



UNIwersYTET TECHNICZNY W KOWNIE
WYDZIAŁ TECHNOLOGII CHEMICZNEJ

**Badania właściwości antybakteryjnych koncentratów fermentowanego napoju
probiotycznego BIFIDO przeciwko bakteriom i mikroskopijnym grzybom**

Sprawozdanie

Opracowała:

Doc. dr Renata Žvirdauskienė

Kowno, 2024

Cel opracowania – zbadanie koncentratów fermentowanych napojów probiotycznych BIFIDO zawierających dobre bakterie pod względem działania antydrobnoustrojowego.

Metoda badania – Działanie antydrobnoustrojowe przeciwko bakteriom badanym metodą wgłębienia dyfuzji do agaru (rys. 1.), przeciwko mikroskopijnym grzybom – metodą podwójnej hodowli (rys. 2), obliczanie współczynnika tłumienia wzrostu mikroskopijnego grzyba.

Badania zostały wykonane na **7 rodzajach napojów fermentowanych**:

- 1 – owsiany koncentrat fermentowanego napoju probiotycznego;
- 2 – ryżowy koncentrat fermentowanego napoju probiotycznego;
- 3 – pomarańczowy koncentrat fermentowanego napoju probiotycznego;
- 4 – malinowy koncentrat fermentowanego napoju probiotycznego;
- 5 – aroniowy koncentrat fermentowanego napoju probiotycznego;
- 6 – miodowo-imbirowy koncentrat fermentowanego napoju probiotycznego;
- 7 – żytni koncentrat fermentowanego napoju probiotycznego.

Zbadano działanie antydrobnoustrojowe dobrych bakterii zawartych w koncentratkach fermentowanych napojów probiotycznych BIFIDO przeciwko 18 drobnoustrojom (16 bakterii i 2 grzyby mikroskopijne):

1. *Micrococcus luteus* ATCC 9341
2. *Bacillus cereus* ATCC 11778
3. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603
4. *Enterobacter cloacae* ATCC 23355
5. *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228
6. *Bacillus subtilis subsp. spizizenii* ATCC 6633
7. *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708
8. *Citrobacter freundii* ATCC 43864
9. *Escherichia coli* DSM 19683
10. *Salmonella agona* ATCC 700720
11. *Listeria monocytogenes* ATCC 13932
12. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145
13. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
14. *Hafnia alvei* ATCC 13337
15. *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.
16. *Helicobacter pylori* DSM 105471
17. *Acremonium* sp. (LAMMC kolekcja)
18. *Fusarium graminearum* (LAMMC kolekcja)

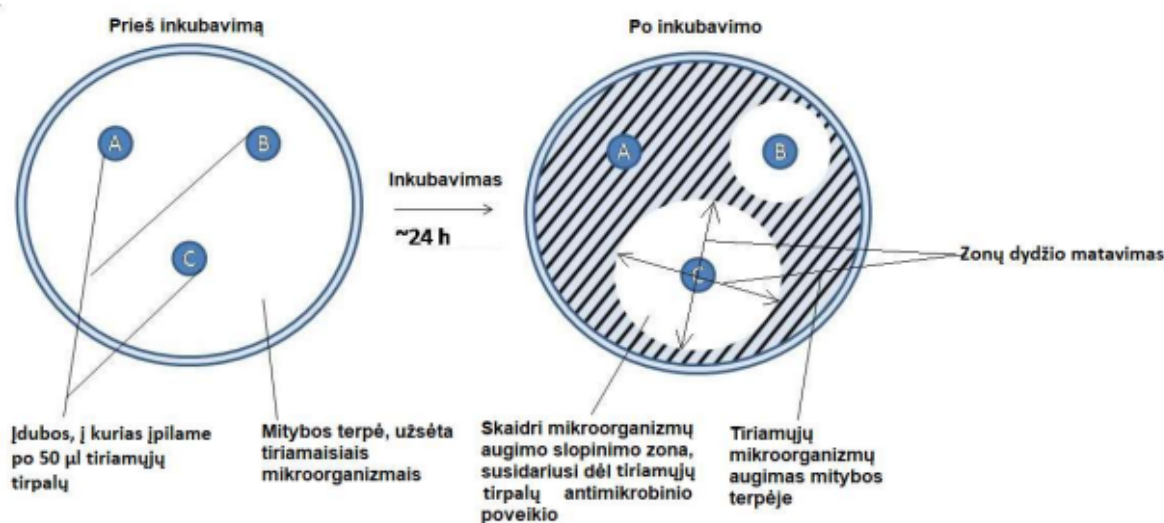
Metoda dyfuzji do agaru (wgłębień)

W przypadku ustalenia wrażliwości wrażliwych kultur bakterii na działanie badanych koncentratów fermentowanych napoju probiotycznego BIFIDO metodą dyfuzji do agaru (wgłębień), zawiesina wrażliwych kultur bakteryjnych (1×10^6 KSV/ml) jest wlewana do rozpuszczonej i wystudzonej do temperatury 47 °C pożywki w celu ustalenia ogólnej liczby

drobnoustrojów (PCA – *Plate count agar* (Liofilchem, Włochy)) – do 100 ml pożywki dodaje się 1 ml zawiesiny z zarodnikami. Mieszaninę pożywek z wrażliwymi kulturami bakterii wylewa się na płytki Petriego o średnicy 90 mm, po 12-15 ml każda. Pożywkę pozostawia się do stężenia na podłożu w pozycji poziomej. Następnie, za pomocą specjalnego przyrządu, w agarze zostają wycięte owalne wgłębienia o średnicy 8 mm (w każdej płytce Petriego po 3 dolki). Do każdego wykonanego wgłębienia wkrapla się po 50 µl badanego fermentowanego napoju. Płytki poddawane są inkubacji w ciągu 24 h w temperaturze $37,0 \pm 0,5$ °C, a następnie, otrzymane wyniki poddawane są ocenie.

Bakterie rosną na płytce, a wokół wgłębienia wytwarzają się wrażliwe strefy tłumiące wzrost kultury bakterii, które są wyraźnie widoczne na tle rozwinętych kolonii drobnoustrojów. Rozmiar przejrzystej strefy określa wrażliwość bakterii na dany napój. Szerokość strefy stłumienia wzrostu mierzy się linijką lub suwmiarką. Średnica mierzonej strefy stłumienia musi przecinać środek wgłębienia. Każde wgłębienie, wokół którego wytworzyła się przejrzysta strefa stłumienia wzrostu bakterii jest mierzone w dwóch pionowych kierunkach (na jednej płytce otrzymujemy 6 wyników).

Po zmierzeniu ogólnej średnicy oraz uzyskaniu informacji, jaka jest średnica wgłębienia, szerokość strefy stłumienia rozwoju bakterii jest obliczana na podstawie wzoru:



Rys. 1. Metoda dyfuzji w agarze

Rozmiar przejrzystej strefy określa wrażliwość bakterii na wybraną badaną ciecz. Szerokość strefy stłumienia wzrostu mierzy się linijką lub suwmiarką. Mierzona średnica strefy stłumienia musi przecinać środek wgłębienia. Po zmierzeniu całej średnicy oraz uzyskaniu informacji, jaka jest średnica krążka papieru filtracyjnego, szerokość strefy stłumienia jest obliczana na podstawie wzoru:

$$H = \frac{D - d}{2}$$

gdzie: H - szerokość strefy tłumienia, mm;

D - całkowita średnica strefy sterylnej i wgłębienia, mm;

d - średnica wgłębienia, mm.

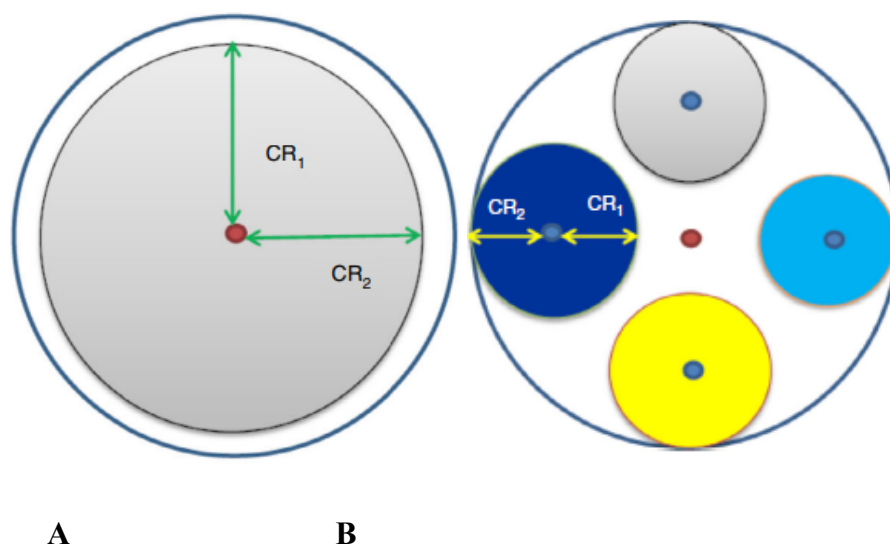
Występuje pewna zależność pomiędzy szerokością strefy tłumienia i czułością bakterii, zgodnie z którą wyniki podlegają ocenie.

Tabela nr 1. Ocena wrażliwości bakterii na środki antydrobnoustrojowe na podstawie szerokości strefy tłumienia

Stopień wrażliwości bakterii	Szerokość wzrostu strefy tłumienia, mm
Bardzo wrażliwe	>10
Wrażliwe	Od 5 do 10
Umiarkowanie wrażliwe	Od 4 do 5
Odporne	< 4

Metoda podwójnych kultur

Metoda polega na tym, że na środku jednej z płytek Petriego, na powierzchni pożywki zostaje wysiany mikroskopijny grzyb (rys. 2 A) i w odległości 2,5 cm od niego zostaje umieszczony krążek papieru filtracyjnego (o średnicy 6 mm) (Hahnemuhle, Niemcy), zwilżony w próbce badanego koncentratu napoju probiotycznego BIFIDO (rys. 2 B). W badaniu wykorzystano pożywkę PDA (Potato Dextrose Agar (Liofilchem, Włochy), służącą do hodowli drożdży i mikroskopijnych grzybów. Przygotowana pożywka zostaje umieszczona na płytce Petriego po 12 ml. Po stężeniu pożywki, wszystkie krążki (o średnicy 10 mm) z grzybnią mikroskopijnego grzyba, uzyskane z obrzeży hodowanych w ciągu siedmiu dób kultur izolatów *F. graminearum* i *Acremonium sp.*, umieszczane są grzybnią w dół na każdy krążek Petriego z wylaną pożywką w dwóch powtórzeniach. W celu kontroli wykorzystane zostały płytki Petriego, na których pożywce rośnie tylko badany mikroskopijny grzyb. Płytki zostają poddane inkubacji w temperaturze $25,0 \pm 0,5$ °C w ciągu 7 dób lub do chwili, gdy na płycce kontrolnej mikroskopijny grzyb osiągnie wielkość aż do krawędzi płytki.



Rys. 2 Metoda podwójnych kultur (Anith K. N., 2021)

A - miejsce grzyba mikroskopijnego na płytce Petriego (płytkę kontrolnej);
B - ułożenie na płytce krążków papieru filtracyjnego, nawilżonego w próbce koncentratu fermentowanego napoju probiotycznego z dobrymi bakteriami wokół mikroskopijnego grzyba

Współczynnik tłumienia (WT) jest obliczany na podstawie wzoru:

$$SK = \frac{a-b}{a} \times 100$$

a - średnica wzrostu izolatu na płytce kontrolnej (mm); b - średnica wzrostu izolatu na płytce z napojem fermentowanym nasyconym dobrymi bakteriami (mm).

Skala czułości współczynnika tłumienia:

- SK <3 – znikome tłumienie;
- SK= 3 - 20 – średnie tłumienie;
- SK= 20 - 100 – silne tłumienie.

Wyniki badania

W trakcie badania ustalono oddziaływanie dobrych bakterii zawartych w koncentraty fermentowanych napojów probiotycznych BIFIDO na 16 bakterii patogenicznych i 2 mikroskopijne grzyby. Wyniki przeprowadzonego badania wskazują, iż bakterie znajdujące się we wszystkich badanych koncentraty fermentowanego napoju probiotycznego BIFIDO hamowały wzrost 15 badanych bakterii patogenicznych, a wręcz wykazywały działanie bakteriobójcze. Najbardziej wrażliwa okazała się bakteria *B. cereus*, która wykazywała znikomy wzrost w przypadku oddziaływania żywnego koncentratu fermentowanego napoju probiotycznego oraz pomarańczowego koncentratu fermentowanego napoju probiotycznego, w przypadku wszystkich pozostałych koncentratów fermentowanego napoju probiotycznego BIFIDO, dobre bakterie całkowicie zatrzymały wzrost *B. cereus*.

Biorąc pod uwagę rozmiary wytworzonych stref stłumienia wzrostu, szczególnie wyróżniają się bakterie *M. luteus*, *E.coli*, *L. monocytogenes* i *H. alvei*, gdyż w ich przypadku dobre bakterie koncentratu fermentowanego napoju probiotycznego BIFIDO wykazały działanie wprost bakteriobójcze. Jedynie bakteria *H. pylori* była odporna na oddziaływanie badanych dobrych bakterii zawartych w koncentraty fermentowanego napoju probiotycznego.

Po zbadaniu tłumienia wzrostu 2 mikroskopijnych grzybów, również wyraźnie widoczne jest hamujące oddziaływanie dobrych bakterii zawartych w koncentraty fermentowanego napoju probiotycznego BIFIDO (rys. 6 i 7).

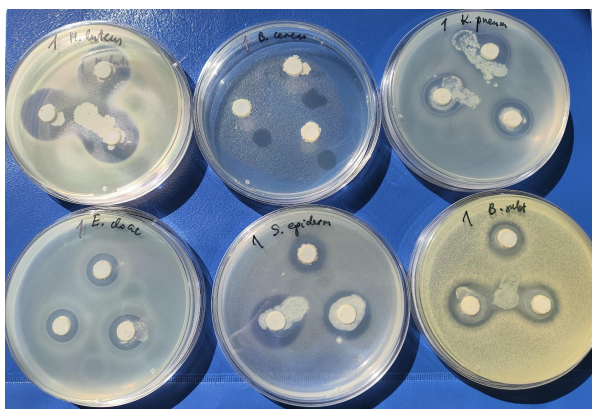
W celach badawczych wybrano 2 grzyby mikroskopijne. *Acremonium sp.*, gdyż jednostki tego szczepu są zaliczane do kategorii pleśni, które przy długotrwałym kontakcie z organizmem ludzkim mogą powodować poważne problemy zdrowotne. *Acremonium* to grupa pleśni, którą często można napotkać w pomieszczeniach, a niektóre ich rodzaje są znane jako ludzkie patogeny. Występują one na całym świecie i można je znaleźć w glebie oraz w przyrodzie, na rozkładającym się materiale roślinnym. Ponadto, mogą się one rozprzestrzeniać w pomieszczeniach i są jedną z najbardziej powszechnych kolonii grzybów w domach i biurach.

Fusarium graminearum to główny patogen, wywołujący fuzariozę kłosów pszenicy i jęczmienia. Na zainfekowanych ziarnach mogą występować mikotoksyny z grupy trichotecenów: deoksyniwalenol, zearalenon, niwalenol. Mitotoksyny te, szczególnie deoksyniwalenol (DON) i niwalenol (NIV) posiadają wspólną toksyczność biochemiczną i komórkową. Wykazują silne tłumienie syntezy białek, łącząc się z rybosomami, osłabiają syntezę RNA i DNA oraz wykazują toksyczne działanie na membrany komórek. Ponadto ich zdolność do tłumienia (inhibowania) syntezy białek może powodować apoptozę grasicy, limfy i tkanek krwiotwórczych poprzez kinazę białkową aktywowaną mitogenami. Zasiewy zarażone trichotecenami mogą powodować ciężkie zatrucia pokarmowe z nudnościami, wymiotami i biegunką.

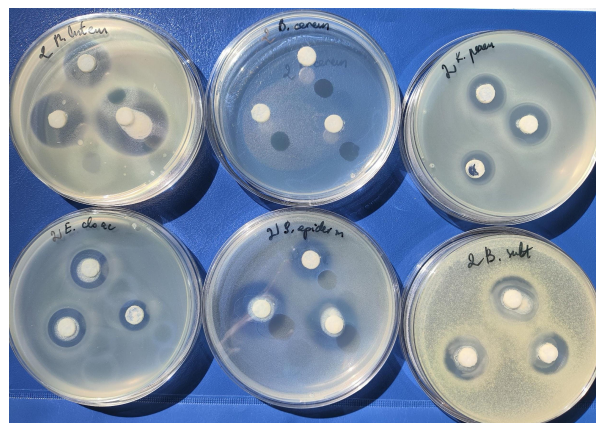
Tabela nr 2. Strefy tłumienia

L. p.	Szczep bakterii	Strefa tłumienia wzrostu bakterii, mm $\pm$ odchylenie standardowe						
		Nr napoju						
		1	2	3	4	5	6	7
1	<i>Micrococcus luteus</i>	20,0 $\pm$ 1,73	19,3 $\pm$ 4,04	16,7 $\pm$ 0,58	16,3 $\pm$ 0,58	18,7 $\pm$ 1,53	16,7 $\pm$ 1,15	14,0 $\pm$ 1,73
2	<i>Bacillus cereus</i>	34,3 $\pm$ 2,52	37,0 $\pm$ 0,00	14,3 $\pm$ 1,15	37,0 $\pm$ 0,00	35,3 $\pm$ 2,89	32,0 $\pm$ 0,00	7,7 $\pm$ 0,58
3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	11,3 $\pm$ 2,08	9,0 $\pm$ 1,73	7,3 $\pm$ 0,58	9,0 $\pm$ 0,00	10,7 $\pm$ 1,15	8,7 $\pm$ 1,53	8,7 $\pm$ 0,58
4	<i>Enterobacter cloacae</i>	7,0 $\pm$ 0,00	8,7 $\pm$ 2,31	4,3 $\pm$ 0,58	1,0 $\pm$ 0,00	4,7 $\pm$ 1,15	4,0 $\pm$ 0,00	4,3 $\pm$ 0,58
5	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12,7 $\pm$ 2,52	14,3 $\pm$ 3,06	9,7 $\pm$ 1,15	12,0 $\pm$ 0,00	11,3 $\pm$ 0,58	8,0 $\pm$ 1,00	8,0 $\pm$ 1,73
6	<i>Bacillus subtilis subsp. Spizizenii</i>	10,0 $\pm$ 2,00	12,0 $\pm$ 1,00	7,3 $\pm$ 1,53	7,3 $\pm$ 0,58	10,7 $\pm$ 0,58	8,0 $\pm$ 1,00	8,0 $\pm$ 1,00
7	<i>Salmonella cholerasuis</i>	8,0 $\pm$ 1,73	6,3 $\pm$ 1,15	4,3 $\pm$ 0,58	9,7 $\pm$ 2,52	12,0 $\pm$ 1,00	7,3 $\pm$ 0,58	6,3 $\pm$ 0,58
8	<i>Citrobacter freundii</i>	9,3 $\pm$ 0,58	17,0 $\pm$ 0,58	9,7 $\pm$ 2,08	12,7 $\pm$ 1,15	12,3 $\pm$ 1,53	9,7 $\pm$ 0,58	6,3 $\pm$ 0,58
9	<i>Escherichia coli</i>	11,0 $\pm$ 1,73	11,0 $\pm$ 1,00	10,7 $\pm$ 1,15	11,3 $\pm$ 1,15	13,3 $\pm$ 1,15	11,7 $\pm$ 0,58	8,7 $\pm$ 0,58
10	<i>Salmonella agona</i>	10,0 $\pm$ 1,00	9,0 $\pm$ 1,73	8,7 $\pm$ 2,52	12,7 $\pm$ 0,58	14,0 $\pm$ 1,73	10,0 $\pm$ 1,73	8,7 $\pm$ 1,53
11	<i>Listeria monocytogenes</i>	17,7 $\pm$ 1,53	15,3 $\pm$ 1,53	10,3 $\pm$ 1,53	16,7 $\pm$ 0,58	14,3 $\pm$ 1,15	11,0 $\pm$ 0,46	12,0 $\pm$ 0,00
12	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10,3 $\pm$ 0,58	10,7 $\pm$ 1,53	7,0 $\pm$ 0,00	10,3 $\pm$ 1,53	9,0 $\pm$ 1,00	11,3 $\pm$ 0,58	10,7 $\pm$ 0,58
13	<i>Staphylococcus aureus</i>	10,3 $\pm$ 1,15	2,0 $\pm$ 0,00	8,0 $\pm$ 1,00	9,0 $\pm$ 1,00	5,0 $\pm$ 0,00	8,0 $\pm$ 1,00	1,0 $\pm$ 0,00
14	<i>Hafnia alvei</i>	14,3 $\pm$ 0,58	11,0 $\pm$ 1,73	12,3 $\pm$ 0,58	15,3 $\pm$ 2,08	15,3 $\pm$ 1,15	14,7 $\pm$ 2,31	12,7 $\pm$ 6,03
15	<i>Salmonella typhimurium</i>	9,7 $\pm$ 1,53	7,0 $\pm$ 1,00	3,7 $\pm$ 0,58	7,3 $\pm$ 0,58	9,3 $\pm$ 1,15	6,3 $\pm$ 2,08	7,7 $\pm$ 1,15

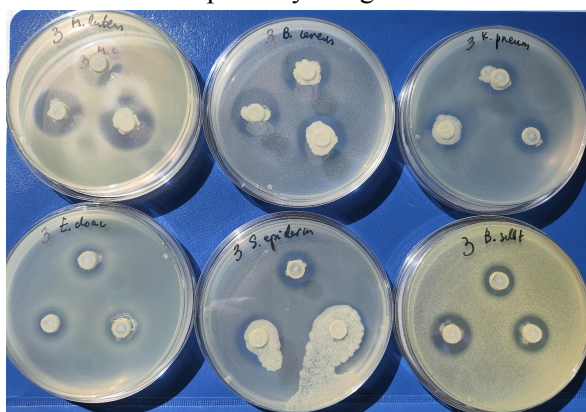
16	<i>Helicobacter pylori</i>	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
----	----------------------------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------



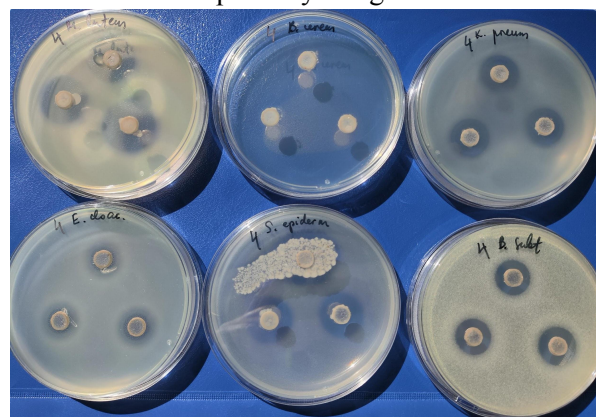
owsiany fermentowany koncentrat napoju probiotycznego



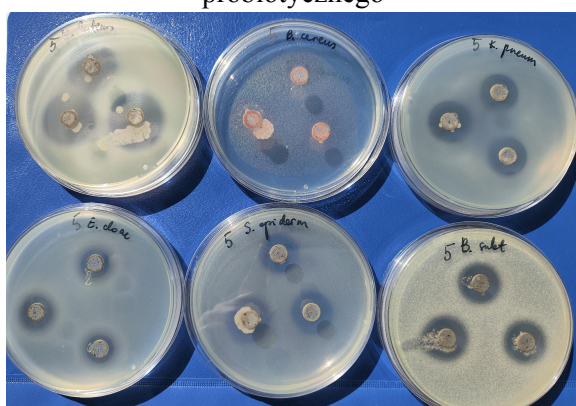
ryżowy fermentowany koncentrat napoju probiotycznego



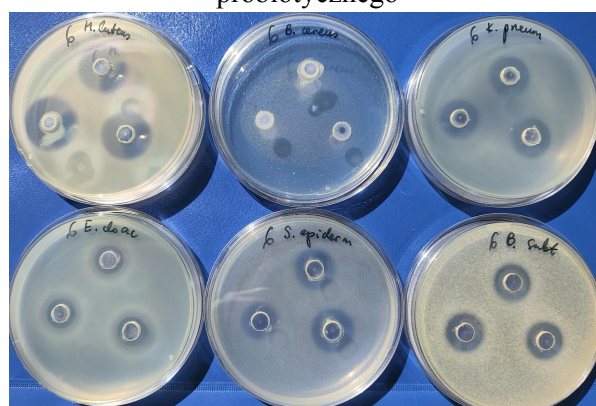
pomarańczowy fermentowany koncentrat napoju probiotycznego



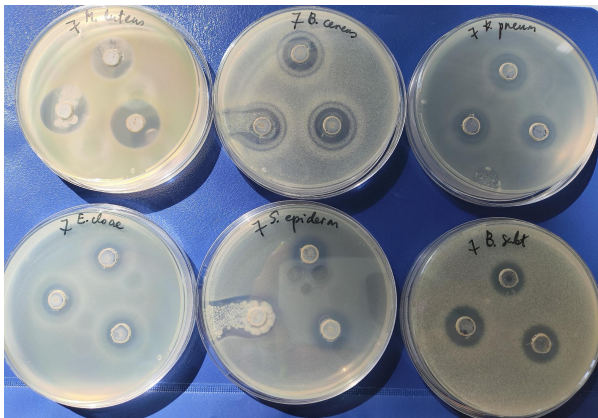
malinowy fermentowany koncentrat napoju probiotycznego



aroniowy fermentowany koncentrat napoju probiotycznego



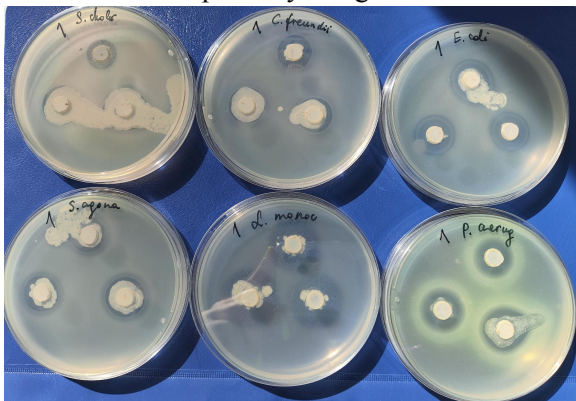
miodowo-imbirowy fermentowany koncentrat napoju probiotycznego



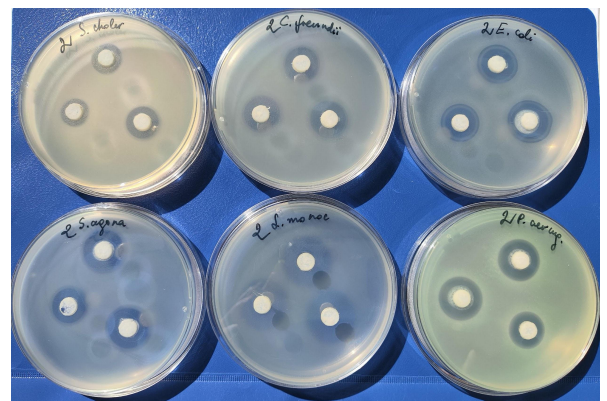
Rys. 3 Działanie antydrobnoustrojowe dobrych bakterii zawartych w koncentratkach fermentowanych napoju probiotycznego:

Micrococcus luteus
Bacillus cereus
Klebsiella pneumoniae
Enterobacter cloacae
Staphylococcus epidermidis
Bacillus subtilis subsp. Spizizenii

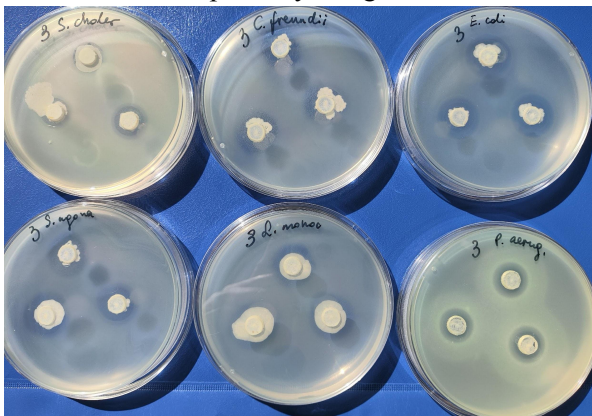
żytni fermentowany koncentrat napoju probiotycznego



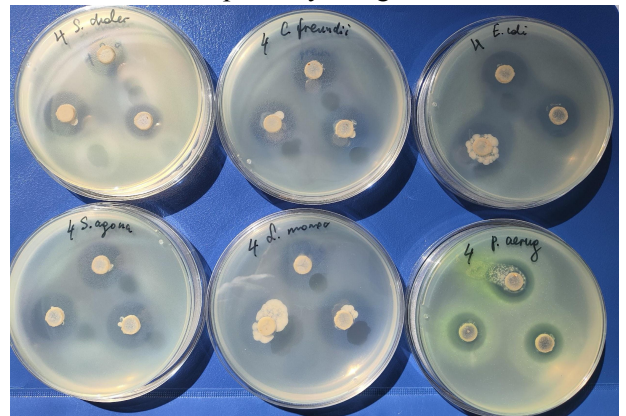
owsiany fermentowany koncentrat napoju probiotycznego



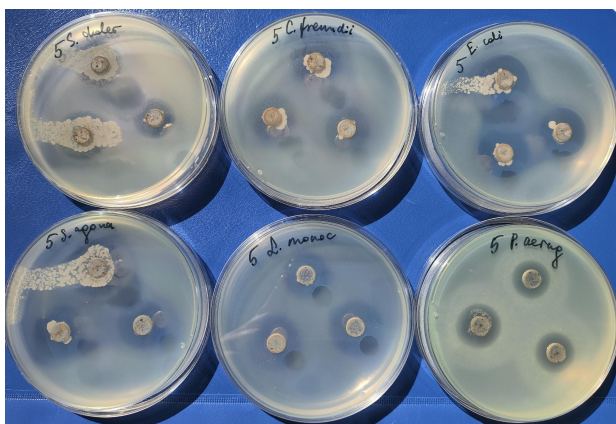
ryżowy fermentowany koncentrat napoju probiotycznego



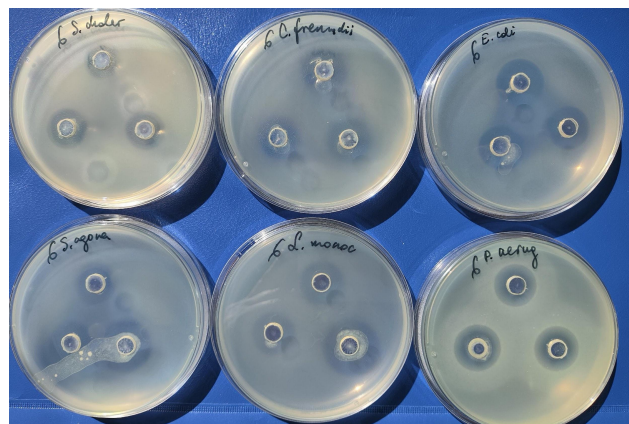
pomarańczowy fermentowany koncentrat napoju probiotycznego



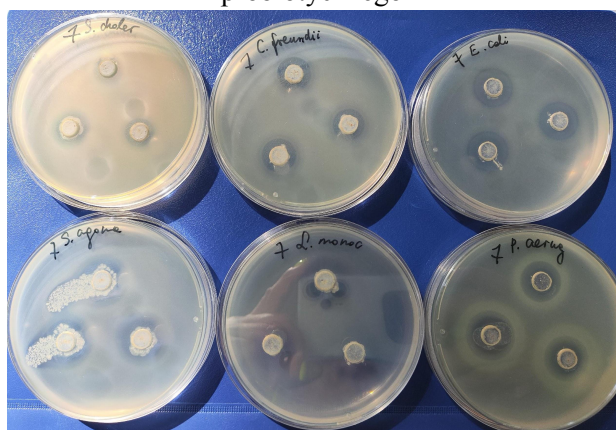
malinowy fermentowany koncentrat napoju probiotycznego



aroniowy fermentowany koncentrat napoju probiotycznego

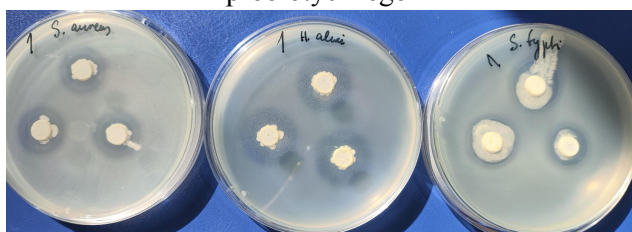


miódowo-imbrowy fermentowany koncentrat napoju probiotycznego



żytni fermentowany koncentrat napoju probiotycznego

Rys. 4 Działanie antydrobnoustrojowe dobrych bakterii zawartych w koncentratkach fermentowanych napoju probiotycznego:
Salmonella choleraesuis
Citrobacter freundii
Escherichia coli
Salmonella agona
Listeria monocytogenes
Pseudomonas aeruginosa



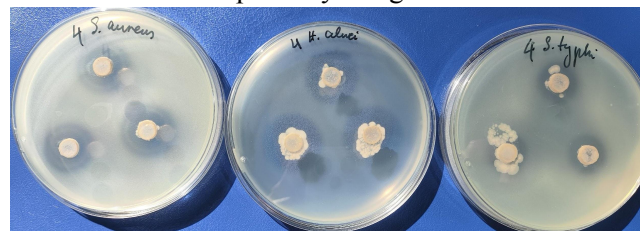
owsiany fermentowany koncentrat napoju probiotycznego



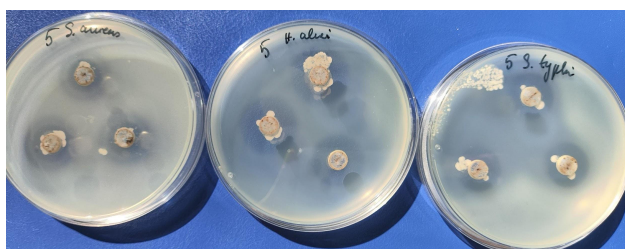
ryżowy fermentowany koncentrat napoju probiotycznego



pomarańczowy fermentowany koncentrat napoju probiotycznego



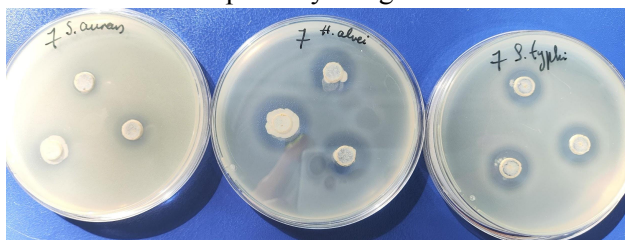
malinowy fermentowany koncentrat napoju probiotycznego



aroniowy fermentowany koncentrat napoju probiotycznego



miodowo-imbirowy fermentowany koncentrat napoju probiotycznego



żytni fermentowany koncentrat napoju probiotycznego

Rys. 5 Działanie antydrobnoustrojowe dobrych bakterii zawartych w koncentratkach fermentowanych napoju probiotycznego:

Staphylococcus aureus

Hafnia alvei

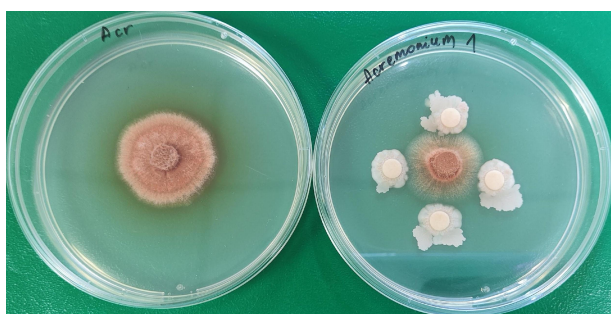
Salmonella typhimurium

Badanie dotyczące tłumienia wzrostu grzybów mikroskopijnych dowodzi, iż dobre bakterie, zawarte we wszystkich koncentratkach fermentowanego napoju probiotycznego BIFIDO wykazują działanie tłumiące wobec wzrostu grzybni tych grzybów i wyróżnia się silnym wskaźnikiem tłumienia, szczególnie wobec *Acremonium sp.* Największy współczynnik tłumienia *Acremonium sp.* wykazały bakterie zawarte w żytnim koncentracie fermentowanego napoju probiotycznego.

Wzrost grzybni *F. graminearum* najefektywniej tłumili bakterie zawarte w żytnim fermentowanym koncentracie napoju probiotycznego.

Tabela nr 3. Współczynniki tłumienia wzrostu badanych mikroskopijnych grzybów

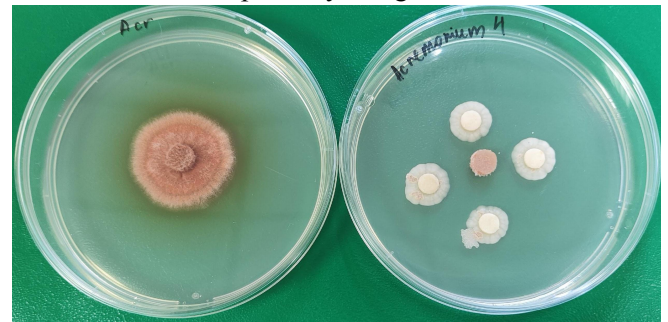
Grzyb mikroskopijny	Współczynnik tłumienia						
	Napój fermentowany						
	1	2	3	4	5	6	7
<i>Acremonium sp.</i>	39±0,7	55±0,0	59±0,0	66±0,7	48±0,7	52±0,7	61±0,7
<i>Fusarium graminearum</i>	18±1,4	25±1,4	20±1,4	7±0,7	20±2,8	29±0,7	39±0,7



owsiany fermentowany koncentrat napoju
probiotycznego



ryżowy fermentowany koncentrat napoju
probiotycznego



pomarańczowy fermentowany koncentrat napoju
probiotycznego



malinowy fermentowany koncentrat napoju
probiotycznego



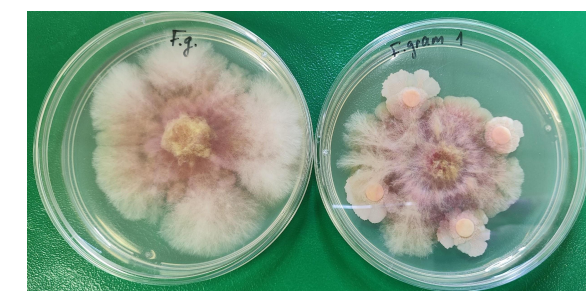
aroniowy fermentowany koncentrat napoju
probiotycznego



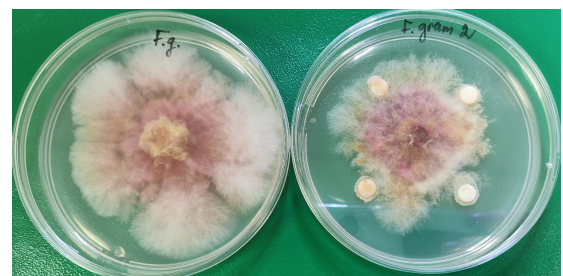
miodowo-imbrowy fermentowany koncentrat napoju
probiotycznego

**Rys. 6 Działanie antydrobnoustrojowe bakterii
zawartych w koncentratkach fermentowanych
napoju probiotycznego na *Acetomonium* sp.**

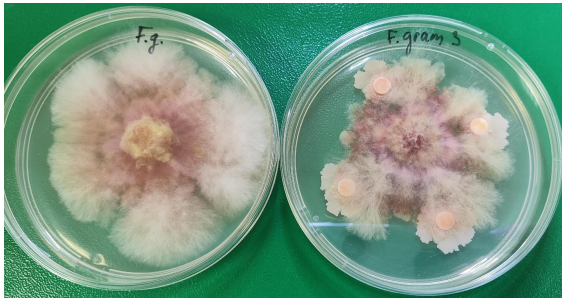
żytni fermentowany koncentrat napoju
probiotycznego



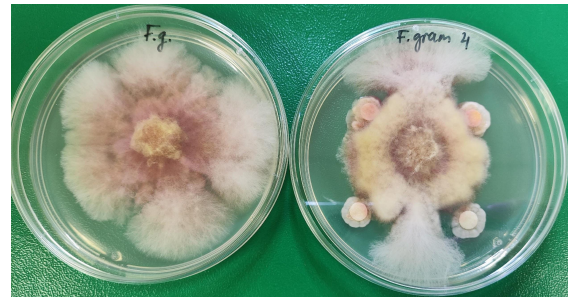
owsiany fermentowany koncentrat napoju
probiotycznego



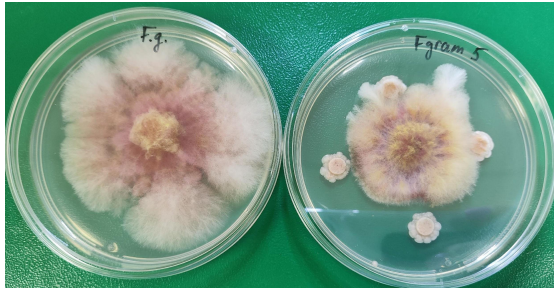
ryżowy fermentowany koncentrat napoju
probiotycznego



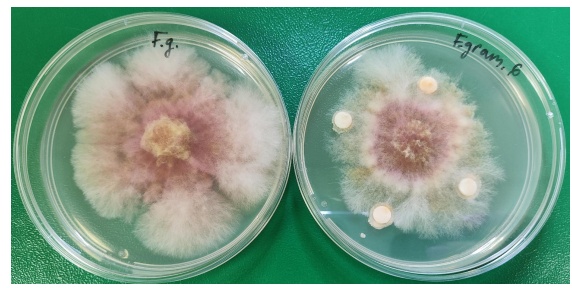
pomarańczowy fermentowany koncentrat napoju probiotycznego



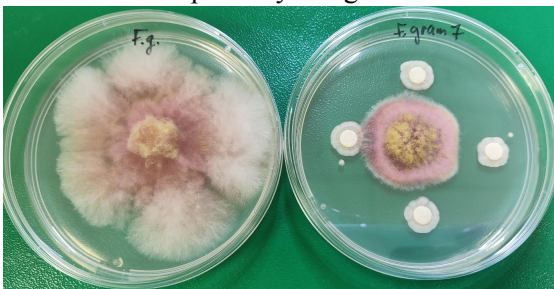
malinowy fermentowany koncentrat napoju probiotycznego



aroniowy fermentowany koncentrat napoju probiotycznego



miodowo-imbirowy fermentowany koncentrat napoju probiotycznego



żytni fermentowany koncentrat napoju probiotycznego

Rys. 7 Działanie antydrobnoustrojowe bakterii zawartych w koncentratkach fermentowanych napoju probiotycznego na *Fusarium graminearum*

Wnioski

Wszystkie badane koncentraty fermentowanych napojów probiotycznych BIFIDO wykazują zawartość dużych ilości dobrych bakterii, mających działanie tłumiące wzrost bakterii *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *Klebsiela pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* subsp. *Spizizenii*, *Salmonella choleraesuis*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Salmonella agona*, *Listeria monocytogene*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Hafnia alvei*, *Salmonella typhimurium* i grzybów *Acremonium* sp. oraz *Fusarium graminearum*. Rozwój grzybów mikroskopijnych najsilniej hamują bakterie znajdujące się w żytnim koncentracie fermentowanego napoju probiotycznego, natomiast rozwój bakterii chorobotwórczych najsilniej hamują bakterie obecne w aroniowym koncentracie fermentowanego napoju probiotycznego.