkowanych przez szczepy *Bifidobacterium* jest bardzo wąski i w praktyce ograniczony tylko do własnego rodzaju, chociaż istnieje kilka wyjątków [57]. Natomiast niektóre ze szczepów przebadanych w powyższej pracy posiadały bardzo szeroki zakres działania antybakteryjnego, obejmujący zarówno ziarenkowce Gram-dodatnie, pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae*, jak i bakterie beztlenowe. Mamy zatem do czynienia z sytuacją podobną, jak w odniesieniu do kwasów octowego i mlekowego: trudno przyjąć, że jedna substancja o aktywności bakteriocyny mogłaby być odpowiedzialna za hamowanie wzrostu tak szerokiego zakresu drobnoustrojów wskaźnikowych.

Innym z proponowanych mechanizmów jest wytwarzanie przez szczepy *Bifidobacterium* tzw. związków antybakteryjnych (ang. antimicrobial compounds) [8]. Fujiwara i wsp. (1997) opisali białkopodobny czynnik, wydzielany przez szczep *B. longum* SBT 2928 o masie molekularnej wynoszącej co najmniej 100 000 Da powodujący zahamowanie adherencji *in vitro* enteropatogennego szczepu *E. coli* Pb 176 do cząsteczek gangliotetrasylceramidu [208]. Liévin i wsp. (2000) wykazali, że na czterdzieści przebadanych szczepów z rodzaju *Bifidobacterium*, dwa charakteryzowały się bardzo silnymi właściwościami antagonistycznymi, blokując inwazję szczepu *S. typhimurium* C5 w głąb komórek linii Caco-2 oraz prowadząc do zabicia komórek bakteryjnych. Udowodniono, że szczepy te wytwarzały lipofilne cząsteczki o masie molekularnej mniejszej niż 3500 Da, wykazujące właściwości antybakteryjne [207].

Tak więc, najbardziej prawdopodobna wydaje się być taka możliwość, że szczepy *Bifidobacterium* o szerokim zakresie działania przeciwbakteryjnego są w stanie produkować wiele różnych substancji, które działają na inne składniki dzielące z nimi tę samą niszę ekologiczną i w ten sposób stabilizują lokalny skład flory. Prawdopodobnie większość z tych aktywnych substancji nie została jeszcze poznana. Taka hipoteza jest zgodna z współczesnymi poglądami dotyczącymi ekologii bakterii [120, 175, 209, 210].

Właściwości powierzchniowe bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* nie są jeszcze dokładnie zbadane i dlatego w pracach badawczych zwykle opisuje się je w sposób cząstkowy. Najczęściej

określa się hydrofobowość powierzchni bakterii oraz zdolność ich przylegania do komórek gospodarza, tzw. adherencję [71, 176].

W niniejszej rozprawie przebadano pod kontem aktywności powierzchniowej stosunkowo dużą kolekcję, bo aż osiemdziesiąt cztery szczepy *Bifidobacterium*. Poza tym, po raz pierwszy udowodniono produkcję przez szczepy *Bifidobacterium* śluzowatej substancji zewnątrzkomórkowej, morfologicznie i czynnościowo przypominającej tzw. slime, obecności której nigdy dotąd nie rozważano jako czynnika powierzchniowego bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*, kolonizujących błony śluzowe ustroju człowieka. Wykazano, że tylko 2% szczepów z przebadanej puli, nie produkowało zewnątrzkomórkowego śluzu, z kolei, najwyżej oceniane wydzielanie śluzu było charakterystyczne dla 7% szczepów, zaś prawie połowa przebadanych szczepów wytwarzała śluz w umiarkowanej ilości.

Substancja określona z angielskiego terminem „slime” została już wcześniej opisana u innych bakterii, w tym między innymi u gatunku *S. epidermidis* oraz u gatunków reprezentujących rodzaj *Lactobacillus*, pochodzących zarówno ze środowiska zewnętrznego, jak i kolonizujących przewód pokarmowy człowieka. Przypuszcza się, że bakterie produkujące zewnątrzkomórkowy śluz wykazują wyjątkowo silną aktywność powierzchniową i stosunkowo łatwo przywierają do różnych powierzchni, szczególnie do powierzchni sztucznych. Badania nad szczepami wydzielającymi duże ilości śluzu są bardzo zaawansowane, gdyż producenci żywności mają nadzieję, że dodanie tego typu szczepów do produktów mlecznych, stanie się w przyszłości naturalnym sposobem ich zagęszczania [190, 212].

Być może, w warunkach naturalnych produkcja substancji zewnątrzkomórkowej posiada jakieś znaczenie biologiczne, na przykład umożliwia tworzenie naturalnego biofilmu, który opisano jako typowe rozmieszczenie bakterii na powierzchni błon śluzowych [211].

Oceniając hydrofobowość powierzchni szczepów *Bifidobacterium* wykazano, że aż około jedna czwarta z przebadanego zestawu bakterii, charakteryzowała się zdolnością do autoaglutynacji oraz agregacji w najniższym stężeniu siarczanu amonu. Uzyskane wyniki świadczą o wysokiej hydrofobowości powierzchni tych szczepów.

Za wysoką hydrofobowość powierzchni bakterii Gram-ujemnych odpowiada obecność na niej adhezyn [187]. Udowodniono zatem, że bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* pochodzące z naturalnej flory człowieka, również wykazują wysoką hydrofobowość powierzchni, co może wskazywać, że wykorzystują do kolonizacji śluzówek te same mechanizmy, co patogenne bakterie Gram-ujemne [188].

Możliwość oddziaływania bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* jako probiotyków związana jest w dużej mierze z ich zdolnością adherowania do powierzchni nabłonka ludzkiego [120, 181].

Badania adherencji *Bifidobacterium* w warunkach *in vitro* z wykorzystaniem ustalonych linii komórkowych prowadzone są tylko w niewielu wyspecjalizowanych laboratoriach. Najczęściej w tym celu wykorzystywane są dwie dobrze scharakteryzowane linie komórkowe pochodzące z ludzkich nowotworów okrężnicy: linia Caco-2 charakteryzująca się typowymi cechami kolonocytów oraz linia HT-29 będąca bardzo dobrym modelem komórek kubkowatych [184, 185].

W toku badań przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy zaobserwowano, że większość z badanych szczepów *Bifidobacterium* adherowało zarówno do wolnych przestrzeni pomiędzy komórkami, jak i do brzegów tkanek, a stopień tego zjawiska był różny w zależności od badanego szczepu. Ta stosunkowo często obserwowana zdolność szczepów do przylegania do szkła może sugerować, że niekoniecznie badane zjawisko było wynikiem specyficznego wiązania się receptorów bakteryjnych z receptorami komórkowymi, a jedynie efektem bardzo silnych właściwości hydrofobowych badanych szczepów. Najprawdopodobniej była to tzw. adherencja niespecyficzna. Z kolei, adherencja do jednowarstwowych hodowli (ang. monolayer) badanych linii komórkowych Caco-2 i HT-29 była rzadziej spotykana i charakteryzowała się mniejszym nasileniem.

Analizując stopień adherencji badanych szczepów bakterii do obu linii komórkowych, wykazano, że był on porównywalny. Jednakże, niektóre szczepy przylegały lepiej do linii Caco-2 niż do linii HT-29 i odwrotnie. Zauważone różnice we właściwościach determinujących adherencję do jednej z obu linii, mogą sugerować wydzielenie się w obrębie rodzaju *Bifidobacterium* epitopów charakteryzujących się swoistym powinowactwem do różnych komórek ludzkiego organizmu.

W trakcie prowadzonych doświadczeń zaobserwowano także ciekawe zjawisko, mianowicie, do niektórych komórek wchodzących w skład jednowarstwowej hodowli, bakterie przylegały w znacznie większej liczbie, niż do innych. Zważywszy, że hodowla badanych linii komórkowych trwała stosunkowo długo: 15 dni linia Caco-2 i 21 dni linia HT-29, sugeruje to, że adherencja bakterii może zależeć od ekspresji pewnych receptorów powierzchniowych obecnych na komórkach będących w odpowiedniej fazie wzrostu i zróżnicowania.

Bernet i wsp. (1993) wykazali przy pomocy mikroskopu skaningowego, że *Bifidobacterium* adherują do apikalnej powierzchni mikrokosmków rąbka szczoteczkowego (ang. brush border) enterocytów linii Caco-2 oraz do śluzu wydzielanego przez komórki linii HT-29-MTX, będących mutacją linii HT-29 stale produkującą śluz [184, 185]. Uważa się, że bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* mogą przylegać do ludzkich kolonocytów za pomocą struktur powierzchniowych zawierających kwasy teichowe i lipoteichowe związane z peptydoglikanem ściany komórkowej [188]. Adherencja ta jest niezależna od obecności

wapnia i jest kontrolowana przez białkowy czynnik (ang. adhesion-promoting factor). Czynnik ten występuje zarówno w komórkach bakteryjnych, jak i w supernatancie pochodzącym z hodowli *Bifidobacterium*. Brak zdolności do adherowania niektórych szczepów *Bifidobacterium* sugeruje, że czynnik stymulujący adherencję nie wykazuje ekspresji u wszystkich szczepów tego rodzaju [184, 186].

Podsumowując, jako wynik badań nad poznaniem aktywności powierzchniowej szczepów *Bifidobacterium*, zauważono pewną istotną zgodność, a mianowicie, że szczepy które wyjątkowo skutecznie przylegały do badanych linii komórkowych, cechowały się autoaglutynacją, wysoką hydrofobowością powierzchni i dużą produkcją śluzu zewnątrzkomórkowego. Zaobserwowana zależność jest zgodna z wynikami Perez i wsp. (1998), którzy wykazali, że szczepy *Bifidobacterium* dobrze adherujące do komórek nabłonkowych, wykazują dużą hydrofobowość, a tym samym autoaglutynację i hemaglutynację [181].

Przeżycie szczepów *Bifidobacterium* w niekorzystnych warunkach panujących w przewodzie pokarmowym człowieka, zależy od ich fizjologicznej oporności, ale także od gospodarza i od nośnika, z którym zostają one spożyte [197].

Aby szczepy *Bifidobacterium* mogły skutecznie kolonizować jelito, muszą być odporne zarówno na wysokie stężenia kwasów żołądkowych, soli kwasów żółciowych, jak i soku trzustkowego. Tylko szczepy posiadające właściwości probiotyczne są w stanie pokonać naturalne bariery i trwale skolonizować śluzówkę jelit [193, 196, 203].

Clark i wsp. (1993) wykazali, że szczepy *Bifidobacterium* izolowane zarówno ze środowiska zewnętrznego, jak i z naturalnej mikroflory człowieka, generalnie dobrze znoszą niskie pH, ponieważ same bytując w środowisku kwasów mlekowego i octowego wytworzyły mechanizmy przystosowawcze [127]. Wiadomo jest także, że szczepy *Bifidobacterium*, izolowane z organizmu człowieka, potrafią przeżyć w wysokich stężeniach soli kwasów żółciowych, gdyż wydzielają enzym hydrolazę soli żółci (ang. Bile Salt Hydrolase - BSH), który katalizuje hydrolizę glicyny i/lub tauryny z soli kwasów żółciowych i tym samym podnosi oporności tych bakterii na toksyczny poziom soli żółci obecnych w przewodzie pokarmowym [36, 198].

Na podstawie otrzymanych wyników badań przeprowadzonych na sześćdziesięciu dziewięciu szczepach *Bifidobacterium* zauważono, że większość z nich (55%), wykazywała dużą oporność na najwyższe, z zastosowanych, stężenie soli kwasów żółciowych, wynoszące 20 g/l. Wynik ten może świadczyć o doskonałym przystosowaniu się tych bakterii do niesprzyjających warunków panujących w ludzkim przewodzie pokarmowym.

Literatura dotycząca oporności bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* na antybiotyki jest bardzo skąpa, być może ze względu na trudności metodyczne, związane z hodowlą tych bakterii

w warunkach beztlenowych w kwaśnym środowisku lub ze względu na fakt, że bakterie te wchodzą w skład naturalnej flory człowieka i nie stanowią dla niego zagrożenia tak jak inne typowe patogeny.

Jednakże, oporność rodzaju *Bifidobacterium* na antybiotyki jest szczególnie interesująca z racji poznania zmian, jakie mogą zajść w mikroflorze przewodu pokarmowego po zastosowaniu antybiotyków [203]. Drugą istotną korzyścią wynikającą z poznania lekooporności *Bifidobacterium* na chemioterapeutyki, jest możliwość ich wykorzystania przy opracowywaniu nowych wybiórczo-namnażających podłoży wzrostowych, które mogłyby być wykorzystane do izolacji tych bakterii z materiałów biologicznych, z produktów mlecznych lub farmaceutycznych [120]. Przykładem takiego podłoża, niestety o wątpliwych właściwościach, może być agar Wilkins-Chalgren'a zawierający w swoim składzie 100 mg/l mupirocyny [133].

Według danych literaturowych cały rodzaj *Bifidobacterium* jest wrażliwy na penicylinę G, erytromycynę, ampicylinę, bacytracynę, klindamycynę, wankomycynę, linkomycynę, oleandomycynę, chloramfenikol i nitrofurantoinę. Bakterie te są odporne na neomycynę, streptomycynę, gentamycynę, kanamycynę, polimyksynę B, kwas nalidyksowy i w przeciwieństwie do innych bakterii beztlenowych na metronidazol [2, 120, 203, 205].

Badanie lekooporności szczepów *Bifidobacterium* na antybiotyki, a szczególnie jego interpretacja jest dość skomplikowana, gdyż do tej pory brak jest odpowiednich norm przeprowadzania tego typu oznaczeń, oraz interpretacji uzyskanych wyników.

W niniejszej rozprawie, w celu zbadania lekooporności siedemdziesięciu dziewięciu szczepów z rodzaju *Bifidobacterium*, posłużono się metodą dyfuzji krążkowej Kirby'ego i Bauera. Przyjmując arbitralne kryterium interpretacji stref zahamowania wzrostu szczepów *Bifidobacterium* wykazano, że najsilniejsze działanie hamujące miała: penicylina G (10µg), erytromycyna (15µg), cefuroksym (30µg) i wankomycyna (30µg); z kolei słabiej działała: gentamycyna (30µg) i ciprofloksacyna (5µg); najslabiej zaś, bądź wcale nie działały: mupirocyna (5µg) i kotrimoksazol (25µg).

Naturalną konsekwencją doświadczeń nad wyselekcjonowaniem szczepów o wybitnych właściwościach probiotycznych, wykazanych w warunkach *in vitro*, są badania kliniczne, prowadzone albo na zdrowych ochotnikach, albo na grupach osób chorych. Takie badania powinny oczywiście podlegać nowoczesnym zasadom właściwego doboru badanych osób, opierać się na stworzeniu próby podwójnie ślepej oraz podlegać odpowiedniej ocenie statystycznej. W literaturze światowej jest jak dotąd niewiele doniesień opisujących badania kliniczne spełniające te kryteria. Dotyczą one tylko kilku najbardziej znanych szczepów probiotycznych głównie z rodzaju *Lactobacillus*. Dotychczas za w pełni udowodniony uważa się, wpływ *L. rhamnosus* GG na zmniejszenie ryzyka zakażenia rotawirusami oraz na skrócenie

czasu trwania biegunki rotawirusowej u dzieci (niestety na polskim rynku nie są dostępne preparaty zawierające ten szczep) [68, 69, 82].

Chociaż obszar praktycznych zastosowań szczepów probiotycznych w medycynie jest już znaczny i stale się rozszerza, ciągle jeszcze naukowe podstawy stanowiące warunek świadomego, bezpiecznego i skutecznego podawania szczepów *Bifidobacterium* jako środków leczniczych i zapobiegawczych w zakażeniach człowieka są dość słabe.

Można żywić nadzieję, że wyselekcjonowane w toku niniejszej pracy szczepy, posiadające w badaniach *in vitro* wymagane cechy probiotyków, zostaną w przyszłości włączone do badań klinicznych, które zweryfikują ich wartość.

XI. WNIOSKI

1. Najbardziej użyteczną i najlepiej wystandaryzowaną metodą wykorzystaną do identyfikacji gatunkowej bakterii należących do rodzaju *Bifidobacterium* była metoda PCR z zastosowaniem gatunkowo specyficznych starterów komplementarnych do fragmentu podjednostki 16S rRNA.
2. Metoda FISH z wykorzystaniem rodzajowo specyficznej sondy komplementarnej do fragmentu podjednostki 16S rRNA, okazała się skuteczna w identyfikacji *Bifidobacterium*, a także umożliwiła określenie liczby tych bakterii w badanych próbkach kału noworodków.
3. Analiza właściwości antagonistycznych szczepów *Bifidobacterium* wobec drobnoustrojów wskaźnikowych wykazała, że większość szczepów charakteryzowała się bardzo silnym działaniem antagonistycznym względem: *P. acnes* i *C. coli*, średnim lub silnym działaniem wobec: *E. coli*, *S. enteritidis*, *S. sonnei* i *S. aureus*, stosunkowo małą aktywnością względem *E. faecalis* oraz zupełnym brakiem działania na *L. lactis*, przy czym, zakres antagonistycznego działania pojedynczych szczepów *Bifidobacterium* był znacznie zróżnicowany.
4. Tylko nieliczne szczepy, które cechowały się szczególną aktywnością powierzchniową, tj.: zdolnością do autoaglutynacji i zdecydowanie wysoką hydrofobowością powierzchni, jednocześnie produkowały znaczne ilości śluzu i wyjątkowo skutecznie przylegały do ustalonych linii jelitowych: Caco-2 i HT-29.
5. Przyjmując arbitralne kryterium interpretacji stref zahamowania wzrostu wykazano, że wszystkie badane szczepy *Bifidobacterium* były wrażliwe na penicylinę i erytromycynę, natomiast większość była oporna na kotrymoksazol i mupirocymę.
6. Podsumowując, wykazano, że w skład naturalnej mikroflory organizmu ludzkiego wchodzi różne gatunki bakterii należące do rodzaju *Bifidobacterium*, ale tylko nieliczne z pośród przebadanych szczepów posiadały wyraźnie zaznaczające się cechy szczepów probiotycznych, których wartość powinna zostać zweryfikowana we właściwie zaplanowanych badaniach klinicznych.

XII. STRESZCZENIE

Przewód pokarmowy człowieka stanowi bardzo złożony ekosystem, w skład którego wchodzi ponad 400 gatunków bakterii, z których 99% stanowią bakterie bezwzględnie beztlenowe, a tylko 1% to bakterie tlenowe. Bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* dominują w okrężnicy u 1/3 populacji osiągając poziom 10^8 - 10^{12} j.t.k. [j.t.k. - jednostki tworzące kolonie] na gram treści jelitowej.

Rodzaj *Bifidobacterium* należy do beztlenowych, niesporujących laseczek Gram- dodatnich, nie posiadających zdolności poruszania się. Z pośród trzydziestu sześciu poznanych gatunków *Bifidobacterium*, trzynaście wchodzi w skład naturalnej mikroflory organizmu człowieka, kolonizując przede wszystkim przewód pokarmowy, a także jamę ustną i narząd rodny oraz pojawia się w mleku matki i kale niemowląt w kilka dni po porodzie.

Korzystny wpływ bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* na czynność przewodu pokarmowego oraz przemiany ogólnoustrojowe jest szeroko poznany, polega on m.in. na: syntezie krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych oraz witamin, uczestnictwie w procesach trawienia i wchłaniania, ochronie przed patogenami i ich toksynami, pobudzaniu układu immunologicznego oraz działaniu antykancerogennym.

Prowadzone od kilku lat badania wyraźnie wskazują na możliwość wykorzystania szczepów *Bifidobacterium* do odbudowywania, a następnie utrzymywania prawidłowego składu mikroflory w ludzkim przewodzie pokarmowym, zaburzonego działaniem licznych, zewnętrznych i wewnętrznych czynników, takich jak: ostre zakażenia jelitowe (bakteryjne lub wirusowe), środki farmakologiczne, różne postacie stresu, dieta.

Ze względu na zdolność do produkowania aktywnych substancji działających antagonistycznie na bakterie chorobotwórcze, uważa się, że w niedalekiej przyszłości wyselekcjonowane szczepy *Bifidobacterium* mogą stać się naturalną, biologiczną alternatywą dla powszechnego i zbyt szerokiego stosowania antybiotyków, tym bardziej, że preparaty zawierające żywe szczepy bakterii tzw. probiotyki, mogą być przyjmowane bez obaw przedawkowania i wywołania działań niepożądanych.

Przedmiotem przedstawionej pracy było utworzenie dużej kolekcji szczepów z rodzaju *Bifidobacterium* pochodzenia ludzkiego, a następnie, przebadanie poszczególnych szczepów pod względem: przynależności gatunkowej, właściwości antagonistycznych, właściwości powierzchniowych i zdolności do adherencji oraz oporności na sole kwasów żółciowych i na wybrane antybiotyki.

Dzięki wykorzystaniu metody PCR z zastosowaniem gatunkowo specyficznych starterów, komplementarnych do fragmentu podjednostki 16S rRNA dokonano identyfikacji badanych szczepów, klasyfikując je do jednego z sześciu gatunków, najczęściej izolowanych

z przewodu pokarmowego człowieka: *B. longum*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. cathenulatum*.

Z kolei, metoda FISH wykorzystująca rodzajowo specyficzną sondę komplementarną do fragmentu podjednostki 16S rRNA, umożliwiła określenie liczby bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* w badanych próbkach kału, pobranych od noworodków.

W toku przeprowadzonych badań nad właściwościami antagonistycznymi szczepów *Bifidobacterium* wobec drobnoustrojów wskaźnikowych wykazano, że większość z nich charakteryzowała się bardzo silnym działaniem antagonistycznym względem: *P. acnes* i *C. coli*, średnim lub silnym działaniem wobec: *E. coli*, *S. enteritidis*, *S. sonnei* i *S. aureus*, stosunkowo małą aktywnością względem *E. faecalis* oraz zupełnym brakiem działania na *L. lactis*. Wykazano także, że niektóre szczepy *Bifidobacterium* wykazywały wybitne działanie hamujące wobec tylko jednego gatunku bakterii wskaźnikowych, a inne równolegle hamowały wzrost kilku różnych szczepów. Co więcej, zauważono, że poszczególne bakterie wskaźnikowe różniły się pomiędzy sobą wrażliwością na działanie tego samego szczepu *Bifidobacterium* oraz te same szczepy wskaźnikowe były w różnym stopniu wrażliwe na działanie różnych szczepów *Bifidobacterium*.

Oceniając hydrofobowość powierzchni badanych szczepów wykazano, że około jedna czwarta z przebadanej kolekcji bakterii, charakteryzowała się zdolnością do autoaglutynacji oraz agregacją w najniższym z badanych stężeniu siarczanu amonu (0.02 mol/l). Wykazano także, że tylko 2% szczepów z przebadanej kolekcji, nie produkowało zewnątrzkomórkowego śluzu, zaś prawie połowa wytwarzała śluz w umiarkowanej ilości. Jako wynik badań nad aktywnością powierzchniową szczepów *Bifidobacterium*, zauważono pewną istotną zgodność, a mianowicie, szczepy które wyjątkowo skutecznie przylegały do badanych linii komórkowych: Caco-2 i HT-29, cechowały się autoaglutynacją, wysoką hydrofobowością powierzchni i dużą produkcją śluzu.

Badając oporność szczepów *Bifidobacterium* na sole kwasów żółciowych wykazano, że większość z nich, cechowała się dużą opornością na najwyższe z zastosowanych stężeń wynoszące 20 g/l. Wynik ten może świadczyć o doskonałym przystosowaniu się tych bakterii do niesprzyjających warunków panujących w ludzkim przewodzie pokarmowym.

Przy zastosowaniu metody dyfuzji krążkowej Kirby'ego i Bauera zbadano lekooporności szczepów *Bifidobacterium* na wybrane antybiotyki. Przyjmując arbitralne kryterium interpretacji stref zahamowania wzrostu wykazano, że wszystkie badane szczepy *Bifidobacterium* były wrażliwe na penicylinę i erytromycynę, natomiast większość była oporna na kotrymoksazol i mupirocymę.

Podsumowując, w wyniku przeprowadzonych badań wykazano znaczne różnice między szczepami wchodzącymi w skład utworzonej kolekcji.

Można żywić nadzieję, że wyselekcjonowane w toku niniejszej pracy szczepy, najaktywniejsze pod względem przebadanych właściwości, posiadające w badaniach *in vitro* wymagane cechy probiotyków, zostaną w przyszłości włączone do badań klinicznych, które zweryfikują ich wartość.

SUMMARY

The intestinal tract of humans contains a complex bacterial ecosystem, known as the normal flora. The composition of the normal flora plays an important role in human health. These bacteria provide colonization resistance and might stimulate the immune responses to potentially pathogenic microorganisms.

The genus *Bifidobacterium* is one of the most common genera in the human gastrointestinal tract. At present, the genus *Bifidobacterium* includes 36 species, from which 13 were isolated from human faecal samples. Besides, these bacteria colonize various warm-blooded animals and honey bees. They are also found in sewages and human clinical materials. The genus *Bifidobacterium* consists of Gram-positive anaerobes with a variety of rod morphologies. The density of populations of these bacteria in the human gastrointestinal tract is the highest in the colon, where they achieve the level of 10^8 - 10^{12} c.f.u. [c.f.u. - colony forming units] per 1 gram of faeces.

The neonatal period is crucial for intestinal colonization. Infants are sterile and they are an open field for colonization by different types of bacteria. Age, type of delivery and feeding affect the stool flora of young infants. However, bifidobacteria outnumber all other species.

The contribution of these bacteria to good health has been recognized many times. Their role is still under investigation and numerous studies have been carried out to investigate possible probiotic effect of these bacteria.

Probiotic strains are live active bacterial cultures which improve the balance of the gut microflora and have a beneficial effect on the host body. Successful probiotic bacteria are able to survive gastric conditions and colonize the intestine.

Probiotic strains of bifidobacteria are useful in the treatment of disturbed intestinal microflora, which is characteristic of many intestinal disorders, e.g. acute rotaviral diarrhoea, other forms of intestinal dysfunction and colonic disorders. The properties of probiotic strains of bifidobacteria include modification of intestinal microflora and secretion of metabolic products, such as short-chain fatty acids and antimicrobial components.

The aim of this PhD thesis was to create a collection composed of different species of bifidobacteria, to study the selected properties of these strains and to analyse their usefulness as probiotics.

An investigation of 80 human isolates of *Bifidobacterium* and 6 standard collection strains, was carried out. These human strains were isolated mostly from newborn faecal samples. The bifidobacteria were identified using “The numerical phenotyping identification system” and two modern molecular methods: PCR and FISH.

Moreover, the surface properties, which are very important in the first step of colonization of the gastrointestinal tract by these bacteria, were examined. In relation to the above their autoaggregation ability was studied. Also, the slime production and ability to adhere to human enterocyte-like cell lines, called Caco-2 and HT-29 were analysed.

Besides, their antagonistic properties were investigated, i. e. in relation to bacteria which are involved in many intestinal disorders, e.g. diarrhoea, or which colonise the human gastrointestinal tract. These bacteria included: *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Propionibacterium acnes*, *Campylobacter coli* and *Lactobacillus lactis*.

An examination of the bile and antibiotic resistance of the strains from the above collection was also performed.

As a result of this research, a detailed description of the strains collected was produced and a few *Bifidobacterium* strains have been chosen as good candidates for probiotics, but more research, especially clinical, should be done.

XIII. PODŁOŻA MIKROBIOLOGICZNE

1. **Agar BL - Glucose Liver Agar** [127]

Ekstrat mięsny „Lab-Lemko” [Oxoid] 3 g
Pepton proteazowy Nr 3 [Difco] 10 g
Pepton tryptozowy [BBL] 5 g
Pepton sojowy [BBL] 3 g
Ekstrat drożdżowy [Difco] 5 g
Ekstrat z wątroby (patrz poniżej) 150 ml
Glukoza 10 g [Sigma]
Skrobia 6,5 g [Sigma]
Roztwór A (patrz poniżej) 10 ml
Roztwór B (patrz poniżej) 5 ml
Tween 80 1g [Sigma]
Agar [Difco] 15 g
5% roztwór L-cysteina HCL·H₂O [LOBA] 10 ml
Woda destylowana 825 ml
pH 7,2 ± 0,1

Roztwór A (składniki POCH):

MgSO₄·7H₂O 4 g
K₂HPO₄ 10 g
KH₂PO₄ 10 g
Woda destylowana 100ml

Roztwór B (składniki POCH):

NaCl 6,2 g
FeSO₄·7H₂O 6,2 g
MnSO₄·xH₂O 6,2 g
Woda destylowana 100ml

Ekstrat wątroby:

10 g sproszkowanej wątroby rozpuścić w 170 ml wody i inkubować przez godzinę w temperaturze 50-60°C, a następnie zagotować przez 5 minut.

2. **MRS Agar (de Man, Rogosa, Sharpe)** [Oxoid]

Pepton 10g/l
Puder „Lab- Lemco” 8g/l
Ekstrakt z drożdży 5g/l
Glukoza 20 g/l
Tween 80 1 g/l
Cytrynian amonu 2 g/l
Octan amonu 5 g/l
Siarczan magnezu 6,1 g/l
Wodorofosforan potasu 2 g/l
Siarczan manganu 6,05 g/l
Agar 10 g/l
pH 6,1 ± 0,1

3. **Podłoże Columbia Blood Agar** [Oxoid]

Pepton 23 g/l
Skrobia 1 g/l
Chlorek sodowy 5 g/l
Agar 10 g/l
5% odwłóknionej krwi barana
pH 7,3 ± 0,1

4. **Podłoże Mac Conkey’a** [BIOMED]

Pepton 20 g/l
Laktoza 10 g/l

- Chlorek sodowy 5 g/l
Dezoksychloran sodowy 6,9 g/l
Czerwień obojętna 6,03 g/l
Fiolet krystaliczny 6,001 g/l
Agar 10 g/l
pH $7,2 \pm 0,1$
5. **Mueller – Hinton Agar II** [Difco]
Ekstrakt wołowy –2 g/l
Kwaśny hydrolizat kazeiny – 17,5 g/l
Skrobia – 1,5 g/l
Agar nr 1 – 17 g/l
Jony wapnia – 50-100 mg/125
Jony magnezu – 20-35 mg/l
5% odwłóknionej krwi barania
pH $7,3 \pm 0,1$
6. **Campylobacter Agar Base** [Oxoid]
Puder „Lab-Lemco” 10 g/l
Pepton 10 g/l
Chlorek sodu 5 g/l
Agar 12 g/l
5% lizowana krew ludzka
pH $7,5 \pm 0,2$
7. **Casman Medium Base** [Difco]
Pepton 10 g/l
Pepton tryptozowy 10 g/l
Wyciąg mięsny 3 g/l
Kwas nikotynowy 6,05 g/l
Dekstroza 6,5 g/l
Skrobia 1 g/l
Chlorek sodu 5 g/l
Agar 14 g/l
pH $7,3 \pm 0,2$
8. **Schaedler Anaerobe Agar** [Oxoid]
Bulion tryptozowo-sojowy 10 g/l
Pepton specjalny 5g/l
Ekstrakt drożdżowy 5 g/l
Glukoza 5 g/l
Cysteina HCl 6,4 g/l
Hemina 0,01 g/l
Bufor Tris 0,75 g/l
Agar 13,5 g/l
pH $7,6 \pm 0,2$
9. **Tryptic Soy Agar** [DIFCO]
Trypton 15 g/l
Pepton sojowy 5 g/l
Chlorek sodu 5 g/l
Agar 15 g/l
pH $7,3 \pm 0,1$

XIV. WYKAZ PRODUCENTÓW ODCZYNNIKÓW I PODŁOŻY ZASTOSOWANYCH W TEJ PRACY

1. Aura-VF 72 / Włochy
2. Becton Dickinson / USA
3. bioMérieux / Francja
4. BIOMED Lublin/ Polska
5. BIORAD / USA
6. Difco / USA
7. DNA-Gdańsk II / Polska
8. DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen / Niemcy
9. Fluka Biochemica / Szwajcaria
10. Jasco / Polska
11. LOBA / Niemcy
12. Menzel-Glaser / Niemcy
13. MERCK / Niemcy
14. Millipore Corporation / USA
15. MJ Reasearch / USA
16. MWG-Biotech AG / Polska
17. OliGold / Polska
18. Olympus / Japonia
19. Oxoid / Anglia
20. Polmos / Polska
21. Polskie Odczynniki Chemiczne / Polska
22. Roche Diagnostic / Szwajcaria
23. SERVA / Niemcy
24. SIGMA / USA
25. TIB MOLBIOL / Polska

XV. SPIS TABEL I RYCIN

XV. 1. TABELE

- Tabela 1: Materiały biologiczne, z których wyizolowano trzynaście gatunków *Bifidobacterium* kolonizujących organizm człowieka.
- Tabela 2: Występowanie bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* w organizmie człowieka.
- Tabela 3: Występowanie gatunków *Bifidobacterium* w ludzkiej okrężnicy w zależności od wieku.
- Tabela 4: Kolonizacja ośmiu pacjentek i ich dzieci przez bakterie z rodzaju *Bifidobacterium*.
- Tabela 5: Pochodzenie szczepów bakterii należących do rodzaju *Bifidobacterium* wchodzących w skład utworzonej kolekcji.
- Tabela 6: Gatunkowo specyficzne startery komplementarne do fragmentu podjednostki 16S rRNA dla sześciu gatunków *Bifidobacterium*, najczęściej kolonizujących przewód pokarmowy człowieka.
- Tabela 7: Identyfikacja przykładowych szczepów *Bifidobacterium* uzyskana przy pomocy zestawu API 20A [bioMérieux].
- Tabela 8: Wyniki uzyskane z testu API 50 CH [bioMérieux] dla sześciu wzorcowych szczepów *Bifidobacterium*, wykorzystane do identyfikacji przeprowadzanej przy pomocy programu komputerowego „The numerical phenotypic identification system” dostępnego przez Internet (<http://kounou.lille.inra.fr>).
- Tabela 9: Wyniki uzyskane z testu rapid ID 32A [bioMérieux] dla sześciu wzorcowych szczepów *Bifidobacterium* wykorzystane do identyfikacji przeprowadzanej przy pomocy programu komputerowego „The numerical phenotypic identification system” dostępnego przez Internet (<http://kounou.lille.inra.fr>).
- Tabela 10: Identyfikacja przykładowych szczepów *Bifidobacterium* uzyskana przy pomocy zestawu Anaerobe ID Kit wchodzącego w skład BBL Cristal Identification System [Becton Dickinson].
- Tabela 11: Wyniki gatunkowej identyfikacji dla pięćdziesięciu jeden szczepów bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*, przeprowadzonej przy pomocy metody PCR z zastosowaniem gatunkowo specyficznych starterów komplementarnych do fragmentu podjednostki 16S rRNA.
- Tabela 12: Produkty metabolizmu bakterii fermentacji mlekowej o aktywności przeciwdrobnoustrojowej.
- Tabela 13: Aktywność antagonistyczna badanych szczepów z rodzaju *Bifidobacterium* wobec szczepów wskaźnikowych.
- Tabela 14: Antagonistyczne działanie badanych szczepów *Bifidobacterium* względem bakterii wskaźnikowych - podział ze względu na wielkość stref zahamowania wzrostu.

- Tabela 15: Legenda oceny stopnia przylegania bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* do linii komórkowych Caco-2 i HT-29.
- Tabela 16: Właściwości powierzchniowe szczepów *Bifidobacterium*, w tym: produkcja śluzu, autoaglutynacja, agregacja w roztworach siarczanu amonu oraz adherencja do linii komórkowych Caco-2 i HT-29.
- Tabela 17: Tabela przedstawiająca wartość najwyższego z testowanych stężenia soli żółci [g/l], nie powodującego zahamowania wzrostu badanych szczepów bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*.
- Tabela 18: Oporność badanych szczepów *Bifidobacterium* na wybrane antybiotyki, wykazana za pomocą metody dyfuzji krążkowej Kirby'ego i Bauera.
- Tabela 19: Działanie ośmiu wybranych antybiotyków na szczepy *Bifidobacterium* - podział ze względu na wielkość średnicy strefy zahamowania wzrostu.

XV. 2. RYCINY

- Ryc. 1: Schemat dominujących grup bakterii jelitowych o potencjalnie szkodliwym lub korzystnym oddziaływaniu.
- Ryc 2: Przykład wzrostu bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* w płynnym podłożu BL - Glucose Liver.
- Ryc. 3: Przykład wzrostu bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* na stałym podłożu BL - Glucose Liver Agar.
- Ryc. 4 - 9: Obraz mikroskopowy szczepów wzorcowych reprezentujących rodzaj *Bifidobacterium*: **4** - *B. adolescentis* 20083 DSMZ, **5** - *B. animalis* 20104 DSMZ, **6** - *B. breve* 20213 DSMZ, **7** - *B. longum* 20219 DSMZ, **8** - *B. bifidum* 20456 DSMZ, **9** - *B. gallinarum* 20670 DSMZ.
- Ryc. 10: Zestaw API 50 CH [bioMérieux].
- Ryc. 11: Zestaw API 20A [bioMérieux].
- Ryc. 12: Zestaw rapid ID 32A [bioMérieux].
- Ryc. 13: Program komputerowy „The numerical phenotypic identification system” dostępny przez Internet (<http://kounou.lille.inra.fr>), wykorzystywany w identyfikacji gatunkowej bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*.
- Ryc. 14: Zestaw Anaerobe ID Kit wchodzący w skład systemu BBL Cristal Microbial Identyfikation [Becton Dickinson].
- Ryc. 15: Wynik przykładowej elektroforezy (1% żel agarozowy, czas 1.5 godz, napięcie 80V) przeprowadzonej w celu potwierdzenia prawidłowej izolacji DNA wykonanej przy użyciu mikrokolumnienek.
- Ryc. 16: Rozkład widma gęstości optycznej genomowego DNA wyizolowanego metodą według Gevers'a.

- Ryc. 17: Identyfikacja gatunkowa *B. bifidum* przeprowadzona przy pomocy reakcji PCR z wykorzystaniem gatunkowo specyficznych starterów (BiBIF-1, BiBIF-2) komplementarnych do fragmentu podjednostki 16S rRNA.
- Ryc. 18: Udział procentowy sześciu gatunków *Bifidobacterium* w utworzonej kolekcji. Identyfikacja gatunkowa przeprowadzona przy pomocy reakcji PCR z wykorzystaniem gatunkowo specyficznych starterów komplementarnych do fragmentu podjednostki 16S rRNA.
- Ryc. 19: Identyfikacja bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* za pomocą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) z wykorzystaniem rodzajowo specyficznej sondy Bif 164 komplementarnej do fragmentu podjednostki 16S rRNA.
- Ryc. 20: Działanie antagonistyczne badanych szczepów z rodzaju *Bifidobacterium* względem szczepu wskaźnikowego *Escherichia coli*.
- Ryc. 21: Działanie antagonistyczne badanych szczepów z rodzaju *Bifidobacterium* względem szczepu wskaźnikowego *Shigella sonnei*.
- Ryc. 22: Działanie antagonistyczne badanych szczepów z rodzaju *Bifidobacterium* względem szczepu wskaźnikowego *Salmonella enteritidis*.
- Ryc. 23: Działanie antagonistyczne badanych szczepów z rodzaju *Bifidobacterium* względem szczepu wskaźnikowego *Staphylococcus aureus*.
- Ryc. 24: Działanie antagonistyczne badanych szczepów z rodzaju *Bifidobacterium* względem szczepu wskaźnikowego *Enterococcus faecalis*.
- Ryc. 25: Działanie antagonistyczne badanych szczepów z rodzaju *Bifidobacterium* względem szczepu wskaźnikowego *Propionibacterium acnes*.
- Ryc. 26: Działanie antagonistyczne badanych szczepów z rodzaju *Bifidobacterium* względem szczepu wskaźnikowego *Campylobacter coli*.
- Ryc. 27: Działanie antagonistyczne badanych szczepów z rodzaju *Bifidobacterium* względem szczepu wskaźnikowego *Lactobacillus lactis*.
- Ryc. 28: Działanie antagonistyczne poszczególnych szczepów z rodzaju *Bifidobacterium*, wchodzących w skład utworzonej kolekcji, względem ośmiu szczepów bakterii wskaźnikowych (*E. coli*, *S. sonnei*, *S. enteritidis*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. acnes*, *C. coli*, *L. lactis*).
- Ryc. 29: Przykład antagonistycznego działania szczepów *Bifidobacterium* względem szczepu *E. coli* wykazany metodą słupkową.
- Ryc. 30: Przykład antagonistycznego działania szczepów *Bifidobacterium* względem *Shigella sonnei* wykazany metodą słupkową.
- Ryc. 31: Przykład antagonistycznego działania szczepów *Bifidobacterium* względem *Salmonella enteritidis* wykazany metodą słupkową.
- Ryc. 32: Przykład antagonistycznego działania szczepów *Bifidobacterium* względem *Enterococcus faecalis* wykazany metodą słupkową.

- Ryc. 33: Przykład antagonistycznego działania szczepów *Bifidobacterium* względem *Staphylococcus aureus* wykazany metodą słupkową.
- Ryc. 34: Przykład antagonistycznego działania szczepów *Bifidobacterium* względem *Propionibacterium acnes* wykazany metodą słupkową.
- Ryc. 35: Przykład antagonistycznego działania szczepów *Bifidobacterium* względem *Campylobacter coli* wykazany metodą słupkową.
- Ryc. 36: Przykład antagonistycznego działania szczepów *Bifidobacterium* względem *Lactobacillus lactis* wykazany metodą słupkową.
- Ryc. 37: Struktura peptydoglikanu gatunku *Bifidobacterium bifidum*.
- Ryc. 38: Porównanie zdolności do agregacji w roztworach siarczanu amonu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ badanych szczepów z rodzaju *Bifidobacterium*.
- Ryc. 39: Porównanie produkcji śluzu przez badane szczepy z rodzaju *Bifidobacterium*.
- Ryc. 40: Porównanie zdolności do przylegania (adherencji) badanych szczepów z rodzaju *Bifidobacterium* do dwóch linii komórkowych: Caco-2 i HT-29.
- Ryc. 41: Stopień aktywności powierzchniowej poszczególnych szczepów *Bifidobacterium*, wchodzących w skład utworzonej kolekcji.
- Ryc. 42: Obraz mikroskopowy testu wykazującego zdolność bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* do autoaglutynacji w 0,9% roztworze NaCl.
- Ryc. 43: Przykładowe wyniki z testu określającego produkcję śluzu (ang. slime) przez bakterie z rodzaju *Bifidobacterium*.
- Ryc. 44: Przyleganie (adherencja) wybranych szczepów *Bifidobacterium* do linii komórkowych ludzkiego raka okrężnicy o morfologii epitelialnej.
- Ryc. 45: Oporność szczepów *Bifidobacterium* na działanie soli kwasów żółciowych w następujących stężeniach: 1, 2, 5, 10, 20 [g/l].
- Ryc. 46: Porównanie oporności testowanych szczepów bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*, względem soli kwasów żółciowych w następujących stężeniach: 1, 2, 5, 10, 20 [g/l].
- Ryc. 47: Działanie penicyliny G (10 µl) na szczepy bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*.
- Ryc. 48: Działanie erytromycyny (15 µl) na szczepy bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*.
- Ryc. 49: Działanie cefuroksymu (30 µl) na szczepy bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*.
- Ryc. 50: Działanie gentamycyny (10 µl) na szczepy bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*.
- Ryc. 51: Działanie ciprofloksacyny (5 µl) na szczepy bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*.
- Ryc. 52: Działanie wankomycyny (30 µl) na szczepy bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*.

- Ryc. 53: Działanie mupirocyny (5 μ l) na szczepy bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*.
- Ryc. 54: Działanie kotrymoksazolu (25 μ l) na szczepy bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*.
- Ryc. 55: Wykres przedstawiający działanie ośmiu zastosowanych antybiotyków na szczepy *Bifidobacterium* - podział ze względu na wielkość średnicy strefy zahamowania wzrostu.
- Ryc. 56: Analiza statystyczna hamującego działania ośmiu zastosowanych antybiotyków na wzrost szczepów *Bifidobacterium*.
- Ryc. 57: Sumaryczne działanie ośmiu wybranych antybiotyków na poszczególne szczepy bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* wchodzące w skład utworzonej kolekcji.
- Ryc. 58: Przykładowe wyniki z testu określającego wrażliwość szczepów z rodzaju *Bifidobacterium* na sole kwasów żółciowych.
- Ryc. 59: Oznaczanie oporności wybranego szczepu *Bifidobacterium* względem ośmiu testowanych antybiotyków przy pomocy metody dyfuzji krążkowej Kirby'ego i Bauera.

XVI. PIŚMIENNICTWO

1. **Poupard J.A., Husain I., Norris R.F.:** Biology of the bifidobacteria. *Bacteriol. Rev.* 1973, 6: 136-165.
2. **Scardovi V.:** Genus *Bifidobacterium*. W: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Red. Sneath P., Williams and Wilkins, Wyd. 9, Baltimore, USA 1986, 1418-1434.
3. **Kim H.S.:** Characterization of lactobacilli and bifidobacteria as applied to dietary adjuncts. *Cult. Daily Prod. J.* 1988, 8: 6-9.
4. **Mackie R.I., White B.A.:** Gastrointestinal microbiology. Vol.1. Gastrointestinal ecosystems and fermentations. Vol. 2. Gastrointestinal microbes and host reactions. *International Thomson Publishing, Chapman and Hall Microbiology Series*, New York, USA 1997, 3-27 i 501-526.
5. **Noble W.C., Wade W.G.:** *Propionibacterium, Bifidobacterium* and related organisms. Vol. 2: Systematic bacteriology. Collier L., Balows A., Sussman M., W: Microbiology and microbial infections. Red. Balows A., Duerden B.I., Topley & Wilson's, Oxford University Press, Inc., New York, USA 1998, 520-525.
6. **Gavini F., Pourcher A.M., Neut C., Monget D., Romond C., Oger C., Izard D.:** Phenotypic differentiation of bifidobacteria of human and animal origins. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1991, 41: 548-557.
7. **Bibiloni R., Perez P.F., Antoni G.L.:** An enzymatic - colorimetric assay for the quantification of *Bifidobacterium*. *J. Food Protect.* 2000, 63: 322-326.
8. **Gibson G.R., Wang X.:** Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 1994, 77: 412-420.
9. **Axelsson L.:** Lactic Acid Bacteria: classification and physiology. W: Lactic Acid Bacteria. Microbiology and Functional Aspects. Red. Salminen S., Eriqht A., Marcel Dekker, Inc., Wyd. 2, New York, USA 1998, 1-72.
10. **Reuter G.:** Vergleichende Untersuchungen über die Bifidus-flora im Säuglings und Erwachsenenstuhl. *Zentralbl. Bacteriol. Parasitendk. Infektionskr. Hyg.* 1963, 191: 486-507.
11. **Scardovi V., Crociani F.:** *Bifidobacterium cetenum*, *Bifidobacterium dentium*, and *Bifidobacterium angulatum*: three new species and their deoxyribonucleic acid homology relationships. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1974, 24: 6-20.
12. **Orla-Jensen S.:** La classification des bacteries lactiques. *Lait.* 1924, 4: 468-474.
13. **Crociani F., Biavati B., Alessandrini A., Chiarini C., Scardovi V.:** *Bifidobacterium inopinatum* sp. nov. and *Bifidobacterium denticolens* sp. nov., two new species isolated from human dental caries. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1996, 46: 564-571.
14. **Lauer E.:** *Bifidobacterium gallicum* sp. nov. isolated from human faeces. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1990, 40: 100-102.
15. **Scardovi V., Trovatielli L.D., Biavati B., Zani G.:** *Bifidobacterium cuniculi*, *Bifidobacterium choerinum*, *Bifidobacterium boum*, and *Bifidobacterium pseudocatenulatum*: four new species and their deoxyribonucleic acid homology relationships. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1979, 29: 291-311.
16. **Hoyle L., Inganas E., Falsen E., Drancourt M., Weiss N., McCartney A.L., Collins M.D.:** *Bifidobacterium scardovii* sp. nov., from human sources. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2002, 52: 995-999.
17. **Meile L., Ludwig W., Rueger U., Gut C., Kaufmann P., Dasen G., Wenger S., Teuber M.:** *Bifidobacterium lactis* sp. nov., a moderately oxygen tolerant species isolated from fermented milk. *Syst. Appl. Microbiol.* 1997, 20: 57-64.
18. **Ventura M., Zink R.:** Rapid identification, differentiation, and proposed new taxonomic classification of *Bifidobacterium lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002, 68: 6429-6434.
19. **Dong X., Xin Y., Jian W., Liu X., Ling D.:** *Bifidobacterium thermacidophilum* sp. nov., isolated from an anaerobic digester. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2000, 50: 119-125.

20. **Mitsuoka T.:** Vergleichende Untersuchungen über die Bifidobakterien aus dem Verdauungstrakt von Menschen und Tieren. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Orig. Abt.* 1969, 210: 52-64.
21. **Scardovi V., Trovatielli L. D.:** New species of bifidobacteria from *Apis mellifica* L. and *Apis indica* F. A contribution to the taxonomy and biochemistry of the genus *Bifidobacterium*. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr.* 1969, 123: 64-88.
22. **Watabe J., Benno Y., Mitsuoka T.:** *Bifidobacterium gallinarum* sp. nov.: a new species isolated from ceca of chickens. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1983, 33: 127-132.
23. **Scardovi V., Zani G.:** *Bifidobacterium magnum* sp. nov., a large acidophilic *Bifidobacterium* isolated from rabbit faeces. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1974, 24: 29-34.
24. **Biavati B., Mattarelli P.:** *Bifidobacterium ruminantium* sp. nov. and *Bifidobacterium merycicum* sp. nov. from the rumen of cattle. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1991, 41: 163-168.
25. **Scardovi V., Trovatielli L.D., Crociani F., Sgorbai B.:** Bifidobacteria in bovine rumen. New species of the genus *Bifidobacterium*: *B. globosum* n. sp. and *B. ruminale* n. sp. *Arch. Microbiol.* 1969, 68: 278-294.
26. **Simpson P.J., Ross R.P., Fitzgerald G.F., Stanton C.:** *Bifidobacterium psychraerophilum* sp. nov. and *Aeriscardovia aeriphila* gen. nov., sp. nov., isolated from a porcine caecum. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2004, 54: 401-406.
27. **Trovatielli L.D., Crociani F., Pedinotti M., Scardovi V.:** *Bifidobacterium pullorum* sp. nov.: a new species isolated from chicken faeces and a related group of bifidobacteria isolated from rabbit faeces. *Arch. Microbiol.* 1974, 98: 187-198.
28. **Biavati B., Mattarelli P., Crociani F.:** *Bifidobacterium saeculare*: a new species isolated from faeces of rabbit. *System. Appl. Microbiol.* 1991, 14: 389-392.
29. **Matteuzzi D., Crociani F., Zani G., Trovatielli L.D.:** *Bifidobacterium suis* sp.: a new species of the genus *Bifidobacterium* isolated from pig faeces. *Z. Allg. Mikrobiol.* 1971, 11: 387-395.
30. **Zhu L., Li W., Dong X.:** Species identification of genus *Bifidobacterium* based on partial HSP60 gene sequences and proposal of *Bifidobacterium thermacidophilum* subsp. *porcinum* subsp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2003, 53:1619-623.
31. **Roberts A.K.:** Bifidobacteria. W: Anaerobes in human disease. Red. Duerdon B.I., Drasar B.S., Wiley, John & Sons, Inc., New York, USA 1991, 152-161.
32. **Mitsuoka T., Kaneuchi C.:** Ecology of bifidobacteria. *Am. J. Clin. Nutr.* 1977, 30: 1799- 1810.
33. **Walker T.S.:** Microbiology. *W.B. Saunders Company.* 1998, 285-288.
34. **Salminen S., Bouley C., Boutronault-Ruault M., Cummins J., Franck A., Gibson G.R., Isolauri E., Moreau M., Roberfroid M., Rowland I.:** Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br. J. Nutr.* 1998, 80: 147-171.
35. **Tanaka N., Kubo K., Shiraki K., Koishi H., Yoshimura H.:** A pilot study on protein metabolism in Papua New Guinea highlanders. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 1980, 26: 247-259.
36. **Tannock G.W.:** Medical importance of the normal microflora. *Kluwer Academic Publishers*, Great Britain, 1999, 312-331 i 487-506.
37. **Petschow B.W., Talbott R.D.:** Response of *Bifidobacterium* species to growth promoters in human and cow milk. *Pediatr. Res.* 1991, 29: 208-213.
38. **Schlegel H.G.:** Mikrobiologia ogólna. *PWN*, Warszawa, 1996, 344-351.
39. **De Vries W., Stouthamer A.H.:** Factors determining the degree of anaerobiosis of *Bifidobacterium* strains. *Arch. Mikrobiol.* 1969, 65: 275.
40. **Hiller S.H., Moncla B.J.:** *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Eubacterium*, and other nonsporeforming anaerobic Gram-positive bacteria. W: Manual of clinical microbiology. Red. Murray P.R., *ASM Press, D.C.*, Washington, USA 1995, 587-600.
41. **Chevalier P., Roy D., Ward P.:** Detection of *Bifidobacterium* species by enzymatic methods. *J. Appl. Microbiol.* 1990, 68: 619-624.
42. **Kunicki-Goldfinger W.:** Życie bakterii. *PWN*, Wyd. IV, Warszawa 1994, 71-96.

43. **Jawetz E., Melnick J.L., Adelberg E.A.:** Przegląd mikrobiologii lekarskiej. *PZWL*, Wyd. II, Warszawa 1991, 54-56.
44. **Scardovi V., Trovatielli G., Zani G., Crociani F., Matteuzzi D.:** Deoxyribonucleic acid homology relationships among species of the genus *Bifidobacterium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1971, 21: 276-293.
45. **Collier L., Balows A., Sussman M.:** Microbiology and microbial infections. W: Systematic bacteriology. Red. Balows A., Duerden B.I., *Topley & Wilson's, Oxford University Press, Inc.*, Wyd. 9, New York, USA 1998, Vol 2, 152-161.
46. **Bourget N., Simonet J.M., Decaris B.:** Analysis of the genome of the five *Bifidobacterium breve* strains: plasmid content, pulsed-field gel electrophoresis genom size estimation and rrn loci number. *FEMS Microbiol. Lett.* 1993, 110: 11-20.
47. **O'Riordan K., Fitzgerald G.F.:** Determination of genetic diversity within the genus *Bifidobacterium* and estimation of chromosomal size. *FEMS Microbiol. Lett.* 1997, 156: 259-264.
48. **Schell M.A., Karmirantzou M., Snel B., Vilanova D., Berger B., Pessi G., Zwahlen M.C., Bork P., Delley M., Pridmore R.D., Arigoni F.:** The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *PNAS*, 2002, 99: 14422-14427.
49. **Sgorbati B., Scardovi V., Leblanc D.:** Plasmids in the genus *Bifidobacterium*. *J. Gen. Microbiol.* 1982, 128: 2121-2131.
50. **Park M.S., Shin D.W., Lee K.H., Ji G.E.:** Sequence analysis of plasmid pKJ50 from *Bifidobacterium longum*. *Microbiol.* 1999, 145: 585-592.
51. **Iwata M., Morishita T.:** The presence of plasmids in *Bifidobacterium breve*. *Lett. Appl. Microbiol.* 1989, 9: 165-168.
52. **Szajewska H., Albrecht P.:** Probiotyki. *Ped. Pol.* 1997, 72: 535-539.
53. **Madsen S.M., Arnau J., Vrang A., Givskov M., Israelsen H.:** Molecular characterization of the pH-inducible and growth phase-dependent promoter P170 of *Lactococcus lactis*. *Mol. Microbiol.* 1999, 32: 75-87.
54. **Salminen S., Deighton M.:** Lactic acid bacteria in the gut in normal and disordered states. *Dig. Dis.* 1992, 10: 227-238.
55. **Salminen S., Deighton M., Gorbach S.:** Lactic acid bacteria in health and disease. W: Lactic Acid Bacteria. Red. S. Salminen, A. von Wright, *Marcel Dekker, Inc.*, New York, USA 1993, 199-226.
56. **Pybus V., Ordendonk AB.:** The effect of growth and succinate production by *Prevotella bivia*. *Microb. Ecol. Health Dis.* 1996, 9: 19-25.
57. **Meghrou J., Euloge P., Junelles A.M., Ballongue J., Petitdemange H.:** Screening of *Bifidobacterium* strains for bacteriocin production. *Biotechnol. Lett.* 1990, 12: 575-580.
58. **Ballongue J., Grill J.P., Baratte-Euloge P.:** Action sur la flore intestinale de laits fermentes au *Bifidobacterium*. *Lait.* 1993, 73: 249-256.
59. **Sokolnicka I.:** Znaczenie endogennej mikroflory bakteryjnej przewodu pokarmowego dla układu odpornościowego. *Pol. J. Immunol.* 1994, 19: 251-261.
60. **Miller T.L., Wolin M.J.:** Pathways of acetate, propionate, and butyrate formation by the human faecal microbial flora. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996, 62: 1589-1592.
61. **Brand-Miller J.C., McVeagh P., McNeil Y., Messer M.:** Digestion of human milk oligosaccharides by healthy infants evaluated by the lactulose hydrogen breath test. *J. Pediatr.* 1998, 133: 95-98.
62. **Jenkins D.J.A., Kendall C.W.C., Vuksan V.:** Inulin, oligofructose and intestinal function. *J. Nutr.* 1999, 129: 1431-1433.
63. **Deguchi Y., Morishita T., Mutai M.:** Comparative studies on synthesis of water-soluble vitamins among human species of bifidobacteria. *Agric. Biol. Chem.* 1985, 49:13-19.
64. **Noda H., Akasaka N., Ohsugi M.:** Biotin Production by Bifidobacteria. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 1994, 40: 181-188.

65. **Arunachalam K.D.:** Role of the bifidobacteria in nutrition, medicine and technology. *Nutr. Res.* 1999, 19: 1559-1597.
66. **Gorbach S.L.:** Lactic acid bacteria in human health. *Ann. Med.* 1990, 22: 37-41.
67. **Sokolnicka I.:** Wpływ probiotyków na układ odpornościowy. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2000, 68: 471-477.
68. **Salminen S.:** Uniques of probiotic strains. *Nutr. Newslett. IDF.* 1996, 145: 18-19.
69. **Salminen S., Isolauri E., Salminen E.:** Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1996, 70: 347-358.
70. **Reid G., Bruce A.W., McGroarty J.A., Cheng K.J., Costerton J.W.:** Is there a role for lactobacilli in prevention of urogenital and intestinal infections? *Clin. Microbiol.* 1990, 4: 335-344.
71. **Sansonetti P.J.:** Bacterial pathogens, from adherence to invasion: comparative strategies. *Med. Microbiol. Immunol.* 1993, 182: 223-232.
72. **Valraeds M., Mei H., Reid G., Busscher H.:** Inhibition of initial adhesion of uropathogenic *Enterococcus faecalis* by biosurfactants from *Lactobacillus* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996, 62: 1958-1963.
73. **Walker W.A., Duffy L.C.:** Diet and bacterial colonization: Role of probiotics and prebiotics. *J. Nutr. Biochemistry* 1998, 9: 668-675.
74. **O'Sullivan M.G., Thorton G.:** Probiotic bacteria: myth or reality? *Trends Food Sci. Technol.* 1992, 12: 309-314.
75. **Lee Y.K., Salminen S.:** The coming of age of probiotics. *Trends Food Sci. Technol.* 1995, 6: 241-245.
76. **Collins M.D., Gibson G.R.:** Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *Am. J. Clin. Nutr.* 1999, 69: 1052-1057.
77. **Bouhnik Y., Flourie B., D'Agay-Abensour L., Pochart P., Gremet G., Durand M.:** Administration of transgalacto-oligosaccharides increases faecal bifidobacteria and modifies colonic fermentation metabolism in healthy humans. *J. Nutr.* 1997, 127: 444-448.
78. **Crittenden R., Laitila A., Forsell P., Saarela M., Mattila-Sandholm T., Myllarinen P.:** Adhesion of bifidobacteria to granular starch and its implications in probiotic technologies. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001, 67: 3469-3475.
79. **Cummings J.H., Macfarlane G.T., Englyst H.N.:** Prebiotic digestion and fermentation. *Am. J. Clin. Nutr.* 2001, 73: 415-420.
80. **Schrezenmeir J., De Vrese M.:** Probiotics, prebiotics, and synbiotics - approaching a definition. *Am. J. Clin. Nutr.* 2001, 73: 361-364.
81. **Hozyasz K.:** Probiotyki i prebiotyki – nowe propozycje w żywieniu niemowląt. *Nowa Ped.* 2004, 35: 24-27.
82. **Wysocka M.:** Probiotyki - nowe, obiecujące zastosowania w terapii. *Nowa Ped.* 2001, 26: 6-11.
83. **Döderlein A.:** Das Scheidensekret und seine Bedeutung für das Puerperalfieber. *Zbl. Bakteriolog.* 1892, 11: 699-700.
84. **Metchnikoff E.:** Prolongation of life. *Putnam*, New York, USA 1908.
85. **Fuller R.:** Probiotics in human medicine. *Gut.* 1991, 32: 439-442.
86. **Fuller R., Gibson G.R.:** Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics. *Scand. J. Gastroenterol.* 1997, 32: 28-31.
87. **Fuller R., Gibson G.R.:** Probiotics and prebiotics: microflora management for improved gut health. *Clin. Microb. Infection.* 1998, 4: 477-480.
88. **Goldin B.R.:** Health benefits of probiotics. *Br. J. Nutr.* 1998, 80: 203-207.
89. **Stackebrandt E., Goodfellow M.:** Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. *Wiley, John & Sons, Inc.*, New York, USA 1991, 205-248.
90. **Bezkorovainy A.:** Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. *Am. J. Clin. Nutr.* 2001, 73: 399-405.

91. **Dunne C., Mahony L., Murphy L., Thorton G., Morrissey D., Halloran S., Feeney M., Flynn S., Fitzgerald G., Daly C., Kiely B., O'Sullivan G., Shanahan F., Collins K.:** *In vitro* selection criteria for probiotics bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. *Am J. Clin. Nutr.* 2001, 73: 386-392.
92. **Saarela M., Lahteenmaki L., Crittenden R., Salminen S., Mattila-Sandholm T.:** Gut bacteria and health food - the European perspective. *Int. J. Food Microbiol.* 2002, 78: 99-117.
93. **Kirjavainen P.V., Ouwehand A.C., Isolauri E., Salminen S.J.:** The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. *FEMS Mikrobiol. Lett.* 1998, 167: 185-189.
94. **Strus M., Heczko B.P.:** Ocena właściwości probiotycznych bakterii kwasu mlekowego. *Przegl. Ped.* 2000, 30: 65-69.
95. **Wright A., Vilpponen-Salmela, Pages-Lopis M., Collins K., Kiely B., Shanahan F., Dunne C.:** The survival and colonic adhesion of *Bifidobacterium infantis* in patients with ulcerative colitis. *Int. Dairy J.* 2002, 12: 197-200.
96. **Socha J., Madaliński K., Stolarczyk A.:** Probiotyki w chorobach przewodu pokarmowego i ich działanie immunomodulujące. *Przegl. Ped.* 2000, 30: 137-140.
97. **Yamazaki S., Machii K., Tsuyuki S., Momose H., Kawashima T., Ueda K.:** Immunological responses to monoassociated *Bifidobacterium longum* and their relation to prevention of bacterial invasion. *Immunol.* 1985, 56: 43-50.
98. **Bengmark S.:** Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. *Gut.* 1998, 42: 2-7.
99. **Saavedra J.M., Bauman N.A., Oung I., Perman J.A., Yolken R.H.:** Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *Lancet.* 1994, 344: 1046-1049.
100. **Dembele T., Obdrzalek V., Votava M.:** Inhibition of bacterial pathogens by lactobacilli. *Zbl. Bakteriologie.* 1998, 288: 395-401.
101. **Nosova T., Jousimies-Somer H., Jokelainen K., Heine R., Salaspuro M.:** Acetaldehyde production and metabolism by human indigenous and probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *Alcohol. Alcohol.* 2000, 35: 561-568.
102. **Gomes A.M.P., Malcata F.X.:** *Bifidobacterium* sp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends Food Science. Technol.* 1999, 10: 139-157.
103. **Conway P.:** Lactobacilli: fact and fiction. W: The regulatory and protective role of the normal microflora. Red. Grun R., Midvedt T., Norin E., *Stockton Press*, New York, USA 1988, 263-281.
104. **Klaver F.A., Van der Meer R.:** The assumed assimilation of cholesterol by lactobacilli and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt-deconjugating activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 1993, 59: 1120-1124.
105. **Passerat B., Desmaison A.M., Conferences M.:** Lactase activity of *Bifidobacterium bifidum*. *Nutr. Res.* 1995, 15: 1287-1295.
106. **Elmer G.W., Surawicz C.M., McFarland L.V.:** Biotherapeutic agents. A neglected modality for the treatment and prevention of selected intestinal and vaginal infections. *J. Am. Med. Assoc.* 1996, 275: 870-876.
107. **Danysz A.:** Probioza w zapobieganiu i leczeniu niektórych chorób przewodu pokarmowego. *Farm. Pol.* 1997, 53: 4.
108. **Strus M.:** Znaczenie bakterii kwasu mlekowego w leczeniu i profilaktyce schorzeń przewodu pokarmowego. *Post. Hig. Med. Doś.* 1997, 51: 605-619.
109. **Ochmański W., Barabasz W.:** Probiotyki oraz ich terapeutyczne właściwości. *Przegl. Lek.* 1999, 56: 3-4.
110. **Uhlemann M., Heine W., Mohr C., Plath C., Pap S.:** Wirkungen oral verabreichter Bifidobakterien auf die intestinale Mikroflora von Fröh- und Neugeborenen. *Z. Geburtshilfe. Neonatol.* 1999, 203: 213-217.
111. **Isolauri E.:** The role of probiotics in paediatrics. *Curr. Pediatr.* 2004, 14: 104-109.

112. **Isolauri E., Salminen S., Ouwehand A.:** Probiotics. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 2004, 18: 299-313.
113. **Klein G., Pack A., Bonaparte C., Reuter G.:** Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 1998, 41: 103-125.
114. **Holzapfel W.H., Haberer P., Geisen R., Bjorkroth J., Schillinger U.:** Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 2001, 73: 365-373.
115. **Collins E.B., Hall B.J.:** Growth of bifidobacteria in milk and preparation of *Bifidobacterium infantis* for a dietary adjunct. *J. Dairy Sci.* 1983, 67: 1376-1380.
116. **Kitajima H., Sumida Y., Tanaka R., Yuki N., Takayama H., Fujimura M.:** Early administration of *Bifidobacterium breve* to preterm infants: randomised controlled trial. *Arch. Dis. Child. Fetal. Neonatal.* 1997, 76: 101-107.
117. Indeks leków medycyny praktycznej. *Med. Prakt.*, Warszawa, 2005, 359-360.
118. **Nolte W.A.:** Oral microbiology with basic microbiology and immunology. *The C.V. Mosby Company*, Saint Louis, USA 1977, 337.
119. **Hoy C.M., Wood C.M., Hawkey P.M., Puntis J.W.:** Duodenal microflora in very-low- birth-weight neonates and relation to necrotizing enterocolitis. *J. Clin. Microbiol.* 2000, 68: 4539-4547.
120. **Ballongue J.:** Bifidobacteria and probiotic action. W: Lactic acid bacteria. Microbiology and Functional Aspects. Red. Salminen S., Eright A., *Marcel Dekker, Inc.*, Wyd. 2, New York, USA 1998, 519-573.
121. **Grönlund M.M., Lehtonen O.P., Erola E., Kero P.:** Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 1999, 28: 19-25.
122. **Klessen B., Bunke H., Tovar K., Noack J., Sawatzki G.:** Influence of two infant formulas and human milk on the development of the faecal flora in newborn infants. *Acta Paediatr.* 1995, 84: 1347-1356.
123. **Gavini F., Cayuela C., Antoine J.M., Lecoq C., Letebvre B., Membre J.M., Neut C.:** Differences in the distribution of bifidobacterial and enterobacterial species in human faecal microflora of three different (children, adults, elderly) age groups. *Microb. Ecol. Health Dis.* 2001, 13: 40-45.
124. **Finegold S., Mathiesen G., George W.:** Consequences of the upsetting the ecology of the intestine. Changes in human intestinal microflora related to the administration of antimicrobial agents. W: Human Intestinal Microflora in Health and Disease. Wyd.: D.J. Hentges. *Academic Press*, New York, USA. 1983, 351-500.
125. **Edwards C.A., Parrett A.M.:** Intestinal flora during the first months of life: new perspectives. *Br. J. Nutr.* 2002, 88: 11-18.
126. **Van den Driessche M., Veereman-Wauters G.:** Functional food in pediatrics. *Acta Gastroenterol. Belg.* 2002, 65: 45-51.
127. **Clark P.A., Cotton L.N., Martin J.H.:** Selection of bifidobacteria for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods: II - tolerance to simulated pH of human stomachs. *Cult. Dairy Prod. J.* 1993, 28: 11-14.
128. **Virella G.:** Mikrobiologia lekarska. *Wyd. UJ*, Kraków. 1999, 62-64 i 528-529.
129. **Kędzia W., Koniar H.:** Diagnostyka mikrobiologiczna. *PZWL*, Wyd. II, Warszawa 1980, 114-131.
130. **Hartemink R., Kok B.J., Weenk G.H., Rombouts F.M.:** Raffinose-Bifidobacterium (RB) agar, a new selective medium for bifidobacteria. *J. Microbiol. Meth.* 1996, 27: 33-43.
131. **Silvi S., Rumney C.J., Rowland I.R.:** An assessment of three selective media for bifidobacteria in faeces. *J. Appl. Bacteriol.* 1996, 81: 561-564.
132. **Rada V., Sirotec K., Petr J.:** Evaluation of selective media for bifidobacteria in poultry and rabbit caecal samples. *J. Vet. Med. B.* 1999, 46: 369-373.
133. **Rada V., Koc J.:** The use of mupirocin for selective enumeration of bifidobacteria in fermented milk products. *Milchwissenschaft.* 2000, 55: 65-67.

134. **Roy D., Ward P.:** Evaluation of rapid methods for differentiation of *Bifidobacterium* species. *J. Appl. Bacteriol.* 1990, 69: 739-749.
135. **Rada V.:** Detection of *Bifidobacterium* species by enzymatic methods and antimicrobial susceptibility testing. *Biotechniques.* 1997, 11: 909-912.
136. **Beerens H.:** Bifidobacteria as indicators of faecal contamination in meat and meat products: detection, determination of origin and comparison with *Escherichia coli*. *Int. J. Food Microbiol.* 1998, 40: 203-207.
137. **Węgleński P.** (praca zbiorowa): Genetyka molekularna. PWN, Warszawa 1996, 156-191.
138. **Gavini F., Beerens H.:** Origin and identification of bifidobacteria strains isolated from meat and meat products. *Int. J. Food. Microbiol.* 1999, 46: 81-85.
139. **Leblond-Bourget N., Philippe H., Magni I., Decaris B.:** 16S rRNA and 16S to 23S internal transcribed spacer sequence analyses reveal inter- and intraspecific *Bifidobacterium* phylogeny. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 1996, 46: 102-111.
140. **Vincent D., Roy D., Mondou F., Dery C.:** Characterization of bifidobacteria by random DNA amplification. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1998, 43: 185-193.
141. **Tannock G.W.:** Molecular assessment of intestinal microflora. *Am. J. Clin. Nutr.* 2001, 73: 410-414.
142. **Ventura M., Elli M., Reniero R., Zink R.:** Molecular microbial analysis of *Bifidobacterium* isolates from different environments by the species-specific amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiol. Ecol.* 2001, 36: 113-120.
143. **Yamamoto T., Morotomi M., Tanaka R.:** Species-specific oligonucleotide probes for five *Bifidobacterium* species detected in human intestinal microflora. *Appl. Environ. Microbiol.* 1992, 58: 4076-4079.
144. **Kok R.G., Waal A., Schut F., Welling G.W., Weenk G., Hellingwef K.:** Specific detection and analysis of probiotic *Bifidobacterium* strain in infant faeces. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996, 62: 3668-3672.
145. **Roy D., Ward P., Champagne G.:** Differentiation of bifidobacteria by use of pulsed-field gel electrophoresis and polymerase chain reaction. *Int. J. Food Microbiol.* 1996, 29: 11-29.
146. **Kaufman P., Pfefferkorn A., Teuber M., Meile L.:** Identification and quantification of *Bifidobacterium* species isolated from food with genus-specific 16S rRNA-targeted probes by colony hybridization and PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997, 63: 1268-1273.
147. **Matsuki T., Watanabe K., Fujimoto J., Takada T., Matsumoto K., Tanaka R.:** Quantitative PCR with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers for analysis of human intestinal bifidobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004, 70: 167-173.
148. **Matsuki T., Watanabe K., Tanaka R., Fukuda M., Oyaizu H.:** Distribution of *Bifidobacterium* species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999, 65: 4506-4512.
149. **Matsuki T., Watanabe K., Tanaka R., Oyaizu H.:** Rapid identification of human intestinal bifidobacteria by 16S rRNA-targeted species- and group-specific primers. *FEMS Microbiol. Lett.* 1998, 167: 113-121.
150. **Zaremba M.L., Borowski J.:** Mikrobiologia lekarska. PZWL, Warszawa, 1997, 386-392 i 818-824.
151. **Southern S.A., Herrington C.S.:** *In situ* hybridization - a practical approach. IRL Press, Oxford 1975, 3.
152. **Langdendijk P.S., Schut F., Jansen G.J., Raangs G.C., Kamphuis G.R., Wilkinson M.H.F., Welling G.W.:** Quantitative fluorescence *in situ* hybridization of *Bifidobacterium* sp. with genus - specific 16S rRNA - targeted probes and its application in fecal samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995, 61: 3069-3075.
153. **Krzeszowiak A., Kosz-Vnenchak M.:** Hybrydyzacja *in situ* i jej wykorzystanie w badaniach infekcji wirusowych. *Mikrobiol. Med.* 1996, 7: 6-13.
154. **Madeja Z.:** Ilościowe metody analizy obrazu w genetyce molekularnej. *Post. Biol. Kom.* 1997, 8: 87-100.

155. **Jansen G.J., Harmsen J. M., Welling G.W.:** Rapid identification of bacteria in blood cultures by using fluorescently labeled oligonucleotide probes. *J. Clin. Microbiol.* 2000, 38: 814-817.
156. **McCartney A.L., Wenzhi W., Tannock G.W.:** Molecular analysis of the composition of the bifidobacterial and lactobacillus microflora of humans. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996, 62: 4608-4613.
157. **Simpson P.J., Stanton C., Fitzgerald G.F., Ross R.P.:** Genomic diversity and relatedness of Bifidobacteria isolated from a porcine cecum. *J. Bacteriol.* 2003, 185: 2571-2581.
158. **Gevers D., Huys G., Swings J.:** Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiol. Lett.* 2001, 205: 31-36.
159. **Harmsen H.J.M., Elfferich P., Schut F., Welling G.W.:** A 16S rRNA - targeted probe for detection of Lactobacilli and Enterococci in faecal samples by Fluorescent *In Situ* Hybridization. *Microb. Ecol. Health Dis.* 1999, 11: 3-12.
160. **Manz W., Arp G., Schumann-Kindel G., Szewzyk U., Reitner J.:** Widefield deconvolution epifluorescence microscopy combined with fluorescent *in situ* hybridization reveals the spatial arrangement of bacteria in sponge tissue. *J. Microbiol. Meth.* 2000, 40: 125-134.
161. **Welling G.W., Elfferich P., Raangs G.C., Wildeboer-Veloo A.C., Jansen G.J., Degener J.E.:** 16S ribosomal RNA - targeted oligonucleotide probes for monitoring of intestinal tract bacteria. *Scand. J. Gastroenterol.* 1997, 222: 17-19.
162. **Franks A.H., Harmsen H.M., Raangs G.C., Jansen G.J., Schut F., Welling G.W.:** Variations of bacterial populations in human faeces measured by fluorescent *in situ* hybridization with group - specific 16S rRNA - targeted oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998, 64: 3336-3345.
163. **Cocconnier M.H., Liévin V., Bernet-Camard M.F., Hudault S., Servin A.L.:** Antibacterial effect of the adhering human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997, 41: 1046-1052.
164. **Strus M., Pakosz K., Gościński H., Przondo-Mordarska A., Rozynek E., Pituch H., Meisel-Mikołajczyk F., Heczko P.B.:** Antagonistyczne działanie bakterii z rodzaju *Lactobacillus* wobec beztlenowych i mikroaerofilnych czynników zakażeń przewodu pokarmowego (*Helicobacter pylori*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium difficile*). *Med. Dośw. Mikrobiol.* 2001, 53: 133-142.
165. **Klewicka E., Libudzisz Z.:** Antagonistic activity of lactic bacteria. Summer school - Lactic acid bacteria - classification, metabolism, genetics, use. Ciechocinek, Polska, 18-22 Maj, 1998.
166. **Hoover D.G.:** *Bifidobacterium*. W: Encyclopedia of Food Microbiology. Red. R. Robinson, C. Batt, P. Panel, *Acad. Press*, London, UK 1999: 210-217.
167. **Hoover D.G., Steenson L.R.:** Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Acad. Press*, San Diego, Calif. 1993.
168. **Tagg J.R.:** Bacteriocins of Gram-positive bacteria: an opinion regarding their nature, nomenclature and numbers. W: Bacteriocins, microcins and lantibiotics. Red. R. James, C. Lazdunski i F. Pattus, *NATO ASI Series, Springer*, Berlin, Denmark 1991, 33-36.
169. **Tagg J.R., Dajani A.S., Wannamaker L.W.:** Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* 1976, 40: 722-756.
170. **Sahl H.G.:** Introduction to the lantibiotics session. W: Bacteriocins, Microcins and Lantibiotics. Wyd.: James R., Lazdunski C., Pattus F. *NATO ASI Series, Springer*, Berlin, Denmark. 1991, 71-74.
171. **Strus M.:** Nowa metoda oceny antagonistycznego działania bakterii kwasu mlekowego (LAB) na wybrane chorobotwórcze bakterie wskaźnikowe. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 1998, 50: 123-130.
172. **McGroarty J., Reid G.:** Inhibition of enterococci by *Lactobacillus* species *in vitro*. *Microb. Ecol. Health. Dis.* 1988, 1: 215-219.

173. **Spelhaug S.R., Harlander S.K.:** Inhibition of food borne bacterial pathogens from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceus*. *J. Food Prot.* 1989, 52: 856-862.
174. **Strus M., Malinowska M.:** Zakres antagonistycznego działania bakterii z rodzaju *Lactobacillus* na czynniki etiologiczne waginozy bakteryjnej. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 1999, 51: 47-57.
175. **Bliska J.B., Galan J.E., Falkow S.:** Signal transduction in the mammalian cell during bacterial attachment and entry. *Cell.* 1993, 73: 903-920.
176. **Andreu A., Stapleton A., Fennel C., Hillier S., Stamm W.:** Hemaagglutination, adherence, and surface properties of vaginal *Lactobacillus* species. *J. Infec. Dis.* 1995, 171: 1237-1243.
177. **Geertsema G.I., Mei H.C., Busscher H.J.:** Microbial cell surface hydrophobicity. *J. Microbiol. Methods.* 1993, 18: 61-68.
178. **Weiss L.:** The cell periphery, metastasis and other contact phenomema. *Publishing Company*, Amsterdam, North-Holland 1967, 165-221.
179. **Curtis A.S.G., Lackie J.M.:** Measuring cell adhesion. *John Wiley & Sons Ltd.*, London, UK 1991, 1-21.
180. **Tuomola E.:** *In vitro* adhesion of probiotic lactic acid bacteria. 1999, *Praca doktorska*.
181. **Perez P.F., Minnaard Y., Disalvo E.A., De Antoni G.L.:** Surface properties of bifidobacterial strains of human origin. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998, 64: 21-26.
182. **Gilbert P., Evans D.J., Brown M.R.W.:** Formation and dispersal of bacterial biofilms *in vivo* and *in situ*. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Supp.* 1993, 74: 67-78.
183. **Bos R., Van der Mei H.C., Busscher H.J.:** Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions-its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiol. Rev.* 1999, 23: 179-230.
184. **Bernet M.F., Brassart D., Neeser J.R., Servin A.:** Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions. *Appl. Environ. Microbiol.* 1993, 59: 4121-4128.
185. **Hudault S., Bernet-Camard M.F., Coconnier M.H., Liévin V., Servin A.L.:** Adhesion and proliferation of probiotic strains in the intestine and their importance for the probiotic effect. *IDF Nutr. Newsletter.* 1997, 5: 25-27.
186. **Aissi E.A., Lecocq M., Brassart C., Bouquelet S.:** Adhesion of some bifidobacterial strains to human enterocyte-like cells and binding to mucosal glycoproteins. *Microb. Ecol. Health Dis.* 2001, 13: 32-39.
187. **Wadstrom T.:** Molecular aspects of bacterial adhesion, colonisation and development of infections associated with biomaterials. *J. Invest. Surg.* 1989, 2: 353-360.
188. **Camp H.J.M., Oosterhof A., Veerkamp J.H.:** Interaction of bifidobacterial lipoteichonic acid with human intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.* 1985, 47: 332-334.
189. **Jonsson P., Wadstrom T.:** Surface hydrophobicity of *Staphylococcus aureus* measured by the salt aggregation test (SAT). *Curr. Microbiol.* 1984, 10: 203-210.
190. **Christensen G.D., Simpson W.A., Bisno A.L., Beachey E.H.:** Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect. Immun.* 1982, 37: 318-326.
191. **Christensen G.D., Simpson W.A., Younger J.J., Baddour L.M., Barrett F., Melton D.M., Beachey E.H.:** Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence staphylococci to medical devices. *J. Clin. Microbiol.* 1985, 22: 996-1006.
192. **Coconnier M.H., Klaenhammer T.R.:** Protein - mediated adhesion of *Lactobacillus acidophilus* BG 2F04 on human enterocyte and mucus - secreting cell lines in culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 1992, 6: 2034-2039.
193. **Lankaputra W.E., Shah N.P.:** Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* sp. in the presence of acid and bile salts. *Cult. Dairy Prod. J.* 1995, 30: 2-7.
194. **Traczyk W.:** Fizjologia człowieka w zarysie. *PZWL*, Warszawa 2004, 446-447.
195. **Streyaer L.:** Biochemia. *PWN*, Warszawa, 1997, 742.

196. **Charteris W.P., Kelly P.M., Morelli L., Collins J.K.:** Development and application of *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *J. Appl. Microbiol.* 1998, 84: 759-768.
197. **Marteau P., Shanahan F.:** Basic aspects and pharmacology of probiotics: an overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side-effects. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 2003, 17: 725-740.
198. **Tanaka H., Hashiba H., Kok J., Mierau I.:** Bile salt hydrolase of *Bifidobacterium longum* - biochemical and genetic characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000, 66: 2502-2512.
199. **Clark P.A., Martin J.H.:** Selection of bifidobacteria for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods: III - tolerance to simulated bile concentrations of human small intestines. *Cult. Dairy Prod. J.* 1994, 29: 18-21.
200. **Ibrahim S.A., Bezkorovainy A.:** Survival of bifidobacteria in presence of bile salt. *J. Sci. Food Agric.* 1993, 62: 351-354.
201. **Dashkevich M.P., Feighner S.D.:** Development of a differential medium for bile salt hydrolase-active *Lactobacillus* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 1989, 55: 11-16.
202. **Hryniewicz W.:** Antybiotykoterapia wobec problemu narastającej oporności drobnoustrojów. *Mikrobiol. Med.* 1994, 10: 19-23.
203. **Charteris W.P., Kelly P.M., Morelli L., Collins J.K.:** Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Bifidobacterium* isolates from the human gastrointestinal tract. *Lett. Appl. Microbiol.* 1998, 26: 333-337.
204. **Socha J.:** Gastroenterologia dziecięca. *Med. Prakt.* 1998, 12: 161-165.
205. **Miller-Catchpole R.:** Bifidobacteria in clinical microbiology and medicine. W: Biochemistry and physiology of bifidobacteria. Red. A. Bezkorovainy, R. Miller- Catchpole, *CRC Press*, Boca Raton, FL, USA 1989, 177-200.
206. **Bielecka M., Biedrzycka E., Smoragiewicz W., Śmieszek M.:** Interaction of *Bifidobacterium* and *Salmonella* during associated growth. *Int. J. Food Microbiol.* 1998, 45: 151-155.
207. **Liévin V., Peiffer I., Hudault S., Rochat F., Brassart D., Neeser J.R., Servin A.L.:** *Bifidobacterium* strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut.* 2000, 47: 646-652.
208. **Fujiwara S., Hashiba H., Hirota T., Forstner J.F.:** Proteinaceous factor(s) in culture supernatant fluids of bifidobacteria which prevents the binding of enterotoxigenic *Escherichia coli* to gangliosylceramide. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997, 63: 506-512.
209. **Asahara T., Shimizu K., Nomoto K., Watanuki M., Tanaka R.:** Antibacterial effect of fermented milk containing *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* against indigenous *Escherichia coli* infection in mice. *Microb. Ecol. Health. Dis.* 2001, 13: 16-24.
210. **Rambaud J.C., Bouhnik Y., Marteau P., Pochart P.:** Manipulation of human gut microflora. *Proc. Nutr. Soc.* 1993, 52: 357-366.
211. **Licht T.R., Krogfelt K.A., Kohen V., Poulsen L., Urbance J., Mollin S.:** Role of lipopolysaccharide in colonization of mouse intestine by *Salmonella typhimurium* studied in *in situ* hybridization. *Infect. Immunity.* 1996, 64: 3811-3817.
212. **De Vuyst L., Degeest B.:** Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 1999, 23: 153-177.