

KAMILA GODERSKA, TOMASZ RYCHLIK, EWA ANDRZEJEWSKA,
ANDRZEJ SZKARADKIEWICZ, ZBIGNIEW CZARNECKI

ANTAGONISTYCZNY WPŁYW *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* DSM 20079 I DSM 20242 NA BAKTERIE PATOGENNE IZOLOWANE OD LUDZI

Streszczenie

W pracy przedstawiono wyniki dotyczące antagonistycznego działania *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079 i DSM 20242 w stosunku do szczepów bakterii *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli* i *Salmonella enteritidis* izolowanych od pacjentów. Największe strefy zahamowania wzrostu obserwowano we wszystkich testowanych szczepach *H. pylori* – wynosiły one ponad 20 mm. Testowane szczepy *L. acidophilus* hamowały również rozwój wszystkich szczepów *S. enteritidis*, a wielkość stref wynosiła powyżej 12 mm. Spośród szczepów *E. coli* były takie, których wzrost nie był hamowany przez testowane szczepy *L. acidophilus*. Wielkość stref zahamowania wzrostu pozostałych testowanych szczepów *E. coli* wynosiła od 11 do 16 mm.

Słowa kluczowe: *Lactobacillus acidophilus*, aktywność antagonistyczna, *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*

Wprowadzenie

Zgodnie z definicją FAO/WHO z 2001 r. probiotyki definiuje się jako żywe mikroorganizmy, które podawane człowiekowi w odpowiedniej liczbie wykazują korzyści zdrowotne. Bakterie probiotyczne są zdolne do antagonizmu w stosunku do bakterii gram dodatnich i gram ujemnych, w tym bakterii patogennych. Mechanizm tego procesu polega na współzawodnictwie o miejsce adherencji do nabłonka przewodu pokarmowego, konkurencji o substancje odżywcze, stymulacji odporności organizmu oraz produkcji substancji antibakteryjnych. Produkują ponadto substancje wywołujące tzw. niespecyficzną inhibicję rozwoju patogenów, takie jak: kwas mlekowy, octowy, nad-

Dr inż. K. Goderska, mgr inż. T. Rychlik, prof. dr hab. Z. Czarnecki, Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego, Wydz. Nauk o Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 31, 60-624 Poznań, dr E. Andrzejewska, prof. dr hab. A. Szkaradkiewicz, Katedra Mikrobiologii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, ul. Wieniawskiego 3, 61-712 Poznań

tlenek wodoru i bakteriocyny. Istnieją dowody na to, że bakterie probiotyczne wykazują aktywność w zwalczaniu *Helicobacter pylori*, odpowiedzialnej za choroby wrzodowe żołądka i dwunastnicy. W badaniach *in vivo* na myszach oraz w badaniach *in vitro* potwierdzono znaczny wpływ *Lactobacillus acidophilus* na hamowanie rozwoju i obniżanie przeżywalności *Helicobacter pylori* [10].

Aktywność przeciwdrobnoustrojowa bakterii kwasu mlekowego przypisywana jest między innymi pozakomórkowym substancjom białkowym. Bakterie kwasu mlekowego (Lactic Acid Bacteria - LAB) oraz ich właściwości przeciwdrobnoustrojowe, za sprawą fermentacji umożliwiają wydłużanie okresu przechowywania. W celu zapewnienia odpowiednich warunków rozwoju bakterie te wytwarzają szereg substancji przeciwdrobnoustrojowych uwalnianych poza komórkę [49]. Oprócz kwasów organicznych, nadtlenu wodoru, diacetylu i CO₂ wytwarzają one liczną grupę substancji białkowych wykazujących znaczące działanie bakteriobójcze i/lub bakteriostatyczne [51]. Poznane oraz scharakteryzowane substancje białkowe wykazujące właściwości hamujące wzrost mikroorganizmów (najczęściej w obrębie gatunku) zwane są bakteriocynami [7, 35, 49]. Prawie wszystkie bakteriocyny pochodzące od LAB są to metabolity pierwotne [49], syntetyzowane rybosomalnie [9, 15, 22], które w większości przypadków ulegają potranslacyjnej modyfikacji. Łańcuchy polipeptydowe tworzące aktywne białka mają masę cząsteczkową rzędu od kilku ($\cdot 10^3$) do kilkunastu ($\cdot 10^3$) Da. Bakteriocyny wytwarzane przez LAB są najlepiej poznaną grupą tego typu związków. Oprócz postaci liniowej bakteriocyn, występują również mniej poznane formy cykliczne, odznaczające się zwiększoną opornością na proteazę oraz większą stabilnością termodynamiczną [46].

Liczna grupa bakterii z rodzaju *Lactobacillus* ssp. wykazująca zdolność biosyntezy bakteriocyn należy do grupy GRAS (Generally Recognized As Safe) [33, 37]. Dlatego też bakterie kwasu mlekowego są szeroko stosowane w przemyśle spożywczym do utrwalania żywności poprzez fermentację. Proces fermentacji mlekowej może jednak powodować niekorzystne zmiany sensoryczne produktu. Z tego względu dąży się do pozyskiwania form substancji oczyszczonych, tak aby mogły być zastosowane jako biokonserwanty. Oczyszczone bakteriocyny nie mają smaku, zapachu ani barwy [36, 37].

Chcąc efektywnie wykorzystywać bakteriocyny w przemyśle spożywczym, niezbędna jest optymalizacja warunków produkcji poprzez kontrolę parametrów technologicznych oraz środowiska. Szczegółowa analiza właściwości biochemicznych oraz technologicznych tego typu związków może wyjaśnić ich niską aktywność, często pojawiającą się w systemach produkcji żywności wykorzystujących mikroorganizmy bakteriocynogenne. Wykorzystanie biosyntezy bakteriocyn *in situ* daje możliwość ich taniej i bezpiecznej aplikacji w celu zapewnienia jakości i bezpieczeństwa żywności.

W wielu badaniach stwierdzono, że najbardziej wydajna biosynteza bakteriocyn zachodzi w optymalnych dla danego szczepu warunkach hodowli. W większości jednak zauważono, że warunki hodowli odbiegające od optymalnych spowodowały znaczne zwiększenie ilości wytwarzanych związków białkowych o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych [35, 43]. Stres środowiskowy powoduje włączenie się mechanizmów obronnych komórki oraz intensywniejszą produkcję substancji pozakomórkowych w celu przetrwania w niekorzystnych warunkach.

Czynniki mające wpływ na zdolność wytwarzania przeciwbakteryjnych substancji białkowych, to: pH, temperatura, faza wzrostu, hodowla w kokulturze, pole elektryczne, skład medium hodowlanego [35].

Kwasowość czynna – pH

Oddziaływanie jonów hydroniowych determinuje zarówno zdolność biosyntezy bakteriocyn oraz ich aktywność przeciwdrobnoustrojową. Optymalne pH do produkcji większości bakteriocyn wytwarzanych przez bakterie kwasu mlekowego mieści się w przedziale od 5 do 7 [7]. Wpływ pH środowiska na komórkę związany jest z pracą enzymów wewnątrzkomórkowych i jednocześnie przepuszczalnością błony komórkowej. Od wartości pH zależy również stopień adsorpcji bakteriocyn do receptorów błony komórkowej producentów. Stwierdzono, że 93 - 100 % bakteriocyn ulega adsorpcji w środowisku o pH 6, natomiast w pH 1,5 - 2 adsorpcji ulega tylko poniżej 5 %. Nie jest to jednak regułą w odniesieniu do wszystkich białek tego typu [11, 16]. Bakteriocyna pochodząca z *Lactobacillus acidophilus* LF221 w bardzo małym stopniu ulegała adsorpcji w zakresie pH 5,5 - 7, natomiast pediocyna AcH, nizyna, sakacyna A prawie całkowicie ulegały adsorpcji w tym przedziale pH [7]. Zdolność adsorpcji pentocyny 31-1 wytwarzanej przez *L. pentosus* 31-1 w zależności od wartości pH wykorzystano do wstępnego oczyszczenia tej bakteriocyny metodą adsorpcji – desorpcji [51]. Warunki silnie kwasowe stabilizują aktywność bakteriocyn podczas wydłużania czasu hodowli [4].

Temperatura

Produkcja bakteriocyn przez bakterie kwasu mlekowego jest procesem zależnym od zmian temperatury. Optymalna temperatura wzrostu drobnoustrojów nie zawsze pokrywa się z najlepszą temperaturą biosyntezy białek o charakterze przeciwdrobnoustrojowym. Wzrost mikroorganizmów w temperaturze niższej niż optymalna skutkuje zmniejszoną produkcją biomasy oraz zwiększoną produktywnością specyficznych metabolitów. Spowolniony za sprawą obniżonej temperatury wzrost może wpływać na zachowanie większej ilości energii w komórce. Energia ta jest niezbędna do polimeryzacji cząstek (aminokwasów) tworzących aktywny peptyd oraz specyficznie skoordynowanej kontroli ekspresji genu odpowiedzialnego za formowanie się bakteriocyny

[13]. Zmiana temperatury do wartości suboptymalnej, przy jednoczesnym zwiększeniu ciśnienia osmotycznego intensyfikowała produkcję bakteriocyny wywarzanej przez *Lactobacillus pentosus* B96 [14, 15]. *Lactobacillus rhamnosus* GP1 [24, 34] i *Lactobacillus plantarum* ZJ316 [24] wykazywały najwyższą zdolność do produkcji bakteriocyn w temperaturze optymalnej dla ich wzrostu.

Faza wzrostu

Produkcja bakteriocyn jest ściśle skorelowana z liczbą komórek w medium hodowlanym. Maksimum produkcji bakteriocyn dla większości LAB znajduje się w końcowej fazie wzrostu logarytmicznego oraz na początku fazy stacjonarnej [4, 7, 15, 16]. Dla większości bakterii optymalne warunki wzrostu są najlepszymi warunkami do produkcji bakteriocyn, natomiast w przypadku amyłoworyny wytwarzanej przez *L. amylovorus* DCE 471 warunki odbiegające od optymalnych powodowały intensyfikację biosyntezy tego związku [13]. Słabą korelację pomiędzy liczbą komórek a produkcją bakteriocyn zauważono w przypadku szczepów produkujących białka sekretoryjne w fazie stacjonarnej wzrostu [15]. Podczas późnej fazy stacjonarnej następuje obniżenie aktywności bakteriocyn. Przyczyną tego może być proteolityczna degradacja aktywnych białek lub ich agregacja do form natywnych [51].

Hodowla w kokulturze

Informacje dotyczące biosyntezy, struktury oraz właściwości bakteriocyn zapisane są w DNA plazmidowym lub/i chromosomowym. Uznawano, że wydzielanie bakteriocynopodobnych substancji odbywa się w sposób konstytutywny [25]. W większości przypadków niezbędna jest obecność związków sygnałnych, by sekrecja aktywnego białka została uruchomiona. Regulacja procesu biosyntezy bakteriocyn klasy II jako związków obronnych zachodzi w warunkach zagrożenia danej populacji mikroorganizmów przez komórki danego szczepu bądź komórki obce. Komórki komunikują się pomiędzy sobą za pomocą substancji chemicznych, co zwane jest zjawiskiem *quorum sensing*. W przypadku bakteriocyn lantybiotykowych (klasa I), do których należy nieliczna grupa aktywnych białek pochodzących z LAB, mechanizm ten polega na działaniu trzech komponentów – peptydu indukującego (IP – inducing peptide), który aktywuje dwuskładnikowy system złożony z histydynowej kinazy białkowej (HK - histidine protein kinase) oraz z regulatora odpowiedzi (RR - reponse regulator) [25, 41]. Dla większości lantybiotyków bakteriocyna sama w sobie działa jako induktor [8, 41]. Bakteriocyny nielantybiotykowe (klasa II) również podlegają regulacji poprzez białko induktorowe, które wykazuje właściwości fizykochemicznych bakteriocyn, funkcjonując jako swoisty feromon integrujący proces syntezy, transportu i regulacji białka. Związki indukujące wydzielane są do środowiska przez komórki gospodarza lub komórki innych mikroorganizmów zajmujących tą samą niszę. Uznano, że zjawisko *quo-*

rum sensing pozwala danej populacji mikroorganizmów synchronizować produkcję peptydów przeciwdrobnoustrojowych jako funkcję gęstości komórek [22].

Również pewne frakcje białek obecne w mleku mogą stanowić determinujący czynnik indukujący szlak biosyntezy bakteriocyn. Udowodniono, że jedynymi molekułami sygnałnymi pozwalającymi na produkcję macedocyny były związki pochodzące z degradacji białek mleka powstałych wskutek aktywności proteolitycznej samego producenta *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 [19].

Wykazano, że synteza laktacyny B przez *L. acidophilus* La-5 zachodziła pod warunkiem zastosowania hodowli w kokulturze z mikroorganizmami startowymi tj. *Streptococcus thermophilus* oraz *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Zauważono jednocześnie, że cistron odpowiedzialny za ekspresję białka autoindukcyjnego (IP) jest aktywny nawet w monokulturze, ale poziom sekrecji bakteriocyny nie był możliwy do określenia przy zastosowaniu metody z wykorzystaniem dyfuzji w żelu agarozowym [41]. Podobną zależność stwierdzono w badaniach nad szczepem *L. plantarum* NC8 który wytwarzał plantarycynę NC8 tylko w obecności innych szczepów bakterii gram dodatnich lub supernatantu z ich hodowli. Co więcej, zastosowanie peptydu autoindukcyjnego w pożywce płynnej MRS indukowało nie tylko ekspresję genu odpowiedzialnego za biosyntezę trzech dwuskładnikowych bakteriocyn, ale również operon regulacyjny, w ten sposób demonstrując proces autoindukcji.

Pole elektryczne

Jak wykazały badania, umiarkowane pole elektryczne zmienia aktywność metaboliczną komórek. A zatem wpływ częstotliwości pola elektrycznego może skutecznie stymulować pewne szlaki metaboliczne. Wykazano, że pole elektryczne o różnych częstotliwościach wywiera wpływ na przepuszczalność błon komórkowych oraz dyfuzję u eukariota [35].

Składniki medium hodowlanego

Rozwój wszystkich organizmów żywych jest uwarunkowany obecnością właściwych składników odżywczych w środowisku bytowania. Dostępność oraz ich przyswajalność determinuje prawidłowe funkcjonowanie danej populacji. Zmiany źródła węgla, azotu czy substancji, takich jak składniki mineralne i witaminy prowadzą do modyfikacji szlaków biochemicznych. Dzięki temu produkowane są enzymy oraz inne substancje wspomagające przyswajanie składników pokarmowych. Prawie każda grupa mikroorganizmów ma ściśle określone, optymalne źródło danego pierwiastka. Jednak nie oznacza to, że nie wykazuje zdolności adaptacji komórki do pobierania składników z innych źródeł.

Zastosowanie kombinacji tryptonu i/lub ekstraktu drożdżowego jako źródła azotu w modyfikowanej pożywce MRS skutkowało zwiększeniem aktywności przeciwdrob-

noustrojowej peptydu ST4SA wytwarzanego przez *Enterococcus mundtii* do 102400 AU/ml, z wartości 51200 AU/ml dla standardowej pożywki MRS. Stwierdzono, że produkcja peptydu ST4SA jest stymulowana przez trypton i ekstrakt drożdżowy, ale nie przez ekstrakt mięsny. Świadczy to o tym, że ekstrakt mięsny nie zawierał niezbędnych składników do biosyntezy bakteriocyny ST4SA [44]. Odmienne rezultaty otrzymano w przypadku bakteriocyny BacST8KF [31], pediocyny AcH [5] i helwetycyny J [23], w których to przypadku zastosowanie ekstraktu mięsnego jako źródła azotu skutkowało poprawą wydajności produkcji bakteriocyn.

Zastosowanie fruktozy jako jedyne źródła węgla pozwoliło uzyskać taką samą biosyntezę peptydu. Natomiast wykorzystanie laktozy i mannozy spowodowało dwukrotne obniżenie aktywności peptydu [44]. Szczep *L. brevis* OG1 syntetyzował znacznie większe ilości bakteriocyny przy zmniejszonym stężeniu glukozy do 1 % [29]. W miarę zwiększania stężenia glukozy w pożywce (z 20 do 60 g/l) nie uzyskano poprawy aktywności amyloworyny L471, co więcej białka te szybciej ulegały degradacji [30].

Środki obniżające napięcie powierzchniowe

Środki powierzchniowo czynne wpływają zarówno na intensywność biosyntezy bakteriocyn, jak i na ich aktywność. Zasada oddziaływania detergentów niejonowych tj. Tween 80 nie jest do końca poznana. Uważa się, że mogą one zmieniać napięcie powierzchniowe komórek producentów, przez co wzrasta tempo uwalniania bakteriocyn z powierzchni komórki i wzrasta ich stężenie w środowisku [44]. Tween 80 jako jeden z najczęściej stosowanych detergentów niejonowych wywierał dwojakie działanie. Szczep *Enterococcus mundtii* QU2 pozytywnie oddziaływał na syntezę bakteriocyny w porównaniu z medium bez dodatku detergentu. Podobną zależność zaobserwowano w przypadku pediocyny AcH [6], bakteriocyn ST23LD, ST341LD [43], ST311LD [42] i plantarycyny 423 [31]. Zatem może mieć on negatywny wpływ w procesie oczyszczania bakteriocyn, głównie z wykorzystaniem techniki HPLC na kolumnie C18 (Nucleosil) – zastosowanie aplikacyjne [44]. Jako związek powierzchniowo czynny stosowany jest również glicerol. W większości analizowanych przypadków wykazywał właściwości hamujące produkcję aktywnych białek. Za sprawą glicerolu stwierdzono obniżenie poziomu sekrecji bakteriocyny ST4SA w zależności od stężenia. Zwiększanie dawki glicerolu powyżej 2g/l powodowało obniżanie wydajności produkcji peptydu ST4SA, plantarycyny ST31 [31], bakteriocyn ST311LD [42] i ST194BZ [45]. Sugerowane jest, że glicerol powodując stres osmotyczny komórek producentów zmniejsza wydajność produkcji bakteriocyn [45].

Dwuwartościowe kationy metali

Kationy metali zawarte w medium hodowlanym wywierają istotny wpływ na biosyntezę bakteriocyn. Stopień wrażliwości na rodzaj pierwiastka oraz jego stężenie jest zależny od szczepu mikroorganizmu. Aniony (fosfor) oraz kationy (Mg^{2+} oraz Ca^{2+}) odgrywają znaczącą rolę w produkcji niskocząsteczkowych białek. Fosfor nieorganiczny wzmagał produkcję nizyny przez *L. lactis* subsp. *lactis* NIZO22186. Najlepszy efekt (3500 IU/ml) uzyskano, stosując 50 g/l K_2HPO_4 w pożywce o kontrolowanym pH 6,8. Jony Mg^{2+} spowodowały wzrost produkcji pediocyny AcH oraz nizyny, która również w znacznie mniejszym stopniu ulegała adsorpcji do komórek *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC11454. Jakkolwiek nie potwierdzono takiego samego wpływu fosforu i magnezu w odniesieniu do szczepu *L. lactis* subsp. *lactis* IO-1 [30]. Dodatek $CaCl_2$ skutkowało wzrostem koncentracji nizyny Z w medium oraz poprawą tempa syntezy bakteriocyny, natomiast nie wpływał na wzrost komórek i produkcję kwasu mlekowego. Jony wapnia mogą stymulować syntezę prepeptydu, powodować aktywację enzymów odpowiedzialnych za jego dojrzewanie lub wspomagać sekrecję poza komórkę. Przypuszcza się, że peptydaza NisP mająca miejsca wiążące Ca^{2+} powoduje odcięcie peptydu liderowego od prekursora nizyny. Prekursor nie wykazuje aktywności przeciwbakteryjnej, dlatego też Ca^{2+} może aktywować enzym odpowiedzialny za syntezę formy aktywnej. Sugerowano również, że jony wapnia odgrywają rolę w ochronie ciągłości błony lipidowej szczepu produkującego dane białko, wzmacniając tym jego odporność [26]. Jony dwuwartościowe Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} oraz Fe^{2+} jako często występujące w żywności wywarły niekorzystny wpływ na produktywność gaserycyny T wytwarzanej przez *L. gasseri* LA158. Zastosowano różne sole ww. metali. Stwierdzono, że wapń w postaci $CaCO_3$ ze względu na niski stopień dysocjacji trudno rozpuszczał się i nie wywierał negatywnego wpływu na aktywność gaserycyny. Związki wapnia również hamowały produkcję aktywnego białka przez *Enterococcus mundtii* QU2 [50]. Wykazano, że dwuwartościowe jony metali, a nie nierozpuszczalne sole, znacząco hamowały produkcję gaserycyny w sposób zależny od koncentracji danego pierwiastka w medium. Kationy te nie wpływały jednak na aktywność bakteriocyny [3].

Chlorek sodu w stężeniu 1 i 2 % zastosowany jako dodatek do medium hodowlanego spowodował dwukrotny wzrost aktywności bakteriocyny z *L. brevis* OG1 [29].

Obecność substancji dodatkowych (alkohol etylowy, NaCl)

Alkohol etylowy i chlorek sodu poprzez swoją aktywność osmotyczną powodują wyraźne zmiany ilości wytwarzanych metabolitów. W zależności od koncentracji czynnika stresującego możliwa jest intensyfikacja lub ograniczenie szlaków biochemicznych odpowiedzialnych za produkcję bakteriocyn. Alkohol etylowy w stężeniu

1 % v/v powodował podwojenie się ilości amyłoworyny L471 w hodowli w warunkach optymalnych dla wzrostu *L. amylovorus* [13].

Odnosząc się do żywności jako środowiska wieloczynnikowego niezbędna jest wiedza na temat oddziaływania poszczególnych czynników na biosyntezę i aktywność bakteriocyn. Modyfikując środowisko w odpowiedni sposób można zwiększyć efektywność produkcji aktywnych metabolitów białkowych, jak również poprawić ich zdolności bakteriobójcze i bakteriostatyczne.

Badane szczepy bakterii z gatunku *Lactobacillus acidophilus* spełniały podstawowe kryterium stawiane szczepom probiotycznym, czyli wykazywały zdolności do przeżycia w warunkach *in vitro* środowiska przewodu pokarmowego – w niskim pH oraz w obecności soli żółci.

Celem pracy było przetestowanie zdolności wybranych szczepów do hamowania rozwoju bakterii *H. pylori*, *S. enteritidis* i *E. coli* oraz określenie ilości syntetyzowanego białka o charakterze bakteriocyn.

Material i metody badań

Testowano dwa szczepy bakterii *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079 i DSM 20242 pochodzące z niemieckiej kolekcji kultur Deutche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen. Testowano antagonizm wobec 11 klinicznych szczepów *Helicobacter pylori* izolowanych od pacjentów z chorobą wrzodową żołądka i dwunastnicy, 6 szczepów *Salmonella enteritidis* i 8 szczepów *Escherichia coli*. Wszystkie one były izolatami własnymi Katedry i Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej UM w Poznaniu. Szczepy *Escherichia coli* izolowano od pacjentów z dróg moczowo-płciowych.

Do hodowli *H. pylori* stosowano podłoże Columbia agar (bioMerieux) z 7 % krwi baraniej. Hodowle prowadzono w temp. 37 °C w warunkach optymalnych dla rozwoju bakterii mikroaerofilnych (Genbag microaer lub Genbox microaer- bioMerieux) przez 4 dni. Hodowlę *S. enteritidis* i *E. coli* prowadzono na podłożu Drygalskiego i podłożu Mueller-Hintona (bioMerieux) bez ograniczania dostępu tlenu, w temp. 37 °C przez 24 h. Hodowlę *Lactobacillus acidophilus* prowadzono na podłożu Rogosa SL agar (Difco) oraz na podłożu MRS agar (Oxoid) w obecności 6 % CO₂ w temp. 37 °C przez 48 h.

Antagonizm między drobnoustrojami oznaczano metodą słupkową wg Strus i wsp. [38, 39]. Zawiesinę bakterii *L. acidophilus* o gęstości 2 w skali McFarlanda przesiewano na podłoże MRS i inkubowano w temp. 37 °C przez 48 h w obecności 6 % CO₂. Po inkubacji w MRS agar wycinano słupki o średnicy 10 mm, które przenoszono na podłoże uprzednio posiane badanymi szczepami – w przypadku *H. pylori* na podłoże Columbia agar (bioMerieux) z 7 % krwi baraniej, a w przypadku szczepów *S. enteritidis* i *E. coli* na podłoże Mueller-Hintona. Inokulum badanych szczepów stanowiła zawiesina badanych drobnoustrojów w soli fizjologicznej o gęstości 2 w skali

McFarlanda. Po nałożeniu słupka z hodowlą *L. acidophilus* podłoża z obydwoma badanymi drobnoustrojami umieszczano w temp. 4 °C na 4 h. Dalszą inkubację podłoży prowadzono w temp. 37 °C przez 4 dni w warunkach mikroaerofilnych w przypadku *H. pylori* i w ciągu 24 h bez ograniczania dostępu tlenu w przypadku *S. enteritidis* i *E. coli*. Po inkubacji oznaczano w mm średnicę strefy zahamowania wzrostu wokół słupków zawierających szczepy *L. acidophilus*, a wynik podawano łącznie ze średnicą samego słupka.

Białko po 16 h hodowli *L. acidophilus* DSM 20079 i DSM 20242 (2 % inokulum) w bioreaktorze o objętości 1,5 dm³, stosując zróżnicowane źródło węgla w ilości 2 % do standardowej pożywki MRS (Oxoid), wysalano wykorzystując frakcjonowanie nasyconym roztworem siarczanu amonu do końcowego stężenia w próbie 2 M (V frakcja) i 1,6 M (IV frakcja) w temp. 4 °C. W izolacji z płynu pochodowlanego wykorzystywano zjawisko zmniejszenia rozpuszczalności białka pod wpływem zwiększającego się stężenia soli (siarczanu amonu). Tak otrzymane zawiesiny odwirowywano w temp. 4 °C, 15000 x g, 15 min i zawieszano w 50 mM buforze octanowym (pH 5,0). Zawartość białka w próbach określano metodą Bradforda przy długości λ fali 595 nm. Masę cząsteczkową białek określano metodą elektroforezy SDS-PAGE w żelu poliakrylamidowym z tryciną (stężenie żelu rozdzielającego 14 %).

Analizę ilości i jakości wytworzonych metabolitów wykonywano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC (Waters) z zastosowaniem detektora refraktometrycznego typu 2414. Do rozdzielania stosowano kolumnę BioRad Aminex HPX-87 M, eluent 5 mM H₂SO₄, przepływ 0,6 cm³/min, temp. kolumny 30 °C. Próbkę do analiz pobierano w czasie hodowli mikroorganizmów w pożywkach ze zróżnicowanym źródłem węgla. Ponadto określano zdolność szczepów *L. acidophilus* do produkcji nadtlenu wodoru w obecności 6 % CO₂ w temp. 37° C przez 48 h na podłożu różnicującym TMB-Plus agar przygotowanym wg Rabe i Hillier [33]. Wystąpienie zmiany zabarwienia wyrosłych kolonii (pojawienie się niebieskiego zabarwienia) oznaczało wytwarzanie nadtlenu wodoru.

Wyniki i dyskusja

Oba badane szczepy *L. acidophilus* najsilniej hamowały wzrost *H. pylori*, a strefy zahamowania wzrostu wynosiły od 19 do 25 mm w zależności od testowanego szczepu *H. pylori*. Zdecydowanie mniejsze strefy zahamowania wzrostu obserwowano w przypadku *S. enteritidis* i wynosiły one od 12 do 16 mm. Nie zaobserwowano aktywności hamującej wobec szczepów *E. coli* 2219 i 2480 przez testowane szczepy *Lactobacillus acidophilus*. Dla pozostałych testowanych szczepów strefy te wynosiły od 11 do 16 mm (tab. 1). Wrażliwość na *L. acidophilus* DSM 20079 i DSM 20242 uzależniona jest od określonego szczepu i jest jego cechą charakterystyczną. Można jednak zauwa-

żyć bardzo silne hamujące właściwości obydwu testowanych szczepów wobec *H. pylori*. Zależność ta może być związana z produkcją bakteriocyn przez te szczepy.

Tabela 1

Strefy zahamowania wzrostu *H. pylori*, *S. enteritidis* i *E. coli* (mm) przez *L. acidophilus* DSM 20079 i DSM 20242.

Zones of inhibited growth of *H. pylori*, *S. enteritidis*, and *E. coli* by *L. acidophilus* DSM 20079 and DSM 20242.

Bakterie patogenne Pathogenic bacteria	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
	DSM 20079	DSM 20242
	Strefa zahamowania [mm] Inhibition zone [mm]	
<i>Helicobacter pylori</i> 53	23,5	23,5
<i>Helicobacter pylori</i> 52	24,5	22,5
<i>Helicobacter pylori</i> 45	25	19
<i>Helicobacter pylori</i> 44	22,5	22
<i>Helicobacter pylori</i> 43	25	18
<i>Helicobacter pylori</i> 49	24	20,5
<i>Helicobacter pylori</i> 50	24	24
<i>Helicobacter pylori</i> 51	25	23
<i>Helicobacter pylori</i> 42	24,5	22,5
<i>Helicobacter pylori</i> 40	25	22
<i>Helicobacter pylori</i> 39	23	21,5
<i>Salmonella enteritidis</i> 1	13	14
<i>Salmonella enteritidis</i> 2	14	13
<i>Salmonella enteritidis</i> 3	16	14
<i>Salmonella enteritidis</i> 4	12	12
<i>Salmonella enteritidis</i> 5	14	12
<i>Salmonella enteritidis</i> 6	15	14
<i>Escherichia coli</i> 2254	12	12
<i>Escherichia coli</i> 2258	13	11
<i>Escherichia coli</i> 2308	12	12
<i>Escherichia coli</i> 2322	15	16
<i>Escherichia coli</i> 2347	13	12
<i>Escherichia coli</i> 2451	11	11

Objaśnienie: / Explanatory note:

Brak zahamowania wzrostu *Escherichia coli* 2219 i *Escherichia coli* 2480 przez *L. acidophilus* DSM 20079 i DSM 20242 / The growth of *Escherichia coli* 2219 and *Escherichia coli* 2480 is not inhibited by *L. acidophilus* DSM 20079 and DSM 20242.

W przypadku bakterii *L. acidophilus* DSM 20079 i DSM 20242 celem wyjaśnienia mechanizmu antagonistycznego wpływu wobec bakterii patogennych podjęto próbę izolacji białka o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych. Wg doniesień Deraz i wsp. [16] izolowane białko *L. acidophilus* DSM 20079 ma masę ok. $6,6 \cdot 10^3$ Da [16]. W zależności od medium hodowlanego uzyskano zróżnicowaną ilość pozyskanego białka o właściwościach bakteriocynogennych (tab. 2).

Tabela 2

Zawartość białka w próbkach w zależności od medium hodowlanego w przypadku hodowli bakterii *L. acidophilus* DSM 20079 i DSM 20242.

Content of proteins in samples depending on type of culture medium used to grow *L. acidophilus* DSM 20079 and DSM 20242 strains.

Źródło węgla Source of carbon	<i>L. acidophilus</i> DSM 20079		<i>L. acidophilus</i> DSM 20242	
	IV frakcja \pm s / SD [$\mu\text{g}/\text{cm}^3$]	V frakcja \pm s / SD [$\mu\text{g}/\text{cm}^3$]	IV frakcja \pm s / SD [$\mu\text{g}/\text{cm}^3$]	V frakcja \pm s / SD [$\mu\text{g}/\text{cm}^3$]
Laktoza / Lactose	319,75 \pm 35,27	489,75 \pm 10,49	79,8 \pm 3,2	174,3 \pm 10,2
Fruktoza / Fructose	169,75 \pm 38,38	347,25 \pm 100,19	82,3 \pm 3,2	72,3 \pm 2,1
Sacharoza Saccharose	0 \pm 2,41	75,25 \pm 42,76	0	18,75 \pm 1,76
Głukoza / Glucose	144,75 \pm 46,51	109,75 \pm 32,83	78,8 \pm 3,3	74,0 \pm 3,2

Działanie hamujące wzrost testowanych mikroorganizmów patogennych możliwe jest również poprzez działanie kwasu mlekowego, dlatego też postanowiono ustalić ilość wytwarzanego kwasu mlekowego w zależności od zastosowanego źródła węgla w pożywce (tab. 3).

Frakcjonowane białka zbierano w 16 h hodowli *L. acidophilus* DSM 20079 i DSM 20242 prowadzonej w bioreaktorze, pH pożywki regulowano do wartości 6,0 a w 16 h obniżano do wartości 5,0. Deraz i wsp. [16], prowadząc badania nad biosyntezą acidocyny D079 przez *L. acidophilus* DSM 20079, wykazali, że największe ilości tego peptydu wytwarzane są właśnie między 16 a 18 h hodowli, oznaczając masę cząsteczkową tego peptydu (acidocyna D079) na poziomie $6,6 \cdot 10^3$ Da. Doświadczenia własne potwierdzają obecność białka o charakterze bakteriocyny o masie cząsteczkowej $6,5 \cdot 10^3$ Da, a największy jego udział obserwowano w ostatnim etapie wysalania czyli V frakcji uzyskiwanego białka przy stężeniu siarczanu amonu w próbce równej 2 M.

Tabela 3

Zmiana zawartości sacharydów i kwasu mlekowego w podłożach podczas hodowli *L. acidophilus* DSM 20079 i DSM 20242 w zależności od źródła węgla w pożywce.

Change in the content of saccharides and lactic acid in media while growing *L. acidophilus* DSM 20079 and DSM 20242 depending on the carbon source in the medium.

Czas [h] Time [h]	<i>L. acidophilus</i> DSM 20079							
	Laktoza Lactose [mg/cm ³]	Kwas mlekowy Lactic acid [mg/cm ³]	Fruktoza Fructose [mg/cm ³]	Kwas mlekowy Lactic acid [mg/cm ³]	Glukoza Glucose [mg/cm ³]	Kwas mlekowy Lactic acid [mg/cm ³]	Sacharoza Sacharose [mg/cm ³]	Kwas mlekowy Lactic acid [mg/cm ³]
2	19,12	0,56	20,04	0,48	19,88	0,83	19,56	0,44
6	16,68	0,96	18,20	0,8	14,00	1,67	16,68	0,64
12	12,21	1,72	17,24	1,08	12,84	1,96	15,96	1,24
18	10,38	2,36	9,92	1,96	9,84	3,52	9,24	2,88
24	7,03	4,96	7,24	2,20	8,92	8,04	8,04	2,92
	<i>L. acidophilus</i> DSM 20242							
2	19,92	0,54	19,61	0,18	18,8	0,81	19,6	0,24
6	17,68	0,76	14,72	0,92	17,44	1,27	18,2	0,32
12	14,21	1,52	14,6	1,08	16,28	1,56	5,04	1,24
18	10,58	2,37	8,8	2,16	16,16	1,52	3,22	2,88
24	8,03	3,78	7,76	2,9	12,36	4,3	3,92	4,84

Największe stężenie białek niskocząsteczkowych o masie od $(6 - 7) \cdot 10^3$ Da występowało w próbach pochodzących z hodowli prowadzonej w pożywce z laktozą i fruktozą, jednak w przypadku szczepu *L. acidophilus* DSM 20242 uzyskiwano mniejsze ilości białek niskocząsteczkowych (tab. 2). Derez i wsp. [16] wykazali właściwości przeciwbakteryjne acidocyny D079 wobec szczepu *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*. Istotny zatem jest przedstawiony w niniejszych badaniach antagonizm wobec *H. pylori*, za który w dużym stopniu odpowiedzialne są właśnie białka niskocząsteczkowe. Największe stężenie uzyskiwanego białka o charakterze bakteriocyny stwierdzano w hodowli *L. acidophilus* DSM 20079 w podłożu z dodatkiem laktozy ($489,75 \pm 10,49 \mu\text{g/cm}^3$). Białko o podobnej masie cząsteczkowej uzyskano również w hodowli *L. acidophilus* DSM 20242 w podłożu z dodatkiem laktozy, glukozy i fruktozy (max. $174,3 \pm 10,2 \mu\text{g/cm}^3$). Biswas i wsp. [6] wykazali, że produkcja pediocyny AcH zachodzi z większą wydajnością, jeśli w pożywce zwiększona zostaje ilość glukozy do 20 g/dm^3 . Podobnie Yang i Ray [47] ustalili, że zwiększenie biosyntezy nizyny było możliwe po podwojeniu stężenia glukozy w pożywce. Badania prowadzone przez de

Vuysta i Vandamme'a [12] dowodzą, że stężenie sacharozy w zakresie 10 - 20 g/dm³ stymulowało zwiększenie produkcji nizyny o 20 %. Meghrous i wsp. [27] wykazali natomiast, że stężenie laktozy, podobnie jak innych sacharydów wpływa na biosyntezę bakteriocyn, a maksymalną ilość nizyny uzyskano stosując stężenie laktozy od 30 - 35 g/dm³, wyższe stężenie laktozy hamowało wzrost komórek *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* i zakłócało syntezę nizyny. Analizy HPLC metabolitów produkowanych przez testowane mikroorganizmy probiotyczne potwierdziły wytwarzanie największej ilości kwasu mlekowego przez *L. acidophilus* DSM 20079 w pożywce z glukozą, a ilość ta kształtowała się na poziomie 8,04 µg/cm³ po 24 h hodowli tych mikroorganizmów. Najmniejszy przyrost stężenia kwasu mlekowego obserwowano w pożywce z fruktozą. W przypadku *L. acidophilus* DSM 20242 ilość wytwarzanego kwasu mlekowego przez *L. acidophilus* DSM 20242 była prawie dwukrotnie mniejsza (tab. 3). Zastosowanie fruktozy jako źródła węgla spowodowało większą biosyntezę białka, co może wynikać ze zmiany szlaków metabolicznych. Anastasiadou i wsp. [1] wykazali, że bakterie *Pediococcus acidilactisci* NRRL B5627 biosyntetyzują kwas mlekowy i pediocynę SA-1, stwierdzając przy tym, że wraz ze wzrostem biosyntezy tego białka zmniejsza się wydajność biosyntezy kwasu mlekowego. Biosynteza wielu bakteriocyn uzależniona jest od stężenia kwasu mlekowego w podłożu hodowlanym. Taniguchi i wsp. [40] zauważyli zmniejszenie wzrostu komórek *L. lactis* subsp. *Lactis*, co jest uwarunkowane obecnością kwasu mlekowego w podłożu. Zmniejszenie koncentracji biomasy wiąże się ze zmniejszeniem biosyntezy białek niskocząsteczkowych.

Dotychczas opublikowane wyniki badań [20] wykazały istotną aktywność antagonistyczną bakterii *L. acidophilus* DSM 20079 w stosunku do czynników patogennych przenoszonych drogą pokarmową, takich jak: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Salmonella enteritidis*. To bardzo szerokie spektrum działania, odpowiadające I i II klasie bakteriocyn, umożliwia zastosowania jej jako biokonserwanta żywności. Możliwe jest również zwiększenie zasięgu jej działania przez synergistyczne działanie z inną bakteriocyną hamującą szczepy odporne na działanie *L. acidophilus* DSM 20079. Przykładem może być diwercyna produkowana przez bakterie *Carnobacterium divergens*, które mają zdolność do bakteriobójczego działania na bakterie *Listeria* sp. [36].

Szczepy *L. acidophilus* DSM 20079 i DSM 20242 nie były zdolne do produkcji nadtlenu wodoru.

W Polsce zatrucia pokarmowe wywołane *Salmonella enteritidis* stanowiły poważny problem od wielu lat. Udział tych mikroorganizmów w zatruciach u ludzi pozostaje w ścisłym związku z występowaniem *Salmonella* wśród ptaków. Niektóre szczepy *Escherichia coli* mogą wywoływać infekcje dróg moczowych. Bakterie *E. coli* normalnie występuje w przewodzie pokarmowym człowieka, ale stają się szkodliwe, jeśli namnożą się w żywności. *Helicobacter pylori* odpowiada za chorobę wrzodową

żołądka i dwunastnicy oraz proces nowotworowy [18]. Alternatywne rozwiązanie w walce z patogenami może stanowić zastosowanie probiotyków, szczególnie tych o działaniu antagonistycznym. Testowane w badaniach szczepy *L. acidophilus* mają zatem szansę być zaliczone do miana bakterii probiotycznych. Dotychczasowe badania dowiodły, że obydwie testowane szczepy *Lactobacillus acidophilus* w środowisku o pH 2 i 3 przeżywają do 24. godziny hodowli. Bakterie *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079 w środowisku o pH 5 i 6 żyją dłużej niż *Lactobacillus acidophilus* DSM 20242. Inaczej zachowują się bakterie nie kapsułkowane obydwu tych szczepów w środowisku o pH 4. Bardziej wrażliwy okazał się szczep *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079. W środowisku o pH 7 i 8 bakterie *Lactobacillus acidophilus* zmniejszają swoją przeżywalność do 0 w 144. godzinie hodowli – szczep *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079 i w 168 godzinie hodowli – szczep *Lactobacillus acidophilus* DSM 20242. Tolerancja na żółć pozwala na przeżycie bakteriom kwasu mlekowego w jelicie cienkim. Na początku prowadzonych doświadczeń liczba bakterii kształtowała się na poziomie 10^6 jtk/ml i po 8 h inkubacji w temp. 37 °C liczba żywych bakterii *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079 i *Lactobacillus acidophilus* DSM 20242 zwiększyła się o jeden rząd wielkości tj. do 10^7 jtk/ml w przypadku podłoża z dodatkiem żółci w ilości do 4 %. W ciągu 8 h hodowli obserwowano przyrost absorbancji świadczący o braku hamującego wpływu żółci na wzrost szczepów *Lactobacillus acidophilus*. Spośród szczepów bakterii *Lactobacillus acidophilus* bardziej wrażliwy okazał się szczep DSM 20242, który w porównaniu ze szczepem DSM 20079 wykazał wrażliwość na antybiotyki z grupy tetracyklin. Testowane w badaniach szczepy spełniały podstawowe kryterium stawiane bakteriom probiotycznym, czyli zdolność do przeżycia w warunkach przewodu pokarmowego [20]. Należy zatem przypuszczać, że szczepy różnią się również działaniem antagonistycznym w stosunku do bakterii patogennych. W badaniach *in vitro* wykazano, że szczepy innych gatunków mikroorganizmów, należących do bakterii probiotycznych, mogą hamować wzrost *Helicobacter pylori*. Wykazano również, że supernatant z hodowli *Lactobacillus johnsonii* La1 hamował wzrost *H. pylori* w testach *in vitro*. *Lactobacillus* GG jest szczepem, który przeciwdziała biegunkom wywołanym przez *Clostridium difficile* [28, 48]. Metabolitem o działanie hamującym wobec bakterii *H. pylori* jest kwas mlekowy, który wytwarzany jest przez *Lactobacillus*. W doświadczeniach na modelu mysim *in vitro* i *in vivo* stwierdzono, że blokuje on aktywność ureazy, czego przypuszczalnie następstwem jest ograniczenie przeżywalności *H. pylori* w środowisku niskiego pH żołądka. Wydzielana przez *H. pylori* ureaza determinuje rozkład mocznika, zapewnia neutralizację pH i w konsekwencji umożliwia kolonizację nabłonka śluzówki żołądka. Znaczenie tego enzymu jako głównego czynnika kolonizacji *H. pylori* dobrze jest udokumentowane w doświadczeniach *in vivo* z użyciem jego mutantów niewytwarzających ureazy [2].

Andrzejewska i Szkaradkiewicz [2] wykazali antagonistyczne oddziaływanie szczepów *L. acidophilus* izolowanych ze śliny zdrowych ludzi wobec 20 klinicznych szczepów *H. pylori*. Potwierdzono, że właściwości testowanych szczepów *Lactobacillus* były zróżnicowane, ale nie stwierdzono istotnego wpływu nadtlenu wodoru na hamowanie wzrostu *H. pylori* [2]. Badania kliniczne i dane z eksperymentów prowadzonych na zwierzętach wykazały, że *L. acidophilus*, *L. johnsonii* i *L. gasseri* mogą hamować wzrost *H. pylori* *in vivo* oraz *in vitro* [21].

Na podstawie przedstawionych danych można stwierdzić, że bakterie *L. acidophilus* DSM 20079 i DSM 20242 charakteryzowały się zróżnicowanym antagonistycznym działaniem wobec klinicznych szczepów *H. pylori*, *S. enteritidis* i *E. coli*. Na uwagę zasługuje jednak antagonistyczne oddziaływanie zarówno *L. acidophilus* DSM 20079, jak i DSM 20242 wobec testowanych szczepów *Helicobacter pylori*, co pośród szczepów bakterii o właściwościach probiotycznych stanowi dodatkową zaletę.

Wnioski

1. Szczepy *L. acidophilus* DSM 20079 i DSM 20242 bakterii wykazujących właściwości probiotyczne w największym stopniu hamowały wzrost *H. pylori*.
2. *L. acidophilus* DSM 20079 i DSM 20242 wykazywał też aktywność hamującą wzrost testowanych szczepów *S. enteritidis* i 6 spośród testowanych szczepów *E. coli*.
3. Nie obserwowano zdolności *L. acidophilus* DSM 20079 i DSM 20242 do hamowania wzrostu *E. coli* 2219 i 2480.
4. Zastosowanie laktozy lub fruktozy jako jedynego źródła węgla w medium hodowlanym powodowało znaczną poprawę biosyntezy białek niskocząsteczkowych.

Literatura

- [1] Anastasiadou S., Papagianni M., Filiouis G., Ambrosiadis I., Koidis P.: Pediocin SA-1, an antimicrobial peptide from *Pediococcus acidilactici* NRRL B5627: Production conditions, purification and characterization. *Bioresource Technol.*, 2008, **99** (13), 5384-5390.
- [2] Andrzejewska E., Szkaradkiewicz A.: Antagonistyczne oddziaływanie *Lactobacillus acidophilus* wobec klinicznych szczepów *Helicobacter pylori*. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 2007, (59), 59-64.
- [3] Arakawa K., Kawai Y., Nishimura J., Kitazawa H., Saito T.: Negative effect of divalent metal cations on production of gassericin T, a bacteriocin produced by *Lactobacillus gasperi*, in milk-based media. *Int. Dairy J.*, 2009, **19**, 612-616.
- [4] Bendali F., Gaillard-Martinie B., Hebraud M., Sadoun D.: Kinetic of production and mode of action of the *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* anti-listerial bacteriocin, an Algerian isolate. *LWT – Food Sci. Technol.*, 2008, **41**, 1784-1792.
- [5] Bhunia A., Kim W.J., Johnson M.S., Ray B.: Purification, characterization and antimicrobial spectrum of bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J. Appl. Bacteriol.*, 1998, (65), 261-268.

- [6] Biswas S.R., Ray P., Johnson M.C., Ray B.: Influence of growth conditions on the production of bacteriocin, pediocin AcH by *Pediococcus acidilactici*. H. Appl. Environ. Microb., 1991, **(57)**, 1265-1267.
- [7] Bogovic-Matijasic B., Rogelj I.: Bacteriocin complex of *Lactobacillus acidophilus* LF221 – production studies in MRS media at different pH values and effect against *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009. Process Biochem., 1997, **33 (3)**, 345-352.
- [8] Coburn P.S., Pillar C.M., Jett B.D., Haas W., Gilmore M.S.: *Enterococcus faecalis* senses target cells and in response expresses cytolysin. Science 2004, **(306)**, 2270-2272.
- [9] Corsetti A., Settanni L., Braga T.M., Silva Lopes M.F., Suzzi G.: An investigation of the bacteriocinogenic potential of lactic acid bacteria associated with wheat (*Triticum durum*) kernels and non-conventional flours. LWT - Food Sci. Technol., 2007, **(41)**, 1173-1182.
- [10] Coconier M. H., Lievin V., Hemery E., Servin A. L.: Antagonistic activity against *Helicobacter* infection in vivo and in vitro by the human *Lactobacillus acidophilus* strain L.B. Appl. Environ. Microb., 1998, **64 (11)**, 4573-4580.
- [11] Corsetti A., Settanni L., Braga T.M., Silva Lopes M.F., Suzzi G.: An investigation of the bacteriocinogenic potential of lactic acid bacteria associated with wheat (*Triticum durum*) kernels and non-conventional flours. LWT- Food Sci. Technol., 2007, **(41)**, 1173-1182.
- [12] De Vuyst L., Vandamme E.J.: Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations. J. Gen. Microbiol., 1992, **138**, 571-578.
- [13] De Vuyst L., Callewaert R., Crabbe K.: Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavorable growth conditions. Microbiology, 1996, **4 (142)**, 817-827.
- [14] Delgado A., Brito D., Peres C., Noe-Arroyo F., Garrido-Fernandez A.: Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* B96 can be expressed as a function of temperature and NaCl concentration. Food Microbiol., 2005, **(22)**, 521-528.
- [15] Delgado A., Lopez F.N.A., Brito D., Peres C., Fevereiro P., Garrido-Fernandez A.: Optimum bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* 17.2b requires absence of NaCl and apparently follows a mixed metabolite kinetics. J. Biotechnol., 2007, **(130)**, 193-200.
- [16] Deraz S.F., Nordberg Karlsson E., Hedstrom M., Andersson M.M., Mattiasson B.: Purification and characterization of acidocin D20079, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079. J. Biotechnol., 2005, **(117)**, 343-354.
- [17] De Vuyst L., Callewaert R., Crabbe K.: Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavorable growth conditions. Microbiology 1996, (142), 817-827.
- [18] Felley C., Michetti P.: Probiotics and *Helicobacter pylori*. Best Pract. Res. Cl. G., 2003, **17 (5)**, 785-791.
- [19] Georgalaki M., Papadelli M., Chassioti E., Anastasiou R., Aktypis A., De Vuyst L., Van Driessche G., Devreese B., Tsakalidou E.: Milk protein fragments induce the biosynthesis of macedocin, the lantibiotic produced by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 18. Applied Environ. Microb., 2010, **76(4)**, 1143-1151.
- [20] Goderska K., Czarnecki Z.: Characterization of selected strains from *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum*. Afr. J. Microbiol. Research 2007, **1 (6)**, 068-078.
- [21] Gorbach S. L.: Probiotics in the third millennium. Digest Liver Dis., 2002, **34 (Suppl. 2)**, S2-S7.
- [22] Huang Y., Luo Y., Zhai Z., Zhang H., Yang C., Tian H., Li Z., Feng J., Liu J., Hao Y.: Characterization and application of an anti-listeria bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* 05-10 isolated from Sichuan Pickle, a traditionally fermented vegetable product from China. Food Control, 2009, **(20)**, 1030-1035.

- [23] Joeger M.C., Klaenhammer T.R.: Characterisation and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. J. Bacteriol., 1986, **(167)**, 439-446.
- [24] Li J., Song D., Gu Q.: Optimization of plantaricin production by *Lactobacillus plantarum* ZJ316. Wei Sheng Wu Xue Bao, 2008, **48(6)**, 818-823.
- [25] Maldonado-Barragan A., Ruiz-Barba J.L., Jimenez-Diaz R.: Knockout of three-component regulatory system reveals that the apparently constitutive plantaricin-production phenotype shown by *Lactobacillus plantarum* on solid medium is regulated via quorum sensing. Int. J. Food Microbiol., 2009, **(130)**, 35-42.
- [26] Matsusaki H., Endo N., Sonomoto K., Ishizaki A.: Lantibiotic nisin Z fermentative production by *Lactococcus lactis* IO-1: relationship between production of the lantibiotic and lactate and cell growth. Appl. Microbiol. Biot., 1996, **(45)**, 36-40.
- [27] Meghrou J., Huot E., Quittelier M., Petitdemange H.: Regulation of nisin biosynthesis by continuous cultures and by resting cells of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Res. Microbiol., 1992, **143(99)**, 879-890.
- [28] Mottet C., Michetti P.: Probiotics: wanted dead or alive. Digest. Liver Dis., 2005, **37**, 3-6.
- [29] Ogunbanwo S.T., Sanni A.I., Onilude A.A.: Influence of cultural conditions on the production of bacteriocin by *Lactobacillus brevis* OG1. Afr. J. Biotechnol., 2003, **(2)**, 179-184.
- [30] Parente E., Ricciardi A.: Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. Appl. Microbiol. Biot., 1999, **(52)**, 628-638.
- [31] Powell J.E., Witthuhn R.C., Todorov S.D., Dicks L.M.T.: Characterization of bacteriocin ST8KF produced by a kefir isolate *Lactobacillus plantarum* ST8KF. Int. Dairy J., 2007, **(17)**, 190-198.
- [32] Quadri L.E.N. Regulation of antimicrobial peptide production by autoinducer-mediated quorum sensing in lactic acid bacteria. A.V. Leeuwenhoek, 2002, **(82)**, 133-145.
- [33] Rabe L. K., Hillier S. L.: Optimization of media for detection of hydrogen peroxide production by *Lactobacillus* species. J. Clin. Microbiol. 2003, **41**, 3260-3264.
- [34] Sarika A.R., Lipton A.P., Aishwarya M.S.: Bacteriocin production by a new isolate of *Lactobacillus rhamnosus* GP1 under different culture conditions. Adv. J. Food Sci. Technol., 2010, **2(5)**, 291-297.
- [35] Settani L., Valmorri S., Suzzi G., Corsetti A.: The role of environmental factors and medium composition on bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) production by *Enterococcus mundtii* strains. Food Microbiol., 2008, **(25)**, 722-728.
- [36] Sip A. Produkcja bakteriocyn przez bakterie mlekowe. Biotechnologia 1999, **2 (45)**, 145-166.
- [37] Sip A., Krasowska M., Więckowicz M., Grajek W.: Metody skryningu bakteriocynogennych bakterii fermentacji mlekowej. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość. 2009, **1 (62)**, 5-26.
- [38] Strus M.: A new method for evaluation of the antagonistic action of bacterial lactic acid (LAB) on selected pathogenic indicator bacteria. Med. Dosw. Mikrobiol. 1998, **50**, 123-130.
- [39] Strus M., Pakosz K., Gościniak H., Przondo-Mordarska A., Rożynek E., Pituch H., Meisel-Mikołajczyk F., Heczko P. B.: Aktywność antagonistyczna szczepów *Lactobacillus* przeciwko beztlenowym patogenom przewodu pokarmowego (*Helicobacter pylori*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium difficile*). Med. Dosw. Mikrobiol., 2001, **53**, 133-142.
- [40] Taniguchi M., Hoshino., Urasaki H., Fujii M. Continuous production of antibiotic polypeptide (nisin) by *Lactococcus lactis* using a bioreactor coupled to a microfiltration module. J Ferment. Bioeng. 1994, **6**, 704-708.
- [41] Tabasco R., Garcia-Cayuela T., Pelaez C., Requena T.: *Lactobacillus acidophilus* La-5 increases lactacin B production when it senses live target bacteria. Int. J. Food Microbiol., 2009, **(132)**, 109-116.
- [42] Todorov S.D., Dicks L.M.T.: Optimization of bacteriocin ST311LD production by *Enterococcus faecium* ST311LD, isolated from spoiled black olives. J. Microbiol., 2005, **(43)**, 370-374.

- [43] Todorov S.D., Dicks L.M.T.: Effect of medium components on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* strains ST23LD and ST341LD, isolated from spoiled olive brine. *Microbiol. Res.* 2006, **(161)**, 102-108
- [44] Todorov S.D., Dicks L.M.T.: Effect of modified MRS medium on production and purification of antimicrobial peptide ST4SA produced by *Enterococcus mundtii*. *Anaerobe*, 2009, **15**: 65-73
- [45] Todorov S.D., Dicks L.M.T.: Effect of growth medium on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST194BZ, a strain isolated from Boza. *Food Technol. Biotech.*, 2005, **(43)**, 165-173.
- [46] Trabi M., Craik D.J.: Circular proteins – no end in sight. *Trends in Biochem. Sci.*, 2002, **(27)**, 132-138
- [47] Yang R., Ray B.: Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Food Microbiol.*, 1994, **11(4)**, 281-291.
- [48] Young R. J., Huffman S.: Probiotic use in children. *J. Pediatr. Health Care*, 2003, **17 (6)**, 277-283.
- [49] Zamfir M., Callewaert r., Cornea P. C., De Vuyst L.: Production kinetics of acidophilin 801, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2002, **(190)**, 305-308.
- [50] Zendo T., Eunggruttanagorn N., Fujioka S., Tashiro Y., Nomura K., Sera Y., Kobayashi G., Nakayama J., Ishizaki A., Sonomoto K.: Identification and production of bacteriocin from *Enterococcus mundtii* QU2 isolated from soybean. *J. Appl. Microbiol.*, 2005, **(99)**, 1181-1190.
- [51] Zhang J., Liu G., Li P. Qu Y.: Pentocin 31-1, a novel meat-borne bacteriocin and its application as biopreservative in chill-stored tray-packaged pork meat. *Food Control*, 2010, **(21)**, 198-202.

ANTAGONISTIC IMPACT OF *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* DSM 20079 AND DSM 20242 STRAINS ON PATHOGENIC BACTERIA ISOLATED FROM PEOPLE

S u m m a r y

The paper presents the results of a study on the antagonistic activity of *L. acidophilus* DSM 20079 and DSM 20242 strains towards *H. pylori*, *E. coli*, and *S. enteritidis* strains isolated from patients. The largest zones of inhibited growth were found in all the *H. pylori* strains analyzed; those zones were larger than 20 mm. The *L. acidophilus* strains also inhibited the development of all the *S. enteritidis* strains and the size of the inhibition zones was larger than 12 mm. Amidst the *E. coli* strains, there were some strains that grew uninhibited by the selected *L. acidophilus* strains analyzed. The size of inhibited growth zones of other *E. coli* strains was between 11 and 16 mm.

Key words: *Lactobacillus acidophilus*, antagonistic activity, *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* ☒