



UNIWERSYTET
EKONOMICZNY
W POZNANIU

Katarzyna Marchwińska

**Projektowanie dodatków paszowych z wykorzystaniem bakterii fermentacji
mlekowej**

Designing of lactic acid bacteria feed additives

Rozprawa doktorska

Promotor: dr hab. inż. Daniela Gwiazdowska

Pracę przyjęto dnia:

Podpis Promotora

Wydział: Towaroznawstwa

Katedra: Przyrodniczych Podstaw Jakości

Poznań 2016

*Składam serdeczne podziękowania **Pani dr hab. inż. Danieli Gwiazdowskiej** za nieocenioną pomoc udzieloną w trakcie realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej. Cenne uwagi i sugestie, cierpliwość i wyrozumiałość, poświęcony czas oraz zaangażowanie, okazane ze strony Pani Promotor i jej zespołu badawczego były dużym wsparciem podczas tworzenia tej pracy.*

*Pracę dedykuję **Rodzicom**,
którzy wspierali mnie przez cały okres studiów oraz
Mężowi,
który zawsze był przy mnie.*

Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów i symboli	9
WSTĘP	11
CZĘŚĆ LITERATUROWA	14
1. Bezpieczeństwo zdrowotne żywności i pasz.....	14
2. Probiotyki jako alternatywa dla antybiotyków	19
2.1. Bakterie fermentacji mlekowej jako potencjalne mikroorganizmy probiotyczne ...	23
3. Probiotyki w żywieniu zwierząt	27
3.1. Probiotyki w hodowli drobiu	30
3.2. Probiotyki w hodowli trzody chlewnej	30
4. Regulacje prawne dotyczące dodatków paszowych zawierających probiotyki	31
5. Rynek produktów probiotycznych	32
6. Założenia badawcze	37
6.1. Cel pracy i hipotezy badawcze	37
6.2. Zakres pracy	38
CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	43
7. Materiały.....	43
7.1. Materiał badawczy.....	43
7.2. Przedmiot badań.....	43
7.3. Mikroorganizmy wskaźnikowe	43
7.4. Podłoża mikrobiologiczne	44
7.4.1. Podłoża do izolacji i namnażania bakterii fermentacji mlekowej	44
7.4.2. Pożywki wykorzystywane do oznaczania aktywności przeciwdrobnoustrojowej.	45
7.4.3. Pożywki wykorzystywane do oceny właściwości proteolitycznych, amylolitycznych i lipolitycznych.....	46

7.4.4. Pożywki wykorzystane jako matryca dla bakterii w projektowanych dodatkach paszowych.....	48
7.5. Krążki do oznaczania wrażliwości izolatów na antybiotyki.....	50
7.6. Odczynniki.....	50
7.7. Bufory i roztwory	52
8. Metodyka badawcza	58
8.1. Izolacja czystych kultur bakterii fermentacji mlekowej z próbek kału i jelit wybranych zwierząt monogastrycznych.....	58
8.2. Fenotypowa charakterystyka izolatów bakterii fermentacji mlekowej	58
8.2.1. Ocena makroskopowa izolatów bakterii	58
8.2.2. Ocena mikroskopowa na podstawie barwienia metodą Grama	59
8.2.3. Ocena zdolności badanych izolatów bakterii do wytwarzania katalazy.....	59
8.3. Selekcja na podstawie wytycznych FAO/WHO oraz wybranych wyróżników determinujących funkcjonalność szczepów	59
8.3.1. Opracowanie schematu postępowania dot. selekcji badanych bakterii.....	59
8.3.2. Określenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej	59
8.3.3. Oznaczanie wrażliwości bakterii fermentacji mlekowej na wybrane antybiotyki.....	60
8.3.4. Oznaczanie zawartości wybranych kwasów organicznych w hodowlach badanych izolatów bakterii fermentacji mlekowej	61
8.3.5. Oznaczanie wybranych właściwości enzymatycznych.....	62
8.3.5.1. Oznaczanie właściwości proteolitycznych	62
8.3.5.2. Oznaczanie właściwości amylolitycznych	62
8.3.5.3. Oznaczanie właściwości lipolitycznych	62
8.3.6. Ocena przeżywalności bakterii fermentacji mlekowej w warunkach panujących w przewodzie pokarmowym.....	63
8.3.6.1. Przygotowanie bakterii do oceny przeżywalności w obecności kwasu solnego i soli żółciowych	63

8.3.6.2. Określenie tolerancji niskiego pH panującego w soku żołądkowym.....	63
8.3.6.3. Określenie tolerancji soli żółciowych przez bakterie fermentacji mlekowej	64
8.3.7. Oznaczenie hydrofobowości komórek	65
8.4. Identyfikacja genetyczna wyselekcjonowanych bakterii.....	65
8.4.1. Izolacja DNA genomowego z bakterii	65
8.4.2. Amplifikacja genu podjednostki rybosomalnej 16s RNA.....	67
8.4.2.1. Reakcja łańcuchowa polimerazy.....	67
8.4.2.2. Analiza elektroforetyczna	67
8.4.3. Sekwencjonowanie genu 16s RNA i analiza wyników	68
8.5. Przygotowanie dodatków paszowych z wykorzystaniem wybranych izolatów bakterii fermentacji mlekowej	68
8.5.1. Dobór nośnika i składników projektowanych preparatów.....	68
8.5.2. Otrzymywanie liofilizowanych hodowli bakterii.....	68
8.5.3. Przygotowanie biopreparatów	69
8.5.4. Ocena stabilności liofilizowanych hodowli bakterii oraz preparatów podczas przechowywania	69
8.5.5. Ocena przeżywalności bakterii obecnych w preparatach w symulowanym układzie pokarmowym.....	69
8.5.5.1. Preparat przeznaczony dla trzody chlewnej.....	70
8.5.5.2. Ocena przeżywalności bakterii obecnych w preparacie przeznaczonym dla drobiu w symulowanym przewodzie pokarmowym	71
8.6. Analiza statystyczna wyników.....	72
9. Wyniki badań i dyskusja.....	73
9.1. Izolacja bakterii fermentacji mlekowej z mikrobioty jelitowej zwierząt monogastrycznych	73
9.2. Fenotypowa charakterystyka izolatów bakterii fermentacji mlekowej	75

9.3. Selekcja bakterii na podstawie wytycznych FAO/WHO oraz wybranych wyróżników determinujących funkcjonalność szczepów	80
9.3.1. Ocena aktywności antibakteryjnej izolatów bakterii fermentacji mlekowej	80
9.3.1.1. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa izolatów pochodzących z kału i jelit zwierząt monogastrycznych	81
9.3.2. Ocena wrażliwości izolatów bakterii fermentacji mlekowej na wybrane antybiotyki	89
9.3.3. Określenie zawartości najważniejszych kwasów organicznych w hodowli badanych izolatów bakterii fermentacji.....	97
9.3.4. Określenie wybranych właściwości enzymatycznych.....	101
9.3.5. Określenie przeżywalności izolatów bakterii fermentacji mlekowej na warunki panujące w przewodzie pokarmowym	105
9.3.6. Określenie hydrofobowości komórek izolatów bakterii fermentacji mlekowej .	115
9.3.7. Aktywność antibakteryjna wybranych izolatów po 18 miesiącach przechowywania	119
9.4. Izolacja DNA i identyfikacja genetyczna wyselekcjonowanych bakterii.....	124
9.5. Kompozycja biopreparatów w oparciu o bakterie dedykowane wybranym grupom zwierząt monogastrycznych.....	126
9.5.1. Opracowanie składu preparatów dedykowanych wybranym grupom zwierząt monogastrycznych	127
9.5.1.1. Dobór matrycy dodatku paszowego.....	127
9.5.1.2. Przeżywalność bakterii fermentacji mlekowej podczas procesu liofilizacji	130
9.5.1.3. Stabilność podczas przechowywania liofilizowanych hodowli bakterii	133
9.5.2. Ocena przeżywalności bakterii w przygotowanych prototypach dodatków paszowych w symulowanym układzie pokarmowym.....	135
9.5.2.1. Ocena przeżywalności bakterii w prototypie dodatku paszowego dla trzody chlewnej w symulowanym układzie pokarmowym.....	135

9.5.2.2. Ocena przeżywalności bakterii w prototypie dodatku paszowego dla kurcząt rzeźnych w symulowanym układzie pokarmowym	137
10. Charakterystyka szczepów bakterii fermentacji mlekowej wykorzystanych do kompozycji dodatków paszowych	139
PODSUMOWANIE WYNIKÓW	145
WNIOSKI.....	148
BIBLIOGRAFIA.....	150
WYKAZ TABEL ORAZ WYKRESÓW ZAWARTYCH W ZAŁĄCZNIKU ELEKTRONICZNYM.....	180

Wykaz stosowanych skrótów i symboli

ATCC[®] (ang. *American Type Culture Collection*) – Amerykańska Kolekcja Kultur,

BA (ang. *Brucella Agar*) – podłoże testowe dla bakterii Gram-ujemnych,

BHI (ang. *Brain Heart Infusion medium*) – podłoże mózgowo-sercowe bogate w składniki odżywcze, pożywka hodowlana ogólnego stosowania,

BLAST (ang. *Basic Local Alignment Search Tool*) – program do obliczania podobieństwa sekwencji nukleotydów,

CLSI (ang. *The Clinical and Laboratory Standards Institute*) – Instytut Norm Klinicznych i Laboratoryjnych,

dNTP – deoksynukleotydy,

EFSA (ang. *European Food Safety Authority*) – Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności,

EURL FA (ang. *European Union Reference Laboratory for Feed Additives*) – Unijne Laboratorium Referencyjne do spraw Dodatków Paszowych,

FAO (ang. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*) – Organizacja Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa,

FDA (ang. *Food and Drug Administration*) – Agencja Żywności i Leków,

gen 16s RNA – gen kodujący rybosomalny kwas rybonukleinowy (rRNA), wchodzący w skład podjednostki małej rybosomów u Procaryota,

GRAS (ang. *Generally Recognised As Safe*) – uważane za bezpieczne,

HPLC (ang. *high-performance liquid chromatography*) – wysokosprawna chromatografia cieczowa,

KORLD – Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów,

LAB (ang. *lactic acid bacteria*) – bakterie fermentacji mlekowej,

M-17 – pożywka stosowana do wykrywania obecności paciorkowców mlekowych,

MRS (de Man, Rogosa i Sharpe) – pożywka do wykrywania, namnażania i oznaczania bakterii fermentacji mlekowej,

NCBI (ang. *National Center for Biotechnology Information*) – Narodowe Centrum Informacji Biotechnologicznej,

PAN – Polska Akademia Nauk,

PBS (ang. *phosphate buffered saline*) – bufor fosforanowy,

PCA (ang. *Plate Count Agar*) – pożywka hodowlana ogólnego stosowania,

PCM (ang. *Polish Collection of Microorganisms*) – Polska Kolekcja Drobnoustrojów, Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej we Wrocławiu,

PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*) – reakcja łańcuchowa polimerazy,

pz – para zasad, w biologii molekularnej,

PZH – Państwowy Zakład Higieny, Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego,

QPS (ang. *Qualified Presumption of Safety*) – pojęcie „uznanego domniemania bezpieczeństwa”,

TBE (ang. *tris-borate-EDTA buffer*) – bufor tris-kwas borowy-EDTA wykorzystywany m.in. do elektroforezy na żelu agarozowym,

TPY (ang. *Trypticase Phytone Yeast Extract*) – podłoże wykorzystywane do oznaczania obecności pałeczek z rodzaju *Bifidobacterium*,

TSA (ang. *Trypticasein Soy Agar*) – podłoże agarowe tryptozowo-sojowe,

TSB (ang. *Trypticasein Soy Broth*) – bulion tryptozowo-sojowy,

UE – Unia Europejska,

WHO (ang. *World Health Organization*) – Światowa Organizacja Zdrowia.

WSTĘP

Prozdrowotne oddziaływanie mikroorganizmów jest w ostatnich latach przedmiotem wielu badań, a możliwości ich zastosowania są coraz szerzej opisywane. W hodowli zwierząt obserwuje się duże zainteresowanie możliwością wykorzystania drobnoustrojów probiotycznych jako alternatywy dla antybiotyków. Dobrostan zwierząt hodowlanych jest jednym z elementów uwzględnianych w ramach polityki Unii Europejskiej (UE), której głównym celem jest zapewnienie konsumentom bezpiecznej żywności. Opracowane w jej ramach normy i regulacje prawne obejmują wszystkie etapy produkcji, od hodowli po konsumpcję. Tymczasem wśród czynników niepożądanych w łańcuchu produkcji żywności, stanowiących ryzyko dla zdrowia i życia ludzi oraz zwierząt jako główne zagrożenia wymienia się mikroorganizmy chorobotwórcze i ich metabolity [European Commission 2012]. Problem ten podkreślają raporty Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA), wskazujące, że do najważniejszych źródeł zakażeń patogenami takimi jak *Campylobacter* sp., *Salmonella* sp. czy *Escherichia coli* należą zwykle surowce i produkty pochodzenia zwierzęcego m.in. jaja oraz mięso drobiowe i wieprzowe [EFSA 2010, 2011a, 2011b; Buncic i Sofos 2012; Romero-Barrios i in. 2013]. Każdego roku Unia Europejska przeznaczona odpowiednie środki finansowe na zapobieganie i zwalczanie chorób zwierząt hodowlanych. W ciągu ostatnich lat na ten cel przeznaczono ponad 2 mld euro. Największe znaczenie mają działania zapobiegawcze, prowadzone jeszcze na etapie hodowli zwierząt, tym bardziej, że niektóre choroby mogą przebiegać bezobjawowo, prowadząc do skażenia mięsa przez patogeny. W tym celu najczęściej stosowane są antybiotyki, które ograniczają rozwój mikroorganizmów chorobotwórczych i powstrzymują rozwój chorób. Ze względu na fakt, iż wiele antybiotyków wykazuje właściwości stymulujące wzrost zwierząt, dochodziło do nadużywania tych substancji przez hodowców [Wegener 2003; Levy i Marshall 2004]. Niewłaściwe stosowanie antybiotyków w hodowli zwierzęcej przyczyniło się do powstania i rozprzestrzenienia zjawiska antybiotykooporności mikroorganizmów [Barton 2000; Mathur i Singh 2005; Clementi i Aquilanti 2011; Rzepkowska, Zielińska i Kołożyn-Krajewska 2014], jak również wykrywania pozostałości antybiotyków w żywności i surowcach pochodzenia zwierzęcego [Donoghue 2003; Nisha 2008; Reig i Toldrá 2008]. Z tego powodu 1 stycznia 2006 roku w krajach Unii Europejskiej wprowadzono zakaz stosowania antybiotykowych stymulatorów wzrostu. Jest to dopełnienie procesu wycofywania antybiotyków, który w 2003 r. Unia Europejska rozpoczęła przyjęciem rozporządzenia nr 1831/2003 dotyczącego dodatków paszowych.

Wycofanie antybiotykowych stymulatorów wzrostu wiąże się jednak ze stratami hodowców i wyższymi cenami surowców mięsnych. Zaistniała zatem pilna potrzeba znalezienia alternatywnych, równie efektywnych, lecz bezpiecznych dodatków paszowych, mających na celu zapobieganie kolonizacji przewodu pokarmowego przez bakterie chorobotwórcze. Taką alternatywą mogą być preparaty zawierające bakterie probiotyczne. Zgodnie z definicją Organizacji ds. Wyżywienia i Rolnictwa ONZ (FAO) oraz Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) probiotyki to *"żywe drobnoustroje, które podane w odpowiedniej ilości wywierają korzystny wpływ na zdrowie gospodarza"* [FAO/WHO 2001a].

Polski rynek dodatków paszowych oferuje preparaty probiotyczne przeznaczone dla zwierząt hodowlanych, jednak większość z nich bazuje na tych samych drobnoustrojach, najczęściej pochodzących z ogólnoswiatowych kolekcji mikroorganizmów. Często też w ofercie jednej firmy znaleźć można preparaty przeznaczone dla różnych grup zwierząt, wykorzystujące ten sam zestaw szczepów probiotycznych. Tymczasem coraz częściej w badaniach naukowych podkreśla się, że duże znaczenie w doborze mikroorganizmów do preparatów probiotycznych ma środowisko ich izolacji, uwzględniające ostateczne zastosowanie. Uważa się, że mikrobiom jelit cechuje unikalny skład w zależności od pochodzenia organizmu, zarówno ludzi jak i zwierząt, biorąc pod uwagę m.in. różne obszary geograficzne, strefy klimatyczne czy sposób odżywiania [Svetoch i in. 2011; Lozupone i in. 2012; Yatsunenکو, i in. 2012]. Ponadto, dane literaturowe wskazują, że wieloszczepowe preparaty mają przewagę nad pojedynczymi mikroorganizmami, ponieważ zestawienie kilku szczepów może zwiększyć zakres właściwości preparatu, na przykład poprzez poszerzenie spektrum aktywności przeciwdrobnoustrojowej [Timmerman i in. 2004].

Biorąc pod uwagę powyższe przesłanki, zasadniczym celem niniejszej pracy było skomponowanie preparatów zawierających odpowiednio wyselekcjonowane szczepy bakterii fermentacji mlekowej. Bakterie te mogłyby ograniczać kolonizację przewodu pokarmowego zwierząt przez mikroorganizmy chorobotwórcze, a tym samym korzystnie wpływać na organizm zwierzęcia. Innowacyjność proponowanego rozwiązania w stosunku do większości produktów obecnych na rynku, a zarazem jego największa zaleta, polega na takim doborze mikroorganizmów, aby zachować relację pochodzenia bakterii z grupą zwierząt monogastrycznych, którym preparaty miałyby być dedykowane. Założeniem badawczym było również skomponowanie preparatów w taki sposób, by były

one konkurencyjne w stosunku do suplementów probiotycznych oferowanych aktualnie na polskim rynku dodatków paszowych. W tym celu uwzględniono szeroką charakterystykę bakterii uwzględniającą ich właściwości przeciwdrobnoustrojowe i enzymatyczne, hydrofobowość, a także przeżywalność w warunkach przewodu pokarmowego. Ponadto wszystkie mikroorganizmy, wchodzące w skład preparatów, stanowią nowo scharakteryzowane szczepy, uzyskane z jelit zwierząt monogastycznych pochodzących z lokalnych hodowli.

CZĘŚĆ LITERATUROWA

1. Bezpieczeństwo zdrowotne żywności i pasz

Bezpieczeństwo żywności stanowi istotny problem zdrowia publicznego na całym świecie. Z punktu widzenia konsumenta jest to najważniejsza cecha jakości kupowanych i spożywanych przez niego produktów. Pojęcie to jest definiowane przez *Codex Alimentarius* jako zapewnienie, że żywność przygotowana i/lub spożywana zgodnie z zamierzonym zastosowaniem, nie spowoduje uszczerbku na zdrowiu konsumenta [FAO/WHO 2001b; Kołożyn-Krajewska 2015]. Ustawa o bezpieczeństwie żywności i żywienia z 2006 roku definiuje natomiast bezpieczeństwo żywności jako „ogół warunków, które muszą być spełniane, dotyczących w szczególności stosowanych substancji dodatkowych i aromatów, poziomów substancji zanieczyszczających, pozostałości pestycydów, warunków napromieniania żywności, cech organoleptycznych i działań, które muszą być podejmowane na wszystkich etapach produkcji lub obrotu żywności - w celu zapewnienia zdrowia i życia człowieka”. Jednak pojęcie bezpieczeństwa nie jest ograniczone wyłącznie do żywności. Zgodnie z kompleksową strategią Unii Europejskiej „od pola do stołu”, dotyczy ono również zdrowia i dobrostanu zwierząt oraz zdrowia roślin. Tym samym istotne jest zapewnienie bezpieczeństwa zdrowotnego w całym łańcuchu żywności. Ważną rolę w tym łańcuchu pełni jakość pasz, która ma z kolei znaczenie dla zdrowia zwierząt, środowiska i wreszcie, bezpieczeństwa żywności pochodzenia zwierzęcego.

W tym kontekście należy zwrócić szczególną uwagę na hodowle zwierząt, jako źródło żywności i związane z nią zagrożenia, zarówno dla zdrowia zwierząt jak i dla bezpieczeństwa produktów pochodzenia zwierzęcego. Produkcja drobiu i trzody chlewnej zajmuje istotne miejsce w światowej gospodarce. Zarówno na świecie jak i w Polsce, obserwuje się wzrost spożycia mięsa drobiowego. W ciągu ostatnich ośmiu lat odnotowano 50% wzrost konsumpcji drobiu w przeliczeniu na jednego mieszkańca [Maćkiw i in. 2011]. Prognozy FAO z października 2016 roku wskazują, że w bieżącym roku światowa produkcja drobiu zwiększy się o 0,9% do 115,8 mln ton (wzrost o 2,3% w krajach rozwiniętych). W ostatniej dekadzie rynek ten odnotował średni wzrost na poziomie 3%. Ponadto, przewiduje się, że do końca 2016 roku wartość globalnego eksportu i importu mięsa drobiu wzrośnie prawdopodobnie odpowiednio o 4,4% (do 12,7 mln ton) i 3,3 % (do 12,6 mln ton). Prognozy wskazują, że mięso drobiowe w bieżącym roku pozostanie najważniejszym rodzajem mięsa z 40,8% udziałem w handlu ogółem. Rynek wieprzowiny ma nieco gorsze notowania

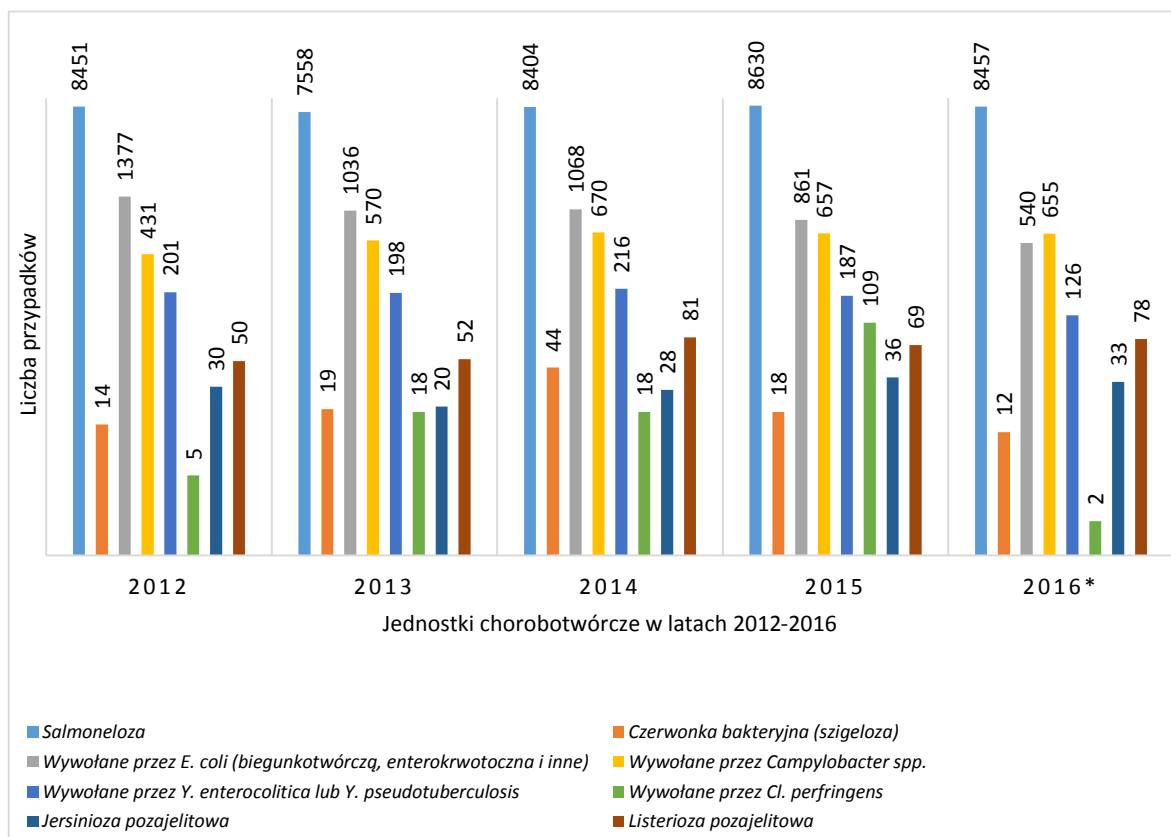
i zgodnie z prognozami, miał osiągnąć w 2016 r. wartość 25,7% udziału. Przewiduje się, że pomimo wzrostu produkcji mięsa na światowym rynku o ponad 600 tys. ton w 2016 r. (0,2% wzrost), do 319,8 mln ton, w przypadku mięsa wieprzowego prognozowany jest spadek o 0,6% do wartości 116,5 mln ton. Jednakże mimo spadku produkcji, światowy eksport wieprzowiny ponownie powinien osiągnąć wartości rosnące, o 4,4% do 7,5 mln ton [FAO 2016a].

Wyzwaniem dla bezpiecznej produkcji i dystrybucji żywności jest również globalizacja handlu żywnością, która, pomimo pozytywnego wpływu na rozwój gospodarczy krajów eksportujących żywność, może skutkować wzrostem rozprzestrzeniania się czynników zagrażających bezpieczeństwu produktów, m.in. mikroorganizmów chorobotwórczych. Dlatego, w warunkach rynku globalnego, konieczne jest zapewnienie odpowiednich norm i kontroli w produkcji żywności, aby ograniczyć ryzyko przenoszenia się chorób za pośrednictwem łańcucha żywnościowego. Choroby spowodowane występowaniem drobnoustrojów patogennych w żywności stanowią poważne zagrożenie dla zdrowia ludzi, przyczyniając się równocześnie do strat ekonomicznych jednostek, społeczności, przedsiębiorstw i krajów, powodując m.in. znaczne obciążenie dla systemów opieki zdrowotnej. Konsekwencje ekonomiczne, związane z nieodpowiednią jakością mikrobiologiczną żywności, powodują również szkody w krajowej gospodarce, turystyce i handlu. Istotne zatem jest wprowadzanie działań prewencyjnych, przeciwdziałających kolonizacji bakterii chorobotwórczych w hodowli zwierząt [WHO 2015].

Według danych WHO z grudnia 2015 roku żywność skażona bakteriami, wirusami, zanieczyszczona pasożytami lub substancjami chemicznymi była przyczyną ponad 200 chorób, począwszy od biegunek do nowotworów. Szacuje się, że 600 milionów ludzi choruje po spożyciu skażonej żywności, a aż 420 000 każdego roku umiera. Niepokojące doniesienia wskazują, że 40% przypadków występowania chorób pokarmowych dotyczy dzieci poniżej 5 roku życia, co skutkuje śmiertelnością na poziomie 125 000 zgonów rocznie. Do najczęściej występujących problemów zdrowotnych związanych ze spożyciem skażonej żywności należą choroby biegunkowe, odpowiedzialne za 550 milionów zachorowań, w tym 230 000 zgonów rocznie [WHO 2015].

Do mikroorganizmów najczęściej występujących w hodowlach zwierząt monogastycznych, jak drób i trzoda chlewna, a zarazem stanowiących duże ryzyko ze względu na możliwość przedostania się do żywności, należą bakterie *Salmonella* spp., *Campylobacter* sp. czy *Yersinia* spp.. Na wykresie 1 zamieszczono dane dotyczące

najczęściej występujących zakażeń jelitowych i pozajelitowych występujących w Polsce, z których wynika, że najczęstszą przyczyną zatruc pokarmowych i zakażeń jelitowych są bakterie *Salmonella* spp., jednak coraz częściej odnotowuje się infekcje wywołane przez *E. coli* i *Campylobacter* spp. [PZH 2016].



*zakres czasowy 01.01-30.10.2016 r.

Wykres 1. Liczba przypadków jednostek chorobotwórczych w latach 2012-2016

Źródło: opracowanie na podstawie danych Państwowego Zakładu Higieny, Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego (PZH) [2016]

Gram-ujemne pałeczki *Campylobacter* spp. są główną przyczyną zakażeń jelitowych na całym świecie, a w Unii Europejskiej jest to najczęściej wykrywany patogen wśród mikroorganizmów wywołujących zatrucia pokarmowe od 2005 roku. W ostatnich latach liczba zachorowań spowodowanych przez te bakterie przekraczała 200 000 [EFSA 2015]. Bakterie z rodzaju *Campylobacter* spp. kolonizują przewód pokarmowy wielu gatunków zwierząt domowych: drobiu, bydła, świń, psów i kotów, jak również dzikich ptaków i ssaków. Największe zagrożenie związane jest jednak z tuszkami drobiowymi, które ulegają skażeniu podczas uboju i rozbioru [Wieczorek i Osek 2010; Wieczorek i in. 2012; Gözl i in. 2014]. Dane literaturowe wskazują, że nawet 90% tusz kurcząt, znajdujących

się w sprzedaży, może być zakażonych pałeczkami *Campylobacter* spp., a 50-80% przypadków kamylobakterioz u ludzi wywołanych jest przez spożycie mięsa drobiowego skażonego tymi bakteriami. Nie jest znany dokładny mechanizm zapoczątkowania zakażenia na fermach, jednak bakterie łatwo się rozprzestrzeniają, obejmując znaczną część stada. Przykładowo, częstość kolonizacji brojlerów europejskich przez *Campylobacter* spp. w stadach wynosi 71% [Guyard-Nicodème i in. 2015]. Niekiedy infekcja może objąć nawet całe stado. Dodatkowy problem stanowi brak objawów chorobowych u ptaków, co uniemożliwia prewencyjną eliminację zainfekowanych osobników [Godlewska i Jagusztyn-Krynicka 2006]. W krajach rozwiniętych przyczyną zatruc pokarmowych wywołanych przez *Campylobacter* spp. jest najczęściej niedogotowany lub niedopieczony drób, niepasteryzowane mleko lub woda oraz żywność gotowa do spożycia (ready-to eat), która została zakażona tym patogenem [Rożynek i in. 2005; Josefsen i in. 2015]. Pomimo, iż bakterie te nie namnażają się w warunkach chłodniczych, mają możliwość przetrwania w niskich temperaturach, np. w zamrożonym mięsie nawet do kilku miesięcy [Haddad i in. 2009].

Niemal równie często, jak pałeczki z rodzaju *Campylobacter*, odpowiedzialne za zatrucia pokarmowe ludzi i choroby zwierząt hodowlanych, są bakterie *Salmonella* spp.. Jest to zoonotyczny mikroorganizm, który od lat stanowi poważny problem na całym świecie, wpływając na bezpieczeństwo żywności, zdrowie publiczne i powodując straty ekonomiczne w hodowli zwierząt [Jackson i in. 2013]. Główne źródło tych bakterii stanowią: mięso drobiowe i wieprzowe, jaja, produkty mleczarskie, a w mniejszym stopniu także owoce i warzywa [EFSA 2008b]. W obrębie rodzaju *Salmonella* wyróżnia się tylko dwa gatunki: *S. bongori* oraz *S. enterica*, podzielony na podgatunki: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, *indica*. Gatunek *S. enterica* ssp. *enterica* obejmuje około 150 serotypów, różniących się m.in. chorobotwórczością [Ohl i Miller 2001]. Najważniejszym serotypem jest *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, odpowiedzialnym za niemal 50% przypadków salmonellozy u ludzi [Porwollik i in. 2004]. W Polsce Gram-ujemne pałeczki *Salmonella* spp. wciąż pozostają na pierwszym miejscu jako główny czynnik wywołujący zakażenia jelitowe (wyk. 1). Ponadto, obserwuje się zwiększony poziom oporności na antybiotyki szczepów *Salmonella* spp. izolowanych od zwierząt, co zmniejsza skuteczność terapeutyczną w leczeniu antybiotykami chorób zwierząt i ludzi. Podkreśla to zatem pilną potrzebę kontroli zakażeń bakteriami z rodzaju *Salmonella* u zwierząt [Yang i in. 2014].

Spośród mikroorganizmów, stanowiących problem zarówno z punktu widzenia hodowli zwierząt jak możliwości zakażenia żywności, należy wymienić również należące do rodziny *Enterobacteriaceae* pałeczki z rodzaju *Yersinia* i bakterie *Escherichia coli*. Wśród pałeczek *Yersinia* spp. gatunkiem najczęściej występującym w mięsie i produktach mięsnych jest *Y. enterocolitica*. Może ona powodować jersiniozę, czyli odzwierzęcą chorobę zakaźną, która wywołuje ostre lub przewlekłe dolegliwości przewodu pokarmowego. Bakterie te dobrze rozwijają się w temperaturze od -2 do 45°C, są przy tym odporne na długotrwałe przechowywanie w warunkach chłodniczych a także pakowanie w atmosferze modyfikowanej [Jagielski 2010; Nowicka i in. 2014]. Z kolei bakterie *Escherichia coli* w większości należą do mikrobioty komensalnej ludzi i zwierząt, jednak wyróżnia się też grupy (patotypy) chorobotwórcze. Rezerwuarem niektórych grup mogą być zwierzęta hodowlane. Drób i trzoda chlewna rzadko są opisywane jako źródło chorobotwórczych bakterii *E. coli*, częściej dotyczy to bydła. Istotnym problemem jest fakt, że bakterie *E. coli* łatwo wymieniają materiał genetyczny poprzez horyzontalny transfer genów z bakteriami bytującymi w tym samym środowisku jak *Salmonella* spp. i *Shigella* spp. oraz innymi szczepami *E. coli* [Scotland i in. 1998; EFSA 2011b].

Znaczne straty ekonomiczne wiążą się także z zanieczyszczeniem żywności przez Gram-dodatnie pałeczki *Listeria monocytogenes*, wymieniane konsekwentnie wśród najważniejszych patogenów pokarmowych na całym świecie. Choć zakażenia u ludzi są stosunkowo rzadkie, bakterie te mogą spowodować poważne i zagrażające życiu choroby. Jako patogen oportunistyczny, stanowi szczególne zagrożenie dla kobiet w ciąży, noworodków i ludzi z upośledzonym układem odpornościowym, np. po przeszczepach organów czy kuracjach z użyciem leków immunosupresyjnych [Schlech i in. 2000; Liu 2006]. Większość przypadków listeriozy jest związanych ze skażoną żywnością [Andritsos i in. 2013]. Dane literaturowe wskazują, że zdrowe zwierzęta, m.in. świnie, stanowią potencjalne źródło bakterii *L. monocytogenes*, które mogą się przenosić podczas uboju do mięsa. Obecność tych mikroorganizmów stwierdzono m.in. w rzeźniach, surowym mięsie wieprzowym i produktach wieprzowych [Kanuganti i in. 2002; Thevenot i in. 2005; Hellström i in. 2010].

W celu zapobiegania i zwalczania zakażeń bakteryjnych, hodowcy najczęściej stosują antybiotyki. Jednakże, jak już wspomniano, nadużywanie tych substancji, szczególnie jako stymulatorów wzrostu, prowadzi do narastania zjawiska lekooporności i wykrywania pozostałości antybiotyków w mięsie [Godziszewska i in. 2016]. Ponadto, wprowadzony

zakaz stosowania w hodowli zwierząt gospodarskich antybiotyków w formie subterapeutycznej [Rozporządzenie UE 1831/2003] wymusił na producentach wprowadzenie alternatywnych suplementów o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, czy też zwiększającym przyrost masy zwierząt. Alternatywę dla antybiotyków mogą stanowić m.in. probiotyki, prebiotyki czy synbiotyki. Ich zastosowanie ma na celu zapobieganie niepożądanym efektom w hodowli zwierząt i uzyskiwanie wyników produkcyjnych, nieodbiegających od rezultatów uzyskiwanych przy stosowaniu antybiotykowych stymulatorów wzrostu [De Lange i in. 2010; Vondruskova i in. 2010].

2. Probiotyki jako alternatywa dla antybiotyków

Początkowe odkrycia mikrobiologiczne skupiały się przede wszystkim na chorobotwórczości drobnoustrojów. Jednak już ponad 100 lat temu Ilja Miecznikow zasugerował korzystne oddziaływanie bakterii fermentacji mlekowej na organizm, opierając swoje wnioski na obserwacjach mieszkańców Kaukazu, spożywających znaczne ilości fermentowanego mleka. W tym samym czasie francuski pediatra, Henry Tissier, zaobserwował, że w kale dzieci cierpiących na biegunki znajdują się niewielkie ilości charakterystycznych, rozwidlonych („bifid”) bakterii, przyjmujących kształt litery Y, podczas gdy u dzieci zdrowych jest ich znacznie więcej. Na podstawie tych obserwacji wysnuł hipotezę o pozytywnym wpływie tych bakterii na zdrowie dzieci, a nawet zasugerował suplementację szczepami bifidobakterii w celu zapobiegania i leczenia biegunek [FAO/WHO 2001b; Schrezenmeir i in. 2001; Kubiszewska i in. 2014]. Od czasu pierwszych odkryć w zakresie korzystnego działania bakterii na organizm ludzi, wiedza na temat probiotyków znacznie się rozwinęła, chociaż nadejście ery antybiotyków po wykryciu penicyliny przez Aleksandra Fleminga odsunęło na jakiś czas rozwój badań nad prozdrowotnymi właściwościami bakterii.

Słowo probiotyk wywodzi się z greckiego „pro bios” i w dosłownym znaczeniu oznacza „dla życia”, jednak definicja probiotyku ulegała wielokrotnym modyfikacjom. W 1965 roku termin ten po raz pierwszy pojawił się w definicji Lily i Stillwell [1965], którzy zastosowali pojęcie probiotyku w odniesieniu do metabolitów wytwarzanych przez mikroorganizmy, wspomagających wzrost innych drobnoustrojów. Definicja ta nie spotkała się jednak z akceptacją, stąd też pojawiły się kolejne. W 1971 r. Spertie określił mianem probiotyków ekstrakty tkankowe stymulujące wzrost bakterii, a w 1974 r. Parker po raz pierwszy użył definicji probiotyku w sensie, jaki znamy do dziś, mówiąc, że są to „organizmy i substancje

wnoszące swój wkład w zachowanie równowagi mikroflory jelitowej”. W 1989 r. Fuller rozwinął to pojęcie jako „suplement pokarmowy zawierający żywe drobnoustroje, który w sposób dobroczynny oddziałuje na gospodarza zwierzęcego poprzez poprawienie jego mikrobiologicznej równowagi jelitowej”.

Obecnie, probiotyki zgodnie z FAO oraz WHO [2001], są to żywe komórki mikroorganizmów, które podane w odpowiednich ilościach korzystnie wpływają na zdrowie gospodarza. Drobnoustroje te podawane są w formie pojedynczych lub mieszanych kultur bakterii, wpływając pozytywnie na równowagę mikrobioty zasiedlającej przewód pokarmowy konsumenta. Idea probiozy zyskała w ostatnich latach wielu zwolenników, co można zaobserwować poprzez szerokie spektrum zastosowania probiotyków w medycynie i weterynarii [Cho, Zhao i Kim 2011; Grover i in. 2012; Mizak i in. 2012].

Preparaty probiotyczne wykorzystywane w suplementacji ludzi i zwierząt stanowią czyste kultury jednego lub większej ilości szczepów drobnoustrojów, pochodzących głównie z ich przewodów pokarmowych. Szczepy mikroorganizmów probiotycznych w obrębie jednego gatunku może cechować zróżnicowane oddziaływanie, funkcje jak i aktywność enzymatyczna. Niezbędne są jednak szczegółowe badania *in vitro* i *in vivo* w celu określenia czy wybrany mikroorganizm można zakwalifikować jako probiotyczny [Ouwehand i in. 1999; Ray 2001].

Bezpieczeństwo stosowania probiotyków wiąże się z przeprowadzeniem szeregu badań dotyczących pozyskania i charakterystyki tych mikroorganizmów. Szczegółowe wytyczne dla probiotyków w żywności zostały opracowane przez Grupę Ekspertów FAO/WHO w 2002 roku. Ponieważ uważa się, że cechy probiotyczne są szczepozależne, w pierwszej kolejności należy zidentyfikować mikroorganizm za pomocą metod fenotypowych i genotypowych. Dokument „Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food” zawiera wskazania dotyczące badań funkcjonalności bakterii, podkreśla również konieczność oceny bezpieczeństwa badanych szczepów [FAO/WHO 2002].

Kryteria opracowane przez EFSA, FAO oraz WHO determinujące cechy mikroorganizmu probiotycznego obejmują aspekty bezpieczeństwa, funkcjonalności oraz właściwości technologicznych.

Wytyczne dotyczące bezpieczeństwa stosowania probiotyków obejmują:

- udokumentowane pochodzenie,
- ściśle określoną przynależność do rodzaju i gatunku potwierdzoną metodami biologii molekularnej,
- brak danych o powiązaniu z chorobami infekcyjnymi przewodu pokarmowego i serca,
- brak genów oporności na antybiotyki.

Kryteria funkcjonalne, jakie bakterie muszą spełniać w procesie selekcji są następujące:

- wytwarzanie substancji przeciwdrobnoustrojowych - antagonizm wobec mikroorganizmów patogennych,
- adhezja do nabłonka jelita i zdolność kolonizacji jelita gospodarza,
- konkurencyjność w stosunku do mikrobioty jelitowej,
- oporność na substancje przeciwdrobnoustrojowe wytwarzane przez mikrobiotę jelitową,
- stymulacja odpowiedzi immunologicznej,
- udokumentowane właściwości prozdrowotne.

Z punktu widzenia technologicznego bakterie probiotyczne wykazywać muszą:

- dobre właściwości wzrostowe umożliwiające łatwe uzyskiwanie dużej ilości biomasy,
- przeżywalność podczas procesów związanych z utrwalaniem preparatów probiotycznych jak zamrażanie, liofilizacja czy suszenie rozpyłowe,
- przeżywalność w okresie przydatności produktu do spożycia,
- brak wpływu na właściwości organoleptyczne gotowych produktów,
- stabilność genetyczna i utrzymywanie biologicznej aktywności zarówno w trakcie procesów produkcyjnych jak i podczas przechowywania.

Powyższe wymagania wskazują, że zakres badań dotyczących oceny przydatności danego mikroorganizmu jako potencjalnie probiotycznego jest bardzo szeroki [Schrezenmeir i de Vrese 2001; FAO/WHO 2002; EFSA 2008a; 2012; FAO 2016b]. Przede wszystkim powinny to być mikroorganizmy bezpieczne, o czym świadczy nadanie im statusu GRAS lub QPS. Status GRAS, stanowiący skrót wyrażenia „ogólnie uważane

za bezpieczne”, nadawany jest przez Agencję Żywności i Leków (ang. FDA – Food and Drug Administration). Jest to definicja stosowana w USA, jak również respektowana na świecie. Każda substancja celowo wykorzystywana do fortyfikacji żywności, w tym mikroorganizmy, stanowi dodatek obligatoryjnie objęty obowiązkiem zatwierdzenia przez FDA przed wprowadzeniem na rynek. Pozytywna opinia wydana przez FDA dla danego produktu spożywczego lub leku jest uznawana za wyznacznik jakości i potwierdzenie braku negatywnego wpływu na zdrowie. Dotyczy to również dodatków do żywności, które muszą być bezpieczne w warunkach użytkowania zgodnie z przeznaczeniem. Nadając bakteriom probiotycznym status GRAS, organizacja FDA umieszcza je na liście bezpiecznych dodatków do żywności, opracowanej pierwotnie przez Kongres Stanów Zjednoczonych w 1958 roku. System QPS to podejście zbliżone w koncepcji i celu do GRAS, zmodyfikowane i uwzględniające zróżnicowane praktyki regulacyjne w Europie. Od 2007 roku QPS jest sugerowane jako narzędzie pracy w ramach EFSA, mające na celu ocenę bezpieczeństwa różnych czynników biologicznych oraz harmonizację podejścia zróżnicowanych Paneli i Jednostek [EFSA 2005; EFSA 2007; Leuschner i in. 2010].

Warto również podkreślić, że znane obecnie mikroorganizmy o właściwościach probiotycznych charakteryzują się znaczną różnorodnością, dlatego też są klasyfikowane według różnych kryteriów [FAO 2016b]:

a. bakterie i grzyby

- bakterie: do grupy mikroorganizmów probiotycznych zaliczane są głównie zróżnicowane morfologicznie bakterie
 - niewytwarzające spor: *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp.,
 - sporulujące: m.in. *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* [Alexopoulos i in. 2004; Ahmed i in. 2014].
- drożdże: m.in. *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardi*, *Candida pintolopesii* [Daskiran i in. 2012; Bai i in. 2013; Rahman i in. 2013]
- grzyby strzępkowe: m.in. *Aspergillus oryzae*, [Daskiran i in. 2012; Shim i in. 2012]

b. liczba zastosowanych mikroorganizmów. Kompozycja produktów probiotycznych obejmuje produkty zawierające zarówno jeden szczep jak i zestawienie wielu. Dominują produkty wieloszczepowe skomponowane wyłącznie na bazie szczepów bakterii, bądź drożdży probiotycznych, jak również kultury mieszane wykorzystujące zarówno bakterie jak i drożdże.

c. pochodzenie mikroorganizmów

- allochtoniczne pochodzenie mikroorganizmów niewystępujących naturalnie w mikrobiocie jelitowej.
- autochtoniczne pochodzenie mikroorganizmów naturalnie występujących w mikrobiocie przewodu pokarmowego.

Bioróżnorodność probiotyków wynika przede wszystkim z faktu, iż każdy mikroorganizm charakteryzuje się określonymi właściwościami i zakresem działania. Umożliwia to zarazem rozwiązywanie określonych problemów zdrowotnych ludzi i zwierząt. Zwykle jednak podstawowe znaczenie mają właściwości przeciwdrobnoustrojowe, stąd też cecha ta należy do głównych kryteriów wyboru większości znanych drobnoustrojów probiotycznych, podobnie jak w prezentowanej pracy.

2.1. Bakterie fermentacji mlekowej jako potencjalne mikroorganizmy probiotyczne

Jedną z głównym grup bakterii, wśród których poszukuje się potencjalnych probiotyków są bakterie fermentacji mlekowej (LAB). Są to Gram-dodatnie, nieruchliwe, niesporulujące (wyjątek stanowi *Sporolactobacillus inulinus*), ziarniaki lub pałeczki. Komórki bakteryjne gatunków bakterii fermentacji mlekowej przyjmują charakterystyczne dla nich układy morfologiczne. Ziarniaki układają się głównie w tetrazy lub paciorkowce, natomiast pałeczki różnią się kształtem i długością, począwszy od długich, prostych i wąskich, poprzez wygięte, aż do krótkich i grubych form. Pałeczki mogą występować pojedynczo lub układać się w formy rozgałęzione. Kształt komórek bakterii zależy jest m.in. od wieku hodowli jak i składu podłoża hodowlanego [Schlegel 2004; Vos i in. 2009].

Gatunki bakterii fermentacji mlekowej zgodnie z zapisem Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [Vos i in. 2009] przyporządkowane są do dwóch rzędów w obrębie gromady *Firmicutes*: *Lactobacillales* i *Bacillales*. Do grupy bakterii fermentacji mlekowej zalicza się również bakterie z rodziny *Bifidobacteriaceae*. Środowisko naukowców jest jednak podzielone, czy należy je do tej grupy przyporządkować. Mikroorganizmy te są bowiem filogenetycznie odległe od drobnoustrojów z gromady *Firmicutes* [Vos i in. 2009; Rzepkowska, Zielińska i Kołożyn-Krajewska 2014]. Taksonomia bakterii fermentacji mlekowej oraz bifidobakterii o właściwościach bakterii mlekowych zawarta została w tabeli 1.

Tabela 1. Taksonomia bakterii fermentacji mlekowej

Gromada	Klasa	Rząd	Rodzina	Gatunek
Firmicutes	Bacilli	<i>Bacilliales</i>	<i>Sporolactobacillaceae</i>	<i>Sporolactobacillus</i>
		<i>Lactobacillales</i>	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus,</i> <i>Paralactobacillus,</i> <i>Pediococcus</i>
			<i>Aerococcaceae</i>	<i>Aerococcus,</i> <i>Abiotrophia,</i> <i>Dolosicoccus,</i> <i>Eremococcus,</i> <i>Facklamia,</i> <i>Globicatella,</i> <i>Ignavigranum</i>
			<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Carnobacterium,</i> <i>Alkalibacterium,</i> <i>Allofustis,</i> <i>Alloiococcus,</i> <i>Atopobacter,</i> <i>Atopostipes,</i> <i>Desemzia,</i> <i>Dolosigranum,</i> <i>Granulicatella,</i> <i>Isobaculum,</i> <i>Marinilactibacillus,</i> <i>Trichococcus</i>
			<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus,</i> <i>Melissococcus,</i> <i>Tetragenococcus,</i> <i>Vagococcus</i>
			<i>Leuconostocaceae</i>	<i>Leuconostoc,</i> <i>Oecococcus,</i> <i>Weisella</i>
			<i>Streptococcaceae</i>	<i>Streptococcus,</i> <i>Lactococcus,</i> <i>Lactovum</i>
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Bifidobacteriales</i>	<i>Bifidobacteriaceae</i>	<i>Bifidobacterium</i>

Źródło: opracowanie własne na podstawie Vos i in. [2009]

Bakterie fermentacji mlekowej przypisane są głównie do rzędu *Lactobacillales*. Mikroorganizmy z rodziny *Lactobacillaceae* charakteryzuje mikroaerofilny lub beztlenowy typ oddychania. Bakterie te, zwłaszcza paciorkowce, pomimo, że nie zawierają hemin (cytochromów i katalazy), wykazują wzrost w obecności tlenu. Rosną w szerokim zakresie temperatur, od 5 do 55°C, chociaż ich optimum temperaturowe stanowi 30 do 40°C. Należą do grupy drobnoustrojów acydofilnych, a ich optymalne pH wzrostu wynosi ok. 5,5-6,2. Charakterystyczną cechą bakterii fermentacji mlekowej jest brak zdolności do wytwarzania enzymu katalazy, syntetyzują natomiast dysmutazę nadtlenkową [Tannock 1999; Kunicki-Goldfinger 2007; Pfeiler i Klaenhamer 2007].

Bakterie fermentacji mlekowej do rozwoju potrzebują bogatych w składniki odżywcze kompleksowych podłoży, zawierających związki azotowe, węglowodany, kwasy tłuszczowe lub ich estry oraz pochodne kwasów nukleinowych. Większość wymaga do wzrostu również dodatku witamin (np. kwasu pantotenowego, kwasu foliowego czy biotyny), aminokwasów oraz puryn, toteż podłoża do hodowli zawierają zazwyczaj duże ilości ekstraktu drożdżowego lub soku pomidorowego. Przystosowanie bakterii fermentacji mlekowej do wzrostu w kwaśnym środowisku sprawiło, że drobnoustroje te zatraciły zdolność syntezy wielu metabolitów. Charakterystycznym jest jednak umiejętność metabolizowania laktozy, co stanowi przykład adaptacji do środowiska bytowania. Z grupy węglowodanów drobnoustroje te fermentują także glukozę, maltozę, a poszczególne gatunki także sacharozę, inulinę, mannitol, galaktozę i dekstryny. Dodatek węgla wapnia do podłoża odżywczego skutkuje obserwacją przejrzystych stref wokół kolonii, co jest powiązane z wytwarzaniem kwasów organicznych [Schlegel 2004; Ray 2001].

Nazwa bakterii fermentacji mlekowej, zwanych również bakteriami kwasu mlekowego lub, bardziej potocznie, bakteriami mlekowymi, pochodzi od dominującego produktu beztlenowej fermentacji cukrów - kwasu mlekowego. Na podstawie produktów fermentacji glukozy bakterie z tej grupy kwasu mlekowego z rodziny *Lactobacillaceae* można podzielić na homofermentatywne i heterofermentatywne. Homofermentatywne bakterie wytwarzają głównie kwas mlekowy (wydajność $\geq 85\%$), natomiast heterofermentatywne poza kwasem mlekowym (wydajność 50%) cechuje produkcja m.in. innych kwasów organicznych, etanolu, dwutlenku węgla, bakteriocyn czy też glicerolu [Schlegel 2004; Gwiazdowska i Trojanowska 2005].

Wspomniane wcześniej bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* również charakteryzuje produkcja kwasu mlekowego. Bakterie te mają kształt pałeczek układających się w formy rozgałęzione przypominające litery V oraz Y, są bezwzględnie beztlenowcami, które do wzrostu wymagają co najmniej 10% wysycenia dwutlenkiem węgla. Wyjątek stanowią bakterie *Bifidobacterium psychraerophilum*, *Bifidobacterium scardovii* oraz *Bifidobacterium tsurumiense* wykazujące wzrost w warunkach tlenowych [Okamoto i in. 2008]. Większość szczepów wykazuje optymalny wzrost w temperaturze 37–41°C w środowisku o pH 6,5–7,0. Te heterofermentatywne mikroorganizmy dominują w układach pokarmowych nowonarodzonych ssaków, w tym ludzi. Ich siedliska stanowią również przewody pokarmowe ptaków, a nawet gnijące błoto [Ray 2001; Schlegel 2004; Biavati i Mattarelli 2015].

Środowiskiem bytowania bakterii fermentacji mlekowej są mleko i jego surowce. Mogą być nim również zdrowe lub gnijące rośliny, zróżnicowane surowce roślinne jak również błony śluzowe i układ pokarmowy ludzi i zwierząt stałocieplnych. W przemyśle rolno-spożywczym procesy fermentacyjne są powszechnie wykorzystywane do otrzymywania produktów o wysokich walorach sensorycznych i żywieniowych, jak również do przedłużania trwałości żywności i pasz. Dlatego bakterie fermentacji mlekowej znalazły zastosowanie w produkcji fermentowanych produktów mlecznych, roślinnych i mięsnych. Wynika to głównie z naturalnej obecności tej grupy drobnoustrojów na powierzchni różnych surowców, co podnosi wydajność procesów fermentacyjnych. [Schlegel 2004]. Najszerszy asortyment stanowią fermentowane produkty mleczne takie jak mleko kwaśne, kefir, jogurt czy kumys, a także szeroka gama produktów na bazie mleka, np. sery [Schlegel 2004; Kunicki-Goldfinger 2007]. Inną grupą produktów, w której te mikroorganizmy ma zastosowanie, są fermentowane produkty warzywne, spośród których dominują kiszzone i marynowane ogórki, kapusta, oliwki czy kapary. Produkty te, na drodze fermentacji, zostają wzbogacone o kwas mlekowy, który hamuje rozwój mikroorganizmów niepożądanych, a zarazem przedłuża ich trwałość. Produkcja fermentowanych przetworów mięsnych, takich jak wędliny, salami, mięsa i kiełbasy dojrzewające, także wykorzystuje aktywność biologiczną bakterii fermentacji mlekowej. Stosowane w tych produktach szczepy powinny charakteryzować się przede wszystkim zdolnością do szybkiej fermentacji, wysoką tolerancją względem zawartości soli, azotynów czy też stosowanych przypraw. Bakterie te znalazły również zastosowanie w produkcji chleba oraz past i sosów z fermentowanych ryb [Schlegel 2004; Sawitzki i in. 2007; Theron i Lues 2011].

Zdolność do szybkiego obniżania pH środowiska, jak również produkcja szerokiej gamy metabolitów o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych przez bakterie fermentacji mlekowej, znalazło dodatkowo zastosowanie w przemyśle fermentowanych pasz objętościowych. Produkcja kiszzonek paszowych, stanowiących ważne źródło pokarmowe zwierząt hodowlanych, charakteryzuje się większą efektywnością przy wykorzystaniu bakterii fermentacji mlekowej, jako stymulatorów fermentacji. Otrzymane w ten sposób kiszkonki paszowe charakteryzują się lepszymi walorami sensorycznymi i odżywczymi, oraz zwiększonym bezpieczeństwem związanym z ograniczeniem wzrostu niepożądanego mikrobioty. Dodatki kiszkonkarskie stanowią najczęściej mieszankę bakterii homofermentatywnych (głównie *L. plantarum*) i heterofermentatywnych (np. *L. buchnerii*).

Dodatkowo w preparatach kiszonkarskich można znaleźć takie szczepy bakterii, jak *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei*, *L. brevis*, *Enterococcus fecium*, *Pediococcus cerevisiae* czy *P. acidilactici*.

Aktualnie, nieliczne bakterie fermentacji mlekowej zaliczane są do grupy mikroorganizmów probiotycznych, które znalazły zastosowanie w żywieniu, suplementowaniu i leczeniu ludzi [Leroy i De Vuyst 2004; Sawitzki i in. 2007; Heczko, Strus i Kochan 2008; Neffe i Kołożyn-Krajewska 2010; Nowak i in. 2010] oraz zwierząt hodowlanych [Gajewska i in. 2008; Van Hai i in. 2009; Gaggia, Mattarelli i Biavati 2010]. Należy podkreślić, że jedynie wybrane szczepy z danego gatunku, o ściśle określonych cechach, charakteryzują się prozdrowotnymi właściwościami, potwierdzonymi badaniami klinicznymi. Bakterie fermentacji mlekowej o cechach probiotycznych poddawane muszą być szczegółowej selekcji ze względu na konieczność określenia ich korzystnego oddziaływania na układ trawienny gospodarza zgodnie ze wspomnianymi wcześniej procedurami. Bezpieczeństwo stosowania tych mikroorganizmów jest potwierdzone nadaniem określonym szczepom statusu GRAS (ang. *Generally Recognised As Safe*) oraz wpisaniem na listę produktów QPS.

3. Probiotyki w żywieniu zwierząt

W ostatnich latach probiotyki coraz częściej stosuje się jako suplementy w żywieniu zwierząt różnych gatunków, głównie hodowlanych jak krowy, owce, świnie, drób, konie, ale także u zwierząt domowych jak psy i koty. Wykorzystuje się je również w hodowlach ryb, krewetek, zwierząt futerkowych, a nawet pszczół. Oddziaływanie prozdrowotne preparatów probiotycznych zostało docenione przez weterynarzy, zoologów jak również hodowców na całym świecie. Drobnoustroje probiotyczne mogą być stosowane w różnych formach dodatków paszowych, m.in. w postaci sproszkowanej, płynnej, past, kapsułek czy też granulatu, wchodzi ponadto w skład mieszanek zakiszających pasze dla zwierząt [Nowak, Śliżewska i Libudzisz 2010].

Mechanizm prozdrowotnego oddziaływania szczepów probiotycznych wobec zwierząt jest wielokierunkowy i złożony. W dużej mierze zależy to od rodzaju drobnoustrojów wchodzących w skład preparatu i wykazywanych przez nie właściwości.

Jednym z zasadniczych sposobów działania probiotyków na organizm zwierząt jest modyfikacja składu mikrobioty jelitowej. Warunkiem prawidłowo funkcjonującego układu pokarmowego jest odpowiedni skład mikroorganizmów, determinowany przez

czynniki takie jak wiek, stan zdrowia, sposób żywienia, cechy osobnicze, stres czy podatność organizmu na infekcje. Zdrowe ssaki w swych przewodach pokarmowych zawierają przeważającą ilość mikroorganizmów korzystnie oddziałujących na zdrowie gospodarza. W zależności od odcinka przewodu pokarmowego liczba i skład mikrobioty znacznie się różni. W żołądku, ze względu na niskie pH środowiska, ilość bytujących drobnoustrojów jest ograniczona do poziomu ok. 10^3 jtk/cm³, przy czym są to głównie Gram-dodatnie, tlenowe mikroorganizmy. W dalszej części przewodu pokarmowego ilość mikroorganizmów wzrasta do ilości 10^5 jtk/cm³. Najliczniej skolonizowanym odcinkiem układu pokarmowego ssaków jest jelito grube, które stanowi siedlisko ok 1 biliona jtk/cm³ drobnoustrojów, głównie bakterii beztlenowych. Jelita stanowią środowisko bytowania ok. 400-500 gatunków mikroorganizmów, a zróżnicowanie gatunkowe jak i duża ilość komórek umożliwia uznanie tego mikrobiomu za aktywny metabolicznie [Macfarlane i Macfarlane 2004; Tuohy i in. 2005; Woźniak-Kosek i Jarosz 2005]. Mikrobiota kału zwierząt monogastrycznych składa się z takich rodzajów mikroorganizmów jak: *Bacterioides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Lactobacillus*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus* oraz bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae* [Mizak i in. 2012]. Kluczowym znaczeniem zrównoważonej mikrobioty przewodu pokarmowego zwierząt jest jej udział w procesach trawienia i wchłaniania składników pokarmowych. Układ jakościowy i ilościowy mikrobiomu jelitowego ssaków może ulegać zmianom w wyniku zakażeń bakteryjnych i wirusowych, przyjmowanych leków, głównie antybiotyków czy też chemioterapeutyków [Woźniak-Kosek i Jarosz 2005; Ley i in. 2008]. Zachwianie lub zniszczenie tzw. efektu bariery poprzez zaburzenie mikrobioty endogennej jelit doprowadza do zasiedlenia dolnych partii przewodu pokarmowego przez drobnoustroje patogenne. Dochodzi wówczas do naruszenia i uszkodzenia błony śluzowej, co stanowi zagrożenie dla zdrowia zwierzęcia, ponieważ niesie za sobą translokację bakterii chorobotwórczych i toksyn do krwi [Trafalska i Grzybowska 2004].

Probiotyki mogą wpłynąć na zmianę dynamiki populacji drobnoustrojów w układzie pokarmowym bilansując liczebność mikrobioty korzystnej i szkodliwej dla organizmu [Mountzouris i in. 2007; An i in. 2008; Mountzouris i in. 2009]. Najczęściej zmiana składu jakościowego populacji mikroorganizmów w jelitach polega na wzroście liczby bakterii z rodzajów *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* oraz jednoczesnym spadku liczby bakterii z grupy coli, w tym *Escherichia coli* [Mountzouris i in. 2010; Samli i in. 2010; Zhang i in. 2011; Hung

i in. 2012; Khaksar, Golian i Kermanshahi 2012; Shim i in. 2012; Yang i in. 2012a; Cao i in. 2013; Landy i Kavyani 2015; Mookiah i in. 2014; Zhang i Kim 2014].

Wpływ na zmiany składu populacji w mikrobiomie przewodu pokarmowego zwierząt ma określona aktywność biologiczna wprowadzanych drobnoustrojów probiotycznych. Wiąże się to m.in. z wytwarzaniem substancji przeciwdrobnoustrojowych, takich jak kwasy organiczne czy bakteriocyny [Shim i in. 2012]. Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, w szczególności kwas mlekowy i octowy mają działanie hamujące rozwój patogenów, a ponadto regulują pH środowiska obniżając jego wartość do poziomu letalnego dla bakterii chorobotwórczych [Commane i in. 2005; Fayol-Messaoudi i in. 2005; Daşkıran i in. 2012]. Bakteriocyny i inne metabolity przeciwdrobnoustrojowe, jak nadtlenek wodoru, również wpływają na ograniczenie wzrostu mikroorganizmów niepożądanych. Dodatkowo, probiotyki wykazują zdolność adhezji do nabłonka jelitowego, mogą również zakłócać procesy komunikowania się bakterii patogennych m.in. poprzez mechanizm *quorum sensing*. Tym samym probiotyki hamują rozwój drobnoustrojów chorobotwórczych i zapobiegają ich kolonizacji [Jin i in. 1996; Kawai i in. 2004; Medellin-Peña i in. 2007; Mookiah i in. 2014]. Dzięki takiej aktywności, obserwuje się np. skrócenie czasu rekonwalescencji po przebyciu chorób czy też zmniejszenie skutków ubocznych w przypadku antybiotykoterapii. Ponadto, dane literaturowe wskazują również na możliwość nieswoistej stymulacji układu odpornościowego zwierząt, co stanowi kolejny korzystny efekt stosowania mikroorganizmów probiotycznych [Schrezenmeir i de Vrese 2001]. Pośród funkcjonalnych właściwości bakterii probiotycznych badania z ostatnich lat wskazują na przeciwnowotworowe oddziaływanie tych mikroorganizmów. Jest to związane z konkurencją w obrębie mikrobiomu przewodu pokarmowego zwierząt i ograniczeniem rozwoju bakterii produkujących enzymy fekalne o działaniu prokancerogennym [Rautray i in. 2011; Kumar i in. 2015].

Pomimo, iż większość mechanizmów działania probiotyków na organizm zwierząt nie została jeszcze w pełni poznana, wymienia się wiele korzyści związanych z ich stosowaniem. Prawidłowy skład populacji bakterii w przewodzie pokarmowym, wspomagany stosowaniem probiotyków, jest często związany ze zwiększoną wydajnością zwierząt, wpływając na bardziej efektywne trawienie i wzrost odporności [Niba i in. 2009; Hung i in. 2012]. Obserwuje się także wspomaganie zwalczania chorób.

3.1. Probiotyki w hodowli drobiu

Stosowanie dodatków probiotycznych w hodowli drobiu może nieść ze sobą wymierne korzyści. Często stwierdza się poprawę wydajności i produktywności na skutek stosowania probiotyków w paszy, przypisując te efekty zwiększonemu spożyciu paszy i poprawie jej wykorzystania. Obserwuje się przy tym różne efekty np. zwiększenie spożycia paszy, bez znaczącej poprawy wskaźnika wykorzystania paszy (ang. *Feed Conversion Rate*) [Afsharmanesh i Sadaghi 2014] jak również poprawę wskaźnika FCR bez istotnych różnic w spożyciu paszy [Mountzouris i in. 2010; Shim i in. 2012; Zhang i in. 2012; Zhang i Kim 2014] czy też zwiększenie spożycia paszy wraz ze znaczną poprawą wskaźnika FCR [Landy i Kavayani 2015]. Intensywniej przebiegający proces trawienia może być związany ze wzrostem aktywności enzymów. Przykładowo, w badaniach Jin i in. [2000] obserwowano 42% wzrost aktywności amylazy po zastosowaniu *L. acidophilus*, chociaż nie stwierdzono zmian aktywności enzymów lipolityczny i proteaz. Podobne rezultaty opisywali również Collington, Parker i Armstrong [1990].

Mikroorganizmy probiotyczne zwiększają także kontrolę mikroorganizmów chorobotwórczych, dzięki czemu mogą zapobiegać wystąpieniu chorób, takich jak salmonelloza, kampylobakterioza czy też kokcydioza [Zhang i Kim 2014; Lei i in. 2015; FAO 2016b].

Jak wskazują badania różnych autorów, probiotyki mogą oddziaływać pozytywnie na jakość i wydajność tuszy drobiowej. Badania *in vivo* potwierdzają zwiększenie zatrzymania wody, wzrost kruchości mięsa jak również zawartości tłuszczu wokół mięśni. Wyniki badań zależne są zarówno od stosowanych szczepów probiotycznych jak i rasy badanych ptaków [Zhou i in 2010; Abdel-Rahman i in. 2013; Zhao i in. 2013]. Niejasne są natomiast doniesienia na temat wpływu probiotyków na efektywność znoszenia jaj i ich jakość, chociaż wielu autorów podkreśla zmniejszenie ilości cholesterolu w żółtku jaj, co odnotowano po zastosowaniu bakterii fermentacji mlekowej [Haddadin i in. 1996; Panda i in. 2003], bakterii *Bacillus* sp. [Kurtoglu i in. 2004] i drożdży [Yousefi i Karkoodi 2007].

3.2. Probiotyki w hodowli trzody chlewnej

W żywieniu prosiąt najczęściej opisywanym efektem stosowania probiotyków jest ograniczenie śmiertelności w okresie odsadzeniowym i okołoodsadzeniowym [Takahashi i in. 2007; Modesto i in. 2009], jak również łagodzenie biegunek wywołanych

przez bakterie *E. coli*, wzrost produkcji przeciwciał i regulację produkcji cytokin [Scharek i in. 2007; Zhang i in. 2010]. Biegunki powodowane przez enterotoksyczne szczepy *E. coli*, są jednym z głównych problemów zdrowotnych u świń w okresie okołoodsadzeniowym na całym świecie, powodując znaczne straty ekonomiczne poprzez zwiększenie śmiertelności, zmniejszenie tempa wzrostu i powiązane z tym koszty weterynaryjne [Fairbrother, Nardeau i Gyles 2005]. Obserwuje się pozytywny wpływ probiotyków nie tylko na zmniejszenie częstości występowania biegunek, ale również łagodzenie ich przebiegu. Efekty takie opisano m.in. po zastosowaniu preparatów zawierających *B. licheniformis* [Kyriakis i in. 1999] czy *B. toyonensis* [Taras i in. 2005; Kantas i in. 2015]. Wykazano, że bakterie probiotyczne takie jak *L. sobrius* [Konstantinov i in. 2008] czy *L. paracasei* [Bomba i in. 2002] ograniczają kolonizację jelit przez chorobotwórcze szczepy *E. coli*, co eliminuje lub zmniejsza nasilenie infekcji.

W odniesieniu do cech produkcyjnych, po zastosowaniu probiotyków, obserwowano poprawę parametrów wydajności tuczników, poprawę jakości tuszy, poprawę wykorzystania składników pokarmowych i zwiększenie przyrostu masy ciała, a także zwiększenie odporności na stres [Alexopoulos i in. 2007; Konstantinov i in. 2008]. Trzeba jednak podkreślić, że autorzy wskazują, iż poszczególne efekty są w dużej mierze zależne od zastosowanego mikroorganizmu lub ich kombinacji, ale zależą również od innych czynników, jak sposób żywienia zwierząt czy ich wiek.

4. Regulacje prawne dotyczące dodatków paszowych zawierających probiotyki

Wymagania dotyczące stosowania mikroorganizmów jako dodatków paszowych zostały uregulowane w Rozporządzeniu nr 1831/2003 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 22 sierpnia 2003 r. w sprawie dodatków stosowanych w żywieniu zwierząt. W późniejszym czasie dokument ten został zastąpiony Rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady nr 767/2009 z dnia 13 lipca 2009 r. Powyższe akty prawne określają m.in. zasady i warunki stosowania, monitorowania, etykietowania czy też pakowania dodatków paszowych. Zapisy w dokumentach wskazują, iż jedynie dodatki zatwierdzone w ramach procedury z niniejszych rozporządzeń mogą zostać wprowadzone do obrotu, stosowane oraz przetwarzane w żywieniu zwierząt na ściśle określonych warunkach. Zdefiniowano pojęcie dodatku paszowego oraz wytyczne dotyczące jego właściwości. Według Rozporządzenia z 22 sierpnia 2003 r. stanowią go „*substancje, drobnoustroje lub preparaty, inne niż materiał paszowy i premiksy, które są celowo dodawane do paszy lub wody w celu*

pełnienia, w szczególności, jednej lub więcej funkcji wymienionych w art. 5 ust. 3". W rozporządzeniu wskazano, że dodatek paszowy nie może negatywnie oddziaływać na zdrowie zarówno ludzi, zwierząt jak i środowisko. Preparat taki nie może również być szkodliwy dla konsumenta, poprzez wpływ na cechy produktów pochodzenia zwierzęcego. Określone zostały także wymagania, jakie musi spełnić dodatek paszowy, m.in. korzystny wpływ na właściwości i cechy paszy, środków spożywczych pochodzenia zwierzęcego oraz na środowisko. Preparat stanowiący dodatek do pasz powinien także pozytywnie wpływać na mikrobiotę przewodu pokarmowego i na strawność paszy, a także zaspokajać potrzeby żywieniowe zwierząt oraz charakteryzować się działaniem kokcydiostatycznym lub histomonostatycznym. W niniejszym akcie prawnym wskazano ponadto podział dodatków na kategorie w zależności od jego funkcji i właściwości. Bakterie probiotyczne kwalifikują się jako „dodatek zootechniczny - wszystkie dodatki stosowane, aby wpłynąć korzystnie na cechy użytkowe ze względu na dobry stan zdrowia zwierząt lub korzystnie wpłynąć na środowisko” [Rozporządzenie UE 1831/2003 z dnia 22 sierpnia 2003 r.].

Procedura wprowadzania do obrotu dodatku paszowego, jak również modyfikacja lub przedłużanie zezwoleń na obrót dodatków wymaga szeregu czynności administracyjnych, które także podano w tekście omawianego aktu prawnego i szeregu aktów wykonawczych. Zezwolenia udzielane są dla określonych gatunków zwierząt, wyspecyfikowanych warunków stosowania, na okres dziesięciu lat. Za przeprowadzenie oceny wniosku rejestracyjnego odpowiedzialny jest Europejski Urząd do spraw Bezpieczeństwa Żywności, wspierany przez Unijne Laboratorium Referencyjne do spraw Dodatków Paszowych (EURL FA). Po pozytywnej opinii EFSA Komisja Europejska przygotowuje projekt rozporządzenia o wydaniu zezwolenia, zgodnie z procedurą i udziałem państw członkowskich w ramach Stałego Komitetu ds. Łańcucha Żywnościowego i Zdrowia Zwierząt [Rozporządzenie UE 1831/2003 z dnia 22 sierpnia 2003 r.; Rozporządzenie UE 767/2009 z dnia 13 lipca 2009r.; Kwiatek, Osiński i Walczak 2012].

5. Rynek produktów probiotycznych

Produkcja dodatków paszowych zawierających mikroorganizmy probiotyczne należy do dynamicznie rozwijających się gałęzi w przemyśle rolno-spożywczym. Dynamiczny wzrost tego rynku związany jest m.in. z wprowadzonym w 2006 roku, w krajach Unii Europejskiej, zakazem stosowania antybiotykowych stymulatorów wzrostu w produkcji zwierzęcej. Najważniejsze cele stosowania probiotyków w żywieniu zwierząt to utrzymanie

i poprawa wydajności produkcji zwierzęcej oraz zapobieganie i zwalczanie rozwoju mikroorganizmów chorobotwórczych. W kontekście rosnącego zainteresowania wykorzystaniem subterapeutycznych dodatków paszowych oraz większej świadomości odnośnie wpływu zrównoważonej mikrobioty jelitowej na wydajności zwierząt, zaobserwowano wzrost produkcji preparatów probiotycznych dla zwierząt. Według raportu Transparency Market Research z Wielkiej Brytanii, przedstawiającego prognozy rozwoju tego rynku do roku 2019, przewidywany skumulowany roczny wskaźnik wzrostu wynosić będzie 7,7%. Tym samym rynek probiotyków dla zwierząt osiągnie wartość 4,4 miliardów USD [Transparency Market Research 2015]. Na podstawie danych najnowszego raportu wykonanego przez Markets and Markets szacuje się, że do 2021 roku wartość rynku dodatków probiotycznych dla zwierząt osiągnie 4,71 miliardów USD przy skumulowanym rocznym wskaźniku wzrostu 7,7% w okresie od 2016 do 2021 roku [Markets and Markets 2016]. Największy udział w segmencie zwierzęcych dodatków paszowych mają probiotyki przeznaczone dla bydła, świń i drobiu. Opracowywanie i wprowadzanie na rynek nowych konkurencyjnych produktów probiotycznych jest przedmiotem współpracy różnych firm. Przykład stanowi współpraca podjęta w maju 2015 roku przez Adisseo i Novozymes, dwóch światowych liderów przemysłu żywienia zwierząt i dodatków paszowych. Firmy te podpisały umowę o współpracy w zakresie opracowania i wprowadzenia na rynek nowego probiotyku przeznaczonego dla drobiu.

W roku 2010 całkowita sprzedaż produktów i suplementów probiotycznych wynosiła 21,6 mld USD, natomiast w roku 2011 wielkość sprzedaży wzrosła o 12% do poziomu 24,23 mld USD. Dynamiczny wzrost tego rynku zawdzięczany jest m.in. rozwojowi rynku dodatków i suplementów diety oraz rosnącemu znaczeniu żywności funkcjonalnej, mającej pożądane działanie prozdrowotne. Na podstawie danych najnowszego raportu wykonanego przez Transparency Market Research [2015] z Wielkiej Brytanii, szacuje się, że w bieżącym roku światowa wartość sprzedaży probiotyków wyniesie 31,1 mld USD.

Aktualnie największy udział w światowym rynku produkcji i sprzedaży produktów probiotycznych posiadają firmy z Europy, Ameryki Północnej oraz Azji, spośród których należy wyszczególnić:

- w Europie: Chr. Hansen A/S (Dania), Danone SA (Francja), Nestlé Nutrition (Szwajcaria), BioGaia AB (Szwecja), Probi AB (Szwecja), Seven Seas Ltd. (Wielka Brytania), Valio Ltd. (Finlandia), Danisco (Dania)

- Ameryce Płn: E.I. du Pont de Nemours and Company (USA), General Mills (USA), Garden of Life LLC (USA), Kirkman (USA), Lifeway Foods, Inc. (USA), Natren, Inc. (USA), Lallemand-Institut Rosell (Kanada)
- w Azji: China-Biotics Inc. (Chiny), Mother Dairy (Indie), Yakult Honsha Co., Ltd. (Japonia).

Spośród ww. firm do pięciu z nich (Danone SA, Yakult Honsha Co. Ltd, Nestlé Nutrition, Chr. Hansen A/S oraz Danisco) należy 35,5% wartości sprzedaży probiotyków.

Zgodnie z danymi zawartymi w raporcie wykonanym przez Markets and Markets w sierpniu 2016 roku, rynek dodatków probiotycznych dla zwierząt zdominowany jest obecnie przez następujące firmy: Lallemand, Inc. (Canada), Koninklijke DSM N.V. (Netherlands), Cargill, Inc. (U.S.), Chr. Hansen Holding A/S (Denmark), E.I. du Pont de Nemours and Company (U.S.), Lesaffre Group (France), Novozymes (Denmark), Advanced BioNutrition Corporation (U.S.), Calpis Co., Ltd. (Japan) oraz Nebraska Cultures Inc. (U.S.) [Markets and Markets 2016].

Polski rynek dodatków paszowych charakteryzuje się obecnością zróżnicowanych preparatów, zawierających w swoim składzie zarówno bakterie fermentacji mlekowej o działaniu probiotycznym, jak i suplementy prebiotyczne. W zadeklarowanym składzie dostępnych produktów probiotycznych można odnotować występowanie bakterii z gatunków *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, jak również drożdże *Saccharomyces* (tab. 2). Z danych informujących o kompozycji komercyjnych preparatów probiotycznych zaobserwować można tendencje stosowania tych samych szczepów bakterii w produktach przeznaczonych dla zróżnicowanych grup zwierząt hodowlanych. Obserwuje się zatem niski stopień zróżnicowania w obrębie stosowanych drobnoustrojów a ilością oferowanych dodatków paszowych i suplementów w portfolio produktowym poszczególnych producentów.

Tabela 2. Wybrane dodatki paszowe zawierające mikroorganizmy probiotyczne

Nazwa handlowa preparatu	Mikroorganizmy wchodzące w skład	Docelowa grupa zwierząt
Lavipan	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Carnobacterium divergens</i>	prosięta drób
Biogen D	<i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Pediococcus faecium</i>	drób

Biogen T	<i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Enterococcus faecium</i>	prosięta tuczniaki warchlaki
Probiomix P-I	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> KKP 830 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> KKP832	prosięta
Biaction	<i>Lactobacillus farciminis</i> MA67-4R	drób trzoda chlewna
Levucell® SB 10ME TITAN	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> typ <i>boulevardii</i> CNCM I-1079	lochy prosięta
Enterocid Duo	<i>Enterococcus faecium</i> DSM10663/NCIMB10415 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CECT5940	drób
Pro-Biotyk (em15)™	<i>Bifidobacterium animalis</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Bifidobacterium longum</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i> (Synonym: <i>Lactobacillus bulgaricus</i>) <i>Lactobacillus fermentum</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactococcus lactis subsp. Lactis</i> (Synonym: <i>Streptococcus lactis</i>) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Streptococcus thermophilus</i>	drób trzoda chlewna bydło konie psy koty ryby
BacterBovis	<i>Lactobacillus acidophilus</i> D2/CSL CECT 4529, <i>Enterococcus faecium</i> NCIMB 10 11181, <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042, <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 7469	przeżuwacze
BacterPig	<i>Lactobacillus acidophilus</i> D2/CSL CECT 4529, <i>Enterococcus faecium</i> NCIMB 11181, <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042, <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 7469	trzoda chlewna
BacterChicken	<i>Lactobacillus acidophilus</i> D2/CSL CECT 4529, <i>Enterococcus faecium</i> NCIMB 11181, <i>Pediococcus 10 acidilactici</i> ATCC 8042, <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 7469.	drób
Growmax	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	drób
Propoul	<i>Lactobacillus fermentum</i> CCM 7158	drób
PROPIG proszek	<i>Lactobacillus plantarum</i> CCM 7102	trzoda chlewna
Pentaprol	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Bifidobacterium pullorum</i>	drób trzoda chlewna

Źródło: opracowanie własne na podstawie Podkówka i Podkówka [1999], Holzapfel i Schillinger [2002], Śliżewska, Biernasiak i Libudzisz [2006]

Biorąc pod uwagę zarówno obserwowane na rynku zwiększone zapotrzebowanie na preparaty o prozdrowotnym działaniu na zwierzęta, jak i widoczne w większości produktów powielanie mikroorganizmów, w prezentowanej pracy podjęto próbę opracowania nowych dodatków paszowych o wielokierunkowym działaniu. Szczególną uwagę poświęcono izolacji i charakterystyce szczepów wchodzących w skład finalnego

preparatu. Projektowane produkty mogą być skierowane do podmiotów reprezentujących rynek producentów dodatków paszowych oraz produktów probiotycznych przeznaczonych dla zwierząt monogastrycznych.

6. Założenia badawcze

Z danych przedstawionych w rozdziale 1 wynika, że zanieczyszczone mikrobiologicznie produkty pochodzenia zwierzęcego mogą stanowić zagrożenie dla życia i zdrowia konsumenta ze względu na możliwość rozprzestrzeniania się mikroorganizmów chorobotwórczych. Ponadto, nowoczesne, intensywne metody chowu, a tym samym duże zagęszczenie zwierząt hodowlanych sprzyjają występowaniu zaburzeń równowagi mikrobioty ich układu pokarmowego. Następstwem mogą być problemy zdrowotne takie jak obniżenie odporności, zakażenia, biegunki, spadek masy ciała, a w ostrych przypadkach zgony. To z kolei prowadzi do strat ekonomicznych ponoszonych przez hodowców. Kontrola równowagi mikrobioty jelitowej stanowi zatem efektywną barierę przeciwdziałającą kolonizacji patogenów w przewodzie pokarmowym. W leczeniu i profilaktyce zaburzeń mikrobioty jelit coraz większe znaczenie zyskują suplementy zawierające bakterie fermentacji mlekowej o właściwościach probiotycznych [Chaucheyras-Durand i Durand 2009].

W projektowaniu tego typu suplementów, ważny jest dobór mikroorganizmów tak, by posiadały one określone właściwości. Selekcja bakterii probiotycznych jest złożona i wymaga przeprowadzenia wielu badań *in vitro*, zanim możliwe będzie przeprowadzenie doświadczeń *in vivo*. Klasyfikacja wybranych bakterii jako probiotycznych, jak już opisano wcześniej, odbywa się na podstawie wytycznych opracowanych przez FAO/WHO [2002]. W niniejszym opracowaniu uwzględniono główne wymagania, jakie muszą spełniać szczepy bakterii probiotycznych: udokumentowane pochodzenie, funkcjonalność oraz dobre właściwości technologiczne [Libudzisz 2008].

6.1. Cel pracy i hipotezy badawcze

Celem niniejszej pracy doktorskiej było opracowanie i kompozycja nowych preparatów, zawierających w swoim składzie odpowiednio wyselekcjonowane szczepy bakterii fermentacji mlekowej, o wielokierunkowym działaniu ze szczególnym uwzględnieniem antagonizmu wobec bakterii chorobotwórczych. Preparaty będą przeznaczone dla zwierząt monogastrycznych, głównie dla trzody chlewnej i drobiu.

Cele szczegółowe

1. Izolacja bakterii fermentacji mlekowej z mikrobioty jelitowej zwierząt monogastrycznych.

2. Selekcja bakterii na podstawie wytycznych FAO/WHO i wybranych wyróżników determinujących funkcjonalność szczepów.
3. Identyfikacja genetyczna wyselekcjonowanych bakterii.
4. Kompozycja biopreparatów w oparciu o bakterie dedykowane wybranym grupom zwierząt monogastrycznych i ocena wybranych właściwości technologicznych.

Jako **tezę** w niniejszej pracy przyjęto założenie, że mikrobiota jelitowa zwierząt monogastrycznych stanowi źródło potencjalnie probiotycznych bakterii przydatnych do skomponowania nowych dodatków paszowych o wielokierunkowym działaniu.

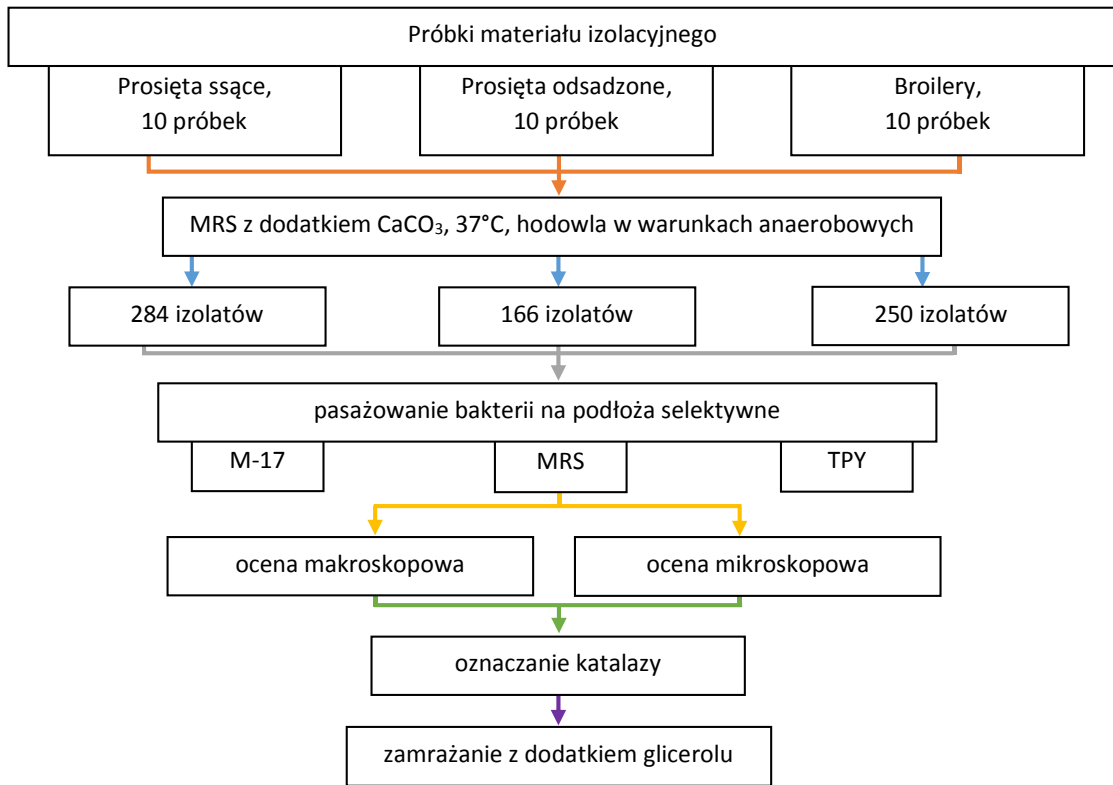
Hipotezy badawcze

1. Właściwości funkcjonalne bakterii fermentacji mlekowej pochodzących z mikrobioty jelitowej zwierząt monogastrycznych są szczezozależne.
2. Odpowiednio wyselekcjonowane bakterie fermentacji mlekowej dają możliwość skomponowania nowych, wieloszczepowych preparatów przeznaczonych dla określonych grup zwierząt monogastrycznych.
3. Zaproponowane, nowe preparaty mogą stanowić bezpieczną alternatywę dla antybiotyków stosowanych w hodowli zwierząt monogastrycznych.

6.2. Zakres pracy

Prezentowana rozprawa doktorska dotyczy zaprojektowania biopreparatów z wykorzystaniem wyselekcjonowanych bakterii fermentacji mlekowej jako dodatków paszowych dla zwierząt monogastrycznych. Przeprowadzono przegląd literatury tematycznej z zakresu możliwości izolacji, selekcji oraz metod stosowanych do determinowania właściwości funkcjonalnych szczepów probiotycznych. Dokonano również przeglądu stanu wiedzy na temat prozdrowotnego stosowania szczepów bakterii fermentacji mlekowej w suplementacji zwierząt hodowlanych. Doświadczenia zrealizowane w ramach prezentowanej pracy podzielono na cztery zasadnicze etapy.

Pierwszym etapem badań była izolacja bakterii fermentacji mlekowej z mikrobioty jelitowej zwierząt monogastrycznych oraz ich fenotypowa charakterystyka (rys. 1).

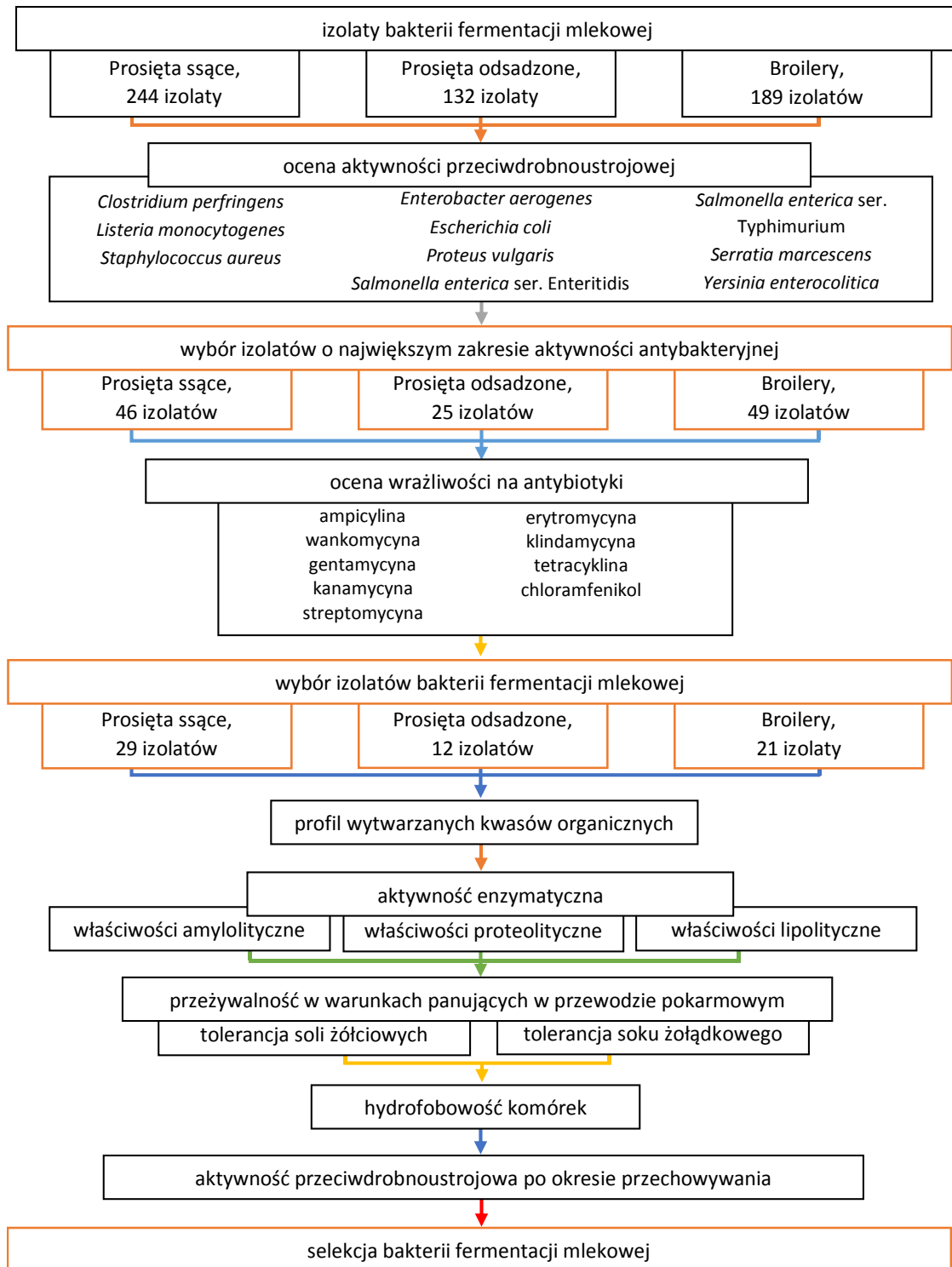


Rysunek 1. Izolacja bakterii fermentacji mlekowej z mikrobioty jelitowej zwierząt monogastrycznych (Etap 1)

Źródło: opracowanie własne

Z materiału badawczego wyizolowano 700 czystych kultur mikroorganizmów z zastosowaniem podłoży selektywnych przeznaczonych dla tej grupy bakterii. Następnie przeprowadzono fenotypową charakterystykę, mającą na celu potwierdzenie przynależności wyizolowanych mikroorganizmów do grupy bakterii fermentacji mlekowej. Badania obejmowały ocenę makro- i mikroskopową, oznaczania morfologii bakterii, barwienie metodą Grama oraz ocenę zdolności izolatów do wytwarzania enzymu katalazy. 565 uzyskanych w ten sposób kultur bakterii o potwierdzonej przynależności do grupy LAB zabezpieczano do długoterminowego przechowywania poprzez zamrażanie w podłożu z dodatkiem glicerolu.

Drugi etap badań dotyczył selekcji izolatów bakterii fermentacji mlekowej w oparciu o wytyczne FAO/WHO i wybrane wyróżniki determinujące funkcjonalność szczepów na podstawie opracowanego schematu postępowania (rys. 2).



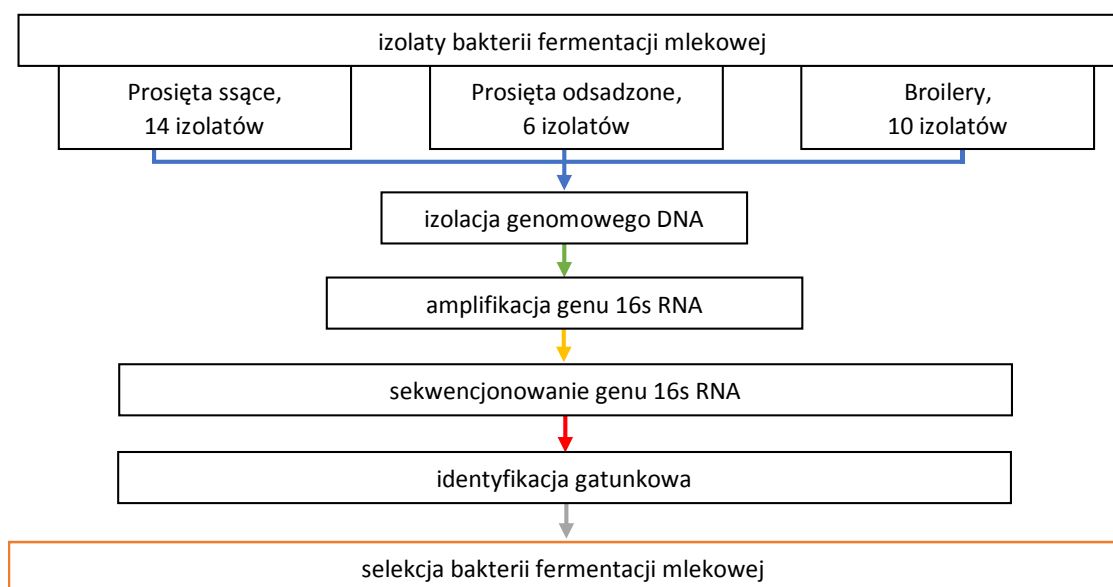
Rysunek 2. Selekcja izolatów bakterii fermentacji mlekowej na podstawie wybranych wyróżników (Etap 2)

Źródło: opracowanie własne

Selekcję 565 izolatów bakterii fermentacji mlekowej prowadzono stopniowo na podstawie analizy wyników kluczowych doświadczeń tego etapu. Podstawowym kryterium selekcji była aktywność przeciwdrobnoustrojowa wyizolowanych bakterii

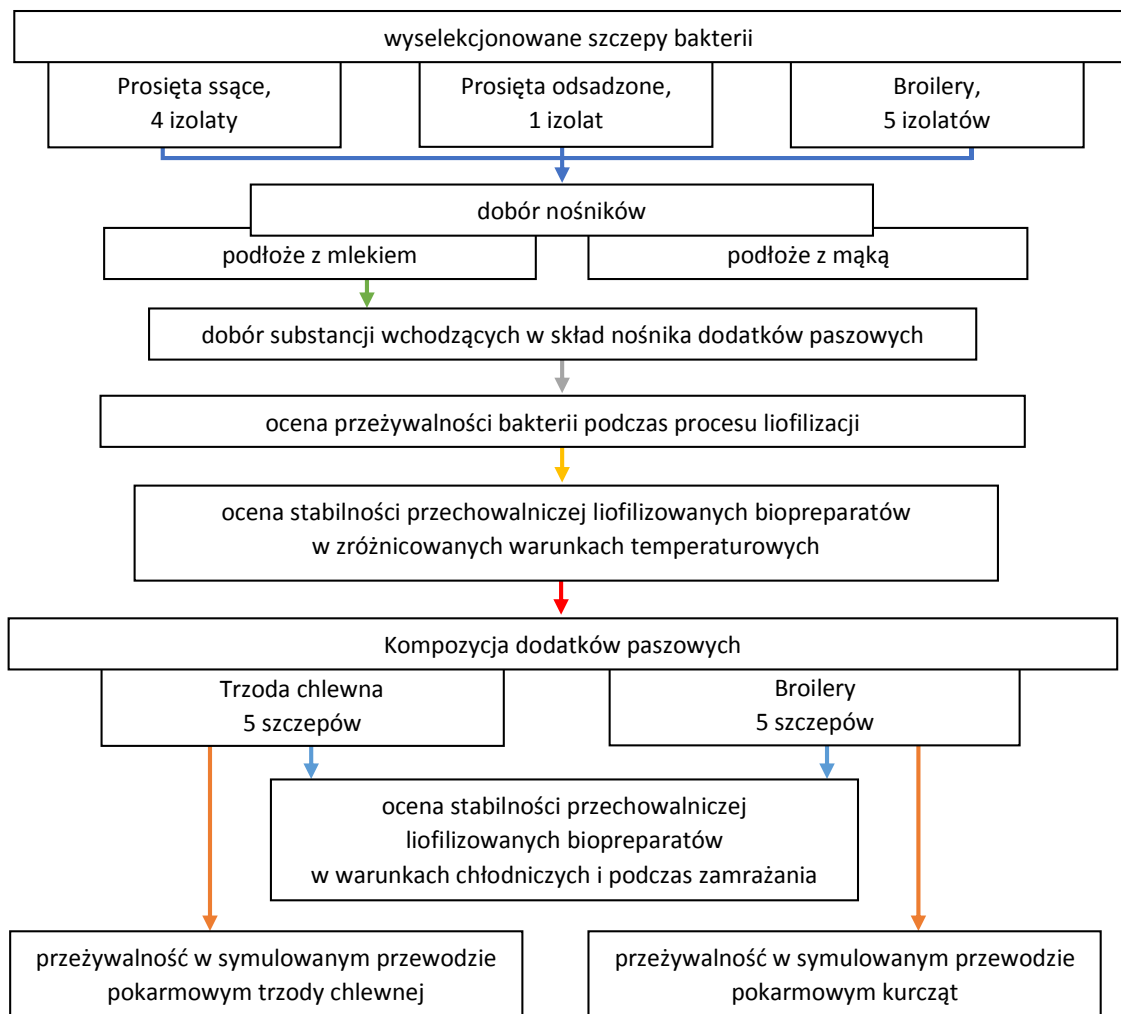
oraz wrażliwość na antybiotyki stosowane w hodowlach drobiu i trzody chlewnej. Izolaty, wybrane na podstawie wyników przeprowadzonych badań charakteryzowano następnie pod względem wybranych właściwości biochemicznych (proteolitycznych, amylolitycznych i lipolitycznych), hydrofobowości komórek, jak również profilu głównych kwasów organicznych wytwarzanych przez badane kultury. Do ważnych wyróżników, determinujących przydatność badanych izolatów jako potencjalnych probiotyków, należała ocena zdolności przetrwania w warunkach przewodu pokarmowego, uwzględniając zróżnicowane stężenia soli żółciowych oraz niskie pH soku żołądkowego. Na podstawie analizy wyników badań z drugiej części pracy wyselekcjonowano 30 izolatów bakterii fermentacji mlekowej do kolejnego etapu doświadczeń.

Trzeci etap obejmował identyfikację genetyczną izolatów bakterii fermentacji mlekowej (rys. 3). Badania rozpoczęto od izolacji genomowego DNA bakterii, którego obecność potwierdzono przeprowadzając elektroforezę w żelu agarozowym. Następnie wykonano amplifikację genu 16s RNA przeprowadzając reakcję PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*) z odpowiednio dobranymi starterami. W wyniku reakcji otrzymano zamplifikowany fragment o wielkości 1500 pz, co potwierdzono analizą elektroforetyczną. Następnie próbki przekazano do sekwencjonowania genu 16s RNA. Otrzymane wyniki porównano z bazą danych Narodowego Centrum Informacji Biotechnologicznej (NCBI) przy użyciu narzędzia BLAST (ang. *Basic Local Alignment Search Tool*) uzyskując tym samym informację o przynależności gatunkowej badanych izolatów.



Rysunek 3. Identyfikacja genetyczna wyselekcjonowanych izolatów bakterii fermentacji mlekowej (Etap 3)

Ostatni, czwarty etap prac doświadczalnych (rys. 4) polegał na kompozycji dwóch biopreparatów probiotycznych w oparciu o bakterie dedykowane wybranym grupom zwierząt monogastrycznych oraz ocenie wybranych właściwości technologicznych. W tym celu dokonano wyboru nośnika przeznaczonego do kompozycji preparatu z bakteriami, oceniając ich wzrost w kilku wybranych wariantach podłoża. Następnie przeprowadzono liofilizację hodowli bakterii i przygotowano dwa preparaty zawierające odrębne szczepy, przeznaczone dla drobiu i trzody chlewnej. Określono przeżywalność bakterii fermentacji mlekowej po procesie liofilizacji, jak również po okresie 30 dniowego przechowywania w zróżnicowanych temperaturach. Na koniec, przeprowadzono doświadczenia mające na celu określenie przeżywalności bakterii w formie liofilizowanego dodatku w symulowanym układzie pokarmowym trzody chlewnej oraz drobiu.



Rysunek 4. Kompozycja biopreparatów bakteryjnych w formie dodatków paszowych (Etap 4)

Źródło: opracowanie własne

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

7. Materiały

7.1. Materiał badawczy

Materiał izolacyjny został pobrany i dostarczony przez lekarza weterynarii z województwa wielkopolskiego. Zwierzęta rzeźne pochodziły z hodowli z województwa wielkopolskiego. Próbkę do badań przechowywane były w sterylnych fiolkach transportowych w temperaturze chłodniczej (4°C). Analizy wykonywano w dniu pobrania próbek materiału doświadczalnego. Materiał badawczy obejmował:

- próbki treści jelitowej 10 prosiąt ssących - młodych świń w wieku od urodzenia do odsadzenia od lochy, czyli około 4-8 tygodni;
- próbki treści jelitowej 10 prosiąt odsadzonych - młodych świń po odłączeniu od maciory w wieku 12 tygodni;
- próbki jelit 10 brojlerów - kurcząt rzeźnych w wieku ok 12 tygodni.

7.2. Przedmiot badań

Przedmiot badań stanowiło 700 czystych kultur wyizolowanych z próbek treści jelitowej prosiąt i jelit kurcząt, które w kolejnych etapach pracy podlegały selekcji. Przynależność badanych kultur do grupy bakterii fermentacji mlekowej określono na podstawie morfologii komórek, wzrostu na podłożu MRS oraz zdolności do wytwarzania enzymu katalazy.

Izolaty bakterii fermentacji mlekowej długookresowo przechowywano w temperaturze -20°C po odwirowaniu 24 godzinnej hodowli bakterii oraz dodaniu świeżej pożywki płynnej MRS i sterylnego, 80% glicerolu w stosunku 1:1.

7.3. Mikroorganizmy wskaźnikowe

Aktywność antybakteryjną izolatów bakterii fermentacji mlekowej określano wobec wybranych bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. (tab. 3). Szczepy pochodziły z kolekcji ATCC (ang. *American Type Culture Collection*) oraz PCM (ang. *Polish Collection of Microorganisms*, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN) i były przechowywane w Laboratorium Biochemii i Mikrobiologii, Katedry Przyrodniczych Podstaw Jakości, Uniwersytetu Ekonomicznego w Poznaniu.

Tabela 3. Wykaz bakterii wskaźnikowych wraz z warunkami ich inkubacji i zastosowanym podłożem agarowym.

L.p.	Szczep	Oznakowanie	Temperatura inkubacji	Atmosfera inkubacji	Podłoże mikrobiologiczne
Bakterie Gram-dodatnie					
1.	<i>Clostridium perfringens</i>	ATCC® 13124™	37°C	beztlenowa	TSA z krwią
2.	<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC® 19115™	37°C	tlenowa	BHI
3.	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC® 33862™	37°C	tlenowa	PCA
Bakterie Gram-ujemne					
4.	<i>Aeromonas hydrophila</i>	ATCC® 7966™	30°C	tlenowa	PCA
5.	<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC® 33291™	37°C	względnie beztlenowa	BA
6.	<i>Enterobacter aerogenes</i>	PCM 532	37°C	tlenowa	BHI
7.	<i>Escherichia coli</i>	ATCC® 8739™	37°C	tlenowa	PCA
8.	<i>Proteus vulgaris</i>	PCM 542	37°C	tlenowa	BHI
9.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC® 9027™	37°C	tlenowa	PCA
10.	<i>Salmonella enterica</i> ser. Enteritidis	ATCC® 13076™	37°C	tlenowa	BHI
11.	<i>Salmonella enterica</i> ser. Typhimurium	PCM 2565	37°C	tlenowa	PCA
12.	<i>Serratia marcescens</i>	PCM 549	30°C	tlenowa	TSA
13.	<i>Shigella flexneri</i>	PCM 89	37°C	tlenowa	BHI
14.	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC® 9610™	30°C	tlenowa	BHI

Źródło: opracowanie własne

Mikroorganizmy wskaźnikowe w trakcie prowadzenia doświadczeń przechowywano w warunkach chłodniczych, w temperaturze 4°C, na płynnym podłożu odpowiednim dla danych bakterii (tab. 3), natomiast długookresowo przechowywano w podłożu z dodatkiem sterylnego, 80% glicerolu, w stosunku 1:1 w temperaturze -20°C.

7.4. Podłoża mikrobiologiczne

Pożywki stosowane w doświadczeniach obejmowały gotowe podłoża suche jak również pożywki przygotowane samodzielnie na podstawie danych literaturowych.

7.4.1. Podłoża do izolacji i namnażania bakterii fermentacji mlekowej

Mikrobiologiczne podłoża suche do izolacji bakterii fermentacji mlekowej pochodzące z firmy Biocorp Polska Sp. z o.o., dobrano odpowiednio do wymagań pokarmowych różnych grup bakterii:

- **MRS** (de Man, Rogosa i Sharpe) **bulion** (nr kat. PS 60), pH $6,2 \pm 0,2$ i **agar** (nr kat. PS 59), pH $6,5 \pm 0,2$ – pożywka przeznaczona do wykrywania obecności i oznaczania liczby oraz namnażania bakterii fermentacji mlekowej z rodzajów: *Lactobacillus*, *Oenococcus*, *Weisella* oraz *Bifidobacterium* spp..
- **M-17 agar** (nr kat. PS 108), pH $7,0 \pm 0,2$ – pożywka stosowana do wykrywania obecności paciorkowców z rodzaju *Lactococcus*, *Leuconostoc* oraz *Streptococcus*.
- **TPY** (Trypticase phytone yeast extract) **bulion** (nr kat. PS 534), pH $6,5 \pm 0,2$ – pożywka wykorzystywana do oznaczania obecności i namnażania pałeczek z rodzaju *Bifidobacterium*.
- **MRS agar wzbogacony 0,5% CaCO₃** – pożywka sporządzona poprzez dodanie 0,5% CaCO₃ do gotowej pożywki MRS według Guo i in. [2010] oraz Petsuriyawong i Khunajakr [2011], stosowano do izolacji bakterii fermentacji mlekowej.

Wszystkie pożywki przygotowywano zgodnie z instrukcją producenta i sterylizowano w autoklawie w 121°C.

7.4.2. Pożywki wykorzystywane do oznaczania aktywności przeciwdrobnoustrojowej

W zależności od wymagań poszczególnych bakterii wskaźnikowych w doświadczeniach stosowano następujące suche podłoża testowe firmy Biocorp Polska Sp. z o. o.:

- **Bulion odżywczy** (Nutrient Broth) (nr kat. PS 90), pH $6,9 \pm 0,2$.
- **Agar odżywczy z glukozą** (Plate Count Agar - PCA) (nr kat. PS 37), pH $7,0 \pm 0,2$.
- **Bulion mózgowo-sercowy** (Brain Heart Infusion Broth), (nr kat. PS 04), pH $7,4 \pm 0,2$.
- **Agar mózgowo-sercowy** (Brain Heart Infusion Agar - BHI), (nr kat. PS 03), pH $7,4 \pm 0,2$.
- **Brucella Bulion** (Brucella Broth - BB), (nr kat. PS 137), pH $7,0 \pm 0,2$.
- **Brucella Agar** (Brucella Agar - BA) pH $7,0 \pm 0,2$, podłoże przygotowano przez dodanie 1,5% agaru do pożywki płynnej BB.
- **Bulion tryptozowo-sojowy** (Trypticasein Soy Broth - TSB), (nr kat. PS 23), pH $7,3 \pm 0,2$.
- **Agar tryptozowo-sojowy** (Trypticasein Soy Agar - TSA), (nr kat. PS 37), pH $7,3 \pm 0,2$.
- **Agar tryptozowo-sojowy wzbogacony 5% dodatkiem odwłóknionej krwi baraniej** (TSA wzbogacone), pH $7,3 \pm 0,2$ podłoże przygotowano poprzez dodanie odwłóknionej krwi baraniej w ilości 10 cm³ na każde 200 cm³ wysterylizowanej i schłodzonej pożywki.

Wszystkie pożywki przygotowywano zgodnie z instrukcją producenta i sterylizowano w autoklawie w 121°C przez 20 minut. W zależności od potrzeb pożywki stosowano w postaci płynnej lub zestalonej agarom jako podłoża namnażające lub testowe. Zestawienie mikroorganizmów wskaźnikowych wraz z odpowiadającymi im pożywkami i warunkami hodowli przedstawiono w tabeli 3.

7.4.3. Pożywki wykorzystywane do oceny właściwości proteolitycznych, amylolitycznych i lipolitycznych

Pożywka MRS z dodatkiem 0,25% skrobi (zmodyfikowana) [Taheri i in. 2009a]

Pożywkę wykorzystano do namnożenia bakterii przed oznaczeniem właściwości amylolitycznych.

Do wykonania 1000 cm³ podłoża płynnego zastosowano:

- enzymatyczny hydrolizat kazeiny	10,00 g
- ekstrakt wołowy	8,00 g
- ekstrakt drożdżowy	4,00 g
- Tween 80	1,00 g
- octan sodu	5,00 g
- siarczan magnezu	0,20 g
- wodorofosforan dipotasu	2,00 g
- cytrynian triamonu	2,00 g
- siarczan manganu	0,05 g
- skrobia kukurydziana woskowa	0,25 g
- woda destylowana	do 1000 cm ³

Pożywkę rozlano po 9 cm³ do szklanych probówek, następnie jałowiono w autoklawie w temperaturze 121°C przez 20 minut.

Pożywka z mlekiem (zmodyfikowana) [Taheri i in. 2009a oraz Moslehisad i in. 2013]

Podłoże z dodatkiem mleka wykorzystywano do oznaczenia właściwości proteolitycznych bakterii fermentacji mlekowej.

Do wykonania 1000 cm³ podłoża przygotowano dwa roztwory:

a. Roztwór mleka odtłuszczonego

- odtłuszczone mleko	10,00 g
----------------------	---------

- woda destylowana do 100 cm³

Roztwór sterylizowano w autoklawie w temperaturze 117°C, 30 minut.

b. Roztwór agaru

- agar 15,00 g
- woda destylowana do 900 cm³

Roztwór agaru jałowiono w autoklawie w temperaturze 121°C, 20 minut. Bezpośrednio przed wykorzystaniem, rozpuszczano pożywkę agarową, a następnie wykonane roztwory mieszano w warunkach sterylnych i wykorzystywano do posiewów.

Pożywka z dodatkiem 1% skrobi (zmodyfikowana) [Guo i in. 2010]

Podłoże z dodatkiem skrobi wykorzystywano do oznaczenia właściwości amylolitycznych bakterii fermentacji mlekowej. Pożywka ta stanowiła modyfikację podłoża MRS, z pominięciem ekstraktu mięsnego i zastąpieniem glukozy taką samą ilością skrobi.

Do wykonania 1000 cm³ podłoża zastosowano:

- enzymatyczny hydrolizat kazeiny 10,00 g
- ekstrakt drożdżowy 4,00 g
- Tween 80 1,00 g
- octan sodu 5,00 g
- siarczan magnezu 0,20 g
- wodorofosforan dipotasu 2,00 g
- cytrynian triamonu 2,00 g
- siarczan manganu 0,05 g
- skrobia kukurydziana woskowa 1,00 g
- agar 15,00 g
- woda destylowana do 1000 cm³

Kompozycję podłoża rozpoczynano od doprowadzenia roztworu skrobi i 200 cm³ wody destylowanej do temperatury 100°C. Następnie łączono wszystkie składniki i jałowiono podłoże w autoklawie (121°C, 20 minut).

Pożywka z dodatkiem Tween 80 (zmodyfikowana) [Burbianka, Pliszka i Burzyńska 1983]

Podłoże z dodatkiem polisorbátu 80 (Tween 80) i chlorku wapnia wykorzystywano do oznaczenia właściwości lipolitycznych bakterii fermentacji mlekowej.

Do wykonania 1000 cm³ podłoża zastosowano:

- pepton K	10,00 g
- chlorek sodu	5,00 g
- chlorek wapnia	0,10 g
- agar	20,00 g
- Tween 80, 10% roztwór wodny	100 cm ³
- woda destylowana	do 1000 cm ³

Składniki z pominięciem roztworu Tween'u rozpuszczono w wodzie destylowanej, pH pożywki ustalano na poziomie 7,4 roztworami 1M NaOH oraz 1M HCl. Podłoże oraz 10% roztwór wodny Tween'u 80 sterylizowano w autoklawie w temperaturze 121°C, przez 20 minut. Bezpośrednio przed wykonywaniem posiewów do gorącego podłoża dodawano wyjałowiony r-r Tween'u 80.

7.4.4. Pożywki wykorzystane jako matryca dla bakterii w projektowanych dodatkach paszowych

W celu doboru podłoża stanowiącego najefektywniejszą matrycę dla bakterii w komponowanych dodatkach paszowych, wykorzystano pożywkę z dodatkiem odtłuszczonego mleka oraz pożywkę z dodatkiem mąki żytniej.

Pożywka z mlekiem [Lyon, Sethi i Glatz 1993]

Do wykonania 1000 cm³ podłoża zastosowano:

- odtłuszczone mleko	80,00 g
- ekstrakt drożdżowy	15,00 g
- woda destylowana	do 1000 cm ³

Roztwór jałowiono w autoklawie w temperaturze 121°C, 20 minut.

Pożywka z mąką żytnią

Do wykonania 1000 cm³ podłoża przygotowano:

- a. Mąkę żytnią 50,00 g

Mąkę sterylizowano suchym gorącym powietrzem w temperaturze 160°C, 60 minut.

- b. Roztwór ekstraktu drożdżowego

- ekstrakt drożdżowy 50,00 g
- węglan wapnia 40,00 g
- woda destylowana do 1000 cm³

Roztwór sterylizowano w autoklawie w temperaturze 121°C, 20 minut.

Bezpośrednio przed hodowlą bakterii mąkę oraz roztwór ekstraktu drożdżowego mieszano w warunkach sterylnych.

W celu uzupełnienia podłoża na bazie odtłuszczonego mleka stanowiącego matrycę dla bakterii w komponowanych dodatkach paszowych, pożywkę wzbogacono o maltodekstrynę oraz trehalozę [Kimoto-Nira i in. 2010].

Pożywka z mlekiem wzbogacona (zmodyfikowana) [Lyon, Sethi i Glatz 1993; Kimoto-Nira i in. 2010]

Do wykonania 1000 cm³ podłoża przygotowano dwa roztwory:

- a. Roztwór mleka odtłuszczonego

- odtłuszczone mleko 80,00 g
- ekstrakt drożdżowy 15,00 g
- woda destylowana do 750 cm³

Roztwór jałowiono w autoklawie w temperaturze 121°C, 20 minut.

- b. Roztwór maltodekstryny i trehalozy

- maltodekstryna 150,00 g
- trehaloza 50,00 g
- sterylna woda destylowana do 250 cm³

Wodę destylowaną jałowiono w autoklawie w temperaturze 121°C, 20 minut. Roztwór maltodekstryny i trehalozy pasteryzowano w autoklawie w temperaturze 90°C, 30 minut. Bezpośrednio przed wykorzystaniem, po schłodzeniu rozgrzanego roztworu maltodekstryny i trehalozy, wykonane roztwory mieszano w warunkach sterylnych i wykorzystywano do hodowli bakterii fermentacji mlekowej.

7.5. Krążki do oznaczania wrażliwości izolatów na antybiotyki

Ocenę wrażliwości badanych izolatów bakterii fermentacji mlekowej na wybrane antybiotyki określono za pomocą metody antybiogramów z wykorzystaniem komercyjnych krążków antybiotykowych firmy Oxoid Ltd. (Wielka Brytania). Zestawienie antybiotyków wraz z zastosowanym stężeniem oraz grupą, do której dany antybiotyk należy, przedstawiono w tabeli 4.

Tabela 4. Wykaz antybiotyków zastosowanych w doświadczeniach

L.p.	Antybiotyk	Podział ze względu na budowę chemiczną	Stężenie [mcg]	Skrót
Oddziaływanie bakterioobójcze				
1.	ampicylina	B-laktamy (penicyliny)	10	AMP
2.	wankomycyna	antybiotyki peptydowe (glikopeptydy)	30	VA
3.	gentamycyna	aminoglikozydy	10	CN
4.	kanamycyna	aminoglikozydy	30	K
5.	streptomycyna	aminoglikozydy	300	S
Oddziaływanie bakteriostatyczne				
6.	erytromycyna	makrolidy	15	E
7.	klindamycyna	linkozamidy	2	DA
8.	tetracyklina	tetracykliny	30	TE
9.	chloramfenikol	amfenikole	30	C

Źródło: opracowanie własne na podstawie Berg, Tymoczko i Stryer [2005] oraz Irving, Boswell i Ala'Aldeen [2008]

7.6. Odczynniki

Do przygotowania buforów, roztworów oraz podłoży hodowlanych i testowych zastosowano następujące odczynniki:

- pepton-trypton, pepton K zakupiono w firmie **BTL Łódź** (Polska).
- enzymatyczny hydrolizat kazeiny, ekstrakt drożdżowy, bufor fosforanowy w postaci tabletek (PBS) zakupiono w firmie **Bioshop Canada Inc.** (Kanada).

- wzorce kwasów organicznych (mlekowego, propionowego, octowego, bursztynowego), tween 80, żółć bydłęca, pepsyna, α amylaza, pankreatyna, odtłuszczone mleko w proszku pochodzący z firmy **Sigma-Aldrich** (Niemcy).
- toluen, wodorofosforan dipotasu, chlorek wapnia, wodorofosforan sodu, diwodorofosforan sodu, wodorotlenek sodu, gliceryna bezw., kwas solny, sodu octan bezwodny, sodu wodorowęglan, kwas octowy zakupiono w firmie **POCH S.A.** (Polska).
- odczynniki do zestawu barwienia Grama, ekstrakt wołowy, agar zakupiono w firmie **Biocorp Sp. z o.o.** (Polska).
- chlorek sodu, chlorek potasu, glukoza bezw., octan sodu, alkohol etylowy, siarczan manganu bezw., siarczan magnezu bezw., węglan wapnia, azotan amonu, cytrynian triamonu, nadtlenek wodoru, odczynnik Grama II (płyn Lugola), żelaza siarczan pochodzący z firmy **Chempur** (Polska).
- odwłókniona krew barania pochodziła z firmy **Graso Biotech** (Polska).
- skrobia kukurydziana woskowa z firmy **Agrana** (Austria).
- maltodekstryna DE 5, suszona rozpyłowa **Hortimex PLUS Sp. z o.o.** Konin
- trehaloza **Agrotrade Sp. z o.o.** Warszawa
- mąka żytnia
- próbki pasz: uniwersalny koncentrat białkowy, pasza kruszona na bazie pszenicy

Odczynniki do izolacji DNA, reakcji PCR i elektroforezy

W doświadczeniach wykorzystano następujące odczynniki i zestawy do izolacji DNA i reakcji PCR:

- zestaw do izolacji DNA z komórek bakterii Genomic Mini AX Bacteria+ (Spin) nr. katalogowy 060-100MS pochodził z firmy **A&A Biotechnology** (Polska).
- zestaw do reakcji PCR: 2xPCR Master Mix Plus nr kat. 2005-100P (Składniki: Taq DNA polimeraza 0,1U/ μ l; MgCl₂ 4mM; dNTPs: dATP 0,5 mM, dCTP 0,5 mM, dGTP 0,5 mM, dTTP 0,5 mM; stabilizatory, czerwony barwnik, bufor obciążający) zakupiono w firmie **A&A Biotechnology** (Polska).
- wzorzec długości fragmentów DNA Nova 100bp DNA lader pochodził z firmy **Novazym** (Polska).
- startery do reakcji PCR 1492r i S-D-Bact-0008 zostały zsyntetyzowane w **Future Synthesis** (Polska) oraz **Tib Molbiol Sp. zo.o.** (Polska).

- agaroz, Tris, EDTA pochodziły z firmy **Bioshop** Canada Inc. (Kanada).
- kwas borowy zakupiono w firmie **POCH S.A.** (Polska).
- barwnik MIDORI GREEN zakupiono w firmie **ABO Sp. z o.o.** (Polska)

7.7. Bufory i roztwory

Bufory i roztwory wykorzystywane w pracy wykonywane były bezpośrednio przed doświadczeniami, w których były stosowane. W przypadku, gdy metodyka wymagała zastosowania sterylnego roztworu lub buforu przeprowadzano jego sterylizację w autoklawie.

- **Bufor fosforanowy – PBS**

Bufor PBS wykorzystywano do przepłukiwania komórek bakterii w celu pozbycia się pozostałości pożywki w doświadczeniach. Jedną tabletkę buforu rozpuszczano w 100 cm³ wody destylowanej, a następnie sterylizowano w autoklawie w temperaturze 121°C, przez 20 minut.

- **Bufor TBE**

Bufor TBE (89 mM Tris, 89 mM kwasu borowego oraz 1 mM EDTA) wykorzystywano do wykonania rozdziału elektroforetycznego kwasów nukleinowych w żelach agarozowych i do przygotowania żeli.

Do wykonania 1000 cm³ 10-krotnie stężonego buforu TBE zastosowano:

- Tris	108,00 g
- kwas borowy	55,00 g
- EDTA	3,70 g
- woda destylowana	do 1000 cm ³

pH 8,0–8,3

W celu otrzymania roztworu roboczego buforu 1 x TBE, rozcieńczano bufor 10 x TBE wodą destylowaną.

▪ **Bufor octanowy**

Bufor octanowy 50 mM o pH 5,0 wykorzystano w badaniach przeżywalności bakterii fermentacji mlekowej wchodzących w skład dodatków paszowych w trzystopniowym modelu układu pokarmowego drobiu.

W celu otrzymania buforu octanowego o określonym pH przygotowano dwa roztwory:

a. 0,2 M roztwór kwasu octowego

- kwas octowy 11,55 cm³
- woda destylowana do 1000 cm³

b. 0,2 M roztwór octanu sodowego

- octan sodowy 16,40 g
- woda destylowana do 1000 cm³

Do wykonania 1000 cm³ 50 mM buforu octanowego o pH 5,0, zastosowano:

- 0,2 M roztwór kwasu octowego 98,67 cm³
- 0,2 M roztwór octanu sodu 234,66 cm³
- woda destylowana do 1000 cm³

Bufor oraz roztwory przygotowano bezpośrednio przed wykonaniem oznaczeń.

▪ **Bufory fosforanowe**

Bufory fosforanowe wykorzystano w badaniach przeżywalności bakterii fermentacji mlekowej wchodzących w skład dodatków paszowych w trzystopniowym modelu układu pokarmowego trzody chlewnej.

W celu otrzymania odpowiedniego pH buforu fosforanowego przygotowano roztwory:

a. 0,2 M roztwór diwodorofosforanu sodu

- diwodorofosforan sodu 27,80 cm³
- woda destylowana do 1000 cm³

b. 0,2 M roztwór wodorofosforanu sodu

- wodorofosforan sodu 71,70 g

- woda destylowana do 1000 cm³

Do wykonania 1000 cm³ 0,1 M buforu fosforanowego o pH 6,0, zastosowano:

- 0,2 M roztwór diwodorofosforanu sodu 61,50 cm³
- 0,2 M roztwór wodorofosforanu sodu 438,50 cm³
- woda destylowana do 1000 cm³

Do wykonania 1000 cm³ 0,2 M buforu fosforanowego o pH 6,8, zastosowano:

- 0,2 M roztwór diwodorofosforanu sodu 490,00 cm³
- 0,2 M roztwór wodorofosforanu sodu 510,00 cm³

Bufor oraz roztwory przygotowywano bezpośrednio przed wykonaniem doświadczeń.

▪ **Roztwór soli fizjologicznej**

Sól fizjologiczna stosowana była do wykonania rozcieńczeń i zawiesin bakterii w poszczególnych eksperymentach, m.in. podczas izolacji bakterii.

Do wykonania 1000 cm³ 0,85% soli fizjologicznej zastosowano:

- chlorek sodu 8,50 g
- woda destylowana do 1000 cm³

Przygotowany roztwór rozlewano do probówek lub kolb Erlenmayera i sterylizowano w autoklawie w temperaturze 121°C przez 20 minut.

▪ **Roztwór nadtlenu wodoru**

Roztwór H₂O₂ o stężeniu 3% wykonywano w celu oznaczenia zdolności izolatów bakterii LAB do wytwarzania enzymu katalazy.

Do wykonania 1000 cm³ 3% roztworu nadtlenu wodoru zastosowano:

- nadtlenek wodoru 100,00 cm³
- woda destylowana do 1000 cm³

Roztwór przygotowywano bezpośrednio przed wykonaniem oznaczeń.

▪ **Roztwory kwasu solnego**

Roztwór 1M HCl wykorzystywano do ustalania pH pożywek, buforów oraz roztworów wykorzystanych w doświadczeniach. W badaniach dotyczących pasażu bakterii fermentacji mlekowej przez symulowany przewód pokarmowy drobiu w warunkach *in vitro* wykorzystano roztwór 0,2 M HCl.

Do wykonania 1000 cm³ 1 M roztworu kwasu solnego zastosowano:

- kwas solny 85,00 cm³
- woda destylowana do 1000 cm³

Do wykonania 1000 cm³ 0,2 M roztworu kwasu solnego zastosowano:

- kwas solny 17,00 cm³
- woda destylowana do 1000 cm³

Roztwory przygotowywano bezpośrednio przed wykonaniem badań doświadczalnych.

▪ **Roztwór wodorowęglanu sodu**

Roztwór NHCO₃ zastosowano w badaniach przeżywalności bakterii fermentacji mlekowej w symulowanym przewodzie pokarmowym drobiu.

Do wykonania 1000 cm³ 1 M roztworu wodorowęglanu sodu zastosowano:

- wodorowęglan sodu 38,20 g
- woda destylowana do 1000 cm³

Roztwór przygotowywano bezpośrednio przed doświadczeniem, w którym został wykorzystany.

▪ **Roztwory wodorotlenku sodu**

Roztwory NaOH wykorzystywano do ustalania pH podłoży, roztworów lub buforów wykorzystanych w badaniach (1M roztwór) i badaniach przeżywalności bakterii fermentacji mlekowej w symulowanym przewodzie pokarmowym trzody chlewnej (0,6 M roztwór).

Do wykonania 1000 cm³ 1 M roztworu wodorotlenku sodu zastosowano:

- wodorotlenek sodu 40,00 g

- woda destylowana do 1000 cm³

Do wykonania 1000 cm³ 0,6 M roztworu wodorotlenku sodu zastosowano:

- wodorotlenek sodu 24,00 g
- woda destylowana do 1000 cm³

Roztwory przygotowywano bezpośrednio przed doświadczeniami, w których zostały wykorzystane.

▪ **Roztwór śliny trzody chlewnej**

Roztwór wykorzystano w modelu *in vitro* symulowanego przewodu pokarmowego trzody chlewnej.

Do wykonania 1000 cm³ roztworu śliny zastosowano:

- chlorek sodu 3,10 g
- chlorek potasu 1,10 g
- chlorek wapnia 0,15 g
- α amylaza 0,29 g
- woda destylowana do 1000 cm³

▪ **Roztwory pankreatyny**

Roztwory wodne pankreatyny wykorzystano w badaniach przeżywalności bakterii fermentacji mlekowej podczas pasażu przez modele *in vitro* symulowanych przewodów pokarmowych drobiu oraz trzody chlewnej.

Do wykonania 1000 cm³ roztworu pankreatyny o stężeniu 14,80 mg/cm³ zastosowano:

- pankreatyna 14,80 g
- woda destylowana do 1000 cm³

Do wykonania 1000 cm³ roztworu pankreatyny o stężeniu 100,00 mg/cm³ zastosowano:

- pankreatyna 100,00 g
- woda destylowana do 1000 cm³

▪ **Roztwór żółci bawolej**

Roztwór 2% żółci bawolej stosowany był do określenia tolerancji warunków panujących w przewodzie pokarmowym przez badane izolaty bakterii.

Do sporządzenia 1000 cm³ 2% roztworu żółci bawolej zastosowano:

- | | |
|-------------------------|-------------------------|
| - żółć bawola (ox-bile) | 20,00 g |
| - bulion MRS | do 1000 cm ³ |

Roztwór przygotowywano bezpośrednio przed wykonaniem badań laboratoryjnych.

▪ **Roztwory pepsyny**

Roztwór wodny pepsyny o stężeniu 25 mg/cm³, wykorzystano w badaniach przeżywalności bakterii fermentacji mlekowej podczas pasażu przez model *in vitro* symulowanego przewodu pokarmowego trzody chlewnej.

Do wykonania 1000 cm³ roztworu wodnego pepsyny zastosowano:

- | | |
|--------------------|-------------------------|
| - pepsyna | 25,00 g |
| - woda destylowana | do 1000 cm ³ |

Roztwór pepsyny o stężeniu 21 mg/cm³ w 50 mM buforze octanowym o pH 5,0, zastosowano w badaniach przeżywalności bakterii fermentacji mlekowej podczas pasażu przez model *in vitro* symulowanego przewodu pokarmowego drobiu.

Do wykonania 1000 cm³ roztworu pepsyny zastosowano:

- | | |
|------------------------|-------------------------|
| - pepsyna | 21,00 g |
| - 50 mM bufor octanowy | do 1000 cm ³ |

8. Metodyka badawcza

8.1. Izolacja czystych kultur bakterii fermentacji mlekowej z próbek kału i jelit wybranych zwierząt monogastycznych

Izolację bakterii fermentacji mlekowej z próbek kału prosiąt i jelit kurcząt przeprowadzano dokonując seryjnych rozcieńczeń i posiewów na podłoża selektywne. Próbkę materiału badawczego w ilości 10 g zawieszono w 90 cm³ sterylnej soli fizjologicznej w kolbach Erlenmayera o pojemności 250 cm³. Zawiesinę wytrząsano przez 5 minut, a następnie wykonano szeregi rozcieńczeń dziesiętnych oraz posiewy ilościowe metodą zalewową z wykorzystaniem agaru MRS z dodatkiem 0,5% CaCO₃ [Guo i in. 2010; Petsuriyawong i Khunajakr 2011]. Inkubację prowadzono w warunkach względnie beztlenowych w temperaturze 37°C przez 24 godziny. Wybrane losowo kolonie pasażowano na podłoże agarowe MRS, wykonując posiew redukcyjny i inkubowano w warunkach anaerobowych w celu uzyskania czystych kultur. Na tym etapie przeprowadzano makroskopową ocenę kolonii. Pojedyncze kolonie namnażano w pożywce bulionowej MRS, a kultury wykazujące słaby wzrost na tej pożywce, pasażowano na bulion M17 i TPY. Otrzymane hodowle 700 izolatów stanowiły przedmiot badań pracy doktorskiej.

8.2. Fenotypowa charakterystyka izolatów bakterii fermentacji mlekowej

Pierwszym etapem charakterystyki 700 wyizolowanych mikroorganizmów było określenie ich przynależności do grupy bakterii fermentacji mlekowej. Wykonano preparaty bakteryjne barwione metodą Grama, dokonano oceny makro- i mikroskopowej oraz oznaczono zdolność do wytwarzania katalazy.

8.2.1. Ocena makroskopowa izolatów bakterii

Do makroskopowej oceny mikroorganizmów wykorzystano wykonane posiewy redukcyjne na agarze MRS. Szczególną uwagę zwracano na pojedyncze kolonie w trzeciej i czwartej strefie posiewu. W opisie kolonii wzięto pod uwagę następujące elementy: wielkość, średnica, kształt, brzeg, powierzchnię, przejrzystość, barwę, otoczenie kolonii, wzrost wgłębny.

8.2.2. Ocena mikroskopowa na podstawie barwienia metodą Grama

Z wybranych pojedynczych kolonii wykonywano preparaty mikroskopowe, które barwiono metodą Grama. Obserwację prowadzono oglądając preparaty w jasnym polu w mikroskopie Leica DM 1000 LED, w powiększeniu 1500 razy.

8.2.3. Ocena zdolności badanych izolatów bakterii do wytwarzania katalazy

Określenie obecności enzymu katalizującego nadtlenek wodoru przez badane izolaty mikroorganizmów wykonano wykorzystując 3% roztwór nadtlenku wodoru. Na szkiełko zegarkowe wprowadzono kilka kropli 24 godzinnej hodowli badanych bakterii i dodano kilka kropli 3% H₂O₂. Wynik dodatni obserwowano gdy pod działaniem katalazy następowało obfite wydzielanie tlenu. Kontrolę pozytywną stanowiła próba z zastosowaniem bakterii *Staphylococcus aureus*, których cechą jest wytwarzanie katalazy.

8.3. Selekcja na podstawie wytycznych FAO/WHO oraz wybranych wyróżników determinujących funkcjonalność szczepów

8.3.1. Opracowanie schematu postępowania dot. selekcji badanych bakterii

Schemat selekcji 565 izolatów bakterii fermentacji mlekowej opracowany został na podstawie wytycznych FAO/WHO oraz danych literaturowych i przedstawiony na rysunku 2 w rozdziale 4.2. „Zakres pracy”.

8.3.2. Określenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej

Antagonistyczne oddziaływanie izolatów bakterii fermentacji mlekowej oznaczono metodą dyfuzji studzienkowej. Na etapie początkowej selekcji przebadano 565 izolatów bakterii wobec 10 mikroorganizmów wskaźnikowych, w dalszym etapie po 18 miesiącach 62 izolaty wobec 14 mikroorganizmów wskaźnikowych. Podczas oceny właściwości antybakteryjnej 62 izolatów, hodowle prowadzono tak, by po ich zakończeniu gęstość kształtowała się na porównywalnym poziomie, tj. 10¹⁰ jtk/cm³.

Oznaczenie aktywności antybakteryjnej

Z 24 godzinnych hodowli bakterii wskaźnikowych przygotowywano zawiesiny w soli fizjologicznej o gęstości optycznej ustalonej na poziomie 0,5 w skali McFarlanda. Posiewy wykonano metodą zalewową, po zestaleniu agaru jałowym korkoborem o średnicy 10 mm wycinano studzienki. Następnie wprowadzano do nich zawiesiny hodowli izolatów bakterii

fermentacji mlekowej w ilości 0,1 cm³. Gęstość optyczna hodowli została zbadana przy pomocy densytometru. Warunki inkubacji były zgodne z optimum temperaturowym wzrostu poszczególnych bakterii wskaźnikowych i wynosiły 30°C lub 37°C przez 24 godziny.

Próby zawierające mikroaerofilne bakterie *Campylobacter jejuni* i bezwzględnie beztlenowe bakterie *Clostridium perfringens* inkubowane były w ekzykatorze, w którym powietrze atmosferyczne zastąpiono dwutlenkiem węgla. Badania przeprowadzono w 3 równoległych powtórzeniach. W celu otrzymania wyników mierzona była średnica zahamowania wzrostu z uwzględnieniem studzienki (10 mm). Kontrolę stanowił bulion MRS w ilości 0,1 cm³. Dla uzyskanych wyników obliczona została wartość odchylenia standardowego.

8.3.3. Oznaczanie wrażliwości bakterii fermentacji mlekowej na wybrane antybiotyki

Wrażliwość 120 izolatów bakterii fermentacji mlekowej wybranych na podstawie wyników aktywności antybakteryjnej na antybiotyki określono za pomocą metody dyfuzji krążkowej z wykorzystaniem komercyjnych krążków antybiotykowych [Torshizi i in. 2008; Petsuriyawong i Khunajakr 2011; Pérez-Sánchez i in. 2011].

Z 24 godzinnej hodowli bakterii fermentacji mlekowej przygotowano zawiesiny w soli fizjologicznej, ustalając gęstość optyczną na poziomie 1,0 w skali McFarlanda. Następnie, wykonano posiewy metodą zalewową, a po zestaleniu pożywki nanoszono na powierzchnię krążki antybiotykowe (tab. 5). W badaniach wykorzystano pożywki Mueller-Hinton i MRS. Próbkę inkubowano w warunkach względnie beztlenowych w ekzykatorze wysyconym CO₂ w temperaturze 37°C przez 24 godziny. Oznaczenia wykonywane były w trzech równoległych powtórzeniach. Kontrolę stanowiły krążki bibułowe nasączone roztworem soli fizjologicznej.

Strefy zahamowania wzrostu odczytywano mierząc średnicę oddziaływania antybiotyków wobec izolatów bakterii fermentacji mlekowej, uwzględniając wielkość krążków antybiotykowych (6 mm). Kryteria analizy wyników wrażliwości mikroorganizmów na działanie antybiotyków określone zostały na podstawie zmodyfikowanych wytycznych CLSI (ang. *The Clinical and Laboratory Standards Institute*) wykorzystanych przez Charteris i in. [1998; 1999], Vlková i in. [2006] i Han i in. [2015]. Podział mikroorganizmów uwzględniający stopień oddziaływania antybiotyków był uzależniony od wielkości stref zahamowania wzrostu. Wyszczególniono: mikroorganizmy odporne (R – ang. *resistance*), które wykazywały brak bądź znikomą wrażliwość na działanie antybiotyków, średnio

wrażliwe izolaty bakterii (I – ang. *intermediate susceptibility*) oraz wrażliwe izolaty bakterii fermentacji mlekowej (S – ang. *susceptibility*). Szczegółowe wytyczne do interpretacji zawiera tabela 5.

Tabela 5. Wytyczne dotyczące podziału izolatów na podstawie wyników wrażliwości na wybrane antybiotyki

L.p.	Antybiotyk	Stężenie [mcg]	Średnica zahamowania wzrostu (mm)		
			Oporny izolat - R	Średnio wrażliwy izolat - I	Wrażliwy izolat - S
1.	ampicylina	10	≤21,99	22,00-28,99	≥29,00
2.	wankomycyna	30	≤9,99	10,00-11,99	≥12,00
3.	gentamycyna	10	≤12,99	13,00-14,99	≥15,00
4.	kanamycyna	30	≤13,99	14,00-17,99	≥18,00
5.	streptomycyna	300	≤15,99	16,00-20,99	≥21,00
6.	erytromycyna	15	≤13,99	14,00-17,99	≥18,00
7.	klindamycyna	2	≤14,99	15,00-16,99	≥17,00
8.	tetracyklina	30	≤11,99	12,00-14,99	≥15,00
9.	chloramfenikol	30	≤16,99	17,00-19,99	≥20,00

Źródło: opracowanie własne na podstawie Charteris i in. [1998; 1999], Vlková i in. [2006] i Han i in. [2015]

8.3.4. Oznaczanie zawartości wybranych kwasów organicznych w hodowlach badanych izolatów bakterii fermentacji mlekowej

Określenie zawartości kwasów: mlekowego, octowego, propionowego i bursztynowego w 24 godzinnych hodowlach bakterii na podłożu bulionowym MRS przeprowadzono metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Próbkę hodowli o pojemności 2 cm³ odwirowywano w jałowych probówkach wirówkowych typu eppendorf (10 000 rpm/min, 10 minut) w wirówce Centifuge 5804R, Eppendorf AG. Supernatanty przesączano następnie przez filtry Millex®-LCR 0,22 μm (Millipore) do jałowych probówek wirówkowych typu eppendorf.

Badania wykonano na chromatografie cieczowym 2695 Waters sprzężonym z detektorem refraktometrycznym 2414 Refractive Index (RI) detector (Waters, Milford, MA, USA). Do oznaczeń używano kolumny Animex HPX-87H 300 x 7,8 mm (BIO-RAD). Eluent stanowił 0,004 M roztwór H₂SO₄, przy przepływie 0,75 cm³/min. Jako standardy stosowano roztwory kwasów: mlekowego, octowego, propionowego i bursztynowego o stężeniu 0,1 μg/μl. Oznaczenie prowadzono w temperaturze 65°C. Identyfikacji dokonano metodą

standardu zewnętrznego z wykorzystaniem powierzchni pików. Oznaczenia wykonywane były w trzech równoległych powtórzeniach.

8.3.5. Oznaczanie wybranych właściwości enzymatycznych

Sześćdziesiąt dwa izolaty, które zostały wybrane na podstawie wyników antybakteryjnych właściwości oraz wrażliwości na antybiotyki poddano ocenie w zakresie wybranych właściwości biochemicznych, w tym proteolitycznych, amylolitycznych i lipolitycznych.

Oznaczenia mające na celu określenie wykrywania aktywności wybranych enzymów wykonano na podstawie metodyki według Taheri i in. [2009a], Guo i in. [2010] oraz Moslehishad i in. [2013] zmodyfikowanej w oparciu o przepisy na podłoża opisane przez Burbianka, Pliszka i Burzyńska [1983]. Do badań wykorzystywano 24 godzinne hodowle izolatów bakterii fermentacji mlekowej.

8.3.5.1. Oznaczanie właściwości proteolitycznych

W celu oznaczenia właściwości proteolitycznych, na powierzchnię pożywki agarowej z mlekiem (opisaną w pkt. 7.4.3.) наносono 10 µl hodowli izolatów, a następnie płytki Petriego inkubowano w warunkach względnie beztlenowych przez 24 godzin w temperaturze 37°C. Po inkubacji obserwowano występowanie strefy przejaśnienia otaczającej kolonię. Oznaczenia wykonywane były w trzech równoległych powtórzeniach.

8.3.5.2. Oznaczanie właściwości amylolitycznych

W celu wykrycia właściwości amylolitycznych, doświadczenia poprzedzała hodowla izolatów na podłożu płynnym zawierającym 2% dodatek skrobi (patrz pkt. 7.4.3.). Badania wykonywano poprzez naniesienie 10 µl hodowli izolatów na powierzchnię pożywki agarowej zawierającej skrobię. Płytki Petriego inkubowano w warunkach względnie beztlenowych przez 24 godziny w temperaturze 37°C. Po inkubacji, w celu wykrycia czystych stref wokół kolonii, płytki Petriego zalewano 3 cm³ płynu Lugola. Obserwowano zabarwienie podłoża na ciemny granatowy kolor i występowanie stref przejaśnienia otaczających kolonie. Oznaczenia wykonywane były w trzech równoległych powtórzeniach.

8.3.5.3. Oznaczanie właściwości lipolitycznych

Określenie właściwości proteolitycznych, wykonano nanosząc na powierzchnię pożywki agarowej z dodatkiem polisorbatu - Tween 80 oraz chlorku wapnia (opisaną w pkt. 7.4.3)

nanoszono 10 µl hodowli izolatów, a następnie płytki Petriego inkubowano w warunkach względnie beztlenowych przez 24 godziny w temperaturze 37°C. Po inkubacji obserwowano występowanie strefy zmętnienia otaczającej kolonię. Była ona wynikiem reakcji uwolnionych przez lipazy kwasów tłuszczowych z obecnymi w pożywce jonami wapnia, które powodują powstanie nierozpuszczalnych mydeł wapniowych. Oznaczenia wykonywane były w trzech równoległych powtórzeniach.

8.3.6. Ocena przeżywalności bakterii fermentacji mlekowej w warunkach panujących w przewodzie pokarmowym

Oceniając wpływ warunków panujących w przewodzie pokarmowym zwierząt na przeżywalność badanych izolatów uwzględniono zróżnicowane stężenie kwasu solnego oraz soli żółciowych.

8.3.6.1. Przygotowanie bakterii do oceny przeżywalności w obecności kwasu solnego i soli żółciowych

Próbki hodowli bakterii o gęstości na poziomie 10^{10} jtk/cm³, w ilości 1 cm³ odwirowywano przez 5 minut przy obrotach 7500 rpm/min w wirówce Centifuge 5804R, Eppendorf AG. Supernatanty zlewano, a pozostały osad zawieszano w 1 cm³ buforu fosforanowego. Próby ponownie odwirowywano (7500 rpm/min, 5 min), a następnie osad zawieszano w 1 cm³ pożywki bulionowej MRS [Torshizi i in. 2008; Taheri i in. 2009a]. Tak przygotowane zawiesiny bakterii wykorzystywano następnie w doświadczeniach określających wpływ niskiego pH i soli żółciowych na ich przeżywalność.

8.3.6.2. Określenie tolerancji niskiego pH panującego w soku żołądkowym

Ocenę wpływu pH środowiska na przeżywalność badanych izolatów bakterii fermentacji mlekowej badano z wykorzystaniem mikroplatek inkubując bakterie w pożywce MRS, której pH ustalono na poziomie 2 i 3. Odpowiednią wartość pH uzyskano mieszając w odpowiednich proporcjach zawiesinę bakterii z bulionem MRS o pH 1,0, ustalonym przy pomocy 1 M kwasu solnego. Inokulat przygotowano zgodnie z opisem w punkcie 8.1. Inkubację prowadzono w warunkach względnie beztlenowych w ekzykatorze wysyconym CO₂ w temperaturze 37°C przez 24 godziny. Pomiar spektrofotometryczny wykonywano używając czytnika mikroplatek firmy BioTek Instruments. Absorbancję mierzono przy długości fali 600 nm (OD₆₀₀) bezpośrednio po wykonaniu próbek oraz po 1, 2, 3 oraz 24

godzinach inkubacji. Kontrolę negatywną stanowiła pożywka bez inokulatu. Kontrolę pozytywną stanowiła hodowla bakterii prowadzona w pożywce MRS o pH 6,5. Oznaczenia wykonywane były w trzech równoległych powtórzeniach.

Stopień tolerancji kwasu solnego wyrażono procentowo:

$$\text{Procent tolerancji} = \frac{\text{OD}_{600} \text{ eksperymentalne}}{\text{OD}_{600} \text{ kontroli pozytywnej}} \times 100$$

Gdzie:

OD₆₀₀ kontroli pozytywnej – absorbancja hodowli bakterii fermentacji mlekowej w pH 6,5;

OD₆₀₀ eksperymentalne – absorbancja hodowli bakterii fermentacji mlekowej w pH 2,0 lub 3,0.

8.3.6.3. Określenie tolerancji soli żółciowych przez bakterie fermentacji mlekowej

Ocenę wpływu soli żółciowych na przeżywalność badanych izolatów bakterii fermentacji mlekowej wykonano zmodyfikowaną metodą według Lin i in. [2007] z wykorzystaniem mikroplitek. Do badań przygotowano roztwór 2% żółci w bulionie MRS, oraz inokulat bakterii fermentacji mlekowej przygotowany według punktu 8.1.. W płaskodennych sterylnych 96-dołkowych mikroplitykach przygotowano dwukrotne rozcieńczenia 2% roztworu żółci bawolej stosując bulion MRS jako rozcieńczalnik, a następnie dodawano 100 µl zawiesiny bakterii. Ostatecznie stężenie żółci bawolej w hodowlach wynosiło 1,00%, 0,50% i 0,25%. Inkubację prowadzono w warunkach względnie beztlenowych w eksykatorze wysyconym CO₂, w temperaturze 37°C przez 24 godziny. Pomiar spektrofotometryczne wykonywano używając czytnika mikroplitek firmy BioTek Instruments. Absorbancję mierzono przy długości fali 600 nm (OD₆₀₀) bezpośrednio po wykonaniu próbek oraz po 1,5; 3; 4,5; 6; 20 oraz 24 godzinach inkubacji. Kontrolę negatywną stanowiła pożywka bez inokulatu. Kontrolę pozytywną stanowiła hodowla bakterii prowadzona w pożywce MRS niezawierającej soli żółciowej. Oznaczenia wykonywane były w trzech równoległych powtórzeniach.

Stopień tolerancji soli żółciowych wyrażono procentowo:

$$\text{Procent tolerancji} = \frac{\text{OD}_{600} \text{ eksperymentalne}}{\text{OD}_{600} \text{ kontroli pozytywnej}} \times 100$$

Gdzie:

OD₆₀₀ kontroli pozytywnej – absorbancja hodowli bakterii fermentacji mlekowej bez obecności soli żółciowej;

OD₆₀₀ eksperymentalne – absorbancja hodowli bakterii fermentacji mlekowej z dodatkiem soli żółciowej.

8.3.7. Oznaczenie hydrofobowości komórek

Hydrofobowość powierzchni komórkowej określano na podstawie metodyki opisanej przez Taheri i in. [2009a] oraz Pérez-Sánchez i in. [2011]. 24 godzinne hodowle bakterii fermentacji mlekowej odwirowywano przez 5 minut przy obrotach 7500 rpm/min w wirówce Centifuge 5804R, Eppendorf AG. Następnie supernatant usuwano, komórki bakteryjne przemywano dwukrotnie buforem fosforanowym i zawieszono w roztworze soli fizjologicznej do otrzymania gęstości optycznej 0,5 przy 600 nm (OD₆₀₀). Zawiesinę komórek bakterii przenoszono w ilości 3 cm³ do sterylnych probówek i dodawano 1 cm³ toluenu. Próbkę wytrząsano przy użyciu wytrząsarki Vortex przez 90 sekund. Następnie probówki odstawiono na 15 minut w celu oddzielenia się faz. Próbkę badaną stanowiła pobrana faza wodna, której absorbancję mierzono przy długości fali 600 nm.

Hydrofobowość komórek została obliczona jako średni procentowy spadek gęstości zawiesiny izolatów bakterii fermentacji mlekowej (OD₆₀₀) spowodowany adhezją mikroorganizmów do zastosowanego węglowodoru.

$$\text{Procent hydrofobowości} = \frac{\text{OD}_{600} \text{ przed zmieszaniem} - \text{OD}_{600} \text{ po zmieszaniu}}{\text{OD}_{600} \text{ przed zmieszaniem}} \times 100$$

Oznaczenia hydrofobowości komórek wykonywane były w trzech równoległych powtórzeniach.

8.4. Identyfikacja genetyczna wyselekcjonowanych bakterii

Identyfikację 30 izolatów bakterii fermentacji przeprowadzono na podstawie analizy sekwencji fragmentu genu kodującego 16s RNA, co wymagało izolacji DNA genomowego, wykonania reakcji PCR z odpowiednio dobranymi starterami, sekwencjonowania oraz analizy otrzymanych sekwencji.

8.4.1. Izolacja DNA genomowego z bakterii

Izolację DNA genomowego izolatów bakterii fermentacji mlekowej przeprowadzono przy użyciu zestawu **Genomic Mini AX Bacteria+ Spin** (nr. katalogowy 060-100MS) firmy A&A

Biotechnology, który jest w szczególności dedykowany do bakterii Gram-dodatnich. Izolację wykonywano według protokołu załączonego przez producenta z pewnymi modyfikacjami.



Rysunek 5. Schemat izolacji DNA z komórek izolatów bakterii fermentacji mlekowej

Źródło: opracowanie własne na podstawie protokołu produktu o nr. katalogowym 060-100MS, A&A

Biotechnology

8.4.2. Amplifikacja genu podjednostki rybosomalnej 16s RNA

W celu zamplifikowania genu kodującego 16s RNA przeprowadzono reakcję PCR oraz analizę elektroforetyczną uzyskanych produktów.

8.4.2.1. Reakcja łańcuchowa polimerazy

Amplifikacja fragmentu genu kodującego podjednostkę rybosomu 16s RNA została przeprowadzona z wykorzystaniem dwóch zdegenerowanych starterów: 1492r oraz S-D-Bact-0008 [Leser i in. 2002, Pang i in. 2011], komplementarnych do sekwencji docelowej (tab. 6).

Tabela 6. Sekwencje starterów reakcji 16s RNA

Starter	Sekwencja (5' → 3')	Długość startera (pz)	Długość produktu (pz)
1492r	ggT TAC CTT gTT ACg ACT T	19	1500
S-D-Bact-0008	AgA gTT TgA TCM Tgg CTC AG	20	

pz – par zasad

Źródło: opracowanie własne na podstawie danych producenta

Startery do badań przygotowano wykonując rozcieńczenia przy użyciu ultraczystej wody. Stężenie końcowe wynosiło 100 $\mu\text{moli}/\text{cm}^3$. DNA stanowiące matrycę, izolowano z 24 godzinnych hodowli bakterii fermentacji mlekowej. Mieszanina reakcyjna zawierała 18.3 μl ultraczystej sterylnej destylowanej wody, 2.5 μl 10 x bufor PCR z 20 mM MgCl_2 , 1 μl 5 mM dNTP (mieszaniny deoksynukleotydów), po 1 μl starterów (2,5 μM), 0,2 μl polimerazy (5U/ μl) i 1 μl matrycy DNA. Całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 25 μl . Reakcję PCR prowadzono przy użyciu termocyklera Biometra. Kolejne etapy reakcji PCR obejmowały: denaturację wstępną w 94°C (120 s.) oraz 40 cykli, na które składały się: denaturacja w 94°C (30 s.), wiązanie starterów w 45°C (30 s.) i wydłużanie (elongację) w 72°C (120 s.). Etap końcowy stanowił cykl obejmujący: denaturację w 95°C przez 30 sekund, wiązanie starterów w 45°C przez 30 sekund oraz 120 sekundowa elongacja w 72°C.

8.4.2.2. Analiza elektroforetyczna

Analizę produktów reakcji PCR wykonano techniką elektroforezy w 1% żelu agarozowym [Słomski, Szalata i Walkowiak 2011] z dodatkiem barwnika MIDORI GREEN w buforze 1xTBE (89 mM Tris, 89 mM kwasu borowego oraz 1 mM EDTA) przy napięciu 5 V/cm. Jako wzorzec

długości fragmentów DNA zastosowano „Nova 100bp DNA ladder”, Novazym Polska (długość fragmentów DNA w zakresie 100 - 1500 par zasad (pz). Zamplifikowane fragmenty DNA obserwowano w świetle UV.

8.4.3. Sekwencjonowanie genu 16s RNA i analiza wyników

Produkty PCR przekazano do sekwencjonowania do Pracowni Techniki Biologii Molekularnej, Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Otrzymane sekwencje obu rund sekwencjonowania, po edycji w programie GeneDoc 2.7.000, połączono i wygenerowano fragmenty o długości ok 1500nt odpowiadających 16s RNA. Następnie zanalizowano je używając narzędzia BLAST (algorytm Megablast) do przeszukania bazy sekwencji 16s RNA bakterii zdeponowanej w NCBI i porównano z sekwencjami dostępnymi w bazie.

8.5. Przygotowanie dodatków paszowych z wykorzystaniem wybranych izolatów bakterii fermentacji mlekowej

Do skomponowania dwóch dodatków paszowych przeznaczonych dla drobiu i trzody chlewnej wykorzystano 10 zróżnicowanych taksonomicznie izolatów wyselekcjonowanych spośród bakterii wybranych na podstawie wcześniej przeprowadzonych badań.

8.5.1. Dobór nośnika i składników projektowanych preparatów

Wybór podłoża, stanowiącego główny nośnik dodatków paszowych, wykonano, oceniając wzrost wybranych izolatów bakterii *Lactobacillus paracasei* KK 160, *Lactobacillus rhamnosus* KK 270 na dwóch różnych pożywkach.

Hodowle wybranych izolatów bakterii fermentacji mlekowej prowadzono w kolbach Erlenmayera o objętości 300 cm³, zawierających 190 cm³ jałowej płynnej pożywki bazującej na mleku odtłuszczonym lub mące żytniej (pkt 7.4.4.), którą zaszczepiano 10 cm³ inokulum 24 godzinnej bakterii. Po 24 godzinach inkubacji w temperaturze 37°C, wykonywano posiew ilościowy z wykorzystaniem podłoża agarowego MRS.

8.5.2. Otrzymywanie liofilizowanych hodowli bakterii

Liofilizację hodowli wybranych izolatów bakterii przygotowanych na nośniku bazującym na mleku odtłuszczonym przeprowadzono na podłożu wzbogaconym o maltodekstrynę oraz trehalozę [Lyon, Sethi i Glatz 1993; Kimoto-Nira i in. 2010]. Prace doświadczalne

prowadzono przy użyciu liofilizatora półkowego serii Alpha 1 D. Próbki 24 hodowli każdego z izolatów osobno, w ilości 20 cm³, przenoszono do jałowych jednorazowych pojemników z polipropylenu o pojemności 60 cm³. Następnie badane próbki przetrzymywano w zamrażarce w temperaturze -20°C przez 72h, po czym przeprowadzano liofilizację. Proces próżniowego suszenia sublimacyjnego odbywał się w stałych parametrach: ciśnienie 63 Pa, czas 96 godzin, temperatura półek grzejnych liofilizatora 30°C.

8.5.3. Przygotowanie biopreparatów

Próbki 10 zliofilizowanych hodowli bakterii przygotowanych według pkt. 8.5.2. mielono i mieszano dokładnie w równych proporcjach. W ten sposób przygotowano dwa preparaty, jeden przeznaczony dla trzody chlewnej, a drugi dla drobiu. Każdy zawierał hodowle pięciu izolatów. Pochodzenie szczepów bakterii było tożsame z grupą zwierząt monogastrycznych dla których będą one przeznaczone.

8.5.4. Ocena stabilności liofilizowanych hodowli bakterii oraz preparatów podczas przechowywania

Po przeprowadzeniu liofilizacji określano stabilność 10 liofilizowanych hodowli bakterii oraz 2 skomponowanych preparatów zawierających wyselekcjonowane szczepy. Ocena liczebności populacji na podstawie posiewów ilościowych przeprowadzano bezpośrednio po liofilizacji oraz po 30 dniach przechowywania w temperaturze 4°C oraz -22°C. Próbki do oceny stabilności podczas przechowywania trzymano w szczelnie zamkniętych, jałowych pojemnikach. Bezpośrednio przed badaniem próbki mielono i wykonywano posiewy ilościowe z wykorzystaniem podłoża MRS agar.

Stabilność podczas przechowywania badanych preparatów określano porównując zmiany liczebności bakterii między posiewami wykonanymi bezpośrednio po liofilizacji po 30 dniach przechowywania. Parametry testu przechowywania symulowały 30 dniowy okres przechowywania preparatu w warunkach chłodniczych (4°C) oraz mrożenia (-20°C).

8.5.5. Ocena przeżywalności bakterii obecnych w preparatach w symulowanym układzie pokarmowym

W celu określenia przeżywalności szczepów bakterii fermentacji mlekowej w symulowanym układzie pokarmowym, wykorzystano modele *in vitro* trzody chlewnej [Boisen i Fernández 1997; Minekus 1998; Avantaggiato, Havenaar i Visconti 2003;

Versantvoort i in. 2005] oraz drobiu [Versantvoort i in. 2005; Latorre i in. 2015; Menezes-Blackburn, Gabler i Greiner 2015]. Opracowane modele *in vitro* przewodów pokarmowych zwierząt monogastycznych obejmowały warunki panujące w początkowych odcinkach tych przewodów. W przypadku świń zastosowane warunki odzwierciedlały: jamę gębową, żołądek, jelito cienkie, a w przypadku kur: wole, żołądek i jelito cienkie. W badaniach nie ujmowano doświadczeń związanych z symulacją jelita grubego.

8.5.5.1. Preparat przeznaczony dla trzody chlewnej

Przeżywalność bakterii obecnych w preparatach przygotowanych według pkt. 8.5.3. oceniano poddając je transferowi przez symulowany przewód pokarmowy. Próbki do badań stanowiły: liofilizowany preparat zmieszany z paszą oraz sam preparat, taki dobór miał na celu określenie zależności przeżywalności badanych bakterii w warunkach spożycia ich z pokarmem oraz bez.

W doświadczeniach wykorzystano komercyjną paszę - uniwersalny koncentrat białkowy do stosowania w żywieniu tuczników w okresie tuczu. Mieszanka ta sporządzona jest na bazie m.in. zbóż, wysokobiałkowych śrutów poekstrakcyjnych, premiksu witaminowo-mineralnego, dodatków mineralnych jak również związków biologicznie czynnych i innych komponentów. Próbkę A stanowiło 5 g koncentratu białkowego z 5% dodatkiem liofilizatu preparatu bakteryjnego, próbkę B stanowiło 5 g 100% preparatu.

Tabela 7. Model trawienia *in vitro* trzody chlewnej

Odcinek przewodu pokarmowego	Roztwór symulujący środowisko danego odcinka przewodu pokarmowego	Zastosowana ilość	Czas zalegania pokarmu
Jama gębowa	symulowany r-r śliny	7,50 cm ³	5 minut
	woda destylowana	12,50 cm ³	
Żołądek	0,1 M bufor fosforanowy	250,00 cm ³	120 minut
	0,2 M r-r HCl	100,00 cm ³	
	r-r wodny pepsyny 25 mg/ cm ³	10,00 cm ³	
Jelito cienkie	r-r wodny pankreatyny 100 mg/ cm ³	10,00 cm ³	240 minut
	0,6 M r-r NaOH	50,00 cm ³	
	0,2 M bufor fosforanowy	100,00 cm ³	

pH matrycy na poszczególnych etapach badań ustalano roztworami 1M wodorotlenku sodu oraz 1M kwasu solnego.

Źródło: opracowanie własne na podstawie badań Boisen i Fernández [1997]; Minekus [1998]; Avantaggiato, Havenaar i Visconti [2003]; Versantvoort i in. [2005]

Wykorzystany model trawienia *in vitro* trzody chlewnej obejmował trzystopniowy proces trawienia zachodzący w jamie gębowej, żołądka oraz jelicie cienkim (tab. 7). Preparaty A i B poddano wstępnemu trawieniu w 39°C w roztworze śliny przez 5 minut, następnie w symulowanym soku żołądkowym przez 2h oraz jelitowym przez 4h. W każdym etapie badana mieszanina była inkubowana w temperaturze 39°C w warunkach ciągłego mieszania z szybkością 150 obrotów na minutę na wytrząsarce obrotowej w celu zapewnienia jednorodnego rozkładu wszystkich składników. Na początku każdego z odcinków przewodu pokarmowego oraz po upływie czasu zalegania pobierano próbki, z których wykonywano posiewy ilościowe w celu oznaczenia przeżywalności badanych bakterii.

8.5.5.2. Ocena przeżywalności bakterii obecnych w preparacie przeznaczonym dla drobiu w symulowanym przewodzie pokarmowym

Liofilizowany preparat przygotowanych według pkt. 8.5.3. zmieszany z paszą, jak również sam preparat, poddano transferowi przez symulowany przewód pokarmowy drobiu w celu określenia przeżywalności bakterii w trakcie procesu trawienia. Dobór próbek miał na celu określenie zależności przeżywalności badanych bakterii w warunkach w przypadku spożycia ich z pokarmem oraz bez. Do badań wykorzystano komercyjną paszę kruszoną na bazie pszenicy przeznaczoną do żywienia brojlerów w okresie od 10 do 20 dnia tuczu. Próbkę A stanowiła pasza z 5% dodatkiem liofilizowanego preparatu bakteryjnego, próbkę B stanowił sam preparat.

Schemat modelu trawienia drobiu *in vitro* obejmował trzystopniowy proces trawienia, w tym: wole, żołądek (gruczołowy i mięśniowy) oraz jelito cienkie (tab. 8).

Tabela 8. Schemat zastosowanego modelu trawienia *in vitro* drobiu

Odcinek przewodu pokarmowego	Roztwór symulujący środowisko danego odcinka przewodu pokarmowego	Zastosowana ilość	Czas zalegania pokarmu
Wole	50 mM bufor octanowy	15,00 cm ³	30 minut
Żołądek	1M r-r kwasu solnego - HCl	1,40 cm ³	45 minut
	r-r pepsyny w buforze octanowym	2,60 cm ³	
Jelito cienkie	r-r wodny pankreatyny	3,25 cm ³	60 minut
	1 M r-r wodorowęglanu sodu - NaHCO ₃	3,25 cm ³	

pH matrycy na poszczególnych etapach badań ustalano roztworami 1M wodorotlenku sodu oraz 1M kwasu solnego

Źródło: opracowanie własne na podstawie badań Versantvoort i in. [2005]; Latorre i in. [2015]; Menezes-Blackburn, Gabler i Greiner [2015]

Trawienie treści pokarmowej inicjowane było przez mieszanie badanych próbek A i B w ilości 5 g z buforem octanowym w czasie 30 min. Następnie, dodawano kolejno soki żołądkowe i jelitowe w celu symulowania procesów trawienia odpowiednio w żołądku (45 min) i jelicie cienkim (60 min). W każdym etapie badana mieszanina była inkubowana w temperaturze 40°C w warunkach ciągłego mieszania z szybkością 150 obrotów na minutę na wyrząsarce obrotowej w celu zapewnienia jednorodnego rozkładu wszystkich składników. Na początku każdego z odcinków przewodu pokarmowego oraz po upływie czasu zalegania pobierano próbki, z których wykonywano posiewy ilościowe w celu oznaczenia przeżywalności badanych bakterii.

8.6. Analiza statystyczna wyników

Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono z wykorzystaniem programu SPSS Statistics 23 oraz Microsoft Excel®. W celu porównania wartości średnich przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA). Istotność różnic pomiędzy wartościami średnimi dla doświadczeń, określano za pomocą testu post-hoc Tukeya. Wszystkie hipotezy statystyczne weryfikowano na poziomie istotności $p < 0,05$.

9. Wyniki badań i dyskusja

Badania przeprowadzone w ramach niniejszej pracy dotyczyły opracowania nowych dodatków paszowych z wykorzystaniem bakterii fermentacji mlekowej o właściwościach potencjalnie probiotycznych, przeznaczonych dla zwierząt monogastrycznych. Kilkuetapowe prace doświadczalne obejmowały izolację mikroorganizmów z mikrobioty jelitowej prosiąt i kurcząt oraz ich wielokierunkową charakterystykę. Ostatecznie, po dokonaniu selekcji na podstawie uzyskanych wyników, opracowano dwie odrębne kompozycje biopreparatów z przeznaczeniem dla dwóch grup zwierząt monogastrycznych.

9.1. Izolacja bakterii fermentacji mlekowej z mikrobioty jelitowej zwierząt monogastrycznych

W pierwszym etapie prowadzonych badań z materiału badawczego, który stanowiło 20 próbek kału prosiąt oraz 10 próbek przewodów pokarmowych kurcząt rzeźnych wyizolowano 700 czystych kultur mikroorganizmów wykorzystując podłoże MRS przeznaczone dla bakterii fermentacji mlekowej. Dobór materiału izolacyjnego miał na celu uzyskanie izolatów od przedstawicieli gatunku, u którego docelowo miałyby być one zastosowane w formie dodatków paszowych. Jak wskazują dane literaturowe, część korzystnych efektów zdrowotnych może być gatunkowo specyficzna. Takie podejście umożliwia uzyskanie szczepów najbardziej dostosowanych do mikrobioty jelitowej danego gatunku zwierząt [Lin i in. 2007; Guo i in. 2010]. Kluczowym warunkiem w doborze materiału izolacyjnego był również fakt, iż osobniki, od których był pobierany, były młode i nie otrzymywały probiotyków. W przypadku trzody chlewnej wybór młodych zwierząt, pobierających pokarm od lochy zwiększa prawdopodobieństwo uzyskania zróżnicowanych izolatów bakterii fermentacji mlekowej o właściwościach probiotycznych i przeciwdrobnoustrojowych.

Liczebność bakterii fermentacji mlekowej w badanych próbkach materiału izolacyjnego prosiąt ssących kształtowała się na poziomie $1,3 \times 10^7$ do $7,1 \times 10^9$ jtk/cm³, prosiąt odsadzonych w ilości od $2,9 \times 10^8$ do $9,9 \times 10^9$ jtk/cm³, natomiast kurcząt od $2,6 \times 10^8$ do $6,1 \times 10^9$ jtk/cm³.

Tabela 9. Liczba kolonii na podłożu MRS z dodatkiem CaCO₃, uzyskanych z materiału izolacyjnego [jtk/cm³]

Numer próbki	Prosięta ssące	Prosięta odsadzone	Kurczęta rzeźne
1.	1,4 x 10 ⁹ de	3,8 x 10 ⁸ a	3,4 x 10 ⁸ ab
2.	4,3 x 10 ⁹ efg	6,9 x 10 ⁸ ab	6,1 x 10 ⁹ d
3.	7,1 x 10 ⁹ g	9,9 x 10 ⁹ c	3,3 x 10 ⁸ ab
4.	6,5 x 10 ⁹ fg	3,1 x 10 ⁹ bc	3,1 x 10 ⁹ cd
5.	2,0 x 10 ⁹ defg	2,2 x 10 ⁹ bc	2,6 x 10 ⁸ a
6.	1,3 x 10 ⁷ a	3,1 x 10 ⁹ bc	3,6 x 10 ⁹ d
7.	1,4 x 10 ⁸ b	1,0 x 10 ⁹ ab	4,2 x 10 ⁹ d
8.	1,7 x 10 ⁸ bc	7,9 x 10 ⁹ c	5,6 x 10 ⁹ d
9.	1,1 x 10 ⁹ cd	9,0 x 10 ⁹ c	9,4 x 10 ⁸ bc
10.	2,1 x 10 ⁹ def	2,9 x 10 ⁸ a	9,7 x 10 ⁸ ab

*analiza statystyczna przeprowadzona została na danych w postaci logarytmicznej

*a- g średnie oznaczone różnymi literami w kolumnach różnią się istotnie przy p < 0,05

Źródło: na podstawie badań własnych

Na podstawie wyników stwierdzono istotne różnice w liczebności populacji mikroorganizmów wyizolowanych z próbek kału prosiąt ssących i odsadzonych oraz kurcząt (tab. 9). Najwyższą liczebność odnotowano kolejno w trzech próbkach kału pochodzących od prosiąt odsadzonych (7,9 - 9,9 x 10⁹ jtk/g), dwóch próbkach kału prosiąt ssących (6,5-7,1 x 10⁹ jtk/g) oraz w dwóch próbkach pochodzących od kurcząt (5,6 - 6,1 x 10⁹ jtk/g). Niemal w połowie próbek, niezależnie od pochodzenia liczba bakterii wynosiła 1,1 - 4,3 x 10⁹ jtk/g. Niższe liczebności, rzędu 10⁸ jtk/g, odnotowano w dwóch próbkach uzyskanych od prosiąt ssących, trzech od prosiąt odsadzonych i pięciu od kurcząt rzeźnych. W przypadku jednej próbki materiału izolacyjnego pochodzącego z kału prosiąt ssących zaobserwowano znacznie niższą liczebność populacji na poziomie 1,3 x 10⁷ jtk/g.

Podobne liczebności bakterii fermentacji mlekowej w próbkach treści jelitowej i kału zwierząt monogastrycznych obserwowali inni autorzy. Petsuriyawong i Khunajakr [2011] izolując bakterie fermentacji mlekowej ze 136 próbek kału prosiąt w wieku do 3 miesięcy uzyskali liczebność w granicach 8,03 (1,08 x 10⁸ jtk/g) do 8,95 (8,97 x 10⁸ jtk/g) log. Nie zaobserwowali przy tym istotnych różnic w liczebności populacji tych bakterii pomiędzy próbkami pochodzącymi od prosiąt ssących, w wieku 28 - 35 dni, a próbkami uzyskanymi od prosiąt odsadzonych, w wieku 45 - 120 dni. Guo i in. [2010], izolując tą grupę mikroorganizmów ze 150 próbek kału prosiąt w wieku 7 - 10 dni, uzyskali podobną

rozbieżność wyników, jak w prezentowanej pracy, od 7,0 do 9,0 log jtk/g. Porównywalne liczebności bakterii fermentacji mlekowej odnotowali również Naito i in. [1995] w próbkach kału pochodzących od prosiąt w wieku od 1 do 45 dni. Niektóre badania wskazują na różnice w liczebności populacji tych bakterii w zależności od wieku zwierząt. Przykładowo, Swords i in. [1993] odnotowali wyższą liczbę bakterii fermentacji mlekowej izolowanych z przewodów pokarmowych prosiąt odsadzonych w porównaniu do prosiąt ssących. Taki wynik może być zależny od wielu determinantów, m.in. czynników środowiskowych, diety czy higieny zwierząt.

W przypadku drobiu dane literaturowe również są zbieżne z wynikami uzyskanymi w niniejszej pracy. Bjerrum i in. [2006] porównując próbki różnych odcinków przewodu pokarmowego brojlerów z hodowli konwencjonalnych i organicznych stwierdzili, że liczba bakterii fermentacji mlekowej kształtuje się na poziomie 10^9 jtk/g i jest porównywalna niezależnie od rodzaju chowu. Porównując odcinki przewodu pokarmowego zwykle obserwowano najwyższe liczebności populacji tych bakterii w jelicie ślepym, a nieco niższe stwierdzono w jelicie krętym i odbytnicy brojlerów organicznych.

Zarówno wyniki uzyskane w prezentowanej pracy, jak i dane literaturowe potwierdzają, że materiał izolacyjny w postaci kału oraz treści jelitowej zwierząt monogastrycznych stanowią dobre źródła izolacji bakterii fermentacji mlekowej.

9.2. Fenotypowa charakterystyka izolatów bakterii fermentacji mlekowej

Z posiewów wykonanych w pierwszym etapie doświadczeń wyizolowano 700 czystych kultur mikroorganizmów, wybierając kolonie dobrze wyodrębnione, o morfologii typowej dla bakterii fermentacji mlekowej. Jednocześnie brano pod uwagę ich zróżnicowanie w celu zwiększenia różnorodności izolatów. Charakterystyczną cechą, braną również pod uwagę, były przejaśnienia wokół kolonii na podłożu stałym MRS z dodatkiem CaCO_3 , widoczne na fotografiach 1 i 2, wywołane obecnością kwasów organicznych, które rozpuszczają węglan wapnia [Khunajakr i in. 2008].



Fotografia 1



Fotografia 2

Fot. 1 – próbka nr. 3 pochodząca z materiału izolacyjnego prosiąt ssących, Fot. 2 – próbka nr. 3 pochodząca z materiału izolacyjnego kurcząt rzeźnych

Fotografie 1, 2. Wzrost kolonii bakterii fermentacji mlekowej na podłożu MRS wzbogaconym CaCO_3

Źródło: wykonanie własne

Czystość kultur sprawdzano przeprowadzając posiewy redukcyjne. Liczbę izolatów pochodzących z poszczególnych próbek materiału izolacyjnego przedstawiono w tabeli 10. łącznie wyizolowano 284 mikroorganizmów z kału prosiąt ssących, 166 z prosiąt odsadzonych oraz 250 z przewodów pokarmowych kurcząt rzeźnych.

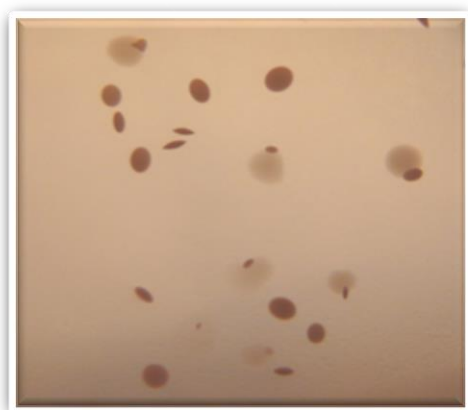
Tabela 10. Zestawienie wyników izolacji mikroorganizmów z przewodów pokarmowych zwierząt monogastrycznych

Opis	Prosięta ssące	Prosięta odsadzone	Kurczęta rzeźne
Ilość próbek materiału izolacyjnego	10	10	10
Liczba wyizolowanych mikroorganizmów	284	166	250
Nr próbki:			
1.	25	12	24
2.	27	22	22
3.	28	12	21
4.	27	11	21
5.	37	24	20
6.	25	22	32
7.	27	20	30
8.	34	19	29
9.	28	13	30
10.	26	12	21

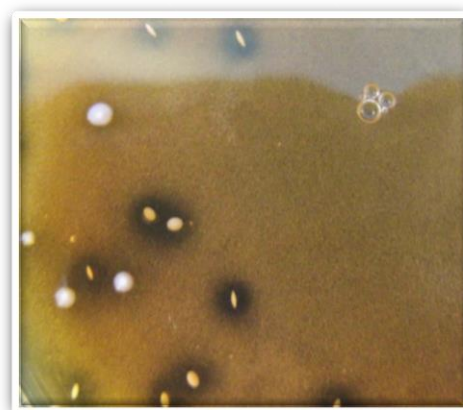
Źródło: na podstawie badań własnych

Wszystkim izolatom nadano oznaczenia, którymi posługiwano się w prezentowanej pracy (szczegółowe zestawienie znajduje się w załączniku elektronicznym, tab. E. 1 - 3).

Z każdej próbki materiału izolacyjnego uzyskano co najmniej kilkanaście czystych kultur, które poddano ocenie makro- i mikroskopowej. Bakterie fermentacji mlekowej rosły na podłożu stałym MRS w postaci małych i średnich, często wypukłych kolonii, bezbarwnych lub o barwie kremowej do kremowo-żółtej. Przyjmowały one kształt okrągły, owalny lub łezkowaty z dobrze wyodrębnionym gładkim brzegiem (fot. 3, 4). Powierzchnia kolonii była matowa lub błyszcząca, a struktura często śluzowata lub mukoidalna.



Fotografia 3



Fotografia 4

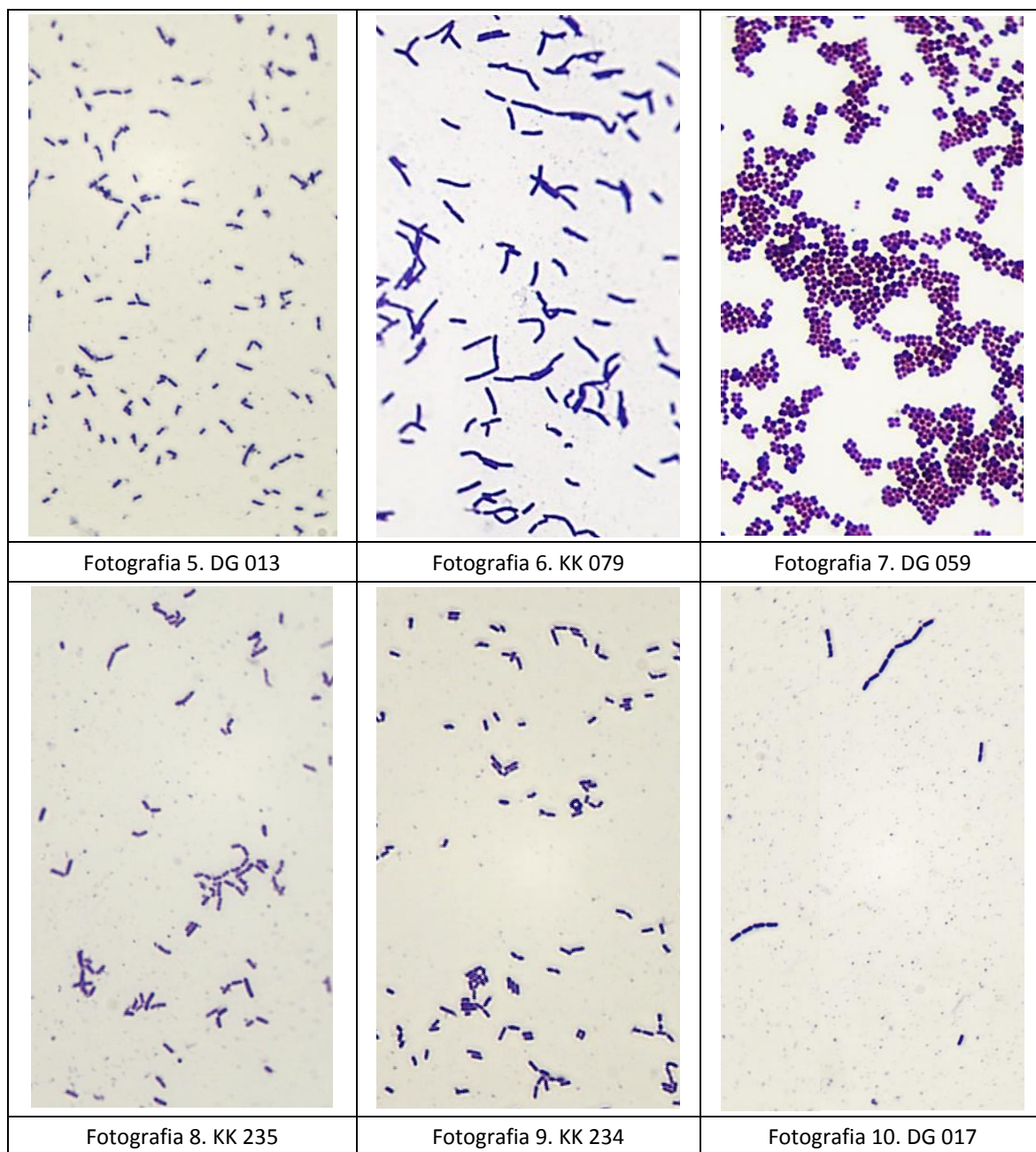
Fot. 3 – podłoże MRS, izolat KK 078, fot. 4 – podłoże MRS wzbogacone CaCO₃, izolat DG 380

Fotografie 3, 4. Obraz makroskopowy wzrostu kolonii bakterii fermentacji mlekowej

Źródło: wykonanie własne

Obserwacje mikroskopowe preparatów barwionych metodą Grama wykazały, że spośród 700 izolatów zdecydowana większość należy do gramdodatnich pałeczek i ziarniaków.

Pałeczki wykazywały znaczne zróżnicowanie pod względem morfologicznym (długość i grubość komórek) oraz przyjmowanych form i tworzonych układów. Wspomniane różnice można zaobserwować na fotografiach 5, 8, 9 lub 10. Wyszczególnić można zarówno krótkie (fot. 5) jak i wydłużone formy komórek (fot. 6), tworzące charakterystyczne dla bakterii fermentacji mlekowej układy takie jak łańcuszki, palisady lub formy nieregularnie (Y i V). Z kolei większość ziarniaków występowała w postaci tetrad (fot 7).



Fotografie 5-10. Obraz mikroskopowy wybranych preparatów bakteryjnych

Źródło: wykonanie własne

Oceniano również zdolność badanych mikroorganizmów do wytwarzania katalazy. Pośród 700 izolatów, zaobserwowano 565 kultur bakterii niewykazujących zdolności do wytwarzania katalazy, co stanowi jedną z podstawowych cech branych pod uwagę przy wstępnej identyfikacji bakterii fermentacji mlekowej. Na podstawie badania oznaczono 33 izolaty bakterii katalazododatnich. Pozostałe 102 kultury mikroorganizmów stanowiły drożdże, których nie uwzględniono w doświadczeniach. Zestawienie wyników zawarte zostało w tabeli 11.

Zgodnie z założeniami dysertacji doktorskiej przedmiot badań miały stanowić wyłącznie bakterie fermentacji mlekowej o właściwościach potencjalnie probiotycznych, dlatego też odrzucono wszystkie mikroorganizmy niezakwalifikowane do tej grupy. Drobnoustroje wyeliminowane na tym etapie stanowiły 19% wszystkich izolatów.

Obecność drożdży, jak również innych bakterii na podłożu MRS wynikała prawdopodobnie z niewystarczającej selektywności tej pożywki, co obserwują często inni autorzy. Højberg i in. [2005] badając skład mikrobioty przewodów pokarmowych prosiąt ssących, zaobserwowali wzrost pojedynczych szczepów bakterii z gatunku *Staphylococcus* oraz enteroki. Tharmaraj i Shah [2003] w badaniach dotyczących oceny zastosowania zróżnicowanych podłoży selektywnych zaobserwowali wzrost bakterii z gatunku *Propionibacterium* na podłożu MRS. Pomimo takich wyników, podłoże MRS uznawane jest za odpowiednie i najczęściej stosowane do selektywnego wzrostu bakterii fermentacji mlekowej, izolowanych z przewodów pokarmowych oraz kału zwierząt monogastrycznych [Van Winsen i in. 2001; Roofchae i in. 2011].

Podczas pasażowania badanych izolatów obserwowano różną intensywność wzrostu na podłożu MRS, dlatego niektóre z nich przeszczepiano na pożywki TPY oraz M-17. Ze względu na brak znaczących zmian w intensywności wzrostu kultur, w kolejnych doświadczeniach wykorzystywano wyłącznie pożywkę MRS do namnażania izolatów.

Tabela 11. Wstępna ocena fenotypowa mikroorganizmów wyizolowanych z przewodów pokarmowych zwierząt monogastrycznych

Materiał izolacyjny	Liczba czystych kultur mikroorganizmów	Analiza morfologiczna			Wytwarzanie katalazy*		Izolaty odrzucone	Ilość czystych kultur bakterii fermentacji mlekowej
		Gram-dodatnie pączki	Gram-dodatnie ziarniaki	drożdże	Katalazoujemnie	Katalazododatnie		
Prosięta ssące	284	219	32	33	217	7	40	244
Prosięta odsadzone	166	117	24	25	98	9	34	132
Kurczęta rzeźne	250	148	58	44	128	17	61	189

*zdolność do wytwarzania katalazy oznaczano tylko dla bakterii

Źródło: na podstawie badań własnych

Do kolejnego etapu badań wybrano 244 czyste kultury bakterii fermentacji mlekowej wyizolowane z kału prosiąt ssących, 132 izolaty pochodzące z treści jelitowej prosiąt odsadzonych oraz 189 izolatów bakterii z przewodów pokarmowych kurcząt rzeźnych.

9.3. Selekcja bakterii na podstawie wytycznych FAO/WHO oraz wybranych wyróżników determinujących funkcjonalność szczepów

9.3.1. Ocena aktywności antybakteryjnej izolatów bakterii fermentacji mlekowej

Zdolność do wytwarzania substancji przeciwdrobnoustrojowych i hamowania rozwoju mikroorganizmów patogennych stanowi jedno z istotniejszych kryteriów w selekcji bakterii potencjalnie probiotycznych [FAO/WHO 2002]. Dlatego w pierwszym etapie selekcji określano aktywność antybakteryjną izolatów bakterii względem Gram-ujemnych i Gram-dodatnich patogenów pokarmowych. Bakterie wskaźnikowe wybrano na podstawie danych dotyczących czynników zakażeń pokarmowych zwierząt hodowlanych jak również chorób ludzi wywołanych przez mikroorganizmy przenoszone za pośrednictwem produktów pochodzenia zwierzęcego [Swanenburg i in. 2001; Holt i in. 2006; Lin i in. 2007]. Wśród istotniejszych czynników etiologicznych bakteryjnych zakażeń przewodu pokarmowego zwierząt monogastrycznych wymienia się m.in.: *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella* spp., *Yersinia* spp. [Swanenburg i in. 2001; Holt i in. 2006; Lin i in. 2007; Chan i in. 2013]. W prezentowanej pracy pod uwagę brano 14 różnych szczepów bakterii (tab. 3 w pkt. 9.3.). Ocenę aktywności antybakteryjnej przeprowadzono dwukrotnie, bezpośrednio po izolacji bakterii z materiału izolacyjnego i ich morfologicznej ocenie oraz po półtorarocznym przechowywaniu w warunkach głębokiego zamrożenia (opisane w pkt. 8.3.2.). Pierwsza ocena dotyczyła 565 izolatów, natomiast kolejna obejmowała 62 izolaty bakterii, wybrane na podstawie dalszych badań doświadczalnych. Powtórna ocena aktywności antybakteryjnej miała na celu sprawdzenie, czy na skutek długoterminowego przechowywania i pasażowania bakterie nie straciły swoich właściwości.

Do przeprowadzenia badań wykorzystano metodę dyfuzji studzienkowej, opisaną pierwszy raz w roku 1977 [Vu i in. 2002; Aujoulat i in. 2011]. Pozwala ona na ocenę wpływu czynników wprowadzonych do studzienki na wzrost mikroorganizmów na podłożu stałym. Metodyka badań *in vitro* aktywności przeciwdrobnoustrojowej różnych substancji ewoluowała na przestrzeni lat, ale zastosowana metoda jest stosunkowo prosta i nadal powszechnie wykorzystywana.

W prezentowanej pracy wyniki oceny aktywności antybakteryjnej bakterii fermentacji mlekowej posłużyły do wyboru izolatów bakterii o najsilniejszym oddziaływaniu przeciwdrobnoustrojowym.

9.3.1.1. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa izolatów pochodzących z kału i jelit zwierząt monogastrycznych

Bezpośrednio po wyizolowaniu i wstępnej charakterystyce fenotypowej określono aktywność przeciwdrobnoustrojową 565 izolatów (w tym 244 izolaty pochodzące z treści jelit prosiąt ssących, 132 izolaty z treści jelit zwierząt odsadzonych oraz 189 izolatów z przewodów pokarmowych kurcząt rzeźnych) wobec 10 szczepów bakterii: *C. perfringens*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. aerogenes*, *E. coli*, *P. vulgaris*, *S. enterica* ser. Enteritidis, *S. enterica* ser. Typhimurium, *S. marcescens* oraz *Y. enterocolitica*. Zasadniczym celem tego etapu było dokonanie wyboru izolatów charakteryzujących się największą aktywnością antybakteryjną oraz eliminacja bakterii niewykazujących takich właściwości. Wyniki tych badań uwzględniające pochodzenie bakterii fermentacji mlekowej przedstawiono w załączniku elektronicznym w tabelach E. 4 - E.6. Wyniki zestawiono jako liczbę izolatów bakterii wykazujących oddziaływanie silne, umiarkowane, słabe oraz brak oddziaływania względem poszczególnych mikroorganizmów wskaźnikowych (tab. 12). Stopień oddziaływania określono na podstawie wielkości stref zahamowania wzrostu bakterii wskaźnikowych przez hodowle badanych izolatów.

Wyniki doświadczeń *in vitro* wykazały duże zróżnicowanie oddziaływania antybakteryjnego badanych izolatów, zarówno biorąc pod uwagę zakres ich aktywności, jak i stopień hamowania wzrostu poszczególnych mikroorganizmów wskaźnikowych.

Należy podkreślić, że na tym etapie doświadczeń oceniano aktywność antagonistyczną hodowli bez korygowania liczebności populacji. Każda hodowla była wyprowadzona z pojedynczej kolonii i prowadzona w warunkach typowych dla bakterii fermentacji mlekowej (temperatura 37°C, inkubacja 24 godziny, atmosfera beztlenowa, 5-10% CO₂). Intensywność wzrostu izolatów stanowiła dodatkowy czynnik selekcyjny, zakładając, że słabo rosnące bakterie będą miały mniejszą przydatność produkcyjną. Zaobserwowano, że gęstość hodowli (określana densytometrycznie) znacząco wpływała na wyniki aktywności antybakteryjnej. Z reguły hodowle o wysokiej liczebności populacji wykazywały najsilniejszą aktywność hamującą wzrost bakterii wskaźnikowych, niemniej jednak zdarzały się hodowle, które nie hamowały ich wzrostu pomimo, iż osiągały wysoką gęstość optyczną.

Do takich izolatów należały: DG 024, DG 241, DG 088 lub KK 082 (załącznik elektroniczny, tab. E. 4 - E.6).

Spośród wszystkich izolatów bakterii, 272 nie wykazywało żadnych właściwości antagonistycznych względem badanych mikroorganizmów wskaźnikowych. Pozostałe charakteryzowały się zróżnicowanym zakresem i siłą oddziaływania. Większość izolatów, które wykazywały aktywność antybakteryjną, charakteryzowała się słabym stopniem oddziaływania. Dotyczyło to wszystkich grup bakterii fermentacji mlekowej, niezależnie od pochodzenia. Tylko nieliczna grupa izolatów charakteryzowała się oddziaływaniem umiarkowanym do silnego w stosunku do mikroorganizmów wskaźnikowych. Wśród bakterii uzyskanych z kału prosiąt ssących (tab. 12), z 244 badanych kultur, od 1 do 10 izolatów bakterii wykazywało silne oddziaływanie antybakteryjne (w zależności od szczepu bakterii wskaźnikowych), od 1 do 34 demonstrowało umiarkowane oddziaływanie przeciwdrobnoustrojowe, natomiast słabą aktywność antagonistyczną wykazało 21 do 49 hodowli. Brak oddziaływania wobec mikroorganizmów wskaźnikowych obserwowano w przypadku 161 do 222 izolatów.

Tabela 12. Aktywność antybakteryjna izolatów pochodzących z treści jelit prosiąt ssących

Rodzaj bakterii	Liczba izolatów, wykazujących oddziaływanie antagonistyczne w stopniu:			
	Silnym (średnica strefy >20,01 mm)	Umiarkowanym (średnica strefy 20,00-15,01 mm)	Słabym (średnica strefy 15,00-10,00 mm)	Brak oddziaływania
<i>C. perfringens</i>	6	24	32	182
<i>L. monocytogenes</i>	0	4	35	205
<i>S. aureus</i>	10	28	39	167
<i>E. aerogenes</i>	6	27	49	162
<i>E. coli</i>	1	27	22	194
<i>P. vulgaris</i>	0	1	36	207
<i>S. enterica</i> ser. Enteritidis	0	1	39	204
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium	1	34	28	181
<i>S. marcescens</i>	7	27	49	161
<i>Y. enterocolitica</i>	0	1	21	222

Źródło: na podstawie badań własnych

Antybakteryjne oddziaływanie izolatów bakterii pochodzących z kału prosiąt odsadzonych zestawione zostało w tabeli 13. Wśród 132 przebadanych bakterii od 1 do 7 izolatów wykazywało silne oddziaływanie antybakteryjne (w zależności

od szczepu bakterii wskaźnikowych), od 3 do 14 demonstrowało umiarkowane oddziaływanie przeciwdrobnoustrojowe, natomiast słabą aktywność antagonistyczną odnotowano w przypadku 10 do 30 izolatów. Nie odnotowano aktywności od 92 do 122 izolatów bakterii fermentacji mlekowej w stosunku do bakterii wskaźnikowych.

Tabela 13. Aktywność antybakteryjna izolatów pochodzących z treści jelit prosiąt odsadzonych

Rodzaj bakterii	Liczba izolatów, wykazujących oddziaływanie antagonistyczne w stopniu:			
	Silnym (średnica strefy >20,01 mm)	Umiarkowanym (średnica strefy 20,00-15,01 mm)	Słabym (średnica strefy 15,00-10,00 mm)	Brak oddziaływania
<i>C. perfringens</i>	0	5	24	103
<i>L. monocytogenes</i>	0	3	10	119
<i>S. aureus</i>	7	14	33	78
<i>E. aerogenes</i>	0	9	22	101
<i>E. coli</i>	1	9	25	97
<i>Proteus vulgaris</i>	0	0	15	117
<i>S. enterica</i> ser. Enteritidis	0	0	15	117
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium	1	12	16	103
<i>S. marcescens</i>	1	9	30	92
<i>Y. enterocolitica</i>	0	0	10	122

Źródło: na podstawie badań własnych

Wyniki antybakteryjnego oddziaływania uzyskane dla 189 izolatów z przewodów pokarmowych kurcząt (w zależności od szczepu bakterii wskaźnikowych), zawarte w tabeli 14, wskazują, że 2 do 4 izolatów wykazywało silne oddziaływanie antagonistyczne wobec badanych bakterii wskaźnikowych. Umiarkowane oddziaływanie zaobserwowano względem 4 do 14 izolatów bakterii wskaźnikowych, natomiast od 6 do 47 słabą aktywność przeciwdrobnoustrojową. Nie odnotowano hamowania wzrostu badanych bakterii wskaźnikowych przez 132 do 183 izolatów bakterii fermentacji mlekowej.

Tabela 14. Aktywność antybakteryjna izolatów pochodzących z jelit kurcząt rzeźnych

Rodzaj bakterii	Liczba izolatów, wykazujących oddziaływanie antagonistyczne w stopniu:			
	Silnym (średnica strefy >20,01 mm)	Umiarkowanym (średnica strefy 20,00-15,01 mm)	Słabym (średnica strefy 15,00-10,00 mm)	Brak oddziaływania
<i>C. perfringens</i>	0	14	24	151
<i>L. monocytogenes</i>	0	0	7	182
<i>S. aureus</i>	4	13	40	132
<i>E. aerogenes</i>	0	4	41	144
<i>E. coli</i>	0	5	40	144
<i>P. vulgaris</i>	0	0	11	178
<i>S. enterica</i> ser. Enteritidis	0	0	6	183
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium	2	14	31	142
<i>S. marcescens</i>	2	8	47	132
<i>Y. enterocolitica</i>	0	0	36	153

Źródło: na podstawie badań własnych

Porównując izolaty bakterii fermentacji mlekowej pod względem pochodzenia, można zauważyć, że najsilniejsze oddziaływanie antybakteryjne demonstrowały izolaty pochodzące z próbek kału prosiąt ssących. Fotografie 12-16 przedstawiają przykładowe oddziaływanie badanych izolatów wobec wybranych mikroorganizmów wskaźnikowych.

Fotografia 11. *Staphylococcus aureus*Fotografia 12. *Serratia marcescens*



Fotografia 13. *Escherichia coli*



Fotografia 14. *Salmonella enteritidis* ser. Typhimurium



Fotografia 15. *Enterobacter aerogenes*



Fotografia 16. *Proteus vulgaris*

Fotografie 11-16. Aktywność antybakteryjna wybranych izolatów bakterii fermentacji mlekowej

Źródło: wykonanie własne

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że mikroorganizmy wskaźnikowe różniły się wrażliwością na działanie bakterii fermentacji mlekowej. Największą wrażliwość wykazywały bakterie *S. aureus*, *E. aerogenes* i *S. marcescens*. Spośród badanych izolatów, 188 hamowało wzrost *S. aureus*, a wielkość stref zahamowania wzrostu w przypadku 21 z nich przekraczała 20 mm. Spośród 565 badanych izolatów 180 hamowało wzrost bakterii *S. marcescens*, w tym 10 w stopniu silnym, czego rezultatem były strefy zahamowania wzrostu przekraczające 20 mm. Z kolei Gram-ujemna pałeczka *E. aerogenes* wykazała wrażliwość na działanie 158 izolatów, w tym 6 ograniczało jej wzrost w stopniu silnym. Pałeczki *S. enterica* ser. Typhimurium, jak również bakterie *E. coli* również wykazywały wysoką wrażliwość na działanie badanych izolatów bakterii fermentacji mlekowej. Stopień zahamowania wzrostu *S. enterica* ser. Typhimurium kształtował

się z reguły na niskim i umiarkowanym poziomie, jak stwierdzono w przypadku 135 izolatów, natomiast strefy zahamowania wzrostu przekraczające 20 mm wykazały 4 izolaty. Wzrost bakterii *E. coli* był ograniczany przez 130 spośród badanych 565 izolatów, w tym 2 izolaty wykazały oddziaływanie silne. Podobne rezultaty uzyskano w odniesieniu do *C. perfringens*, którego wzrost był ograniczany przez 129 izolatów, w tym 6, w stopniu silnym. Wzrost pozostałych bakterii: *Y. enterocolitica*, *P. vulgaris*, *S. enterica* ser. Enteritidis i *L. monocytogenes* został zahamowany kolejno przez 68, 63, 61 i 59 izolatów. Z reguły obserwowano niewielkie strefy zahamowania wzrostu tych bakterii, nieprzekraczające 15 mm. Tylko w pojedynczych przypadkach obserwowano umiarkowane zahamowanie ich wzrostu.

Analizując pochodzenie izolatów bakterii fermentacji mlekowej można zauważyć, że najczęściej izolaty wykazujące silne hamowanie wzrostu mikroorganizmów wskaźnikowych pochodziły z kału prosiąt ssących.

Na podstawie wyników uzyskanych na tym etapie doświadczeń, spośród 565 izolatów do kolejnych badań wybrano 120. Pozostałe odrzucono ze względu na brak oddziaływania antybakteryjnego, słaby stopień hamowania wzrostu mikroorganizmów wskaźnikowych lub bardzo wąski zakres aktywności, ograniczający się do pojedynczych bakterii wskaźnikowych. Pośród wyeliminowanych bakterii występowały również szczepy, które nie przejawiały oddziaływania antybakteryjnego ze względu na niską gęstość optyczną, a tym samym małą liczebność populacji w hodowli.

Zestawienie 120 wybranych izolatów uwzględniające ich zakres oddziaływania w stosunku do mikroorganizmów wskaźnikowych wyszczególniono w tabeli 15.

Tabela 15. Zakres aktywności przeciwdrobnoustrojowej 120 wybranych izolatów

Pochodzenie izolatów	Liczba izolatów bakterii fermentacji mlekowej hamujących wzrost				
	9 – 10 bakterii wskaźnikowych	7 - 8 bakterii wskaźnikowych	6 - 5 bakterii wskaźnikowych	3 - 4 bakterii wskaźnikowych	1 - 2 bakterii wskaźnikowych
Prosięta ssące	19	8	19	0	0
Prosięta odsadzone	3	7	11	3	1
Kurczęta rżęzne	4	7	26	11	1

Źródło: na podstawie badań własnych

Dane literaturowe, podobnie jak wyniki uzyskane w niniejszej pracy, wskazują, że aktywność przeciwdrobnoustrojowa jest cechą często opisywaną w odniesieniu do bakterii fermentacji mlekowej, ale zależy od szczepu. Najczęściej z dużej puli badanych izolatów pochodzących z określonego środowiska można wybrać tylko pewien odsetek, wykazujący właściwości na tyle istotne, aby można było rozważać wykorzystanie takich drobnoustrojów w warunkach przemysłowych. W prezentowanej pracy 52% wyizolowanych bakterii fermentacji mlekowej wykazało aktywność antybakteryjną wobec mikroorganizmów wskaźnikowych, przy czym zakres aktywności różnił się dla poszczególnych izolatów, obejmując od 1 do 10 bakterii (tab. 15). W literaturze znaleźć można rozbieżne informacje dotyczące procentowego udziału szczepów bakterii izolowanych z treści jelitowej i poszczególnych odcinków przewodu pokarmowego zwierząt w zakresie aktywności przeciwdrobnoustrojowej. W badaniach Guo i in. [2010], podobnie jak w prezentowanej pracy, aktywność antybakteryjną wobec *E. coli* O55 wykazywało 50% badanych izolatów bakterii fermentacji mlekowej pochodzących z przewodu pokarmowego prosiąt. Khunajakr i in. [2008] wykorzystując, podobnie jak w niniejszej pracy, metodę dyfuzji studzienkowej do oceny przeciwdrobnoustrojowych właściwości bakterii fermentacji mlekowej wyizolowanych z przewodu pokarmowego prosiąt, odnotowali aktywność antybakteryjną wobec bakterii Gram-dodatnich: *L. monocytogenes*, *B. cereus* i *S. aureus* oraz Gram-ujemnych: *E. coli* i *S. typhimurium*. Tylko około 20% spośród badanych izolatów wykazało zdolność do inhibicji mikroorganizmów wskaźnikowych. Zakres aktywności poszczególnych izolatów był zróżnicowany i obejmował od jednego do czterech szczepów bakterii patogennych. Z kolei Pringsulaka i in. [2015] obserwowali znacznie większy odsetek izolatów wykazujących działanie antagonistyczne względem wybranych mikroorganizmów chorobotwórczych. Spośród 81 izolatów, 61 hamowało wzrost bakterii *E. coli*, 43 były aktywne wobec *Salmonella* sp., 59 wobec *S. aureus*, a 78 i 79 wykazywało antagonizm odpowiednio w stosunku do bakterii *Shigella* sp. i *Klebsiella* sp.. Petsuriyawong i Khunajakr [2011] stwierdzili, że wszystkie spośród 317 izolatów bakterii fermentacji mlekowej pochodzące z kału prosiąt wykazywały aktywność antybakteryjną wobec co najmniej jednego szczepu wskaźnikowego, a 171 hamowało wzrost przynajmniej trzech bakterii wskaźnikowych. Szeroki zakres aktywności, obejmujący 8 szczepów wskaźnikowych, wykazało natomiast 15 izolatów.

Wielu autorów podkreśla zróżnicowaną wrażliwość mikroorganizmów chorobotwórczych i niepożądanych w żywności czy paszach na działanie hodowli

lub supernatantów bakterii fermentacji mlekowej, co zaobserwowano również w niniejszej pracy. Kizerwetter-Swida i Binek [2005] opisywali silniejsze oddziaływanie tej grupy bakterii wobec bakterii Gram-dodatnich takich jak *C. perfringens* i *S. aureus* niż wobec Gram-ujemnych bakterii *E. coli* i *Salmonella* sp. Jin i in. [1996] obserwowali większą wrażliwość bakterii z rodzaju *Salmonella* na działanie 12 szczepów z rodzaju *Lactobacillus* wyizolowanych z jelit kurcząt niż bakterie *E. coli*. Podobnie, Taheri i in. [2009b] stwierdzili silniejsze oddziaływanie bakterii fermentacji mlekowej wobec bakterii *Salmonella* sp. niż wobec *E. coli*. W prezentowanej pracy widoczne były różnice nawet pomiędzy badanymi serotypami bakterii z rodzaju *Salmonella*. Większą wrażliwością charakteryzował się szczep *S. enterica* ser. Typhimurium niż *S. enterica* ser. Enteritidis. Podobne, zróżnicowane oddziaływanie bakterii z rodzaju *Lactobacillus* wobec trzech serotypów *Salmonella* sp. obserwowali Klose i in. [2010].

Inhibicja patogennych mikroorganizmów przez bakterie fermentacji mlekowej może być rezultatem wytwarzania przez nie różnych metabolitów, takich jak kwasy organiczne, bakteriocyny czy nadtlenek wodoru [Lorca i in. 2001; Nakai i Siebert 2003]. Barrow i in. [1980] podkreślali, że wzrost większości bakterii może być hamowany, kiedy pH podłoża spada poniżej 4,5. Wskazuje to na dominujący udział kwasów organicznych, m.in. mlekowego i octowego, w antagonizycznym oddziaływaniu bakterii fermentacji mlekowej, co potwierdza wielu autorów. Jin i in. [1996], Ehrman i in. [2002], Van Coillie i in. [2007] stwierdzili, że hamowanie wzrostu różnych serotypów bakterii *Salmonella* sp. i *E. coli* przez bakterie fermentacji mlekowej izolowane z jelit kurcząt, jest związane głównie z wytwarzanymi przez nie kwasami organicznymi. W badaniach Lin i in. [2007] hodowle *L. fermentum* na pożywce MRS obniżały pH hodowli po 24 godzinach do poziomu 3,7 do 4,4. Supernatanty, uzyskane z takich hodowli, wykazywały działanie antybakteryjne wobec bakterii *E. coli*, *Salmonella* sp. czy *Shigella* sp., podczas gdy po neutralizacji pH do poziomu 7,0 aktywność antagonizyczna była praktycznie niezauważalna. Brak aktywności supernatantów z hodowli bakterii fermentacji mlekowej po ich neutralizacji opisywali Chang i in. [2001] oraz Pinto i in. [2006]. Taheri in. [2009b] obserwowali spadek aktywności antybakteryjnej supernatantów z hodowli bakterii fermentacji mlekowej wraz ze wzrostem wartości pH, która kształtowała się na poziomie 3,8 do 4,4. W niniejszej pracy pH hodowli kształtowało się w granicach 4,3 do 5,0, stąd też można założyć, że kwasy organiczne wytwarzane przez badane izolaty, miały decydujący udział w oddziaływaniu antybakteryjnym. Podobnie Khunajakr i in. [2008] po neutralizacji supernatantów hodowli

17 izolatów bakterii fermentacji mlekowej do pH 7,0 odnotowali aktywność antybakteryjną tylko w 3 przypadkach, chociaż wszystkie hamowały wzrost mikroorganizmów wskaźnikowych przed neutralizacją. Autorzy sugerowali, że jest to związane z wytwarzaniem bakteriocynopodobnych metabolitów przez wybrane izolaty. Wpływ bakteriocyn i bakteriocynopodobnych substancji na aktywność przeciwdrobnoustrojową bakterii fermentacji mlekowej opisywali również González i in. [2007], Monteagudo-Mera i in. [2012] oraz Cleveland i in. [2001]. Na właściwości antagonistyczne tej grupy bakterii może również wpływać obecność innych metabolitów, m.in. nadtlenku wodoru, którego antybakteryjne działanie może być związane z utlenianiem grup sulfhydrylowych prowadząc do denaturacji enzymów i peroksydacją lipidów błonowych, zwiększając tym samym przepuszczalność błon komórkowych [Kong i Davison 1980; Condon 1987]. Obecność nadtlenku wodoru w hodowlach niektórych szczepów bakterii fermentacji mlekowej opisywali m.in. Pinto i in. [2006] i Monteagudo-Mera i in. [2012].

Większość prac prowadzonych w kierunku pozyskania nowych szczepów probiotycznych, zarówno w celu wykorzystania ich dla ludzi jak i zwierząt, przyjmuje jako podstawowe kryterium zdolność hamowania wzrostu mikroorganizmów niepożądanych, w tym chorobotwórczych, przez izolowane bakterie. Również w prezentowanej dysertacji, skryning w oparciu o antybakteryjne właściwości stanowił podstawę wyboru grupy izolatów, poddanych kolejnym testom.

9.3.2. Ocena wrażliwości izolatów bakterii fermentacji mlekowej na wybrane antybiotyki

Kolejnym etapem selekcji bakterii fermentacji mlekowej była ocena wrażliwości 120 wyselekcjonowanych wcześniej izolatów na wybrane antybiotyki. Jako kryterium doboru antybiotyków oraz ich stężeń wykorzystane zostały dane z wytycznych EFSA [2008, 2012], literatury tematycznej [Pérez-Sánchez i in. 2011; Ripamonti i in. 2011], Krajowego Ośrodka Referencyjnego ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów (KORLD) [Żabicka i Hryniewicz 2010], a także konsultacji z producentami dodatków paszowych dla zwierząt hodowlanych oraz hodowcami. Zgodnie ze wskazaniem EFSA, badania profilów antybiotykooporności i mechanizmów transmisji są niezbędne w celu nadania statusu QPS szczepom probiotycznym przeznaczonym do stosowania przemysłowego [EFSA 2013].

W prezentowanej pracy doświadczenia wykonano w oparciu o zmodyfikowaną procedurę badania antybiotykooporności szczepów klinicznych Kirby-Bauer'a [1966], którą opisał Charteris i in. [1998] oraz nawiązując do wytycznych CLSI i danych literaturowych,

uwzględniających badanie bakterii fermentacji mlekowej w tym kierunku. Antybiogramy obejmowały zarówno antybiotyki o działaniu bakteriobójczym, jak i bakteriostatycznym. Początkowo metodyka uwzględniała wykorzystanie podłoża agarowego Mueller-Hinton, jednak wyniki badań pilotażowych wykluczyły jej zastosowanie ze względu na brak możliwości odczytu wyników. Zasadniczym problemem był słaby wzrost badanych bakterii, bądź też strefy zahamowania wzrostu były nieregularne lub niemożliwe do odczytu. Podobne obserwacje odnotowali Ocaña, Silva i Nader-Macías [2006] podczas badań antybiotykooporności potencjalnie probiotycznych szczepów bakterii *Lactobacillus* pochodzących z układów płciowych kobiet.

Stosując metodę antybiogramu do oznaczenia lekooporności bakterii fermentacji mlekowej wyszczególniono następujące poziomy oddziaływania: wrażliwy izolat (S), średniowrażliwy izolat (I) lub oporny izolat (R). Analizę wyników wykonano w oparciu o wytyczne zawarte w tabeli 5 (pkt. 8.3.3. niniejszej rozprawy doktorskiej). Szczegółowe wyniki badań wykonanych antybiogramów zawarto w załączniku elektronicznym, w tabelach E. 7 - E. 9, natomiast w tabeli 16 przedstawiono zestawienie liczby izolatów wykazujących określonych stopień wrażliwości na dany antybiotyk.

Tabela 16. Wrażliwość wybranych bakterii fermentacji mlekowej pochodzących z kału prosiąt oraz jelit kurcząt na działanie antybiotyków

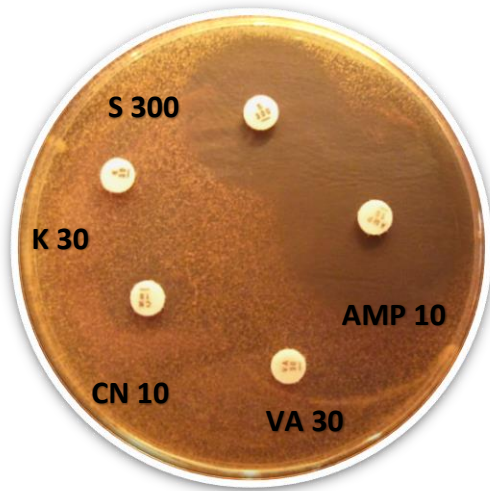
Antybiotyk	Stężenie [mcg]	Izolaty wykazujące wysoką wrażliwość (S)		Izolaty wykazujące średnią wrażliwość (I)		Izolaty wykazujące oporność (R)	
		Liczba izolatów	Procent izolatów	Liczba izolatów	Procent izolatów	Liczba izolatów	Procent izolatów
Prosięta ssące							
ampicylina	10	33	72	12	26	1	2
wankomycyna	30	1	2	0	0	45	98
gentamycyna	10	25	54	9	20	12	26
kanamycyna	30	7	15	19	40	22	46
streptomycyna	300	26	57	16	35	4	9
erytromycyna	15	45	98	1	2	0	0
klindamycyna	2	46	100	0	0	0	0
tetracyklina	30	43	93	3	7	0	0
chloramfenikol	30	45	98	1	2	0	0
Prosięta odsadzone							
ampicylina	10	19	76	6	24	0	0
wankomycyna	30	1	4	0	0	24	96

Antybiotyk	Stężenie [mcg]	Izolaty wykazujące wysoką wrażliwość (S)		Izolaty wykazujące średnią wrażliwość (I)		Izolaty wykazujące oporność (R)	
		Liczba izolatów	Procent izolatów	Liczba izolatów	Procent izolatów	Liczba izolatów	Procent izolatów
gentamycyna	10	14	56	3	12	8	32
kanamycyna	30	5	20	9	36	11	44
streptomycyna	300	23	92	2	8	0	0
erytromycyna	15	25	100	0	0	0	0
klindamycyna	2	25	100	0	0	0	0
tetracyklina	30	22	88	2	8	1	4
chloramfenikol	30	24	96	0	0	1	4
Kurczęta rzeźne							
ampicylina	10	32	65	15	31	2	4
wankomycyna	30	2	4	0	0	47	96
gentamycyna	10	22	45	8	16	19	39
kanamycyna	30	5	10	20	39	26	51
streptomycyna	300	32	65	13	27	4	8
erytromycyna	15	49	100	0	0	0	0
klindamycyna	2	49	100	0	0	0	0
tetracyklina	30	48	98	1	2	0	0
chloramfenikol	30	49	100	0	0	0	0

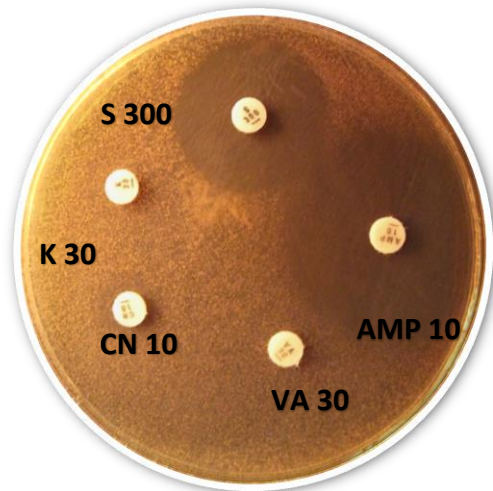
Źródło: na podstawie badań własnych

Wrażliwość badanych izolatów bakterii fermentacji mlekowej na testowane antybiotyki była zróżnicowana. Przykładowe wyniki przedstawiono na fotografiach 17-22. Wszystkie badane izolaty charakteryzowały się wrażliwością na działanie klindamycyny oraz erytromycyny (w badanych stężeniach), za wyjątkiem jednego izolatu pochodzącego z kału prosiąt ssących, który wykazywał średnią wrażliwość na działanie erytromycyny. Większość izolatów (99%) była również wrażliwa na tetracyklinę oraz chloramfenikol. Tylko jeden izolat wykazał średnią wrażliwość na chloramfenikol, natomiast sześć izolatów na tetracyklinę (5%). Inaczej kształtowała się wrażliwość izolatów bakterii fermentacji mlekowej na pozostałe testowane antybiotyki. Dużą wrażliwość na ampicylinę w stężeniu 10 mcg wykazały 84 izolaty (70%), natomiast średnią wrażliwość wykazały 33 izolaty (28%). Brak wrażliwości stwierdzono w przypadku 3 izolatów (3%). Liczba izolatów bakterii fermentacji mlekowej wykazujących dużą lub średnią wrażliwość na działanie streptomycyny w stężeniu 300 mcg wynosiła 112 (93%). W przypadku gentamycyny obserwowano duże zróżnicowanie izolatów pod względem ich wrażliwości na ten

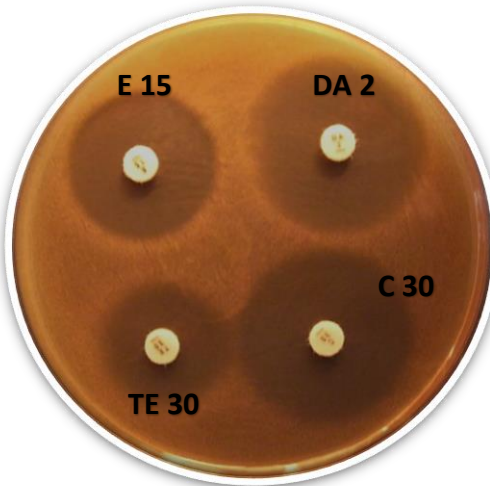
antybiotyków. Wrażliwość wykazywało 76 izolatów (63%), w tym 20 w stopniu średnim (17%), podczas gdy 39 izolatów (33%) było niewrażliwych na gentamycynę w badanym stężeniu. W przypadku kanamycyny i wankomycyny w stężeniu 30 mcg stwierdzono największy odsetek izolatów opornych. Zaobserwowano 59 izolatów (49%) wykazujących oporność na kanamycynę oraz 116 izolatów (97%) na wankomycynę.



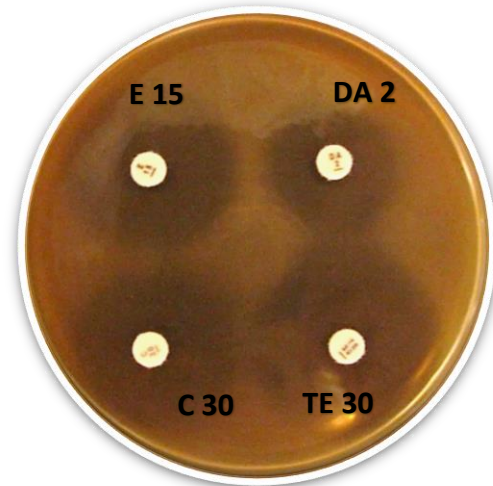
Fotografia 17. KK 320



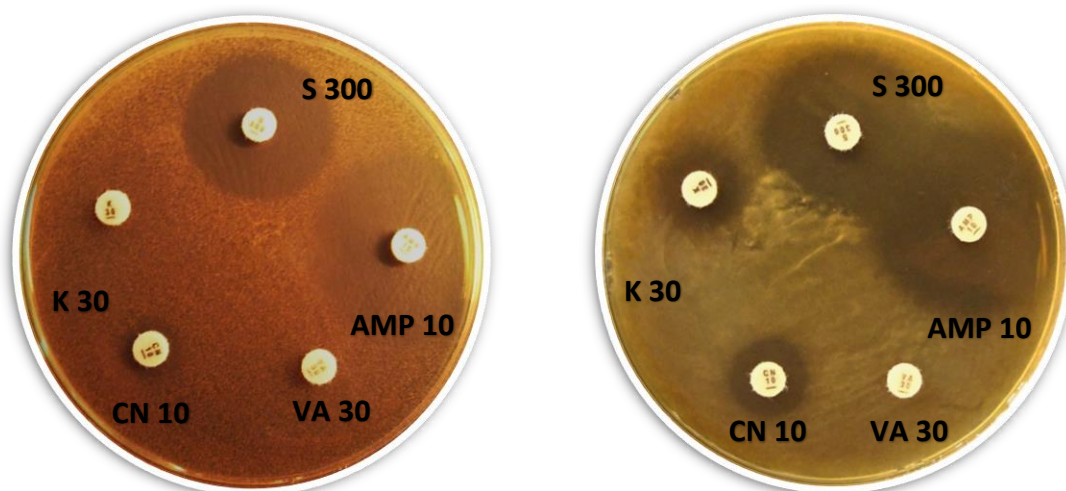
Fotografia 18. KK 232



Fotografia 19. DG 069



Fotografia 20. KK 015



Fotografia 21. DG 240

Fotografia 22. KK 079

Fotografie 17-22. Wrażliwość wybranych izolatów bakterii fermentacji mlekowej na działanie antybiotyków

Źródło: wykonanie własne

Bakterie fermentacji mlekowej stosowane w preparatach probiotycznych lub jako kultury starterowe, mogą wykazywać oporność na antybiotyki. Dlatego istotne dla bezpieczeństwa projektowanych suplementów jest określenie potencjalnej antybiotykooporności [FAO/WHO 2002]. Oporność drobnoustrojów na antybiotyk (chemioterapeutyk) jest zjawiskiem, w którym średnie stężenia substancji badanej, wykazujące hamowanie rozwoju populacji drobnoustrojów w warunkach *in vitro*, przewyższają stężenia tej samej substancji możliwe do uzyskania *in vivo* [Janiec i Krupińska 2002]. Podstawowym typem jest oporność naturalna, która jest cechą szczepu lub gatunku, związaną najczęściej z nieskuteczną penetracją antybiotyku przez ściany komórkowe. Co istotne, nie jest ona przenoszona na inne mikroorganizmy, dlatego nie stanowi zagrożenia [Mazur 2002; Janiec i Krupińska 2002]. Problemem jest natomiast oporność nabyta, powstająca, gdy mikroorganizmy, będące początkowo wrażliwe na antybiotyk, nabierają oporności w wyniku zmian w ich genomie. Dzieje się to najczęściej na skutek mutacji spontanicznej lub poprzez nabycie genu lub zespołu genów determinujących oporność od innych bakterii [Mathur i Singh 2005]. Istnieją dwa główne mechanizmy nabywania antybiotykooporności przez mikroorganizmy: mutacja oraz horyzontalny transfer genów [Mathur i Singh 2005; Ammor i in. 2007]. Ponadto geny kodujące oporność na antybiotyki mogą być przenoszone drogą horyzontalnego transferu genów również do komórek niespokrewnionych.

Ze względu na możliwość do przenoszenia cech lekooporności na inne mikroorganizmy, w tym również na bakterie patogenne, problem antybiotykooporności wśród bakterii fermentacji mlekowej może stanowić zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt. Jest to zjawisko szczególnie niepożądane w odniesieniu do szczepów probiotycznych, które ze względu na sposób ich zastosowania, mogą mieć styczność z mikroorganizmami bytującymi w przewodzie pokarmowym gospodarza. Tym samym istnieje prawdopodobieństwo przekazania genów oporności innym bakteriom, w tym patogennym. Największe zagrożenie związane jest z możliwością transmisji genów na elementach ruchomych, jak transpozony, do komórek mikroorganizmów patogennych czy potencjalnie patogennych. Wrodzona oporność raczej nie stanowi takiego problemu, a nawet może być postrzegana jako zjawisko pozytywne np. u osób poddawanych kuracjom z zastosowaniem leków przeciwdrobnoustrojowych, ponieważ może zapobiegać wyjąłowieniu przewodu pokarmowego.

Bakterie fermentacji mlekowej posiadają dość szeroki zakres wrodzonej oporności na antybiotyki. Jednym z najlepiej scharakteryzowanych fenotypów jest oporność na wankomycynę. Wiele danych literaturowych wskazuje na występowanie tej cechy u bakterii z rodzajów *Lactobacillus*, *Pediococcus* i *Leuconostoc* [Coppola i in. 2005; Pérez-Sánchez i in. 2011]. Podobnie, w niniejszej pracy, większość badanych izolatów bakterii fermentacji mlekowej (97%) nie wykazywała wrażliwości na wankomycynę w zastosowanym stężeniu. Jedynie cztery spośród badanych izolatów bakterii były wrażliwe na ten chemioterapeutyk. Oporność na wankomycynę wynika z braku docelowych receptorów dla tego antybiotyku w ścianie komórkowej wspomnianych rodzajów bakterii. Działanie wankomycyny na komórki bakterii zachodzi na drodze interakcji z prekursorami peptydoglikanu w ścianie komórkowej i tworzenie kompleksu z D-alanylo-D-alaniną fragmentu prekursora peptydu w miejscu wiązania podjednostek peptydoglikanu. Tym samym blokuje polimeryzację peptydoglikanu i transpeptydację. W przypadku bakterii fermentacji mlekowej D-alanina jest zastąpiona D-mleczanem lub D-seryną w muramylo-pentapeptydzie, nie umożliwiając przyłączenia wankomycyny. Jest to cecha kodowana chromosomalnie i nie ulegająca transmisji [Delcour i in. 1999; Ammor i in. 2008; Gueimonde i in. 2013]. Również oporność bakterii z rodzaju *Lactobacillus* na działanie antybiotyków aminoglikozydowych (np. gentamycyna, kanamycyna, streptomycyna), uważana jest za wrodzoną. Jest to związane z brakiem transportu elektronowego za pośrednictwem cytochromu, który odpowiedzialny jest za wchłanianie antybiotyku

[Monteagudo-Mera i in. 2012]. Również inni autorzy opisują występowanie wśród bakterii fermentacji mlekowej szczepów opornych na aminoglikozydy. Liu i in. [2009] stwierdzili oporność na gentamycynę i streptomycynę w przypadku, odpowiednio, 16 i 2 szczepów bakterii z rodzajów *Lactobacillus* i *Enterococcus* spośród 41 badanych. D'Aimmo i in. [2007], badając zjawisko antybiotykooporności wśród bakterii izolowanych z fermentowanych produktów mlecznych i preparatów farmaceutycznych, obserwowali oporność *S. thermophilus* na kanamycynę i streptomycynę oraz *Bifidobacterium* sp. na wszystkie aminoglikozydy. Oporność na aminoglikozydy w przypadku bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* opisali również inni autorzy [Temmerman i in. 2003; Moubareck i in. 2005]. Według Żabicka i Hryniewicz [2010] oporność bakterii na gentamycynę oznacza również oporność na wszystkie antybiotyki z grupy aminoglikozydów w tym kanamycynę, niezależnie od wyników uzyskanych *in vitro*, za wyjątkiem streptomycyny. W prezentowanej pracy zaobserwowano taką zależność w przypadku 30 izolatów, które wykazywały oporność zarówno na gentamycynę jak i kanamycynę, przy jednoczesnej wrażliwości na streptomycynę. Jeden z badanych izolatów bakterii był niewrażliwy zarówno na kanamycynę jak i streptomycynę.

Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* sp. wykazują oporność na chinolony (ciprofloksacynę, norfloksacynę, kwas nalidyksowy), chociaż mechanizm nie został zdefiniowany [Hummel i in. 2007], a także wrodzoną oporność na bacytracynę, cefoksytynę, metronidazol, nitrofurantoinę i sulfadiazynę [Tynkkynen i in. 1998; Danielsen i Wind 2003; Zhou i in. 2005; Bernardeau i in. 2008].

Mikroorganizmy te są natomiast wrażliwe na inhibitory syntezy ściany komórkowej jak penicyliny i ampicyliny [Danielsen i Wind 2003] oraz inhibitory syntezy białek, w tym na chloramfenikol, erytromycynę, linkomycynę, klindamycynę czy tetracykliny [Aymerich i in. 2006; Hummel i in. 2007; Comunian i in. 2010; Landeta i in. 2013; Federici i in. 2014]. Potwierdzają to również badania przedstawione w niniejszej pracy. Tylko nieliczne izolaty wykazywały oporność na antybiotyki z wymienionych powyżej grup. Podobnie, Aymerich i in. [2006] stwierdzili niewielki odsetek szczepów wykazujących oporność m.in. na ampicylinę i tetracyklinę badając izolaty pochodzące z fermentowanych, podsuszanych kiełbas. Liu i in. [2009] odnotowali oporność na erytromycynę tylko w przypadku dwóch szczepów z rodzaju *Enterococcus* spośród 41 badanych izolatów bakterii fermentacji mlekowej.

Najczęściej, autorzy podkreślają, że wrażliwość na antybiotyki jest cechą szczepozależną. Poza tym antybiotykooporność może pojawić się w wyniku mutacji. Przykładem jest oporność na erytromycynę stwierdzona w przypadku komercyjnego szczepu *B. bifidum* Yakult YIT 400, która powstała na skutek mutacji w regionie 23S rRNA zlokalizowanym na chromosomie, dzięki czemu ryzyko transferu jest minimalne [Sato i lino 2010]. Jak wskazują dane literaturowe, bakterie fermentacji mlekowej mogą wykształcić więcej niż jeden mechanizm oporności na dany antybiotyk, co tylko potwierdza, że badanie w tym kierunku bakterii fermentacji mlekowej o potencjalnym zastosowaniu przemysłowym jest niezbędne.

Pomimo podkreślanej konieczności badania antybiotykooporności bakterii fermentacji mlekowej, nie ma jak dotąd jednolitych standardów dla tej grupy mikroorganizmów. Wymagania i dostępne metodyki badań wykorzystujących antybiogramy dostarczone przez instytucje międzynarodowe takie, jak EFSA, NCCLS, czy polskie, w tym KORLD, dotyczą jedynie wybranych, zagrażających zdrowiu publicznemu, klinicznych szczepów tlenowych i beztlenowych bakterii lub drożdży. Bakterie fermentacji mlekowej zostały zaliczone przez Instytut Standardów Klinicznych i Laboratoryjnych CLSI w tym kontekście do rzadko izolowanych i wymagających pałeczek. Jako zalecaną metodę badania wrażliwości na antybiotyki zasugerowano określenie metody MIC na podłożu Mueller-Hinton z krwią końską [Jorgensen and Hindler 2007]. Wielu autorów stosuje jednak nadal metodę krążkowo-dyfuzyjną, szczególnie w celach skринingowych [Saeed i in. 2014; El Jeni i in. 2015; Morandi i in. 2015]. W prezentowanej pracy również wykorzystano tą metodę, przede wszystkim ze względu na dużą liczbę badanych izolatów.

Podsumowując, w prezentowanej pracy wybrane do badań antybiotyki hamowały wzrost izolatów bakterii fermentacji mlekowej w stopniu silnym i umiarkowanym. Na podstawie otrzymanych wyników wybrano 62, które cechował brak lub niska dopuszczalna antybiotykooporność. Zostały one tym samym wyselekcjonowane do kolejnych etapów badań. Pośród wybranych na tym etapie bakterii, 29 izolatów pochodziło z przewodów pokarmowych prosiąt ssących, 12 izolatów z przewodów prosiąt odsadzonych oraz 21 izolatów z przewodów pokarmowych kurcząt rzeźnych.

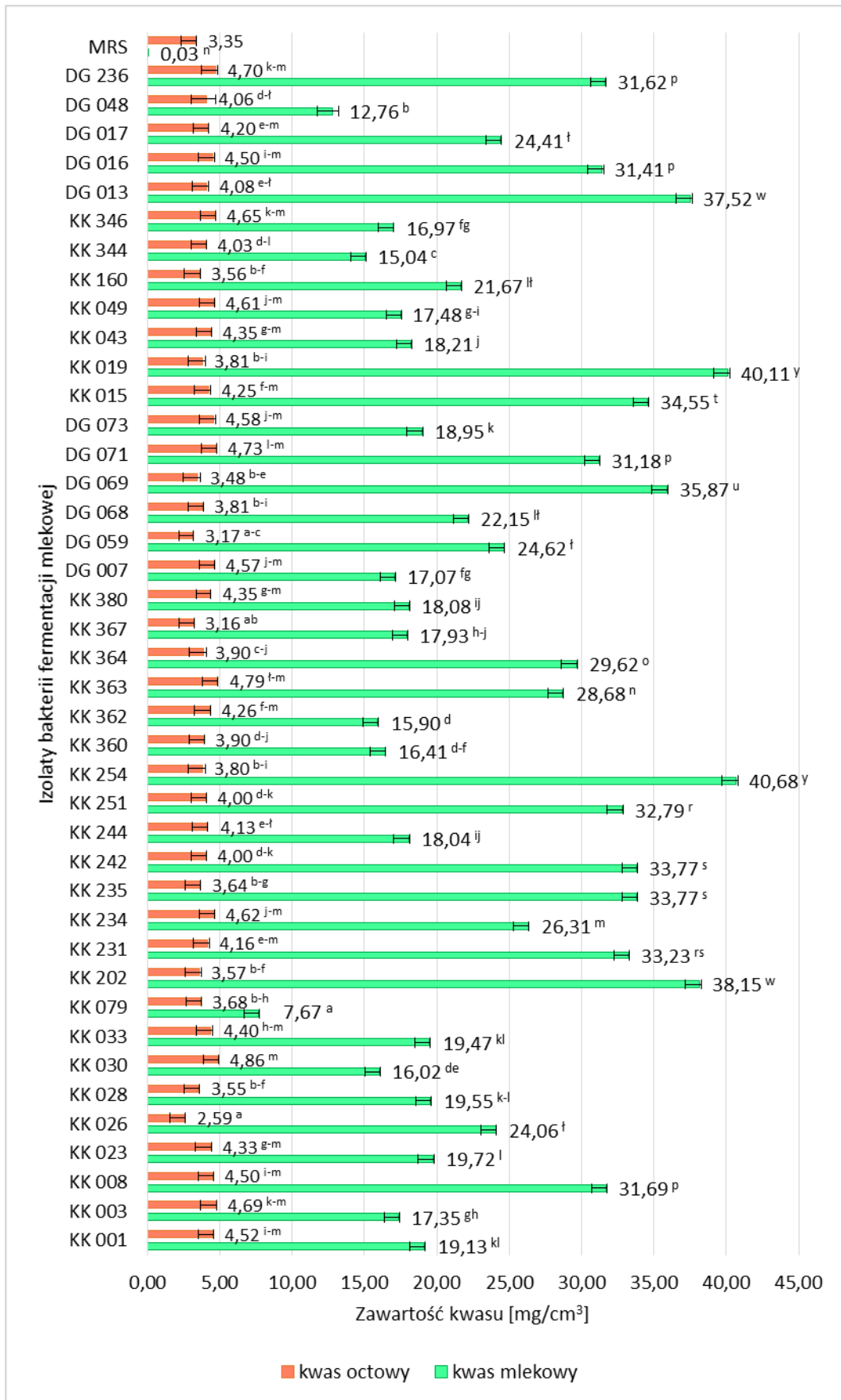
9.3.3. Określenie zawartości najważniejszych kwasów organicznych w hodowli badanych izolatów bakterii fermentacji

Jedną z charakterystycznych cech bakterii fermentacji mlekowej jest wytwarzanie przez nie kwasów organicznych, w tym mlekowego i octowego, dlatego określono zawartość tych metabolitów w hodowlach 62 wybranych izolatów. Biorąc pod uwagę, że niektóre heterofermentatywne lub fakultatywnie heterofermentatywne bakterie z tej grupy wytwarzają niewielkie ilości kwasu propionowego i bursztynowego [Kaneuchi i in. 1988; Schlegel 2004; Ripamonti i in. 2011], w oznaczeniach uwzględniono również zawartość tych kwasów. Wyniki badań przedstawiono na wykresach 2 i 3 oraz w załączniku elektronicznym w tabelach E. 10 i E. 11.

Określenie zawartości kwasów organicznych będących głównymi metabolitami bakterii fermentacji mlekowej stanowiło z jednej strony potwierdzenie przynależności badanych izolatów do tej grupy mikroorganizmów, a z drugiej stanowiło czynnik selekcyjny. Należy podkreślić, że wysoki poziom produkcji kwasu mlekowego jest pożądaną cechą podczas wyboru szczepów do zastosowania komercyjnego, ponieważ wybrane właściwości funkcjonalne, m.in. aktywność przeciwdrobnoustrojowa, są zależne m.in. od umiejętności zakwaszania przez bakterie środowiska ich bytowania.

Wyniki oznaczeń wskazują, że poszczególne izolaty bakterii charakteryzowały się zróżnicowaną zawartością kwasu mlekowego w hodowli, który był zarazem dominującym produktem. W przypadku izolatów pochodzących z kału prosiąt ilość kwasu mlekowego kształtowała się na poziomie 7,67 do 40,68 mg/cm³, a w hodowlach izolatów pochodzących z przewodów pokarmowych kurcząt rzeźnych na poziomie 9,32 do 41,18 mg/cm³.

Jak można zauważyć na wykresie 2, pośród 41 izolatów bakterii fermentacji mlekowej pochodzących z przewodów pokarmowych trzody chlewnej w 17 przypadkach odnotowano wysoki poziom produkcji kwasu mlekowego, w zakresie od 26,31 do 40,68 mg/cm³. W hodowlach 22 izolatów ilość kwasu mlekowego kształtowała się na średnim poziomie, od 15,04 do 24,62 mg/cm³, a w 2 przypadkach zawartość tego metabolitu była niska i wynosiła od 7,67 do 12,76 mg/cm³.

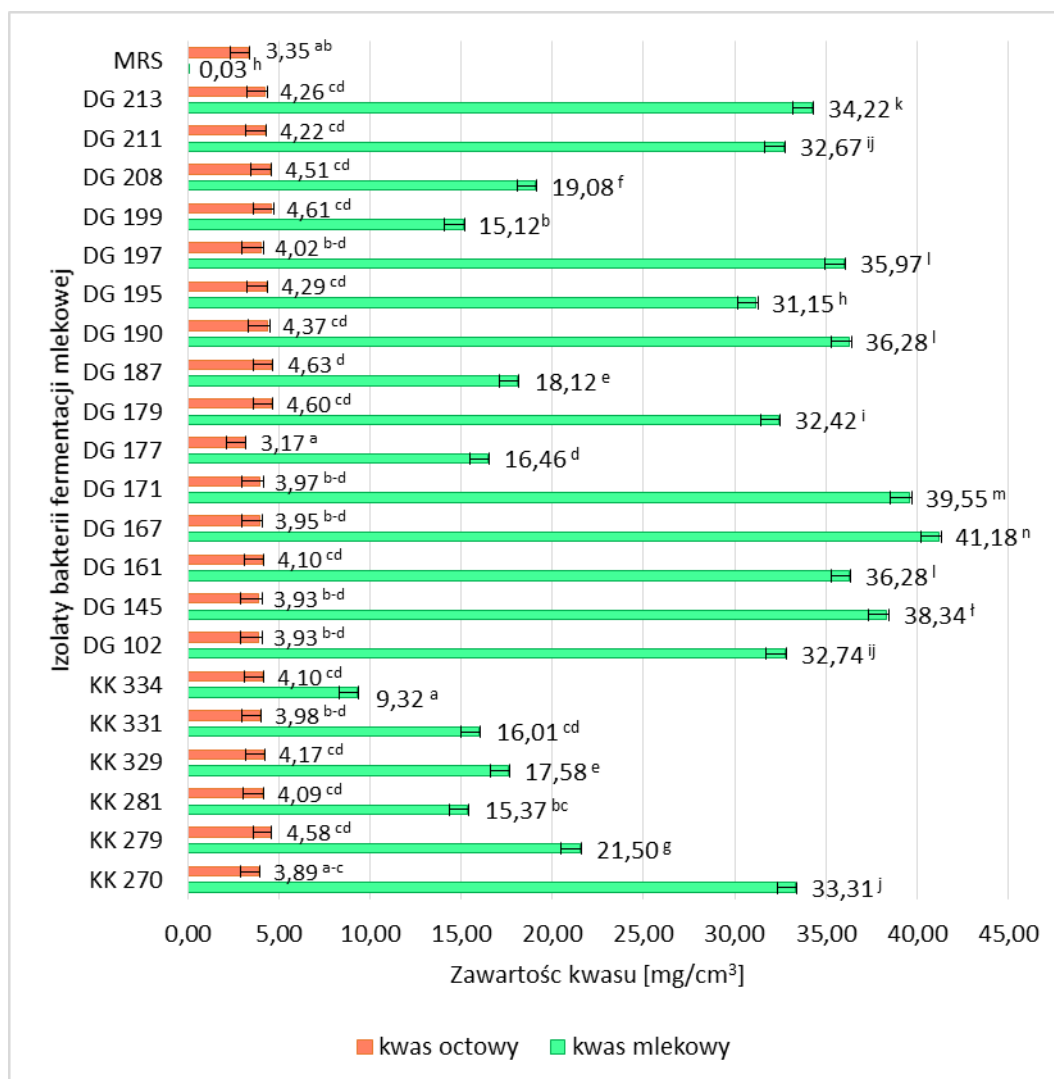


*a- y średnie oznaczone różnymi literami dla poszczególnych kwasów różnią się istotnie przy p < 0,05

Wykres 2. Zawartość kwasów: octowego oraz mlekowego w hodowlach izolatów bakterii fermentacji mlekowej pochodzących z kału prosiąt

Źródło: na podstawie badań własnych

Podobne zróżnicowanie obserwowano w grupie izolatów pochodzących z przewodów pokarmowych kurcząt rzeźnych. Wysoką zawartość kwasu mlekowego, na poziomie od 31,15 do 41,18 mg/cm³ odnotowano w hodowlach 12 izolatów. W przypadku 8 izolatów ilość kwasu wynosiła od 15,12 do 21,50 mg/cm³, a hodowla 1 izolatu (KK 334) charakteryzowała się najniższą zawartością kwasu mlekowego, na poziomie 9,32 mg/cm³.



*a- m średnie oznaczone różnymi literami dla poszczególnych kwasów różnią się istotnie przy p < 0,05

Wykres 3. Zawartość kwasów: octowego oraz mlekowego w hodowlach izolatów bakterii fermentacji mlekowej pochodzących z jelit kurcząt

Źródło: na podstawie badań własnych

Zarówno w hodowli bakterii fermentacji mlekowej pochodzących z kału prosiąt jak i jelit kurcząt stwierdzono niewielką ilość kwasu octowego. Stężenie wynosiło od 2,59 do 4,79 mg/cm³. Należy podkreślić, że zawartość kwasu octowego różniła się istotnie w większości przypadków.

Różnice w produkcji kwasów przez bakterie fermentacji mlekowej w zależności od gatunku i szczepu obserwowali także inni autorzy, podkreślając także rolę środowiska występowania. Przykładowo, Özcelik, Kuley i Özogul [2016] badali wytwarzanie kwasu bursztynowego, mlekowego, octowego i propionowego przez różne gatunki bakterii fermentacji mlekowej w bulionach rybnych (z sardeli, okonia morskiego, tilapii i pstrąga) i bulionie MRS. Autorzy odnotowali, że ilość i proporcje poszczególnych kwasów organicznych w hodowlach różnych bakterii zależała od gatunku mikroorganizmu i rodzaju podłoża. Zalán i in. [2010] również obserwowali duże różnice w ilości wytwarzanych kwasów: mlekowego, octowego, bursztynowego i kilku innych pomiędzy dziesięcioma szczepami bakterii z rodzaju *Lactobacillus*.

Kwasy organiczne, takie jak kwas mlekowy czy octowy, jak również inne, odgrywają istotną rolę w antagonizmie bakterii fermentacji mlekowej. Główny metabolit, kwas mlekowy, hamuje wzrost m.in. bakterii gnilnych, a także grzybów. Kwas octowy wykazuje silniejsze właściwości przeciwdrobnoustrojowe niż kwas mlekowy, a jego działanie, w zależności od zastosowanego stężenia może być bakteriobójcze (0,3%) lub bakteriostatyczne (0,2%). Mechanizm działania kwasów związany jest z obniżaniem pH środowiska. W postaci niezdysocjowanej, kwas mlekowy i octowy może przenikać przez błony komórkowe, po czym ulegają dysocjacji wewnątrz komórki, gdzie panuje wyższe pH. Prowadzi to do akumulacji anionów wodorotlenowych i protonów, czego następstwem jest obniżenie pH we wnętrzu komórki. W rezultacie zakwaszenie cytoplazmy powoduje zahamowanie rozwoju mikroorganizmów. Dodatkowym mechanizmem jest zaburzenie siły protonomotorycznej w błonie, wpływając na transbłonowy gradient pH. Kwas octowy może też powodować denaturację białek wewnątrzkomórkowych [Oda i in. 2002; Wee i in. 2006].

Należy również podkreślić, że oprócz kwasów organicznych, jak mlekowy czy octowy, bakterie fermentacji mlekowej wytwarzają szereg innych metabolitów, które mają właściwości przeciwdrobnoustrojowe, stąd też na potencjał antybakteryjny będą wpływały również inne czynniki. Są to m.in. nadtlenek wodoru, ditlenek węgla, diacetyl, reuteryna i reuterycyklina czy też niskocząsteczkowe, syntetyzowane rybosomalnie białka – bakteriocyny [Claisse i Lonvaud-Funel 2000; Gänzle i in. 2000; Gwiazdowska i Trojanowska 2005; Savadogo i in. 2006].

9.3.4. Określenie wybranych właściwości enzymatycznych

Właściwości enzymatyczne bakterii wchodzących w skład preparatów probiotycznych, są szczególnie pożądane w suplementach przeznaczonych dla zwierząt, ponieważ mogą one wspomagać trawienie przez nie paszy. Jest to ważna cecha zarówno w preparatach dla drobiu, m.in. dla nowo wyklutych kurcząt [Yu i in. 2008; Taheri i in. 2009b], jak i dla prosiąt [Lee, Gilliland i Carter 2001; Liu i in. 2007]. Dlatego wielu autorów podkreśla celowość badania mikroorganizmów pod względem określenia właściwości enzymatycznych w trakcie selekcji szczepów do takich preparatów. Ocenę wybranych właściwości enzymatycznych, izolatów bakterii fermentacji mlekowej w prezentowanej pracy przeprowadzono na odpowiednio dobranych i skomponowanych podłożach.

Izolaty bakterii przebadano w celu określenia ich właściwości proteolitycznych, amylolitycznych oraz lipolitycznych. Wyniki przedstawiono w tabeli 17, oznaczając aktywność enzymatyczną znakiem „+” a jej brak znakiem „-”.

Tabela 17. Wybrane właściwości enzymatyczne bakterii fermentacji mlekowej

Numer izolatu	Właściwości:			Numer izolatu	Właściwości:		
	Proteolityczne	Amylolityczne	Lipolityczne		Proteolityczne	Amylolityczne	Lipolityczne
Prosięta ssące				Prosięta odsadzone			
KK 001	+	-	-	KK 043	+	-	-
KK 003	+	-	-	KK 049	+	-	-
KK 008	++	+	-	KK 160	+	+	-
KK 023	+	-	-	KK 344	+	+	-
KK 026	++	-	-	KK 346	+	-	-
KK 028	++	-	-	DG 013	+	-	-
KK 030	+	-	-	DG 016	+	+	-
KK 033	+	-	-	DG 017	+	+	-
KK 079	+	+	-	DG 048	+	+	-
KK 202	+	-	-	DG 236	+	-	-
KK 231	+	+	-	Kurczęta rzeźne			
KK 234	+	+	-	KK 270	+	+	-
KK 235	+	+	-	KK 279	+	+	-
KK 242	+	-	-	KK 281	+	+	-
KK 244	+	+	-	KK 329	+	+	-
KK 251	+	+	-	KK 331	+	+	-
KK 254	+	-	-	KK 334	+	-	-
KK 360	+	+	-	DG 102	+	+	-
KK 362	+	-	-	DG 145	+	-	-
KK 363	+	-	-	DG 161	+	-	-

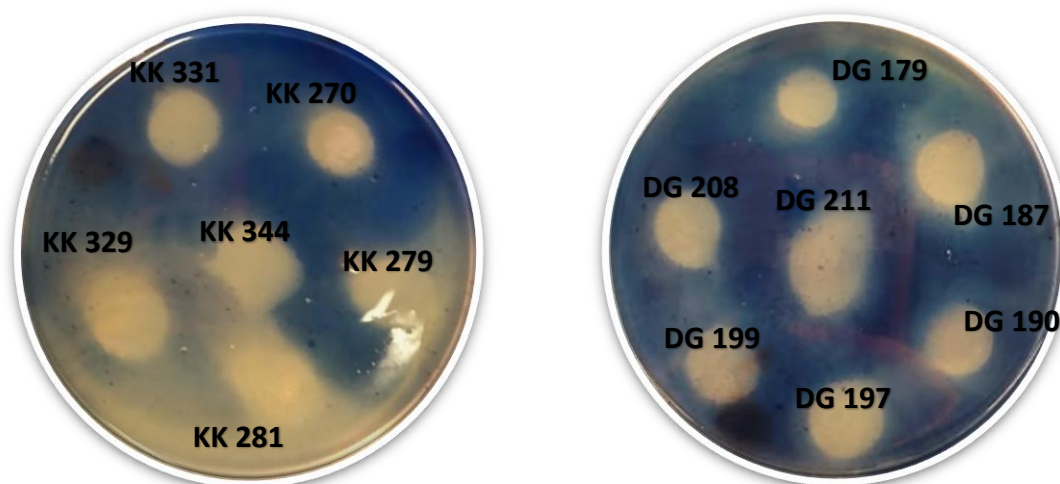
Numer izolatu	Właściwości:			Numer izolatu	Właściwości:		
	Proteolityczne	Amylolityczne	Lipolityczne		Proteolityczne	Amylolityczne	Lipolityczne
KK 364	+	+	-	DG 167	+	-	-
KK 367	+	+	-	DG 171	+	-	-
KK 380	+	+	-	DG 177	+	-	-
DG 007	+	-	-	DG 179	+	+	-
DG 059	+	-	-	DG 187	+	+	-
DG 068	+	-	-	DG 190	+	+	-
DG 069	+	+	-	DG 195	+	-	-
DG 071	+	-	-	DG 197	+	+	-
DG 073	+	+	-	DG 199	+	+	-
Prosięta odsadzone				DG 208	+	+	-
KK 015	++	+	-	DG 211	+	+	-
KK 019	++	-	-	DG 213	+	-	-

++ strefa przejaśnienia, widoczna wokół hodowli na podłożu; + przejaśnienie w miejscu naniesienia hodowli na podłożu.

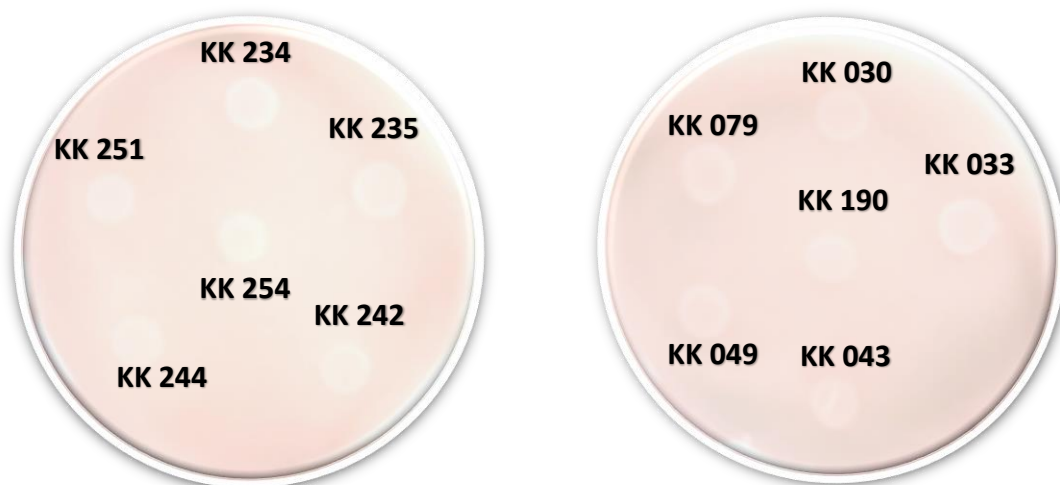
Źródło: na podstawie badań własnych

Rezultaty badań wykazały, że wszystkie badane izolaty bakterii powodowały rozkład kazeiny mleka. W większości przypadków przejaśnienie pożywki z mlekiem było widoczne wyłącznie w miejscu naniesienia i wzrostu bakterii (fot. 25, 26). W przypadku pięciu izolatów, pochodzących z treści jelitowej prosiąt ssących i odsadzonych, zaobserwowano wyższą aktywność proteolityczną widoczną jako strefy o promieniu około 2 mm wokół hodowli.

Rozkład skrobi wykazywało niecałe 52% badanych izolatów. Aktywność amylopolityczna badanych izolatów bakterii przedstawiona na fotografiach 23 i 24, widoczna była jako przejaśnienia w miejscu i wokół naniesienia hodowli na podłożu agarowe, po zalaniu płynem Lugola. Właściwości amylopolityczne odnotowano w przypadku 13 izolatów pochodzących z treści jelitowej prosiąt ssących, 6 izolatów wyizolowanych z kału prosiąt odsadzonych i 13 izolatów pochodzących z jelit kurcząt rzeźnych.



Fotografie 23, 24. Właściwości amyloliczne



Fotografie 25, 26. Właściwości proteolityczne

Fotografie 23-26. Właściwości amyloliczne oraz proteolityczne wybranych izolatów bakterii fermentacji mlekowej

Źródło: wykonanie własne

Oceniając zdolność badanych bakterii fermentacji mlekowej do wytwarzania lipaz, nie stwierdzono stref zmętnienia wokół kolonii bakterii, co świadczyło o braku właściwości lipolitycznych tych izolatów.

Dane literaturowe wskazują, że właściwości enzymatyczne bakterii fermentacji mlekowej są bardzo zróżnicowane. Taheri i in. [2009a] badali aktywność enzymatyczną bakterii fermentacji mlekowej w celu ich selekcji jako źródła probiotyków dla kurcząt. Z ich obserwacji wynikało, że 90% badanych bakterii wykazywało właściwości proteolityczne, a 70% amyloliczne. Nie zaobserwowali natomiast zdolności do wytwarzania lipaz. Wyniki te są zbliżone do otrzymanych wyników w niniejszych badaniach. Podobne rezultaty uzyskali Kim i in. [2007], którzy przebadali 252 izolaty bakterii

fermentacji mlekowej, pochodzące z kału i jelit prosiąt, pod względem ich zdolności do wytwarzania proteaz, amylaz, lipaz i fitaz. Właściwości proteolityczne posiadało 81% badanych szczepów, a amylolityczne 22% izolatów pochodzących z kału i 23% uzyskanych z jelit. Autorzy uzyskali jednak inne wyniki w przypadku właściwości lipolitycznych, które stwierdzili w przypadku 15% izolatów z kału i 17% uzyskanych z jelit. Z kolei Musikasang i in. [2009], badając właściwości enzymatyczne 20 izolatów bakterii fermentacji mlekowej wyizolowanych z przewodów pokarmowych kurcząt, nie zaobserwowali właściwości amylolitycznych ani lipolitycznych, jedynie w przypadku 60% bakterii zaobserwowano zdolność do rozkładu kazeiny mleka.

Różnice dotyczące występowania określonych właściwości enzymatycznych wśród bakterii fermentacji mlekowej mogą wynikać m.in. z ich pochodzenia. Przykładowo, wielu autorów opisuje szczepy wykazujące silne właściwości amylolityczne, które pochodzą z fermentowanej żywności bogatej w skrobię [Olympia i in. 1995; Sanni, Morlon-Guyot i Guyot 2002].

Innym problemem wpływającym na właściwości biochemiczne bakterii może być stopień związania enzymów z komórką. Lee, Gilliland i Carter [2001] podczas selekcji potencjalnie probiotycznych bakterii stwierdzili, że aktywność amylolityczna szczepu *L. acidophilus* L23 była ściśle powiązana z obecnością komórek, co świadczy o tym, że enzym był związany ze ścianą komórkową. Z kolei inny szczep, *L. fermentum* L9, wytwarzał zewnątrzkomórkowe enzymy amylolityczne. Dodatkowo, autorzy uznali, że w przypadku *L. acidophilus* L23 była to aktywność indukowana.

W prezentowanej pracy aktywność proteolityczna i amylolityczna badanych izolatów była brana pod uwagę jako czynnik selekcyjny, mając na uwadze, że jest to istotna cecha mikroorganizmów typowanych jako probiotyczne. Suplementacja pasz takimi mikroorganizmami może wpływać na procesy trawienne zwierząt, ponieważ bakterie probiotyczne, kolonizując nabłonek jelitowy, mogą wydzielać enzymy, powodując wzrost aktywności enzymatycznej w środowisku jelitowym. Wskazują na to badania zarówno w zakresie żywienia drobiu jak i prosiąt. Jin i in. [2000] wykazali, że po zastosowaniu bakterii *L. acidophilus* lub mieszaniny bakterii *Lactobacillus* spp. podczas karmienia drobiu, poziom amylaz w jelicie cienkim istotnie wzrastał po 40 dniach. Nie stwierdzono natomiast wpływu tych mikroorganizmów na aktywność enzymów proteolitycznych i lipolitycznych. Z kolei Collington i in. [1990] obserwowali wyższą aktywność enzymów amylolitycznych

w przewodzie pokarmowym prosiąt po suplementacji preparatem probiotycznym zawierającym mieszaninę bakterii *Lactobacillus* spp. i *Streptococcus faecium*.

9.3.5. Określenie przeżywalności izolatów bakterii fermentacji mlekowej na warunki panujące w przewodzie pokarmowym

Jednym z ważniejszych parametrów determinujących przydatność bakterii fermentacji mlekowej jako potencjalnych probiotyków jest tolerancja niskiego pH i soli żółciowych. Szczepy takie powinny być bowiem odporne na warunki panujące w przewodzie pokarmowym, aby mogły przetrwać pasaż przez żołądek i jelita [Patterson i Burkholder 2003; Choudhari i in. 2008]. Tylko odpowiednia ilość komórek bakterii docierająca do jelita grubego może wywierać korzystny wpływ na zdrowie gospodarza.

W prezentowanej pracy przeżywalność w warunkach niskiego pH oraz w obecności soli żółciowych oznaczano dla 62 izolatów bakterii fermentacji mlekowej. Ze względu na dużą liczbę izolatów oznaczenia wykonano metodą mikroptytkową obserwując zmiany w rozwoju bakterii na podstawie gęstości optycznej hodowli, wykonując pomiary w określonych odstępach czasu.

9.3.5.1. Wpływ niskiego pH na wzrost wybranych izolatów bakterii fermentacji mlekowej

Jak wskazują różne badania, pH w soku żołądkowym może wynosić od 2,5 do 3,0, w zależności od gatunku zwierzęcia, rodzaju i czasu żywienia, a także od wieku zwierzęcia [Yu i Tsen 1993]. Biorąc, zatem pod uwagę zakres pH panującego w żołądku różnych zwierząt, przeżywalność badanych izolatów bakterii fermentacji mlekowej badano w pożywce MRS, której pH zostało ustalone na poziomie 2,0 i 3,0. Dla porównania, równolegle prowadzono hodowle w optymalnych warunkach, przy pH równym 6,5. Wzrost bakterii w warunkach niskiego pH monitorowano przez 4 godziny, wykonując oznaczenie absorbancji co godzinę. Szczegółowe wyniki przedstawiono na wykresach w załączniku elektronicznym, natomiast w tabeli 18 zaprezentowano zmianę wartości OD₆₀₀ po 24 godzinach oraz tolerancję niskiego pH środowiska przez badane izolaty bakterii wyrażoną jako procent wzrostu populacji w stosunku do próbki kontrolnej.

Tabela 18. Zmiany wartości OD₆₀₀ po 24 godzinnej hodowli izolatów bakterii fermentacji mlekowej pochodzących z treści jelitowej prosiąt oraz kurcząt w zależności od pH środowiska

Numer izolatu	pH 6,5	pH 2,0	Procent tolerancji	pH 3,0	Procent tolerancji
Prosięta ssące					
KK 001	0,799 ± 0,009 ^{ab}	0,433 ± 0,002 ^{c-f}	54	0,419 ± 0,004 ^{a-e}	52
KK 003	0,977 ± 0,014 ^{b-e}	0,374 ± 0,001 ^{bc}	38	0,364 ± 0,003 ^{ab}	37
KK 008	1,293 ± 0,006 ^{h-t}	0,620 ± 0,003 ^{i-r}	48	0,582 ± 0,008 ^{c-k}	45
KK 023	1,336 ± 0,001 ^{i-m}	0,407 ± 0,001 ^{b-e}	30	0,399 ± 0,004 ^{a-d}	30
KK 026	1,405 ± 0,029 ^{k-n}	0,184 ± 0,000 ^a	13	0,333 ± 0,003 ^a	24
KK 028	1,097 ± 0,017 ^{d-h}	0,559 ± 0,003 ^{g-m}	51	0,607 ± 0,009 ^{d-k}	55
KK 030	1,104 ± 0,014 ^{d-h}	0,543 ± 0,002 ^{f-t}	49	0,628 ± 0,010 ^{e-k}	57
KK 033	0,956 ± 0,006 ^{b-e}	0,484 ± 0,002 ^{c-h}	51	0,516 ± 0,006 ^{a-h}	54
KK 079	1,422 ± 0,015 ^{k-n}	0,603 ± 0,003 ^{i-p}	42	0,597 ± 0,009 ^{d-k}	42
KK 202	1,416 ± 0,000 ^{k-n}	0,631 ± 0,003 ^{j-r}	45	0,665 ± 0,011 ^{f-l}	47
KK 231	1,489 ± 0,002 ^{t-n}	0,669 ± 0,004 ^{m-r}	45	0,718 ± 0,013 ^{h-t}	48
KK 234	1,437 ± 0,008 ^{l-n}	0,646 ± 0,003 ^{l-r}	45	0,729 ± 0,013 ^{i-t}	51
KK 235	1,450 ± 0,002 ^{t-n}	0,311 ± 0,001 ^b	21	0,511 ± 0,006 ^{a-h}	35
KK 242	1,383 ± 0,007 ^{j-n}	0,588 ± 0,003 ^{h-o}	42	0,619 ± 0,009 ^{e-k}	45
KK 244	1,446 ± 0,001 ^{t-n}	0,403 ± 0,001 ^{b-d}	28	0,430 ± 0,001 ^{a-e}	30
KK 251	1,390 ± 0,011 ^{j-l}	0,377 ± 0,001 ^{bc}	27	0,462 ± 0,005 ^{a-f}	33
KK 254	1,432 ± 0,001 ^{l-n}	0,652 ± 0,003 ^{l-r}	46	0,542 ± 0,007 ^{b-i}	38
KK 360	1,162 ± 0,000 ^{e-i}	0,482 ± 0,002 ^{c-h}	41	0,478 ± 0,006 ^{a-f}	41
KK 362	1,105 ± 0,005 ^{d-h}	0,520 ± 0,002 ^{f-j}	47	0,433 ± 0,005 ^{a-e}	39
KK 363	0,991 ± 0,014 ^{b-f}	0,584 ± 0,003 ^{h-n}	59	0,552 ± 0,007 ^{b-j}	56
KK 364	1,493 ± 0,002 ^{t-n}	0,717 ± 0,004 ^{p-s}	48	0,700 ± 0,012 ^{g-t}	47
KK 367	1,440 ± 0,004 ^{t-n}	0,701 ± 0,004 ^{o-r}	49	0,733 ± 0,013 ^{i-t}	51
KK 380	1,227 ± 0,022 ^{g-l}	0,407 ± 0,001 ^{b-e}	33	0,430 ± 0,005 ^{a-e}	35
DG 007	1,474 ± 0,001 ^{t-n}	0,376 ± 0,001 ^{bc}	26	0,460 ± 0,005 ^{a-f}	31
DG 059	1,386 ± 0,018 ^{j-n}	0,537 ± 0,002 ^{f-l}	39	0,545 ± 0,007 ^{b-i}	39
DG 068	0,949 ± 0,013 ^{bd}	0,372 ± 0,001 ^{bc}	39	0,421 ± 0,004 ^{a-e}	44
DG 069	1,590 ± 0,015 ⁿ	0,828 ± 0,006 ^s	52	0,840 ± 0,017 ^h	53
DG 071	1,386 ± 0,001 ^{j-n}	0,431 ± 0,002 ^{c-f}	31	0,432 ± 0,005 ^{a-e}	31
DG 073	1,216 ± 0,015 ^{g-k}	0,511 ± 0,002 ^{d-i}	42	0,479 ± 0,006 ^{a-f}	39
Prosięta odsadzone					
KK 015	1,441 ± 0,001 ^{t-n}	0,638 ± 0,003 ^{k-r}	44	0,575 ± 0,008 ^{c-k}	40
KK 019	1,331 ± 0,002 ^{i-m}	0,701 ± 0,004 ^{o-r}	53	0,773 ± 0,015 ^{k-t}	58
KK 043	1,189 ± 0,000 ^{f-j}	0,517 ± 0,002 ^{d-j}	44	0,557 ± 0,008 ^{b-j}	47
KK 049	1,147 ± 0,019 ^{d-i}	0,609 ± 0,003 ^{i-p}	53	0,657 ± 0,011 ^{f-l}	57
KK 160	0,732 ± 0,002 ^a	0,440 ± 0,002 ^{c-f}	60	0,524 ± 0,007 ^{a-i}	72
KK 344	1,044 ± 0,007 ^{c-g}	0,527 ± 0,002 ^{f-k}	51	0,548 ± 0,007 ^{c-i}	52
KK 346	1,028 ± 0,012 ^{c-g}	0,444 ± 0,002 ^{c-g}	43	0,504 ± 0,006 ^{a-g}	49
DG 013	1,437 ± 0,005 ^{l-n}	0,726 ± 0,004 ^{rs}	51	0,905 ± 0,020 ^t	63
DG 016	1,462 ± 0,003 ^{t-n}	0,460 ± 0,002 ^{c-g}	31	0,529 ± 0,007 ^{a-i}	36
DG 017	0,859 ± 0,011 ^{a-c}	0,690 ± 0,004 ^{n-r}	80	0,656 ± 0,010 ^{f-l}	76
DG 048	1,025 ± 0,015 ^{c-g}	0,389 ± 0,001 ^{bc}	38	0,381 ± 0,004 ^{d-c}	37

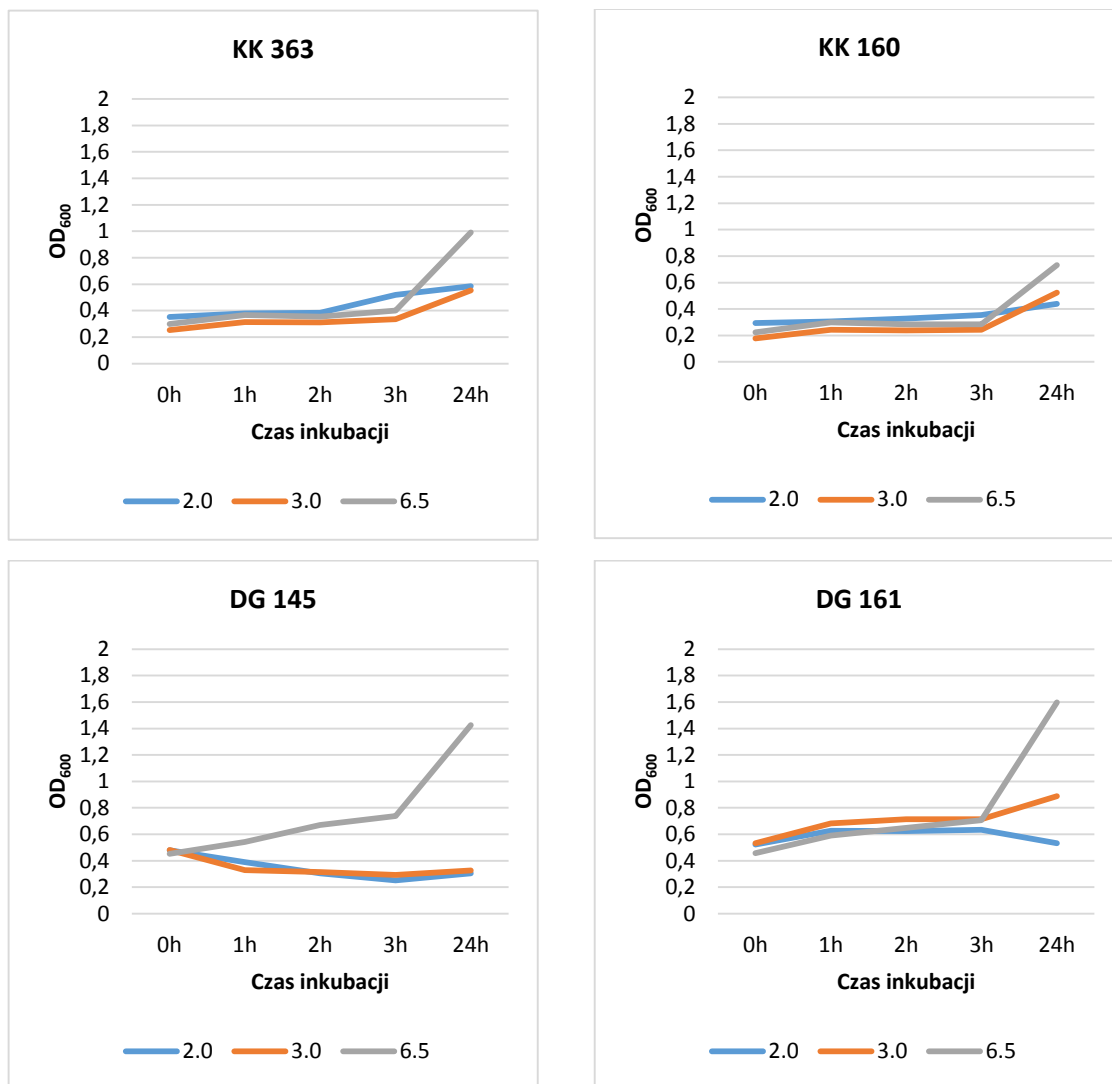
Numer izolatu	pH 6,5	pH 2,0	Procent tolerancji	pH 3,0	Procent tolerancji
DG 236	1,514 ± 0,002 ^{mn}	0,654 ± 0,003 ^{t-r}	43	0,761 ± 0,014 ^{j-t}	50
Kurczęta rzeźne					
KK 270	1,383 ± 0,012 ^{c-e}	0,693 ± 0,004 ^{jk}	50	0,761 ± 0,014 ^{e-h}	55
KK 279	1,365 ± 0,001 ^{c-e}	0,489 ± 0,002 ^{c-e}	36	0,526 ± 0,007 ^{a-d}	39
KK 281	1,441 ± 0,030 ^{d-f}	0,658 ± 0,004 ^{h-k}	46	0,695 ± 0,012 ^{c-g}	48
KK 329	1,506 ± 0,002 ^{d-g}	0,449 ± 0,002 ^{b-d}	30	0,425 ± 0,004 ^{ab}	28
KK 331	1,123 ± 0,018 ^a	0,556 ± 0,003 ^{d-h}	49	0,617 ± 0,009 ^{b-f}	55
KK 334	1,156 ± 0,005 ^{ab}	0,556 ± 0,003 ^{d-h}	48	0,501 ± 0,006 ^{a-c}	43
DG 102	1,582 ± 0,003 ^{f-g}	0,641 ± 0,003 ^{g-k}	41	0,946 ± 0,022 ^h	60
DG 145	1,426 ± 0,010 ^{d-f}	0,304 ± 0,001 ^a	21	0,326 ± 0,003 ^a	23
DG 161	1,597 ± 0,018 ^{f-g}	0,534 ± 0,002 ^{c-g}	33	0,887 ± 0,019 ^{gh}	56
DG 167	1,636 ± 0,003 ^g	0,661 ± 0,004 ^{h-k}	40	0,842 ± 0,017 ^{f-h}	51
DG 171	1,416 ± 0,001 ^{d-f}	0,616 ± 0,003 ^{f-j}	43	0,664 ± 0,011 ^{c-g}	47
DG 177	1,321 ± 0,005 ^{b-d}	0,439 ± 0,002 ^{bc}	33	0,542 ± 0,007 ^{a-e}	41
DG 179	1,343 ± 0,003 ^{b-e}	0,744 ± 0,005 ^k	55	0,747 ± 0,014 ^{d-h}	56
DG 187	1,216 ± 0,016 ^{a-c}	0,459 ± 0,002 ^{b-d}	38	0,538 ± 0,007 ^{a-e}	44
DG 190	1,439 ± 0,008 ^{d-f}	0,674 ± 0,004 ^{i-k}	47	0,691 ± 0,012 ^{c-g}	48
DG 195	1,505 ± 0,002 ^{d-g}	0,667 ± 0,004 ^{h-k}	44	0,672 ± 0,011 ^{c-g}	45
DG 197	1,642 ± 0,005 ^g	0,577 ± 0,003 ^{e-i}	35	0,848 ± 0,018 ^{gh}	52
DG 199	1,512 ± 0,002 ^{e-g}	0,348 ± 0,001 ^{ab}	23	0,410 ± 0,004 ^{ab}	27
DG 208	1,524 ± 0,002 ^{e-g}	0,507 ± 0,002 ^{c-f}	33	0,584 ± 0,008 ^{b-e}	38
DG 211	1,456 ± 0,005 ^{d-g}	0,654 ± 0,003 ^{h-k}	45	0,699 ± 0,012 ^{c-g}	48
DG 213	1,442 ± 0,001 ^{d-f}	0,598 ± 0,003 ^{e-j}	41	0,715 ± 0,012 ^{c-g}	50

*a- s średnie oznaczone różnymi literami w kolumnach różnią się istotnie przy p < 0,05

** analizę statystyczną wykonano osobno dla próbek izolatów pochodzących z kału prosiąt (ssących i odsadzonych) oraz jelit kurcząt rzeźnych

Źródło: na podstawie badań własnych

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono, że wartość OD₆₀₀ w przypadku wszystkich izolatów była istotnie niższa w podłożu o pH 2,0 i 3,0 w porównaniu z wartością kontrolną (dla przejrzystości prezentowanych wyników, w tabeli nie wskazano istotności różnic pomiędzy wynikami uzyskanymi dla poszczególnych izolatów). Stwierdzono natomiast zróżnicowaną tolerancję badanych bakterii na niskie wartości pH. Analiza statystyczna wykazała istotne różnice pomiędzy izolatami. W przypadku niektórych bakterii fermentacji mlekowej obserwowano zahamowanie wzrostu np. KK 026, były jednak izolaty, które rosły w środowisku o obniżonej wartości pH, np. KK 019, DG 017. Porównując rozwój bakterii w pH 2 i pH 3, w kilku przypadkach można zauważyć istotne różnice wartości OD₆₀₀ obrazujących wzrost izolatów w tych warunkach. Zaobserwowano również mniejszy wzrost w środowisku o pH 2 w porównaniu do pH 3 np. KK 026 i KK 235.



Wykresy 4-7. Zmiany wartości OD₆₀₀ hodowli wybranych izolatów bakterii fermentacji mlekowej pochodzących z treści jelitowej prosiąt oraz jelit kurcząt w zależności od pH środowiska

Źródło: na podstawie badań własnych

Na wykresach 4-7 przedstawiono wzrost wybranych izolatów w zależności od wartości pH podłoża. W celu zaprezentowania zróżnicowanego zachowania bakterii wykresy obrazują skrajne przypadki, uwzględniając zarówno zahamowania wzrostu jak i dobrej tolerancji niskiego pH. Wykresy dla wszystkich badanych bakterii fermentacji mlekowej zamieszczono w załączniku elektronicznym: dla 29 izolatów pochodzących z kału prosiąt ssących E. 1 - E. 29, dla 12 izolatów z kału prosiąt odsadzonych E. 30 - E. 41 oraz dla 23 izolatów z jelit kurcząt rzeźnych E. 42 - E. 62. W przypadku izolatów, najlepiej tolerujących niskie wartości pH, jak KK 363 czy KK 160, w ciągu pierwszych trzech godzin nie obserwowano większych zmian we wzroście, natomiast po 3 godzinach widoczny był gwałtowny przyrost wartości OD₆₀₀. Niektóre izolaty, jak DG 161, wykazywały niewielką

tolerancję niskich wartości pH i chociaż obserwowano niewielki wzrost wartości OD₆₀₀ w pierwszych godzinach inkubacji, ostatecznie wzrost był słaby. Z kolei część izolatów wykazywała dużą wrażliwość na skrajne wartości pH, jak DG 145, w związku z czym obserwowano spadek wartości OD₆₀₀ już od pierwszych godzin.

Większość bakterii fermentacji mlekowej należy do neutrofilii, chociaż uważa się, że są z natury odporne na działanie kwasów [Tannock 2004]. Obserwuje się jednak wyraźnie zwiększoną wrażliwość na niskie wartości pH, szczególnie poniżej 3,0 [Jin i in. 1998; Rönkä i in. 2003]. Tolerancja niskich wartości pH jest cechą szczepozależną, na co wskazują dane literaturowe, jak również wyniki przedstawione w niniejszej pracy. De Angelis i in. [2006] badając osiem szczepów wybranych spośród 80 izolatów pozyskanych z odchodów prosiąt stwierdzili, że większość szczepów dobrze tolerowała transfer przez sok żołądkowy, natomiast jeden, *L. kitasatonis* 5.5R, wykazał bardzo słabą tolerancję niskich wartości pH.

Damayanti i in. [2014] obserwowali wyższą tolerancję niskiego pH w przypadku szczepu *P. acidilactici* R02 niż *P. acidilactici* R01 w trakcie godzinnej inkubacji. Podobnie, Sofyan i in. [2013] stwierdzili zróżnicowaną wrażliwość czterech szczepów bakterii fermentacji mlekowej w zależności od pH środowiska, a zarazem wyższą tolerancję pH 2,0 przez szczepy *L. paracasei* ssp. *paracasei* (CR1 i CR2) niż *L. brevis* Sil.3 i *L. collinoides* Sil.9. Niektórzy autorzy podkreślają, że adaptacja do warunków panujących w przewodzie pokarmowym zwierząt czy ludzi może być związana z pochodzeniem mikroorganizmów [Damayanti i in. 2014].

Wielu autorów zwraca uwagę na duże różnice w przeżywalności bakterii fermentacji mlekowej w środowisku o pH 2,0 i 3,0. Przykładowo, przeżywalność *L. plantarum* ZLP001 w soku żołądkowym o pH 2,0 spadała o 95% podczas trzygodzinnej inkubacji, podczas gdy w pH 3 spadek przeżywalności wynosił 81,28% [Wang i in. 2011]. Podobnie, Hacin, Rogelj i Matijašić [2008] obserwowali większą redukcję liczebności bakterii wyizolowanych z przewodu pokarmowego prosiąt w pH 2 niż pH 3. W niniejszej pracy nie obserwowano jednak tak dużych różnic w przeżywalności izolatów w pH 2 i 3. Należy jednak brać pod uwagę, że wartość OD₆₀₀ nie odzwierciedla w pełni liczebności populacji, ponieważ pomiar gęstości optycznej uwzględnia również obecność komórek martwych. Daje jednak pogląd na zachowanie populacji w określonych warunkach.

Przeprowadzone badania pozwoliły wytypować izolaty charakteryzujące się największą odpornością na działanie kwaśnego środowiska, co stanowi ważną cechę podczas selekcji mikroorganizmów o potencjale probiotycznym.

9.3.5.2. Wpływ soli żółciowych na wzrost wybranych bakterii fermentacji mlekowej

Kolejnym czynnikiem wpływającym na przeżywalność bakterii podczas pasażu przez przewód pokarmowy jest obecność soli żółciowych, będących pochodnymi kwasu cholowego. Są one głównym składnikiem żółci, wydzieliny trawiennej odgrywającej rolę w procesach dyspersji i absorpcji tłuszczów. Toksyczne oddziaływanie soli żółciowych na komórki bakterii nie jest mechanizmem w pełni znanym. Wiadomo jednak, że są to cząsteczki amfipatyczne, które działają jak detergenty i uszkodzają ściany komórkowe, wykazując tym samym silne działanie przeciwdrobnoustrojowe. Sole żółciowe mogą zaburzać homeostazę komórki, powodując uszkodzenie dwuwarstwy lipidowej i dysfunkcję białek integralnych, prowadząc do wycieku zawartości komórki i jej śmierci. Dotyczy to zarówno bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych, chociaż uważa się, że bakterie Gram-dodatnie są bardziej wrażliwe [Thanassi i in. 1997; Sahadeva i in. 2011; Brink i in. 2006]. Oba typy bakterii rozwinęły mechanizmy odporności na żółć, które umożliwiają im przetrwanie w przewodzie pokarmowym [Gunn 2000]. Tolerancja soli żółciowych jest zatem istotną cechą szczepów potencjalnie probiotycznych wpływającą na ich przeżywalność i możliwość dotarcia do jelita grubego [Smet i in. 1995].

W niniejszej pracy izolaty bakterii fermentacji mlekowej poddano działaniu soli żółciowych w stężeniu 0,25; 0,50 i 1,00%. W literaturze najczęściej wykorzystuje się do podobnych badań stężenie soli żółciowych równe 0,3%, jako odpowiadające ilości tego składnika w ludzkim przewodzie pokarmowym [Brashears i in. 2003; Lin i in. 2007]. W rzeczywistości nie jest to dokładne odzwierciedlenie faktycznego stężenia soli żółciowych występujące u ludzi. Zarówno u ludzi jak i w odniesieniu do zwierząt, podkreśla się zmienność tego parametru w zależności od wieku i sposobu żywienia. Stąd też zakres tego parametru w różnych badaniach sięga od 0,2 [Chou i Weimer 1999] do nawet 2% [Mishra i Prasad 2005]. W prezentowanej pracy uwzględniono trzy stężenia soli żółciowych opierając się na danych literaturowych odnoszących się do zwierząt monogastrycznych, takich jak drób i trzoda chlewna. Wyniki doświadczenia przedstawiono w tabeli 19.

Tabela 19. Zmiany wartości OD₆₀₀ po 24 godzinnej hodowli izolatów bakterii fermentacji mlekowej pochodzących z treści jelitowej prosiąt oraz jelit kurcząt w zróżnicowanych stężeniach żółci bawolej

Numer izolatu	Stężenie żółci bawolej 0%	Stężenie żółci bawolej 0,25%	Procent tolerancji	Stężenie żółci bawolej 0,50%	Procent tolerancji	Stężenie żółci bawolej 1,00%	Procent tolerancji
Prosięta ssące							
KK 001	1,005 ± 0,002 ^{b-d}	0,513 ± 0,002 ^{ab}	51	0,447 ± 0,001 ^{ab}	45	0,502 ± 0,004 ^{ab}	50
KK 003	1,105 ± 0,003 ^{d-f}	0,961 ± 0,006 ^{g-l}	87	0,566 ± 0,001 ^{bc}	51	0,888 ± 0,012 ^{d-i}	80
KK 008	1,331 ± 0,004 ^{gh}	1,198 ± 0,010 ^{n-p}	90	1,055 ± 0,004 ^{t-o}	79	1,147 ± 0,019 ^{i-l}	86
KK 023	1,515 ± 0,005 ^{l-i}	0,993 ± 0,007 ^{h-m}	66	0,767 ± 0,002 ^{e-h}	51	1,016 ± 0,015 ^{g-k}	67
KK 026	1,648 ± 0,006 ^h	1,367 ± 0,013 ^{pr}	83	1,440 ± 0,008 ^r	87	1,554 ± 0,035 ^o	94
KK 028	1,475 ± 0,005 ^{h-j}	1,202 ± 0,010 ^{n-p}	81	1,107 ± 0,005 ^{m-o}	75	1,085 ± 0,017 ^{h-l}	74
KK 030	1,108 ± 0,003 ^{d-f}	1,199 ± 0,010 ^{n-p}	108	1,162 ± 0,005 ^{op}	105	0,909 ± 0,012 ^{e-i}	82
KK 033	0,878 ± 0,002 ^b	0,835 ± 0,005 ^{d-i}	95	0,996 ± 0,004 ⁱ⁻ⁿ	113	0,933 ± 0,013 ^{f-i}	106
KK 079	1,214 ± 0,003 ^{fg}	1,163 ± 0,009 ^{t-o}	96	1,088 ± 0,005 ^{m-o}	90	1,088 ± 0,017 ^{h-l}	90
KK 202	1,673 ± 0,006 ^l	1,500 ± 0,015 ^r	90	1,491 ± 0,009 ^r	89	1,547 ± 0,035 ^o	92
KK 231	1,724 ± 0,007 ^l	1,515 ± 0,015 ^r	88	1,255 ± 0,006 ^p	73	1,431 ± 0,030 ^{m-o}	83
KK 234	1,590 ± 0,006 ^{l-t}	1,252 ± 0,011 ^{op}	79	1,135 ± 0,005 ^{n-p}	71	1,157 ± 0,020 ^{i-m}	73
KK 235	1,450 ± 0,005 ^{h-j}	0,910 ± 0,006 ^{f-k}	63	1,020 ± 0,004 ^{j-n}	70	1,221 ± 0,022 ^{j-n}	84
KK 242	1,385 ± 0,004 ^{hi}	1,155 ± 0,009 ^{t-o}	83	1,033 ± 0,004 ^{l-o}	75	0,996 ± 0,014 ^{g-k}	72
KK 244	1,424 ± 0,005 ^{hi}	0,390 ± 0,001 ^a	27	0,364 ± 0,001 ^a	26	0,463 ± 0,003 ^a	32
KK 251	1,462 ± 0,005 ^{h-j}	0,667 ± 0,003 ^{bd}	46	1,121 ± 0,005 ^{m-o}	77	1,372 ± 0,027 ^{t-o}	94
KK 254	1,487 ± 0,005 ^{ij}	0,877 ± 0,005 ^{e-j}	59	0,682 ± 0,002 ^{c-f}	46	1,143 ± 0,019 ^{i-l}	77
KK 360	0,922 ± 0,003 ^{bc}	1,023 ± 0,007 ⁱ⁻ⁿ	111	0,750 ± 0,002 ^{d-g}	81	0,904 ± 0,012 ^{e-i}	98
KK 362	0,995 ± 0,002 ^{b-d}	0,857 ± 0,005 ^{d-j}	86	0,865 ± 0,003 ^{g-i}	87	0,638 ± 0,006 ^{a-e}	64
KK 363	1,339 ± 0,004 ^{gh}	1,144 ± 0,009 ^{l-o}	85	1,125 ± 0,005 ^{m-p}	84	1,111 ± 0,018 ^{i-l}	83
KK 364	1,237 ± 0,004 ^{f-g}	0,881 ± 0,005 ^{f-j}	71	0,889 ± 0,003 ^{h-j}	72	0,514 ± 0,004 ^{a-c}	42
KK 367	1,057 ± 0,003 ^{c-e}	0,803 ± 0,004 ^{c-h}	76	0,429 ± 0,001 ^a	41	0,901 ± 0,012 ^{e-i}	85
KK 380	1,095 ± 0,003 ^{d-f}	0,688 ± 0,003 ^{b-e}	63	0,404 ± 0,001 ^a	37	0,797 ± 0,009 ^{c-g}	73
DG 007	1,402 ± 0,005 ^{hi}	0,972 ± 0,006 ^{g-t}	69	0,919 ± 0,003 ^{i-l}	66	0,987 ± 0,014 ^{g-k}	70
DG 059	1,330 ± 0,004 ^{gh}	0,985 ± 0,007 ^{h-t}	74	1,026 ± 0,004 ^{k-n}	77	1,365 ± 0,027 ^{l-o}	103
DG 068	0,987 ± 0,002 ^{b-d}	0,400 ± 0,001 ^a	40	0,412 ± 0,001 ^a	42	0,511 ± 0,004 ^{ab}	52
DG 069	1,486 ± 0,005 ^{ij}	1,258 ± 0,011 ^{op}	85	1,092 ± 0,005 ^{m-o}	73	0,973 ± 0,014 ^{g-k}	65
DG 071	1,231 ± 0,003 ^{fg}	0,791 ± 0,004 ^{c-g}	64	0,743 ± 0,002 ^{d-g}	60	0,503 ± 0,004 ^{ab}	41
DG 073	1,337 ± 0,004 ^{gh}	0,628 ± 0,003 ^{bc}	47	0,469 ± 0,001 ^{ab}	35	0,504 ± 0,004 ^{ab}	38
Prosięta odsadzone							
KK 015	1,400 ± 0,004 ^{hi}	1,184 ± 0,009 ^{m-p}	85	0,875 ± 0,003 ^{g-i}	63	1,110 ± 0,018 ^{i-l}	79
KK 019	1,391 ± 0,004 ^{hi}	0,912 ± 0,006 ^{f-k}	66	0,728 ± 0,002 ^{d-f}	52	1,014 ± 0,015 ^{g-k}	73
KK 043	1,165 ± 0,003 ^{ef}	0,725 ± 0,004 ^{c-f}	62	0,693 ± 0,002 ^{c-f}	59	0,911 ± 0,012 ^{e-i}	78
KK 049	0,546 ± 0,000 ^a	0,509 ± 0,002 ^{ab}	93	0,416 ± 0,001 ^a	76	0,498 ± 0,004 ^{ab}	91
KK 160	1,637 ± 0,006 ^{k-l}	1,100 ± 0,008 ^{k-o}	67	0,931 ± 0,003 ^{i-l}	57	1,244 ± 0,023 ^{k-n}	76
KK 344	0,659 ± 0,001 ^a	0,742 ± 0,004 ^{c-f}	113	0,622 ± 0,002 ^{cd}	94	0,676 ± 0,007 ^{a-f}	103
KK 346	1,090 ± 0,003 ^{d-f}	1,005 ± 0,007 ^{i-m}	92	0,630 ± 0,002 ^{cd}	58	0,606 ± 0,005 ^{a-d}	56
DG 013	1,498 ± 0,005 ^{i-k}	1,101 ± 0,008 ^{k-o}	74	1,152 ± 0,005 ^{n-p}	77	0,966 ± 0,014 ^{g-k}	64
DG 016	1,467 ± 0,005 ^{h-j}	1,072 ± 0,008 ^{k-o}	73	0,774 ± 0,002 ^{f-h}	53	0,946 ± 0,013 ^{f-j}	65

Numer izolatu	Stężenie żółci bawolej 0%	Stężenie żółci bawolej 0,25%	Procent tolerancji	Stężenie żółci bawolej 0,50%	Procent tolerancji	Stężenie żółci bawolej 1,00%	Procent tolerancji
DG 017	1,214 ± 0,003 ^{fg}	1,076 ± 0,008 ^{k-o}	89	0,896 ± 0,003 ^{h-k}	74	1,452 ± 0,031 ^{no}	120
DG 048	1,122 ± 0,003 ^{d-f}	0,946 ± 0,006 ^{g-k}	84	0,641 ± 0,002 ^{c-e}	57	0,751 ± 0,008 ^{b-g}	67
DG 236	1,459 ± 0,005 ^{h-j}	1,028 ± 0,007 ^{j-n}	70	0,886 ± 0,003 ^{hi}	61	0,824 ± 0,010 ^{d-h}	56
Kurczęta rzeźne							
KK 270	1,375 ± 0,004 ^{c-g}	0,983 ± 0,006 ^{c-h}	72	0,984 ± 0,004 ^{ef}	72	1,027 ± 0,015 ^{c-h}	75
KK 279	1,521 ± 0,005 ^{g-j}	0,914 ± 0,006 ^{c-f}	60	0,890 ± 0,003 ^{c-f}	59	0,916 ± 0,012 ^{b-f}	60
KK 281	1,415 ± 0,005 ^{c-h}	0,859 ± 0,005 ^{c-e}	61	0,866 ± 0,003 ^{c-e}	61	1,064 ± 0,017 ^{d-h}	75
KK 329	1,284 ± 0,004 ^c	0,654 ± 0,003 ^b	51	0,627 ± 0,002 ^b	49	0,733 ± 0,008 ^{ab}	57
KK 331	0,786 ± 0,001 ^a	0,803 ± 0,004 ^{bc}	102	0,764 ± 0,002 ^{bc}	97	0,539 ± 0,004 ^a	69
KK 334	0,923 ± 0,002 ^a	1,152 ± 0,009 ^{h-j}	125	0,975 ± 0,004 ^{ef}	106	0,893 ± 0,012 ^{b-d}	97
DG 102	1,556 ± 0,006 ^{h-j}	1,066 ± 0,008 ^{f-i}	69	0,807 ± 0,003 ^{cd}	52	0,631 ± 0,006 ^a	41
DG 145	1,348 ± 0,004 ^{c-f}	0,468 ± 0,001 ^a	35	0,444 ± 0,001 ^a	33	0,729 ± 0,008 ^{ab}	54
DG 161	1,449 ± 0,005 ^{d-i}	1,307 ± 0,011 ^j	90	1,295 ± 0,007 ^g	89	1,063 ± 0,016 ^{d-h}	73
DG 167	1,449 ± 0,005 ^{d-i}	1,293 ± 0,011 ^j	89	1,246 ± 0,006 ^g	86	1,234 ± 0,022 ^{g-i}	85
DG 171	1,594 ± 0,006 ^{ij}	1,299 ± 0,011 ^j	82	1,243 ± 0,006 ^g	78	1,256 ± 0,023 ^{hi}	79
DG 177	1,315 ± 0,004 ^{cd}	0,977 ± 0,006 ^{c-h}	74	0,999 ± 0,004 ^{ef}	76	0,909 ± 0,012 ^{b-e}	69
DG 179	1,540 ± 0,005 ^{h-j}	0,931 ± 0,006 ^{c-g}	60	0,952 ± 0,004 ^{ef}	62	1,004 ± 0,015 ^{c-h}	65
DG 187	1,125 ± 0,003 ^b	1,099 ± 0,008 ^{g-i}	98	1,018 ± 0,004 ^f	91	1,014 ± 0,015 ^{c-h}	90
DG 190	1,494 ± 0,005 ^{f-j}	0,989 ± 0,007 ^{d-h}	66	0,999 ± 0,004 ^{ef}	67	1,060 ± 0,000 ^{d-h}	71
DG 195	1,466 ± 0,005 ^{e-j}	0,830 ± 0,005 ^{b-d}	57	0,927 ± 0,003 ^{d-f}	63	0,986 ± 0,014 ^{b-g}	67
DG 197	1,575 ± 0,006 ^{ij}	1,248 ± 0,010 ^{i-j}	79	1,210 ± 0,006 ^g	77	1,161 ± 0,020 ^{e-i}	74
DG 199	1,390 ± 0,004 ^{c-g}	0,987 ± 0,007 ^{c-h}	71	0,900 ± 0,003 ^{c-f}	65	0,791 ± 0,009 ^{a-c}	57
DG 208	1,320 ± 0,004 ^{c-e}	0,860 ± 0,005 ^{c-e}	65	0,867 ± 0,003 ^{c-e}	66	1,170 ± 0,020 ^{f-i}	89
DG 211	1,612 ± 0,006 ^j	1,298 ± 0,011 ^j	81	1,300 ± 0,007 ^g	81	1,406 ± 0,029 ⁱ	87
DG 213	1,541 ± 0,005 ^{h-j}	1,027 ± 0,007 ^{e-h}	67	1,018 ± 0,004 ^f	66	1,073 ± 0,017 ^{d-h}	70

*a- p średnie oznaczone różnymi literami w kolumnach różnią się istotnie przy p < 0,05

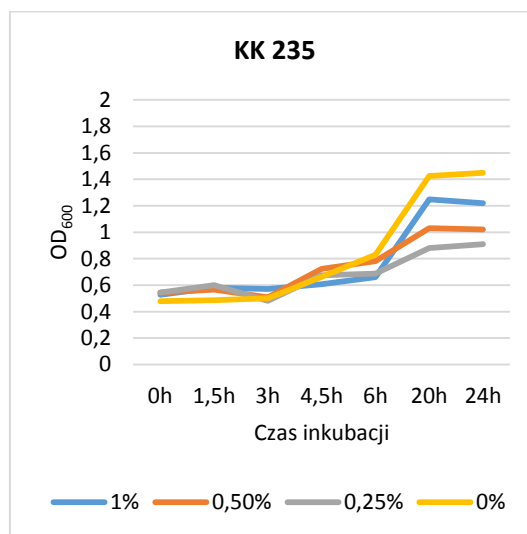
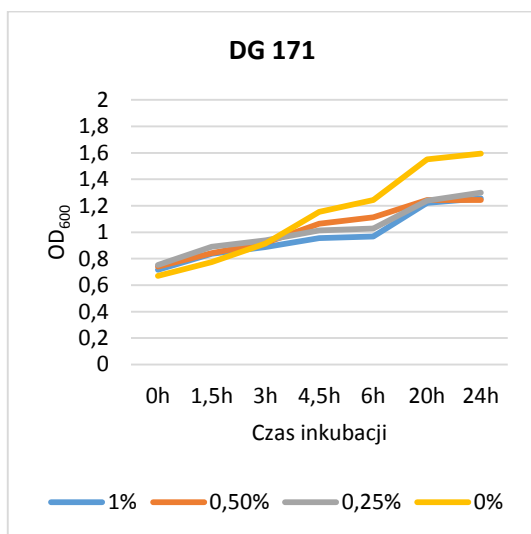
** analizę statystyczną wykonano osobno dla próbek izolatów pochodzących z kału prosiąt (ssących i odsadzonych) oraz jelit kurcząt rzeźnych

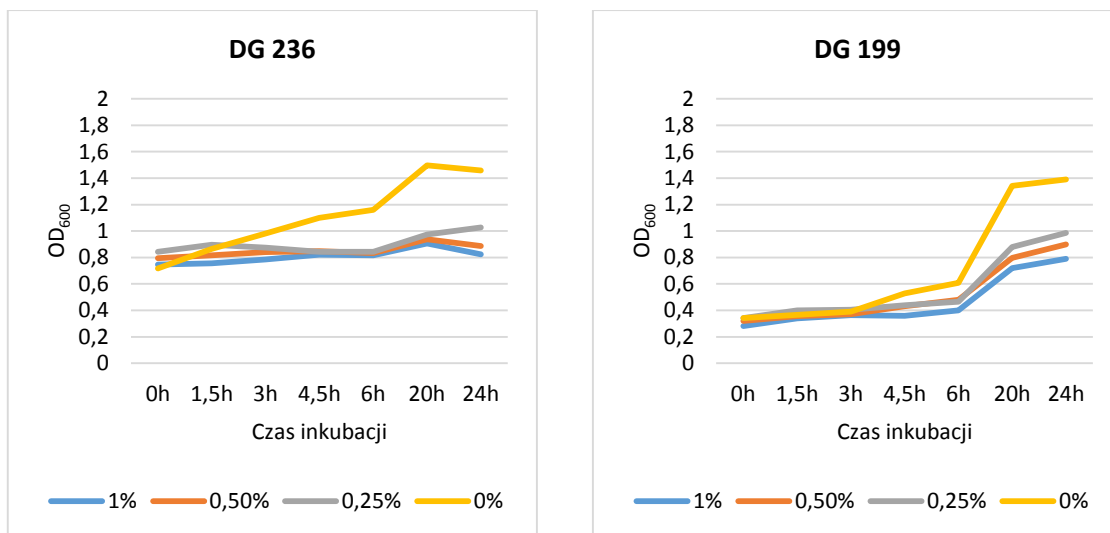
Źródło: opracowanie własne

Z danych w tabeli 19 wynika, że obecność soli żółciowych w zróżnicowany sposób wpływała na wzrost badanych izolatów. Analiza statystyczna wykazała istotne różnice pomiędzy poszczególnymi izolatami. Tolerancja soli, wyrażona jako procent wzrostu populacji w obecności tego składnika w stosunku do próbki kontrolnej, zależała od izolatu jak również od stężenia soli żółciowych w hodowli. Z reguły wzrost zawartości soli żółciowych powodował zmniejszenie tolerancji, jednak w przypadku wielu izolatów nie odnotowano istotnych różnic we wzroście w obecności 0,5 i 1% (dla przejrzystości prezentowanych wyników, w tabeli nie wskazano istotnych różnic pomiędzy wynikami

uzyskanymi dla poszczególnych izolatów). Kilka izolatów wykazało bardzo dużą tolerancję na obecność soli żółciowych, czego efektem był intensywny wzrost porównywalny ze wzrostem bakterii w próbkach kontrolnych. Przykładem były izolaty KK 030, KK 033, KK 344 czy KK 334. Odnotowano również przypadki, w których wzrost izolatów bakterii fermentacji mlekowej został znacznie zahamowany. Do takich izolatów należały KK 001, KK 244, DG 068, DG 073 czy DG 145. Podobne zależności obserwowano zarówno w grupie izolatów pochodzących z treści jelitowej prosiąt, jak i jelit drobiu.

Na wykresach 8-11 można zaobserwować ponadto wpływ czasu oddziaływania soli żółciowych na wzrost wybranych izolatów bakterii. W zależności od danych literaturowych czas ekspozycji bakterii na ten składnik wynosi zwykle od 3 do 24 godzin, dlatego też w niniejszej pracy przeprowadzono kinetykę wzrostu badanych izolatów w obecności soli żółciowych, aby możliwe było zaobserwowanie zmian zachodzących w czasie. W przypadku niektórych izolatów już w pierwszych godzinach widoczny był wpływ stężenia soli na wzrost populacji (np. DG 171). Wzrost większości izolatów utrzymywał się na podobnym poziomie w ciągu pierwszych 4 – 6 godzin inkubacji, niezależnie od stężenia, natomiast różnice we wzroście ujawniały się dopiero w kolejnych godzinach (np. KK 235, DG 199). Izolaty, które wykazywały słabą tolerancję tego składnika w podłożu charakteryzowały się słabym wzrostem już od pierwszych godzin (np. DG 236). Wykresy zawierające wyniki wpływu soli żółciowych na wzrost wszystkich 62 badanych bakterii zawarte zostały w załączniku elektronicznym, z podziałem w zależności od ich pochodzenia: z kału prosiąt ssących (E. 63 - E. 91), kału prosiąt odsadzonych (E. 92 - E. 103) oraz jelit kurcząt rzeźnych (E. 104 - E. 124).





Wykresy 8-11. Zmiany wartości OD₆₀₀ hodowli wybranych izolatów bakterii fermentacji mlekowej pochodzących z treści jelitowej prosiąt oraz kurcząt w zależności od pH środowiska

Źródło: na podstawie badań własnych

Uzyskane wyniki są zgodne z danymi literaturowymi. Autorzy różnych prac również wskazują, że przeżywalność bakterii w obecności soli żółciowych zależy w dużym stopniu od szczepu, a także od stężenia tego składnika i czasu ekspozycji mikroorganizmów na jego działanie. Lin i in. [2007] badając wpływ soli żółciowych na wzrost różnych szczepów bakterii *L. fermentum* stwierdzili, że niektóre z nich wykazują znaczną odporność na ich obecność. Jeden ze szczepów, SG2, pochodzący z przewodu pokarmowego świń, był całkowicie odporny na stężenie 0,3% soli żółciowych w ciągu 4 godzin inkubacji, podczas gdy wzrost izolatów PG3 i PGM3 wyizolowanych z przewodu pokarmowego drobiu, był silnie hamowany. W badaniach Sahadeva i in. [2011] nawet 2% stężenie soli żółciowych nie hamowało wzrostu bakterii probiotycznych przez 24 godziny inkubacji, a liczebność populacji utrzymywała się na wysokim poziomie. Mishra i Prasad [2005] stwierdzili, że dwa z siedmiu badanych szczepów bakterii wykazywały odporność na 1 i 2% stężenie soli żółciowych aż do 12 godzin inkubacji, dwa inne szczepy tolerowały ten składnik tylko w niższym badanym stężeniu przez 3 godziny, a pozostałe trzy lepiej tolerowały stężenie 1% niż 2%. Yang i in. [2014] zaobserwowali dobrą tolerancję soli żółciowych w przypadku ośmiu izolatów bakterii z rodzaju *Lactobacillus* wyizolowanych z przewodu pokarmowego drobiu w zakresie 0,3 do 1,5% i umiarkowaną tolerancję w przypadku dwóch izolatów w zakresie stężeń 0,5 do 1%. Wielu innych autorów opisywało podobnie zróżnicowaną wrażliwość bakterii z rodzaju *Lactobacillus* [Gilliland i Walker 1990; Jacobsen i in. 1999] czy *Bifidobacterium* [Ibrahim i Bezkorovainy 1993; Clark i Martin 1994].

W prezentowanej pracy zaobserwowano, że w niektórych przypadkach procent tolerancji soli żółciowych kształtował się na poziomie przekraczającym 100%, jak odnotowano m.in. dla izolatów KK 030 czy KK 334. Podobne rezultaty uzyskali Damayanti i in. [2012] badając wpływ tego parametru na różne szczepy *Pediococcus acidilactici*, a także Torshizi i in. [2008] w przypadku *L. fermentum* TMU121 i Damayanti i in. [2014] w badaniach dotyczących *Lactobacillus salivarius* I72.

Jak wskazują niektórzy autorzy, wysoka tolerancja soli żółciowych może być związana z pochodzeniem mikroorganizmu i możliwościami jego adaptacji do określonego środowiska [Takanashi i in. 2014]. Tym samym, po raz kolejny podkreśla to zasadność poszukiwania potencjalnie probiotycznych mikroorganizmów w środowiskach, które są tożsame z ich docelowym zastosowaniem.

Przeprowadzone badania pozwoliły na wytypowanie izolatów charakteryzujących się najwyższym stopniem tolerancji na obecność soli żółciowych, co w dalszych etapach brano pod uwagę przy selekcji do skomponowania preparatów.

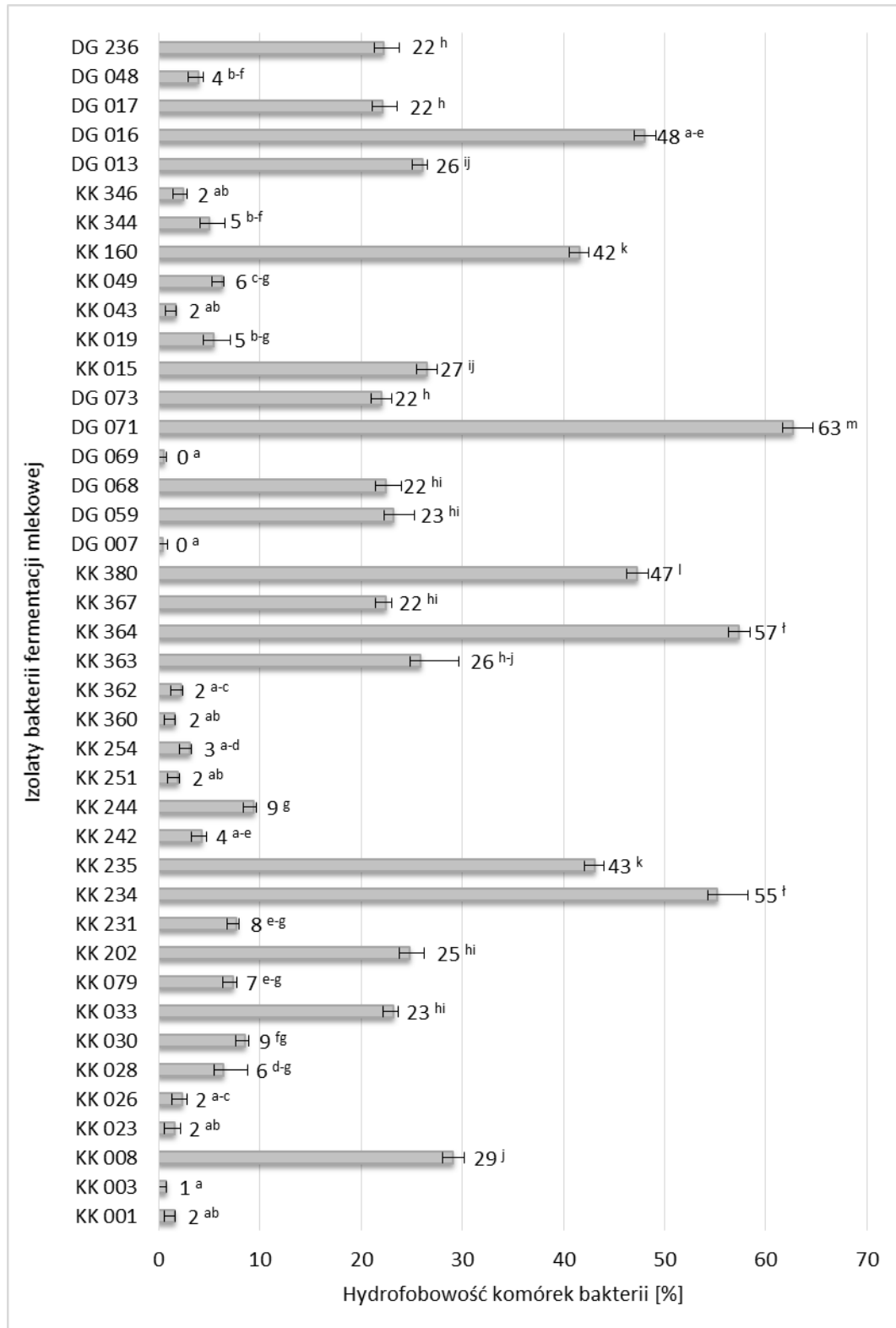
9.3.6. Określenie hydrofobowości komórek izolatów bakterii fermentacji mlekowej

Korzystny wpływ bakterii probiotycznych na organizm ludzi i zwierząt przypisuje się m.in. zdolności kolonizacji nabłonka jelit [Dharmawan i in. 2006]. Jednym z czynników wpływającym na adhezję komórek jest hydrofobowość ich powierzchni. Wadström i in. [1987] wykazali, że hydrofobowe komórki szczepów bakterii *Lactobacillus* sp. silniej przylegają do komórek epitelium niż hydrofilowe. Dlatego uważa się, że ocena tej właściwości może być pośrednim wskaźnikiem zdolności przylegania bakterii fermentacji mlekowej do powierzchni jelit [Taheri i in. 2009a].

Kolejną badaną cechą braną pod uwagę podczas selekcji bakterii, była zdolność komórek do przylegania do węglowodorów, jako wskaźnik ich hydrofobowości, a zarazem kryterium zdolności adhezji do komórek nabłonka jelit. Wyniki wyrażone w postaci procentowych zmian gęstości zawiesiny komórek bakterii po adhezji do zastosowanego węglowodoru przedstawiono w na wykresach 12 i 13. Powyżej 40% wartości przylegania do toluenu przyjęto jako wysoki stopień hydrofobowości komórek, zakres od 20 do 40%, jako średni, natomiast niski poziom określony został poniżej 20%.

Wyniki dotyczące oceny hydrofobowości izolatów bakterii pochodzących z treści jelitowej prosiąt wskazują na duże zróżnicowanie tego parametru. Spośród 41 przebadanych izolatów, 19 charakteryzowało się średnią i wysoką wartością

hydrofobowości od 22 do 63%. Pozostałe 22 izolaty cechowała niska wartość przylegania do toluenu, nie większa niż 10%.

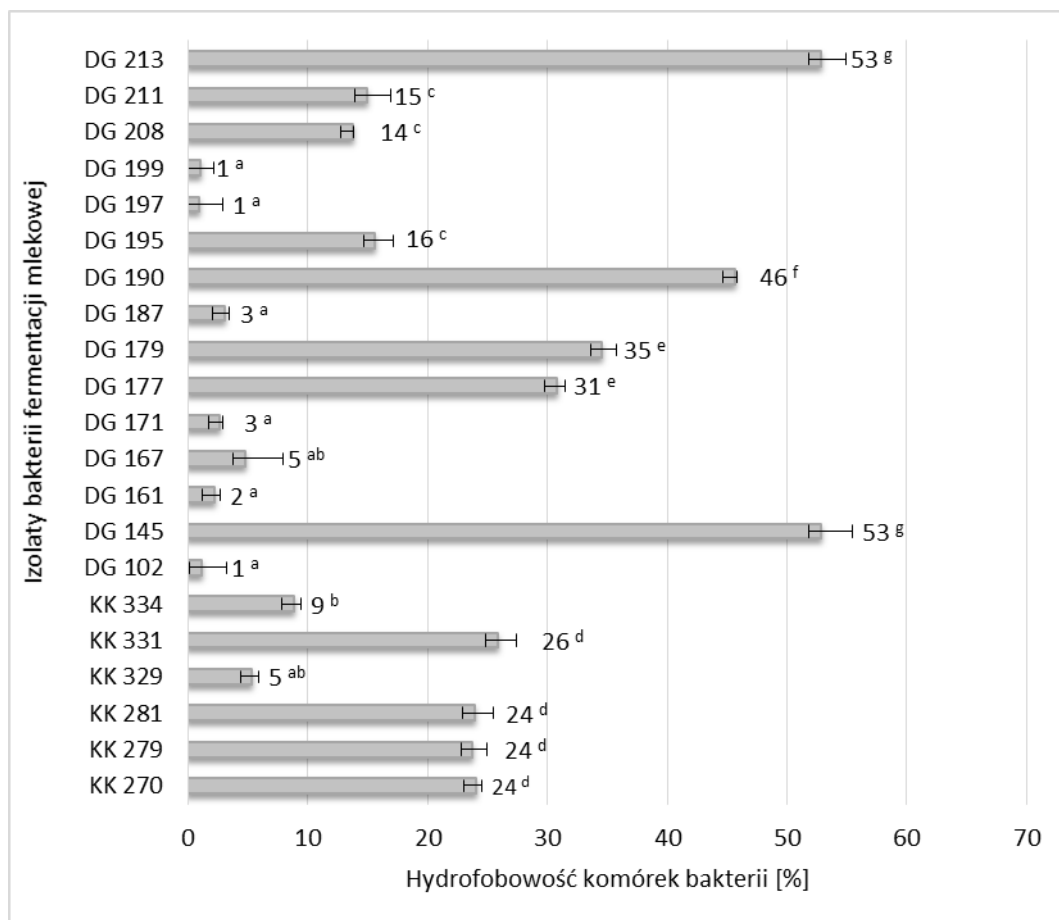


*a-m średnie oznaczone różnymi literami w słupkach różnią się statystycznie istotnie przy $p < 0,05$

Wykres 12. Procentowa wartość hydrofobowości powierzchni komórek badanych izolatów bakterii pochodzących z treści przewodów pokarmowych prosiąt

Źródło: na podstawie badań własnych

Podobne zróżnicowanie hydrofobowości komórek obserwowano w grupie izolatów bakterii fermentacji mlekowej pochodzących z jelit kurcząt. Zakres procentowej wartości stopnia przylegania komórek do węglowodoru wynosił od 1 do 53%. Jak wynika z danych na wykresie 13, w przypadku 9 izolatów odnotowano średni i wysoki stopień hydrofobowości, na poziomie od 24 do 53%. Pozostałe izolaty cechował natomiast niski poziom hydrofobowości (poniżej 16%).



*a-g średnie oznaczone różnymi literami w słupkach różnią się statystycznie istotnie przy $p < 0,05$

Wykres 13. Procentowa wartość hydrofobowości powierzchni komórek badanych izolatów bakterii pochodzących z jelit kurcząt rzeźnych

Źródło: na podstawie badań własnych

Podsumowując wyniki dotyczące wszystkich badanych izolatów, można stwierdzić, że wśród 62 badanych izolatów bakterii 33 izolaty charakteryzowały się niskim stopniem hydrofobowości, nieprzekraczającym 16%. Średni poziom hydrofobowości komórek, na poziomie od 22 do 35%, odnotowano w przypadku 18 izolatów bakterii. Z kolei

najwyższą zdolność przylegania do toluenu, wykazywało 10 izolatów. Zakres badanego parametru sięgał w tej grupie od 42 do 63%.

Hydrofobowość komórek jest często badana na etapie selekcji mikroorganizmów probiotycznych. Wysokie wartości tego parametru mogą wskazywać na większą zdolność bakterii do przylegania do komórek nabłonka, o czym wspomniano wcześniej [Rosenberg i in. 1980]. Jest to zatem istotna cecha determinująca dobór izolatów do kompozycji dodatku paszowego zawierającego bakterie potencjalnie probiotyczne, ponieważ od adhezji do śluzówki jelita zależy m.in. stymulacja układu immunologicznego. Dane literaturowe wskazują na duże zróżnicowanie poszczególnych bakterii potencjalnie probiotycznych pod względem hydrofobowości komórek, co zaobserwowano również w niniejszej pracy. Van Coillie i in. [2007] oraz Taheri i in. [2009a] stwierdzili, że hydrofobowość powierzchni komórkowej wybranych szczepów bakterii *Lactobacillus* może wynosić ponad 90%. Missotten i in. [2009] przebadali bakterie z rodzaju *Lactobacillus* pochodzące z przewodów pokarmowych świń pod względem zdolności komórek do przylegania do n-heksadekanu. Wartość hydrofobowości 10 badanych szczepów bakterii kształtowała się od 0,56% (silnie hydrofilowe) do 96,93% (silnie hydrofobowe).

Wyniki badań Raghavendra i Halami [2009] przedstawiające wartość hydrofobowości komórek dwóch szczepów bakterii *P. pentosaceus* oraz szczepu referencyjnego *L. rhamnosus* GG były zbliżone do wartości otrzymanych w niniejszej pracy. Szczepy wyizolowane z przewodów pokarmowych kurcząt i wyselekcjonowane na podstawie oceny ich właściwości funkcjonalnych, wykazywały zdolność przylegania do ksylenu w 54,6% oraz 44,8%. Zastosowany w celach porównawczych szczep referencyjny wykazywał wartość hydrofobowości na poziomie 59,0%.

Porównując wyniki z danymi literaturowymi, warto podkreślić, że fakt obserwowania w prezentowanej pracy, niższych wartości hydrofobowości komórek, w porównaniu z innymi autorami, może być związany z różnicami w hodowli bakterii oraz metodą oceny tego parametru. Warunki wzrostu mogą mieć znaczny wpływ na skład kwasów tłuszczowych w lipidach błony komórkowej bakterii, a tym samym mogą wpływać na hydrofobowość i właściwości adhezyjne [Torshizi i in. 2008]. Mishra i Prasad [2011] obserwowali natomiast różne wyniki hydrofobowości komórek 7 szczepów bakterii *L. casei* w zależności od zastosowanego związku. Ostatecznie, stwierdzili maksymalną zdolność przylegania komórek szczepu *L. casei* NCDC17 do heksadekanu, a szczepu NCDC19 do oktanu. Cztery kultury bakterii wykazały wysoką zdolność przylegania do oktanu.

W podobnych badaniach, Morata De Ambrosini i in. [1999] obserwowali wysokie powinowactwo do n-heksadekanu.

Autorzy podkreślają, że wysoka hydrofobowość może wskazywać, że szczepy bakterii z większym prawdopodobieństwem przylegać będą do nabłonka w przewodzie pokarmowym, a tym samym będą mieć większą zdolność do hamowania zasiedlania go przez patogeny. Zdarzają się jednak odmienne opinie, wskazujące na brak korelacji tych parametrów [Conway i Reginald 1989].

W prezentowanej pracy hydrofobowość komórek wykorzystano jako czynnik selekcyjny w połączeniu z innymi badanymi właściwościami. Izolaty wykorzystane do kompozycji preparatów dla zwierząt monogastrycznych wykazywały wartości hydrofobowości w zakresie od 22,44 do 52,85%.

9.3.7. Aktywność antybakteryjna wybranych izolatów po 18 miesiącach przechowywania

Izolaty bakterii fermentacji mlekowej, wybrane na podstawie oceny wrażliwości na antybiotyki, badane kolejno pod względem ich właściwości enzymatycznych, przeżywalności w warunkach przewodu pokarmowego, poddano ponownej ocenie aktywności antybakteryjnej. Powtórne badanie, po upływie 18 miesięcy od pierwszej oceny, miało na celu sprawdzenie, czy wybrane izolaty zachowały swoje właściwości pomimo pasażowania i długoterminowego przechowywania. Mniejsza liczba izolatów niż w badaniu przeprowadzonym bezpośrednio po izolacji, umożliwiła poszerzenie grupy mikroorganizmów wskaźnikowych o bakterie *A. hydrophila*, *S. flexneri*, *C. jejuni* i *P. aeruginosa*.

Wyniki badań aktywności przeciwdrobnoustrojowej zestawione zostały w tabelach 20 i 21. Ponowne określenie właściwości antybakteryjnych wykazało zbliżone oddziaływanie antagonistyczne izolatów wobec bakterii wskaźnikowych, w porównaniu z wynikami uzyskanymi we wcześniejszych oznaczeniach przeciwdrobnoustrojowych (załącznik elektroniczny, tab. 4-6). Jedynie w przypadku oddziaływania na wzrost *C. perfringens*, po okresie przechowywania, zaobserwowano znaczącą redukcję aktywności większości izolatów bakterii fermentacji mlekowej. Pośród 62 badanych izolatów wyłącznie 12 hamowało wzrost *C. perfringens* (w stopniu słabym).

Wyniki doświadczeń wykazały ponadto zróżnicowane oddziaływanie przeciwdrobnoustrojowe badanych izolatów, biorąc pod uwagę zarówno zakres ich aktywności jak i stopień inhibicji względem dodanych na tym etapie mikroorganizmów

wskaźnikowych. Bakterie *A. hydrophila* wykazywały wrażliwość na działanie 60 z 62 badanych izolatów, przy czym stopień zahamowania wzrostu wynosił od niskiego (13,33 mm) do wysokiego (21,00 mm). Wszystkie badane izolaty wykazały aktywność antagonistyczną względem *S. flexneri*, gdzie wartości stref zahamowania wzrostu wahały się od niskich (11,00 mm) do umiarkowanych (19,00 mm). Ponadto, 59 izolatów wykazało inhibicję wzrostu pałeczki *P. aeruginosa*. Stwierdzono także hamowanie wzrostu *C. jejuni* przez badane bakterie fermentacji mlekowej, gdzie w przypadku kilku izolatów zaobserwowano wysoką aktywność przeciwdrobnoustrojową. Średnice zahamowania wzrostu tej bakterii mieściły się w przedziale od ± 20 mm do ± 27 mm.

Podsumowując, przeprowadzone badania wskazują na zdolność bakterii fermentacji mlekowej do hamowania wzrostu bakterii *A. hydrophila*, *S. flexneri*, *C. jejuni* i *P. aeruginosa*. W większości przypadków aktywność antibakteryjna badanych izolatów po upływie 18 miesięcy została utrzymana, chociaż jak wspomniano, obserwowano redukcję bądź zanik aktywności w stosunku do wybranych mikroorganizmów wskaźnikowych. Jest to ważna informacja z punktu widzenia przydatności przemysłowej, co wzięto pod uwagę przy selekcji bakterii do komponowanych dodatków paszowych.

Różnice w aktywności antibakteryjnej badanych izolatów, w porównaniu z wynikami uzyskanymi przed 18 miesięcznym przechowywaniem, mogły być spowodowane adaptacją mikroorganizmów do stałych warunków hodowli. Hodowle bakterii fermentacji mlekowej prowadzone były w warunkach eliminujących czynniki generujące stresy: głodowy (deficyt składników odżywczych), kwasowy (duże stężenie końcowych metabolitów), termiczny (zmiany temperatur) jak również toksyczny (hodowla na zróżnicowanych podłożach). Tym samym mógł nastąpić zanik bądź osłabienie właściwości przeciwdrobnoustrojowych, które w naturalnych warunkach stanowią element konkurencji w ekosystemie. Reakcje bakterii na działanie czynników środowiskowych zależą bowiem od wielu mechanizmów, z których nie wszystkie są w pełni poznane. Ponadto, literatura tematyczna wskazuje, że subtelne czynniki stresowe, oddziałujące na bakterie fermentacji mlekowej mogą wpływać na zwiększenie ich aktywności i uodparnianie się na działanie trudnych warunków w procesach technologicznych i przechowywania [Jach i in. 2013].

Tabela 20. Aktywność antybakteryjna wyselekcjonowanych izolatów bakterii fermentacji mlekowej wyizolowanych z treści jelitowej prosiąt

Numer izolatu	<i>C. perfringens</i>	<i>L. monocotogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. enteritidis</i> ser. Enteritidis	<i>S. enteritidis</i> ser. Typhimurium	<i>S. marcescens</i>	<i>S. flexneri</i>	<i>Y. enterocolitica</i>
Prosięta ssące														
KK 001	0,00 ± 0,00	14,33 ± 0,94	14,33 ± 0,94	17,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	11,33 ± 0,47	17,33 ± 0,94	14,33 ± 0,94	14,67 ± 0,47	12,67 ± 0,47	15,67 ± 0,94	16,33 ± 0,94	14,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
KK 003	0,00 ± 0,00	13,00 ± 0,00	13,67 ± 0,47	18,67 ± 0,47	11,33 ± 0,94	11,33 ± 0,47	17,33 ± 0,94	15,00 ± 0,00	14,67 ± 0,47	12,00 ± 0,00	16,33 ± 0,47	15,00 ± 0,00	13,33 ± 0,94	0,00 ± 0,00
KK 008	0,00 ± 0,00	13,33 ± 0,47	15,33 ± 0,47	20,67 ± 0,47	0,00 ± 0,00	13,67 ± 0,94	18,33 ± 0,94	16,67 ± 0,47	15,00 ± 1,41	13,33 ± 0,47	18,00 ± 0,00	15,67 ± 0,47	13,67 ± 0,47	0,00 ± 0,00
KK 023	0,00 ± 0,00	13,33 ± 0,47	15,67 ± 0,47	17,00 ± 0,00	13,67 ± 0,47	12,33 ± 0,47	18,33 ± 0,94	17,67 ± 0,47	16,33 ± 0,94	14,33 ± 0,47	16,33 ± 0,47	15,67 ± 0,47	15,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
KK 026	0,00 ± 0,00	13,00 ± 0,00	15,00 ± 0,00	20,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	17,00 ± 0,00	16,00 ± 0,00	17,67 ± 0,94	12,33 ± 0,47	16,67 ± 0,47	16,00 ± 0,00	14,67 ± 0,47	0,00 ± 0,00
KK 028	0,00 ± 0,00	13,67 ± 0,47	15,00 ± 0,00	19,00 ± 1,41	10,67 ± 0,47	11,00 ± 0,00	18,00 ± 0,00	14,33 ± 0,47	17,67 ± 0,94	13,67 ± 0,47	16,33 ± 0,94	15,33 ± 0,47	13,67 ± 0,47	0,00 ± 0,00
KK 030	0,00 ± 0,00	13,33 ± 0,47	15,00 ± 0,00	18,00 ± 0,00	11,33 ± 0,94	11,00 ± 0,00	17,00 ± 0,00	15,00 ± 0,00	16,00 ± 1,41	14,00 ± 0,00	16,67 ± 0,47	15,00 ± 0,00	13,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
KK 033	0,00 ± 0,00	14,00 ± 0,00	15,33 ± 0,94	16,33 ± 0,47	11,33 ± 0,94	11,00 ± 0,00	17,00 ± 0,00	15,00 ± 0,00	16,67 ± 0,94	12,67 ± 0,94	16,67 ± 0,47	15,00 ± 0,00	13,00 ± 0,00	11,00 ± 0,00
KK 079	0,00 ± 0,00	15,33 ± 0,47	15,33 ± 0,47	17,00 ± 1,41	0,00 ± 0,00	11,33 ± 0,47	17,00 ± 0,00	15,67 ± 0,94	15,33 ± 0,47	13,33 ± 0,94	15,00 ± 0,00	14,33 ± 0,47	12,33 ± 0,47	0,00 ± 0,00
KK 202	0,00 ± 0,00	15,00 ± 0,00	14,67 ± 0,47	19,33 ± 0,94	14,33 ± 0,47	12,67 ± 0,47	17,00 ± 0,00	15,67 ± 0,94	16,00 ± 0,00	13,33 ± 0,47	15,00 ± 0,00	13,33 ± 0,47	13,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
KK 231	0,00 ± 0,00	15,33 ± 0,47	15,00 ± 0,00	18,67 ± 0,47	14,33 ± 0,94	12,33 ± 0,94	17,00 ± 0,00	14,67 ± 0,94	16,00 ± 0,00	13,00 ± 0,00	13,67 ± 0,94	13,00 ± 0,00	11,33 ± 0,47	0,00 ± 0,00
KK 234	0,00 ± 0,00	14,33 ± 0,47	15,00 ± 0,00	17,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	16,67 ± 0,47	15,00 ± 1,41	15,00 ± 0,00	12,67 ± 0,47	13,67 ± 0,94	13,00 ± 0,00	11,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
KK 235	0,00 ± 0,00	16,00 ± 0,00	15,67 ± 0,94	19,67 ± 0,47	14,00 ± 0,00	12,67 ± 0,47	15,33 ± 0,47	12,67 ± 0,94	15,33 ± 0,47	13,67 ± 0,47	12,33 ± 0,47	14,33 ± 0,94	12,33 ± 0,94	0,00 ± 0,00
KK 242	0,00 ± 0,00	14,33 ± 0,47	15,00 ± 0,00	19,33 ± 0,47	14,00 ± 0,00	12,00 ± 0,00	14,00 ± 0,00	16,67 ± 0,47	17,33 ± 0,47	13,33 ± 0,47	16,00 ± 1,41	13,67 ± 0,47	16,00 ± 0,00	11,00 ± 0,00
KK 244	0,00 ± 0,00	12,00 ± 1,41	13,67 ± 0,94	17,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	10,67 ± 0,47	12,67 ± 0,47	14,33 ± 0,47	15,33 ± 0,94	11,67 ± 0,94	15,00 ± 1,41	13,00 ± 0,00	15,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
KK 251	0,00 ± 0,00	12,67 ± 0,94	15,33 ± 0,47	18,33 ± 0,47	13,67 ± 0,94	14,00 ± 1,41	12,67 ± 0,47	15,00 ± 0,00	17,00 ± 0,00	12,00 ± 0,00	15,67 ± 0,94	14,67 ± 0,47	15,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
KK 254	0,00 ± 0,00	14,33 ± 0,47	15,00 ± 0,00	16,33 ± 0,94	12,33 ± 0,94	13,33 ± 0,94	12,67 ± 0,47	15,67 ± 0,47	15,33 ± 0,47	11,67 ± 0,47	15,33 ± 0,47	13,00 ± 0,00	15,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
KK 360	0,00 ± 0,00	16,33 ± 0,94	15,00 ± 0,00	16,33 ± 0,47	12,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	13,67 ± 0,47	15,00 ± 0,00	14,00 ± 0,00	12,33 ± 0,47	15,00 ± 0,00	12,33 ± 0,47	15,67 ± 0,47	0,00 ± 0,00
KK 362	0,00 ± 0,00	16,67 ± 0,47	14,00 ± 0,00	17,00 ± 0,00	13,67 ± 0,47	0,00 ± 0,00	13,33 ± 0,94	14,67 ± 0,47	14,00 ± 0,00	12,33 ± 0,47	12,00 ± 0,00	12,33 ± 0,47	14,33 ± 0,47	0,00 ± 0,00
KK 363	0,00 ± 0,00	15,33 ± 0,47	13,00 ± 0,00	17,33 ± 0,94	12,67 ± 0,47	0,00 ± 0,00	12,33 ± 0,94	13,33 ± 0,94	13,33 ± 0,47	13,33 ± 0,47	12,67 ± 0,47	12,33 ± 0,47	13,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
KK 364	0,00 ± 0,00	15,67 ± 0,47	13,00 ± 0,00	16,00 ± 0,00	12,67 ± 0,47	0,00 ± 0,00	12,67 ± 0,47	13,00 ± 0,00	13,67 ± 0,94	13,33 ± 0,47	15,00 ± 0,00	12,33 ± 0,47	13,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
KK 367	0,00 ± 0,00	15,33 ± 0,47	14,00 ± 0,00	16,00 ± 0,00	12,67 ± 0,47	0,00 ± 0,00	13,00 ± 0,00	13,33 ± 0,47	14,33 ± 0,47	13,33 ± 0,47	15,00 ± 0,00	13,00 ± 0,00	14,67 ± 0,47	0,00 ± 0,00
KK 380	0,00 ± 0,00	14,67 ± 0,47	13,00 ± 0,00	17,67 ± 0,47	12,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	12,33 ± 0,94	11,67 ± 0,47	14,00 ± 1,41	12,67 ± 0,94	11,00 ± 0,00	13,33 ± 0,47	14,67 ± 0,47	0,00 ± 0,00
DG 007	0,00 ± 0,00	13,00 ± 0,00	15,00 ± 0,00	20,33 ± 0,47	11,33 ± 0,47	11,33 ± 0,47	17,00 ± 0,00	17,00 ± 0,00	17,00 ± 0,00	13,33 ± 0,47	15,67 ± 0,47	13,67 ± 0,94	12,33 ± 0,94	0,00 ± 0,00
DG 059	0,00 ± 0,00	14,33 ± 0,47	0,00 ± 0,00	16,33 ± 1,89	13,00 ± 1,41	0,00 ± 0,00	14,67 ± 0,47	13,33 ± 0,47	13,67 ± 0,94	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	12,00 ± 0,00	11,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

Numer izolatu	<i>C. perfringens</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. enteritidis</i> ser. Enteritidis	<i>S. enteritidis</i> ser. Typhimurium	<i>S. marcescens</i>	<i>S. flexneri</i>	<i>Y. enterocolitica</i>
DG 068	11,00 ± 0,00	15,33 ± 0,47	16,33 ± 0,47	17,00 ± 0,00	11,00 ± 0,00	11,33 ± 0,47	16,67 ± 0,47	12,33 ± 0,47	13,67 ± 0,47	18,67 ± 0,47	16,33 ± 0,47	15,67 ± 0,47	18,33 ± 0,47	0,00 ± 0,00
DG 069	11,00 ± 0,00	16,33 ± 0,47	16,33 ± 0,47	16,00 ± 0,00	12,00 ± 0,00	11,33 ± 0,47	17,00 ± 0,00	12,67 ± 0,47	13,67 ± 0,47	19,00 ± 0,00	14,67 ± 0,47	13,33 ± 0,47	19,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
DG 071	0,00 ± 0,00	15,00 ± 0,00	11,00 ± 0,00	16,00 ± 1,41	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	13,33 ± 0,47	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	16,67 ± 0,47	15,00 ± 0,00	13,33 ± 0,47	16,67 ± 0,47	0,00 ± 0,00
DG 073	0,00 ± 0,00	16,00 ± 0,00	14,33 ± 0,47	0,00 ± 0,00	12,33 ± 0,47	10,33 ± 0,47	15,67 ± 0,47	12,67 ± 0,47	12,00 ± 0,00	17,33 ± 0,94	14,67 ± 0,94	15,00 ± 0,00	16,67 ± 0,47	0,00 ± 0,00
Prosięta odsadzone														
KK 015	0,00 ± 0,00	14,00 ± 0,00	13,67 ± 0,47	16,00 ± 0,00	12,67 ± 0,47	10,33 ± 0,47	17,33 ± 0,94	15,33 ± 0,94	13,33 ± 0,94	11,33 ± 0,47	16,00 ± 0,00	15,67 ± 0,47	12,67 ± 0,47	0,00 ± 0,00
KK 019	0,00 ± 0,00	13,67 ± 0,94	15,33 ± 0,94	17,33 ± 0,47	0,00 ± 0,00	11,67 ± 0,94	17,33 ± 0,94	15,33 ± 0,94	15,33 ± 0,94	13,00 ± 0,00	15,33 ± 0,47	15,00 ± 0,00	14,67 ± 0,47	0,00 ± 0,00
KK 043	0,00 ± 0,00	15,00 ± 0,00	15,00 ± 0,00	19,67 ± 0,47	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	17,00 ± 0,00	16,00 ± 0,00	13,67 ± 2,36	11,67 ± 0,94	16,67 ± 0,47	14,33 ± 0,47	13,33 ± 0,47	11,00 ± 0,00
KK 049	0,00 ± 0,00	12,33 ± 0,47	12,00 ± 0,00	18,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	17,00 ± 0,00	14,67 ± 0,47	12,00 ± 1,41	11,33 ± 0,47	13,67 ± 0,47	15,33 ± 0,47	12,33 ± 0,47	0,00 ± 0,00
KK 160	0,00 ± 0,00	16,00 ± 0,00	15,00 ± 0,00	21,00 ± 1,41	15,33 ± 0,47	16,67 ± 0,47	18,00 ± 0,00	15,33 ± 0,47	16,33 ± 0,47	13,67 ± 0,94	13,67 ± 0,94	14,67 ± 0,47	13,67 ± 0,94	0,00 ± 0,00
KK 344	0,00 ± 0,00	12,67 ± 0,47	13,67 ± 0,94	16,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	11,00 ± 0,00	13,67 ± 0,47	14,67 ± 0,47	15,67 ± 0,47	13,67 ± 0,47	14,67 ± 0,47	12,33 ± 0,47	13,67 ± 0,47	0,00 ± 0,00
KK 346	0,00 ± 0,00	13,67 ± 0,47	14,67 ± 0,47	16,00 ± 0,00	11,67 ± 0,47	0,00 ± 0,00	13,00 ± 0,00	12,33 ± 0,47	15,67 ± 0,94	13,67 ± 0,47	11,67 ± 0,47	13,67 ± 0,47	13,33 ± 0,47	0,00 ± 0,00
DG 013	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	10,67 ± 0,47	15,33 ± 1,89	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	16,00 ± 0,00	13,00 ± 0,00	13,33 ± 0,47	10,33 ± 0,47	14,33 ± 0,47	12,33 ± 0,47	11,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
DG 016	0,00 ± 0,00	11,67 ± 0,47	13,00 ± 0,00	15,67 ± 0,94	0,00 ± 0,00	10,67 ± 0,94	16,00 ± 0,00	15,33 ± 0,47	13,33 ± 0,47	11,00 ± 0,00	15,00 ± 0,00	13,00 ± 0,00	12,67 ± 0,47	0,00 ± 0,00
DG 017	0,00 ± 0,00	11,67 ± 0,47	14,00 ± 0,00	16,67 ± 0,94	12,00 ± 0,00	11,33 ± 0,47	16,00 ± 0,00	17,33 ± 0,47	14,67 ± 0,47	11,67 ± 0,47	15,67 ± 0,47	15,00 ± 0,00	12,67 ± 0,47	0,00 ± 0,00
DG 048	0,00 ± 0,00	12,67 ± 0,47	15,00 ± 0,00	18,00 ± 0,00	12,67 ± 0,47	0,00 ± 0,00	16,00 ± 0,00	17,33 ± 0,47	15,00 ± 0,00	12,00 ± 0,00	15,00 ± 0,00	15,00 ± 0,00	13,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
DG 236	0,00 ± 0,00	14,33 ± 0,47	13,33 ± 0,47	15,33 ± 0,47	13,67 ± 0,47	11,00 ± 0,00	12,67 ± 0,47	0,00 ± 0,00	13,67 ± 0,47	12,00 ± 0,00	11,67 ± 0,47	12,33 ± 0,47	17,00 ± 1,41	0,00 ± 0,00

Źródło: na podstawie badań własnych

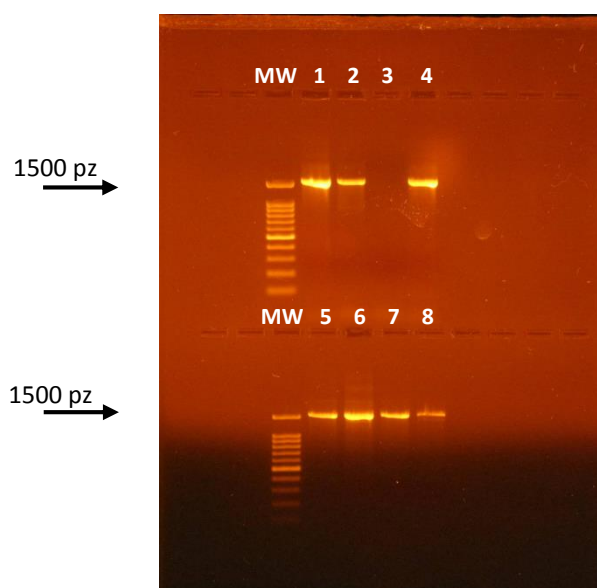
Tabela 21. Aktywność antybakteryjna 62 wyselekcjonowanych izolatów bakterii fermentacji mlekowej wyizolowanych z jelit kurcząt

Numer izolatu	<i>C. perfringens</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. enteritidis</i> ser. Enteritidis	<i>S. enteritidis</i> ser. Typhimurium	<i>S. marcescens</i>	<i>S. flexneri</i>	<i>Y. enterocolitica</i>
Kurczęta rzeźne														
KK 270	0,00 ± 0,00	14,33 ± 0,47	16,33 ± 0,47	16,33 ± 1,89	13,00 ± 1,41	11,67 ± 0,47	16,67 ± 0,47	14,33 ± 0,47	16,00 ± 0,00	11,00 ± 0,00	13,00 ± 1,41	12,00 ± 0,00	15,33 ± 0,47	0,00 ± 0,00
KK 279	0,00 ± 0,00	12,67 ± 0,47	13,33 ± 0,47	15,33 ± 0,47	0,00 ± 0,00	11,00 ± 0,00	12,00 ± 0,00	16,00 ± 1,41	16,00 ± 0,00	12,67 ± 0,47	14,67 ± 0,47	12,67 ± 0,47	14,33 ± 0,94	0,00 ± 0,00
KK 281	0,00 ± 0,00	15,33 ± 0,47	15,00 ± 0,00	17,00 ± 0,00	14,33 ± 0,47	13,67 ± 1,89	13,00 ± 0,00	14,67 ± 0,47	16,00 ± 0,00	13,00 ± 0,00	13,67 ± 0,94	14,00 ± 0,00	15,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
KK 329	11,67 ± 0,47	12,33 ± 0,47	13,00 ± 0,00	16,33 ± 0,47	12,67 ± 0,47	0,00 ± 0,00	16,67 ± 0,47	14,67 ± 0,47	16,00 ± 0,00	13,00 ± 0,00	15,00 ± 0,00	13,33 ± 0,47	14,33 ± 0,94	0,00 ± 0,00
KK 331	0,00 ± 0,00	15,33 ± 0,94	15,00 ± 0,00	17,00 ± 0,00	11,67 ± 0,47	10,33 ± 0,47	14,33 ± 0,47	14,33 ± 0,47	13,67 ± 0,94	13,67 ± 0,47	15,67 ± 0,47	13,67 ± 0,94	14,33 ± 0,94	0,00 ± 0,00
KK 334	0,00 ± 0,00	15,67 ± 0,47	14,67 ± 0,47	16,00 ± 1,41	14,67 ± 0,47	11,33 ± 0,47	14,67 ± 0,47	14,33 ± 0,94	16,67 ± 0,47	13,67 ± 0,47	14,33 ± 0,94	13,33 ± 0,47	15,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
DG 102	12,67 ± 0,47	14,67 ± 0,47	14,33 ± 0,94	17,00 ± 0,00	26,67 ± 1,89	11,33 ± 0,47	15,33 ± 0,94	15,00 ± 0,00	15,33 ± 0,47	13,00 ± 0,00	12,33 ± 0,47	14,67 ± 0,47	17,67 ± 0,47	0,00 ± 0,00
DG 145	0,00 ± 0,00	16,33 ± 0,47	14,00 ± 0,00	17,00 ± 1,41	11,33 ± 0,47	0,00 ± 0,00	15,67 ± 0,47	12,00 ± 0,00	13,00 ± 0,00	17,67 ± 1,89	14,67 ± 0,94	15,00 ± 0,00	16,67 ± 0,47	0,00 ± 0,00
DG 161	0,00 ± 0,00	14,67 ± 0,47	11,67 ± 0,94	14,33 ± 0,47	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	13,67 ± 0,47	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	15,67 ± 1,89	11,67 ± 0,94	13,33 ± 0,47	15,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
DG 167	0,00 ± 0,00	13,67 ± 0,47	15,00 ± 0,00	15,33 ± 0,94	16,33 ± 0,94	0,00 ± 0,00	17,33 ± 0,47	14,33 ± 0,47	14,33 ± 0,47	10,67 ± 0,94	12,33 ± 0,47	13,67 ± 0,47	17,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
DG 171	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	11,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	14,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	11,33 ± 0,47	0,00 ± 0,00	14,33 ± 0,47	0,00 ± 0,00
DG 177	14,00 ± 1,41	14,33 ± 0,94	11,00 ± 0,00	18,33 ± 0,47	21,00 ± 1,41	13,00 ± 0,00	16,00 ± 0,00	15,67 ± 0,47	16,00 ± 0,00	13,67 ± 0,47	12,33 ± 0,94	13,67 ± 0,47	17,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
DG 179	0,00 ± 0,00	12,67 ± 0,47	15,67 ± 0,47	13,33 ± 0,47	15,33 ± 0,94	0,00 ± 0,00	16,00 ± 0,00	13,00 ± 0,00	12,67 ± 0,47	13,00 ± 1,41	11,33 ± 0,47	12,33 ± 0,94	16,33 ± 0,47	0,00 ± 0,00
DG 187	12,00 ± 0,00	13,00 ± 0,00	12,33 ± 0,47	17,33 ± 0,94	21,33 ± 2,36	11,33 ± 0,47	16,00 ± 0,00	14,33 ± 0,47	14,33 ± 0,47	13,00 ± 0,00	12,00 ± 0,00	14,33 ± 0,94	17,33 ± 0,47	0,00 ± 0,00
DG 190	0,00 ± 0,00	13,00 ± 0,00	12,67 ± 0,94	16,33 ± 0,94	14,67 ± 0,94	11,33 ± 0,47	16,00 ± 0,00	13,33 ± 0,47	13,67 ± 0,47	11,67 ± 0,47	17,00 ± 0,00	13,00 ± 0,00	12,67 ± 0,47	0,00 ± 0,00
DG 195	0,00 ± 0,00	15,00 ± 0,00	15,00 ± 0,00	14,67 ± 0,94	15,67 ± 0,94	0,00 ± 0,00	16,67 ± 0,47	15,00 ± 0,00	14,67 ± 0,47	12,33 ± 0,47	14,33 ± 0,94	14,33 ± 0,94	13,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
DG 197	0,00 ± 0,00	11,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	14,33 ± 0,94	14,33 ± 0,47	0,00 ± 0,00	15,33 ± 0,47	12,00 ± 0,00	12,33 ± 0,94	11,00 ± 0,00	13,33 ± 0,94	11,67 ± 0,47	11,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
DG 199	12,33 ± 0,94	13,00 ± 0,00	14,33 ± 0,47	15,67 ± 0,94	15,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	17,00 ± 0,00	13,67 ± 0,94	14,33 ± 0,47	11,67 ± 0,47	13,33 ± 0,47	13,33 ± 0,47	12,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
DG 208	0,00 ± 0,00	13,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	13,00 ± 0,00	13,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	12,00 ± 0,00	12,33 ± 0,94	12,00 ± 0,00	11,33 ± 0,94	11,33 ± 0,47	14,67 ± 0,47	0,00 ± 0,00
DG 211	0,00 ± 0,00	11,00 ± 0,00	12,33 ± 0,47	14,67 ± 0,94	13,67 ± 0,94	0,00 ± 0,00	15,00 ± 0,00	12,33 ± 0,47	11,67 ± 0,47	0,00 ± 0,00	10,67 ± 0,47	11,33 ± 0,47	11,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
DG 213	12,33 ± 0,94	14,33 ± 0,47	15,67 ± 0,47	17,33 ± 0,47	20,33 ± 0,47	11,00 ± 0,00	14,33 ± 0,47	14,33 ± 0,47	15,00 ± 0,00	12,00 ± 0,00	12,67 ± 0,47	14,00 ± 0,00	14,33 ± 0,94	0,00 ± 0,00

Źródło: na podstawie badań własnych

9.4. Izolacja DNA i identyfikacja genetyczna wyselekcjonowanych bakterii.

Na podstawie selekcji przeprowadzonej w drugim etapie niniejszej pracy, wybrano 30 izolatów, które zidentyfikowano na podstawie sekwencjonowania genu kodującego 16s RNA. W tym celu przeprowadzono izolację genomowego DNA z komórek bakterii, a następnie przeprowadzono reakcje PCR w celu uzyskania zamplifikowanych fragmentów genów kodujących 16s RNA. Każdorazowo po przeprowadzonej reakcji PCR potwierdzano uzyskanie produktu reakcji o długości 1500 pz wykonując rozdział elektroforetyczny z wykorzystaniem odpowiedniego markera wielkości DNA (fot. 27).



Poszczególne tory zawierają: MW - marker wielkości fragmentów DNA; 1-8 - DNA wybranych szczepów bakterii fermentacji mlekowej (odpowiednio: KK 008, KK 033, KK 202, KK 234, KK 235, KK 363, KK 364, KK 367)

Fotografia 27. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR – widoczne fragmenty o długości 1500 pz

Źródło: wykonanie własne

Produkty PCR przekazano następnie do sekwencjonowania. Wyniki sekwencjonowania przy użyciu dwóch komplementarnych starterów 1492r oraz S-D-Bact-0008, po wstępnej edycji w programie GeneDoc 2.7.000, zostały połączone. Następnie w oparciu o bazę NCBI, przy użyciu programu BLAST, dokonano identyfikacji genetycznej poprzez porównanie otrzymanych sekwencji fragmentów o długości 1500 pz z danymi dostępnymi w bazie. Rezultaty analizy przedstawiono w tabeli 22.

Tabela 22. Analiza wyników sekwencjonowania fragmentu genu 16s RNA

Numer izolatu	Dopasowanie wygenerowane przez BLAST	Numer izolatu	Dopasowanie wygenerowane przez BLAST
Prosięta ssące		DG 013	<i>Lactobacillus paracasei</i>
KK 008	<i>Lactobacillus paracasei</i>	DG 016	<i>Lactobacillus paracasei</i>
KK 033	<i>Lactobacillus casei</i>	DG 017	<i>Lactobacillus buchneri</i>
KK 202	<i>Lactobacillus paracasei</i>	DG 236	<i>Lactobacillus casei</i>
KK 234	<i>Lactobacillus casei</i>	Kurczęta rzeźne	
KK 235	<i>Lactobacillus casei</i>	KK 270	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
KK 363	<i>Lactobacillus paracasei</i>	KK 279	<i>Lactobacillus paracasei</i>
KK 364	<i>Lactobacillus paracasei</i>	KK 281	<i>Lactobacillus casei</i>
KK 367	<i>Lactobacillus casei</i>	KK 331	<i>Lactobacillus casei</i>
KK 380	<i>Lactobacillus paracasei</i>	DG 177	<i>Lactobacillus buchneri</i>
DG 059	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	DG 179	<i>Lactobacillus paracasei</i>
DG 068	<i>Lactobacillus buchneri</i>	DG 190	<i>Lactobacillus buchneri</i>
DG 071	<i>Lactobacillus casei</i>	DG 195	<i>Lactobacillus casei</i>
DG 073	<i>Lactobacillus paracasei</i>	DG 208	<i>Lactobacillus casei</i>
Prosięta odsadzone		DG 211	<i>Lactobacillus paracasei</i>
KK 015	<i>Lactobacillus casei</i>	DG 213	<i>Lactobacillus casei</i>
KK 160	<i>Lactobacillus paracasei</i>		

- izolaty bakterii wybrane do kompozycji dodatków paszowych

Źródło: na podstawie badań własnych

Pokrycie zapytania i identyczność sekwencji w przypadku wszystkich 30 identyfikowanych izolatów wynosiły 99%. W grupie izolatów pochodzących z treści jelitowej prosiąt ssących 5, należało do gatunku *Lactobacillus casei*, 6 do *L. paracasei*, jeden do *L. buchneri* i jeden do gatunku *Pediococcus pentosaceus*. Wśród izolatów uzyskanych z próbek kału prosiąt odsadzonych, 3 wykazały najwyższą homologię do gatunku *L. paracasei*, 2 do *L. casei* i 1 do *L. buchneri*. Z 11 izolatów pochodzących z jelit kurcząt rzeźnych, aż 5 przynależało do gatunku *L. casei*, 3 do *L. paracasei*, 1 do *L. buchneri* i 1 do gatunku *L. rhamnosus*.

Jak można zauważyć, wśród wybranych izolatów dominowały *Lactobacillus casei* i *L. paracasei*. Pojedyncze izolaty należały natomiast do innych gatunków.

Zróznicowanie składu jakościowego mikrobioty jelitowej zwierząt uwarunkowane jest wieloma czynnikami m.in. gatunkiem i wiekiem, jak również warunkami środowiskowymi, przebytymi chorobami czy też wpływem stresu. Doniesienia literaturowe dotyczące izolacji i identyfikacji bakterii fermentacji mlekowej o właściwościach probiotycznych z przewodów pokarmowych zwierząt monogastrycznych potwierdzają zróżnicowanie tego ekosystemu. W większości badań, identyfikacji genetycznej poddawane są wyłącznie izolaty o określonych właściwościach funkcjonalnych. Takie wyniki

nie dają poglądu na całkowity jakościowy skład mikrobioty, informują jedynie o występowaniu poszczególnych bakterii w mikrobiomie. Musikasang i in. [2009] podobnie jak w niniejszej rozprawie podjęli się izolacji i identyfikacji bakterii fermentacji mlekowej o właściwościach probiotycznych z przewodów pokarmowych drobiu. Na podstawie wybranych właściwości funkcjonalnych z grupy 226 wyizolowanych bakterii fermentacji mlekowej, 5 izolatów zidentyfikowano genetycznie jako *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecium* (2 szczepy) oraz *Pediococcus pentosaceus*. Guo i in. [2010] spośród 485 wyizolowanych z przewodów pokarmowych świń, bakterii fermentacji mlekowej, wytypowali na podstawie badań właściwości probiotycznych 3 izolaty do identyfikacji genetycznej. Szczepy *L. salivarius* oraz *L. reuteri* zostały zaproponowane do kompozycji funkcjonalnych dodatków paszowych dla świń. De Angelis i in. [2006] zaklasyfikowali 35 izolatów bakterii wyizolowanych z odchodów prosiąt do gatunków *Lactobacillus reuteri*, *L. mucosae*, *L. plantarum*, *L. kitasatonis*, *L. rossiae*, *L. ultunensis*, *L. crispatus* i *L. intestinalis* na podstawie analizy sekwencji 16S rRNA.

Stosunkowo małe zróżnicowanie gatunkowe, stwierdzone w niniejszej pracy, było najprawdopodobniej efektem ukierunkowanej selekcji bakterii.

9.5. Kompozycja biopreparatów w oparciu o bakterie dedykowane wybranym grupom zwierząt monogastrycznych

Analiza wyników badań obejmujących wybrane właściwości funkcjonalne oraz identyfikacja genetyczna wyselekcjonowanych izolatów bakterii pozwoliły na wytypowanie 10 szczepów do kompozycji dwóch prototypów dodatków paszowych przeznaczonych dla zwierząt monogastrycznych. Ostateczna selekcja miała na celu dobór przedstawicieli różnych gatunków lub szczepów bakterii o właściwościach probiotycznych, których biologiczna aktywność mogłaby się uzupełniać wzajemnie.

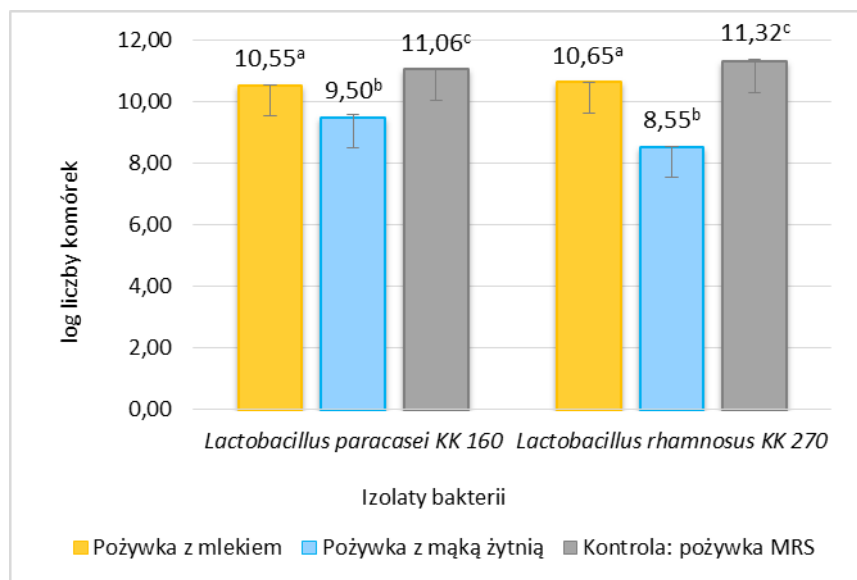
Izolaty bakterii pozyskane z przewodów pokarmowych kurcząt rzeźnych przeznaczone zostały do kompozycji dodatku dla brojlerów oraz analogicznie, szczepy bakterii pochodzące z kału prosiąt wykorzystano w składzie preparatu dedykowanego dla trzody chlewnej.

9.5.1. Opracowanie składu preparatów dedykowanych wybranym grupom zwierząt monogastrycznych

9.5.1.1. Dobór matrycy dodatku paszowego

Przeżywalność bakterii fermentacji mlekowej podczas pasażu przez przewód pokarmowy jest ściśle zależna od postaci, w jakiej podane zostaną probiotyki np. liofilizatu czy produktu fermentowanego. W tym aspekcie niezwykle istotny jest dobór nośnika oraz dodatków [Klingberg i Budde 2006; Klewicka, Śliżewska i Nowak 2014].

Odpowiednia kompozycja nośnika biomasy bakterii stwarza warunki ochronne dla bakterii fermentacji mlekowej podczas procesów utrwalania, ale także później, w trakcie pasażu w przewodzie pokarmowym. Tym samym skład podłoża zwiększa stabilność populacji szczepów, powodując, że odpowiednia liczba mikroorganizmów dostarczana jest do jelita grubego, umożliwiając uzyskanie przez organizm wymiernych korzyści zdrowotnych. W celu kompozycji podłoża stanowiącego nośnik dodatku paszowego przeprowadzono badania pilotażowe wykorzystujące dwie pożywki. W planowaniu doświadczeń wykorzystano dane literaturowe [Lyon, Sethi i Glatz 1993; Kimoto-Nira i in. 2010] oraz rezultaty badań własnych (dane niepublikowane).



*a- c średnie oznaczone różnymi literami w słupkach różnią się istotnie przy $p < 0,05$

Wykres 14. Ilościowe oznaczenie hodowli wybranych bakterii

Źródło: na podstawie badań własnych

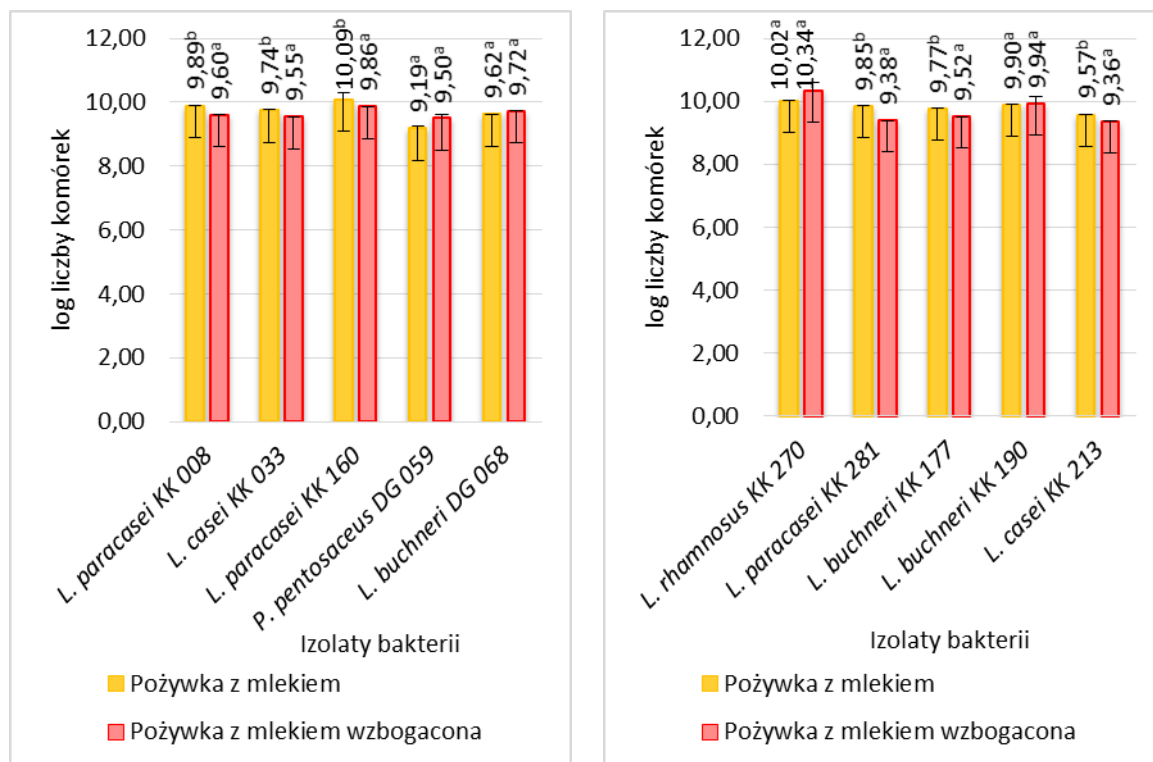
Jedna z pożywek została skomponowana na bazie mąki żytniej, natomiast druga na bazie mleka odtłuszczonego (szczegółowy skład wykorzystanych pożywek zawarty jest w punkcie

7.4.4. w rozdziale Materiały). Do badań wykorzystano dwa izolaty (*Lactobacillus paracasei* KK 160, *Lactobacillus rhamnosus* KK 270) spośród 10 wyselekcjonowanych bakterii fermentacji mlekowej (tab. 22).

Z danych zamieszczonych na wykresie 14 można zaobserwować istotne różnice we wzroście badanych szczepów na testowanych podłożach. Porównując podłoża testowe, wyższą liczebność populacji obu szczepów uzyskano na pożywce na mleku odtłuszczonym. Liczba bakterii na tej pożywce była zbliżona do liczebności w pożywce MRS. Nie stwierdzono ponadto istotnych różnic w intensywności wzrostu dwóch badanych szczepów na testowanych pożywkach. Do przygotowania preparatów wybrano zatem pożywkę opartą na mleku. Zgodnie z danymi literaturowymi, mleko zapewnia buforowanie treści żołądka i lepsze przeżycie bakterii w trakcie przejścia przez przewód pokarmowy. Z kolei zawarta w mleku laktoza stanowi substrat do wzrostu bakterii fermentacji mlekowej [Libudzisz i Klewicka 2006; Livney 2010].

Kolejnym etapem pracy nad składem podłoża był dobór dodatków zwiększających z jednej strony przeżywalność bakterii podczas procesu liofilizacji, a z drugiej w trakcie pasażu przez układ pokarmowy. Na podstawie badań Lyon, Sethi i Glatz [1993] oraz Kimoto-Nira i in. [2010] jak również analizy składu rynkowych produktów probiotycznych, podłoża do hodowli bakterii wzbogacono o 15% zawartość maltodekstryny oraz 5% trehalozy. Szczegółowy skład pożywki zawarty jest w pkt. 7.4.4. w rozdziale „Materiały”.

Wyniki posiewów ilościowych hodowli poszczególnych szczepów bakterii fermentacji mlekowej na podłożu z mlekiem bez dodatków oraz na podłożu wzbogaconym trehalozą i maltodekstryną przedstawiono na wykresach 15 i 16. Dodatek maltodekstryny i trehalozy nie wpłynął istotnie na wzrost czterech szczepów spośród badanych bakterii: *P. pentosaceus* DG 059, *L. buchneri* DG 068 oraz KK 190, *L. rhamnosus* KK 270. W pozostałych przypadkach niższą liczebność populacji zaobserwowano w próbkach hodowli na podłożu wzbogaconym. Ze względu na potencjalne właściwości ochronne, a także biorąc pod uwagę, że spadek liczebności nie był duży, dodatki te zastosowano do przygotowania preparatów przeznaczonych do liofilizacji i dalszych testów.



*a- b średnie oznaczone różnymi literami w słupkach różnią się istotnie przy $p < 0,05$

Wykresy 15, 16. Liczba bakterii (jtk/g) w hodowlach wybranych szczepów pochodzących z przewodów pokarmowych trzody chlewnej oraz kurcząt na podłożach opartych na bazie mleka odtłuszczonego

Źródło: na podstawie badań własnych

Dane literaturowe wskazują, że odpowiednio dobrane składniki podłoża mogą zmniejszyć stres związany z działaniem niekorzystnych czynników. Uznano zatem za uzasadnione wprowadzanie do podłoża, przeznaczonego do liofilizacji, dodatków pełniących funkcję ochronną. Może to bowiem wpływać stabilizująco na błonę komórkową bakterii i zapobiega jej uszkodzeniom. Podczas liofilizacji może dojść do destabilizacji lipidów w błonie komórkowej i białek, co często prowadzi do znacznej utraty żywotności bakterii [Leslie i in. 1995]. W wielu przypadkach dodatek węglowodanów i ich pochodnych są skuteczne w ochronie różnych bakterii fermentacji mlekowej. Składniki mleka oraz dodatek węglowodanów, jak laktoza i sacharoza okazały się skutecznymi substancjami ochronnymi dla różnych gatunków *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* podczas liofilizacji i przechowywania [Gagne i Roy 1993; Zayed i Roos 2004]. Kimoto-Nira i in. [2010] jak również Strasser i in. [2009] wykazali, że przeżywalność bakterii fermentacji mlekowej podczas pasażu przez przewód pokarmowy jest wyższa, kiedy dodano węglowodany do nośnika biomasy. Według Carvalho in. [2004] oraz Meng i in. [2008] mechanizm ochronnego działania sacharydów związany jest prawdopodobnie z tworzeniem wiązań wodorowych pomiędzy grupami fosforanowymi w fosfolipidach i grupami hydroksylowymi

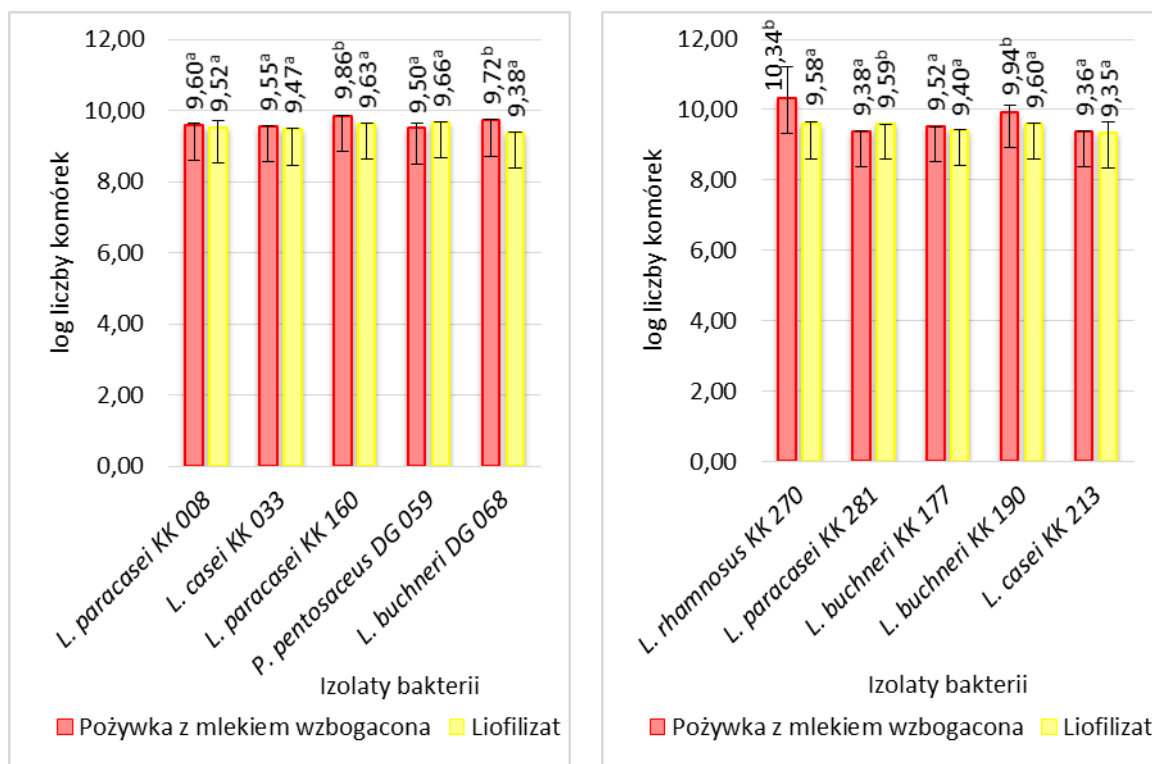
cukrów, co prowadzi do stabilizacji błony komórkowej. Poliole z kolei mogą zapobiegać uszkodzeniu oksydacyjnemu przez wymiatanie wolnych rodników [Smirnoff i Cumbes 1989]. Z kolei Carvalho i in. [2003] uzyskali wyższą przeżywalność *Enterococcus durans* i *E. faecalis* podczas liofilizacji po zastosowaniu Tween 80 i kwasu askorbinowego.

W prezentowanych badaniach w celu ochrony komórek bakterii przed niekorzystnymi czynnikami wykorzystano maltodekstrynę oraz trehalozę. Crowe, Reid i Crowe [1996] sugerowali, że trehaloza jest bardziej skuteczna niż inne cukry w ochronie suszonych materiałów biologicznych. Cukier ten bierze udział w witrifikacji, czyli tworzeniu tzw. stanu zeszklenia cytoplazmy (ang. glassy matrix), dzięki czemu cytoplazma charakteryzuje się dużą lepkością, hamując tym samym wytwarzanie kryształów podczas liofilizacji. Podobną właściwość wykazują również inne cukry, jednak uważa się, że trehaloza najefektywniej podnosi temperaturę przejścia cytoplazmy ze stanu szklistego w płynny. Obecność tego węglowodanu w błonach komórkowych znacznie obniża również temperaturę przejść fazowych lipidów, co pozwala na zachowanie struktury ciekłokrystalicznej błony pomimo braku wody [Crowe, Carpenter, i Crowe 1998; Crowe 2002].

9.5.1.2. Przeżywalność bakterii fermentacji mlekowej podczas procesu liofilizacji

W prezentowanej pracy do przygotowania preparatów bakteryjnych stanowiących prototypy dodatków paszowych wykorzystano liofilizację. Jest to proces powszechnie stosowany do długoterminowego przechowywania próbek biologicznych. Liofilizacja ma na celu usunięcie wody z zamrożonego produktu na skutek procesu sublimacji lodu, przy jednoczesnym pominięciu fazy ciekłej, dzięki czemu mikroorganizmy są w mniejszym stopniu narażone na uszkodzenia. Suszenie sublimacyjne (molekularne), przebiega w warunkach ujemnej temperatury oraz obniżonego ciśnienia. Produkt otrzymywany w ten sposób charakteryzuje się zwykle długą żywotnością i wysoką jakością, gdyż możliwość wystąpienia niepożądanych reakcji (np. utleniania, zmian chemicznych lub aktywność drobnoustrojów) jest zminimalizowana. Niemniej jednak w trakcie liofilizacji komórki, narażone na ekstremalne warunki środowiskowe, takie jak niska temperatura i niska aktywność wody, mogą ulec uszkodzeniu. Może to prowadzić do spadku żywotności, dlatego szczególnie ważne jest opracowanie nośnika biomasy, co zostało wcześniej wykonane.

Liofilizacji poddano hodowle poszczególnych szczepów bakterii, prowadzone oddzielnie. Zmiany w liczebności populacji badanych izolatów bakterii fermentacji mlekowej na pożywce z mlekiem wzbogaconej maltodekstryną i trehalozą przed oraz po procesie liofilizacji zestawiono na wykresach 17 i 18.



*a- b średnie oznaczone różnymi literami w słupkach różnią się istotnie przy $p < 0,05$

Wykresy 17, 18. Liczba bakterii przed i po procesie liofilizacji hodowli wybranych szczepów pochodzących z przewodów pokarmowych trzody chlewnej oraz kurcząt

Źródło: na podstawie badań własnych

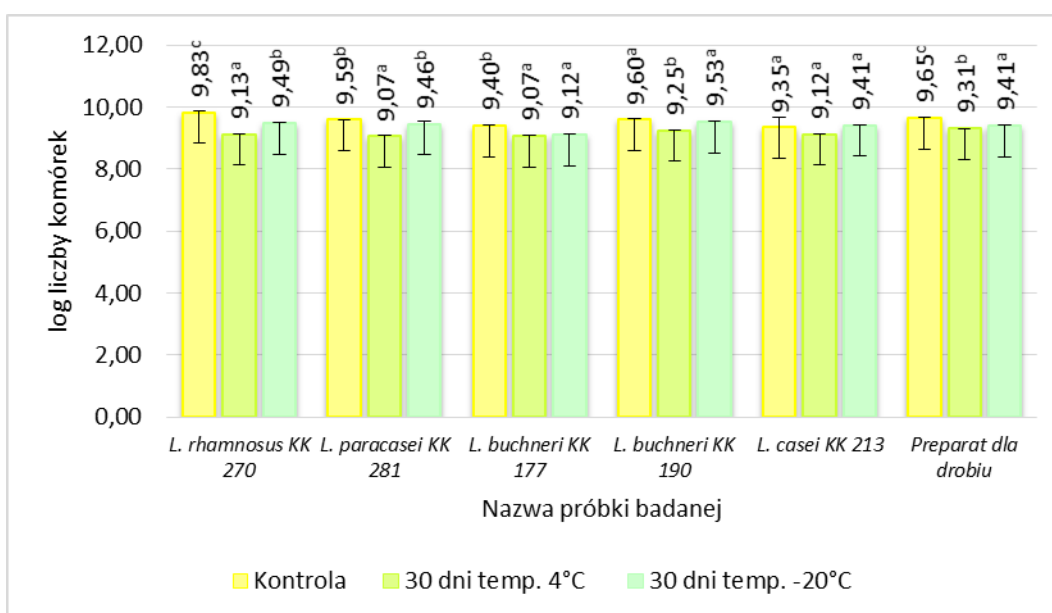
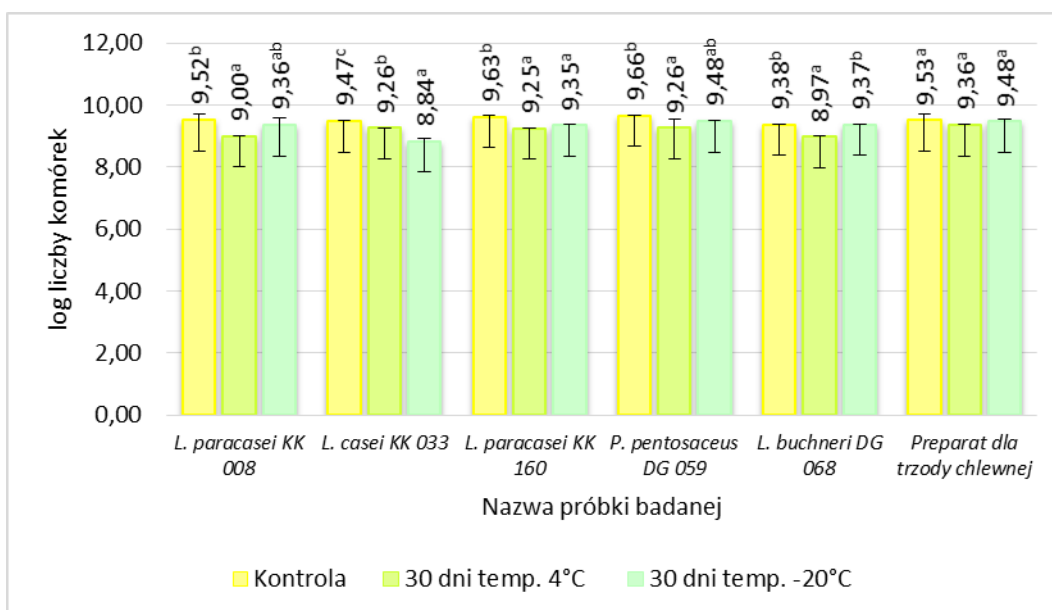
W przypadku 5 badanych izolatów nie zaobserwowano istotnych różnic w populacji bakterii przed i po przeprowadzonym procesie liofilizacji. Cztery szczepy bakterii okazały się bardziej wrażliwe na proces utrwalania. Największy spadek liczebności populacji zaobserwowano w próbkach *L. rhamnosus* KK 270, z $2,2 \times 10^{10}$ jtk/cm³ do poziomu $6,7 \times 10^9$ jtk/cm³. W pozostałych próbkach różnica była niewielka i wynosiła od 0,23 do 0,34 jednostek logarytmicznych. Wyjątek stanowił szczep bakterii *L. paracasei* KK 281, w przypadku którego liczebność populacji zwiększyła się po procesie utrwalania. Badane bakterie wykazywały wysoką przeżywalność podczas liofilizacji, jest to cecha pożądana, ponieważ miarą gwarancji aktywności prozdrowotnej zastosowanych bakterii jest odpowiednia liczba żywych komórek w oferowanym produkcie. Wysoka liczebność

populacji bakterii w liofilizowanym produkcie świadczy ponadto o dobrym doborze podłoża.

Podobnie, wysoką przeżywalność bakterii fermentacji mlekowej podczas procesu liofilizacji, po zachowaniu odpowiedniego składu podłoża, stwierdzali inni autorzy. W badaniach Wang in. [2004] procent przeżycia *S. thermophilus* po liofilizacji w fermentowanym mleku sojowym kształtował się na poziomie 74,7 - 75,1% z redukcją populacji tylko o 0,12 - 0,13 log jtk/g. Autorzy obserwowali zróżnicowaną przeżywalność w zależności od gatunku bakterii. Bakterie *S. thermophilus* wykazywały wyższą przeżywalność w porównaniu z *L. acidophilus*, a *B. longum* lepszą niż *B. infantis*. W badaniach Julean i in. [2014] mających na celu kompozycję dodatku paszowego dla drobiu, określano przeżywalność bakterii *L. lactis*, *L. paracasei* oraz *L. rhamnosus* podczas procesu liofilizacji. Izolaty pochodzące od ludzi poddano hodowli na podłożu MRS z dodatkiem 20% roztworu odtłuszczonego mleka (1:1). Wyniki wskazują na pozytywny wpływ dodatku mleka do podłoża oraz dobrą stabilność podczas procesu utrwalania, ponieważ liczebność populacji bakterii po procesie wynosiła ponad 83%. Uroic i in. [2014] przeprowadzili ocenę przeżywalności 11 szczepów bakterii fermentacji mlekowej z rodzajów *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* oraz *Leuconostoc* podczas procesu liofilizacji. Badania polegały na określeniu ochronnego oddziaływania 5% dodatku odtłuszczonego mleka, inuliny lub fruktooligosacharydów do nośnika, który stanowił bufor fosforanowy (kompozycja bezpośrednio przed procesem utrwalania). Najwyższą przeżywalność pięciu izolatów bakterii zaobserwowano wykorzystując nośnik z inuliną, trzech izolatów na podłożu z odtłuszczonym mlekiem oraz trzech w nośniku z dodatkiem fruktooligosacharydów. Z kolei Strasser i in. [2009] badali wpływ dodatku węglowodanów: glukozy, trehalozy, sacharozy lub maltodekstryny na przeżywalność bakterii *Enterococcus faecium* i *Lactobacillus plantarum* po procesie liofilizacji. Naukowcy zaobserwowali zmniejszenie się populacji bakterii *E. faecium* w próbkach liofilizatów hodowli bez dodatków, natomiast wszystkie badane węglowodany wpływały podobnie (ok. 83,4%) na przeżywalność badanego szczepu po procesie liofilizacji. Bakterie *L. plantarum* okazały się bardziej wrażliwe na proces liofilizacji. Spośród zastosowanych dodatków, najwyższą przeżywalność uzyskano po zastosowaniu trehalozy.

9.5.1.3. Stabilność podczas przechowywania liofilizowanych hodowli bakterii

Ważnym parametrem określającym technologiczną przydatność mikroorganizmów jest stabilność populacji podczas przechowywania. Próbki hodowli wybranych 10 szczepów bakterii fermentacji mlekowej poddane liofilizacji, a także preparaty przygotowane poprzez zmieszanie liofilizowanych hodowli odpowiednich szczepów, osobno dla trzody chlewnej i dla drobiu, przechowywano w temperaturze 4°C oraz -20°C przez 30 dni. Po upływie tego czasu próbki badano w celu określenia liczebności populacji bakterii fermentacji mlekowej i określenia ich stabilności. Wyniki doświadczenia przedstawiono na wykresach 19 i 20.



*a- c średnie oznaczone różnymi literami w słupkach różnią się istotnie przy $p < 0,05$

Wykresy 19, 20. Liczba bakterii w liofilizowanych hodowlach poszczególnych szczepów oraz preparatach dla trzody chlewnej i kurcząt rzeźnych

Źródło: na podstawie badań własnych

Z danych przedstawionych na wykresie wynika, że większy spadek liczby bakterii zarówno w liofilizowanych hodowlach jak i preparatach odnotowano w trakcie przechowywania w temperaturze 4°C niż -20°C. Zaobserwowano przy tym istotne statystycznie różnice pomiędzy poszczególnymi wariantami. Zasadniczo jednak, liczebność populacji badanych bakterii po liofilizacji oraz po 30 dniach przechowywania utrzymywała się na poziomie porównywalnym.

Badania wskazują, że warunki przechowywania mają kluczowe znaczenie dla przeżywalności komórek liofilizowanych. Stabilność wysuszonych próbek najczęściej zmniejsza się podczas przechowywania, jednak zależy to od różnych czynników: temperatury, atmosfery, działania światła i wilgotności względnej powietrza. Zwykle wyższą przeżywalność mikroorganizmów w preparatach liofilizowanych notuje się w niższych temperaturach przechowywania [Abadias i in. 2001]. Dlatego w niniejszej pracy zastosowano warunki chłodnicze oraz zamrażanie, jako najlepsze opcje przechowywania liofilizatów. Konieczność zachowania odpowiedniej liczebności populacji bakterii w podawanym produkcie jest niezbędna w celu uzyskania właściwości prozdrowotnych, dlatego wielu autorów ocenia ten parametr podczas opracowywania formuły preparatu zawierającego probiotyczne bakterie. Strasser i in. [2009] oznaczali wpływ dodatku trehalozy, sacharozy, maltodekstryny oraz glukozy na przeżywalność liofilizatów bakterii *Enterococcus faecium* i *Lactobacillus plantarum* podczas przechowywania w temperaturach 4, 22 oraz 35°C przez okres 6 miesięcy. Podobnie, jak w niniejszej pracy, zaobserwowano wysoką stabilność liofilizowanych próbek badanych bakterii skomponowanych z trehalozą po okresie 30 dni przechowywania w temperaturze 4°C. Dane literaturowe wskazują, że różne gatunki i szczepy mogą wykazywać różny stopień przeżywalności podczas przechowywania w stanie suchym. Autorzy sugerują, że na przeżycie w czasie zamrażania i liofilizacji może wpływać m.in. wielkość komórek bakteryjnych [Bazoglu i in. 1987; Fonseca i in. 2000]. Według Fonseca i in. [2000] im większa powierzchnia komórki, tym większe może powstać uszkodzenie błony z powodu tworzenia się kryształków lodu pozakomórkowego w czasie zamrażania. Biorąc pod uwagę różnice przeżywalności pomiędzy poszczególnymi szczepami, niektórzy autorzy uważają, że może do tego prowadzić transfer genów pomiędzy szczepami.

Nieustanny rozwój metod i technik utrwalania tych produktów sprawia, że niektórzy autorzy sięgają po niekonwencjonalne rozwiązania. W badaniach prowadzonych

przez Denkova, Georgieva i Denkova [2014], komponowano liofilizowane preparaty zawierające w swoim składzie szczepy bakterii *L. acidophilus*, *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* oraz *Bifidobacterium* sp.. Innowacyjność podejścia polegała na wykorzystaniu hydrokolidów pochodzenia roślinnego do kompozycji matryc żywieniowych. Liofilizowany preparat, otrzymany po zastosowaniu hydrokolidowej matrycy złożonej z alginianu sodu i pektyny jabłkowej, zawierał wysoką liczebność żywych komórek bakterii, zarówno po procesie liofilizacji (ok. 10^{10} jtk/g) jak i po 12 miesiącach przechowywania w temperaturze 20°C (ok. 10^9 jtk/g).

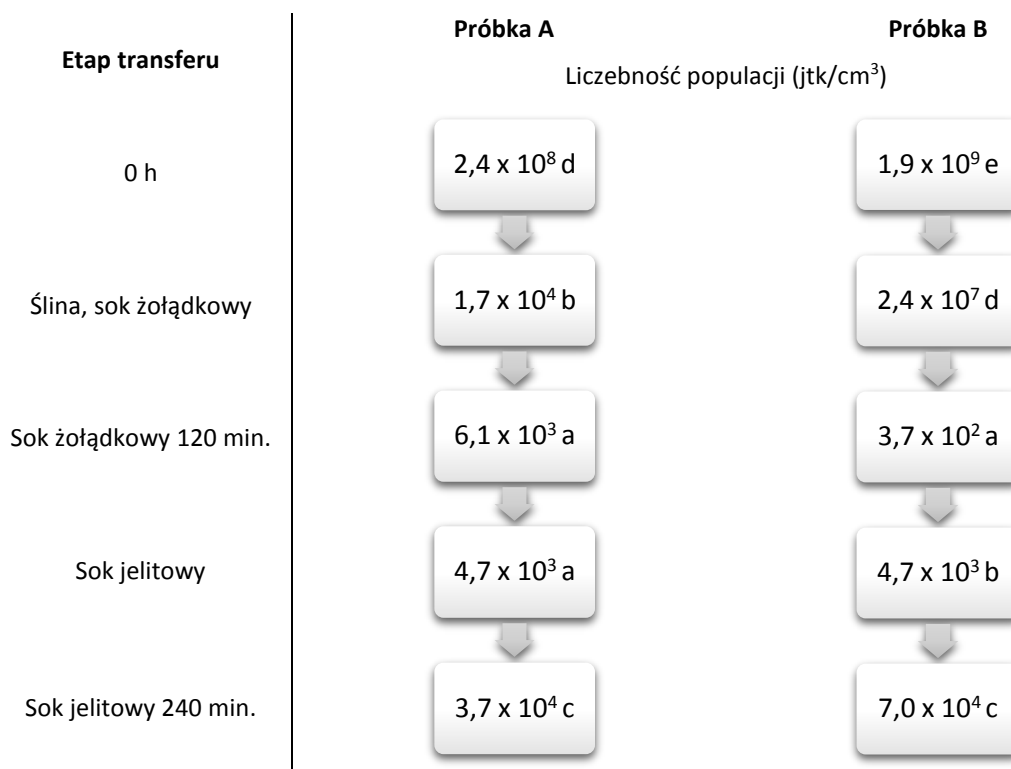
W kontekście przeżywalności, obserwowanej przez innych autorów, warto podkreślić, że stopień przeżywalności, uzyskany w niniejszej pracy po procesie liofilizacji i 30 dniowym okresie przechowywania można uznać za satysfakcjonujący.

9.5.2. Ocena przeżywalności bakterii w przygotowanych prototypach dodatków paszowych w symulowanym układzie pokarmowym

Zróznicowane i w większości niekorzystne warunki panujące w poszczególnych częściach układu pokarmowego wpływają na liczebność oraz rodzaj mikrobioty obecnej w danym środowisku. Skomponowane prototypy dodatków paszowych przeznaczone dla trzody chlewnej oraz drobiu zostały poddane pasażowaniu w przewodach pokarmowych w warunkach *in vitro*. Warunki doświadczeń zbliżone były do tych panujących w przewodach pokarmowych zwierząt monogastrycznych.

9.5.2.1. Ocena przeżywalności bakterii w prototypie dodatku paszowego dla trzody chlewnej w symulowanym układzie pokarmowym

Próbki paszy z dodatkiem liofilizowanego preparatu bakteryjnego oraz sam preparat skomponowany z odpowiednio dobranych szczepów bakterii poddawano działaniu kolejnych roztworów symulujących ślinę, sok żołądkowy i sok jelitowy. Wyniki doświadczenia przedstawiono na rysunku 5.



*a- e średnie oznaczone różnymi literami w słupkach różnią się istotnie przy $p < 0,05$

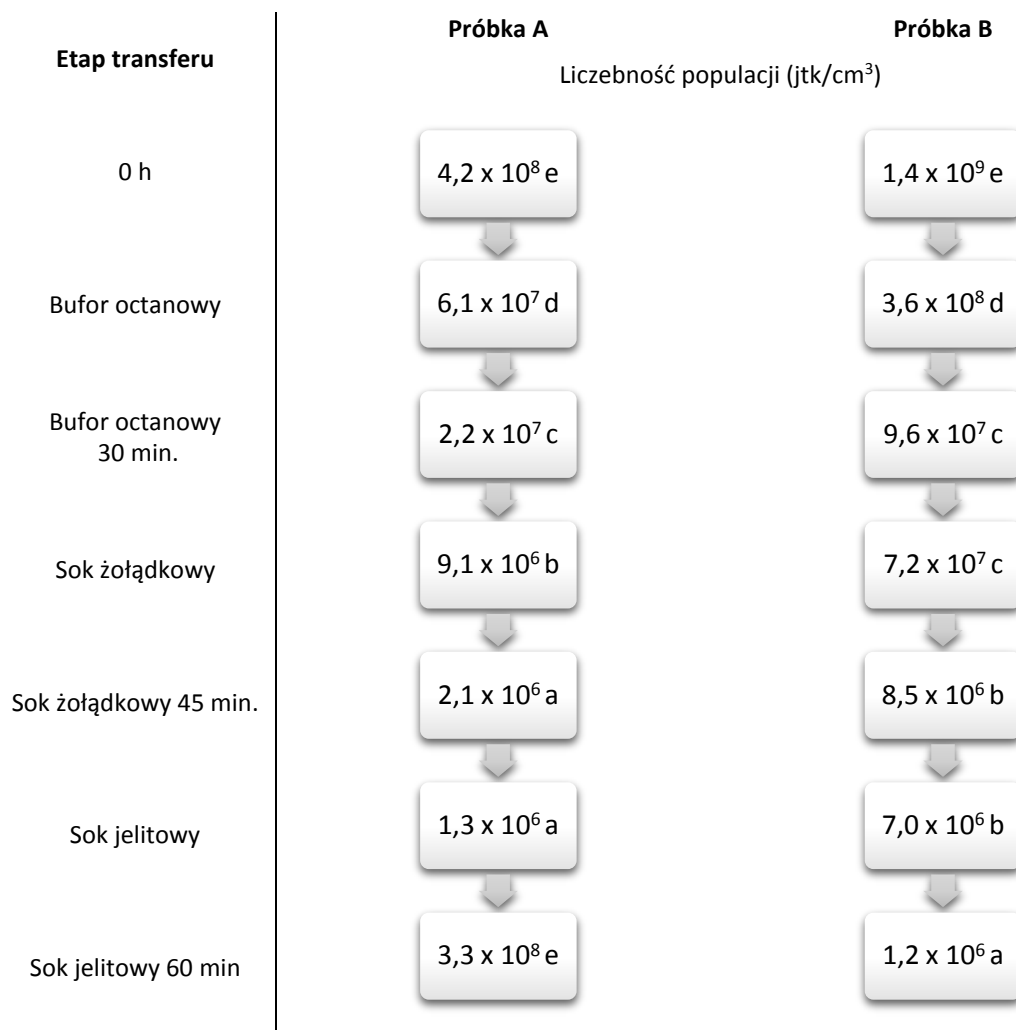
Rysunek 6. Liczba bakterii podczas pasażu paszy z dodatkiem preparatu (próbka A) i preparatu (próbka B) przez modelowy układ trawienia *in vitro* trzody chlewnej

Źródło: na podstawie badań własnych

Początkowa liczba bakterii różniła się o jedna jednostkę logarytmiczną, co wynikało z faktu, że próbka A była mieszanką paszy i liofilizowanego preparatu bakterii, podczas gdy próbkę B stanowił bezpośrednio preparat. Po kilkuminutowym działaniu śliny i dodaniu soku żołądkowego, liczebność bakterii spadała drastycznie. Spadek liczby żywych komórek był większy w próbce A, gdzie odnotowano ilość o 4 jednostki logarytmiczne niższą w stosunku do wartości początkowej. W próbce B spadek liczby bakterii wynosił 3 jednostki logarytmiczne. Po dwóch godzinach działania soku żołądkowego, obserwowano dalszy spadek liczebności populacji w obu próbkach, przy czym w próbce B liczba bakterii spadła aż o 3 jednostki logarytmiczne, a w próbce A, tylko o jedną. Po zmianie środowiska na sok jelitowy, liczba bakterii zrównała się w obu próbkach. Oznaczało to zarazem wzrost liczebności w próbce B, podczas gdy w próbce z paszą parametr ten utrzymywał się na porównywalnym poziomie. Po kolejnych 3 godzinach inkubacji w soku jelitowym odnotowano istotny wzrost liczby bakterii zarówno w preparacie, jak i paszy zmieszanej z preparatem. W obu przypadkach liczebność populacji kształtowała się na poziomie 10⁴ jtk/cm³: w próbce A 3,3 x 10⁴ jtk/cm³, w próbce B 7,0 x 10⁴ jtk/cm³.

9.5.2.2. Ocena przeżywalności bakterii w prototypie dodatku paszowego dla kurcząt rzeźnych w symulowanym układzie pokarmowym

Próbki paszy z dodatkiem preparatu bakteryjnego oraz sam preparat skomponowany z odpowiednio dobranych szczepów bakterii poddawano trawieniu enzymatycznemu w warunkach *in vitro*: roztworem pepsyny imitującym trawienie w żołądku oraz roztworem pankreatyny, symulującym trawienie w jelicie cienkim. Wyniki doświadczenia przedstawiono na rysunku 7.



*a- e średnie oznaczone różnymi literami w słupkach różnią się istotnie przy $p < 0,05$

Rysunek 7. Liczba bakterii podczas pasażu paszy z dodatkiem preparatu (próbka A) i preparatu (próbka B) przez modelowy układ trawienia *in vitro* drobiu

Źródło: na podstawie badań własnych

Początkowa liczba bakterii w próbkach A i B różniła się o jedną jednostkę logarytmiczną, podobnie jak w przypadku badań z preparatem dla trzody chlewnej. W ciągu 30 minut w buforze octanowym imitującym środowisko wola, liczebność populacji została istotnie zredukowana, o około 0,4 jednostki logarytmicznej. Dalszy spadek liczby żywych komórek

odnotowano po zastosowaniu roztworu pepsyny, przy czym większe zmiany były widoczne w próbce A. Ostatecznie, w środowisku symulującym jelito cienkie, liczba bakterii spadła do $1,2 \times 10^6$ jtk/cm³, podczas gdy w paszy z dodatkiem preparatu obserwowano przyrost liczby bakterii do $3,3 \times 10^8$ jtk/cm³ wzrosła z poziomu $1,6 \times 10^6$ do $3,3 \times 10^8$ jtk/cm³. Warto zauważyć, że w próbce zawierającej paszę z dodatkiem preparatu liczba bakterii w jelitach wzrosła do poziomu porównywalnego z liczebnością populacji na początku transferu.

W celu wywarcia korzystnego wpływu na organizm gospodarza, przyjmuje się, że bakterie probiotyczne muszą być żywe w konsumowanej żywności czy paszach, jak również w wystarczająco dużej liczbie dotrzeć do jelita grubego w celu ułatwienia kolonizacji i proliferacji [Shah 2000]. Na przeżywalność w przewodzie pokarmowym może wpłynąć wiele czynników, w tym zmiany pH na poszczególnych odcinkach, obecność soli żółciowych czy enzymów trawiennych [Pitino i in. 2010]. Większość badań dotyczących przeżywalności bakterii fermentacji mlekowej w niskim pH lub w obecności soli żółciowych jest przeprowadzana w osobnych doświadczeniach. Jednak badanie możliwości przeżycia bakterii w modelu obejmującym warunki panujące w żołądku i jelitach pozwala na uzyskanie pełnej wiedzy w zakresie tolerancji czynników wpływających negatywnie na badane szczepy. Może się bowiem zdarzyć, że pomimo redukcji liczebności bakterii w soku żołądkowym, co jest najczęściej obserwowane, mogą one wystarczająco licznie przetrwać transfer przez sok jelitowy. Może też być tak, że redukcja liczebności populacji będzie następowała zarówno w warunkach symulujących żołądek jak i jelito cienkie, co wykluczyłoby taki mikroorganizm z dalszych badań. W niniejszej pracy, przeprowadzono osobne doświadczenia w zakresie tolerancji niskiego pH i soli żółciowych na etapie skryningu 62 izolatów bakterii fermentacji mlekowej, jednak opracowane preparaty dla trzody chlewnej i drobiu, poddano pasażowi przez symulowany przewód pokarmowy odpowiednio dobrany do rodzaju zwierząt. Uzyskane wyniki wykazały dobrą przeżywalność bakterii obecnych w preparatach. Pomimo spadku przeżywalności podczas pasażu przez symulowany sok żołądkowy, liczba bakterii wzrastała w kolejnych odcinkach przewodu pokarmowego. Podobne obserwacje opisywali inni autorzy. Przykładowo, Guerra i in. [2007] badali przeżywalność czterech potencjalnie probiotycznych szczepów, w tym *P. acidilactici*, *E. faecium*, *L. lactis* i *L. casei* podczas transferu przez symulowany przewód pokarmowy. We wszystkich przypadkach obserwowano zmniejszenie liczby żywych komórek podczas przejścia przez żołądek. Natomiast po 180 min transferu, zarówno przez

część żołądkową jak i jelitową, przeżywalność bakterii kształtowała się na poziomie przekraczającym 2×10^6 jtk /cm³.

Przeżywalność bakterii może również zależeć od postaci, w jakiej są podawane biorąc pod uwagę zarówno formę utrwalenia, jak i rodzaj matrycy, w której są spożywane [Klingberg i Budde 2006]. Stwierdzono, że przeżywalność bakterii fermentacji mlekowej w żołądku może wzrosnąć w obecności produktów żywnościowych, które mają wpływ na wartość pH i mogą chronić komórki przed wpływem pepsyny i kwasu w żołądku [Bergamini i in. 2005]. Pinto i in. [2006] podjęli się określenia przeżywalności bakterii *L. johnsonii* oraz *L. plantarum* podczas pasażu przez roztwory śliny, soku żołądkowego i soków jelitowych. Wyniki badań *in vitro* wykazały, że zastosowanie odtłuszczonego mleka jako nośnika komórek zwiększyło odporność badanych szczepów bakterii na działanie niekorzystnych warunków towarzyszących pasażowaniu przez przewód pokarmowy. Podobnie, Lo Curto i in. [2011] stwierdzili wyższą przeżywalność trzech probiotycznych szczepów *Lactobacillus casei* ssp. *shirota*, *L. casei* ssp. *immunitas* i *L. acidophilus* ssp. *johnsonii* w symulowanym przewodzie pokarmowym, kiedy były podawane pasażowaniu w mleku w porównaniu z wodą jako nośnikiem. W niniejszej pracy nie obserwowano jednak dużego wpływu matrycy, chociaż w niektórych odcinkach symulowanego przewodu pokarmowego, zarówno trzody chlewnej jak i drobiu, można było zauważyć większą stabilność populacji w obecności paszy.

10. Charakterystyka szczepów bakterii fermentacji mlekowej wykorzystanych do kompozycji dodatków paszowych

Wyniki doświadczeń laboratoryjnych przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy, otrzymane dla 10 wyselekcjonowanych szczepów bakterii, zestawiono w tabelach 23 i 24. Obrazy mikroskopowe komórek wszystkich izolatów przedstawiono na fotografiach 28-37. W tabelach zebrano wszystkie informacje dotyczące wybranych szczepów, które uzyskano na podstawie kolejnych etapów selekcji w celu przedstawienia pełnej charakterystyki każdego mikroorganizmu.

W składzie opracowanego w pracy preparatu, proponowanego do suplementacji trzody chlewnej, znalazły się bakterie: *Lactobacillus paracasei* KK 008, *Lactobacillus casei* KK 033, *Lactobacillus paracasei* KK 160, *Pediococcus pentosaceus* DG 059 i *Lactobacillus buchneri* DG 068 (tab. 23). Wszystkie bakterie wykazywały szeroki zakres aktywności antybakteryjnej, przy czym tylko *L. casei* KK 033 hamował rozwój bakterii *Y. enterocolitica*,

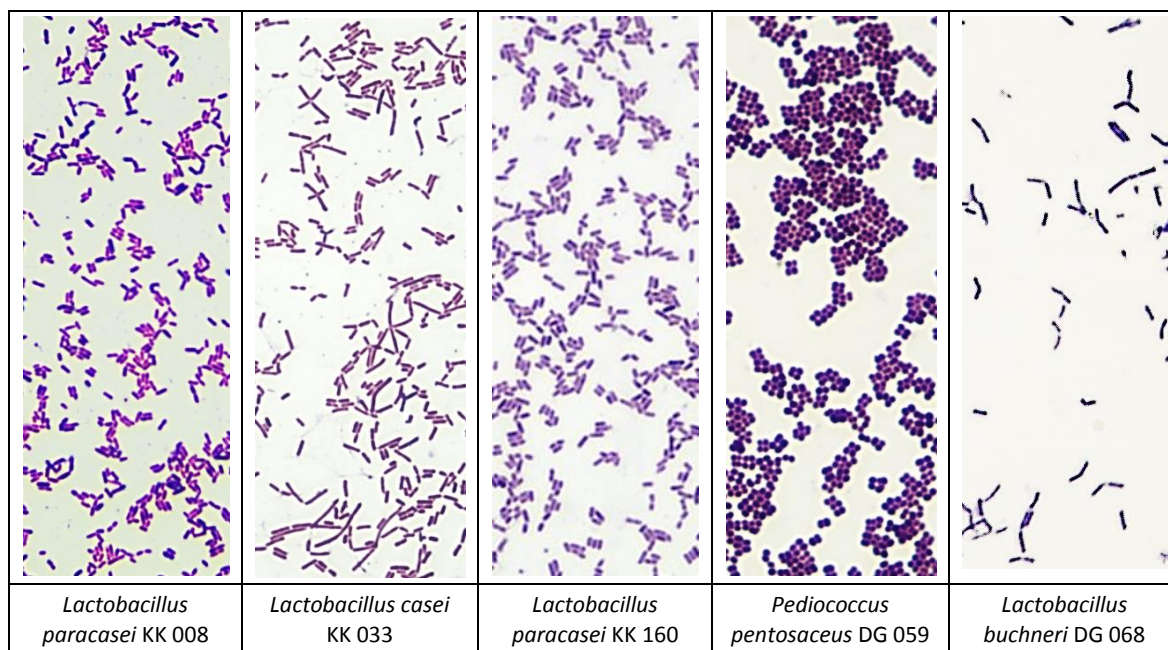
a *P. pentosaceus* wykazał aktywność wobec *C. perfringens*. Badane szczepy wykazywały wysoką lub średnią wrażliwość na działanie 8 z 9 badanych antybiotyków (w badanych stężeniach), za wyjątkiem wankomycyny. Aktywność proteolityczną wykazywały wszystkie szczepy, natomiast amylolityczną tylko dwa: *L. paracasei* KK 008 oraz KK 160. Produkcja kwasu mlekowego przez badane bakterie wynosiła od 15,15 do 31,69 mg/cm³. Wybrane izolaty charakteryzowały się dobrą tolerancją niskiego pH podłoża oraz soli żółciowych. Możliwość adhezji do nabłonka oszacowano wstępnie na podstawie oceny hydrofobowości komórek na poziomie od 22 do 42%. Wszystkie badane szczepy wykazywały dobrą przeżywalność w procesie liofilizacji i podczas 30 dniowego przechowywania w temperaturze 4 i -20°C, jak również podczas pasażu w symulowanym przewodzie pokarmowym *in vitro*.

Tabela 23. Zestawienie wyników badań wybranych szczepów bakterii przeznaczonych do kompozycji dodatku paszowego dla trzody chlewnej

Opis	<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>Lactobacillus buchneri</i>
Numer izolatu	KK 008	KK 033	KK 160	DG 059	DG 068
Pochodzenie Numer próbki	Prosię ssące Próbka nr. 1.3	Prosię ssące Próbka nr. 1.3	Prosię odsadzone Próbka nr. 2.1	Prosię ssące Próbka nr. 1.6	Prosię ssące Próbka nr. 1.5
Katalaza	-	-	-	-	-
Morfologia	Gram- dodatnie	Gram- dodatnie	Gram- dodatnie	Gram- dodatnie	Gram- dodatnie
	pałeczki, b. krótkie	pałeczki, średnia długość	pałeczki, b. krótkie	ziarniaki	pałeczki, średnia długość
Układ	nieregularny, tetrazy	nieregularny, Y, łańcuszki	palisady	tetrazy	nieregularny, Y
Właściwości antybakteryjne					
- <i>Clostridium perfringens</i>	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	11,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
- <i>Listeria monocytogenes</i>	13,33 ± 0,47	14,00 ± 0,00	14,33 ± 0,47	15,33 ± 0,47	16,00 ± 0,00
- <i>Staphylococcus aureus</i>	15,33 ± 0,47	15,33 ± 0,94	0,00 ± 0,00	16,33 ± 0,47	15,00 ± 0,00
- <i>Aeromonas hydrophila</i>	20,67 ± 0,47	16,33 ± 0,47	16,33 ± 1,89	17,00 ± 0,00	21,00 ± 1,41
- <i>Campylobacter jejuni</i>	0,00 ± 0,00	11,33 ± 0,94	13,00 ± 1,41	11,00 ± 0,00	15,33 ± 0,47
- <i>Enterobacter aerogenes</i>	13,67 ± 0,94	11,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	11,33 ± 0,47	16,67 ± 0,47
- <i>Escherichia coli</i>	18,33 ± 0,94	17,00 ± 0,00	14,67 ± 0,47	16,67 ± 0,47	18,00 ± 0,00
- <i>Proteus vulgaris</i>	16,67 ± 0,47	15,00 ± 0,00	13,33 ± 0,47	12,33 ± 0,47	15,33 ± 0,47
- <i>Pseudomonas aruginosa</i>	15,00 ± 1,41	16,67 ± 0,94	13,67 ± 0,94	13,67 ± 0,47	16,33 ± 0,47
- <i>Salmonella enterica</i> ser. Enteritidis	13,33 ± 0,47	12,67 ± 0,94	0,00 ± 0,00	18,67 ± 0,47	13,67 ± 0,94
- <i>Salmonella enterica</i> ser. Typhimurium	18,00 ± 0,00	16,67 ± 0,47	0,00 ± 0,00	16,33 ± 0,47	13,67 ± 0,94
- <i>Serratia marcescens</i>	15,67 ± 0,47	15,00 ± 0,00	12,00 ± 0,00	15,67 ± 0,47	14,67 ± 0,47
- <i>Shigella flexneri</i>	13,67 ± 0,47	13,00 ± 0,00	11,00 ± 0,00	18,33 ± 0,47	13,67 ± 0,94
- <i>Yersinia enterocolitica</i>	0,00 ± 0,00	11,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

Opis	<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>Lactobacillus buchneri</i>
Numer izolatu	KK 008	KK 033	KK 160	DG 059	DG 068
Wrażliwość na antybiotyki					
- Ampicylina 10 mcg	31,33 ± 0,94	32,67 ± 1,89	37,33 ± 0,94	30,67 ± 1,89	23,33 ± 0,47
- Wankomycyna 30 mcg	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
- Gentamycyna 10 mcg	20,00 ± 0,00	19,00 ± 1,41	14,00 ± 1,41	13,67 ± 0,94	17,33 ± 1,89
- Kanamycyna 30 mcg	14,00 ± 0,00	14,00 ± 0,00	15,00 ± 0,00	15,67 ± 0,94	15,33 ± 0,47
- Streptomycyna 300 mcg	27,00 ± 1,41	30,67 ± 0,94	29,67 ± 0,94	16,33 ± 1,89	20,67 ± 0,94
- Erytromycyna 15 mcg	32,33 ± 0,47	30,33 ± 1,89	31,00 ± 1,41	28,33 ± 3,30	29,00 ± 2,83
- Klindamycyna 2 mcg	31,00 ± 1,41	31,00 ± 1,41	32,67 ± 0,94	23,33 ± 0,94	23,33 ± 0,94
- Tetracyklina 30 mcg	36,33 ± 0,94	38,33 ± 2,36	36,33 ± 0,94	16,00 ± 1,41	18,67 ± 0,94
- Chloramfenikol 30 mcg	30,67 ± 0,94	32,33 ± 0,94	30,33 ± 0,47	28,67 ± 0,94	28,00 ± 0,00
Wytwarzane kwasy organiczne					
kwas mlekowy [mg/cm ³]	31,69 ± 0,07	19,47 ± 0,07	16,67 ± 0,07	24,62 ± 0,06	15,15 ± 0,06
kwas octowy [mg/cm ³]	4,50 ± 0,08	4,40 ± 0,11	3,56 ± 0,07	3,17 ± 0,03	3,81 ± 0,06
Właściwości proteolityczne	+	+	+	+	+
Właściwości amylolityczne	+	-	+	-	-
Właściwości lipolityczne	-	-	-	-	-
Tolerancja niskiego pH					
- pH 2,0	48%	51%	60%	39%	39%
- pH 3,0	45%	54%	72%	39%	44%
Tolerancja soli żółciowych					
- 0,25% żółci bawolej	90%	95%	67%	40%	74%
- 0,50% żółci bawolej	79%	113%	57%	42%	77%
- 1,0% żółci bawolej	86%	106%	76%	52%	103%
Hydrofobowość komórek	29%	23%	42%	23%	22%
Liczebność populacji bakterii [log]					
- hodowla na nośniku z mlekiem wzbogaconym	9,60	9,55	9,86	9,50	9,72
- liofilizowany preparat	9,52	9,47	9,63	9,66	9,38
- przechowywanie 30 dni, 4°C	9,00	9,26	9,25	9,26	9,36
- przechowywanie 30 dni, -20°C	9,36	8,84	9,35	9,48	9,48

Źródło: na podstawie badań własnych



Fotografie 28-32. Obraz mikroskopowy wybranych izolatów bakterii fermentacji mlekowej

Źródło: wykonanie własne

Charakterystyka 5 wybranych szczepów bakterii fermentacji mlekowej wykorzystanych do kompozycji prototypu dodatku paszowego przeznaczanego dla drobiu przedstawiona została w tabeli 24.

W składzie preparatu przeznaczanego dla drobiu znalazły się bakterie: *Lactobacillus rhamnosus* KK 270, *Lactobacillus paracasei* KK 281, *Lactobacillus buchneri* DG 177, *Lactobacillus buchneri* DG 190 i *Lactobacillus casei* DG 213. Wyselekcjonowane szczepy charakteryzowały się szerokim zakresem aktywności antagonistycznej, przy czym tylko szczepy *L. buchneri* DG 177 oraz *L. casei* KK 033 ograniczały rozwój bakterii *C. perfringens*. Nie zaobserwowano natomiast inhibicji wzrostu *Y. enterocolitica*. Badane izolaty bakterii fermentacji mlekowej wykazywały wysoką i średnią wrażliwość na działanie 8 z 9 testowanych antybiotyków (w badanych stężeniach), za wyjątkiem wankomycyny. Wszystkie badane szczepy wykazywały aktywność proteolityczną, natomiast amylolityczną trzy: *L. rhamnosus* KK 270, *L. paracasei* KK 281 oraz *L. buchneri* DG 190. Produkcja kwasu mlekowego przez badane izolaty bakterii wynosiła od 15,37 do 36,28 mg/cm³. Szczepy charakteryzowały się dobrą tolerancją zarówno niskiego pH podłoża jak i soli żółciowych. Hydrofobowość komórek została oznaczona na poziomie od 24 do 53%. Wszystkie izolaty wykazywały dobrą przeżywalność podczas procesu liofilizacji oraz 30 dniowego przechowywania w temperaturach 4 i -20°C. Badania obejmujące oznaczenie

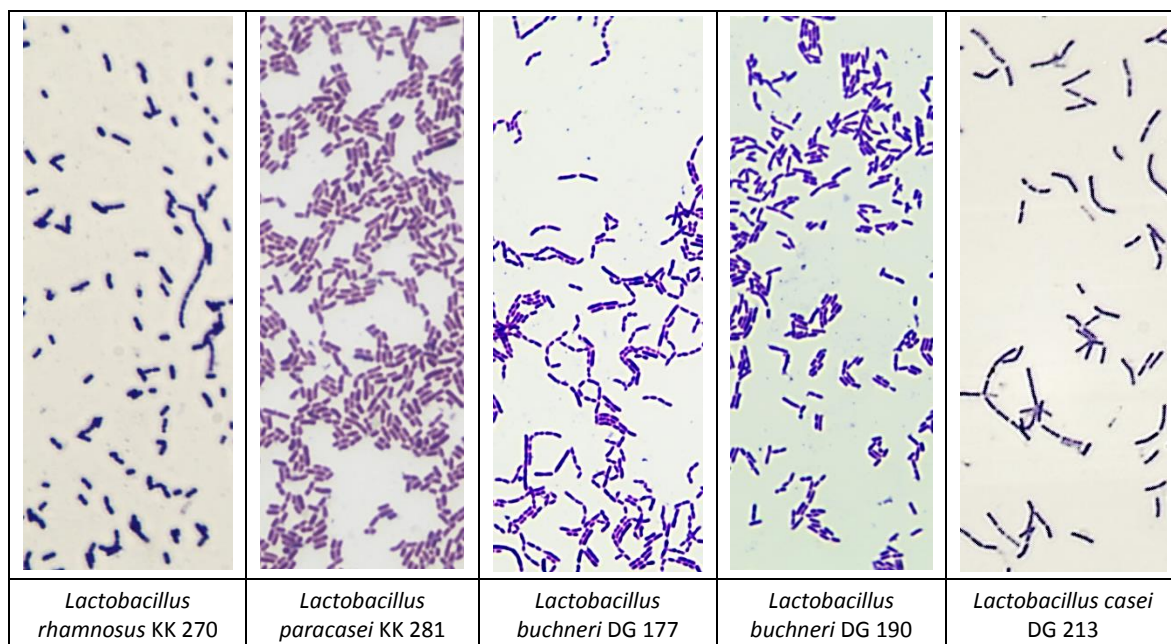
przeżywalności *in vitro* bakterii w symulowanym przewodzie pokarmowym drobiu wskazują na wysoką przeżywalność izolatów.

Tabela. 24 Zestawienie wyników badań wybranych szczepów bakterii przeznaczonych do kompozycji dodatku paszowego dla brojlerów

Opis	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Lactobacillus buchneri</i>	<i>Lactobacillus buchneri</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
Numer izolatu	KK 270	KK 281	DG 177	DG 190	DG 213
Pochodzenie Numer próbki	Kurczę rzeźne Próbka nr. 3.1	Kurczę rzeźne Próbka nr. 3.1	Kurczę rzeźne Próbka nr. 3.6	Kurczę rzeźne Próbka nr. 3.9	Kurczę rzeźne Próbka nr. 3.9
Katalaza	-	-	-	-	-
Morfologia	Gram- dodatnie	Gram- dodatnie	Gram- dodatnie	Gram- dodatnie	Gram- dodatnie
	pałeczki długie	pałeczki długie	pałeczki krótkie	pałeczki b. krótkie	pałeczki krótkie
Układ	łańcuszki	łańcuszki, palisady	łańcuszki	nieregularny	łańcuszki, Y
Właściwości antybakteryjne					
- <i>Clostridium perfringens</i>	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	14,00 ± 1,41	0,00 ± 0,00	12,33 ± 0,94
- <i>Listeria monocytogenes</i>	14,33 ± 0,47	15,33 ± 0,47	14,33 ± 0,94	13,00 ± 0,00	14,33 ± 0,47
- <i>Staphylococcus aureus</i>	16,33 ± 0,47	15,00 ± 0,00	11,00 ± 0,00	12,67 ± 0,94	15,67 ± 0,47
- <i>Aeromonas hydrophila</i>	16,33 ± 1,89	17,00 ± 0,00	18,33 ± 0,47	16,33 ± 0,94	17,33 ± 0,47
- <i>Campylobacter jejuni</i>	13,00 ± 1,41	14,33 ± 0,47	21,00 ± 1,41	14,67 ± 0,94	20,33 ± 0,47
- <i>Enterobacter aerogenes</i>	11,67 ± 0,47	13,67 ± 1,89	13,00 ± 0,00	11,33 ± 0,47	11,00 ± 0,00
- <i>Escherichia coli</i>	12,00 ± 0,00	13,00 ± 0,00	16,00 ± 0,00	16,00 ± 0,00	14,33 ± 0,47
- <i>Proteus vulgaris</i>	14,33 ± 0,47	14,67 ± 0,47	15,67 ± 0,47	13,33 ± 0,47	14,33 ± 0,47
- <i>Pseudomonas aruginosa</i>	16,00 ± 0,00	16,00 ± 0,00	16,00 ± 0,00	13,67 ± 0,47	15,00 ± 0,00
- <i>Salmonella enterica</i> ser. Enteritidis	11,00 ± 0,00	13,00 ± 0,00	13,67 ± 0,47	11,67 ± 0,47	12,00 ± 0,00
- <i>Salmonella enterica</i> ser. Typhimurium	13,00 ± 1,41	13,67 ± 0,94	12,33 ± 0,94	17,00 ± 0,00	12,67 ± 0,47
- <i>Serratia marcescens</i>	12,00 ± 0,00	14,00 ± 0,00	13,67 ± 0,47	13,00 ± 0,00	14,00 ± 0,00
- <i>Shigella flexneri</i>	15,33 ± 0,47	15,00 ± 0,00	17,00 ± 0,00	12,67 ± 0,47	14,33 ± 0,94
- <i>Yersinia enterocolitica</i>	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Wrażliwość na antybiotyki					
- Ampicylina 10 mcg	37,00 ± 1,41	29,00 ± 1,41	23,33 ± 2,36	24,00 ± 2,83	36,67 ± 3,30
- Wankomycyna 30 mcg	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
- Gentamycyna 10 mcg	18,00 ± 1,41	15,67 ± 0,94	16,00 ± 1,41	17,67 ± 0,94	21,33 ± 1,89
- Kanamycyna 30 mcg	17,67 ± 0,94	14,33 ± 0,47	15,67 ± 0,94	20,33 ± 0,47	15,00 ± 1,41
- Streptomycyna 300 mcg	23,33 ± 0,94	23,67 ± 0,94	25,33 ± 0,47	22,67 ± 0,94	21,33 ± 1,89
- Erytromycyna 15 mcg	26,33 ± 1,89	35,67 ± 0,94	29,67 ± 2,36	35,00 ± 1,41	30,33 ± 1,89
- Klindamycyna 2 mcg	25,00 ± 1,41	33,00 ± 0,00	31,67 ± 0,94	31,67 ± 0,94	25,00 ± 0,00
- Tetracyklina 30 mcg	24,33 ± 0,94	23,33 ± 1,89	32,33 ± 0,47	38,33 ± 0,47	33,33 ± 0,47
- Chloramfenikol 30 mcg	24,67 ± 2,36	34,00 ± 1,41	31,00 ± 1,41	29,00 ± 1,41	24,33 ± 0,94
Wytwarzane kwasy organiczne [mg/cm ³]					
- kwas mlekowy	33,31 ± 0,08	15,37 ± 0,08	16,46 ± 0,06	36,28 ± 0,11	34,22 ± 0,09
- kwas octowy	3,89 ± 0,10	4,09 ± 0,09	3,17 ± 0,06	4,37 ± 0,15	4,21 ± 0,11
Właściwości proteolityczne	+	+	+	+	+
Właściwości amylolityczne	+	+	-	+	-
Właściwości lipolityczne	-	-	-	-	-

Opis	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Lactobacillus buchneri</i>	<i>Lactobacillus buchneri</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
Numer izolatu	KK 270	KK 281	DG 177	DG 190	DG 213
Tolerancja niskiego pH					
- pH 2,0	50%	46%	33%	47%	41%
- pH 3,0	55%	48%	41%	48%	50%
Tolerancja soli żółciowych					
- 0,25% żółci bawolej	72%	61%	74%	66%	67%
- 0,50% żółci bawolej	72%	61%	76%	67%	66%
- 1,0% żółci bawolej	75	75	69	71	70
Hydrofobowość komórek	24%	24%	31%	46%	53%
Liczebność populacji bakterii [log]					
- hodowla na nośniku z mlekiem wzbogaconym	10,32	9,38	9,52	9,94	9,36
- liofilizowany preparat	9,58	9,59	9,40	9,60	9,35
- przechowywanie 30 dni, 4°C	9,13	9,07	9,07	9,25	9,12
- przechowywanie 30 dni, -20°C	9,49	9,46	9,12	9,53	9,41

Źródło: na podstawie badań własnych



Fotografie 33-37. Obraz mikroskopowy wybranych izolatów bakterii fermentacji mlekowej

Źródło: wykonanie własne

PODSUMOWANIE WYNIKÓW

Celem prezentowanej pracy doktorskiej było opracowanie nowych preparatów - dodatków paszowych, zawierających w swoim składzie odpowiednio wyselekcjonowane szczepy bakterii fermentacji mlekowej o wielokierunkowym działaniu ze szczególnym uwzględnieniem antagonizmu wobec bakterii chorobotwórczych. Głównym założeniem pracy było pozyskanie izolatów bakterii z lokalnych hodowli zwierząt i dokonanie wyboru szczepów na podstawie wybranych wyróżników determinujących ich funkcjonalność oraz wytycznych FAO/WHO w zakresie badań *in vitro* przewidzianych dla probiotyków.

Z próbek treści jelitowej prosiąt i jelit kurcząt rzeźnych wyizolowano 700 czystych kultur mikroorganizmów, które scharakteryzowano fenotypowo potwierdzając przynależność 565 izolatów do grupy bakterii fermentacji mlekowej. W ocenie fenotypowej uwzględniono ocenę makro- i mikroskopową oraz zdolność do wytwarzania enzymu katalazy. Wybrane kultury zamrożono w podłożu z dodatkiem glicerolu w celu długoterminowego przechowywania i zdeponowano w kolekcji Katedry Przyrodniczych Podstaw Jakości.

Selekcja izolatów do projektowanych preparatów przebiegała dwuetapowo. Podstawowym kryterium wyboru była aktywność przeciwdrobnoustrojowa wyizolowanych bakterii, co jest cechą najczęściej braną pod uwagę podczas selekcji bakterii potencjalnie probiotycznych. Wykazano, że poszczególne izolaty różniły się zakresem aktywności i siłą oddziaływania w stosunku do mikroorganizmów wskaźnikowych, co pozwoliło wybrać 120 kultur do dalszych etapów badań. Uzyskane wyniki były zgodne z danymi literaturowymi i, wskazującymi, że aktywność przeciwdrobnoustrojowa jest cechą często opisywaną w odniesieniu do bakterii fermentacji mlekowej, ale zależy od szczepu. Dalsza selekcja obejmowała określenie wrażliwości na antybiotyki stosowane w hodowlach drobiu i trzody chlewnej ocenę wybranych właściwości biochemicznych (proteolitycznych, amylolitycznych i lipolitycznych), hydrofobowości komórek, określenie profilu głównych kwasów organicznych wytwarzanych przez badane kultury. Pod uwagę brano również zdolność przetrwania w niskim pH soku żołądkowego oraz w obecności soli żółciowych, co stanowi istotny wyróżnik, determinujący przydatność mikroorganizmów jako potencjalnych probiotyków. Rezultaty badań wykazały, że izolaty bakterii fermentacji mlekowej różniły się pod względem badanych cech, co pozwoliło na pozytywną weryfikację pierwszej z hipotez postawionych w pracy, mówiącej, iż właściwości funkcjonalne bakterii fermentacji mlekowej pochodzących z mikrobioty jelitowej zwierząt monogastrycznych są szczepozależne.

Wyróżnikibrane pod uwagę w drugim etapie pracy pozwoliły na wybranie 30 izolatów bakterii, które poddano identyfikacji genetycznej poprzez sekwencjonowanie fragmentu genu kodującego 16s RNA. Na podstawie analizy porównawczej z bazą danych NCBI przy użyciu narzędzia BLAST uzyskano informację o przynależności gatunkowej badanych izolatów. Większość wybranych izolatów należała do gatunków *L.casei* i *L. paracasei*, stwierdzono także obecność gatunków *L. buchneri*, *L. rhamnosus* i *P. pentosaceus*. Niewielkie zróżnicowanie gatunkowe wyselekcjonowanych izolatów może być związane z ukierunkowaną selekcją, która miała na uwadze wybór bakterii charakteryzujących się nie tylko szerokim zakresem aktywności antybakteryjnej i określonymi właściwościami biochemicznymi, ale także cechami przydatnymi z technologicznego punktu widzenia, jak łatwość uzyskania dużej ilości biomasy i wzrost na standardowym podłożu. Dzięki temu możliwe było ominięcie procesu optymalizacji warunków hodowli przy zachowaniu najbardziej pożądanых cech mikroorganizmów. Jest to szczególnie istotne ze względów ekonomicznych.

Dane uzyskane w trakcie realizacji kolejnych etapów doświadczalnych pozwoliły na wybranie po 5 izolatów pochodzących z treści jelitowej prosiąt i jelit kurcząt rzeźnych w celu skomponowania preparatów stanowiących prototypy dodatków paszowych. W zestawieniu izolatów uwzględniono zarówno pochodzenie szczepów, ich zróżnicowanie gatunkowe i właściwości, które zgodnie z założeniami niniejszej pracy, miały się uzupełniać w ostatecznej wersji preparatu. Tym samym zweryfikowano hipotezę drugą, mówiącą, iż odpowiednio wyselekcjonowane bakterie fermentacji mlekowej dają możliwość skomponowania nowych, wieloszczepowych preparatów przeznaczonych dla określonych grup zwierząt monogastrycznych. Ostatecznie, przygotowano dwa preparaty, dla których opracowano podłoże bazujące na mleku odtłuszczonym z dodatkami w postaci trehalozy i maltodekstryny, wspomagającymi przeżywalność bakterii w trakcie procesu utrwalania metodą liofilizacji i podczas przechowywania preparatu w warunkach chłodniczych i w postaci zamrożonej. Stwierdzono, że zarówno pojedyncze hodowle wybranych izolatów w postaci liofilizowanej, jak przygotowane preparaty, charakteryzowały się dobrą przeżywalnością zarówno podczas procesu utrwalania jak i po 30 dniowym przechowywaniu we wspomnianych wyżej warunkach.

Rezultaty badań przeprowadzonych w pracy umożliwiły zrealizowanie założonego celu, a przy tym okazały się satysfakcjonujące. Skomponowane, nowe preparaty mogą stanowić bezpieczną alternatywę dla antybiotyków stosowanych w hodowli zwierząt

monogastycznych, jak założono w hipotezie trzeciej. Kontynuacją badań zrealizowanych w ramach prezentowanej pracy mogą być badania *in vivo* na zwierzętach monogastycznych, dla których zaprojektowano nowe dodatki.

Warto podkreślić, że tematyka podjęta w niniejszej pracy wpisuje się w nurt badań towaroznawczych dotyczących kształtowania jakości i poprawy bezpieczeństwa zdrowotnego pasz oraz żywności pochodzenia zwierzęcego. Wykorzystanie mikroorganizmów potencjalnie probiotycznych w hodowli zwierząt stanowi alternatywę dla stosowania antybiotyków, co ma ogromne znaczenie ze względu na narastające zjawisko antybiotykoodporności. Ponadto, korzystny wpływ na organizm zwierząt jest ważny z punktu widzenia wydajnej i opłacalnej produkcji.

WNIOSKI

Przeprowadzone badania pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków:

1. Próbkę treści jelitowej prosiąt ssących i odsadzonych oraz jelit kurcząt rzeźnych stanowiły dobre źródło izolacji morfologicznie różnorodnych bakterii fermentacji mlekowej, przy czym liczebność tych bakterii różniła się w zależności od próbki i pochodzenia materiału izolacyjnego.
2. Spośród 565 izolatów bakterii fermentacji mlekowej 52% wykazało aktywność antybakteryjną wobec testowanych mikroorganizmów wskaźnikowych, przy czym zakres aktywności i stopień oddziaływania różnił się dla poszczególnych izolatów. Aktywność antybakteryjna była zależna od pochodzenia izolatów.
3. Wrażliwość badanych izolatów bakterii fermentacji mlekowej na testowane antybiotyki była zróżnicowana i zależała od izolatu bakterii. W przypadku ośmiu spośród dziewięciu antybiotyków zaobserwowano wysoką lub średnią wrażliwość bakterii. Większość izolatów była natomiast niewrażliwa na działanie wankomycyny.
4. Właściwości proteolityczne wykazywały wszystkie badane izolaty bakterii fermentacji mlekowej, podczas gdy rozkład skrobi obserwowano w przypadku około 52% bakterii. Nie stwierdzono właściwości lipolitycznych.
5. Większość badanych izolatów wykazywała wysoką lub średnią tolerancję niskiego pH i soli żółciowych, natomiast hydrofobowość okazała się istotnym czynnikiem eliminującym ze względu na niskie wartości przylegania do węglowodoru, stwierdzone w przypadku 53% izolatów.
6. Identyfikacja genetyczna wykazała różnorodność gatunkową wśród izolatów wybranych na podstawie właściwości funkcjonalnych, chociaż dominującymi gatunkami były *Lactobacillus casei* i *Lactobacillus paracasei*.
7. Analiza właściwości oraz identyfikacja genetyczna poszczególnych izolatów bakterii fermentacji mlekowej umożliwiła wyselekcjonowanie szczepów o cechach uzupełniających się wzajemnie do skomponowania preparatów przeznaczonych dla trzody chlewnej i drobiu.
8. Odpowiednio dobrany skład pożywki pozwolił na utrzymanie liczebności populacji bakterii na wysokim poziomie w hodowlach poszczególnych szczepów i gotowych preparatach podczas procesu liofilizacji oraz przechowywania w temperaturze 4°C i -20°C przez 30 dni.

9. Zaprojektowane preparaty, stanowiące prototypy dodatków paszowych wykazały wysoką przeżywalność w symulowanych przewodach pokarmowych trzody chlewnej i drobiu.

BIBLIOGRAFIA

1. Abadias, M., Teixidó, N., Usall, J., Benabarre, A., Vinas, I., 2001. *Viability, efficacy, and storage stability of freeze-dried biocontrol agent Candida sake using different protective and rehydration media*. Journal of Food Protection®, vol. 64, nr 6, s. 856-861.
2. Abdel-Rahman, H., Shawky, S., Ouda, H., Nafeaa, A., Orabi, S., 2013. *Effect of two probiotics and bioflavonoids supplementation to the broilers diet and drinking water on the growth performance and hepatic antioxidant parameters*. Global Veterinaria, vol. 10, nr 6, s. 734-741.
3. Afsharmanesh, M., Sadaghi, B., 2014. *Effects of dietary alternatives (probiotic, green tea powder and Kombucha tea) as antimicrobial growth promoters on growth, ileal nutrient digestibility, blood parameters, and immune response of broiler chickens*. Comparative Clinical Pathology, vol. 23, nr 3, s. 717-724.
4. Ahmed, S. T., Islam, M. M., Mun, H. S., Sim, H. J., Kim, Y. J., & Yang, C. J., 2014, *Effects of Bacillus amyloliquefaciens as a probiotic strain on growth performance, cecal microflora, and fecal noxious gas emissions of broiler chickens*, Poultry Science, vol. 93, nr 8, s. 1963-1971.
5. Alexopoulos C., Georgoulakis I.E., Tzivara A., Kyriakis C.S., Govaris A., Kyriakis S.C., 2007, *Field evaluation of the effect of a probiotic-containing Bacillus licheniformis and Bacillus subtilis spores on the health status, performance, and carcass quality of grower and finisher pigs*, Journal of Veterinary Medicine, vol. 51, s. 306-312.
6. Alexopoulos, C., Georgoulakis, I. E., Tzivara, A., Kritas, S. K., Siochu, A., & Kyriakis, S. C., 2004, *Field evaluation of the efficacy of a probiotic containing Bacillus licheniformis and Bacillus subtilis spores, on the health status and performance of sows and their litters*, Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, vol. 88, s.381-392.
7. Ammor, M.S., Flórez, A.B., Mayo, B., 2007. *Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria*. Food Microbiology, vol. 24, s. 559-570.
8. Ammor, M.S., Flórez, A.B., van Hoek, A.H.A.M., de los Reyes-Gavilán, C.G., Aarts, H.J.M., Margolles, A., Mayo, B., 2008. *Molecular characterization of intrinsic and acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria and bifidobacteria*. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, vol. 14, s. 6-15.
9. Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E., Chevallier, I., 2006. *Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 1—Screening and characterization of the antibacterial compounds*. Food Control, vol. 17, nr 6, s. 454-461.

10. An, B. K., Cho, B. L., You, S. J., Paik, H. D., Chang, H. I., Kim, S. W., Kang, C. W., 2008, *Growth performance and antibody response of broiler chicks fed yeast derived β -glucan and single-strain probiotics*, Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, vol. 21, nr7, s. 1027-1032.
11. Andritsos, N. D., Mataragas, et al., 2013, *Quantifying Listeria monocytogenes prevalence and concentration in minced pork meat and estimating performance of three culture media from presence/absence microbiological testing using a deterministic and stochastic approach*, Food Microbiology, vol. 36, nr 2, s. 395-405.
12. Aujoulat, F., Lebreton, F., Romano, S., Delage, M., Marchandin, H., Brabet, M., Bricard, F., Godreuil, S., Parer, S., Jumas-Bilak, E., 2011. *Comparative diffusion assay to assess efficacy of topical antimicrobial agents against Pseudomonas aeruginosa in burns care*. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, vol. 10, nr 27, s. 1-10.
13. Avantaggiato, G., Havenaar, R., Visconti, A., 2003. *Assessing the zearalenone-binding activity of adsorbent materials during passage through a dynamic in vitro gastrointestinal model*. Food and Chemical Toxicology, vol. 41, nr 10, s. 1283-1290.
14. Aymerich, T., Martin, B., Garriga, M., Vidal-Carou, M. C., Bover-Cid, S., Hugas, M., 2006. *Safety properties and molecular strain typing of lactic acid bacteria from slightly fermented sausages*. Journal of Applied Microbiology, vol. 100, nr 1, s. 40-49.
15. Bai, S. P., Wu, A. M., Ding, X. M., Lei, Y., Bai, J., Zhang, K. Y., & Chio, J. S., 2013, *Effects of probiotic-supplemented diets on growth performance and intestinal immune characteristics of broiler chickens*, Poultry Science, vol. 92, nr 3, s. 663-670.
16. Barrow, P.A., Brooker, B.E., Fuller, R., Newport, M.J., 1980. *The attachment of bacteria to the gastric epithelium of the pig and its importance in the microecology of the intestine*. Journal of Applied Bacteriology, vol. 48, nr 1, s. 147-154.
17. Barton, M. D., 2000. *Antibiotic use in animal feed and its impact on human health*. Nutrition Research Reviews, vol. 13, nr 2, s. 279-299.
18. Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C., Turck, M., 1966. *Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method*. American Journal of Clinical Pathology, vol. 45, nr 4, s. 493-496.
19. Bazoğlu, T.F. Özilgen, M., Bakir, U., 1987. *Survival kinetics of lactic acid starter cultures during and after freeze-drying*. Enzyme and Microbial Technology, vol. 9, s. 531-537.
20. Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., 2005. *Biochemia*. Wydawnictwo Naukowe PWN, s. 838-839.
21. Bergamini, C.V., Hynes, E.R., Quiberoni, A., Suarez, V.B., Zalazar, C.A., 2005. *Probiotic bacteria as adjunct starters: influence of the addition methodology on their survival in a semi-hard Argentinean cheese*. Food Research International, vol. 38, s. 597-604.

22. Bernardeau, M., Vernoux, J.P., Henri-Dubernet, S., Guéguen, M., 2008. *Safety assessment of dairy microorganisms: The Lactobacillus genus*. International Journal of Food Microbiology, vol. 126, nr 3, s. 278-285.
23. Biavati, B., Mattarelli, P., 2015. *Bifidobacterium*. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria, s. 1-57.
24. Bjerrum, L., Engberg, R.M., Leser, T.D., Jensen, B.B., Finster, K., Pedersen, K., 2006. *Microbial community composition of the ileum and cecum of broiler chickens as revealed by molecular and culture-based techniques*. Poultry Science, vol. 85, nr 7, s. 1151-1164.
25. Boisen, S., Fernández, J.A., 1997. *Prediction of the total tract digestibility of energy in feedstuffs and pig diets by in vitro analyses*. Animal Feed Science and Technology, vol. 68, nr 3, s. 277-286.
26. Bomba, A., Nemcova, R., Gancarcikova, S., Herich, R., Guba, P., Mudronova, D., 2002. *Improvement of the probiotic effect of micro-organisms by their combination with maltodextrins, fructo-oligosaccharides and polyunsaturated fatty acids*. British Journal of Nutrition, vol. 88, nr 1, s. 95-99.
27. Brashears, M.M., Jaroni, D., Trimble, J., 2003. *Isolation, selection, and characterization of lactic acid bacteria for a competitive exclusion product to reduce shedding of Escherichia coli O157: H7 in cattle*. Journal of Food Protection, vol. 66, nr 3, s. 355-363.
28. Brink, M., Todorov, S.D., Martin, J.H., Senekal, M., Dicks, L.M.T., 2006. *The effect of prebiotics on production of antimicrobial compounds, resistance to growth at low pH and in the presence of bile, and adhesion of probiotic cells to intestinal mucus*. Journal of Applied Microbiology, vol. 100, nr 4, s. 813-820.
29. Buncic, S., Sofos, J., 2012. *Interventions to control Salmonella contamination during poultry, cattle and pig slaughter*. Food Research International, vol. 45, nr 2, s. 641-655.
30. Burbianka, M., Pliszka, A., Burzyńska, H., 1983. *Mikrobiologia żywności*. Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich.
31. Cao, G. T., Zeng, X. F., Chen, A. G., Zhou, L., Zhang, L., Xiao, Y. P., & Yang, C. M., 2013, *Effects of a probiotic, Enterococcus faecium, on growth performance, intestinal morphology, immune response, and cecal microflora in broiler chickens challenged with Escherichia coli K88*, Poultry Science, vol. 92, nr 11, s. 2949-2955.
32. Carvalho, A. S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F.X., Gibbs, P., 2003, *Effect of various growth media upon survival during storage of freeze-dried Enterococcus faecalis and Enterococcus durans*, Journal of Applied Microbiology, vol. 94, s. 947-952.
33. Carvalho, A.S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F.X., Gibbs, P., 2004. *Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria*. International Dairy Journal, vol. 14, nr 10, s. 835-847.

34. Chan, G., Farzan, A., DeLay, J., McEwen, B., Prescott, J.F., Friendship, R.M., 2013. *A retrospective study on the etiological diagnoses of diarrhea in neonatal piglets in Ontario, Canada, between 2001 and 2010*. Canadian Journal of Veterinary Research, vol. 77, nr 4, s. 254-260.
35. Chang, Y.H., Kim, J.K., Kim, H.J., Kim, W.Y., Kim, Y.B., Park, Y.H., 2001. *Selection of a potential probiotic Lactobacillus strain and subsequent in vivo studies*. Antonie Van Leeuwenhoek, vol. 80, nr 2, s. 193-199.
36. Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L., Collins, J.K., 1998. *Antibiotic susceptibility of potentially probiotic Lactobacillus species*. Journal of Food Protection, vol. 61, nr 12, s. 1636-1643.
37. Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L., Collins, J.K., 1999. *Development of an agar overlay disc diffusion method for the antibiotic susceptibility testing of potentially probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium species*. Egyptian Journal of Dairy Science, vol. 27, s. 71-82.
38. Chaucheyras-Durand, F., Durand, H., 2009. *Probiotics in animal nutrition and health*. Beneficial Microbes, vol. 1, nr 1, s. 3-9.
39. Cho, J.H., Zhao, P.Y., Kim, I.H., 2011. *Probiotics as a Dietary Additive for Pigs: A Review*. Journal of Animal and Veterinary Advances, vol. 10, nr 16, s. 2127-2134.
40. Chou, L.S., Weimer, B., 1999. *Isolation and characterization of acid-and bile-tolerant isolates from strains of Lactobacillus acidophilus*. Journal of Dairy Science, vol. 82, nr 1, s. 23-31.
41. Choudhari, A., Shinde, S., Ramteke, B.N., 2008. *Prebiotics and Probiotics as Health promoter*. Veterinary World, vol. 1, nr 2, s. 59-61.
42. Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., 2000. *Assimilation of glycerol by a strain of Lactobacillus collinoides isolated from cider*. Food Microbiology, vol. 17, nr 5, s. 513-519.
43. Clark, P.A., Martin, J.H., 1994. *Selection of bifidobacteria for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods. III. Tolerance to simulated bile concentrations of human small intestines*. Cultured Dairy Products Journal, vol. 29, s. 18-21.
44. Clementi, F., Aquilanti, L., 2011. *Recent investigations and updated criteria for the assessment of antibiotic resistance in food lactic acid bacteria*. Anaerobe, vol. 17, nr 6, s. 394-398.
45. Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F., Chikindas, M.L., 2001. *Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation*. International Journal of Food Microbiology, vol. 71, nr 1, s. 1-20.

46. Collington, G.K., Parker, D.S., Armstrong, D.G., 1990. *The influence of inclusion of either an antibiotic or a probiotic in the diet on the development of digestive enzyme activity in the pig*. British Journal of Nutrition, vol. 64, nr 1, s. 59-70.
47. Commane, D. M., Shortt, C. T., Silvi, S., Cresci, A., Hughes, R. M., Rowland, I. R., 2005, *Effects of fermentation products of pro-and prebiotics on trans-epithelial electrical resistance in an in vitro model of the colon*, Nutrition and Cancer, vol. 51, nr 1, s. 102-109.
48. Comunian, R., Daga, E., Dupré, I., Paba, A., Devirgiliis, C., Piccioni, V., De Lorentiis, A., 2010. *Susceptibility to tetracycline and erythromycin of Lactobacillus paracasei strains isolated from traditional Italian fermented foods*. International Journal of Food Microbiology, vol. 138, nr 1, s. 151-156.
49. Condon, S., 1987. *Responses of lactic acid bacteria to oxygen*. FEMS Microbiology Reviews, vol. 3, nr 3, s. 269-280.
50. Conway, P.L., Adams, R F., 1989. *Role of erythrosine in the inhibition of adhesion of Lactobacillus fermentum strain 737 to mouse stomach tissue*. Microbiology, vol. 135, nr 5, s. 1167-1173.
51. Coppola, R., Succi, M., Tremonte, P., Reale, A., Salzano, G., Sorrentino, E., 2005. *Antibiotic susceptibility of Lactobacillus rhamnosus strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese*. Lait, vol. 85, nr 3, s. 193-204.
52. Crowe, J. H., Carpenter, J. F., Crowe, L. M., 1998, *The role of vitrification in anhydrobiosis*, Annual Review of Physiology, vol. 60, s. 73-103.
53. Crowe, L. M., 2002, *Lessons from nature: the role of sugars in anhydrobiosis*, Comparative Biochemistry and Physiology, vol. 131A, s. 505-513.
54. Crowe, L. M., Reid, D. S., Crowe, J. H., 1996, *Is trehalose special for preserving dry biomaterials?*, Biophysical Journal, vol. 71, s. 2087–2093.
55. Curto, A.L., Pitino, I., Mandalari, G., Dainty, J.R., Faulks, R.M., Wickham, M.S.J., 2011. *Survival of probiotic lactobacilli in the upper gastrointestinal tract using an in vitro gastric model of digestion*. Food microbiology, vol. 28, nr 7, s. 1359-1366.
56. D'Aimmo, M.R., Modesto, M., Biavati, B., 2007. *Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and Bifidobacterium spp. isolated from dairy and pharmaceutical products*. International Journal of Food Microbiology, vol. 115, nr 1, s. 35-42.
57. Damayanti, E., Julendra, H., Sofyan, A., Hayati, S.N., 2014. *Bile Salt and Acid Tolerant of Lactic Acid Bacteria Isolated from Proventriculus of Broiler Chicken*. Media Peternakan, vol. 37, nr 2, s. 80.
58. Damayanti, E., Yusiati, L.M., Dinoto, A., 2015. *16s rRNA Identification of Pediococcus spp. from broiler and studies of adherence ability on immobilized mucus*. Indonesian Journal of Biotechnology, vol. 17, nr 2, s. 96-106.

59. Danielsen, M., Wind, A., 2003. *Susceptibility of Lactobacillus spp. to antimicrobial agents*. International Journal of Food Microbiology, vol. 82, nr 1, s. 1-11.
60. Daşkıran, M., Önel, A. G., Cengiz, Ö., Ünsal, H., Türkyılmaz, S., Tatlı, O., Sevim, Ö., 2012. *Influence of dietary probiotic inclusion on growth performance, blood parameters, and intestinal microflora of male broiler chickens exposed to posthatch holding time*, The Journal of Applied Poultry Research, vol. 21, nr 3, s. 612-622.
61. De Angelis, M., Siragusa, S., Berloco, M., Caputo, L., Settanni, L., Alfonsi, G., Amerio, M., Grandi, A., Ragni, A., Gobetti, M., 2006. *Selection of potential probiotic lactobacilli from pig feces to be used as additives in pelleted feeding*. Research in Microbiology, vol. 157, nr 8, s. 792-801.
62. De Lange, C.F.M., Pluske, J., Gong, J., Nyachoti, C.M., 2010. *Strategic use of feed ingredients and feed additives to stimulate gut health and development in young pigs*. Livestock Science, vol. 134, nr 1, s. 124-134.
63. Delcour, J., Ferain, T., Deghorain, M., Palumbo, E., Hols, P., 1999. *The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria*. In *Lactic acid bacteria: genetics, metabolism and applications*. Springer Netherlands, s. 159-184.
64. Denkova, R., Georgieva, L., Denkova, Z., Yanakieva, V., Ilieva, S., 2014. *Highly active probiotic concentrates with long shelf life obtained using cryoprotectants of plant origin*. Journal of Food and Packaging Science Technique and Technologies, vol. 4, s. 66-70.
65. Dharmawan, J., Surono, I.S., Kun, L.Y., 2006. *Adhesion properties of indigenous dadih lactic acid bacteria on human intestinal mucosal surface*. Asian Australasian Journal of Animal Sciences, vol. 19, nr 5, s. 751-755.
66. Donoghue, D.J., 2003. *Antibiotic residues in poultry tissues and eggs: human health concerns?*. Poultry Science, vol. 82, nr 4, s. 618-621.
67. EFSA, 2005. Summary Report. *QPS – Qualified presumption of safety of microorganisms in food and feed*, Scientific Colloquium nr 2, Brussels. <http://www.efsa.europa.eu> [Dostęp: 06.03.2016]
68. EFSA, 2007. Scientific opinion. *Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA*, EFSA Journal vol. 587. <http://www.efsa.europa.eu> [Dostęp: 06.03.2016]
69. EFSA, 2008a. Technical guidance. *Update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance*. Prepared by the Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feeds. EFSA Journal, vol. 732. <http://www.efsa.europa.eu> [Dostęp: 15.03.2016]

70. EFSA, 2008b. *Quantitative microbiological risk assessment on Salmonella in meat: Source attribution for human salmonellosis from meat*. EFSA Journal, vol. 625. <http://www.efsa.europa.eu> [Dostęp: 06.02.2016]
71. EFSA, 2010. Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). *Scientific opinion on a quantitative microbiological risk assessment of Salmonella in slaughter and breeder pigs*, EFSA Journal, vol. 8, nr 4, Parma. <http://www.efsa.europa.eu> [Dostęp: 02.03.2016]
72. EFSA, 2011a. Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). *Scientific opinion on Campylobacter in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain*, EFSA Journal, vol. 9, nr 4, Parma. <http://www.efsa.europa.eu> [Dostęp: 02.03.2016]
73. EFSA, 2011b. *Scientific Report: Shiga toxin producing E.coli (STEC) O104:H4 outbreaks in Europe: Taking Stock*. EFSA Journal, vol. 9, nr 10, 2390. <http://www.efsa.europa.eu> [Dostęp: 03.03.2016]
74. EFSA, 2012. Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). *Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance*, EFSA Journal, vol. 10, nr 6, Parma. <http://www.efsa.europa.eu> [Dostęp: 12.03.2016]
75. EFSA, 2013. Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). *Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2013 update)*, EFSA Journal, vol. 11, nr 11, Parma. <http://www.efsa.europa.eu> [Dostęp: 15.03.2016]
76. EFSA, 2015. ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), *The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2013*. EFSA Journal, vol. 13, nr 3991. <http://www.efsa.europa.eu> [Dostęp: 02.06.2016]
77. Ehrmann, M.A., Kurzak, P., Bauer, J., Vogel, R.F., 2002. *Characterization of Lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry*. Journal of Applied Microbiology, vol. 92, nr 5, s. 966-975.
78. El Jeni, R., El Bour, M., Calo-Mata, P., Böehme, K., Fernandez-No, I., Barros-Velázquez, J., Bouhaouala-Zahar, B., 2015. *In-vitro probiotic profiling of novel Enterococcus faecium and Leuconostoc mesenteroides Lactic Acid Bacteria strains from Tunisian freshwater fishes*, vol. 85, nr 3, s. 193-204.
79. European Commission, 2012a. Food: From farm to fork statistics. 2011 edition, Eurostat Pocketbooks, Eurostat, European Commission, Publication Office of the European Union, Luksemburg.

80. Fairbrother, J. M., Nadeau, É., Gyles, C. L., 2005. *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Animal Health Research Reviews*, vol. 6, nr 1, s. 17-39.
81. FAO, 2016a. Food Outlook. *Biannual report on global food markets*, www.fao.org/publications [Dostęp: 1.11.2016]
82. FAO, 2016b. *Probiotics in animal nutrition – Production, impact and regulation*, Food and Agricultural Organization of the United Nations Animal Production and Health Paper, nr. 179, Rzym.
83. FAO/WHO, 2001a. *Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria*, Joint Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report, Kordoba, Argentyna.
84. FAO/WHO, 2001b. Codex Alimentarius Commission. *Food Hygiene basic texts*. Rzym.
85. FAO/WHO, 2002. *Guidelines for the evaluation of probiotics in food*, Joint Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Meeting Report, Londyn, Ontario, Kanada.
86. Fayol-Messaoudi, D., Berger, C. N., Coconnier-Polter, M. H., Lievin-Le Moal, V., Servin, A. L., 2005. *pH-, Lactic acid-, and non-lactic acid-dependent activities of probiotic Lactobacilli against Salmonella enterica Serovar Typhimurium*, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 71, nr 10, s. 6008-6013.
87. Federici, S., Ciarrocchi, F., Campana, R., Ciandrini, E., Blasi, G., Baffone, W., 2014. *Identification and functional traits of lactic acid bacteria isolated from Ciauscolo salami produced in Central Italy*. *Meat Science*, vol. 98, nr 4, s. 575-584.
88. Fonseca, F., Béal, C., Corrieu, G., 2000. *Method of quantifying the loss of acidification activity of lactic acid starters during freezing and frozen storage*. *Journal of Dairy Research*, vol. 67, nr 01, s. 83-90.
89. Fuller, R., 1989, *Probiotics in man and animals*, *Journal of Applied Bacteriology*, vol. 66, nr 5, s. 365-378.
90. Gaggia, F., Mattarelli, P., Biavati, B., 2010. *Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production*. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 141, s. 15-28.
91. Gagne, J., Roy, D., 1993, *Production of frozen and freeze dried concentrates of Bifidobacterium infantis by membrane filtration*, *Milchwissenschaft*, vol. 48, s. 501–505.
92. Gajewska, J., Masznicz, M., Rekiel, A., Batorska, M., Pawlicka, E., Wiecek, J., 2008. *Skład mikroflory kału prosiąt i tuczników otrzymujących dodatek preparatu probiotycznego i/lub kwasu benzoowego*. *Roczniki Naukowe Polskiego Towarzystwa Zootechnicznego*, vol. 4, nr 3, s. 165-174.

93. Gänzle, M.G., Hölzel, A., Walter, J., Jung, G., Hammes, W.P., 2000. *Characterization of reutericyclin produced by Lactobacillus reuteri LTH2584*. Applied and Environmental Microbiology, vol. 66, nr 10, s. 4325-4333.
94. Gilliland, S.E., Walker, D.K., 1990. *Factors to consider when selecting a culture of Lactobacillus acidophilus as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in humans*. Journal of Dairy Science, vol. 73, nr 4, s. 905-911.
95. Godlewska, R., Jagusztyn-Krynicka, E.K., 2006. *Magiczna pałeczka*. Academia, vol. 4, nr 8, s. 40-42.
96. Godziszewska, J., Guzek, D., Głąbski, K., Wierzbicka, A., 2016. *Mobilna antybiotykooporność - o rozprzestrzenianiu się genów determinujących oporność bakterii poprzez produkty spożywcze*. Postępy Higieny Medycyny Doświadczalnej, vol. 70, s. 803-810.
97. Gözl, G., Rosner, B., Hofreuter, D., Josenhans, C., Kreienbrock, L., Löwenstein, A., Schielke, A., Stark, K., Sauerbaum, S., Wieler, L., Alter, T., 2014. *Relevance of Campylobacter to public health—The need for a One Health approach*. International Journal of Medical Microbiology, vol. 304, nr 7, s. 817-823.
98. González, L., Sandoval, H., Sacristán, N., Castro, J.M., Fresno, J.M., Tornadijo, M.E., 2007. *Identification of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity*. Food Control, vol. 18, nr 6, s. 716-722.
99. Gouriet, F., Million, M., Henri, M., Fournier, P. E., Raoult, D., 2012. *Lactobacillus rhamnosus bacteremia: an emerging clinical entity*. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, vol. 31, nr 9, s. 2469-2480.
100. Grover, S., Rashmi, H.M., Srivastava, A.K., Batish, V.K., 2012. *Probiotics for human health—new innovations and emerging trends*. Gut Pathogens, vol. 4, nr 1, s. 1.
101. Gueimonde, M., Sánchez, B., de los Reyes-Gavilán, C.G., Margolles, A., 2013. *Antibiotic resistance in probiotic bacteria*. Frontiers in Microbiology. vol. 4, s. 1-6. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2013.00202/full> [Dostęp: 16.02.2016].
102. Guerra, N.P., Bernárdez, P.F., Méndez, J., Cachaldora, P., Castro, L.P., 2007. *Production of four potentially probiotic lactic acid bacteria and their evaluation as feed additives for weaned piglets*. Animal Feed Science and Technology, vol. 134, nr 1, s. 89-107.
103. Gunn, J. S., 2000. *Mechanisms of bacterial resistance and response to bile*. Microbes and Infection, vol. 2, nr. 8, s. 907-913.
104. Guo, X., Kim, J., Nam, H., Park, S., Kim, J., 2010. *Screening lactic acid bacteria from swine origins for multistrain probiotics based on in vitro properties*. Anaerobe, vol. 16, s. 321-326.
105. Guyard-Nicodéme, M., Rivoal, K., Houard, E., Rose, V., Quesne, S., Mourand, G., Rouxel, S., Kempf, I., Guillier, L., Gauchard, F., Chemaly, M., 2015. *Prevalence and characterization*

- of Campylobacter jejuni from chicken meat sold in French retail outlets*. International Journal of Food Microbiology, vol. 203, s. 8-14.
106. Gwiazdowska, D., Trojanowska, K., 2005. *Bakteriocyny–właściwości i aktywność przeciwdrobnoustrojowa*. Biotechnologia, vol. 1, nr 68, s. 114-130.
107. Hacin, B., Rogelj, I., Matijašić, B.B., 2008. *Lactobacillus isolates from weaned piglets' mucosa with inhibitory activity against common porcine pathogens*. Folia Microbiologica, vol. 53, nr 6, s. 569-576.
108. Haddad, N., Burns, C.M., Bolla, J.M., Prévost, H., Fédérighi, M., Drider, D., Cappelier, J.M., 2009. *Long-term survival of Campylobacter jejuni at low temperatures is dependent on polynucleotide phosphorylase activity*. Applied and Environmental Microbiology, vol. 75, nr 23, s. 7310-7318.
109. Haddadin, M., Abdulrahim, S., Hashlamoun, E., Robinson, R., 1996. The effect of Lactobacillus acidophilus on the production and chemical composition of hen's eggs. Poultry Science, vol. 75, nr 4, s. 491-494.
110. Han, J., Chen, D., Li, S., Li, X., Zhou, W. W., Zhang, B., Jia, Y., 2015. *Antibiotic Susceptibility of Potentially Probiotic Lactobacillus Strains*. Italian Journal of Food Science, vol. 27, nr 3, s. 282-289.
111. Han, J., Chen, D., Li, S., Li, X., Zhou, W.W., Zhang, B., Jia, Y., 2015. *Antibiotic susceptibility of potentially probiotic lactobacillus strains*. Italian Journal of Food Science, vol. 27, nr 3, s. 282-289.
112. Heczko, P.B., Strus, M., Kochan, P., 2008. *Projektowanie probiotyków do zastosowań medycznych*. Postępy Mikrobiologii, vol. 47, nr 3, s. 431-434.
113. Hellström, S., Laukkanen, R., et al., 2010, *Listeria monocytogenes contamination in pork can originate from farms*, Journal of Food Protection, vol. 73, nr 4, s.641-648.
114. Højberg, O., Canibe, N., Poulsen, H.D., Hedemann, M.S., Jensen, B.B., 2005. *Influence of dietary zinc oxide and copper sulfate on the gastrointestinal ecosystem in newly weaned piglets*. Applied and Environmental Microbiology, vol. 71, nr 5, s. 2267-2277.
115. Holt, P.S., Vaughn, L.E., Moore, R.W., Gast, R.K., 2006. *Comparison of Salmonella enterica serovar Enteritidis levels in crops of fed or fasted infected hens*. Avian Diseases, vol. 50, s. 425-429.
116. Holzapfel, W.H., Schillinger, U., 2002. *Introduction to pre-and probiotics*. Food Research International, vol. 35, nr 2, s. 109-116.
117. Hummel, A.S., Hertel, C., Holzapfel, W.H., Franz, C.M., 2007. *Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria*. Applied and Environmental Microbiology, vol. 73, nr 3, s. 730-739.

118. Hung, A. T., Lin, S. Y., Yang, T. Y., Chou, C. K., Liu, H. C., Lu, J. J., Lien, T. F., 2012, *Effects of Bacillus coagulans ATCC 7050 on growth performance, intestinal morphology, and microflora composition in broiler chickens*, Animal Production Science, vol. 52, nr 9, s. 874-879.
119. Ibrahim, S.A., Bezkorovainy, A., 1993. *Survival of bifidobacteria in the presence of bile salt*. Journal of the Science of Food and Agriculture, vol. 62, nr 4, s. 351-354.
120. Irving, W., Boswell, T., Ala'Aldeen, D., 2008. *Mikrobiologia medyczna—krótkie wykłady*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
121. Jach, M., Los, R., Maj, M., Malm, A., 2013. *Probiotyki-aspekty funkcjonalne i technologiczne*. Postępy Mikrobiologii, vol. 52, nr 2, s. 161-170.
122. Jackson, B.R., Griffin, P.M., Cole, D., Walsh, K.A., Chai, S.J., 2013. *Outbreak-associated Salmonella enterica serotypes and food commodities, United States, 1998–2008*. Emerging Infectious Diseases Journal, vol. 19, nr 8, s. 1239-1244.
123. Jacobsen, C.N., Nielsen, V.R., Hayford, A.E., Møller, P.L., Michaelsen, K.F., Paerregaard, A., Sandstrom, B., Tvede, M., Jakobsen, M., 1999. *Screening of probiotic activities of forty-seven strains of Lactobacillus spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans*. Applied and Environmental Microbiology, vol. 65, nr 11, s. 4949-4956.
124. Jagielski, M., 2010. *Etiologia, obraz kliniczny i diagnostyka ostrych zakażeń i zarażeń przewodu pokarmowego oraz zatruc pokarmowych*, Fundacja Pro Pharmacia Futura, Warszawa.
125. Janiec, W., Krupińska, J., 2002. *Farmakodynamika*. PZWL, Wydanie V, Warszawa.
126. Jin, L.Z., Ho, Y.W., Abdullah, N., Ali, M.A., Jalaludin, S., 1996. *Antagonistic effects of intestinal Lactobacillus isolates on pathogens of chicken*. Letters in Applied Microbiology, vol. 23, nr 2, s. 67-71.
127. Jin, L.Z., Ho, Y.W., Abdullah, N., Jalaludin, S., 1998. *Acid and bile tolerance of Lactobacillus isolated from chicken intestine*. Letters in Applied Microbiology, vol. 27, nr 3, s. 183-185.
128. Jin, L.Z., Ho, Y.W., Abdullah, N., Jalaludin, S., 2000. *Digestive and bacterial enzyme activities in broilers fed diets supplemented with Lactobacillus cultures*. Poultry science, vol. 79, nr 6, s. 886-891.
129. Jorgensen, J.H., Hindler, J.F., 2007. *New consensus guidelines from the Clinical and Laboratory Standards Institute for antimicrobial susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria*. Clinical Infectious Diseases, vol. 44, nr 2, s. 280-286.
130. Josefsen, M.H., Bhunia, A.K., Engvall, E.O., Fachmann, M.S., Hoorfar, J., 2015. *Monitoring Campylobacter in the poultry production chain—From culture to genes and beyond*. Journal of Microbiological Methods, vol. 112, nr 5, s. 118-125.

131. Julean, C., Stef, L., Drinceanu, D., Cean, A., Dragomirescu, M., Vintila, T., Gherasim, V., Corcionivoschi, N., 2014. *Lyophilisation of Probiotic Bacteria for Inclusion in Poultry Feed*. Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies, vol. 47, nr 2, s. 18-21.
132. Kaneuchi, C., Seki, M., Komagata, K., 1988. *Production of succinic acid from citric acid and related acids by Lactobacillus strains*. Applied and Environmental Microbiology, vol. 54, nr 12, s. 3053-3056.
133. Kantas, D., Papatsiros, V., Tassis, P., Giavasis, I., Bouki, P., Tzika, E., 2015. *A feed additive containing Bacillus toyonensis (Toyocerin®) protects against enteric pathogens in postweaning piglets*. Journal of Applied Microbiology, vol. 118, nr 3, s. 727-738.
134. Kanuganti, S. R., Wesley, I. V., et al., 2002, *Detection of Listeria monocytogenes in pigs and pork*, Journal of Food Protection, vol. 65, nr 9, s.1470-1474.
135. Kawai, Y., Ishii, Y., Arakawa, K., Uemura, K., Saitoh, B., Nishimura, J., Saito, T., 2004, *Structural and functional differences in two cyclic bacteriocins with the same sequences produced by lactobacilli*, Applied and Environmental Microbiology, vol. 70, nr 5, s. 2906-2911.
136. Khaksar, V., Golian, A., & Kermanshahi, H., 2012, *Immune response and ileal microflora in broilers fed wheat-based diet with or without enzyme Endofeed W and supplementation of thyme essential oil or probiotic PrimaLac?*, African Journal of Biotechnology, vol. 11, nr 81, s. 14716.
137. Khunajakr, N., Wongwicharn, A., Moonmangmee, D., Tantipaiboonvut, S., 2008. *Screening and identification of lactic acid bacteria producing antimicrobial compounds from pig gastrointestinal tracts*. KMITL Science and Technology Journal, vol. 8, nr 1, s. 8-17.
138. Kim, E.Y., Kim, Y.H., Rhee, M.H., Song, J.C., Lee, K.W., Kim, K.S., Lee, S.P., Lee I.S., Park, S.C., 2007. *Selection of Lactobacillus sp. PSC101 that produces active dietary enzymes such as amylase, lipase, phytase and protease in pigs*. The Journal of General and Applied Microbiology, vol. 53, nr 2, s. 111-117.
139. Kimoto-Nira, H., Suzuki, C., Sasaki, K., Kobayashi, M., Mizumachi, K., 2010. *Survival of a Lactococcus lactis strain varies with its carbohydrate preference under in vitro conditions simulated gastrointestinal tract*. International Journal of Food Microbiology, vol. 143, nr 3, s. 226-229.
140. Kizerwetter-Swida, M., Binek, M., 2005. *Selection of potentially probiotic Lactobacillus strains towards their inhibitory activity against poultry enteropathogenic bacteria*. Polish Journal of Microbiology, vol. 54, nr 4, s. 287-294.
141. Klewicka, E., Śliżewska, K., Nowak, A., 2014. *Ocena przeżywalności bakterii Lactobacillus zawartych w preparacie probiotycznym podczas pasażu w symulowanym przewodzie pokarmowym*. Żywność Nauka Technologia Jakość, vol. 21, nr 6.

142. Klingberg, T.D., Budde, B.B., 2006. *The survival and persistence in the human gastrointestinal tract of five potential probiotic lactobacilli consumed as freeze-dried cultures or as probiotic sausage*. International Journal of Food Microbiology, vol. 109, s. 157-159.
143. Klose, V., Bayer, K., Bruckbeck, R., Schatzmayr, G., Loibner, A.P., 2010. *In vitro antagonistic activities of animal intestinal strains against swine-associated pathogens*. Veterinary Microbiology, vol. 144, nr 3, s. 515-521.
144. Kong, S., Davison, A.J., 1980. *The role of interactions between O₂, H₂O₂, •OH, e⁻ and O₂⁻ in free radical damage to biological systems*. Archives of Biochemistry and Biophysics, vol. 204, nr 1, s. 18-29.
145. Konstantinov, S.R., Smidt H., Akkermans, A.D.L., Casini, L., Trevisi, P., Mazzoni, M., De Filippi, S., Bosi, P., de Vos, W., 2008, *Feeding of Lactobacillus sobrius reduces Escherichia coli F4 levels in the gut and promotes growth of infected piglets*, FEMS Microbiology Ecology, vol. 66, s. 599-607.
146. Kubiszewska, I., Januszewska, M., Rybka, J., Gackowska, L., 2014, *Bakterie kwasu mlekowego i zdrowie: czy probiotyki są bezpieczne dla człowieka?*, Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, vol. 68, s. 1325-1334.
147. Kumar, K.S., Sastry, N., Polaki, H., Mishra, V., 2015. *Colon cancer prevention through probiotics: an overview*. Journal of Cancer Science & Therapy, vol. 7, nr 2, s. 81-92.
148. Kunicki-Goldfinger, W.J.H, 2007. *Życie bakterii*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
149. Kurtoglu, V., Kurtoglu, F., Seker, E., Coskun, B., Balevi, T., Polat, E., 2004. *Effect of probiotic supplementation on laying hen diets on yield performance and serum and egg yolk cholesterol*. Food Additives and Contamination, vol. 21, nr 9, s. 817-823.
150. Kwiatek, K., Osinski, Z., Walczak, M., 2012. *Rejestracja dodatków paszowych w Unii Europejskiej*. Życie Weterynaryjne, vol. 5, nr 87.
151. Kyriakis, S., Tsioloyiannis, V., Vlemmas, J., Sarris, K., Tsinas, A., Alexopoulos, C., Jansegers, L., 1999. *The effect of probiotic LSP 122 on the control of post-weaning diarrhoea syndrome of piglets*. Research in Veterinary Science, vol. 67, nr 3, s. 223-228.
152. Landeta, G., Curiel, J.A., Carrascosa, A.V., Muñoz, R., De Las Rivas, B., 2013. *Technological and safety properties of lactic acid bacteria isolated from Spanish dry-cured sausages*. Meat Science, vol. 95, nr 2, s. 272-280.
153. Landy, N., Kavyani, A., 2015, *Effects of using a multi-strain probiotic on performance, immune responses and cecal microflora composition in broiler chickens reared under cyclic heat stress condition*, Iranian Journal of Applied Animal Science, vol. 3, nr 4, s. 703-708.
154. Latorre, J.D., Hernandez-Velasco, X., Kuttappan, V.A., Wolfenden, R.E., Vicente, J.L., Wolfenden, A.D., Bielke, L.R., Prado-Rebolledo, O.F., Morales, E., Hargis, B.M., Tellez, G.,

2015. *Selection of Bacillus spp. for cellulase and xylanase production as direct-fed microbials to reduce digesta viscosity and Clostridium perfringens proliferation using an in vitro digestive model in different poultry diets*. *Frontiers in Veterinary Science*, vol. 2, nr 25.
155. Lee, H.S., Gilliland, S.E., Carter, S., 2001. *Amylolytic cultures of Lactobacillus acidophilus: potential probiotics to improve dietary starch utilization*. *Journal of Food Science*, vol. 66, nr 2, s. 338-344.
156. Lei, X., Piao, X., Ru, Y., Zhang, H., Péron, A., Zhang, H., 2015. *Effect of Bacillus amyloliquefaciens-based direct-fed microbial on performance, nutrient utilization, intestinal morphology and cecal microflora in broiler chickens*. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, vol. 28, nr 2, s. 239-246.
157. Leroy, F., De Vuyst, L., 2004. *Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry*. *Trends in Food Science & Technology*, vol. 15, nr 2, s. 67-78.
158. Leser, T.D., Amenuvor, J.Z., Jensen, T.K., Lindecrona, R.H., Boye, M., Møller, K., 2002. *Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited*. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 68, nr 2, s. 673-690.
159. Leslie, S.B., Israeli, E., Lighthart, B., Crowe, J. H., Crowe, L. M., 1995, *Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying*, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 61, s. 3592–3597.
160. Leuschner, R.G., Robinson, T.P., Hugas, M., Cocconcelli, P.S., Richard-Forget, F., Klein, G., Licht, T.R., Nguyen-The, C., Querol, A., Suarez, J.E., Richardson, M., Thrane, U., Vlak, J.M., von Wright, A., 2010. *Qualified presumption of safety (QPS): a generic risk assessment approach for biological agents notified to the European Food Safety Authority (EFSA)*. *Trends in Food Science & Technology*, vol. 21, nr 9, s. 425-435.
161. Levy, S.B., Marshall, B., 2004. *Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses*. *Nature Medicine*, vol. 10, s. 122-129.
162. Ley, R.E., Hamady, M., Lozupone, C., Turnbaugh, P.J., Ramey, R.R., Bircher, J.S., Schlegel, M.L., Tucker, T.A., Schrenzer, M.D., Knight, R., Gordon, J.I., 2008. *Evolution of mammals and their gut microbes*. *Science*, vol. 320, nr 5883, s. 1647-1651.
163. Libudzisz, Z., 2008. *Mikroflora jelitowa, rola probiotyków w żywieniu*. *Żywność dla Zdrowia*, vol. 8, s. 3-4.
164. Libudzisz, Z., Klewicka, E., 2006. *Lactic Acid Bacteria in Probiotics Products*, *Zakażenia*, nr 4, s. 57-62.
165. Libudzisz, Z., Walczak, P., Bardowski, J., 1997. *Bakterie fermentacji mlekowej-klasyfikacja, metabolizm, genetyka, wykorzystanie*. *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny*, vol. 41, nr 07, s. 21-24.

166. Lilly, DM., Stillwell, RH., 1965, *Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms*, Science, vol. 147, s. 747-748.
167. Lin, W. H., Yu, B., Jang, S. H., Tsen, H. Y., 2007. *Different probiotic properties for Lactobacillus fermentum strains isolated from swine and poultry*. Anaerobe, vol. 13, nr 3, s. 107-113.
168. Liu, C., Zhang, Z. Y., Dong, K., Yuan, J. P., Guo, X.K., 2009. *Antibiotic resistance of probiotic strains of lactic acid bacteria isolated from marketed foods and drugs*. Biomedical and Environmental Sciences, vol. 22, nr 5, s. 401-412.
169. Liu, D., 2006. *Identification, subtyping and virulence determination of Listeria monocytogenes, an important foodborne pathogen*. Journal of Medical Microbiology, vol. 55, nr 6, s. 645-659.
170. Liu, J.R., Lai, S.F., Yu, B., 2007. *Evaluation of an intestinal Lactobacillus reuteri strain expressing rumen fungal xylanase as a probiotic for broiler chickens fed on a wheat-based diet*. British poultry science, vol. 48, nr 4, s. 507-514.
171. Livney, Y. D., 2010, *Milk proteins as vehicles for bioactives*, Current Opinion in Colloid and Interface Science, vol. 15, s. 73-83.
172. Lorca, G.L., Wadström, T., De Valdez, G.F., Ljungh, Å., 2001. *Lactobacillus acidophilus autolysins inhibit Helicobacter pylori in vitro*. Current microbiology, vol. 42, nr 1, s. 39-44.
173. Lozupone, C.A., Stombaugh, J.I., Gordon, J.I., Jansson J.K., Knight R., 2012. *Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota*. Nature, vol. 489, s. 220-230.
174. Lyon, W.J., Sethi, J.K., Glatz, B.A., 1993. *Inhibition of psychrotrophic organisms by propionicin PLG-1, a bacteriocin produced by Propionibacterium thoenii*. Journal of Dairy Science, vol. 76, nr 6, s. 1506-1513.
175. Macfarlane, S., Macfarlane, G.T., 2004. *Bacterial diversity in the human gut*. Advances in Applied Microbiology, vol. 54, s. 261-289.
176. Maćkiw, E., Korsak, D., Tomczuk, K., Stos, K., 2011. *Ocena stopnia kontaminacji bakteriami Campylobacter spp. produktów drobiarskich dostępnych w handlu detalicznym*. Bromatologia i Chemia Toksykologiczna, vol. 44, nr 3, s. 678-682.
177. Markets and Markets, 2016, *Probiotics in Animal Feed Market by Bacteria (Lactobacilli, Streptococcus Thermophiles, and Bifidobacteria), Livestock (Cattle, Poultry, Swine, and Aquaculture), Form (Dry and Liquid), Function (Yield, Immunity, and Productivity), and by Region - Global Forecast to 2021*, <http://www.marketsandmarkets.com/> [Dostęp: 15.09.2016].
178. Mathur, S., Singh, R., 2005. *Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review*. International Journal of Food Microbiology, vol. 105, nr 3, s. 281-295.
179. Mazur, E., 2002. *Założenia racjonalnej antybiotykoterapii*. Medycyna Rodzinna, vol. 2, nr 18, s. 89-93.

180. Medellin-Peña, M. J., Wang, H., Johnson, R., Anand, S., & Griffiths, M. W., 2007, *Probiotics affect virulence-related gene expression in Escherichia coli O157: H7*, Applied and Environmental Microbiology, vol. 73, nr 13, s. 4259-4267.
181. Menezes-Blackburn, D., Gabler, S., Greiner, R., 2015. *Performance of seven commercial phytases in an in vitro simulation of poultry digestive tract*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 63, nr 27, s. 6142-6149.
182. Meng, X.C., Stanton, C., Fitzgerald, G.F., Daly, C., Ross, R.P., 2008. *Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures*. Food Chemistry, vol. 106, nr 4, s. 1406-1416.
183. Minekus, M., 1998. *Development and validation of a dynamic model of the gastrointestinal tract: Ontwikkeling en validatie van een dynamisch maagdarm model*. Praca doktorska, Uniwersytet w Utrechcie, Holandia, publications.tno.nl/publication/34610561/x4f73v/minekus-1998-development.pdf [Dostęp: 08.09.2015].
184. Mishra, V., Prasad, D.N., 2005. *Application of in vitro methods for selection of Lactobacillus casei strains as potential probiotics*. International Journal of Food Microbiology, vol. 103, nr 1, s. 109-115.
185. Missotten, J.A.M., Goris, J., Michiels, J., Van Coillie, E., Herman, L., De Smet, S., Derick, N.A., Heyndrickx, M., 2009. *Screening of isolated lactic acid bacteria as potential beneficial strains for fermented liquid pig feed production*. Animal Feed Science and Technology, vol. 150, nr 1, s. 122-138.
186. Mizak, L., Gryko, R., Kwiatek, M., Parasion, S., 2012. *Probiotyki w żywieniu zwierząt*. Życie Weterynaryjne, vol. 87, nr 09, s. 736-742.
187. Modesto M., D'Aimmo M.R., Stefanini I., Trevisi P., De Filippi S., Casini L., Mazzoni M., Bosi P., Biavati B., 2009, *A novel strategy to select Bifidobacterium strains and prebiotics as natural growth promoters in newly weaned pigs*, Livestock Science, vol.122, s. 248-258.
188. Monteagudo-Mera, A., Rodríguez-Aparicio, L., Rúa, J., Martínez-Blanco, H., Navasa, N., García-Armesto, M.R., Ferrero, M.Á., 2012. *In vitro evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin*. Journal of Functional Foods, vol. 4, nr 2, s. 531-541.
189. Mookiah, S., Sieo, C. C., Ramasamy, K., Abdullah, N., Ho, Y. W., 2014, *Effects of dietary prebiotics, probiotic and synbiotics on performance, caecal bacterial populations and caecal fermentation concentrations of broiler chickens*, Journal of the Science of Food and Agriculture, vol. 94, nr 2, s. 341-348.
190. Morandi, S., Silvetti, T., Miranda Lopez, J.M., Brasca, M., 2015. *Antimicrobial activity, antibiotic resistance and the safety of lactic acid bacteria in raw milk Valtellina Casera cheese*. Journal of Food Safety, vol. 35, nr 2, s. 193-205.

191. Morata de Ambrosini, V.I., Gonzalez, S.N., Oliver, G., 1999. *Study of adhesion of Lactobacillus casei CRL 431 to ileal intestinal cells of mice*. Journal of Food Protection, vol. 62, nr 12, s. 1430-1434.
192. Moslehishad, M., Mirdamadi, S., Ehsani, M.R., Ezzatpanah, H., Moosavi-Movahedi, A.A., 2013. *The proteolytic activity of selected lactic acid bacteria in fermenting cow's and camel's milk and the resultant sensory characteristics of the products*. International Journal of Dairy Technology, vol. 66, nr 2, s. 279-285.
193. Moubareck, C., Gavini, F., Vaugien, L., Butel, M.J., Doucet-Populaire, F., 2005. *Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, vol. 55, nr 1, s. 38-44.
194. Mountzouris, K. C., Balaskas, C., Xanthakos, I., Tzivinikou, A., Fegeros, K., 2009, *Effects of a multi-species probiotic on biomarkers of competitive exclusion efficacy in broilers challenged with Salmonella enteritidis*, British Poultry Science, vol. 50, nr 4, s. 467-478.
195. Mountzouris, K. C., Tsirtsikos, P., Kalamara, E., Nitsch, S., Schatzmayr, G., & Fegeros, K., 2007. *Evaluation of the efficacy of a probiotic containing Lactobacillus, Bifidobacterium, Enterococcus, and Pediococcus strains in promoting broiler performance and modulating cecal microflora composition and metabolic activities*, Poultry Science, vol. 86, nr 2, s. 309-317.
196. Mountzouris, K. C., Tsirtsikos, P., Palamidi, I., Arvaniti, A., Mohnl, M., Schatzmayr, G., Fegeros, K., 2010, *Effects of probiotic inclusion levels in broiler nutrition on growth performance, nutrient digestibility, plasma immunoglobulins, and cecal microflora composition*, Poultry Science, vol. 89, nr 1, s. 58-67.
197. Musikasang, H., Tani, A., H-kittikun, A., Maneerat, S., 2009. *Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from chicken gastrointestinal digestive tract*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, vol. 25, nr 8, s. 1337-1345.
198. Naito, S., Hayashidani, H., Kaneko, K., Ogawa, M., Benno, Y., 1995. *Development of intestinal lactobacilli in normal piglets*. Journal of Applied Bacteriology, vol. 79, nr 2, s. 230-236.
199. Nakai, S. A., Siebert, K. J., 2003. *Validation of bacterial growth inhibition models based on molecular properties of organic acids*. International journal of food microbiology, vol. 86, nr 3, s. 249-255.
200. Nakai, S.A., Siebert, K.J., 2003. *Validation of bacterial growth inhibition models based on molecular properties of organic acids*. International journal of food microbiology, vol. 86, nr 3, s. 249-255.

201. Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego - Państwowy Zakład Higieny, 2016. *Meldunki o zachorowaniach na choroby zakaźne, zakażeniach i zatruciach w Polsce* <http://www.pzh.gov.pl/> [Dostęp 3.11.2016]
202. Neffe, K., Kołożyn-Krajewska, D., 2010. *Możliwości zastosowania bakterii probiotycznych w dojrzewających produktach mięsnych*. *Żywność Nauka Technologia Jakość*, vol. 17, nr 5, s. 167-177.
203. Niba, A., Beal, J., Kudi, A., Brooks, P., 2009. *Bacterial fermentation in the gastro-intestinal tract of non-ruminants: influence of fermented feeds and fermentable carbohydrates*. *Tropical Animal Health and Production*, vol. 41, nr 7, s. 1393-1407.
204. Nisha, A.R., 2008. *Antibiotic residues-a global health hazard*. *Vet World*, vol. 1, nr 12, s. 375-377.
205. Nowak, A., Śliżewska, K., Libudzisz, Z., 2010. *Probiotyki-historia i mechanizmy działania*. *Żywność Nauka Technologia Jakość*, vol. 17, nr 4, s. 5-19.
206. Nowak, A., Śliżewska, K., Libudzisz, Z., Socha, J., 2010. *Probiotyki-efekty zdrowotne*. *Żywność Nauka Technologia Jakość*, vol. 17, nr 4, s. 20-36.
207. Nowicka, P., Wojdyło, A., Oszmianski, J., 2014. *Zagrożenia powstające w żywności minimalnie przetworzonej i skuteczne metody ich eliminacji*. *Żywność Nauka Technologia Jakość*, vol. 21, nr 2, s. 5-18.
208. Ocaña, V., Silva, C., Nader-Macías, M.E., 2006. *Antibiotic susceptibility of potentially probiotic vaginal lactobacilli*. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, s. 1-6.
209. Oda, Y., Saito, K., Yamauchi, H., Mori, M., 2002. *Lactic acid fermentation of potato pulp by the fungus *Rhizopus oryzae**, *Current Microbiology*, vol. 45, s. 1-4.
210. Ohl, M.E., Miller, S.I., 2001. *Salmonella: a model for bacterial pathogenesis*. *Annual Review of Medicine*, vol. 52, nr 1, s. 259-274.
211. Olympia, M., Fukuda, H., Ono, H., Kaneko, Y., Takano, M., 1995. *Characterization of starch-hydrolyzing lactic acid bacteria isolated from a fermented fish and rice food, "Burong Isda", and its amylolytic enzyme*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, vol. 80, nr 2, s. 124-130.
212. Özcelik, S., Kuley, E., Özogul, F., 2016. *Formation of lactic, acetic, succinic, propionic, formic and butyric acid by lactic acid bacteria*. *LWT-Food Science and Technology*, vol. 73, s. 536-542.
213. Panda, A., Reddy, M., Rao, S. R., Praharaj, N., 2003. *Production performance, serum/yolk cholesterol and immune competence of white leghorn layers as influenced by dietary supplementation with probiotic*. *Tropical Animal Health and Production*, vol. 35, nr 1, s. 85-94.

214. Pang, H., Qin, G., Tan, Z., Li, Z., Wang, Y., Cai, Y., 2011. *Natural populations of lactic acid bacteria associated with silage fermentation as determined by phenotype, 16S ribosomal RNA and recA gene analysis*. Systematic and Applied Microbiology, vol. 34, nr 3, s. 235-241.
215. Parker, R. B., 1974, *Probiotics: the other half of the antibiotic story*, Animal Nutrition Health, vol. 29, s. 4-8.
216. Patterson, J.A., Burkholder, K.M., 2003. *Application of prebiotics and probiotics in poultry production*. Poultry Science, vol. 82, nr 4, s. 627-631.
217. Pérez-Sánchez, T., Balcázar, J.L., García, Y., Halaihel, N., Vendrell, D., De Blas, I., Merrifield, D.L., Ruiz-Zarzuela, I., 2011. *Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with inhibitory activity against *Lactococcus garvieae**. Journal of Fish Diseases, vol. 34, nr 7, s. 499-507.
218. Petsuriyawong, B., Khunajakr, N., 2011. *Screening of probiotic lactic acid bacteria from piglet feces*. Kasetsart Journal Natural Science, vol. 45, s. 245-253.
219. Pfeiler E., Klaenhammer T., 2007. *The genomics of lactic acid bacteria*. Trends in Microbiology, vol. 15, s. 546-553.
220. Pinto, M.G. V., Franz, C.M., Schillinger, U., Holzapfel, W.H., 2006. *Lactobacillus spp. with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products*. International Journal of Food Microbiology, vol. 109, nr 3, s. 205-214.
221. Pitino, I., Randazzo, C.L., Mandalari, G., Lo Curto, A., Faulks, R.M., Le Marc, Y., Bisignano, C., Caggia, C., Wickham, M.S.J., 2010. *Survival of Lactobacillus rhamnosus strains in the upper gastrointestinal tract*. Food Microbiol, vol. 27, s. 1121-1127.
222. Podkówka, Z., Podkówka, W., 1999. *Probiotyki w żywieniu świń. Trzoda Chlewna*, vol. 5, s. 35-37.
223. Porwollik, S., Boyd, E.F., Choy, C., Cheng, P., Florea, L., Proctor, E., McClelland, M., 2004. *Characterization of Salmonella enterica subspecies I genovars by use of microarrays*. Journal of Bacteriology, vol. 186, nr 17, s. 5883-5898.
224. Pringsulaka, O., Rueangyotchanthana, K., Suwannasai, N., Watanapokasin, R., Amnueysit, P., Sunthornthummas, S., Sukkhum, S., Sarawaneeyaruk, S., Rangsiruji, A., 2015. *In vitro screening of lactic acid bacteria for multi-strain probiotics*. Livestock Science, vol. 174, s. 66-73.
225. Raghavendra, P., Halami, P.M., 2009. *Screening, selection and characterization of phytic acid degrading lactic acid bacteria from chicken intestine*. International Journal of Food Microbiology, vol. 133, nr 1, s. 129-134.
226. Rahman, M. S., Mustari, A., Salauddin, M., & Rahman, M. M., 2014, *Effects of probiotics and enzymes on growth performance and haematobiochemical parameters in broilers*, Journal of the Bangladesh Agricultural University, vol. 11, nr 1, s. 111-118.

227. Raport of a Joint FAO/ WHO Expert Consultation, 2001, *Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria*, Córdoba, Argentyna, s. 1-34.
228. Rautray, A.K., Patra, R.C., Sardar, K.K., Sahoo, G., 2011. *Potential of probiotics in livestock production*. Medical Research, vol. 1, nr 1, s. 20-28.
229. Ray, B., 2001. *Fundamental food microbiology*. CRC Press Taylor & Francis Group, USA.
230. Reig, M., Toldrá, F., 2008. *Veterinary drug residues in meat: Concerns and rapid methods for detection*. Meat Science, vol. 78, nr 1, s. 60-67.
231. Ripamonti, B., Agazzi, A., Bersani, C., De Dea, P., Pecorini, C., Pirani, S., Rebucci, R., Savoini, G., Stella, S., Stenico, A., Tirloni, E., Domeneghini, C., 2011, *Screening of species-specific lactic acid bacteria for veal calves multi-strain probiotic adjuncts*. Anaerobe, vol. 17, s. 97-105.
232. Romero-Barrios, P., Hempen, M., Messens, W., Stella, P., Hugas, M., 2013. *Quantitative microbiological risk assessment (QMRA) of food-borne zoonoses at the European level*. Food Control, vol. 29, nr 2, s. 343-349.
233. Rönkä, E., Malinen, E., Saarela, M., Rinta-Koski, M., Aarnikunnas, J., Palva, A., 2003. *Probiotic and milk technological properties of Lactobacillus brevis*. International Journal of Food Microbiology, vol. 83, nr 1, s. 63-74.
234. Roofchae, A., Irani, M., Ebrahimzadeh, M.A., Akbari, M.R., 2011. *Effect of dietary oregano (Origanum vulgare L.) essential oil on growth performance, cecal microflora and serum antioxidant activity of broiler chickens*. African Journal of Biotechnology, vol. 10, nr 32, s. 6177-6183.
235. Rosenberg, M., Gutnick, D., Rosenberg, E., 1980. *Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity*. FEMS Microbiology letters, vol. 9, nr 1, s. 29-33.
236. Rozporządzenie (WE) nr 178/2002 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 28 stycznia 2002 r. ustanawiające ogólne zasady i wymagania prawa żywnościowego, powołujące Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności oraz ustanawiające procedury w zakresie bezpieczeństwa żywności, Dz.U. L 031, 01/02/2002, poz. 0001- 0024.
237. Rozporządzenie (WE) nr 767/2009 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 13 lipca 2009 r. w sprawie wprowadzania na rynek i stosowania pasz, zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1831/2003 Parlamentu Europejskiego i Rady i uchylające dyrektywę Rady 79/373/EWG, dyrektywę Komisji 80/511/EWG, dyrektywy Rady 82/471/EWG, 83/228/EWG, 93/74/EWG, 93/113/WE i 96/25/WE oraz decyzję Komisji 2004/217/WE, Dz.U. 229, 1/9/2009, poz. 1-28.

238. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1831/2003 z dnia 22 sierpnia 2003r. w sprawie dodatków stosowanych w żywieniu zwierząt, Dz.U. L 268, 18/10/2003, poz. 0029-0043.
239. Rożynek, E., Dzierzanowska-Fangrat, K., Jozwiak, P., Popowski, J., Korsak, D., Dzierzanowska, D., 2005. *Prevalence of potential virulence markers in Polish Campylobacter jejuni and Campylobacter coli isolates obtained from hospitalized children and from chicken carcasses*. Journal of Medical Microbiology, vol. 54, nr 7, s. 615-619.
240. Rzepkowska, A., Zielińska, D., Kołożyn-Krajewska, D., 2014. *Antybiotykooporność bakterii z rodzaju Lactobacillus pochodzących z żywności, jako kryterium stawiane probiotykom*. Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych, nr 578, s. 99-110.
241. Saeed, R.M., Elyas, Y.Y.A., Yousif, N.M.E., Eltayeb, M.M., Ahmed, I.A.M., 2014. *Incidence of Antibiotic Resistance of Lactic Acid Bacteria (LAB) Isolated from Various Sudanese Fermented Foods*. Journal of Food and Nutritional Disorders, s. 3-6.
242. Sahadeva, R.P.K., Leong, S.F., Chua, K.H., Tan, C.H., Chan, H.Y., Tong, E.V., Wong, S.Y.W, Chan, H.K., 2011. *Survival of commercial probiotic strains to pH and bile*. International Food Research Journal, vol. 18, nr 4, s. 1515-1522.
243. Samli, H. E., Dezman, S., Koc, F., Ozduven, M. L., Okur, A. A., & Senkoğlu, N., 2010, *Effects of Enterococcus faecium supplementation and floor type on performance, morphology of erythrocytes and intestinal microbiota in broiler chickens*, British Poultry Science, vol. 51, nr 4, s. 564-568.
244. Sanni, A.I., Morlon-Guyot, J., Guyot, J.P., 2002. *New efficient amylase-producing strains of Lactobacillus plantarum and L. fermentum isolated from different Nigerian traditional fermented foods*. International Journal of Food Microbiology, vol. 72, nr 1, s. 53-62.
245. Sato, T., Iino, T., 2010. *Genetic analyses of the antibiotic resistance of Bifidobacterium bifidum strain Yakult YIT 4007*. International Journal of Food Microbiology, vol. 137, s. 254-258.
246. Savadogo, A., Ouattara, A.C., Bassole, H.I., Traore, S.A., 2006. *Bacteriocins and lactic acid bacteria-a minireview*. African Journal of Biotechnology, vol. 5, nr 9, s. 678-683.
247. Sawitzki, M.C., Fiorentini, Â.M., Brod, F.C.A., Tagliari, C., Bertol, T.M., Arisi, A.C.M., Sant'Anna, E.S., 2007. *Phenotypic characterization and species-specific PCR of promising starter culture strains of Lactobacillus plantarum isolated from naturally fermented sausages*. Brazilian Journal of Microbiology, vol. 38, s. 547-552.
248. Scharek, L., Altherr, B.J., Tolke, C., Schmidt, M.F., 2007, *Influence of the probiotic Bacillus cereus var. toyoi on the intestinal immunity of piglets*, Veterinary Immunology and Immunopathology, vol. 120, s. 136-147.

249. Schlech, III, W.F., Lavigne, P.M., Bortolussi, R.A., Allen, A.C., Haldane, E.V., Wort, A.J., Hightower, A.W., Johnson, S.E., King, S.H., Nicholls, E.S., Broome, C.V. 1983, *Epidemic listeriosis-evidence for transmission by food*, The New England Journal of Medicine, vol. 308, nr 4, s. 203-206.
250. Schlegel, H.G., 2004. *Mikrobiologia ogólna*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
251. Schrezenmeir, J., de Vrese, M., 2001. *Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition*. The American Journal of Clinical Nutrition, vol. 73, nr 2, s. 361-364.
252. Scotland, S.M., Rowe, B., Smith, H.R., Willshaw, G.A., Gross, R.J., 1988. *Vero cytotoxin-producing strains of Escherichia coli from children with haemolytic uraemic syndrome and their detection by specific DNA probes*. Journal of Medical Microbiology, vol. 25, nr 4, s. 237-243.
253. Shah, N.P., Ravula, R.R., 2000. *Microencapsulation of probiotic bacteria and their survival in frozen fermented dairy desserts*. Australian Journal of Dairy Technology, vol. 55, s. 139-144.
254. Shim, Y. H., Ingale, S. L., Kim, J. S., Kim, K. H., Seo, D. K., Lee, S. C., Kwon, I. K., 2012, *A multi-microbe probiotic formulation processed at low and high drying temperatures: effects on growth performance, nutrient retention and caecal microbiology of broilers*, British Poultry Science, vol. 53, nr 4, s. 482-490.
255. Śliżewska, K., Biernasiak, J., Libudzisz, Z., 2006. *Probiotyki jako alternatywa dla antybiotyków*. Zeszyty Naukowe Politechniki Łódzkiej. Technologia i Chemia Spożywcza, vol. 70, s. 79-91.
256. Słomski, R., Szalata, M., Walkowiak, B., 2011. *Elektroforeza kwasów nukleinowych*, w: Słomski, R. (red.), *Analiza DNA teoria i praktyka*, Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Poznań, s. 65-81.
257. Słomski, R., Szalata, M., Wielgus, K., 2011. *Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR)*, w: Słomski, R. (red.), *Analiza DNA teoria i praktyka*, Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Poznań, s. 131-143.
258. Smet, I., Hoorde, L., Woestyne, M., Christiaens, H., Verstraete, W., 1995. *Significance of bile salt hydrolytic activities of lactobacilli*. Journal of Applied Bacteriology, vol. 79, nr 3, s. 292-301.
259. Smet, I., Hoorde, L., Woestyne, M., Christiaens, H., Verstraete, W., 1995. *Significance of bile salt hydrolytic activities of lactobacilli*. Journal of Applied Bacteriology, vol. 79, nr 3, s. 292-301.
260. Smirnoff, N. and Cumbes, Q. J., 1989, *Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes*, Phytochemistry, vol. 28, s. 1057–1060.

261. Sofyan, A., Aswari, A. N., Purwoko, T., Damayanti, E., 2013. *Screening of Lactic Acid Bacteria from Rumen Liquor and King Grass Silage as well as Their Antibacterial Activities*. Media Peternakan-Journal of Animal Science and Technology, vol. 36, nr 3, s. 216-223.
262. Sperti, G.S., 1971. *Probiotics*. The Avi Publishing Company Inc., West Point, Connecticut.
263. Strasser, S., Neureiter, M., Geppl, M., Braun, R., & Danner, H., 2009. *Influence of lyophilization, fluidized bed drying, addition of protectants, and storage on the viability of lactic acid bacteria*. Journal of Applied Microbiology, vol. 107, nr 1, s. 167-177.
264. Svetoch, E.A., Eruslanov, B.V., Levchuk, V.P., Perelygin, V.V., Mitsevich, E.V., Mitsevich, I.P., Stepanshin, J., Dyatlov, I., Seal B.S., Stern N.J., 2011. *Isolation of Lactobacillus salivarius 1077 (NRRL B-50053) and characterization of its bacteriocin, including the antimicrobial activity spectrum*. Applied Environmental Microbiology, vol. 77, nr 8, s. 2749-2754.
265. Swanenburg, M., Urlings, H.A., Snijders, J.M., Keuzenkamp, D.A., van Knapen, F., 2001. *Salmonella in slaughter pigs: prevalence, serotypes and critical control during slaughter in two slaughterhouses*. International Journal of Food Microbiology, vol. 70, s. 243-254.
266. Swords, W.E., Wu, C.C., Champlin, F.R., Buddington, R.K., 1993. *Postnatal changes in selected bacterial groups of the pig colonic microflora*. Neonatology, vol. 63, nr 3, s. 191-200.
267. Taheri, H., Tabandeh, F., Moravej, H., Zaghari, M., Shivazad, M., Shariati, P., 2009b. *Potential probiotic of Lactobacillus johnsonii LT171 for chicken nutrition*. African Journal of Biotechnology, vol. 8, nr 21, s.5833-5837.
268. Taheri, H.R., Moravej, H., Tabandeh, F., Zaghari, M., Shivazad, M., 2009a. *Screening of lactic acid bacteria toward their selection as a source of chicken probiotic*. Poultry Science, vol. 88, nr 8, s. 1586-1593.
269. Takahashi S., Egawa Y., Simojo N., Tsukahara T., Ushida K., 2007, *Oral administration of Lactobacillus plantarum strain Lq80 to weaning piglets stimulates the growth of indigenous lactobacilli to modify the lactobacillal population*, Journal of General and Applied Microbiology, vol. 53, s. 325-332.
270. Takanashi, S., Miura, A., Abe, K., Uchida, J., Itoi, S., Sugita, H., 2014. *Variations in bile tolerance among Lactococcus lactis strains derived from different sources*. Folia Microbiologica, vol. 59, nr 4, s. 289-293.
271. Tannock, G., 1999. *Identification of Lactobacilli and Bifidobacteria*. Current Issues Intestinal Microbiology, vol. 1, s. 53-64.
272. Tannock, G.W., 2004. *A special fondness for lactobacilli*. Applied and Environmental Microbiology, vol. 70, nr 6, s. 3189-3194.
273. Taras, D., Vahjen, W., Macha, M., Simon, O., 2005. *Response of performance characteristics and faecal consistency to long-lasting dietary supplementation with the probiotic strain*

- Bacillus cereus* var. *toyoi* to sows and piglets. Archives of Animal Nutrition, vol. 59, nr 6, s. 405-417.
274. Temmerman, R., Pot, B., Huys, G., Swings, J., 2003. *Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products*. International Journal of Food Microbiology, vol. 81, nr 1, s. 1-10.
275. Thanassi, D.G., Cheng, L.W., Nikaido, H., 1997. *Active efflux of bile salts by Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, vol. 179, nr 8, s. 2512-2518.
276. Tharmaraj, N., Shah, N.P., 2003. *Selective enumeration of Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus, Streptococcus thermophilus, Lactobacillus acidophilus, bifidobacteria, Lactobacillus casei, Lactobacillus rhamnosus, and propionibacteria*. Journal of Dairy Science, vol. 86, nr 7, s. 2288-2296.
277. Theron, M.M., Lues, J.F.R., 2011. *Organic acids and food preservation*. CRC Press Taylor & Francis Group, USA.
278. Thévenot, D., Delignette-Muller, M. L., Christieans, S., Leroy, S., Kodjo, A., Vernozy-Rozand, C., 2006, *Serological and molecular ecology of Listeria monocytogenes isolates collected from 13 French pork meat salting-curing plants and their products*, International Journal of Food Microbiology, vol. 112, nr 2, s. 153-161.
279. Timmerman, H.M., Koning, C.J.M., Mulder, L., Rombouts, F.M., Beynen, A.C., 2004. *Monostrain, multistrain and multispecies probiotics: A comparison of functionality and efficacy*. International Journal of Food Microbiology, vol. 96, nr 3, s. 219-233.
280. Torshizi, M.K., Rahimi, S., Mojgani, N., Esmailkhanian, S., Grimes, J. L., 2008. *Screening of indigenous strains of lactic acid bacteria for development of a probiotic for poultry*. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, vol. 21, nr 10, s. 1495-1500.
281. Trafalska, E., Grzybowska, K., 2004. *Probiotyki- Alternatywa dla antybiotyków?*. Wiadomości Lekarskie, vol. 57, nr 9-10, s. 491-498.
282. Transparency Market Research, 2015, *Probiotics Market (Dietary Supplements, Animal Feed, Foods & Beverages): Global Industry Analysis, Market Size, Share, Trends, Analysis, Growth and Forecast*, <http://www.transparencymarketresearch.com/> [Dostęp: 2.09.2016].
283. Tuohy, K.M., Rouzaud, G.C.M., Bruck, W.M., Gibson, G.R., 2005. *Modulation of the human gut microflora towards improved health using prebiotics-assessment of efficacy*. Current Pharmaceutical Design, vol. 11, nr 1, s. 75-90.
284. Tynkkynen, S., Singh, K.V., Varmanen, P., 1998. *Vancomycin resistance factor of Lactobacillus rhamnosus GG in relation to enterococcal vancomycin resistance (van) genes*. International Journal of Food Microbiology, vol. 41, nr 3, s. 195-204.
285. Uroić, K., Nikolić, M., Kos, B., Leboš Pavunc, A., Beganović, J., Lukić, J., Topisirović, L., 2014. *Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Croatian fresh soft cheese*

- and Serbian white pickled cheese. Food Technology and Biotechnology, vol. 52, nr 2, s. 232-241.
286. Ustawa z 25 sierpnia 2006 r. o bezpieczeństwie żywności i żywienia, Dz.U., nr 171, poz. 1225.
287. Van Coillie, E., Goris, J., Cleenwerck, I., Grijspeerdt, K., Botteldoorn, N., Van Immerseel, F., De Buck, J., Vancaneyt, M., Swings, J., Herman, L., Heyndrickx, M., 2007. *Identification of lactobacilli isolated from the cloaca and vagina of laying hens and characterization for potential use as probiotics to control Salmonella Enteritidis*. Journal of Applied Microbiology, vol. 102, nr 4, s. 1095-1106.
288. Van Hai, N., Buller, N., Fotedar, R., 2009. *The use of customised probiotics in the cultivation of western king prawns (Penaeus latisulcatus Kishinouye, 1896)*. Fish & Shellfish Immunology, vol. 27, nr 2, s. 100-104.
289. Van Winsen, R.L., Urlings, B.A., Lipman, L.J., Snijders, J.M., Keuzenkamp, D., Verheijden, J.H., van Knapen, F., 2001. *Effect of fermented feed on the microbial population of the gastrointestinal tracts of pigs*. Applied and Environmental Microbiology, vol. 67, nr 7, s. 3071-3076.
290. Versantvoort, C.H., Oomen, A.G., Van de Kamp, E., Rompelberg, C.J., Sips, A.J., 2005. *Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food*. Food and Chemical Toxicology, vol. 43, nr 1, s. 31-40.
291. Vlková, E., Rada, V., Popelářová, P., Trojanová, I., Killer, J., 2006. *Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria isolated from gastrointestinal tract of calves*. Livestock Science, vol. 105, nr 1, s. 253-259.
292. Vondruskova, H., Slamova, R., Trckova, M., Zraly, Z., Pavlik, I., 2010. *Alternatives to antibiotic growth promoters in prevention of diarrhoea in weaned piglets: a review*. Veterinarni Medicina, vol. 55, nr 5, s. 199-224.
293. Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.H., Whitman, W., 2009. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes*. Springer Science & Business Media, USA.
294. Vu, H., McCoy, L.F., Carino, E., Washington, J., Dang, T., Villarreal, C., Resenblatt, J., Maness, C., Goodheart, R., Heggors, J.P., 2002. *Burn Wound Infection Susceptibilities To Topical Agents: The Nathan's Agar Well Diffusion Technique*. Pharmacy and Therapeutics, vol. 27, nr 8, s. 390-396.
295. Wadström, T., Andersson, K., Sydow, M., Axelsson, L., Lindgren, S., Gullmar, B., 1987. *Surface properties of lactobacilli isolated from the small intestine of pigs*. Journal of Applied Bacteriology, vol. 62, nr 6, s. 513-520.

296. Wang, J., Ji, H., Zhang, D., Liu, H., Wang, S., Shan, D., Wang, Y., 2011. *Assessment of probiotic properties of Lactobacillus plantarum ZLP001 isolated from gastrointestinal tract of weaning pigs*. African Journal of Biotechnology, vol. 10, nr. 54, s. 11303-11308.
297. Wang, Y. C., Yu, R. C., Chou, C. C., 2004. *Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage*, International Journal of Food Microbiology, vol. 93, nr 2, s. 209-217.
298. Wee, Y. J., Kim, J. N., Ryu, H. W., 2006. *Biotechnological production of lactic acid and its recent applications*. Food Technology and Biotechnology, vol. 44, nr 2, s. 163-172.
299. Wegener, H.C., 2003. *Antibiotics in animal feed and their role in resistance development*. Current Opinion in Microbiology, vol. 6, nr 5, s. 439-445.
300. WHO, 2015. Food safety-Fact sheet N 399, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/en/> [Dostęp: 02.02.2016].
301. Wieczorek, K., Osek, J., 2010. *Występowanie Campylobacter spp. w stadach oraz w tuszach brojlerów w krajach Unii Europejskiej w świetle badań monitoringowych*. Życie Weterynaryjne, vol. 85, nr 6, s. 534-537.
302. Wieczorek, K., Szewczyk, R., Osek, J., 2012. *Prevalence, antimicrobial resistance, and molecular characterization of Campylobacter jejuni and C. coli isolated from retail raw meat in Poland*. Veterinarni Medicina, vol. 57, nr 6, s. 293-299.
303. Woźniak-Kosek, A., Jarosz, M., 2005. *Probiotyki a prewencja i leczenie chorób przewodu pokarmowego człowieka*. Żywnienie Człowieka i Metabolizm, vol. 32, nr 4, str. 366-375.
304. Yang, H. L., Liu, Y., Xu, S. C., Li, Y. L., Xu, Y. X., 2012, *Influence of symbiotics on the bacterial community in the cecal contents of broilers analyzed by PCR-DGGE*, Acta Agriculturae Zhejiangensis, vol. 1, s. 005.
305. Yang, X.J. Brisbin, H.Y., Wang, Q., Yin, F., Zhang, Y., Sabour, P., Sharif, S., Gong, J., 2014. *Selected lactic acid-producing bacterial isolates with the capacity to reduce Salmonella translocation and virulence gene expression in chickens*. PloS one, vol. 9, nr 4. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0093022> [Dostęp: 23.06.2016]
306. Yatsunencko, T., Rey, F.E., Manary, M.J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M.G., Contreras, C., Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, R.N., Anokhin, A.P., Heath, A.C., Warner, B., Reeder, J., Kuczynski, J., Caporaso, J.G., Lozupone, C.A., Lauber, C., Clemente, J.C., Knights, D., Knight, R., Gordon, J.I., 2012. *Human gut microbiome viewed across age and geography*. Nature, vol. 486, s. 222-227.
307. Yousefi, M., Karkoodi, K., 2007. *Effect of probiotic Thepax® and Saccharomyces cerevisiae supplementation on performance and egg quality of laying hens*. International Journal of Poultry Science, vol. 6, nr 1, s. 52-54.

308. Yu, B., Liu, J.R., Hsiao, F.S., Chiou, P.W.S., 2008. *Evaluation of Lactobacillus reuteri Pg4 strain expressing heterologous β -glucanase as a probiotic in poultry diets based on barley*. Animal Feed Science and Technology, vol. 141, nr 1, s. 82-91.
309. Yu, B., Tsen, H.Y., 1993. *Lactobacillus cells in the rabbit digestive tract and the factors affecting their distribution*. Journal of Applied Bacteriology, vol. 75, nr 3, s. 269-275.
310. Żabicka, D., Hryniewicz, W., 2010. *Rekomendacje doboru testów do oznaczania wrażliwości bakterii na antybiotyki i chemioterapeutyki. Oznaczanie wrażliwości ziarniaków Gramdodatnich z rodzaju Staphylococcus spp.* Narodowy Instytut Leków Centralny Ośrodek Badań Jakości w Diagnostyce Mikrobiologicznej.
311. Zalán, Z., Hudáček, J., Štětina, J., Chumchalová, J., Halász, A., 2010. *Production of organic acids by Lactobacillus strains in three different media*. European Food Research and Technology, vol. 230, nr 3, s. 395-404.
312. Zayed, G., Roos, Y. H., 2004, *Influence of trehalose and moisture content on survival of Lactobacillus salivarius subjected to freeze-drying and storage*. Process Biochemistry, vol. 39, s. 1081–1086.
313. Zhang, B., Yang, X., Guo, Y., Long, F., 2011, *Effects of dietary lipids and Clostridium butyricum on the performance and the digestive tract of broiler chickens*. Archives of Animal Nutrition, vol. 65, nr 4, s. 329-339.
314. Zhang, J.L., Xie, Q.M., Ji, J., Yang, W.H., Wu, Y.B., Li, C., Ma, Y.J., Bi, Y.Z., 2012. *Different combinations of probiotics improve the production performance, egg quality, and immune response of layer hens*. Poultry science, vol. 91, nr 11, s. 2755-2760.
315. Zhang, L., Xu J.Q., Liu H-L., Lai T., Ma J-L., Wang J-F., Zhu Y-H., 2010, *Evaluation of Lactobacillus rhamnosus GG using an Escherichia coli K88 model of piglet diarrhoea: effects on diarrhoea incidence, faecal microflora and immune responses*. Veterinary Microbiology, vol. 141, s. 142-148.
316. Zhang, Z.F., Kim, I.H., 2014. *Effects of multistrain probiotics on growth performance, apparent ileal nutrient digestibility, blood characteristics, cecal microbial shedding, and excreta odor contents in broilers*. Poultry Science, vol. 93, nr 2, s. 364-370.
317. Zhao, X., Guo, Y., Guo, S., Tan, J., 2013. *Effects of Clostridium butyricum and Enterococcus faecium on growth performance, lipid metabolism, and cecal microbiota of broiler chickens*. Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 97, nr 14, s. 6477-6488.
318. Zhou, J.S., Pillidge, C.J., Gopal, P.K., Gill, H.S., 2005. *Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium strains*. International Journal of Food Microbiology, vol. 98, nr 2, s. 211-217.

WYKAZ TABEL, WYKRESÓW I RYSUNKÓW

1. Tabele

Tabela 1. Taksonomia bakterii fermentacji mlekowej	24
Tabela 2. Wybrane dodatki paszowe zawierające mikroorganizmy probiotyczne	34
Tabela 3. Wykaz bakterii wskaźnikowych wraz z warunkami ich inkubacji i zastosowanym podłożem agarowym.	44
Tabela 4. Wykaz antybiotyków zastosowanych w doświadczeniach	50
Tabela 5. Wytyczne dotyczące podziału izolatów na podstawie wyników wrażliwości na wybrane antybiotyki	61
Tabela 6. Sekwencje starterów reakcji 16s RNA	67
Tabela 7. Model trawienia <i>in vitro</i> trzody chlewnej	70
Tabela 8. Schemat zastosowanego modelu trawienia <i>in vitro</i> drobiu	71
Tabela 9. Liczba kolonii na podłożu MRS z dodatkiem CaCO ₃ . uzyskanych z materiału izolacyjnego [jtk/cm ³]	74
Tabela 10. Zestawienie wyników izolacji mikroorganizmów z przewodów pokarmowych zwierząt monogastrycznych	76
Tabela 11. Wstępna ocena fenotypowa mikroorganizmów wyizolowanych z przewodów pokarmowych zwierząt monogastrycznych	79
Tabela 12. Aktywność antibakteryjna izolatów pochodzących z treści jelit prosiąt ssących	82
Tabela 13. Aktywność antibakteryjna izolatów pochodzących z treści jelit prosiąt odsadzonych	83
Tabela 14. Aktywność antibakteryjna izolatów pochodzących z jelit kurcząt rzeźnych	84
Tabela 15. Zakres aktywności przeciwdrobnoustrojowej 120 wybranych izolatów	86
Tabela 16. Wrażliwość wybranych bakterii fermentacji mlekowej pochodzących z kału prosiąt oraz jelit kurcząt na działanie antybiotyków	90
Tabela 17. Wybrane właściwości enzymatyczne bakterii fermentacji mlekowej	101
Tabela 18. Zmiany wartości OD ₆₀₀ po 24 godzinnej hodowli izolatów bakterii fermentacji mlekowej pochodzących z treści jelitowej prosiąt oraz kurcząt w zależności od pH środowiska	106
Tabela 19. Zmiany wartości OD ₆₀₀ po 24 godzinnej hodowli izolatów bakterii fermentacji mlekowej pochodzących z treści jelitowej prosiąt oraz jelit kurcząt w zróżnicowanych stężeniach żółci bawolej	111
Tabela 20. Aktywność antibakteryjna wyselekcjonowanych izolatów bakterii fermentacji mlekowej wyizolowanych z treści jelitowej prosiąt	121
Tabela 21. Aktywność antibakteryjna 62 wyselekcjonowanych izolatów bakterii fermentacji mlekowej wyizolowanych z jelit kurcząt	123
Tabela 22. Analiza wyników sekwencjonowania fragmentu genu 16s RNA	125

2. Wykresy

Wykres 1. Liczba przypadków jednostek chorobotwórczych w latach 2012-2016.....	16
Wykres 2. Zawartość kwasów: octowego oraz mlekowego w hodowlach izolatów bakterii fermentacji mlekowej pochodzących z kału prosiąt	98
Wykres 3. Zawartość kwasów: octowego oraz mlekowego w hodowlach izolatów bakterii fermentacji mlekowej pochodzących z jelit kurcząt.....	99
Wykresy 4-7. Zmiany wartości OD ₆₀₀ hodowli wybranych izolatów bakterii fermentacji mlekowej pochodzących z treści jelitowej prosiąt oraz jelit kurcząt w zależności od pH środowiska	108
Wykresy 8-11. Zmiany wartości OD ₆₀₀ hodowli wybranych izolatów bakterii fermentacji mlekowej pochodzących z treści jelitowej prosiąt oraz kurcząt w zależności od pH środowiska	114
Wykres 12. Procentowa wartość hydrofobowości powierzchni komórek badanych izolatów bakterii pochodzących z treści przewodów pokarmowych prosiąt	116
Wykres 13. Procentowa wartość hydrofobowości powierzchni komórek badanych izolatów bakterii pochodzących z jelit kurcząt rzeźnych	117
Wykres 14. Ilościowe oznaczenie hodowli wybranych bakterii	127
Wykresy 15, 16. Liczba bakterii (jtk/g) w hodowlach wybranych szczepów pochodzących z przewodów pokarmowych trzody chlewnej oraz kurcząt na podłożach opartych na bazie mleka odtłuszczonego	129
Wykresy 17, 18. Liczba bakterii przed i po procesie liofilizacji hodowli wybranych szczepów pochodzących z przewodów pokarmowych trzody chlewnej oraz kurcząt	131
Wykresy 19, 20. Liczba bakterii w liofilizowanych hodowlach poszczególnych szczepów oraz preparatach dla trzody chlewnej i kurcząt rzeźnych	133

3. Fotografie

Fotografie 1, 2. Wzrost kolonii bakterii fermentacji mlekowej na podłożu MRS wzbogaconym CaCO ₃	76
Fotografie 3, 4. Obraz makroskopowy wzrostu kolonii bakterii fermentacji mlekowej	77
Fotografie 5-10. Obraz mikroskopowy wybranych preparatów bakteryjnych	78
Fotografie 11-16. Aktywność antibakteryjna wybranych izolatów bakterii fermentacji mlekowej	85
Fotografie 17-22. Wrażliwość wybranych izolatów bakterii fermentacji mlekowej na działanie antybiotyków	93
Fotografie 23-26. Właściwości amylolityczne oraz proteolityczne wybranych izolatów bakterii fermentacji mlekowej	103
Fotografia 27. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR – widoczne fragmenty o długości 1500 pz.....	124

4. Rysunki

Rysunek 1. Izolacja bakterii fermentacji mlekowej z mikrobioty jelitowej zwierząt monogastrycznych (Etap 1).....	39
Rysunek 2. Selekcja izolatów bakterii fermentacji mlekowej na podstawie wybranych wyróżników (Etap 2).....	40

Rysunek 3. Identyfikacja genetyczna wyselekcjonowanych izolatów bakterii fermentacji mlekowej (Etap 3).....	41
Rysunek 4. Kompozycja biopreparatów bakteryjnych w formie dodatków paszowych (Etap 4)	42
Rysunek 5. Schemat izolacji DNA z komórek izolatów bakterii fermentacji mlekowej	66
Rysunek 6. Liczba bakterii podczas pasażu paszy z dodatkiem preparatu (próbka A) i preparatu (próbka B) przez modelowy układ trawienia <i>in vitro</i> trzody chlewnej	136
Rysunek 7. Liczba bakterii podczas pasażu paszy z dodatkiem preparatu (próbka A) i preparatu (próbka B) przez modelowy układ trawienia <i>in vitro</i> drobiu	137

WYKAZ TABEL ORAZ WYKRESÓW ZAWARTYCH W ZAŁĄCZNIKU ELEKTRONICZNYM**1. Tabele**

Tabela E. 1. Izolaty mikroorganizmów pochodzące z kału prosiąt ssących	3
Tabela E. 2. Izolaty mikroorganizmów pochodzące z kału prosiąt odsadzonych	4
Tabela E. 3. Izolaty mikroorganizmów pochodzące z jelit kurcząt rzeźnych	5
Tabela E. 4. Antybakteryjne właściwości bakterii fermentacji mlekowej wyizolowanych z odchodów prosiąt ssących	6
Tabela E. 5. Antybakteryjne właściwości bakterii fermentacji mlekowej wyizolowanych z odchodów prosiąt odsadzonych	18
Tabela E. 6. Antybakteryjne właściwości bakterii fermentacji mlekowej wyizolowanych z treści jelitowej kurcząt.....	25
Tabela E. 7. Wrażliwość izolatów bakterii fermentacji mlekowej pochodzących z kału prosiąt ssących na działanie wybranych antybiotyków.....	34
Tabela E. 8. Wrażliwość izolatów bakterii fermentacji mlekowej pochodzących z kału prosiąt odsadzonych na działanie wybranych antybiotyków.....	36
Źródło: na podstawie badań własnych.....	36
Tabela E. 9. Wrażliwość izolatów bakterii fermentacji mlekowej pochodzących z przewodów pokarmowych kurcząt rzeźnych na działanie wybranych antybiotyków	37
Tabela E. 10. Zawartość wybranych kwasów organicznych w 24 godzinnych hodowlach bakterii fermentacji mlekowej wyizolowanych z kału prosiąt.....	39
Tabela E. 11. Zawartość wybranych kwasów organicznych w 24 godzinnych hodowlach bakterii fermentacji mlekowej wyizolowanych z przewodów pokarmowych kurcząt rzeźnych	40

2. Wykresy

Wykresy E. 1-29. Wzrost bakterii fermentacji mlekowej pochodzących z kału prosiąt ssących w zróżnicowanych warunkach pH.....	41
Wykresy E. 30-41. Wzrost bakterii fermentacji mlekowej pochodzących z kału prosiąt odsadzonych w zróżnicowanych warunkach pH.....	46
Wykresy E. 42-62. Wzrost bakterii fermentacji mlekowej pochodzących z jelit kurcząt rzeźnych w zróżnicowanych warunkach pH.....	48
Wykresy E. 63-91. Wzrost bakterii fermentacji mlekowej pochodzących z kału prosiąt ssących w zróżnicowanych stężeniach żółci bawolej	52
Wykresy E. 92-103. Wzrost bakterii fermentacji mlekowej pochodzących z kału prosiąt odsadzonych w zróżnicowanych stężeniach żółci bawolej	57
Wykresy E. 104-124. Wzrost bakterii fermentacji mlekowej pochodzących z jelit kurcząt rzeźnych w zróżnicowanych stężeniach żółci bawolej	59