

## VPLYV PROBIOTÍK NA VYBRANÉ DRUHY PATOGÉNOV INFLUENCE OF PROBIOTICS ON SELECTED PATOGENS

Jaroslav Pochop, Miroslava Kačániová, Ivana Nováková, Simona Kunová

### ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the antagonistic effect of probiotics containing bacteria: *Lactobacillus* sp., *Streptococcus* sp. and *Bifidobacterium* sp. (LSB) against pure cultures of pathogenic bacteria: *Escherichia coli* (CCM 3988), *Listeria monocytogenes* (CCM 4699), *Pseudomonas aeruginosa* (CCM 1960), *Salmonella enterica* (CCM 4420), *Staphylococcus aureus* (CCM 3953), *Staphylococcus epidermidis* (CCM 4418) and *Serratia rubidaea* (CCM 4684). In the first part of the experiment antagonistic against of probiotic organisms on pathogenic bacteria were studied. The probioticum (LSB) used in this study was found to have inhibitory effect on five of the seven groups of pathogenic bacteria. Inhibitory effect was seen against the species *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Serratia rubidaea* and *Staphylococcus epidermidis*.

**Key words:** probiotics, pathogenic bacteria, diffusion method

---

### ÚVOD

Slovo probiotiká má pestrú históriu. Prvý raz bolo použité vo význame protikladu k antibiotikám, prípadne ako látka vylučovaná jedným organizmom, ktorá stimuluje rast druhého organizmu (Tannock, 2005).

Probiotiká sú mikrobiálne bunkové preparáty alebo komponenty mikrobiálnych buniek, ktoré majú blahodárny vplyv na zdravie a celkový stav hostiteľa (Allen et al., 2004; Reid et al., 2003; Brown et al. 2005).

Probiotiká nachádzajú v súčasnosti široké aplikačné možnosti. Na hostiteľa majú veľmi priaznivý biologický efekt, ktorý nie je spojený so žiadnymi vedľajšími účinkami ani rizikami pre životné prostredie (Isolauri et al., 2001).

Montalto et al. (2002) charakterizujú probiotiká ako mikroorganizmy so špeciálnymi vlastnosťami. Sú to organizmy bezpečné pre použitie v humánnej výžive, sú rezistentné proti kyslému pH prostredia. Prežívajú v ľudskom tráviacom trakte, sú schopné stimulovať imunitné reakcie v črevách a stabilizovať mukózovú bariéru. Jeurissen et al. (2002); Chmelníčná (2000) a Špičák et al. (2004) konštatujú, že črevná mikroflóra žije v úzkom kontakte s jej okolitou črevnou stenou. Črevné baktérie môžu mať blahodárny alebo škodlivý vplyv na hostiteľský organizmus závisiac od toho, či sú dané baktérie klasifikované ako probiotické alebo patogénne. Tak probiotické ako aj patogénne determinujú zdravotný stav organizmu.

Najzávažnejší negatívny účinok mikroorganizmov v prírode vyplýva z činnosti tzv. patogénnych mikroorganizmov, ktoré spôsobujú choroby človeka zvierat a rastlín (Šilhánková, 2008).

Vplyv na patogénne mikroorganizmy je pripisovaný produkcii antimikrobiálnych látok a inhibícii mikroorganizmov (organické kyseliny, peroxid vodíka bakteriocíny, antibiotiká, dekonjugované žlčové kyseliny), stimulácii imunitného systému a súťaži o životný priestor a živiny (Marteau, 2002).

Za najvýznamnejšiu funkciu je možné považovať tú skutočnosť, že indigentná mikroflóra svojou prítomnosťou bráni uplatneniu patogénnych a podmienene patogénnych mikroorganizmov (Dalloul et al., 2003).

Cieľom práce bolo zistiť aktivitu probiotického preparátu, a antagonistický účinok prídavku probiotika na vybrané skupiny patogénnych baktérii.

## MATERIÁL A METODIKA

V našom experimente sme sledovali antagonistický účinok a aktivitu probiotických baktérii zastúpených v probiotickom preparáte, ktorý obsahoval nasledovné rody baktérii: *Lactobacillus* sp., *Streptococcus* sp. a *Bifidobacterium* sp. (LSB).

Na stanovenie aktivity baktérii obsiahnutých v probiotickom preparáte sme použili platňovú zriedňovaciu metódu. Vopred pripravenými riedeniami ( $10^{-9}$ ) homogenizovaných vzoriek komerčne dostupných probiotických preparátov, sme naočkovali živné pôdy 1 ml vzorky v Petriho miskách zaliatím v trojnásobnom opakovaní. Intenzitu rastu sme sledovali po dobu siedmych hodín. Z toho vyplýva, že každú sledovanú hodinu bolo uskutočnené očkovanie. Po inkubácii pri 37 °C po dobu 48 až 72 hodín boli vyhodnotené výsledky na základe počtu mikroorganizmov v log KTJ. ml<sup>-1</sup>.

Na detekciu antagonistických vlastností bola použitá platňová difúzna metóda (Chateau et al., 1993; Lan et al., 2003; Oyetayo, 2004; Messaoudi et al., 2005; Lima et al., 2007) modifikovaná konkrétne pre vybraných bakteriálnych zástupcov. Baktérie obsiahnuté v probiotickom preparáte boli predkultivované na klíčkovej živnej pôde (WGM) 48 hod. pred testovaním. Za indikátorové druhy a kmene boli zvolené *Escherichia coli* (CCM 3988), *Listeria monocytogenes* (CCM 4699), *Pseudomonas aeruginosa* (CCM 1960), *Salmonella enterica* sub. *enterica* ser. *enteritidis* (CCM 4420), *Staphylococcus aureus* (CCM 3953), *Staphylococcus epidermidis* (CCM 4418), *Serratia rubidaea* (CCM 4684).

Na platňovú difúznu metódu bol použitý mäsopeptonový agar (MPA) s prídavkom glukózy. Po usušení (30 minút) Petriho misiek s pripravenou živnou pôdou (MPA) sme povrchovo pomocou L-tyčinky naočkovali 200 µl suspenzie patogénnych baktérií (kolónie baktérií rozpustené v sterilnej destilovanej vode).

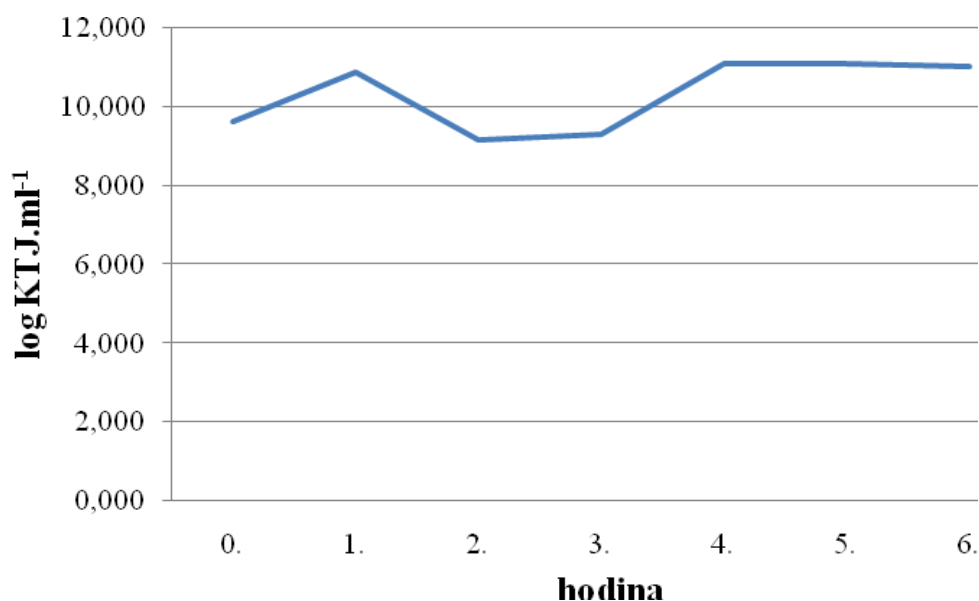
Na povrch naočkovaných platní boli rozmiestnené disky (celulóзовé filtračné papieriky s priemerom 9 mm), ktoré boli napustené suspenziami vybraných probiotických baktérií.

Platne boli inkubované za anaeróbnych podmienok 24 hod pri teplote 37 °C. Po inkubácii sa vyhodnotia inhibičné zóny v okolí diskov.

Výsledky boli doplnené testami na viabilitu a morfológiu baktérií, mikroskopicky pomocou jednoducho farbených preparátov a Gramovho farbenia.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

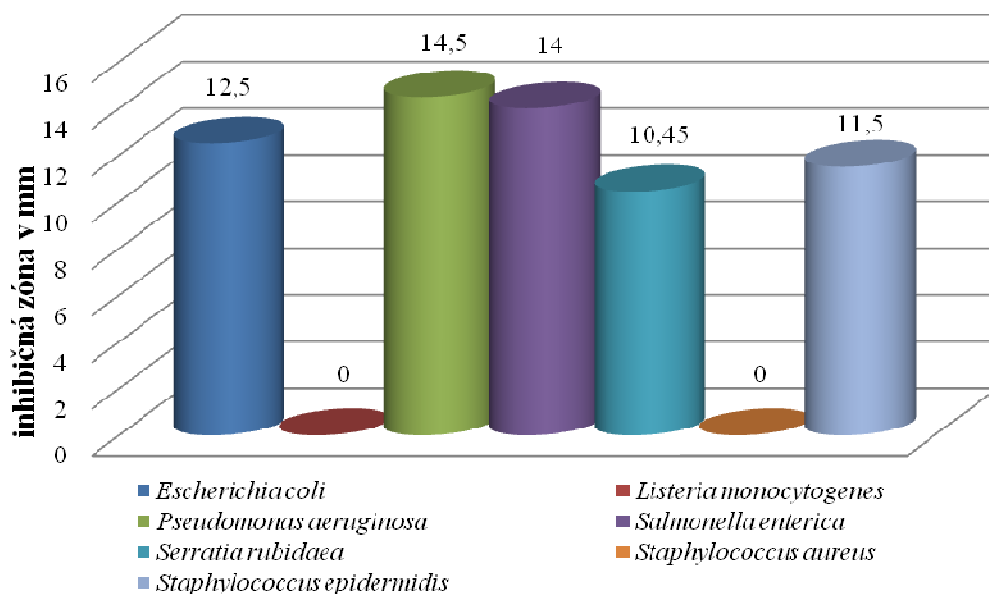
V prvej časti experimentu sme sledovali aktivitu probiotického preparátu (obrázok 1) počas siedmych hodín. Aktivita probiotického preparátu od nulte do prvej hodiny mala stúpajúcu tendenciu (o 1,210 log KTJ.g<sup>-1</sup>), od prvej do druhej hodiny sme zaznamenali pokles o 1,687 log KTJ.g<sup>-1</sup>, od druhej do štvrtej hodiny bol zistený najskôr mierny nárast a okolo tretej hodiny stúpila aktivita o 1,778 log KTJ.g<sup>-1</sup>. Od štvrtej do šiestej hodiny nastal nepatrný pokles (0,065 log KTJ.g<sup>-1</sup>).



Obrázok 1 Aktivita probiotického preparátu

V druhej časti experimentu sme sledovali antagonizmus probiotických mikroorganizmov proti patogénnym baktériám. Na základe výsledkov nášho pokusu môžeme konštatovať nami použité probiotikum malo inhibičný účinok na päť zo siedmich skupín sledovaných patogénnych baktérií a to na tieto druhy *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Serratia rubidaea*, *Staphylococcus epidermidis*.

Bolo dokázané, že množstvo mikroorganizmov, zvlášť baktérie mliečneho kvasenia produkujúce primárne metabolity (organické kyseliny), ako aj sekundárne metabolity, ktoré môžu zabrániť uplatneniu patogénnych mikroorganizmov, prípadne znížiť ich metabolickú aktivitu (Baveli et al., 2001; Zulkifli et al., 2000; Kmet', 2005).



Obrázok 2 Vplyv probiotík na vybrané druhy patogénov

**Ennahar et al. (2000); Kim et al. (2003); Zamfir et al. (2000) a Cleveland et al. (2001)** uvádzajú, že priaznivé účinky probiotík sa mimo iného prejavujú ovplyvnením mikrobiálneho metabolizmu, konkurenciou o adhezívne miesta, produkciou bakteriostatických až bakteriocídnych látok, neutralizáciou mikrobiálnych toxínov a stimuláciou imunity jedinca.

V experimente sme zistili, že probiotikum malo najväčší inhibičný účinok na druhy *Pseudomonas aeruginosa* (veľkosť zóny 14,5 mm) a *Salmonella enterica* (14 mm). **Williams et al. (2001)** dáva bifidobaktérie do súvislosti s potlačením kolonizácie GIT (gastrointestinálneho traktu) salmonellami.

Menší inhibičný účinok sa prejavil na druhoch *Escherichia coli* (veľkosť zóny 12,5 mm) a *Staphylococcus epidermidis* (11,5 mm). Inhibičné účinky kyseliny mliečnej produkovanej *Lactobacillus acidophilus* na *Escherichia coli* potvrdili Levin-Le Moal et al. (2002). Pozitívny účinok probiotika sa prejavil na elimináciu buniek *Escherichia coli* v pokusoch, ktoré uvádzajú **Kačániová et al. (2005); Trakovická et al. (2005)**.

Najmenšiu inhibičnú zónu sme zistili u druhu *Serratia rubidaea* len 10,45 mm. Pozitívne účinky *Lactobacillus* sp. potvrdzujú vo svojich experimentoch **Gusils et al. (2000); Lan et al. (2003); Cross et al. (2002)**.

## ZÁVER

Môžeme konštatovať nami použité probiotikum malo inhibičný účinok na druhy *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus epidermidis*, *Serratia rubidaea*. V tomto zložení (*Lactobacillus* sp., *Streptococcus* sp. a *Bifidobacterium* sp.) nemalo vplyv na ostatné sledované patogénne druhy hoci aktivita probiotického preparátu vyhovovala požiadavkám kladeným na tento druh probiotika. Probiotický preparát na báze *Lactobacillus* sp., *Streptococcus* sp. a *Bifidobacterium* sp. odporúčame testovať vo viacerých experimentoch na testovanie antagonistických vlastností na ďalšie skupiny patogénnych baktérií.

## LITERATÚRA

- ALLEN, S. – OKOKO, B. – MARTINEZ, E. et al. 2004. Probiotics for treating infectious diarrhoea. In *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2004, č. 2, CD003048
- BALEVI, T. – UÇAN, U. S. – COPKUN, B. et al., 2001. Effect of dietary probiotic on performance and humoral immune response in layer hens. In *British Poultry Science*, roč. 42, 2001, č. 4, s. 456-461.
- BROWN, A. C. – SHOVIĆ, A. – IBRAHIM S. A. et al. 2005. A non-dairy probiotic's (poi) influence on changing the gastrointestinal tract's microflora environment. In *Altern. Ther. Health Med.*, roč. 11, 2005, č.1, s. 58-64.
- CLEVELAND, J. – MONTVILLE, T. J. – NES, I. F. CHIKINDAS, M. L. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. In *Int. J. Food Microbiol.*, 2001, č. 71, s. 1-20.
- CROSS, M. L. – MORTENSEN, R. R. – KUDSK, J. – GILL, H. S. 2002. Dietary intake of *Lactobacillus rhamnosus* HNOO1 enhances production of both Th1 and Th2 cytokines in antigen-primed mice. In *Med. Microbiol. Immun.*, roč. 191, 2002, č. 1, s. 49-53.
- DALLOUL, R.A. – LILLEHOJ, H. S. – SHELLEM, T. A. – DOERR, J. A. 2003. Enhanced mucosal immunity against *Eimeria acervulina* in broilers fed a *Lactobacillus*-based probiotic. In *Poultry Science*, roč. 82, 2003, č. 1, s. 62-66.
- ENNAHAR, S. – SASHIHARA, T. – SONOMOTO, K. – ISHIZAKI, A. 2000. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. In *FEMS Microbiol. Rev.*, 2000, č. 24, s. 83-106.
- GUSILS, C. – GONZALEZ, S. N. – OLIVER, G. 2000. Some probiotic properties of chicken lactobacilli. In *Can. J. Microbiol.*, roč. 45, 2000, č. 12, s. 981-987.

- CHATEAU, N. – CASTELLANOS, I. – DESCHAMPS, A. M. 1993. Distribution of pathogen inhibition in the *Lactobacillus* isolates of a commercial probiotic consortium. In *The Journal of Applied Bacteriology*, 1993, n. 74, p. 36-40.
- CHMELNÍČNÁ, Ľ. 2000. Rastová stimulácia hydiny na báze probiotík. Monografia, SPU: Nitra, 2000, 69 s., ISBN 80-7137-763-5
- ISOLAURI, E. – KIRJAVAINEN, P. V. – SALMINEN, S. 2001. Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation? In *Gut*, roč. 50, 2001, č.3, s. 54-59.
- JEURISSEN, S. H. M. – LEWIS, F. – KLIS, J.D. et al. 2002. Parameters and techniques to determine intestinal health of poultry as constituted by immunity, integrity and functionality. In *Curr. Issues Intestinal. Microbiol.*, roč. 3, 2002, č. 1, s. 1-14.
- KAČÁNIOVÁ, M. – ČUBOŇ, J. – HAŠČÍK, P. – PAVLIČOVÁ, S. 2005. Effect of *Enterococcus faecium* on some characteristic in ceca of chickens and its typisation by PCR. In *Acta fytotechnica et zootechnica.*, roč 8, 2005, č. 1, s. 17-20.
- KIM, T. S. – HUR, J. W. – YU, M. A. et al. 2003. Antagonism of *Helicobacter pylori* by bacteriocins of lactic acid bacteria. In *J. Food Protect.*, 2003. č. 66 s. 21-60.
- KMEŤ, V. 2005. Enterálne infekcie hospodárskych zvierat a možnosti ich ovplyvnenia laktobacilmi a rastlinnými silicami. In KAČÁNIOVÁ, M. – BOBČEK, R. – KMEŤ, V. – ANGELOVIČOVÁ, M. 2005. *Krmné doplnky ako náhrada antibiotík a ďalšie aplikácie*. SPU: Nitra, 2005, 78 s., ISBN 80-8069-589.X.
- LAN, P. T. – BINH, L. T. – BENNO, Y. 2003. Impact of two probiotic *Lactobacillus* strains feeding on fecal lactobacilli and weight gains in chicken. In *The Journal of General and Applied Microbiology*, vol. 49, 2003 n. 1, p. 29-36. ISBN 002-1260
- LEVIN-LE MOAL, V. – AMSELLEM, R. – SERVIN, A. L. – COCONNIER, M. H. 2002. *Lactobacillus acidophilus* (strain LB) from the resident adult human gastrointestinal microflora exerts activity against brush border damage promoted by a diarrhoeagenic *Escherichia coli* in human enterocyte-like cells. In *Gut*, č. 50, s. 803-811.
- LIMA, E.T. – FILHO, R. L. A. – OKAMOTO, A. S. – JOSÉ, C. – NOUJAIM, J. C. – BARROS, M. R. – ADALBERTO, J. – CROCCI, A. J. 2007. Evaluation in vitro of the antagonistic substances produced by *Lactobacillus* sp. isolated from chickens. In the Canadian Journal of Veterinary Research, 2007, n. 71, p. 103-107.
- MARTEAU, P. R. 2002. Probiotics in clinical conditions. In *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, roč. 22, 2002, č. 3, s. 255-273.
- MESSAOUDI, D. F. – BERGER, C. N. – COCONNIER-POLTER, M. H. – MOAL, V. – SERVIN A. L. 2005. pH-, Lactic Acid-, and Non-Lactoc Acid- Dependent Activities of Probiotic *Lactobacilli* against *Salmonella enteritica* serovar Typhimurium. In *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 71, 2005, n. 10, p. 6008-6013.
- MONTALTO, M. – ARANCIO, F. – IZZI, D. et al. 2002. Probiotics: history, definition, requirements and possible therapeutic applications. In *Ann. Ital. Med. Int.*, roč. 17, 2002, č. 3, s.157-165.
- OYETAYO, V. O. 2004. Phenotypic characterisation and assessment of the inhibitory potential of *Lactobacillus* isolates from different sources. In *African Journal of Biotechnology*, vol. 3, 2004, n. 7, p. 355-357. ISSN 1684-5315
- REID, G. – JASS, J. SEBULSKY, M. T. – MCCORMICK, J. K. 2003. Potential Uses of Probiotics in Clinical Practice. In *Clinical Microbiological. Review*, vol. 16, 2003, no. 4, p. 658-672.
- ŠILHÁNKOVÁ, L. 2008. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Praha: Academia, 2008, 365 s.
- ŠPIČÁK, V. – PANZNER, P. 2004. *Alergologie*. 1. vyd. Praha: Galén, 2004, s. 21-32.
- TANNOCK, G. W. 2005. *Probiotics and probiotics: Scientific aspects*. Caister Academic Press: Otago, 2005, 230 s. ISBN 1-904455-01-8.

TRAKOVICKÁ, A. – BEŽOVÁ, K. – ANGELOVIČOVÁ, M. et al. 2005. *Genetické markéry a kvalita produktov špeciálnych odvetví živočíšnej výroby*. SPU: Nitra, vedecká monografia, 2005, 180 s. ISBN 80-8069-633-0.

WILLIAMS, B. A. – VERSTEGEN, M. W. A. – TAMMINGA, S. 2001. Fermentation in the large intestine of single-stomacher animals and its relationship to animal health. In *Nurt. Res. Rew.*, vol. 14, 2001, n. 2, p. 207-227.

ZAMFIR, M. – CALLEWAERT, R. – CORNEA, P. C. – DE VUYST, L. 2000. Production kinetics of acidophilin 801, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801. In *FEMS Microbiol. Lett.*, 2000, č. 190, s. 305-308.

ZULKIFLI, I. – ABDULLAH, N. – AYRIN, N. M. et al. 2000. Growth performance and immune response of two commercial broiler strains fed diets containing *Lactobacillus* culture and oxytetracycline under heat stress conditions. In *Brit. Poult. Science*, vol. 41, 2000, p. 593-597.

**Pod'akovanie:**

Práca bola financovaná grantovou agentúrou VEGA 1/0372/09, APVV-VMSP-P-0057-09.

**Kontaktná adresa:**

Ing. Jaroslav Pochop, Katedra mikrobiológie, SPU v Nitre, Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, e-mail: [pochop.jaroslav@gmail.com](mailto:pochop.jaroslav@gmail.com)

doc. Ing. Miroslava Kačániová, PhD., Katedra mikrobiológie, SPU v Nitre, Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, e-mail: [miroslava.kacaniova@gmail.com](mailto:miroslava.kacaniova@gmail.com)

Ing. Ivana Nováková, Katedra mikrobiológie, SPU v Nitre, Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, e-mail: [ivana.novakova2@gmail.com](mailto:ivana.novakova2@gmail.com)

Ing. Simona Kunová, Katedra hygieny a bezpečnosti potravín, SPU v Nitre, Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, e-mail: [simona.pavlicova@uniag.sk](mailto:simona.pavlicova@uniag.sk)