

ELŻBIETA BOGUSŁAWSKA-WĄS, NIKOŁA PIECHOWIAK,  
ALICJA DŁUBAŁA, KATARZYNA MODRZEJEWSKA

## MIKROBIOLOGICZNA ANALIZA PREPARATÓW PROBIOTYCZNYCH

### Streszczenie

**Wprowadzenie.** Celem niniejszej pracy była ocena wybranych preparatów probiotycznych dotycząca określenia liczebności i przynależności gatunkowej zawartych w nich szczepów. W celu realizacji założeń niniejszej pracy wykorzystano 10 różnych preparatów dostępnych w handlu detalicznym. Zakres badań obejmował analizę ilościową oraz jakościową. Analizę ilościową przeprowadzono z wykorzystaniem metod hodowlanych, które pozwoliły również na wstępne określenie zróżnicowania mikrobioty badanych preparatów i izolację szczepów do dalszych badań.

**Wyniki i wnioski.** Wyizolowano łącznie 9 szczepów bakteryjnych oraz 2 szczepy drożdży. Analiza jakościowa obejmowała przeprowadzenie badań biochemicznych z zastosowaniem testów API® 50 CHL oraz API® ID 32 C, jak również analizę genetyczną. Identyfikację genetyczną przeprowadzono stosując technikę PCR z elektroforetycznym rozdziałem produktów w żelu agarozowym. Do identyfikacji szczepów drożdży wykorzystano parę starterów: ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') i ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'), co pozwoliło na potwierdzenie ich przynależności do gatunku *Saccharomyces cerevisiae*. Identyfikację genetyczną bakterii z rodzaju *Lactobacillus* prowadzono przy użyciu starterów 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') i 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3'). Jedynie 3 z 10 preparatów spełniały wszystkie określone na opakowaniu deklaracje, dotyczące liczby szczepów, ich gatunku i liczby jednostek w pojedynczej dawce produktu. W jednym preparacie wyizolowano jeden niewymieniony w deklaracji szczep bakteryjny, a w jednym z suplementów diety wykazano  $<10^4$  jtk / dawka żywych drobnoustrojów. W przypadku trzech preparatów nie wyizolowano jednego z deklarowanych szczepów bakteryjnych.

**Słowa kluczowe:** : suplementy diety, probiotyki, *Lactobacillus* sp, *Saccharomyces* sp, *Bifidobacterium* sp

### Wprowadzenie

Probiotyki definiuje się jako „żywe drobnoustroje, które podane w odpowiedniej ilości wywierają korzystny wpływ na zdrowie gospodarza” [7]. Według wytycznych

---

*Dr hab. inż., prof. ZUT E. Bogusławska-Wąs ORCID: 0000-0002-8526-9273, mgr inż. N. Piechowiak, dr inż. A. Dłubała ORCID: 0000-0003-1629-4958, mgr inż. K. Modrzejewska ORCID: 0000-0001-9567-2771, Katedra Mikrobiologii Stosowanej i Fizjologii Żywności Człowieka, Wydział Nauk o Żywności i Rybactwa, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, al. Piastów 17, 70-310, Szczecin; Kontakt: alicja.dlubala@zut.edu.pl*

FAO/WHO identyfikacja szczepu probiotycznego powinna być przeprowadzona możliwie najdokładniejszymi i najnowszymi metodami fenotypowymi oraz genetycznymi [7]. Nazewnictwo probiotyków obejmuje rodzaj, gatunek, podgatunek oraz oznaczenie literowo-numeryczne. Szczep powinien zostać zdeponowany w międzynarodowej kolekcji szczepów, która nadaje dodatkowe oznaczenie, zgodnie z wewnętrznymi wytycznymi. Dopuszczalne jest, aby w działaniach marketingowych lub w nazwach handlowych produktów używać nazw dowolnych [18]. Oprócz określenia przynależności taksonomicznej danego szczepu równie ważne jest dokładne poznanie jego właściwości probiotycznych. Badania *in vitro* prowadzone są głównie w kierunku określenia: oporności na kwaśne środowisko żołądka i kwasy żółciowe, zdolności adherencji do śluzówki i/lub komórek nabłonkowych, aktywności antymikrobiologicznej w stosunku do potencjalnych patogenów, zdolności do zapobiegania adhezji patogenów oraz aktywności hydrolazy soli żółciowych [9]. Suplementy diety uznawane są za specyficzny rodzaj żywności. Nie istnieją odrębne regulacje dotyczące tej grupy produktów, dlatego podlegają one jedynie regulacjom dotyczącym produkcji żywności [5]. Obejmuje je Ustawa o bezpieczeństwie żywności i żywienia z dnia 25 sierpnia 2006 r. [17], Rozporządzenie Komisji (WE) nr 1881/2006 z dnia 19 grudnia 2006 r. [15] (z późniejszymi zmianami) w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych. Dodatkowo szczegółowe wytyczne dotyczące składu i oznakowania suplementów diety reguluje rozporządzenie ministra zdrowia [11]. W odróżnieniu od leków, suplementy diety nie podlegają ścisłej kontroli jakości określającej czy dany preparat zawiera deklarowaną substancję i w jakiej ilości.

Celem niniejszej pracy była ocena wybranych preparatów probiotycznych dotycząca określenia liczebności i przynależności gatunkowej zawartych w nich szczepów, a tym samym potwierdzenie zgodności z deklaracją producenta zawartą na etykiecie produktu.

### **Materiał i metody badań**

Przedmiotem badań były preparaty zawierające szczepy probiotyczne, tj. suplementy diety, leki oraz środek specjalnego przeznaczenia medycznego. Łącznie przebadano 10 różnych preparatów zakupionych w aptekach w Polsce. Pochodziły one od różnych producentów i obejmowały różne postaci, tj. kapsułki, proszek do sporządzenia zawiesiny, krople. Listę badanych preparatów oraz deklaracje liczebności mikroorganizmów zawarto w Tab. 1 i 2. Do czasu wykonania analiz materiał był przechowywany w temperaturze chłodniczej, a w momencie rozpoczęcia badań mieścił się w terminie przydatności do spożycia.

Tabela 1. Wykaz badanych preparatów wraz z deklarowanymi szczepami

Table 1. List of tested preparations with declared strains

Preparat Preparation	Typ preparatu Type of preparation	Deklarowany szczep Declared strain
A	Suplement diety / Diet supplement	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG ATCC 53103
B	Suplement diety / Diet supplement	<i>Lactobacillus reuteri</i> Protectis DSM 17938
C	Suplement diety / Diet supplement	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5® <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb-12®
D	Suplement diety / Diet supplement	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA 14 (FloraFit™) <i>Bifidobacterium lactis</i> HN019 (HOWARU™ Bifido)
E	Suplement diety / Diet supplement	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG
F	Środek spożywczy specjalnego przeznaczenia medycznego Foodstuff for special medical purposes	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LOCK 0908 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> LOCK 0900 <i>Lactobacillus casei</i> LOCK 0919
G	Lek / Medicament	<i>Saccharomyces boulardii</i> CNCM I-745
H	Lek / Medicament	<i>Saccharomyces boulardii</i> CNCM I-745
I	Suplement diety / Diet supplement	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG
J	Suplement diety / Diet supplement	<i>Lactobacillus plantarum</i> 299v

Oznaczenia ogólnej liczby bakterii z rodzaju *Lactobacillus* wykonano zgodnie z Polską Normą (PN) [14], wykorzystując podłoże MRS Agar (Sharlau, Hiszpania). W przypadku izolacji *L. rhamnosus* oraz *L. casei* zastosowano podłoże MRS Agar z wankomycyną w stężeniu 2ml/L [14]. Do izolacji drożdży z gatunku *S. boulardii* zastosowano podłoże DRBC Agar (Oxoid, Wielka Brytania). Izolację bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* prowadzono na podłożu MRS Agar (Scharalu, Hiszpania) z chlorkiem litu (Sigma-Aldrich, Niemcy) (3 g/dm<sup>3</sup>), propionianem sodu (200 mg/dm<sup>3</sup>) (Sigma-Aldrich, Niemcy) i cysteiną (Sigma-Aldrich, Niemcy) (0,5 g/dm<sup>3</sup>), wykonując posiew powierzchniowy. Posiewy inkubowano w 37 °C/48 h w modyfikowanej atmosferze z wykorzystaniem GasPak (BD BBL™).

Wyizolowane szczepy identyfikowano przy zastosowaniu testów biochemicznych API® 50 CHL oraz API® ID 32 C (bioMérieux, Polska), odpowiednio bakterii z rodzaju *Lactobacillus* oraz drożdży. Po inkubacji posiewów (odpowiednio 37°C /48 h oraz 30 °C /48 h) odczytywano wyniki w sposób zalecany przez producenta. Przy identyfikacji gatunku korzystano z programu komputerowego API-ATB Plus (bioMérieux, Polska) oceniającego procent zgodności cech z wzorcem. Ekstrakcję DNA z hodowli bakterii i drożdży wykonywano komercyjnym zestawem Genomic Mini AX BACTERIA+ (A&A Biotechnology, Polska) oraz Genomic Mini AX YEAST (A&A Biotechnology, Polska). Analizę jakościową wyizolowanego materiału genetycznego prowadzono spektrofotometrycznie (NanoDrop 1000, NanoDrop Technologies). Wyizolowane DNA standaryzowano w buforze TE do poziomu 20 ng/μl i przechowywano

w temperaturze -35 °C do czasu właściwych analiz. Badania genetyczne obejmowały określenie przynależności gatunkowej badanych szczepów. Oznaczenia prowadzono w termocyklerze LightCycler 480 (Roche, Szwajcaria). Do identyfikacji bakterii wykorzystano starter 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') oraz 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'). Reakcję PCR przeprowadzono w objętości 25 µl komercyjnego kitu MIX PCR (A&A Biotechnology, Polska), z zachowaniem profilu temperaturowego: wstępna denaturacja 95 °C / 5 minut, 30 cykli: denaturacja 94 °C / 1 minuta, przyłączanie starterów 55 °C / 1 minuta, elongacja 72 °C / 1,5 minuty, końcowe wydłużanie 72 °C / 10 minut. Do identyfikacji drożdży zastosowano starter ITS 1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') i ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'). Reakcję PCR przeprowadzono w objętości 25 µl komercyjnego kitu MIX PCR (A&A Biotechnology, Polska) z zachowaniem profilu temperaturowego: wstępna denaturacja 95 °C / 5 minut, 30 cykli: denaturacja 94 °C / 30 sekund, przyłączanie starterów 55 °C / 30 sekund, elongacja 72 °C / 30 sekund, końcowe wydłużanie 72 °C / 5 minut. Produkty amplifikacji rozdzielano w 1,5 % żelu agarozowym (Prona Agarose Plus) barwionym bromkiem etydyny (0,5 µl/cm<sup>3</sup>) (Bio-Rad, USA) przy napięciu 40 V. Uzyskane wyniki wizualizowano za pomocą GelDoc (Bio-Rad, USA) i archiwizowano za pomocą programu Quantity One (Bio-Rad, USA). Potwierdzenia gatunkowego dokonano na podstawie wielkości par zasad.

## Wyniki i dyskusja

W niniejszej pracy przebadano dziesięć preparatów probiotycznych (Tab. 1). Stwierdzono, że liczba żywych komórek w większości preparatów jest zgodna z deklaracją producenta lub wyższa (Tab. 2). W jednym z badanych preparatów (I), uzyskano wynik  $<10^4$  jtk na dawkę liczby mikroorganizmów. Zgodnie w wytycznymi preparat ten nie spełnia kryteriów probiotyku. Ponadto w jednym z produktów określono liczbę żywych drobnoustrojów w dawce znacznie niższą od deklarowanej przez producenta (preparat D). Z posiewów ilościowych wyizolowano 9 czystych kultur LAB oraz dwa izolaty drożdży (Tab. 2).

W preparacie A wyizolowano drugi, nie zawarty w deklaracji, szczep bakteryjny (Tab. 2). Na podstawie testu biochemicznego API 50 CHL izolat nr 2 został zidentyfikowany jako *Lactobacillus fermentum*, co też potwierdziła reakcja PCR. Drugiego z wyizolowanych szczepów nie udało się jednoznacznie zidentyfikować. Wskazane zostały gatunki *L. paracasei* subsp. *paracasei*-1, oraz *L. paracasei* subsp. *paracasei*-2. Na podstawie reakcji PCR zidentyfikowano go jako *L. rhamnosus*.

Tylko trzy z dziewięciu izolatów bakteryjnych zidentyfikowano do gatunku, który był deklarowany przez producenta. Wykorzystanie uniwersalnych starterów dla identyfikacji bakterii należących do *Lactobacillus* pozwoliło na zdiagnozowanie jedynie trzech gatunków: *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*.

Żadnego z dwóch izolatów drożdży nie udało się zidentyfikować przy zastosowaniu testu API® ID 32C. Na podstawie analizy produktów reakcji PCR przeprowadzonej przy użyciu starterów ITS1 i ITS4 oba wyizolowane szczepy zidentyfikowano jako *Saccharomyces sp.* Startery te pozwalają na amplifikację regionu ITS (ang. *Internal transcribed spacer*) rDNA. Wielkość regionu ITS szczepów *Saccharomyces cerevisiae* wynosi w 850 pz, co pozwala na ich wyróżnienie spośród innych rodzajów drożdży [13]. *S. boulardi*, deklarowany przez producenta, jest uznawany za odmianę *S. cerevisiae*, przez co można uznać taką identyfikację za prawidłową.

Tabela 2. Porównanie zgodności deklaracji producenta z wynikami przeprowadzonych analiz  
Table 2. Comparison of the compliance of the manufacturer's declaration with the results of the analyses carried out

Preparat Preparation	Numer izolatu Isolate number	Wyniki identyfikacji API Results of API identification	% identyfikacji do gatunku % of identification to species	Wynik identyfikacji genetycznej The result of genetic identification	Deklarowana liczba (jtk/dawka) Viable cell numbers stated on the label of the supplement (cfu/dose)	Stwierdzona liczba (jtk/dawka) Actual viable cell numbers identified ( cfu/dose)
A	1	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	40,5	<i>L. rhamnosus</i>	4 x 10 <sup>9</sup>	8,85·10 <sup>8</sup>
	2	<i>L. fermentum</i>	99	<i>L. fermentum</i>		7,8·10 <sup>8</sup>
B	4	<i>L. fermentum</i>	97,1	<i>L. acidophilus</i>	1 x 10 <sup>8</sup>	2,6·10 <sup>10</sup>
C	5	<i>L. acidophilus</i>	98,3	<i>L. acidophilus</i>	≥1 x 10 <sup>9</sup>	3,2·10 <sup>10</sup>
D	7	<i>L. acidophilus</i>	98,3	<i>L. rhamnosus</i>	2 x 10 <sup>9</sup>	2,2·10 <sup>7</sup>
F	15	<i>L. rhamnosus</i>	97,7	<i>L. rhamnosus</i>	5 x 10 <sup>8</sup>	1,95·10 <sup>8</sup>
	9	<i>L. rhamnosus</i>	99,8	<i>L. rhamnosus</i>		1,1·10 <sup>9</sup>
	10	<i>L. rhamnosus</i>	90	<i>L. rhamnosus</i>		9,2·10 <sup>8</sup>
G	G1	Identyfikacja niemożliwa Identification impossible		<i>S. cerevisiae</i>	Brak liczbowej deklaracji / No numerical decla- ration	1·10 <sup>10</sup>
H	H1	Identyfikacja niemożliwa Identification impossible		<i>S. cerevisiae</i>	Brak liczbowej deklaracji No numerical declaration	8,15·10 <sup>9</sup>
I	nw	-	-	-	6 x 10 <sup>9</sup>	< 10 <sup>4</sup>
J	16	<i>L. plantarum</i>	99,9	<i>L. plantarum</i>	10 x 10 <sup>9</sup>	1,24·10 <sup>9</sup>

Według zaleceń FAO/WHO [7] na etykiecie produktu zawierającego drobnoustroje probiotyczne powinien znaleźć się m.in. dokładny opis szczepu probiotycznego, tj. rodzaj, gatunek oraz numer szczepu a także minimalna liczba żywych komórek, jaką producent deklaruje w ostatnim dniu przydatności do spożycia. Preparaty wykorzystane w niniejszym badaniu, poza dwoma, które nie miały podanej liczebności drobnou-

strojów w pojedynczej dawce, były opisane zgodnie z zaleceniami WHO. Nieprawidłowe oznakowanie produktów probiotycznych nie jest zjawiskiem rzadkim. Badanie przeprowadzone przez Weese [18] obejmowało 44 preparaty probiotyczne, w tym 21 przeznaczonych dla ludzi i 23 preparaty weterynaryjne. Jedynie w 2 preparatach prawidłowo opisano zawarte w nich szczepy. W 17 stwierdzono błędne określenia, które obejmowały zastosowanie nieaktualnych nazw gatunkowych (*Streptococcus faecium*, aktualnie *Enterococcus faecium*), nazw fikcyjnych (*Lactospore sporogenes*), a także niejasne opisy zawartych w preparacie drobnoustrojów („kultury probiotyczne”, „kultury *Lactobacillus*”). Prawidłowy i pełen opis szczepów zastosowanych w preparacie jest bardzo istotny, ze względu na ich właściwości prozdrowotne. Podobnie efekt terapeutyczny probiotyków jest zależny od ich liczby. Uważa się, że dzienna dawka zapewniająca pożądane skutki zdrowotne wynosi  $10^6 \div 10^9$  jtk [6]. Zbliżone wyniki uzyskał Aureli i wsp. [1]. Łącznie badacze przebadali 41 preparatów. W 26 z nich liczba wyizolowanych żywych drobnoustrojów nie odpowiadała zadeklarowanej przez producenta, a jedynie w pięciu wyizolowano wszystkie wymienione na etykiecie szczepy. Dodatkowo, w jednym preparacie stwierdzono obecność licznych spor *Bacillus cereus*. Nieprawidłową liczbę żywych komórek stwierdzono także w suplementach probiotycznych dostępnych w Bangladeszu. Liczba ta była niższa o  $3 \div 4$  log od zadeklarowanej we wszystkich przebadanych preparatach [2]. Na podstawie analizy genetycznej ośmiu probiotycznych suplementów diety obecnych na rynku chińskim stwierdzono obecność niewymienionych w ulotce szczepów bakteryjnych. W siedmiu z nich wykryto obecność *L. helveticus*, mimo że nie był wymieniony w składzie żadnego z tych produktów. Ponadto w dwóch preparatach nie stwierdzono żywych mikroorganizmów [4].

W badaniach własnych do rozróżnienia między liczebnością *L. rhamnosus* a *L. casei* prowadzono hodowlę w dwóch różnych temperaturach: 37 °C i 43 °C. Dodatek wankomycyny hamuje wzrost pozostałych bakterii Gram-dodatnich podczas gdy *L. rhamnosus* i *L. casei* wykazują oporność wobec tego antybiotyku. Termotolerancyjne są wyłącznie *L. rhamnosus*, natomiast w hodowli prowadzonej w 37 °C możliwe jest uzyskanie wzrostu obu gatunków. Liczbę *L. casei* otrzymuje się przez obliczenie różnicy liczb wyrosłych kolonii w hodowlach [15]. W przeprowadzonym badaniu w hodowli w temperaturze 37 °C uzyskano wzrost dwóch izolatów (nr 9 i 10), jednak żaden z nich nie został zidentyfikowany jako deklarowany *L. casei*. Obydwa izolaty w testach biochemicznych i PCR zostały zakwalifikowane do gatunku *L. rhamnosus*. Wykazano jednak pomiędzy nimi różnice w morfologii komórki i aktywności biochemicznej, co sugeruje, że mogą być to dwa odrębne szczepy tego samego gatunku. Izolat wyrosły na podłożu inkubowanym w 43 °C również został zidentyfikowany jako *L. rhamnosus*. Morfologicznie był on zbliżony do izolatu nr 10, ale również charakteryzował się odmiennym profilem biochemicznym. Różnice te mogły być jednak wynikiem hodowli



w innej temperaturze. W celu dokładniejszej identyfikacji wyizolowanych szczepów należałoby przeprowadzić analizy genetyczne umożliwiające określenie podobieństwa pomiędzy danymi szczepami, np. techniką PCR-RAPD.

W badaniach własnych tylko trzy z dziesięciu izolatów bakteryjnych zidentyfikowano jako gatunki, które były deklarowane przez producenta. Analiza przeprowadzona przez Hamilton-Miller [10] wykazała, że spośród 52 produktów zawierających szczepy probiotyczne, w tym 29 suplementów diety, jedynie 15 było zgodne z etykietą producenta. Pozostałe preparaty nie zawierały jednego lub więcej szczepów zadeklarowanych przez producenta lub zawierały dodatkowe szczepy, nieujęte na etykiecie produktu. W pięciu z nich zidentyfikowano inne niż deklarowane gatunki bakterii. Podobne rezultaty uzyskał w swoich badaniach Fredua-Agyeman [8]. W dwóch badaniach do identyfikacji gatunkowej wyizolowanych szczepów zastosowano wyłącznie metody biochemiczne w tym przypadku test API® 50 CHL. Dowiedziono, że metody biochemiczne nie zawsze pozwalają na trafną identyfikację bakterii z rodzaju *Lactobacillus* [3]. W tym celu porównano testy API z metodą Multiplex PCR. Cztery spośród 11 szczepów referencyjnych *Lactobacillus* zostały nieprawidłowo zidentyfikowane na podstawie profilu biochemicznego [3]. Do gatunku *L. acidophilus* zostały zakwalifikowane szczepy *L. jensenii* i *L. gasseri*. *L. reuteri* został oznaczony jako *L. fermentum*, a wynik identyfikacji *L. rhamnosus* był niejednoznaczny. Inną wysoce wiarygodną metodą identyfikacji drobnoustrojów jest technika spektrometrii mas MALDI TOF-MS. Zawistowska-Rojek i wsp. [20] przeprowadzili analizę produktów probiotycznych zarówno metodami biochemicznymi (m.in. API® 50 CHL), jak i techniką spektrometrii mas. Potwierdzone przy użyciu MALDI TOF-MS szczepy *L. rhamnosus* oraz *L. reuteri* w testach biochemicznych były rozpoznawane odpowiednio jako *L. paracasei* ssp. *paracasei* i *L. fermentum*. Najczęściej wskazywaną przyczyną nieprawidłowej identyfikacji gatunków *Lactobacillus* w przypadku testów API jest nieaktualna baza danych, która nie uwzględnia zmian w taksonomii, jak w przypadku *L. jensenii* i *L. gasseri*, które zostały wyodrębnione z gatunku *L. acidophilus* [3] oraz nomenklaturze – *L. reuteri*, *L. fermentum* biotyp II i *L. fermentum* subsp. *reuteri* są nieraz używane jako synonimy [19].

W żadnym z dwóch preparatów (C oraz D), w których, zgodnie z deklaracją miały występować bakterie z rodzaju *Bifidobacterium*, nie udało się ich wyizolować. Zastosowane zostało podłoże, które w literaturze jest opisywane wielokrotnie jako odpowiednie do hodowli tych mikroorganizmów. Z preparatów tych wyizolowano tylko szczepy należące do rodzaju *Lactobacillus*.

Analiza genetyczna przeprowadzona techniką PCR z zastosowaniem starterów 27F i 1492R pozwoliła na weryfikację wyników uzyskanych w testach biochemicznych. W przypadku czterech szczepów (nr 9, 10, 15, 16) identyfikacja potwierdziła zarówno wyniki testów API, jak i deklaracji producenta. W przypadku szczepu nr 1,

analiza genetyczna pozwoliła potwierdzić zgodność z deklaracją producenta, jak i możliwą błędną identyfikację tego gatunku w teście API, opisaną wcześniej przez Zawistowską-Rojek i wsp. [20]. Wątpliwości wzbudził jednak wynik analizy genetycznej w przypadku szczepów nr 7 i nr 4. W preparacie, z którego wyizolowano szczep nr 7, deklarowano obecność *L. acidophilus*. co zostało potwierdzone w teście API. Analiza mikroskopowa pozwoliła stwierdzić także, że morfologia komórki tego izolatu odpowiada morfologii komórki typowej dla *L. acidophilus* [12]. Jednakże w wyniku analizy produktu reakcji PCR zidentyfikowano ten szczep jako *L. rhamnosus*. Szczep nr 4 został wyizolowany z preparatu, w którym deklarowano obecność *L. reuteri*. Morfologia komórki izolatu, obserwowana w preparacie mikroskopowym, odpowiadała morfologii komórki typowej dla tego gatunku [12]. W teście API izolat ten został zidentyfikowany jako *L. fermentum*. W badaniu [19] wykazano, że możliwa jest taka identyfikacja w przypadku gatunku *L. reuteri*. Przeprowadzona analiza genetyczna, wskazała przynależność gatunkową tego izolatu do *L. acidophilus*. Uzyskane wyniki pozwalają wnioskować, że zastosowane do reakcji PCR startery nie są wystarczająco specyficzne do różnicowania gatunkowego rodzaju *Lactobacillus*, mimo że w dostępnych publikacjach są one powszechnie stosowane w tym celu. Ponadto różnicowanie drobnoustrojów blisko spokrewnionych wymaga stosowania połączonych technik, np. MALDI-TOF MS i sekwencjonowania. Ta ostatnia jest powszechnie uważana za najskuteczniejszą metodę klasyfikowania szczepu do rodzaju i gatunku. Z uwagi na wysokie koszty nie została wykonana w niniejszym opracowaniu.

### Wnioski

1. Trzy preparaty probiotyczne spośród 10 przebadanych były zgodne z deklaracją producenta.
2. W przypadku trzech preparatów nie wyizolowano wszystkich deklarowanych szczepów bakteryjnych, a w jednym stwierdzono obecność niewymienionego w deklaracji szczepu bakteryjnego.
3. Z żadnego z dwóch suplementów diety, których producenci deklarowali obecność szczepów z rodzaju *Bifidobacterium*, nie wyizolowano bifidobakterii.

### Literatura

- [1] Aureli P., Fiore A., Scalfaro C., Casale M., Franciosa G.: National survey outcomes on commercial probiotic food supplements in Italy. *Int. J. Food. Microbiol.*, 2010, 137, 265-273.
- [2] Begum A. A., Jakaria D. M., Anisuzzaman S., Islam M., Mahmud S. A.: Market Assessment and Product Evaluation of Probiotic Containing Dietary Supplements Available in Bangladesh Market. *J. Pharm.*, 2015, 763796.



- [3] Brolazo E. M., Leite D. S., Tiba M.R., Villarroel M., Marconi C., Simoes J. A.: Correlation between API 50 CH and multiplex polymerase chain reaction for the identification of vaginal lactobacilli isolates. *Braz. J. Microbiol.*, 2011, 42, 225-232.
- [4] Chen T., Wu Q., Zhou H., Deng K., Wang X., Meng F., Yang S., Wang X., Shah N.P., Wei H.: Assessment of commercial probiotic products in China for labelling accuracy and probiotic characterisation of selected isolates. *Int. J. Dairy. Technol.*, 2017, 70, 119-126.
- [5] Czekaj T., Ciszewski M.: Suplementy diety – obecny stan prawny oraz potencjalne zagrożenia wynikające z uproszczonych procedur wprowadzania do obrotu. *Czasopismo Aptekarskie*, 2015, 3, 39-44.
- [6] Czerwionka-Szaflarska M., Romańczuk B.: Probiotyki w profilaktyce i leczeniu wybranych schorzeń przewodu pokarmowego u dzieci. *Forum Medycyny Rodzinnej*, 2010, 4, 135-140.
- [7] FAO/WHO. 2002. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food - Report of a Joint FAO/WHO Working Group
- [8] Fredua-Agyeman M., Parab S., Gaisford S.: Evaluation of Commercial Probiotic Products. *Br. J. Pharm.*, 2016, 1, 84-89.
- [9] Giraffa G., Chanishvili N., Widyastuti Y.: Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. *Res. Microbiol.*, 2010, 161, 480-487.
- [10] Hamilton-Miller J.M., Shah S., Winkler J.T.: Public health issues arising from microbiological and labelling quality of foods and supplements containing probiotic microorganisms. *Public. Health. Nutr.*, 1999, 2, 223-229.
- [11] Obwieszczenie Ministra Zdrowia z dnia 17 września 2018 r. w sprawie ogłoszenia jednolitego tekstu rozporządzenia Ministra Zdrowia w sprawie składu oraz oznakowania suplementów diety. *Dz.U.* 2018 poz. 1951
- [12] Peña J.A., Li S.Y., Wilson P.H., Thibodeau S.A., Szary A.J., Versalovic J.: Genotypic and Phenotypic Studies of Murine Intestinal Lactobacilli: Species Differences in Mice with and without Colitis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, 7, 558-568.
- [13] Pham T., Wimalasena T., Box W.G., Koivuranta K., Stogårds E., Smart K.A., Gibson B.R.: Evaluation of ITS PCR and RFLP for differentiation and identification of brewing yeast and brewery „wild” yeast contaminants. *J. Inst. Brew.*, 2011, 117, 556-568.
- [14] PN-ISO 15214:2002. Mikrobiologia żywności i pasz - Horizontalna metoda oznaczania liczby mezofilnych bakterii fermentacji mlekowej - Metoda płytkowa w temperaturze 30°C.
- [15] Rozporządzenie Komisji (WE) NR 1881/2006 z dnia 19 grudnia 2006 r. w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych.
- [16] Tarmaraj N., Shah N. P.: Selective Enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, Bifidobacteria, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* and Propionibacteria. *J. Dairy. Sci.*, 2003, 86, 2288-2296.
- [17] Ustawa z dnia 25 sierpnia 2006 r. o bezpieczeństwie żywności i żywienia *Dz.U.* 2006 nr 171 poz. 1225
- [18] Weese J. S.: Evaluation of deficiencies in labeling of commercial probiotics. *Can. Vet. J.*, 2003, 44, 982-983.
- [19] WGO Global Guidelines. (2017). Probiotics and prebiotics.
- [20] Zawistowska-Rojek A., Zaręba T., Mrówka A., Tyski S.: Assessment of the Microbiological Status of Probiotic Products. *Pol. J. Microbiol.*, 2016, 65, 97-104.

## MICROBIOLOGICAL ANALYSIS OF PROBIOTIC PREPARATIONS

### Summary

**Background.** The aim of this study was to evaluate selected probiotic preparations for determining the abundance and species affiliation of the strains contained in them. To meet the assumed objectives of this study, ten different preparations sold retail were used. The evaluation included a quantitative and qualitative analysis. The quantitative analysis was carried out using culture methods, which also allowed for the initial determination of the microbiota diversity of the preparations tested and the isolation of strains for further study.

**Results and conclusion.** A total of nine bacterial strains and two yeast strains were isolated. The qualitative analysis included biochemical tests using API® 50 CHL and API® ID 32 C tests, as well as a genetic analysis. Genetic identification was performed using the PCR technique with agarose gel electrophoretic separation of products. A pair of primers was used to identify yeast strains: ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') and ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'), which allowed to confirm their species affiliation to *Saccharomyces cerevisiae*. Genetic identification of bacteria of the genus *Lactobacillus* was carried out using primers 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'). Only three of ten preparations met all declarations specified on the packaging, relating to the number of strains, their species affiliation and the number of CFUs in a single dose of the product. For one preparation, one bacterial strain not mentioned in the declaration was isolated, and one diet supplement showed  $<10^4$  cfu / dose of live microorganisms. For three preparations, one of the declared bacterial strains was not isolated.

**Key words:** diet supplements, probiotics, *Lactobacillus* sp, *Saccharomyces* sp, *Bifidobacterium* sp 