



**KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETO
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS**

**BIFIDO fermentuotų probiotinių gėrimų koncentratų antimikrobinų savybių tyrimai
prieš bakterijas ir mikroskopinius grybus**

Ataskaita

Paruošė:

Doc. dr. Renata Žvirdauskienė

Kaunas, 2024

Darbo tikslas – ištirti BIFIDO probiotinių gėrimų koncentratų, prisotintų gerosiomis bakterijomis antimikrobinį poveikį.

Tyrimo metodas – Antimikrobinis poveikis prieš bakterijas tirtas difuzijos į agarą įdubų metodu (1 pav.), prieš mikroskopinius grybus – dvigubos kultūros metodu (2 pav.), skaičiuojant mikroskopinio grybo augimo slopinimo koeficientą.

Tyrimai atlikti su **7 rūšių fermentuotais gėrimais**:

- 1 – avižų Bifido fermentuotas probiotinis gėrimo koncentratas;
- 2 – ryžių Bifido fermentuotas probiotinis gėrimo koncentratas;
- 3 – apelsinų Bifido fermentuotas probiotinis gėrimo koncentratas;
- 4 – aviečių Bifido fermentuotas probiotinis gėrimo koncentratas;
- 5 – aronijų Bifido fermentuotas probiotinis gėrimo koncentratas;
- 6 – medaus imbiero-laimo Bifido fermentuotas probiotinis gėrimo koncentratas;
- 7 – rugių Bifido fermentuotas probiotinis gėrimo koncentratas.

Tirtas BIFIDO fermentuotose probiotinių gėrimų koncentratuose esančių gerųjų bakterijų antimikrobinis poveikis prieš 18 mikroorganizmų (16 bakterijų ir 2 mikroskopinius grybus):

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

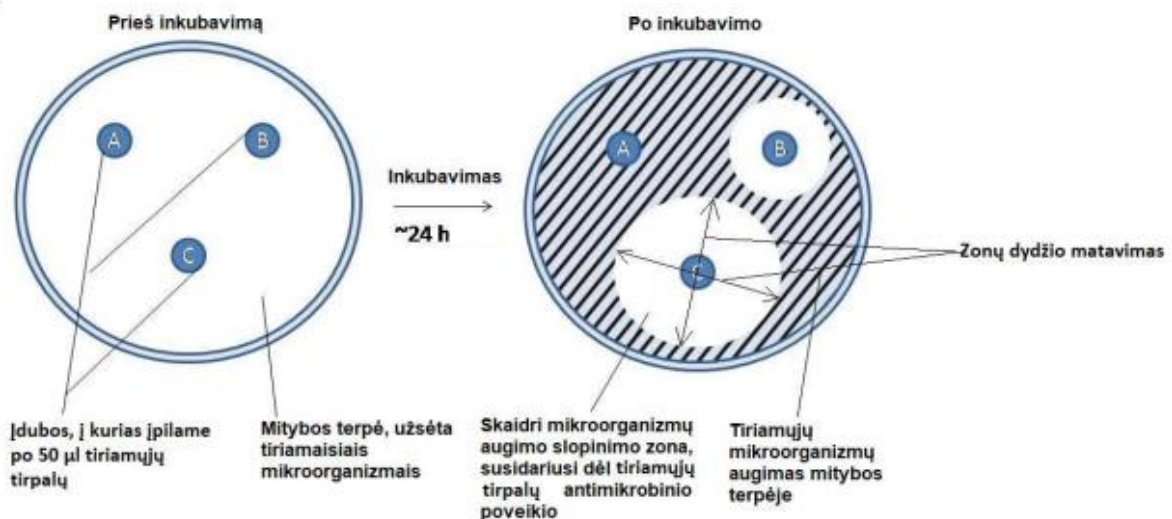
Difuzijos į agarą (įdubų) metodas

Nustatant jautrių bakterijų kultūrų jautrumą tiriamiesiems BIFIDO fermentuotiems probiotinių gėrimų koncentratams difuzijos į agarą (įdubų) metodu, jautrių bakterijų kultūrų suspensija (1×10^6 KSV/ml) pilama į ištirpintą ir atvėsintą iki 47 °C temperatūros terpę bendram mikroorganizmų skaičiui nustatyti (PCA – *Plate count agar* (Liofilchem, Italija)) – į 100 ml terpės pilamas 1 ml sporų suspensijos. Terpės su jautrių bakterijų kultūrų mišinys išpilstomas į

90 mm skersmens Petri lėkštelės po 12-15 ml. Terpei leidžiama sustingti ant horizontalaus paviršiaus. Po to specialiu prietaisu agare išpjaunamos apvalios 8 mm skersmens įdubos (kiekvienoje Petri lėkštelėje po 3 įdubas). Į kiekvieną padarytą įdubą sulašinama po 50 μl tiriamojo fermentuoto gėrimo. Lėkštelės inkubuojamos 24 h 37,0±0,5 °C temperatūroje ir tada vertinami rezultatai.

Bakterijos auga lėkštelėje, o aplink įdubą susidaro jautrios bakterijų kultūros augimo slopinimo zonos, aiškiai matomos išaugusių bakterijų kolonijų fone. Iš skaidrios zonos dydžio sprendžiama apie bakterijų jautrumą atitinkamam tiriamam gėrimui. Augimo slopinimo zonos plotis matuojamas liniuote arba slankmačiu. Matuojamos slopinimo zonos skersmuo turi eiti per įdubos centrą. Kiekviena įduba, aplinkui kurią susidarė skaidri bakterijų augimo slopinimo zona matuojama dviem statmenomis kryptimis (vienoje lėkštelėje gauname 6 rezultatus).

Pamatavus visą skersmenį bei žinant duobutės skersmenį, slopinimo zonos plotis apskaičiuojamas pagal formulę:



1 pav. difuzijos į agarą metodas

Iš skaidrios zonos dydžio sprendžiama apie bakterijų jautrumą atitinkamam tiriamam tirpalui. Augimo slopinimo zonos plotis matuojamas liniuote arba slankmačiu. Matuojamos slopinimo zonos skersmuo turi eiti per centrą. Pamatavus visą skersmenį bei žinant filtrinio popieriaus disko skersmenį, slopinimo zonos plotis apskaičiuojamas pagal formulę:

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

čia: H – slopinimo zonos plotis, mm;

D – bendras sterilios zonos ir įdubos skersmuo, mm;

d – įdubos skersmuo, mm.

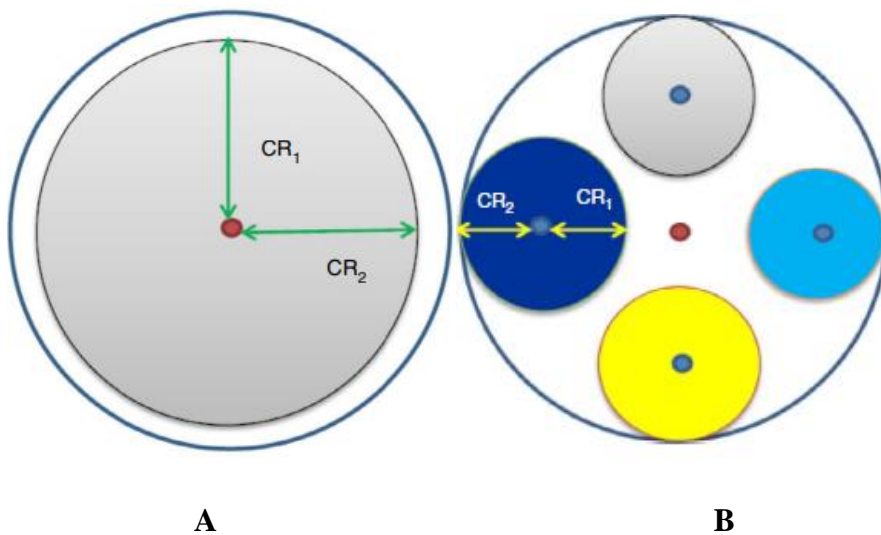
Yra tam tikra priklausomybė tarp slopinimo zonos pločio ir bakterijų jautrumo, pagal kurią vertinami gauti rezultatai.

1 lentelė. Bakterijų jautrumo antimikrobinėms medžiagoms laipsnio įvertinimas pagal augimo slopinimo zonos plotį

Bakterijų jautrumo laipsnis	Augimo slopinimo zonos plotis, mm
Labai jautrūs	>10
Jautrūs	Nuo 5 iki 10
Mažai jautrūs	Nuo 4 iki 5
Atsparūs	< 4

Dvigubos kultūros metodas

Metodo esmė yra ta, kad vienoje Petri lėkštelėje centre ant terpės paviršiaus yra sėjamas mikroskopinis grybas (2 pav. A) ir 2,5 cm atstumu nuo jo dedamas filtrinio popieriaus diskas (6 mm skersmens) (Hahnemuhle, Vokietija), sumirkytas tiriamojo BIFIDO fermentuoto probiotinių gėrimų koncentrato mėginyje (2 pav. B). Tyrimui naudota PDA Potato Dextrose Agar (Liofilchem, Italija) terpė, skirta mielių ir mikroskopinių grybų auginimui. Paruošta terpė išpilstoma į Petri lėkštes po 12 ml, sustingus terpei kiekvieno mikroskopinio grybo miceliniai diskai (10 mm skersmens), paimti iš septynių paras augintų *F. graminearum* ir *Acremonium sp.* izoliatų kultūrų krašto, dedami miceliu žemyn į kiekvienos Petri lėkštelės su išpilstyta terpe centrą dviem pakartojimais. Kaip kontrolė, naudotos Petri lėkštelės, kuriose ant terpės auga tik tiriamasis mikroskopinis grybas. Lėkštelės inkubuojamos $25,0 \pm 0,5$ °C temperatūroje 7 paras arba iki kol kontrolinėje lėkštelėje mikroskopinis grybas užauga iki pat lėkštelės krašto.



2 pav. Dvigubos kultūros metodas (Anith K. N., 2021)

A – mikroskopinio grybo vieta Petri lėkštelėje (kontrolinėje lėkštelėje);
 B – filtrinio popieriaus diskų, sumirkytų tiriamojo fermentuoto probiotinio gėrimo koncentrato su gerosiomis bakterijomis mėginyje, išdėstymas lėkštelėje, aplink mikroskopinį grybą

Slopinimo koeficientas (SK) apskaičiuojamas pagal formulę:

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

Kur a – izoliato augimo skersmuo kontrolinėje lėkštelėje (mm); b – izoliato augimo skersmuo lėkštelėje su fermentuoto gėrimo prisotinto gerosiomis bakterijomis (mm).

Slopinimo koeficiento jautrumo skalė:

- SK <3 – mažas slopinimas;
- SK = 3 - 20 – vidutiniškas slopinimas;
- SK = 20 - 100 – stiprus slopinimas.

Tyrimo rezultatai

Tyrimo metu buvo ištirtas BIFIDO fermentuotų probiotinių gėrimų koncentratuose esančių gerųjų bakterijų poveikis 16 patogeninių bakterijų ir 2 mikroskopiniams grybams. Atlikto tyrimo rezultatai rodo, kad visuose tirtuose BIFIDO fermentuotų probiotinių gėrimų koncentratuose esančios bakterijos slopino 15-os tirtų patogeninių bakterijų augimą ir netgi turėjo joms baktericidinį poveikį. Jautriausia iš visų buvo *B. cereus* bakterija, kuri tik šiek tiek augo veikiamą rugių fermentuoto probioninio gėrimo koncentrato ir apelsinų fermentuoto probiotinio gėrimo koncentrato gerosiomis bakterijomis, visų likusių tirtų BIFIDO fermentuotų probiotinių gėrimų gerosios bakterijos visiškai užslopino *B. cereus* augimą.

Pagal susidariusių augimo slopinimo zonų dydį, taip pat išsiskiria *M. luteus*, *E.coli*, *L. monocytogenes* ir *H. alvei* bakterijos, nes joms visų tirtų BIFIDO fermentuotų probiotinių gėrimų koncentratų gerosios bakterijos turėjo baktericidinį poveikį. Tik *H. pylori* bakterija buvo atspari tirtų fermentuotų probiotinių gėrimų koncentratų gerųjų bakterijų poveikiui.

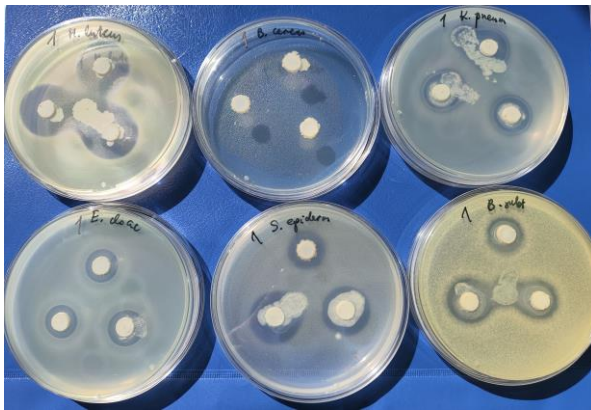
Ištirus 2 mikroskopinių grybų augimo slopinimą, taip pat akivaizdžiai matomas visų tirtų BIFIDO fermentuotų probiotinių gėrimų koncentratų gerųjų bakterijų slopinamasis poveikis (6 ir 7 pav.).

Tyrimams buvo pasirinkti 2 mikroskopiniai grybai. *Acremonium sp.*, nes šios genties atstovai patenka į pelėsių kategoriją, kurie, ilgą laiką veikdami žmogaus organizmą, gali sukelti rimtų sveikatos problemų. *Acremonium* yra pelėsių grupė, kurią dažnai galima rasti patalpose, o kai kurios jo rūšys yra žinomos kaip žmonių patogenai. Jie paplitę visame pasaulyje ir gali būti aptinkami dirvožemyje ir gamtoje ant pūvančių augalų medžiagų. Taip pat jie gali plisti ir patalpose ir yra vieni iš labiausiai paplitusių grybų kolonizatorių namuose ir biuruose.

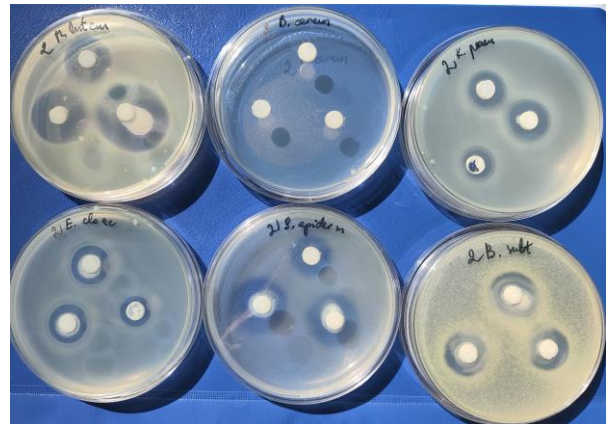
Fusarium graminearum yra pagrindinis patogenas, sukeliantis kviečių ir miežių varpų fuzariozes. Užkrėstuose grūduose gali būti daug trichotecenų mikotoksinų: deoksinivalenolio, zearalenono, nivalenolio. Šie mikotoksinai, ypač deoksinivalenolis (DON) ir nivalenolis (NIV), turi bendrą biocheminį ir ląstelinį toksiškumą. Jie stipriai slopina baltymų sintezę, jungdamiesi prie ribosomų, slopina RNR ir DNR sintezę, bei toksiškai paveikia ląstelių membranas. Be to, jų gebėjimas slopinti (inhibuoti) baltymų sintezę gali sukelti užkrūčio liaukos, limfos ir kraujodaros audinių apoptozę per mitogeno aktyvuotą baltymų kinazę. Pasėliai, užteršti trichotecenu, gali sukelti sunkų apsinuodijimą maistu kartu su pykinimu, vėmimu ir viduriavimu.

2 lentelė. Tiriamųjų bakterijų augimo slopinimo zonos, mm

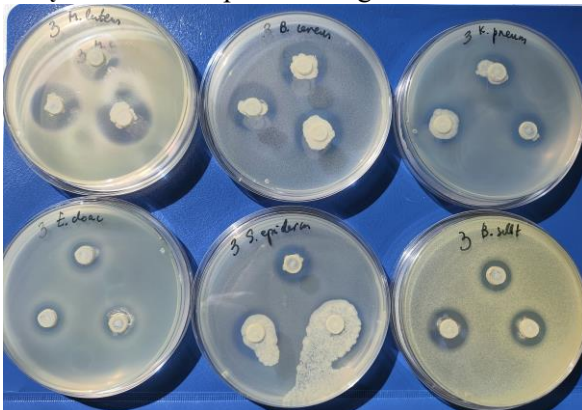
Eil. Nr.	Bakterijų padermė	Bakterijos augimo slopinimo zona, mm ± standartinis nuokrypis						
		Gėrimo Nr.						
		1 Avižų	2 Ryžių	3 Apelsinai- mango	4 Aviečių	5 Aronijos	6 Medus- imbieras- laimas	7 Rugių
1	<i>Micrococcus luteus</i>	20,0±1,73	19,3±4,04	16,7±0,58	16,3±0,58	18,7±1,53	16,7±1,15	14,0±1,73
2	<i>Bacillus cereus</i>	34,3±2,52	37,0±0,00	14,3±1,15	37,0±0,00	35,3±2,89	32,0±0,00	7,7±0,58
3	<i>Klebsiela pneumoniae</i>	11,3±2,08	9,0±1,73	7,3±0,58	9,0±0,00	10,7±1,15	8,7±1,53	8,7±0,58
4	<i>Enterobacter cloacae</i>	7,0±0,00	8,7±2,31	4,3±0,58	1,0±0,00	4,7±1,15	4,0±0,00	4,3±0,58
5	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12,7±2,52	14,3±3,06	9,7±1,15	12,0±0,00	11,3±0,58	8,0±1,00	8,0±1,73
6	<i>Bacillus subtilis subsp. Spizizenii</i>	10,0±2,00	12,0±1,00	7,3±1,53	7,3±0,58	10,7±0,58	8,0±1,00	8,0±1,00
7	<i>Salmonella choleraesuis</i>	8,0±1,73	6,3±1,15	4,3±0,58	9,7±2,52	12,0±1,00	7,3±0,58	6,3±0,58
8	<i>Citrobacter freundii</i>	9,3±0,58	17,0±0,58	9,7±2,08	12,7±1,15	12,3±1,53	9,7±0,58	6,3±0,58
9	<i>Esherichia coli</i>	11,0±1,73	11,0±1,00	10,7±1,15	11,3±1,15	13,3±1,15	11,7±0,58	8,7±0,58
10	<i>Salmonella agona</i>	10,0±1,00	9,0±1,73	8,7±2,52	12,7±0,58	14,0±1,73	10,0±1,73	8,7±1,53
11	<i>Listeria monocytogenes</i>	17,7±1,53	15,3±1,53	10,3±1,53	16,7±0,58	14,3±1,15	11,0±,46	12,0±0,00
12	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10,3±0,58	10,7±1,53	7,0±0,00	10,3±1,53	9,0±1,00	11,3±0,58	10,7±0,58
13	<i>Staphylococcus aureus</i>	10,3±1,15	2,0±0,00	8,0±1,00	9,0±1,00	5,0±0,00	8,0±1,00	1,0±0,00
14	<i>Hafnia alvei</i>	14,3±0,58	11,0±1,73	12,3±0,58	15,3±2,08	15,3±1,15	14,7±2,31	12,7±6,03
15	<i>Salmonella typhimurium</i>	9,7±1,53	7,0±1,00	3,7±0,58	7,3±0,58	9,3±1,15	6,3±2,08	7,7±1,15
16	<i>Helicobacter pylori</i>	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0



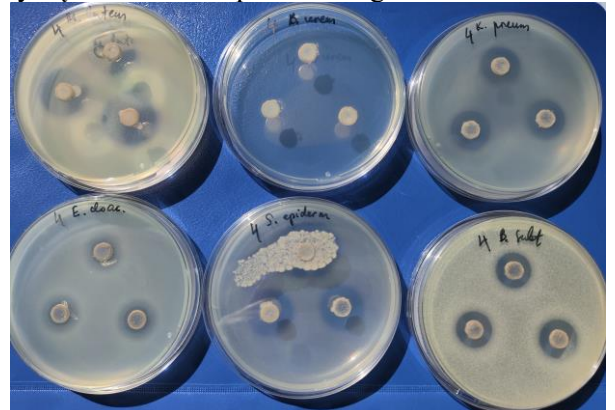
avių fermentuotas probiotinis gėrimo koncentratas



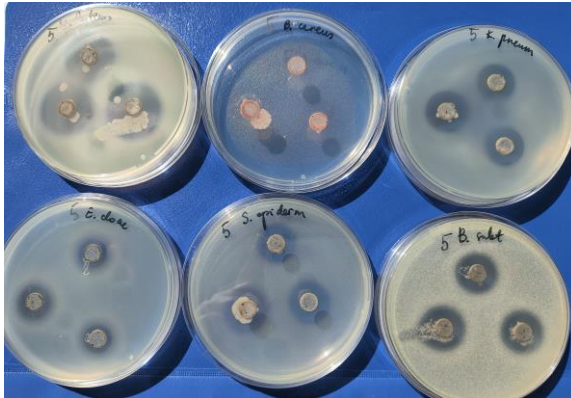
ryžių fermentuotas probiotinis gėrimo koncentratas



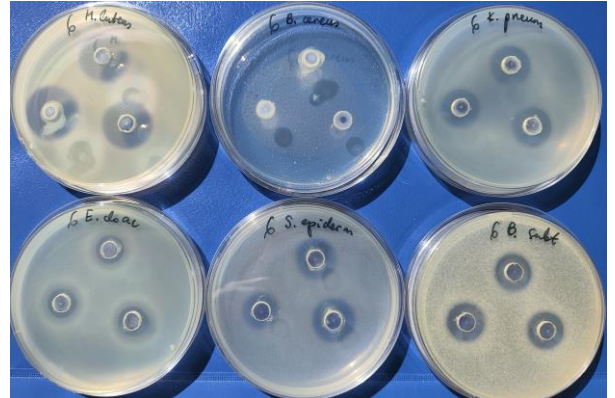
apelsinų fermentuotas probiotinis gėrimo koncentratas



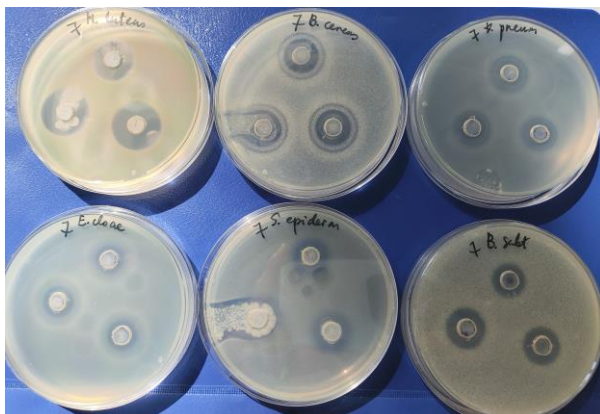
aviečių fermentuotas probiotinis gėrimo koncentratas



aronijų fermentuotas probiotinis gėrimo koncentratas



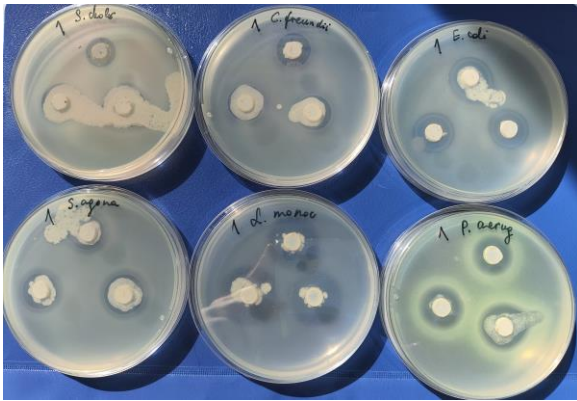
medaus imbiero fermentuotas probiotinis gėrimo koncentratas



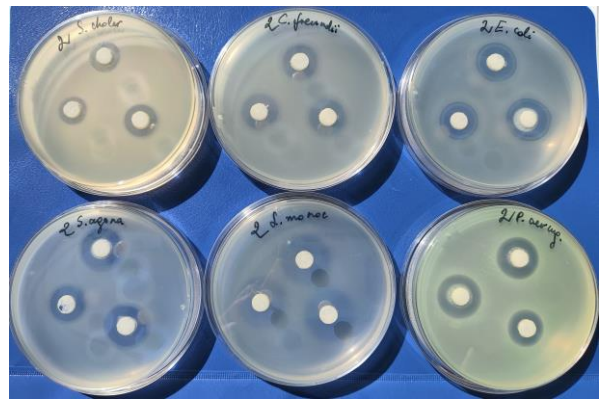
rugių fermentuotas probiotinis gėrimo koncentratas

3 pav. Fermentuotų probiotinių gėrimų koncentratuose esančių gerųjų bakterijų antimikrobinis poveikis:

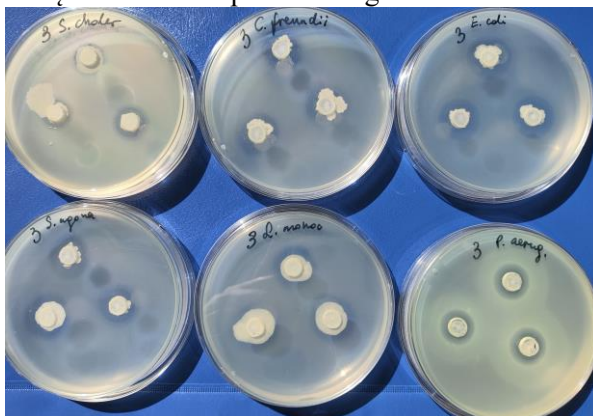
- Micrococcus luteus*
- Bacillus cereus*
- Klebsiela pneumoniae*
- Enterobacter cloacae*
- Staphylococcus epidermidis*
- Bacillus subtilis subsp. Spizizenii*



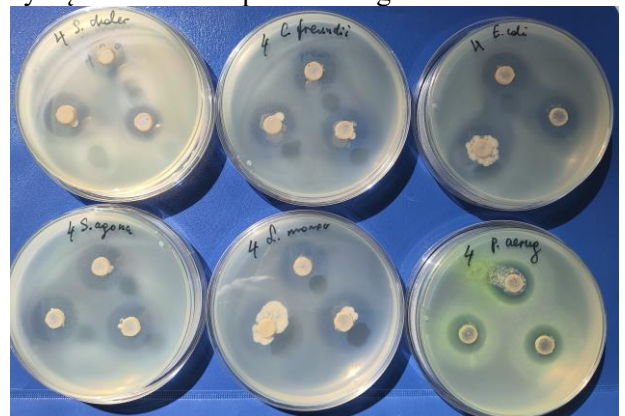
avių fermentuotas probiotinis gėrimo koncentratas



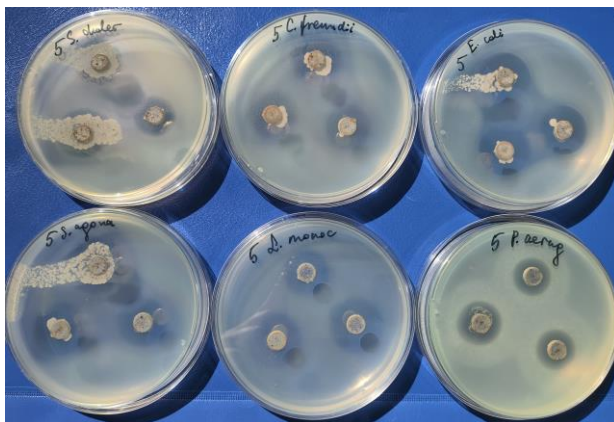
ryžių fermentuotas probiotinis gėrimo koncentratas



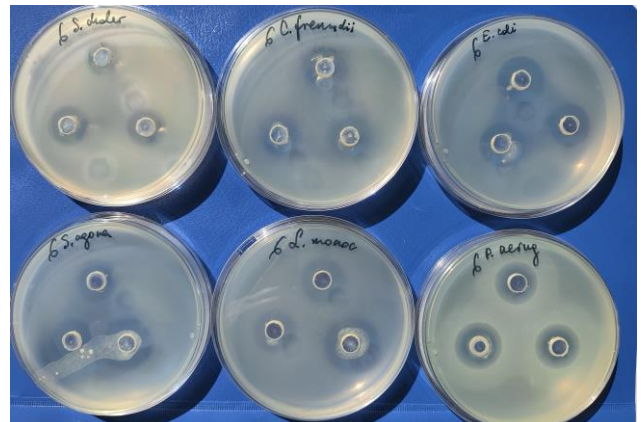
apelsinų fermentuotas probiotinis gėrimo koncentratas



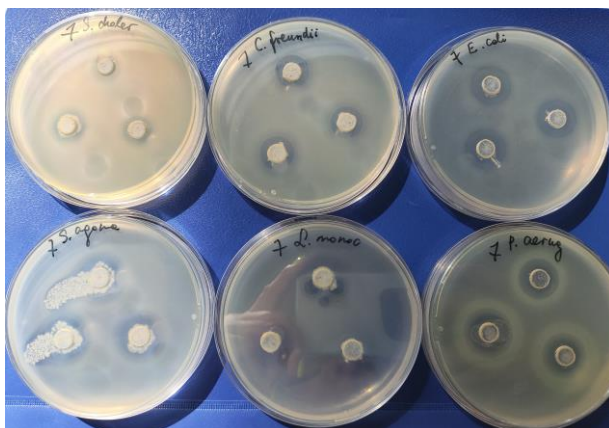
aviečių fermentuotas probiotinis gėrimo koncentratas



aronijų fermentuotas probiotinis gėrimo koncentratas



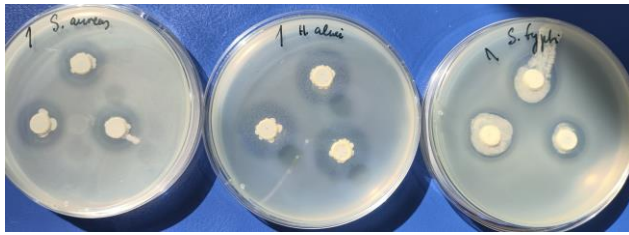
medaus imbiero fermentuotas probiotinis gėrimo koncentratas



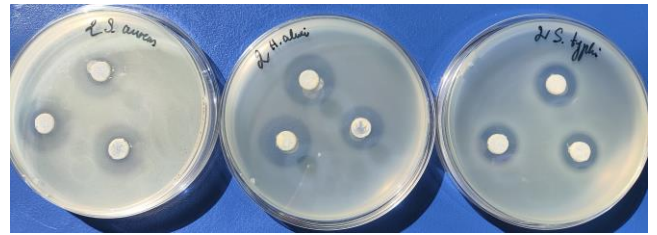
ryžių fermentuotas probiotinis gėrimo koncentratas

4 pav. Bifido fermentuotų probiotinių gėrimų koncentratuose esančių gerųjų bakterijų antimikrobinis poveikis:

- Salmonella choleraesuis*
- Citrobacter freundii*
- Escherichia coli*
- Salmonella agona*
- Listeria monocytogenes*
- Pseudomonas aeruginosa*



avižių fermentuotas probiotinis gėrimo koncentratas



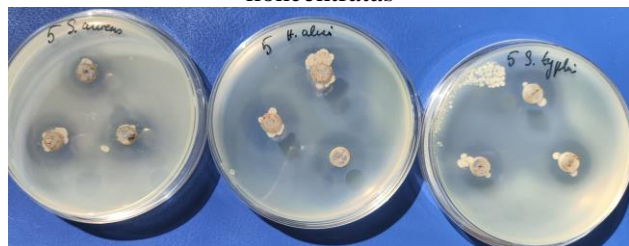
ryžių fermentuotas probiotinis gėrimo koncentratas



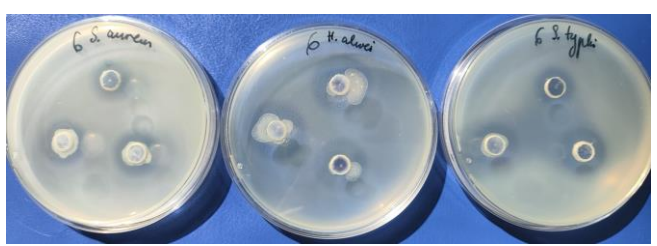
apelsinų fermentuotas probiotinis gėrimo koncentratas



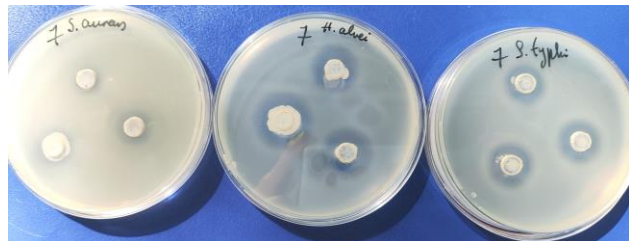
aviečių fermentuotas probiotinis gėrimo koncentratas



aronijų fermentuotas probiotinis gėrimo koncentratas



medaus imbiero fermentuotas probiotinis gėrimo koncentratas



rugių fermentuotas probiotinis gėrimo koncentratas

5 pav. Bifido fermentuotų probiotinių gėrimų koncentratuose esančių gerųjų bakterijų antimikrobinis poveikis:

Staphylococcus aureus

Hafnia alvei

Salmonella typhimurium

Mikroskopinių grybų augimo slopinimo tyrimas parodė, kad visų tirtų BIFIDO fermentuotų probiotinių gėrimų koncentratų gerosios bakterijos turėjo slopinamą poveikį šių grybų micelio augimui ir pasižymėjo stipriu slopinimo koeficientu, ypatingai prieš *Acremonium sp.* Didžiausiu slopinimo koeficientu prieš *Acremonium sp.* pasižymėjo rugių fermentuoto probiotinio gėrimo koncentrate esančios bakterijos.

F. graminearum micelio augimą labiausiai slopino rugių fermentuoto probiotinio gėrimo koncentrato gerosios bakterijos.

3 lentelė. Tiriamųjų mikroskopinių grybų augimo slopinimo koeficientai

Mikroskopinis grybas	Slopinimo koeficientas						
	Fermentuotas gėrimas						
	1	2	3	4	5	6	7
<i>Acremonium sp.</i>	39±0,7	55±0,0	59±0,0	66±0,7	48±0,7	52±0,7	61±0,7
<i>Fusarium graminearum</i>	18±1,4	25±1,4	20±1,4	7±0,7	20±2,8	29±0,7	39±0,7



avižių fermentuotas probiotinis gėrimo koncentratas



ryžių fermentuotas probiotinis gėrimo koncentratas



apelsinų fermentuotas probiotinis gėrimo koncentratas



aviečių fermentuotas probiotinis gėrimo koncentratas



aronijų fermentuotas probiotinis gėrimo koncentratas



medaus imbiero fermentuotas probiotinis gėrimo koncentratas

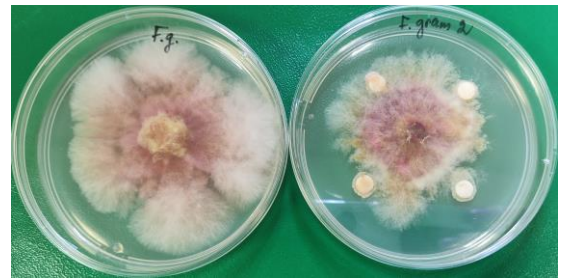


rugių fermentuotas probiotinis gėrimo koncentratas

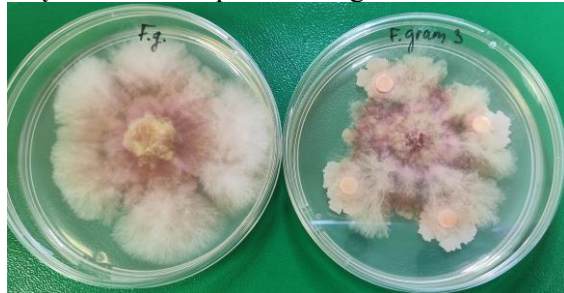
6 pav. Bifido fermentuotų probiotinių gėrimų koncentratuose esančių gerųjų bakterijų antimikrobinis poveikis *Acremonium sp.*



avižių fermentuotas probiotinis gėrimo koncentratas



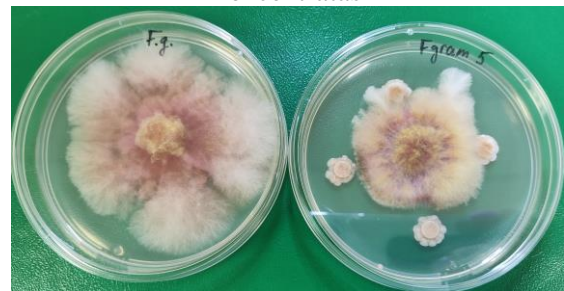
ryžių fermentuotas probiotinis gėrimo koncentratas



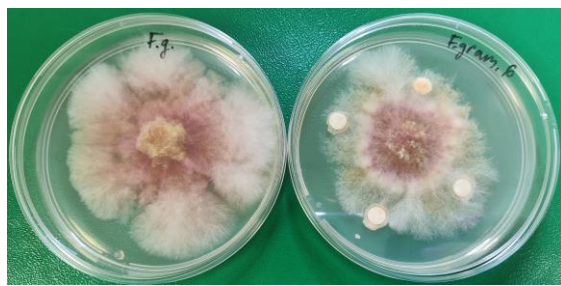
apelsinų fermentuotas probiotinis gėrimo koncentratas



aviečių fermentuotas probiotinis gėrimo koncentratas



aronijų fermentuotas probiotinis gėrimo koncentratas



medaus imbiero fermentuotas probiotinis gėrimo koncentratas



rugių fermentuotas probiotinis gėrimo koncentratas

7 pav. Fermentuotų probiotinių gėrimų koncentratuose esančių gerųjų bakterijų antimikrobinis poveikis *Fusarium graminearum*

Išvada

Visi tirti BIFIDO fermentuotų probiotinių gėrimų koncentratai pasižymi dideliu kiekiu gerųjų bakterijų, turinčių slopinamąjį poveikį *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis subsp. Spizizenii*, *Salmonella choleraesuis*, *Citrobacter freundii*, *Esheria coli*, *Salmonella agona*, *Listeria monocytogene*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Hafnia alvei*, *Salmonella typhimurium* bakterijų ir *Acremonium sp.* bei *Fusarium graminearum* augimui. Mikroskopinių grybų augimą stipriausiai slopina rugių fermentuoto probiotinio gėrimo koncentrate reziduojančios bakterijos, patogeninių bakterijų augimą stipriausiai slopina aronijų fermentuoto probiotinio gėrimo koncentrate esančios bakterijos.