

**VILNIAUS UNIVERSITETAS**  
**GAMTOS MOKSLŲ FAKULTETAS**  
Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedra

Dieninių studijų skyriaus  
II kurso mikrobiologijos studentė

Giedrė Juknevičiūtė

## **PROBIOTIKŲ KOKYBĖS TYRIMAI**

Magistro studijų baigiamasis darbas

Darbo vadovas:  
Doc.dr. Lilija Kalėdienė

Vilnius, 2009

## Turinys

Ivadas.....	4
1. Literatūrosos apžvalga.....	5
1. 1. Probiotikai, prebiotikai, simbiotikai, jų samprata .....	5
1. 1. 1. Probiotiniai mikroorganizmai.....	6
1. 1. 2. Sampratos netolydumai .....	11
1. 2. Probiotikų reikšmė žmogaus sveikatai .....	12
1. 2. 1. Imuninės sistemos moduliavimas.....	12
1. 2. 2. Probiotikai ligų gydymui ir prevencijai.....	13
1. 2. 3. Neigiamas probiotikų poveikis sveikatai.....	15
1. 3. Probiotikų kokybė .....	18
1. 3. 1. Probiotikų kokybės problemos .....	18
1. 3. 2. Probiotikų kokybės reikalvimai.....	19
2. Medžiagos ir metodai .....	21
2. 1. Medžiagos.....	21
2. 1. 1. Probiotiniai preparatai .....	21
2. 1. 2. Terpės ir reagentai .....	22
2. 2. Metodai.....	24
3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas .....	27
3. 1. Probiotikų bakterijų gyvybingumo palyginimas .....	27
3. 2. Skrandžio rūgšties poveikis probiotikams.....	30
3. 3. Priobiotikų atsparumas antibiotikams .....	31
3. 4. Probiotinių kultūrų įtaka Candida augimui .....	35
3. 5. Saccharomyces boulardii rūšies identifikacija .....	37
Išvados .....	41
Santrauka .....	42
Summary.....	43
Literatūra .....	44
Priedai .....	49

## Įvadas

Probiotikai – tai gyvi mikroorganizmai, priklausantys normaliajai (nekintamai) žmogaus mikroflorai ar gebantys apsigyventi žmogaus organizme, ir teigiamai veikti žmogaus sveikatą. Probiotikų preparatai gaminami iš mikroorganizmų – žmogaus mikrobiotos rūšių, dažniausiai iš laktobakterijų ir bifidobakterijų, jie yra nepatogeniški ir netoksiški. Tai pagrindiniai žarnyno ir makšties simbiotai. Šių mikroorganizmų, kaip maisto papildų, dedama į jogurtus, varškę, kefyrus arba jie vartojami liofilizuotų miltelių (kapsulių, mikrokapsulių), tablečių ir skystųjų suspensijų forma (Collins 1999).

Probiotikų sąvoka yra gerai žinoma jau nuo XX amžiaus pradžios, per tą laiką probiotikams tapus svarbiu mokslinių tyrimų objektu, lėmė jų stiprų įsitvirtinimą rinkoje. Visame pasaulyje augantis probiotinių preparatų pasirinkimas bei vartojimas, lėmė, kad daugelis mokslininkų XXI amžių vadintų ateinančia probiotikų era. Jie mano, kad probiotiniai preparatai turėtų pakeisti tradicinius vaistus (Roberfroid ir kt., 2000).

Šiuo metu ypač yra padidėjęs susidomėjimas probiotikais ir jų poveikiu bei nauda žmogaus organizmui. Didžioji dauguma žinių apie probiotikus yra sukaupta tiriant jų gyvybingumą, atsparumą antibiotikams, rūšinį sąstatą, tačiau vis dažniau susiduriame su tam tikrais kitais kokybės neatitikimais, kas ir paskatino iškelti šį darbo tikslą – ištirti dažniausiai vartojamų komercinių probiotinių preparatų kokybinius parametrus.

Uždaviniai:

1. Patikrinti komercinių probiotinių preparatų kokybinius parametrus;
2. Nustatyti probiotinių kultūrų atsparumą antibiotikams ir rūgštims;
3. Įvertinti probiotinių kultūrų įtaką *Candida* genties grybams;

# 1. Literatūros apžvalga

## 1.1. Probiotikai, prebiotikai, simbiotikai, jų samprata

**Probiotikai** - tai gyvi mikroorganizmai, priklausantys normaliai žmogaus mikroflorai, vartojami nustatytomis dozėmis, teikia naudą žmogaus sveikatai, gerina mikrobu balansą žarnyne (Martin, 2007). Probiotikai reguliuoja biologinius apsauginius organizmo mechanizmus, saugo ir pagreitina atsistatymą po tam tikrų ligų, lėtina senėjimo procesus (Harish ir kt., 2006).

**Prebiotikai** - remiantis plačiai pripažintu G. R. Gibsono ir M. B. Roberfroido (1995) apibrėžimu prebiotikai yra apibūdinami kaip „nevirškinami maisto ingredientai, kurie teigiamai veikia organizmą, selektyviai stimuliuodami augimą ir aktyvumą vienos ar keleto bakterijų rūšių storajame žarnyne ir tai turi teigiamą įtaką organizmo sveikatingumui“ (Gibson, 1995). Prebiotikams priskiriamos vandenyje tirpios maistinės skaidulos – nevirškinamieji oligosacharidai ir polisacharidai. Nevirškinamaisiais jie pavadinti todėl, kad žmonių ir gyvulių organizme nėra juos hidrolizuojančių fermentų, jie nesuskaidomi plonajame žarnyne ir storąją žarną pasiekia nepakeisto pavidalo, kur tampa bifidobakterijų ir kitų naudingų mikroorganizmų maistu, stimuliuoja normalios mikrofloros augimą bei aktyvumą. Yra žinoma, kad patogeniniai mikroorganizmai neišskiria prebiotikus skaldančių fermentų. Kaip ir visi probiotiniai preparatai prebiotikai nėra toksiški organizmui ir nesukelia jokių šalutinių reakcijų (Fedorak ir Madsen, 2004).

**Simbiotikai** – tai probiotikų ir prebiotikų kompleksas (Blinde, 2009). Ši kombinacija susideda iš gerųjų bakterijų (probiotikų) ir neasimilijuojamo angliavandenių šaltinio (prebiotikų), tai palanki terpė augti naudingoms bakterijoms. Fermentuoti dienos produktai (jogurtas, kefyras) yra simbiotikai, nes jie turi gyvų bakterijų ir maisto šaltinį, reikalingą joms augti. Be maisto šaltinio probiotikams taptų sunku išlikti gyvybingiems virškinamajame trakte, nes netoleruotų deguonies, žemo pH ir temperatūros. Dažniausiai pasitaikančios simbiotikų kombinacijos: *Bifidobacteria* ir fruktooligosacharidai, *Lactobacillus* GG ir inulinas, *Bifidobacteria* ir *Lactobacilli* su fruktooligosacharidais / inulinu (Kidd, 2008).

### **1. 1. 1. Probiotiniai mikroorganizmai**

Žmogui, kaip ir kiekvienam gyvam organizmui, gyvybinėms funkcijoms palaikyti yra reikalingos maisto medžiagos. Labai svarbi maisto medžiagų metabolizmo grandis yra virškinamajame trakte gyvenantys mikroorganizmai, kurie dalyvauja ne tik virškinime, bet taip pat atlieka ir daugelį kitų svarbių funkcijų. Todėl darni organizmo veikla labai priklauso nuo tinkamos skirtingų mikroorganizmų (laktobacilų, bifidobakterijų, streptokokų) pusiausvyros žarnyne. Įvairūs veiksniai, kaip senėjimas, stresas, ligos ar imuninės sistemos sutrikimai, antibiotikų ar kitų vaistų vartojimas, spindulinis gydymas, blogi mitybos įpročiai bei žalingos aplinkos sąlygos, gali sutrikdyti žarnyno mikrofloros pusiausvyrą, dėl to gali sumažėti naudingų bakterijų. Šios bakterijos dar vadinamos probiotikais, tai gyvi organizmai, kurių suvartojus tam tikrą kiekį pasireiškia teigiamas poveikis sveikatai. Svarbiausi probiotikų atstovai yra bifidobakterijos ir laktobacilos, tačiau probiotikams taip pat priskiriami ir kai kurie *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Esherichia* bei *Saccharomyces* genčių mikroorganizmai (Allen ir kt., 2004).

Nustatyta, kad probiotikai turi imunomoduliuojančių, antibakterinių, antivirusinių, uždegimą mažinančių savybių, teigiamai veikia žarnyno mikrofloros pusiausvyrą ir įvairiais mechanizmais apsaugo organizmą nuo žarnyno patogenų (gamina specifines inhibuojamąsias medžiagas – bakteriocinus, konkurenciniu būdu slopina patogenų jungimąsi prie gleivinės, gerina gleivių ir IgA produkciją žarnyne) (Salminen ir kt., 1996).

Maistui probiotikus žmonės pradėjo naudoti dar gilioje senovėje, keletą tūkstantmečių raugindami pieną. XX a. pradžioje Nobelio premijos laimėtojas rusų mokslininkas Ilya Mečnikovas, įrodė, kad esanti rūgusiame piene bulgarų lazdelė (*Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*) iš tikrųjų kovoja su neigiamu žarnyne ligas sukeliančių bacilų poveikiu ir pasekmėmis bei stiprina organizmo sveikatą. Mokslininkas teigė, kad vartojant fermentuotus pieno produktus, galima ilgai ir sveikai gyventi, teigiamai veikiama žarnyno mikroflora, mažėja toksinių mikrobu aktyvumas. Galime teigti, kad ši hipotezė teisinga ir iki šiol, nes per keletą dešimtmečių buvo atlikta nemažai tyrimų probiotikų srityje (Malda ir kt., 2006).

Probiotikai yra sutinkami maiste ir maisto papilduose (pvz.: kapsulių, tablečių ar miltelių pavidalu). Maisto produktai, turintys probiotikų yra jogurtas, fermentuotas ir nefermentuotas pienas, sojų pasta, kai kurios sultys ir sojos gėrimai (Doron ir kt., 2006).

Kaip probiotikai dažniausiai naudojamos laktobakterijos bei bifidobakterijos, nes jos yra pagrindiniai žarnyno ir makšties simbiotai. Probiotikų preparatai gaminami iš mikroorganizmų – žmogaus floros rūšių arba genetiškai modifikuotų jų variantų, dažniausiai iš laktobakterijų ir

bifidobakterijų, kurie yra nepatogeniški ir netoksiški. Jos priklauso gramteigiamų anaerobinių bakterijų grupei (yra toleruojančių deguonį padermių), nesudaro sporų. Fermentacijos metu gamina pieno ir acto rūgštis, skaido laktozę. Laktobacilos gamina keturių rūšių santykinai siauro aktyvumo spektro bakteriocinus. Jie yra toksiški giminingoms bakterijoms, tarp jų *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Mycobacterium* gentims. Laktobacilos taip pat išskiria vandenilio peroksidą, kuris slopina bakterijų augimą, keisdamas aplinką iš aerobinės į anaerobinę. Taigi probiotikai turi savybę stabdyti kitų bakterijų augimą ar net jas žudyti. Dėl šio poveikio jie gali būti naudojami ir infekcijų profilaktikai bei gydymui (Doron ir kt., 2006).

*Lactobacillus* gentyje yra daug rūšių, šiuo metu sudaro daugiau nei 125, tačiau ne visos iš jų turi pakankamai daug naudingų savybių. Idealia probiotikų paderme laikoma viena iš *Lactobacillus rhamnosus* padermių, išskirta ir nuodugnai iširta Gorbach ir Goldin, kurių garbei pavadinta GG. Daugiau nei 30 Azijos, Europos, Lotynų Amerikos šalių *Lactobacillus rhamnosus* GG naudoja jogurtų, sūrių, sulčių, kitų pieno produktų gamyboje. Antra laktobakterijų rūšis, tinkama probiotinių produktų gamybai, yra *Lactobacillus acidophilus* DDS1. Abi bakterijų padermės yra išskirtos iš žmogaus organizmo, lengvai kolonizuoja žarnyną, adaptuojasi rūgščioje bei šarminėje terpėje. Jos lengvai adhezuoja prie žarnyno gleivinės, ten dauginasi ir sumažina jų pralaidumą ir uždegiminių reakcijų intensyvumą (Pavilonis ir kt., 2004).

*Lactobacillus bifidus* – atsakinga už žarnyno mikrofloros palaikymą, virškinimo procesų gerinimą. Gramteigiama, nesporinė, anaerobinė ir toleruojanti deguonį bakterija. Skaido laktozę, gamina pieno ir acto rūgštis. Palaiko žarnyne ir makštyje rūgščią terpę, slopindama puvinio bakterijų ir kitų mikroorganizmų augimą. Fermentuoja žmogaus fermentų nesuskaidytas skaidulines medžiagas. Lengvina Ca, Mg, Zn adsorbiciją, lengvai kolonizuoja storąją žarnyną ir makštį. Žarnyne slopina šigelių, salmonelių, listerijų, klostridijų, ešerichijų augimą. Saugo nuo viduriavimų, nespecifinių vaginitų ir vaginozių, mažina organizmo alergines reakcijas maistui (Rutkauskaitė ir kt., 2006).

*Lactobacillus bulgaricus* - tai gramteigiama nesporinė bakterija, fermentuojanti laktozę, galaktozę, nefermentuoja eskulino, maltozės ir sacharozės. Pirmą kartą identifikuota 1905 m. Bulgarijos gydytojo Stamen Grigorov. Veikia antimikrobiškai prieš stafilokokus, streptokokus, pseudomonas, *E.coli*, puvinio bakterijas (Teixeira ir kt., 2008).

*Lactobacillus casei* - didina organizmo atsparumą po antibiotikų terapijos, chemoterapijos, po viduriavimo užtikrina žarnyno mikrofloros pusiausvyrą, gerina žarnyno peristaltiką ir palengvina tuštinimąsi. Tai lazdelės, sudarančios trumpesnes ar ilgesnes grandinėles. Mezofilai. Optimali jų vystimosi temperatūra 30-35°C. Terpėje jie susikaupia iki 1,5

% pieno rūgštis. Jų gausu rūgusiame piene. Plačiai naudojami sūrių raugams gaminti (Tamura ir kt., 2004).

Bifidobakterijos - tai vienos iš pirmųjų bakterijų rūšių, aptinkamos virškinamajame trakte, svarbios palaikant pastovią žarnyno homeostazę ir vystymąsi (Vilkova ir kt., 2004). Tai gramteigiamos, anaerobinės bakterijos, šakotos lazdelės formos. Jų skaičius didėja su amžiumi ir sumažėja gyvenimo pabaigoje. Kaip probiotikai dažniausiai naudojamos (*Bifidobacterium bifidum*, *B. longum*, *B. infantis*, *B. infantis* v. *liberorum*) (Ishibashi ir kt., 1997).

*Bifidobacterium bifidus* - naudinga virškinimui, padeda įsisavinti kalcį, geležį, magnį ir kitus vitaminus bei mineralus. Aptinkama storajame žarnyne ir makštyje, ji trukdo daugintis grybeliams ir žalingoms bakterijoms, stabdo jų augimą, nes mažina rūgštingumą, padeda sergant steatohepatitu (Corre ir kt., 2007).

*Bifidobacterium infantis* stabdo skrandžio ir žarnyno uždegimą, apsaugo nuo *E.coli*, skatina ląstelinio imuniteto vystymąsi, pasižymi vėžį veikiančiomis savybėmis (Aukštakalnienė ir kt., 2006). Gausiai kolonizuoja kūdikių, maitinamų motinos pienu, žarnyną, o taip pat ir suaugusių žarnyną. Jų kiekis mažėja vyresniems žmonėms. Palaiko optimalią storosios žarnos funkciją, ypatingai jautri stresui, dietos pokyčiams, antibiotikų vartojimui (Rutkauskaitė ir kt., 2006).

Probiotikų savybių turi ir kiti mikroorganizmai: *Streptococcus termophilus*, *Enterococcus faecium*, *Saccharomyces boulardii*, *Bacillus spp.*, *Escherichia coli* (Pavilonis ir kt., 2004).

**Žmogaus organizmo mikrobiota** - gausus mikroorganizmų antigenų šaltinis, kuris aktyvina imuninę sistemą (fagocitozę, komplemento sistemą, limfocitus, normalius antikūnus) (Ardatskaia ir kt., 2001).

Mikrobiota žmogaus žarnyne sudaro atskirą kiekvienam individui būdingą ekosistemą, kuri veikia žmogaus imuninę sistemą ir atlieka apsauginę – barjerinę funkciją: slopina patogenus, išskiria antibakterines medžiagas, konkuruoja su patogenais dėl maisto medžiagų ir neutralizuoja jų toksinus. Ji kokybiškai ir kiekybiškai pažeidžiama daugelio veiksnių: antibiotikų, patogenų. Visi veiksniai, keisdami mikroflorą, pažeisdami jos barjerinę funkciją, sukelia viduriavimą, o tai gali atsatyti probiotikai (Rambaud ir kt., 2008).

Žmogaus kūno mikrobiota skirstoma į normaliąją (autochtoninę) ir atsitiktinę – laikiną (tranzitinę, alochtoninę) mikroflorą. Normaliąją mikroflorą sudaro mikroorganizmai, pastoviai gyvenantys odoje, gleivinėje, ertmėse. Tranzitinė mikroflora nuolat kinta priklausomai nuo aplinkos ir organizmo būklės (Pavilonis ir kt., 2004).

Žmogų supantys mikroorganizmai skirstomi į patogeninius, sąlyginai patogeninius mikrobus ir simbiontus. Patogeniai mikrobai sukelia ligas, sąlyginai patogeninių mikrobu randama sveikų žmonių organizme ir jie nekenksmingi, bet pasikeitus sąlygoms (nusilpus imunitetui) gali tapti pavojingi. Simbiontai – naudingi ir būtini žmogui mikrobai. Normali mikroflora jungiasi prie gleivinių ir kartu su ląstelių muciniais bei bakterijų polisacharidais sudaro bioplėveles, kurios uždengia ląsteles nuo patogeninių mikroorganizmų (Raugalė, 2006).

Geriausia organizmo sveikatai saprofitinės mikrofloros ir aplinkos pusiausvyra yra vadinama eubioze, o kokybiniai ir kiekybiniai normalios mikrofloros pokyčiai, lydimi pataloginių procesų – disbioze (Raugalė, 2006). Pastaraisiais metais disbiozė yra daugelio ūminių ir lėtinių susirgimų priežastis, todėl vartojant probiotikus ir prebiotikus atstatoma organizmo eubiozė. Tokie preparatai skiriami visų pirma kūdikiams, pagyvenusiems žmonėms, juos gydant antibiotikais ir visais kitais disbiozės atvejais (Pavilonis ir kt., 2004).

#### **Žmogaus mikrofloros (mikrobiotos) funkcijos:**

- lemia pastovią žarnyno ir kitų kūno ertmių dujų sudėtį;
- sintetina fermentus, skaidančius organizmo nesuvirškintą maisto medžiagą, dėl to gaunami produktai, teikiantys energijos žarnyno gleivinės ląstelėms;
- sintetina B grupės ir k vitaminus;
- dalyvauja vandens ir druskų apykaitoje, aktyvina Ca, Mg, Fe jonų absorbciją;
- stabdo organizmo receptorių patogenų adhezijai, stiprindama audinių atsparumą patogeniniams mikroorganizmams;
- dalyvauja tulžies rūgšties, cholesterolio ir kitų makromolekulių recirkuliacijoje;
- mažina storosios žarnos turinio pH, slopindama puvinimo ir patogeninių bakterijų dauginimąsi;
- skaido nuodingąsias egzogenines ir endogenines kilmės medžiagas ir metabolitus;
- sintetina bakteriocidus ir peroksidus, naikinančius patogenines bakterijas;
- veikiant mikroorganizmams susidarę metabolitai reguliuoja žarnų peristaltiką (Tsimmerman, 2005).

Žmogaus virškinamajame trakte gyvena apie 400 - 500 įvairių rūšių bakterijų ir grybelių. Šie mikroorganizmai (mikrobiota) sąveikauja tarpusavyje ir su mūsų organizmu. Jų galima rasti ne tik virškinamajame trakte (burnoje, skrandyje, plonojoje, storosios žarnos), bet ir kitose sistemose (kvėpavimo, šlapimo, lytinių organų). Didžiausia bakterijų koncentracija randama proksimalinėje storosios žarnos dalyje. Žmogaus virškinamojo trakto ertmėje esančios bakterijos



yra kiekvieno žmogaus individualus organas – „mikrobinis organas“, toks pat kaip kepenys, širdis, plaučiai ir kt. (Urbonas, 2005).

Žarnyno mikroflora labai įvairialypė. Žinoma, kad 1 g išmatų yra apie  $10^{12}$  mikroorganizmų ląstelių, kurių daugiau nei 90 proc. sudaro anaerobinė mikroflora: bifidobakterijos ( $1\text{g } 10^5\text{--}10^{11}$ ), bakteroidai (*B.fragilis*), *Fusobacterium spp.*, klostridijos (*C.perfringens*), ( $1\text{g } 10^3\text{--}10^5$ ), anaerobiniai streptokokai (*Peptococcus spp.*), laktobakterijos. Fakultatyvinių anaerobų yra apie 4–5 proc.: enterokokai (*E.faecalis*), *E.coli* ( $1\text{g } 10^6\text{--}10^9$ ), kitos enterobakterijos, mielės, pseudomonas, *Candida* grybai ir kita kintama mikroflora (Aukštakalnienė ir kt., 2006).

Gerosios bakterijos padeda suskaidyti laktozę, slopina patogeninių mikroorganizmų augimą, taip pat gali sintetinti vitaminus, stimuliuoti imuninę sistemą. Sutrikus žarnyno funkcionavimui, atsiranda diskomfortas, žarnyno sudirginimas, vidurių užkietėjimas, kyla infekcijų pavojus. Gali išsivystyti tam tikros ligos: dirgliosios žarnos sindromas, Krono liga, žarnų vėžys. Sutrikus natūraliai žarnyno mikrofloros pusiausvyrai ir pagausėjus *E. coli*, dažniau vargina šlapimo takų infekcijos. O viena iš pasikartojančios makšties kandidamikozės priežasčių gali būti balšvagrybio (*Candida albicans*) augimas žarnyne (Klessen ir kt., 1997).

Žmogaus vaisius vystosi sterilioje aplinkoje. Gimus vaikui, žarnyną ir kitus organus kolonizuoja mikroorganizmai. Pirmosios bakterijos patenka iš mamos gimdymo takų ir storojo žarnyno (laktobakterijos, *E.coli*, streptokokai). Mamos pienu maitinamo kūdikio žarnyne po mėnesio išivyrauja bifidobakterijos. Naujagimio žarnyno mikrofloros formavimąsi nulemia: aplinka, kurioje gimė vaikas (koks gimdymo stacionaras, kokia šalis – išsivysčiusi ar besivystanti), gimdymo būdas (natūralus ar per Cezario sekciją – po jos bifidobakterijų kiekis pasiekia normą 6 mėn., vėliau nei gimdant natūraliai), maitinimas (mamos pienu – vyrauja bifidobakterijos, dirbtiniu maistu – bakteroidai, *E.coli*) (Urbonas, 2005).

Pradinė bakterijų kolonizacija nulemia, kokia bus nuolatinė žmogaus mikrobiota. Vaikų žarnyno mikrobiota supanašėja su suaugusiųjų 1-3 metų amžiuje. Augant mikrobiotos individo sudėtis šiek tiek keičiasi. Mamos pienu maitinamo kūdikio žarnyne apie 30 – 90 % mikrobiotos sudaro bifidobakterijos, tuo tarpu senyvo amžiaus žmonėms jos sudaro 25%. Su amžiumi keičiasi ne vien tik bakterijų kiekis, bet ir jų kokybinė sudėtis, pvz., vaikams būdingos *Bifidum longum*, *Bifidum infantis*, suaugusiems – *Bifidus adolescentis* (Urbonas, 2005).

Neišnešiotų naujagimių žarnyno mikrobiota skiriasi nuo išnešiotų. Jei neišnešiotas naujagimis patenka į reanimacijos ar terapinį skyrių, jo žarnyne apsigyvena tik kelių rūšių bakterijos: laktobakterijų ir bifidobakterijų randama retai, vyrauja *Enterococcus faecalis*, *E. coli*,

*Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis* ir *Staphylococcus haemolyticus*. Mikrobiotos sudėtį labiausiai sąlygoja higieninės sąlygos ir antibiotikai (Urbonas, 2005).

### **1. 1. 2. Sampratos netolydumai**

Šiandien probiotikų pasiūla rinkai ypač didelė, žmogus nežino kuris probiotinis preparatas tinkamiausias vartoti, kuris iš jų geriausiai veikia organizmą, padeda išvengti ligų. Įvairiose mokslinėse publikacijose, straipsniuose, internetiniuose šaltiniuose, žurnaluose pateikiami probiotikų apibūdinimai, kurie bando paaiškinti „kas tai yra probiotikai?“. Dėl šios priežasties susiduriame su sampratos netolydumais, nes vieni šaltiniai probiotikus apibūdina kaip „draugiškas“, kiti kaip „giminingas“ bakterijas.

Viename straipsnyje probiotikai apibūdinami kaip „draugiškos“ bakterijos, turinčios teigiamą poveikį žmogaus sveikatai (Khan ir kt., 2007). Kitame – tai žmogaus organizmui „giminingi“ ir naudingi mikroorganizmai, kurie teigiamai veikia jo sveikatą, pagerina virškinimą ir sustiprina imuninę sistemą (Collins, 1999). Anot Martin (2003) probiotikai – tai gyvi mikrobiniai maisto papildai, teikiantys naudą šeimininkui kartu pagerinantys žarnyno mikrobinį balansą.

Senok (2005) teigimu, paprastai probiotikai apibūdinami kaip gyvi mikroorganizmai, kurie vartojami tinkamomis dozėmis, teikia naudą šeimininkui.

Įvairiuose publikaciniuose leidiniuose yra skirtingai pateikiama probiotiko sąvoka. Dėl šios priežasties yra sudėtinga pateikti standartinį ir vienareikšmį probiotikų termino apibrėžimą. Teisingiau būtų, kad vartoti „giminingos“, nei „draugiškos“, nes probiotikų preparatai gaminami iš mikroorganizmų – žmogaus floros rūšių, tai yra tie organizmai, kurie yra aptinkami žmogaus žarnyne, jie yra įprasta mikroflora. O „draugiškos“ - tiesiog nedarančios žalos, bet negiminingos mūsų organizme esančioms bakterijoms.

## 1. 2. Probiotikų reikšmė žmogaus sveikatai

### 1. 2. 1. Imuninės sistemos moduliavimas

Probiotikai padidina nespecifinį imuniteto atsaką. Štai dėl ko jie tokie veiksmingi gydant įvairias infekcijas. Probiotikai reguliuoja įgimtą ir įgytą imunitetą. Pirminė į žarnyną patekusių probiotikų sąveika su gleivinės imuninė sistema pasireiškia jiems sąveikaujant su virškinamojo trakto sienelės epitelio ląstelėmis. Šios epitelio ląstelės – imunoreguliacinės ląstelės. In vitro tyrimuose įrodyta, kad *Lactobacillus* reguliuoja citokinų ekspresiją, indukuoja T helperių, navikų nekrozės faktoriaus TNF  $\alpha$ , interliukinų (IL) – 2, IL – 1 $\beta$ , IL – 6, IL – 18 produkciją ir ekspresiją periferinėse mononuklearinėse kraujo ląstelėse. *Lactobacillus acidophilus* aktyvina imuninę sistemą, stimuliuodama Ig A (tai imunoglobulinas, esantis žarnyne ir apsaugantis nuo infekcijų) (Doron ir kt., 2006).

Probiotikai sudaro ir imunologinį gleivinių barjerą, nes per gleivines į organizmą patenka dauguma antigenų. Gleivinių vietinis imunitetas yra atsakingas už maisto medžiagų toleravimą, kurių nesuvirškinus gali išsivystyti alergija maistui. Nustatyta, kad probiotikai sveikame organizme stiprina fagocitozę, o turintiems alerginių susirgimų – mažina uždegimines reakcijas (Pavilonis, 2004).

Atlikti įdomūs tyrimai su laktobakterijomis, kaip adjuvantais, vakcinų sudėtyje. Suleidus pelėms stabilgės vakcinos ir *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826 buvo indukuotas stiprus imuninis atsakas prieš stabilgės toksiną. Adjuvantinės laktobakterijų funkcijos ypač svarbios kuriant vakcinas prieš sukėlėjus, kuriems infekcijos vartai yra gleivinių membranos (žarnynas, burnos ertmė, makštis, kvėpavimo takai) (Pavilonis, 2004).

Ekspimentinio tyrimo metu įrodyta, kad *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus rhamnosus* aktyvina plaučių makrofagų fagocitines savybes. Kito tyrimo metu kvėpavimo takų infekcinėmis ligomis sergančių vaikų mitybos racionas buvo papildytas *Bifidobacterium* genties bakterijomis. Atsistačius žarnyno mikrofloros balansui pagerėjo imunologiniai rodikliai (didesni B ir T ląstelinio imuniteto, NK ląstelių duomenys, taip pat  $\alpha$ - ir  $\gamma$ -interferonų išskyrimą stimuliuojantis poveikis). Probiotinės pieno rūgšties ir bifido bakterijos taip pat stimuliuoja imunitetą virusinėms infekcijoms: poliomielitui, rotavirusams ir gripo infekcijoms (Bang ir kt., 2007).

Kaip teigia Perdigon (1995) in vitro bifidobakterijos skatina didelio IgA kiekio susidarymą. Iš 120 padermių, priklausančių tam pačiam rūšių skaičiui, trys *Bifidobacterium breve*

ir *Bifidobacterium longum* padermės sukėlė laukiamą IgA sintezę. Tai buvo patvirtinta in vivo, kai pelėms, kurioms kartu su choleros toksinu buvo duodama viena iš *Bifidobacterium breve* padermių, padidėjo imuninis limfoidinio audinio atsakas, susijęs su žarnynu. Pelių maitinimas fermentuotu *Bifidobacterium breve* papildytu pienu paskatino į makrofagus panašias ląsteles išskirti faktorių, kuris stimuliuoja B ląstelių mitozę, ir pagreitino antikūnų maisto alergenams ir patogenams gamybą.

### ***1. 2. 2. Probiotikai ligų gydymui ir prevencijai***

Probiotikai naudojami įvairių ligų profilaktikai: infekcinės kilmės viduriavimui, ypač rotavirusinės; *Clostridium difficile* sukeltam viduriavimui; antibiotikų sukeltam viduriavimui; radiacinės terapijos sukeltam viduriavimui; pooperacinės ir sunkių būklių sukeltoms komplikacijoms, kvėpavimo sistemos infekcijoms; maisto, rečiau inhaliacinėms infekcijoms; naujagimių nekroziniam enterokolitui; onkologinių ligų, ypač storosios žarnos vėžio, profilaktikai, dantų ėduoniui; I tipo cukriniam diabetui; vakcinacijos metu; aterosklerozės, osteoporozės, alerginių reakcijų profilaktikai, imuniteto stiprinimui; vaginozių, vaginitų ir šlapimo takų profilaktikai.

Probiotikai naudojami įvairių ligų gydymui: infekcinės kilmės, *Clostridium difficile*, antibiotikų sukeltas viduriavimas, *Helicobacter pylori* infekcija, uždegiminės žarnyno ligos: krono liga, maišelio uždegimas nespecifinis opinis kolitas, dirgliosios žarnos sindromas, radiacinės terapijos sukeltas viduriavimas, maisto alergija, atopinis dermatitas, laktozės netoleravimas, steatohepatitas, vaginozių, vaginitų ir šlapimo takų infekcijų gydymas (Urbonas, 2005).

#### Ūminio viduriavimo gydymas

Pasaulyje vaikų viduriavimas labai paplitęs. Besivystančiose šalyse jo atvejų pasitaiko du kartus dažniau nei išsivysčiusiose šalyse. Sunkiausios komplikacijos – svorio praradimas ir didelis mirštamumas. Atlikta daug tyrimų, kuriuose įrodytas probiotikų veiksmingumas gydant tiek vaikų, tiek suaugusiųjų ūminį viduriavimą. Buvo vertinami įvairūs probiotikai, tarp jų *Lactobacillus*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus* ir *Bifidobacterium bifidum*. Gydymas probiotikais sutrumpina ūminio viduriavimo trukmę, jie taip pat veiksmingi gydant antibiotikų sukeltą viduriavimą ir kitus nepageidaujamus poveikius virškinamajam traktui (Doron ir kt., 2006).

Souzos teigimu (2002) *Saccharomyces boulardii* – vienas iš veiksmingiausių probiotikų vaikų ūminiam viduriavimui gydyti ir antibiotikų sukkelto viduriavimo prevencijai. Keturių atsitiktinių imčių tyrimų analizė parodė, kad vartojant *Saccharomyces boulardii* preparatus tokio viduriavimo dažnis yra statistiškai reikšmingai mažesnis nei vartojant placebo.

#### Helicobacter pylori infekcija

*H. pylori* infekcija susijusi su lėtiniu gastritu, pepsinėmis opomis ir skrandžio vėžiu. Jai gydyti skiriamas vaistų derinys – protonų pompos inhibitorius, klaritromicinas ir amoksicilinas, metronidazolis. Šie vaistai veiksmingai gydo *H. pylori* infekciją, tačiau toks gydymas skatina antibiotikams atsparių padermių vystymąsi. Atlikta keletą tyrimų, vertinusių kaip probiotikai apsaugo nuo nepageidaujamų poveikių, kuriuos sukelia antibiotikai. Viename jų pacientai vartojo *L. acidophilus*. Daug geriau *H. pylori* buvo išnaikinta grupėje, gavusioje probiotiką. Visų tyrimų metu probiotikai sumažino nepageidaujamų poveikių dažnį (Miller., 2003).

#### Dirgliosios žarnos sindromas

Dirgliosios žarnos sindromu sergantiems žmonėms atlikti tyrimai taip pat nustatė probiotikų naudą. Vieno jų metu pacientai vartojo *L. acidophilus*. Naudojant anketas atrinkta 18 pacientų. Jie šešias savaites vartojo probiotikų arba placebo, po to buvo daroma 2 savaitių pertrauka. Vėliau pacientams vėl paskirtas šešių savaitių probiotikų kursas ir 50% pacientų buvo nustatytas teigiamas poveikis (Doron ir kt., 2006).

#### Makšties infekcijų gydymas

Moterys dažnai vartoja įvairių vaistų šiai ligai gydyti, tačiau vaistai naikina ne tik infekcijos sukėlėjus, bet ir normalią makšties mikroflorą – laktobakterijas. Todėl makšties infekcijos kartojasi ir gali užsitęsti. Atliktas tyrimas, kuriame tirta, ar kasdieninis jogurto, kurio sudėtyje yra *Lactobacillus acidophilus*, vartojimas apsaugo nuo *Candida* sukeltų makšties infekcijų. Rezultatai rodo, kad pacientės, kurios vartojo jogurtą, tris kartus sumažėjo infekcijų dažnis, bei *Candida* kolonizacija (Doron ir kt., 2006).

Makšties kandidozę sukelia vienas iš daugelio grybelio *Candida* rūšių. Dažniausiai moters lyties organuose randamas baltasis balkšvagrybis (*Candida albicans*). Jis nustatomas makšties išskyrose 10–20 proc. sveikų moterų ir iki 40 proc. nėščiųjų. Dažniausiai aptinkami grybai yra *Candida albicans* ir *Candida tropicalis*. Jų dažniau pasitaiko vyresnėms nei 35 metų amžiaus moterims. Grybelių dažnai randama virškinamajame trakte, daugiau nei 50 proc. sveikų moterų jų yra burnoje, tiesiojoje žarnoje ir makštyje (Hatakka, 2007).

Kaip teigia Raugalė (2006), sveikų moterų makštyje vyrauja *Lactobacillus acidophilus*, gimdymo metu patenka į naujagimio žarnyną. Jei nėščioji serga kolpitu, vulvovaginitu, makšties

kandidoze ir vartoja plataus spektro antibiotikų, tada į naujagimio žarnyną patenka anaerobinių gramneigiamų bakterijų, enterobakterijų, *Candida* grybelis. Kad to išvengti, naujagimių prevencijai dabar nėščiosioms, ypač sergančioms vaginozėmis ir vaginitais, siūloma vartoti probiotikų.

#### Alergijų gydymas

Atopinė egzema, alerginis rinitas ir astma – tai išsivysčiusiose šalyse vis labiau plintančios alerginės ligos. Jų daugėja dėl higienos kaltės. Vis labiau mokslininkai domisi simbiotinės žarnyno mikrofloros, kaip imuninės sistemos modulatoriaus ir atsako į antigeną reguliatoriaus, įtaka. Įrodyta kad probiotikai gali būti vartojami ne tik alerginių ligų profilaktikai, bet ir joms gydyti. Labiausiai šioje srityje ištirtos *Lactobacillus* grupės bakterijos (Doron ir kt., 2006).

Gydant kūdikių dermatitą hidrolizuotais adaptuotais pieno mišiniais su *Bifidobacterium lactis* ar *Lactobacillus rhamnosus GG* pasiektas geresnis efektas nei gydant hidrolizuotais mišiniais be probiotikų (Isolauri 2000).

Antialerginis probiotikų poveikis aiškinamas tuo, jog probiotikai stiprina žarnyno barjero funkciją, mažina jos pralaidumą nesuvirškintiems maisto komponentams – alergenams, skatina alerginių antikūnų IgE sintezę (Kaliomaki ir kt., 2001).

#### Piktybinių procesų profilaktika

Nustatyta, kad laktobakterijos ir bifidobakterijos mažina kancerogenų ir  $\beta$  gliukoronidazės kiekius, skaido žarnyne pasigaminusias žalingas mutacijas, sukeliančias medžiagas, *in vitro* ir *in vivo* aktyvina vieną stipriausių kancerogenų – alfatoksina, slopina kancerogenus aktyvuojančius fermentus storojoje žarnoje (Waltz, 2004).

#### Šlapimo takų infekcijų profilaktika

Anot Raugalės (2006) yra žinoma laktobakterijų nauda šlapimo takų infekcijų prevencijai. Dauguma bakterijų, išskiriamų iš šlapimo, patenka į šlapimo pūslę. Vartojant probiotikų, pagerėja žarnyno ekosistema, taip pat mažiau „blogųjų“ bakterijų patenka į šlapimą ir lytinius organus. Laktobakterijos apsaugo šlapimo ir lytinius organus nuo uropatogeninių bakterijų patekimo ir sumažėja šlapimo organų infekcijos atkryčių pavojus.

### **1. 2. 3. Neigiamas probiotikų poveikis sveikatai**

Vis daugėja moksliskai pagrįstų duomenų apie teigiamą probiotikų poveikį žmogaus sveikatai, tačiau ar iš tiesų probiotikus saugu vartoti, ar jie nekelia pavojus mūsų sveikatai?

Borriello (2003) teigimu, įvairiuose medicinos literatūros šaltiniuose teigiama, kad iš esmės probiotikai nepavojingi žmogui, tačiau juos reikia naudoti tam skirtomis dozėmis ir atsargiai asmenims, turintiems imuniteto defektų ar žarnyno opų.

Pasak Groote ir kitų autorių (2005) griežtų kontraindikacijų probiotikų vartojimui nėra. Sisteminė infekcija (dažniausiai naudojant *Saccharomyces boulardii*) dėl probiotikų pasitaiko retai, dažniausiai ligoniams, turintiems imunodeficitą, bei keliems vaikams, sergantiems trumposios žarnos sindromu. Gydytojas turėtų individualiai nuspręsti kokį skirti probiotiką ligoniui. Atsargiai reikėtų skirti probiotikų vaikams, sergantiems trumposios žarnos sindromu, nes aprašyti keli acidozės kraujyje atvejai po probiotikų terapijos.

Kaip teigia Kotowska (2005), literatūroje aprašyta 30 fungemijos atvejų, vartojant *Saccharomyces boulardii* imunodeficitiniams asmenims ar pacientams, sergantiems sunkiomis, gyvybei grėsmingomis ligomis.

Anot Vogel (2008) Nyderlanduose pradėtas 24 klinikinių tyrimų dalyvių mirties tyrimas. Šiais klinikiniais tyrimais buvo vertinama eksperimentinė pankreatito gydymo probiotikais metodika. Utrechto universiteto medicinos centro organizuotas tyrimas buvo atliekamas keletoje medicinos klinikų nuo 2004 iki 2007 metų, jame dalyvavo 296 pankreatitu sergantys asmenys, kurie gaudavo probiotikų. Jų gydymo rezultatai buvo lyginami su kitos grupės pacientų, negaunančių šių medžiagų, duomenimis. Eksperimentinėje grupėje per trejus metus mirė 24 žmonės, kontrolinėje grupėje - tik 9. Tokių rezultatų priežastys kol kas nežinomos. Olandijos medikams reikalaujant, prieš tris mėnesius buvo nutrauktas analogiškas tyrimas Čekijoje. Galime teigti, kad sergant ūminiu kasos uždegimu, vartoti probiotikus pavojinga.

Didžiausias nerimas vartojant probiotikus – sepsio rizika. Stipriai veikiantys probiotikai, gali tapti patogeniškais. Wagner užkrėtė peles iš žmogaus išskirtomis *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus GG*, nors suaugusioms pelėms šalutinis poveikis nepasireiškė, tačiau paveiktos *Lactobacillus reuteri* ir *Lactobacillus GG* naujagimėms pelėms sukėlė mirtį. Šio tyrimo rezultatai rodo, silpną imuninę sistemą turinčioms ką tik gimusioms pelėms, padidėja probiotikų sepsio rizika (Robert ir kt., 2009).

*Lactobacillus rūšys* yra gerai pažįstamos kaip endokarditų sukėlėjos suaugusiems (kitos formos sepsį vaikams) (Robert ir kt., 2009). Rautio (1999) teigimu, 74 diabetu sergančiai moteriai, vartojusiai *Lactobacillus rhamnosus GG* papildus, kepenyse išsiplėtojo pūlinys ir plaučių uždegimas.

Visais atvejais probiotikų sukeltos bakteriemijos ar fungemijos pasitaiko pacientams turintiems imuninės sistemos sutrikimų, lėtinių ligų, ir neaptikta jokių pranešimų vartojant

probiotinius preparatus sveikiems žmonėms. Septicemijos atvejų pasitaiko, turint žarnyno patologijų (diarėja) (Robert ir kt., 2006).

Rekomenduojama įvertinti galimą riziką skiriant probiotikų neišnešiotiems kūdikiams, sergantiesiems širdies vožtuvų, kai kuriomis lėtinėmis ligomis, kuriems protezuoti širdies vožtuvai, kraujuoja iš žarnyno, asmenims, vartojantiems vaistų, slopinančių imuninę sistemą, sergantiesiems onkologinėmis ligomis po chemoterapijos, esant įvairioms imunodeficitinėms būklėms. Šiais atvejais yra sepsio (kraujo užkrėtimo) išsivystymo tikimybė. Taip yra dėl to, kad, veikiant probiotikams padidėjus žarnyno gleivinės pralaidumui, didėja bakterijų patekimo į kraują galimybė. Yra teorijų teigiančių, kad probiotikai gali neigiamai paveikti vaisių (Robert ir kt., 2006).



### 1. 3. Probiotikų kokybė

#### 1. 3. 1. Probiotikų kokybės problemos

Šiandien probiotikų tyrimams visame pasaulyje teikiamas itin didelis dėmesys, jų gamybai, technologijai, skiriamos milžiniškos pinigų sumos, gamintojai rinkai siūlo vis didesnę probiotikų pasirinkimą, reklamuojama jų nauda sveikatai, todėl labai svarbu, kad probiotikai atitiktų jiems keliamus reikalavimus.

Anot Miller (2002) didelė svarba teikiama probiotikų kokybei – ne tik gamybos aspektu, bet ir technologijos – kaip mikroorganizmus kuo ilgiau išsaugoti gyvybingus. Tiek užsienyje, tiek Lietuvoje atlikti tyrimai su probiotikais parodė, kad išlaikyti reikiama gyvybingų bakterijų skaičių preparate – vis dar sudėtinga užduotis. Tai priklauso ne tik nuo gamybos technologijos, bet ir nuo preparatų laikymo sąlygų.

Europoje molekuliniais metodais tirtų 55 vartojamų probiotikų tyrimai parodė, kad 47 % probiotikų buvo neteisingai nurodytas bakterijų rūšinis sąstatas, devyniolikos probiotinių bakterijų gyvybingumas siekė tik 63%. Taip pat *Enterococcus faecium* buvo išskirtas iš šešių probiotikų, nors informaciniuose lapeliuose ši rūšis rasta tik 2 probiotiniuose preparatuose. Analizuojant bakterijų atsparumą antibiotikams, 187 mikroorganizmų padermės pasirodė atsparios: kanamicinui (79% padermės), vankomicinui (65%), tetraciklinui (26%), penicilinui G (23%), eritromicinui (16%), chloramfenikoliui (11%) (Temmerman ir kt., 2003).

2004 m. vykusiame Europos klinikinės mikrobiologijos ir infekcinių ligų 14 kongrese, dalyvaujantys mokslininkai nurodė probiotikų kokybės trūkumus. Apklausa buvo pasirinktos 54 bendrovės, iš kurių 2 kompanijos atsisakė bendradarbiauti, 27 (daugiausia iš JAV) - neatsiliepė į kvietimą bendradarbiauti, 27 kompanijų informacija apie probiotikus tik iš dalies sutapo su nepriklausomų tyrėjų rezultatais: iš 174 padermių neteisingai identifikuota 17,2%, iš 202 padermių 53,5% priklausė žmonių mikroflorai, 44,5% - buvo gyvūninės kilmės, 2,0% sudarė nedeklaruoti GMO (Vankerckhoven 2004).

Londone buvo tirti 52 probiotiniai preparatai, 44 įsigyti Didžiosios Britanijoje, 8 kitose Europos sąjungos valstybėse (Prancūzijoje, Danijoje, Ispanijoje ir Vokietijoje). Maisto papildai buvo testuojami morfologiškai ir gauti rezultatai lyginami su informacija esama informaciniuose lapeliuose. Atidžiai pažymint preparato pavadinimą, įpakavimą, prekės seriją, galiojimo laiką, bakterijų ląstelių skaičių ir rūšinį sąstatą. Rezultatai parodė, kad 21 probiotinis preparatas pirktas Britanijoje neatitiko tikslios nomenklatūros, pvz., *Lactobacillus bifidus* buvo pažymėtas 4 produktuose, nors šis pavadinimas jau daugiau kaip 20 metų netinkamas, tokia bakterijų padermė

turi būti pervadinta į gentį *Bifidobacterium*, *Streptococcus faecium* pažymėtas 3 produktuose, tačiau tikrasis pavadinimas *Enterococcus faecium* identifikuotos kelios naujos rūšys, kurių nebuvo apraše. Taip pat probiotikų preparatų informaciniuose lapeliuose nurodytas netikslus bakterijų ląstelių skaičius arba jo visai nebuvo. Kiti 8 preparatai iš kontinentinės Europos atitiko aukščiausius vertinimo standartus (Miller ir kt., 1998).

2004 metais Europoje buvo ištirtos *Lactobacillus* padermėmės probiotiniuose preparatuose, ar atitinka tikslų skaičių ir rūšinių sąstatą informaciniame lapelyje. Analizė parodė, kad dešimt probiotinių preparatų suteikė informaciją apie gentį ir rūšį *Lactobacillus*. Tikslus bakterijų ląstelių skaičius ir padermės buvo aptiktos 7 probiotikuose (Coeuret ir kt., 2004).

### **1. 3. 2. Probiotikų kokybės reikalavimai**

Išaugęs didelis pasaulinio masto susidomėjimas probiotikais, jų vartojimas, paskatino įvairių šalių mokslininkus ieškoti tiesos mikrobiologinių tyrimų srityje, kad būtų galima teigti, jog probiotiniai preparatai visiškai atitinka jiems keliamus reikalavimus.

Probiotikų reikalavimuose nurodoma, kad bakterijos privalo priklausyti žmogaus mikrobiotai, gebėti kolonizuoti tam tikras žmogaus kūno ertmes, būti nepatogenais žmogui ir antagonistais kitų mikroorganizmų atžvilgiu, taip pat gebėti daugintis organizme ir atstatyti žmogaus normaliąją mikrobiotą, būti atsparios rūgštims bei tulžiai ir aktyvinti žmogaus imuninę sistemą, turėti žmogaus organizmui naudingą fermentinį aktyvumą bei išlaikyti gyvybingumą ir stabilumą technologinių procesų metu (Gregor ir kt., 2003).

Šiandien gausu įvairių literatūros šaltinių, kuriuose teigiama, kad probiotikų kokybė neatitinka jiems keliamų reikalavimų, didelės problemos siejamos su bakterijų nesugebėjimu išlikti gyvybingomis kuo ilgesnį laiką, taip pat netikslumai informaciniuose lapuose (rūšinio sąstato neatitikimai, neteisingai nurodomas bakterijų ląstelių skaičius arba jo visai nėra, neaiškios laikymo sąlygos ir .t.t). Tokie pažeidimai, reikalauja griežtos kokybės kontrolės, tiek gamyboje, tiek transportavimo ir pardavimo metu.

Skirtingų probiotinių produktų naudingumas priklauso nuo juose esančių bakterijų kamienų, kilmės, grynumo, gyvybingumo, kokybės ir klinikinių tyrimų įvertinimo. Dėl šių priežasčių, kiekvienas probiotinių bakterijų kamienas turi turėti patikimą ir išsamią jų saugumo ir efektyvumo tyrimų dokumentaciją. Todėl mokslininkai bei įvairios kontrolės institucijos ieško galimybių kaip užtikrinti, kad iš probiotinio produkto iki storųjų žarnų epitelio pereinant pakankamas gyvų probiotinių bakterijų kiekis ir taip turėtų galimybę vykdyti naudingą veiklą individui. Šiuo metu teigiama, kad bendras gyvų probiotinių bakterijų kiekis vienoje porcijoje

turi būti  $1 \times 10^8$  KSV. Tai reiškia, kad naudojimo metu probiotiniame produkte turi būti ne mažiau kaip  $1 \times 10^6$  KSV/g (Miller, 1996).

Ne visi probiotikų preparatai savo sudėtyje turi aiškiai nurodytą „gerųjų“ bakterijų kiekį. Tai svarbu, nes vien preparate esančio probiotiko pavadinimas nerodo, kad jo kiekis yra pakankamas klinikiniam poveikiui gauti. Taip pat svarbu atkreipti dėmesį ir į tai, kokių rūšių ir padermių mikroorganizmai įeina į probiotinio preparato sudėtį. Pavyzdžiui, *Lactobalillus acidophilus* DDS-1 išsiskiria iš daugelio kitų *Lactobalillus acidophilus* padermių, nes DDS-1 yra žmogaus organizmo endogeninė laktobacilų padermė, savo savybėmis pranokstanti kitas *Lactobacillus acidophilus* padermes: ne visų padermių bakterijos sėkmingai įveikia skrandžio barjerą, ir gali būti, kad išgėrus netinkamai subalansuoto probiotikų preparato žarnyną pasieks negyvybingos bakterijos, negalinčios atlikti daugelio svarbių funkcijų (Murthy, 2000).

Remiantis **FAO/WHO** (Maisto ir žemės ūkio organizacija Jungtinėse tautose/Pasaulinė sveikatos organizacija) organizacijų nurodytais kriterijais informaciniame lapelyje turėtų būti šie reikalavimai: gentis, rūšis ir štamo pavadinimas, gyvybingų ląstelių skaičius ir laikas, per kurį šios ląstelės išlaikytų savo gyvybingumą nurodytą apraše, dozės kiekis, laikymo sąlygų tinkamumas, nauda sveikatai, kontaktinė informacija vartotojams (FAO/WHO Working Group, 2002).

## 2. Medžiagos ir metodai

### 2.1. Medžiagos

#### 2.1.1. Probiotiniai preparatai

Tirti 6 komerciniai probiotiniai preparatai:

1. Linex preparatas. Į sudėtį įeina trijų rūšių bakterijos. Kiekvienoje kapsulėje yra ne mažiau kaip  $1,2 \times 10^7$  KSV (kolonijas sudarančių vienetų) liofilizuotų gyvybingų pieno rūgšties bakterijų *Lactobacillus acidophilus* (sp. *L.gasseri*), *Bifidobacterium infantis*, *Enterococcus faecium*, atsparių antibiotikams ir chemoterapijai.
2. Bifoval preparatas. Kiekvienoje kapsulėje yra 50 mg *Lactobacillus bulgaricus* DDS-14, 50 mg *Lactobacillus rhamnosus*, 9 mg *Lactobacillus acidophilus* DDS-1 ir 2,5 mg *Bifidobacterium bifidum*. Bendras gyvų bakterijų skaičius  $10^9$  KSV/kapsulėje.
3. Bifolac preparatas. Vienoje kapsulėje yra ne mažiau kaip  $10^7$  KSV *Lactobacillus rhamnosus* ir *Bifidobacterium longum* bakterijų. Bifolac kapsulės yra padengtos specialia rūgščiai atsparia plėvele, todėl nepažeistos patenka į žarnyną.
4. Yogurt preparatas. Vienoje kapsulėje yra  $10^9$  KSV (kolonijas sudarančių vienetų) aktyvių ląstelių *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bifidus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*.
5. Enterol preparatas. Veiklioji medžiaga yra *Saccharomyces boulardii*. Vienoje kapsulėje yra 282,5 mg liofilintų *Saccharomyces boulardii* miltelių (atitinka 250 mg liofilintų *Saccharomyces boulardii* ląstelių).
6. Lactoseven preparatas. Sudėtyje yra septynių rūšių naudingų organizmui pieno rūgšties bakterijų ir inulino (30 mg): *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium longum*, *Streptococcus thermophilus*. Bendras gyvų bakterijų skaičius  $10^8$  KSV/kapsulėje.

## 2. 1. 2. Terpės ir reagentai

Terpės:

Terpių sudėtis nurodyta 1 l distiliuoto vandens

YEPD agaras	Gliukozė Peptonas Mielų ekstraktas Agaras	20 g 20 g 10 g 20 g
PCA agaras	Kazeino fermentinis hidrolizatas Mielų ekstraktas Gliukozė Agaras	5 g 2,5 g 1 g 15 g
MRS agaras	Peptonas Mielų ekstraktas Mėsos ekstraktas D(+) – gliukozė Tween 80 K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> Natrio acetatas MgSO <sub>4</sub> MnSO <sub>4</sub> Agaras	10 g 4 g 8 g 20 g 1 g 2 g 2 g 5 g 0,2 g 0,04 g 14 g
MRS sultinys	Peptonas Mielų ekstraktas Mėsos ekstraktas D(+) – gliukozė Tween 80 K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> Natrio acetatas MgSO <sub>4</sub> MnSO <sub>4</sub>	10 g 4 g 8 g 20 g 1 g 2 g 2 g 5 g 0,2 g 0,04 g
Sabūro dekstrozės sultinys	Peptonas Gliukozė	10 g 20 g

Terpės autoklavuojamos 15 min. 1 atm.(121°C) slėgyje

Biocheminiai rodikliai *Saccharomyces boulardii* identifikacijai

Vitaminų tirpalas	D-biotinas Inozitolis Niacinas Piridoksinas Riboflavinas Tiaminas	10 mg 100 mg 100 mg 100 mg 100 mg 100 mg
Maltozė	$C_{12}H_{22}O_{11}$	20g
Laktozė	$C_{12}H_{22}O_{11}$	20 g
D - gliukozė	$C_6H_{12}O_6$	20 g
D - galaktozė	$C_6H_{12}O_6$	20 g
Celobiozė	$C_{12}H_{22}O_{11}$	20 g
Rafinozė	$C_{18}H_{32}O_{16}$	20 g
DL sacharozė	$C_{12}H_{22}O_{11}$	20 g
D(+) - ksilozė	$C_5H_{10}O_5$	20 g
L – rhamnozė	$C_6H_{12}O_5$	20 g
Natrio nitratas	$NaNO_3$	20 g
L - arabinozė	$C_5H_{10}O_5$	20 g
Kraskmolas	$(C_6H_{10}O_5)_n$	20 g
Šlapalas	$(NH_2)_2CO$	20 g
Kalio nitritas	$KNO_3$	20 g
Natrio citratas	$C_6H_6Na_2O_7$	20 g

Nurodyta 1 l distiliuoto vandens

Antibiotikai

Amoksiklavas (amoksicilinas)	625 mg
Gentamicinas	40 mg/1ml
Lekoklaras (klarithromicinas)	250 mg
Vancomicinas	500 mg
Dalacinas (klindomicinas)	150 mg
Ksorimaksas (kefuroksinas)	250 mg

### Antibiotikų BBL™ Crystal™ rinkinys

Tetraciklinas	80 µg
Kiprofloksinas	10 µg
Ampicilinas	33 µg
Sulphonamidas	240 µg
Methicillinas	29 µg

### Kitos priemonės

HCl	36%
NaCl	0,09%
Chloramfenikolis	98%

## 2. 2. Metodai

### Serijinių praskiedimų metodas

Mikrobiologiniais metodais buvo įvertintas probiotinių mikroorganizmų gyvybingumas. Bakterijų auginimui buvo taikytas serijinių praskiedimų metodas, bakterines kultūras po 0,1 ml išsėjant į Petri lėkšteles ant agarizuotos MRS terpės, ir iki 72 valandų auginant mikroaerofilinėmis sąlygomis, 37°C temperatūroje. Remiantis ISO 15214:1998 standartu, probiotikų kultūros auginamos ant specifinių terpių anaerobinėmis sąlygomis 37°C temperatūroje, Nacionalinėje visuomenės sveikatos tyrimų laboratorijoje.

Mikroorganizmų ląstelių skaičius 1 g substrato apskaičiuojamas pagal formulę:

$$\text{KFV} = (\text{avid.} * 10^n) * b / v$$

KFV – kolonijas formuojantys vienetai ( angl. CFU)

a – kolonijų skaičiaus vidurkis visose tirtose lėkštelėse

10<sup>n</sup> – praskiedimų skaičius

v – sulašintos į lėkšteles suspensijos tūris

b – koeficientas suspensijos tūriui apskaičiuoti viename cm<sup>3</sup>, jei buvo sėjama mažiau nei 1 cm<sup>3</sup>

### Probiotinių kultūrų atsparumo skrandžio rūgščiai tyrimas

Tyrimas buvo atliekamas pasigaminant 1M HCl koncentracijos tirpalą. Į kolbutes su 1M HCl tirpalu dedami probiotikai (100ml/1g.): Bifoval, Linex, Enterol, Bifolac, Lactoseven, Yogurt. Po 2 val. 20 ml bakterijų suspensijos perkeliama į skystą MRS terpę. Bakterijų kultūros buvo auginamos 24 val., 37°C temperatūroje.

### Bakterijų atsparumo antibiotikams vertinimas

Jautrumas antibiotikams buvo nustatomas Petri lėkštelėse BBL™ Crystal™ metodu. Probiotikų atsparumo antibiotikams tyrimų metu atlikta antibiograma, remiantis NEO – SENSITAB jautrumo antibiotikams tyrimų vadovu (1998). Tyrime naudoti šie probiotikai: Linex, Bifoval, Bifolac, Lactoseven, Yogurt ir Enterol. Rezultatų patvirtinimui papildomai buvo vertinamas bakterijų augimas terpėse su dažniausiai šiuo metu terapiniams tikslams vartojamais antibiotikais: vankomicinas, lekoklaras, gentamicinas, dalacinas, ksorimaksas, amoksiklavas. Antibiotikų dozė apskaičiuota remiantis minimalia veiklia terapine koncentracija, nurodyta informaciniuose lapuose. Nurodyta terapinė dozė skaičiuojama 70 kg žmogaus kūno masei (amoksiklavas – 0,8 mg, gentamicinas – 0,4 mg, lekoklaras – 0,4 mg, vankomicinas – 0,7 mg, dalacinas – 0,21 mg, ksorimaksas – 0,35 mg). Bakterijos MRS terpėje buvo inkubuojamos 37°C temperatūroje 24 val. mikroaerofilinėse sąlygose. Mėginiai buvo imami kas 2 val. ir matuojamas optinis tankis esant 590nm šviesos bangos ilgiui

### Probiotikų įtakos *Candida* rūšių augimui nustatymas

Tirti probiotiniai preparatai: Linex, Bifolac, Bifoval, Lactoseven, Yogurt ir Enterol. Tyrimui buvo naudojamos *Candida* genties 4 rūšys: *C. albicans*, *R. mulciligalinos*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, auginamos mėgintuvėliuose, Sabūro dekstrozės terpėje. Vėliau 2 ml *Candida* rūšių suspensijos perkeliama į kolbutes, dedami probiotikai (100ml/1g.) ir auginama skystoje Sabūro dekstrozės terpėje 37°C temperatūroje 36 val. Rezultatai fiksuoti kas 2 val. OT matuotas 590 bangų ilgyje. Rezultatų patvirtinimui papildomai buvo atliekamas analogiškas tyrimas. Naudojamos buvo 2 *Candida* rūšys: *C. mulciligalinos* ir *C. albicans*, bei probiotikai: Lactoseven, Bifoval ir Linex. Į kolbutes su skysta Sabūro terpe ir chloramfenikoliu 98%, perkeliama 2 ml *Candida* rūšių suspensija. P Probiotiniai preparatai ir kas 4 val. suspensija po 0,1 ml išsėjama Petri lėkštelėse. Auginamos kultūros 37°C temperatūroje, 36 val. ir skaičiuojamas KSV.

### *Saccharomyces boulardii* identifikacijos analizė

Mielių kultūra (*S. boulardii*) buvo auginama Petri lėkštelėse ant YEPD terpės, 30 °C temperatūroje 2 dienas, po to vertinami morfologiniai kriterijai (kolonijų forma, spalva, profilis, kraštas, dydis). Taip pat mielės buvo auginamos skirtingų laipsnių temperatūrose (25°C, 30 °C,



35 °C, 37 °C, 42 °C) 24 val. analizuojant jų augimą. Mielių kultūra sėjama į skystą tepę. Ji daroma iš 2% peptono ir mielių ekstrakto 1% tirpalo, į kurį pridedama 2% atitinkamo cukraus (gliukozės, laktozės, maltozės, sacharozės ir.t.t). nitritų, nitratų, šlapalo ar vitaminų. Terpės po 10 ml išpilstomos į mėgintuvėlius su stiklinėmis, tuščiavidurėmis plūdėmis. Į terpes pridedama 2 ml *S. boulardii* kultūros. Užsandarinti mėgintuvėliai laikomi 2 – 5 paras, 30 - 37°C temperatūroje ir per tą laiką stebimas dujų išsiskyrimas. *S. boulardii* identifikacijos analizė atliekama remiantis mielių raktais pagal Meyen ex Hansen (1937).

### 3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

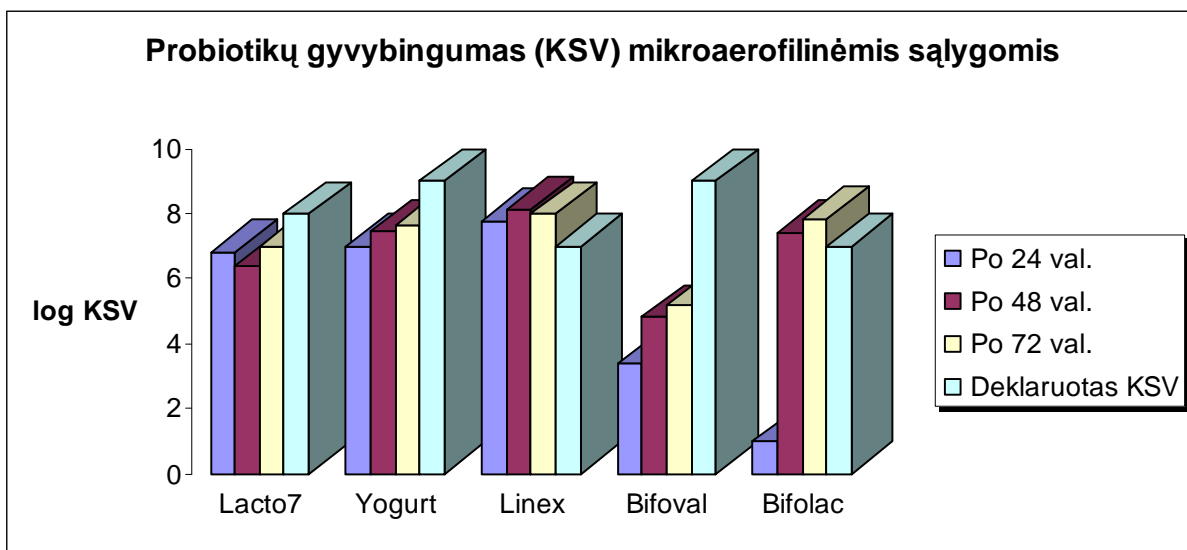
#### 3.1. Probiotikų bakterijų gyvybingumo palyginimas

Probiotikai turi ilgalaikio vartojimo tradicijas ir didžiąja dalimi jų vartojimas yra saugus. Tačiau yra duomenų apie galimas infekcijas, kurios siejamos su bakteremijų ir fungemijų rizika vartojant probiotikus. Medicininėje literatūroje minimi endokarditų, kepenų abscesų atvejai, kuriuos sukėlė probiotinė *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Saccharomyces boulardii* fungemijų atvejai, *Bacillus spp.* bakteremijų ir septicemijų atvejai (Boyle ir kt., 2006).

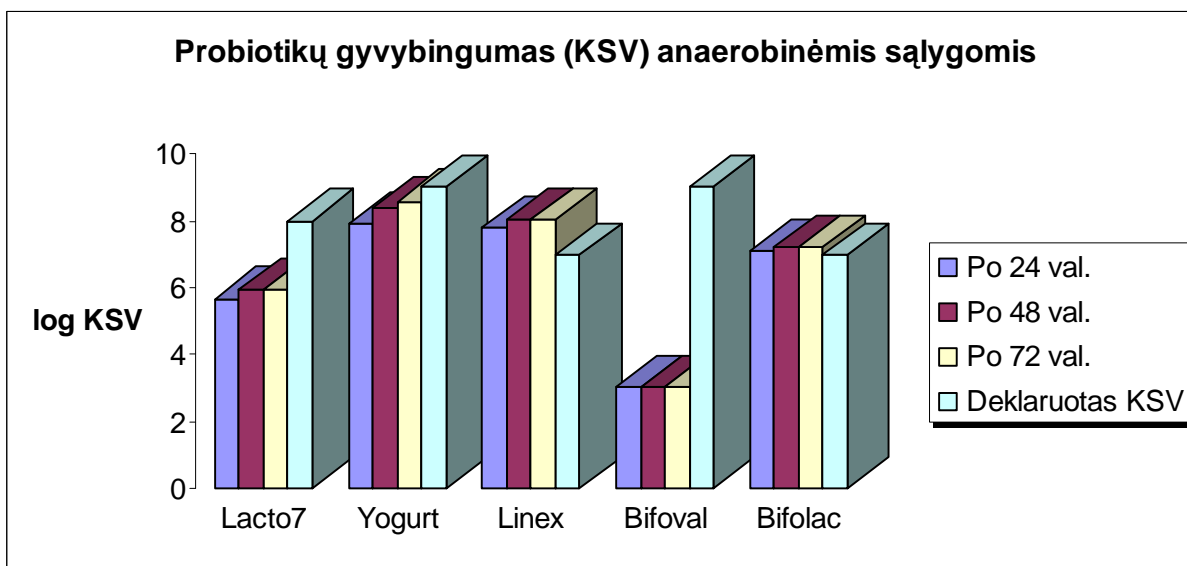
Reikalavimuose keliamuose probiotikams nurodoma, kad išskirtos rūšys turi būti giminingos šeimininko virškinamojo trakto mikroflorai, gebėti kolonizuoti tam tikras žmogaus kūno ertmes, būti nepatogeniškais žmogui, būti atspariais rūgštims bei tulžiai, gebėti daugintis organizme ir atstatyti žmogaus normaliąją mikrobiotą, gebėti aktyvinti žmogaus imuninę sistemą, turėti žmogaus organizmui naudingą fermentinį aktyvumą, gebėti išlaikyti gyvybingumą ir stabilumą technologinių procesų metu. Probiotikuose mikroorganizmų kultūros privalo išlikti gyvybingos kuo ilgesnį laiką, būti atsparios skrandžio rūgštims, tulžiai, turi būti jautrios antibiotikams. Probiotikų kokybė keičiasi priklausomai nuo gamybos, transportavimo, saugojimo sąlygų. Populiarėjant probiotikų vartojimui medicinoje ir veterinarijoje, didėja ir jų prekybos apimtys. Dažniausiai probiotikai teikiami į rinką ne kaip vaistai, bet kaip maisto papildai, todėl iš gamintojų/tiekėjų dažniausiai nereikalaujama griežtos kokybės ir efektyvumo kontrolės. (Gregor ir kt., 2003).

Karšties pramoniniu būdu formuojant probiotikų kapsules ir tabletes, ilgalaikis arba netinkamas produkto saugojimas gali sumažinti gyvybingumą. Todėl labai svarbu įvertinti parduodamų probiotikų gyvybingumą ir jų gebėjimą vystytis įprastomis mikroorganizmams sąlygomis. Apie minimalų probiotikų gyvybingų ląstelių skaičių preparatų galiojimo terminų pabaigoje, paprastai, nurodoma informaciniuose lapeliuose.

Tyrimams atsitiktinai parinkti dažniau perkami probiotikai, įsigyti keliose Vilniaus vaistinėse: ENTROL, LINEX, BIFOVAL, BIFOLAC, YOGURT, LACTOSEVEN. Tirta ar realus bakterijų kolonijas sudarančių ląstelių skaičius atitinka deklaruojamą informaciniame lapelyje. Tyrimai buvo atliekami remiantis ISO 15214:1998 standartu, probiotikų kultūras auginant ant MRS terpių, anaerobinėmis ir mikroaerofilinėmis sąlygomis, 37°C temperatūroje. Tyrimų rezultatai pateikti 1, 2, 3 paveiksluose.



1 pav. Probiotinių bakterijų gyvybingumo palyginimas mikroaerofilinėmis sąlygomis

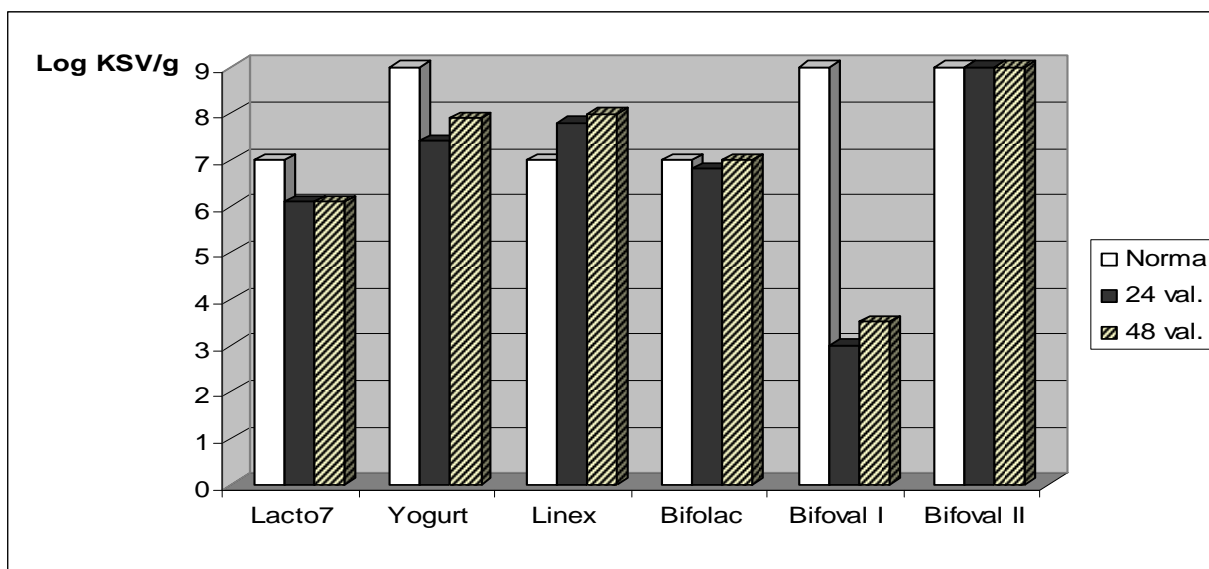


2 pav. Probiotinių bakterijų gyvybingumo palyginimas anaerobinėmis sąlygomis

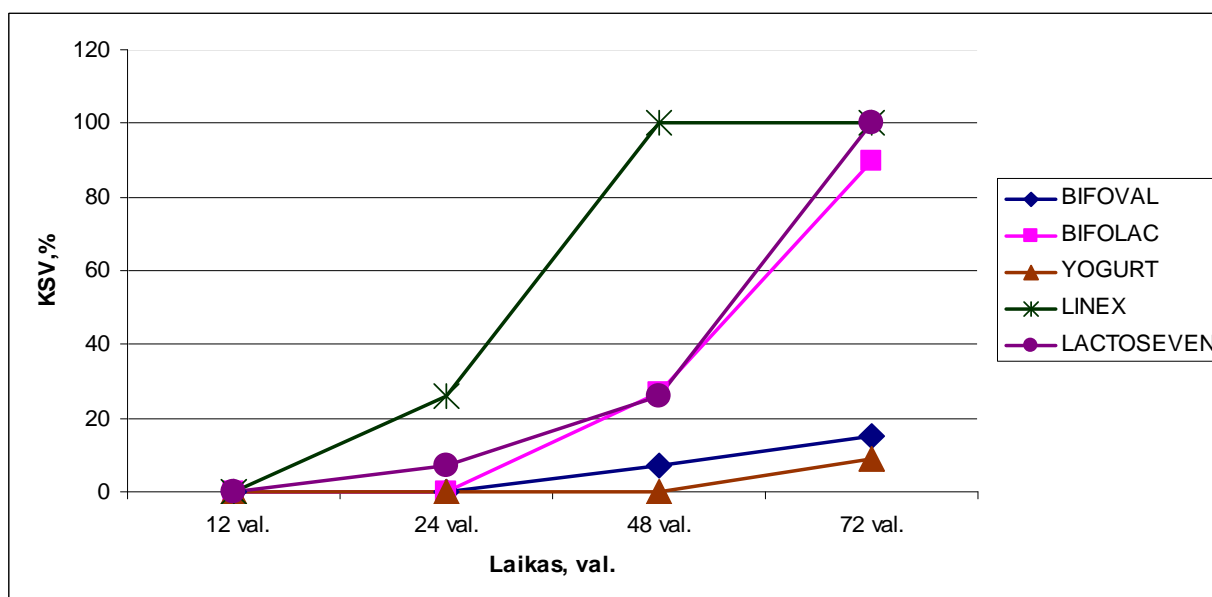
LACTOSEVEN, YOGURT gyvybingų mikroorganizmų skaičius (KSV) po 24val. buvo mažesnis 10-1000 kartų, priklausomai nuo preparatų realizacijos laiko, pardavimo vietos, mikroorganizmų rūšinio sąstato, tyrimų periodiškumo. BIFOLAC gyvybingų ląstelių skaičius po 24 val. kapsulėse siekė 95% deklaruojamo skaičiaus, LINEX -100 %.

BIFOVAL KSV svyravo tyrimų metu (3 pav.). Priklausomai nuo išigyto partijos, pirkimo vietos vienoje Bifoval (I) pakuotėse gyvybingų mikroorganizmų skaičius vos siekė  $10^3$ , kitose (II)

atitiko deklaruojamą skaičių  $10^9$  KSV. Akivaizdu, kad probiotikų gyvybingumas didžiaja dalimi priklauso nuo preparatų gaminimo, platinimo ir sandėliavimo sąlygų.



3 pav. Probiotikų gyvybingumo įvertinimas, skaičiuojant kolonijas sudarančius vienetus (KSV)/g.



4 pav. Probiotikų bakterijų augimo greitis anaerobinėmis sąlygomis, 37°C temperatūroje

ENTEROL, LEPICOL ir VEGA ACIDOPHILUS-BIFIDUS komplekso informaciniuose lapuose trūko duomenų, reikalingų probiotikų kokybei įvertinti, tad nebuvo prasmės jų tirti.

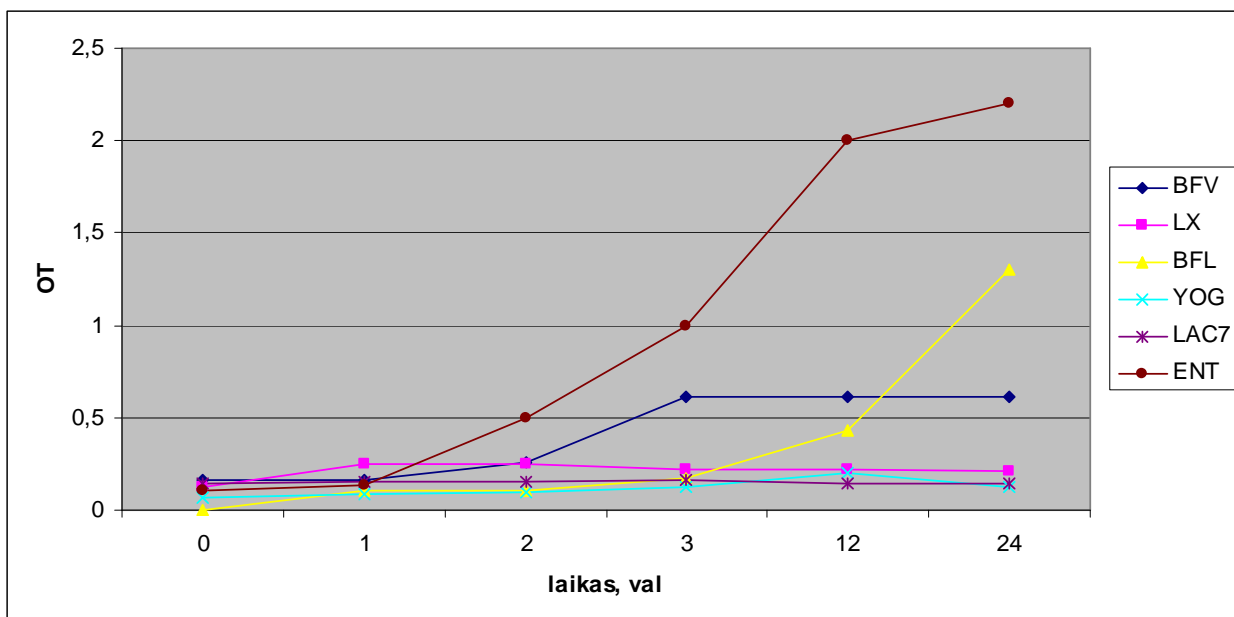
Įprastas ir visuotinai priimtas ląstelių skaičius probiotike turėtų būti ne mažesnis  $5 \times 10^7$  –  $1 \times 10^8$  gyvybingų ląstelių. Remiantis įvairiais šaltiniais maksimali dienos dozė turėtų svyruoti nuo  $10^7$ - $10^9$  KSV, vidutinė dozė –  $6 \times 10^8$  KSV (Guarner ir kt., 1998, Weese, 2002). Reikšmingas ląstelių kiekis neturėtų ženkliai viršyti minimalios terapinės dozės. Tyrimai parodė, kad tiek mikroaerofilinėmis, tiek ir anaerobinėmis sąlygomis probiotikų gyvybingų ląstelių skaičius gautas beveik vienodas ir svyravo 5-10% ribose.

Didžiausias augimo greitis nustatytas probiotike LINEX (4 pav.). Jau po 24 valandų KSV kiekis siekė 60% nurodyto apraše skaičiaus. Po 48 valandų gyvybingų ląstelių kiekis pasiekė apraše nurodytą skaičių ( $1.2 \times 10^7$  KSV). Mažesnis augimo greitis nustatytas probiotikų BIFOLAC ir LACTOSEVEN mikroorganizmams, tačiau po 3 parų KSV kiekis atitiko apraše nurodytus skaičius. Silpnai augo probiotikų ENTEROL ir YOGURT kultūros.

### 3. 2. Skrandžio rūgšties poveikis probiotikams

Probiotikų reikalavimuose nurodoma, kad bakterijos privalo būti atsparios skrandžio rūgštims ir tulžiai (Gregor, 2003), kitaip žarnyną pasiektų negyvybingos ląstelės ir nesuteiktų teigiamo poveikio sveikatai.

Tyrimas buvo atliktas su šešiais pobiotiniais preparatais, įvertinant jų atsparumą skrandžio rūgštims.



5 pav. Bakterijų atsparumo 1M HCL palyginimas

Paprastai, skrandyje probiotikai išlieka iki 2 valandų. Per tą laiką dalis probiotinių kultūrų žūsta. Todėl svarbu, kad skrandyje biopreparatai išliktų gyvybingi kuo ilgesnį laiką. Rezultatai parodė, kad labiausiai atsparumu pasižymėjo Bifolac probiotinis preparatas, kurio kapsulių apvalkalas, kaip nurodoma informaciniame lapelyje, išlieka neirus skrandyje daugiau kaip 2 val. Bifolac kapsulės tikrai nesuiro 2 val. Vėliau, kapsules perkėlus į terpę, kurios pH buvo 6 pradėjo tirpti. Taigi, pasitvirtino informacinio lapelio teiginys, kad kapsulės yra neirios. Taip pat neblogo atsparumu pasižymėjo Enterol preparatas, kapsulės ištirpo maždaug per 1,5 val., kitų probiotikų kapsulės pradėdavo irti po 30 min. Neirūs kapsulių apvalkalai apsaugojo Enterol ir Bifolac mikroorganizmus nuo druskos rūgšties poveikio. Deja, jautriausi rūgšties poveikiui pasirodė Linex, Bifoval, Yogurt ir Lactoseven probiotikai. Probiotikų gyvybingumas ir atsparumas aplinkos veiksniams, tokiems kaip skrandžio sultys ir tulžis, labai priklauso nuo probiotikų mikroorganizmų rūšinio sąstato. Jautriausiai į aplinką reaguoja *Bifidobacterium* ir *Lactobacillus* genčių bakterijos, mažiau *Bacillus* (Saarela ir kt., 2000).

### 3. 3. Priobiotikų atsparumas antibiotikams

Tiriant probiotinius preparatus susiduriama su tam tikromis kokybės problemomis, viena iš jų - probiotinių kultūrų atsparumas antibiotikams. Molekuliniiais metodais ištyrus 55 Europoje dažniausiai vartojamus probiotikus, nustatyta, kad net 187 mikroorganizmų padermės, išskirtos iš šių probiotikų, pasirodė atsparios antibiotikams: kanamicinui (79% padermės), vankomicinui (65%), tetraciklinui (26%), penicilinui G (23%), eritromicinui (16%), chloramfenikoliui (11%) (Intern. J. Food. Microbiol. , 2003, 81 (1): 1-10).

Labai svarbu, kad bakterijos būtų jautrios antibiotikams, kitaip jos gali pernešti atsparumo geną patogeninėms bakterijoms (Courvalin, 2007). Mes tyrėme LINEX, LACTOSEVEN, BIFOLAC, BIFOVAL, YOGURT probiotikų jautrumą. Sudaryta antibiograma parodė (1 lentelė), kad visi probiotikai pasirodė atsparūs tam tikriems antibiotikams: Linex, Bifoval (kiprofloksacinui, ampicilinui, sulphonamidui), Lactoseven (sulphonamidui, vankomicinui, gentamicinui, klindamicinui, metchicilinui), Yogurt (ampicilinui, sulphonamidui, gentamicinui), Bifolac (ampicilinui, klindamicinui).

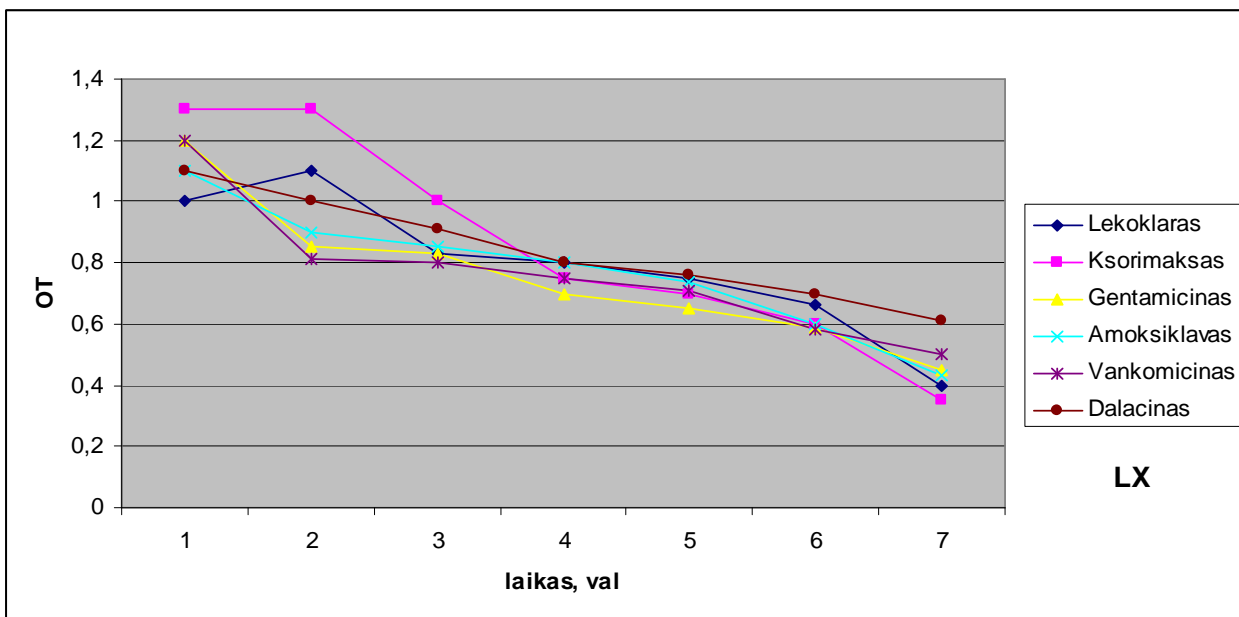
Šiuo metu antibiogramose naudojami antibiotikai beveik nėra vartojami ligonių gydymui, todėl probiotikų atsparumas vieniems ar kitiems pirmos-antros kartos antibiotikams nėra svarbus probiotikų kokybės rodiklis. Todėl antibiogramose naudoti antibiotikai buvo pakeisti naujos

kartos, dažniausiai klinikinėje praktikoje naudojamais antibiotikais: amoksiklavu, gentamicinu, lekoklaru, vankomicinu, dalacinu ir ksorimaksu.

1 lentelė. Antibiograma

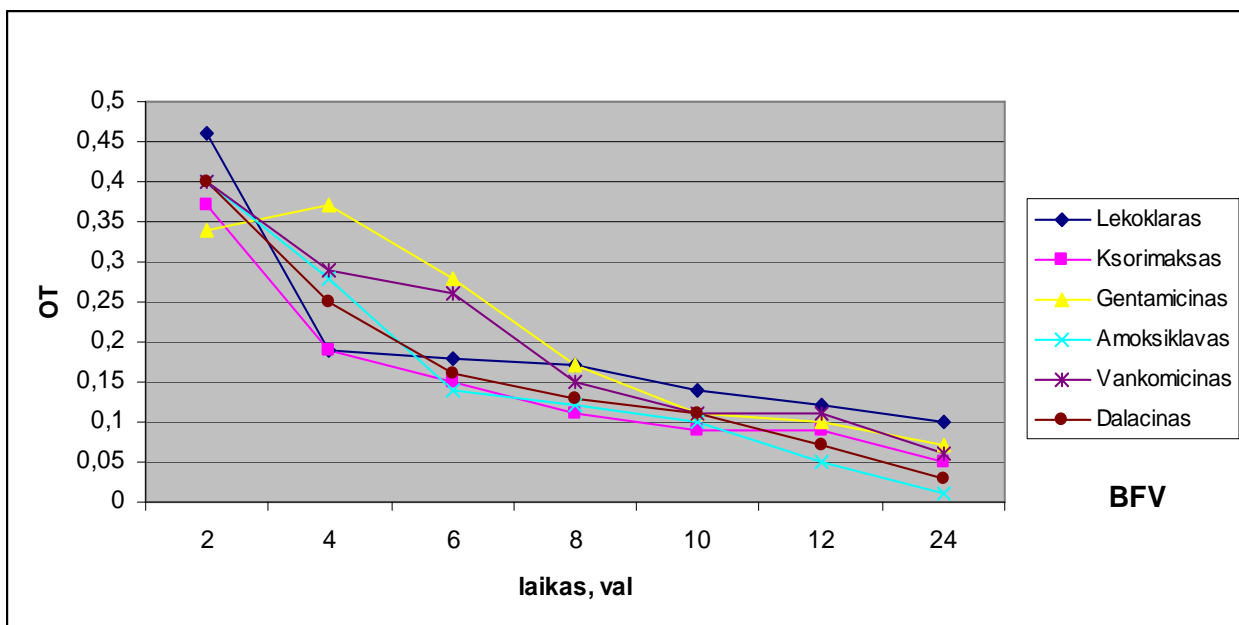
Antibiotikas	PROBIOTIKAI				
	LINEX	BIFOVAL	BIFOLAC	LACTOSEVEN	YOGURT
1.Tetraciklinas 80µg	S 30	S 30	S 30	I 26	S 28
2. Methicilinas	S 35	S 30	S 28	R 5	S 28
3.Klindamicinas 25 µg	I 23	S 28-30	R 5-10	R 5	S 30
4.Kiprofloksacinas 10 µg	R 5	R10	S 26	S 26	S 30
5. Ampicilinas 33 µg	R 5	R 5	R 5	S 30	R12
6.Sulphonamidas	R 5	R 5-12	S 30	R 20	R 15-20
7. Vancomicinas 70 µg	S 35	S 28	S 17	R 5	S 35
8. Gentamicinas 40 µg	S 30	S 22	R 5	R 5	R 12-14

R – atparus, S – jautrus, I – maišytas



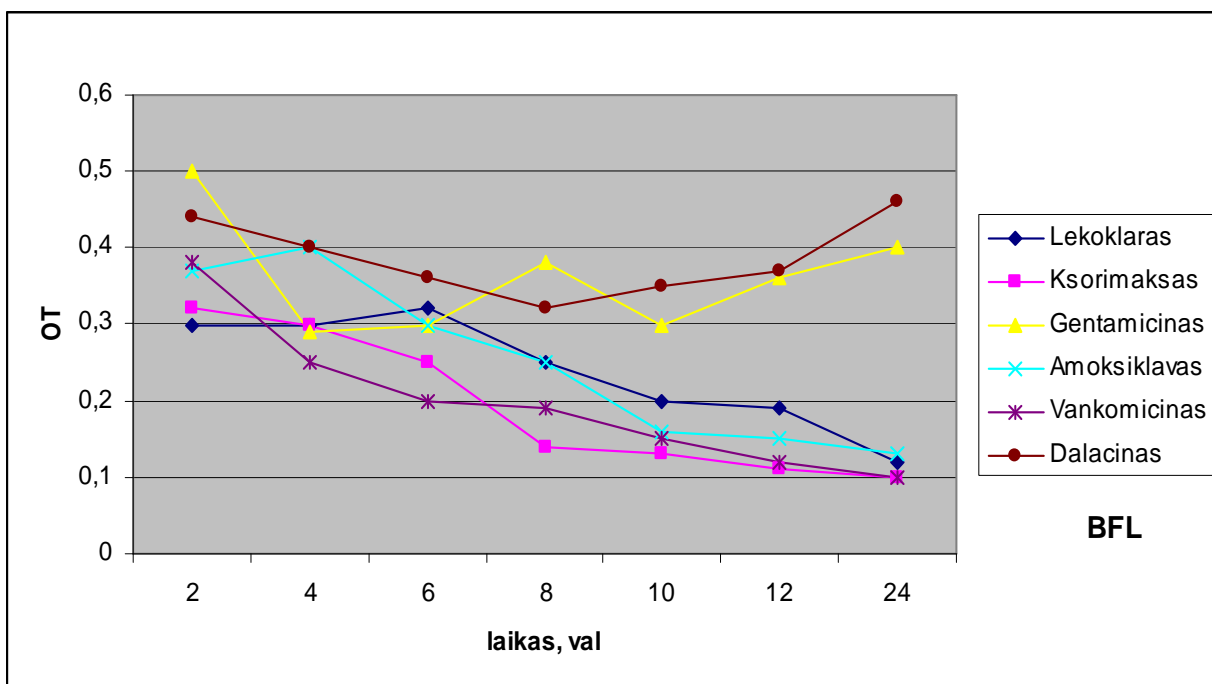
6 pav. Probiotiko LINEX augimas terpėse su įvairiais antibiotikais

Vertinant probiotikų jautrumą antibiotikams, Linex ir Bifoval buvo jautrūs visiems tirtiems antibiotikams (klaritromicinui, kefuroksinui, gentamicinui, amoksiklavui, vankomicinui, klindamicinui).

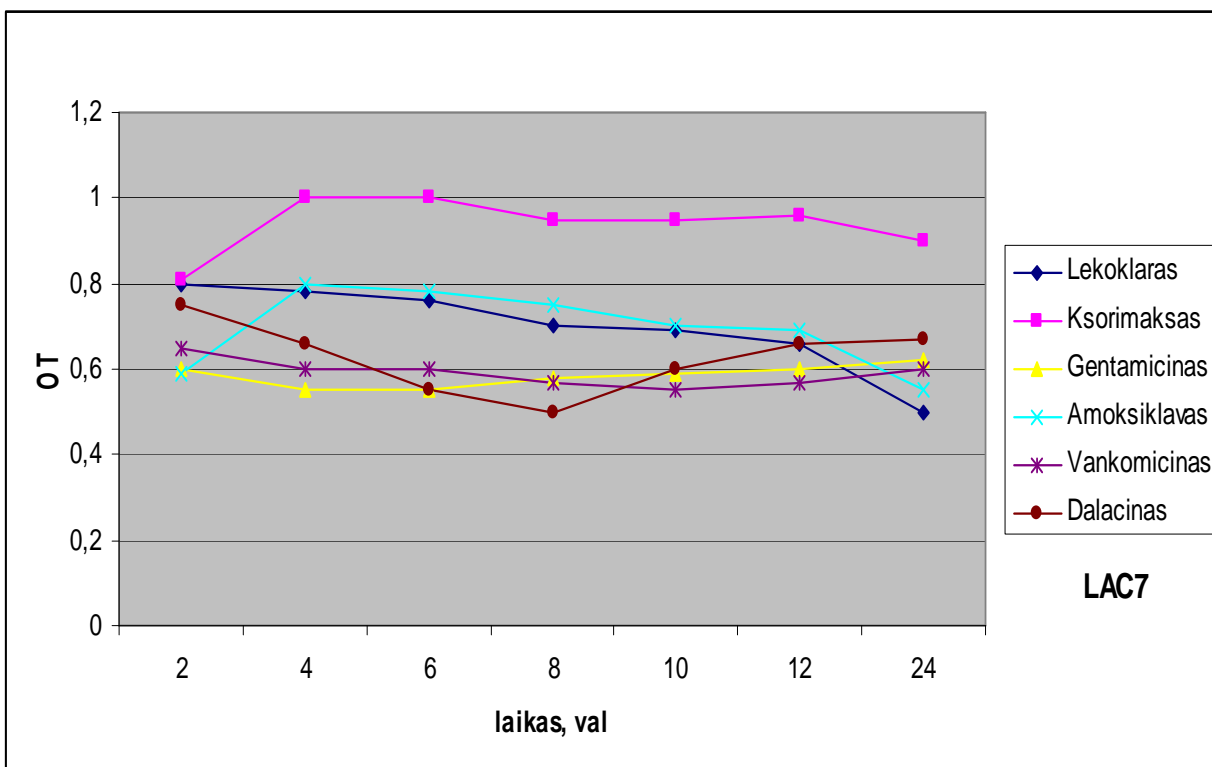


7 pav. Probiotiko BIFOVAL augimas terpėse su įvairiais antibiotikais

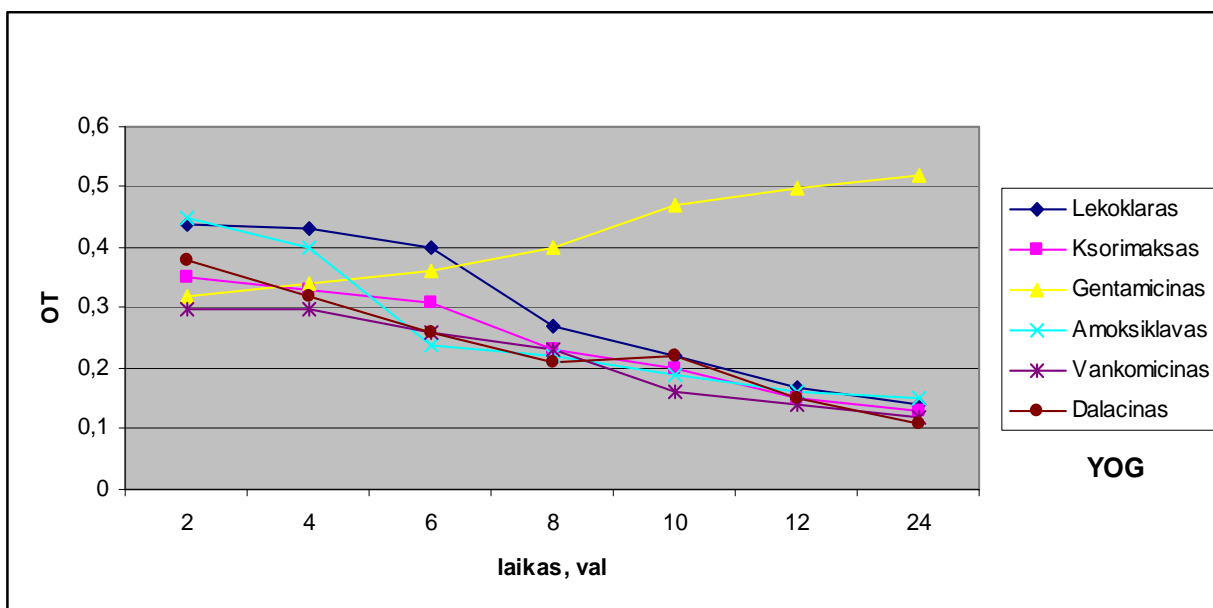




8 pav. Probiotiko BIFOLAC augimas terpėse su įvairiais antibiotikais



9 pav. Probiotiko LACTOSEVEN augimas įvairiose terpėse su antibiotikais

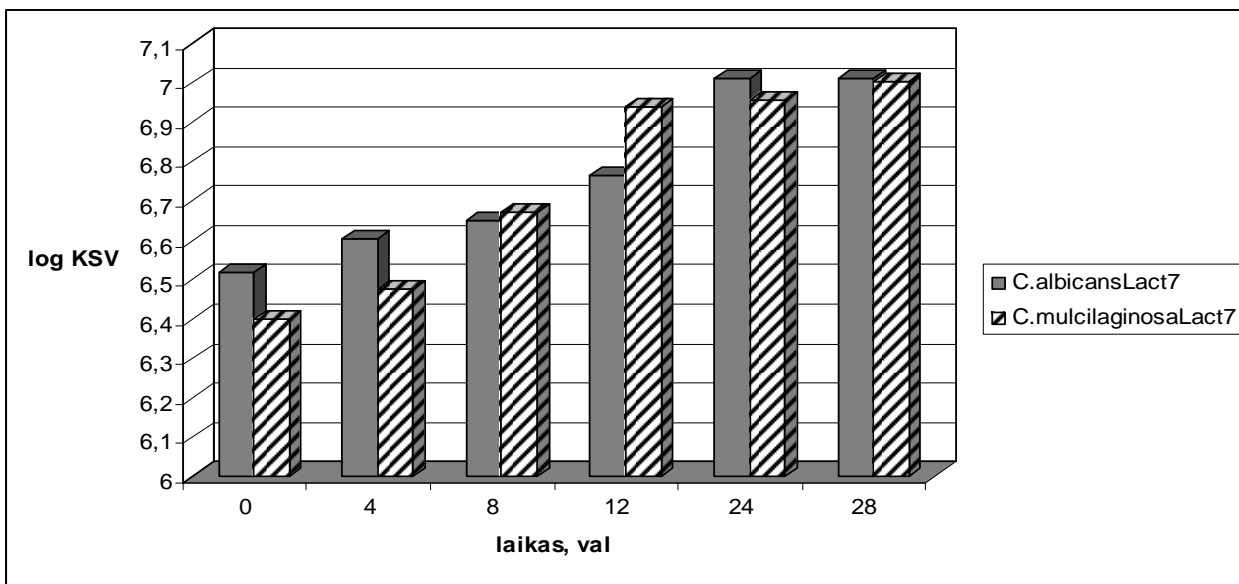


10. Probiotiko YOGURT augimas įvairiose terpėse su antibiotikais

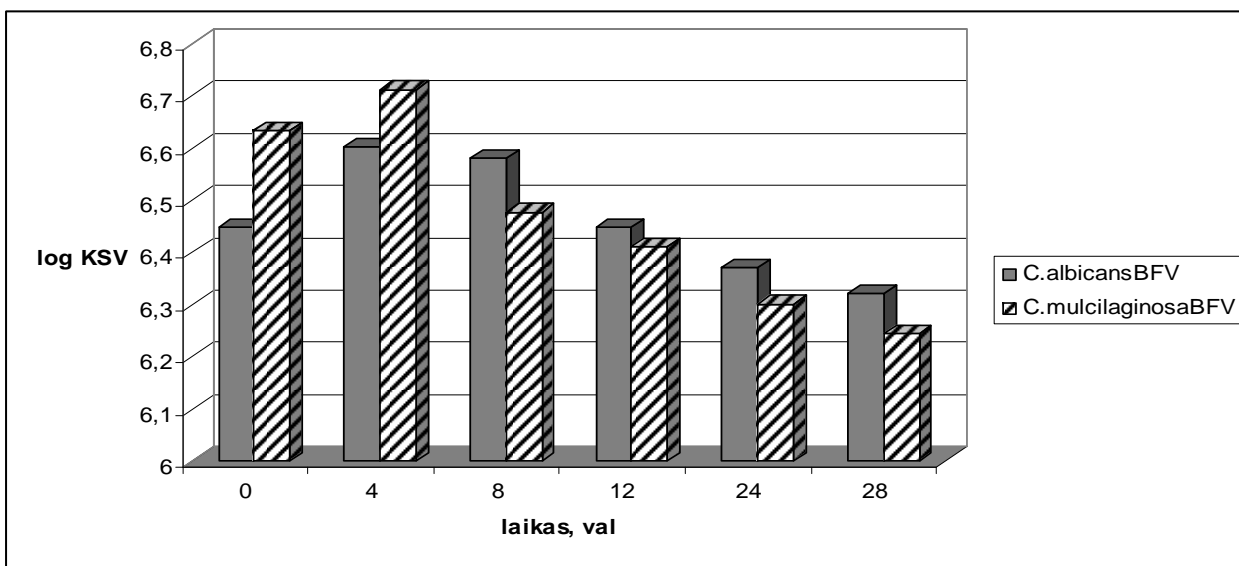
Yogurt probiotiko bakterijos buvo atsparios gentamicinui, Bifolac – klindomicinui ir gentamicinui. Lactoseven preparato mikroorganizmai atsparūs – gentamicinui ir cefuroksinui. Iš penkių tirtų probiotikų, daugiau nei pusė jų buvo atsparūs gentamicinui.

### 3. 4. Probiotinių kultūrų įtaka *Candida* augimui

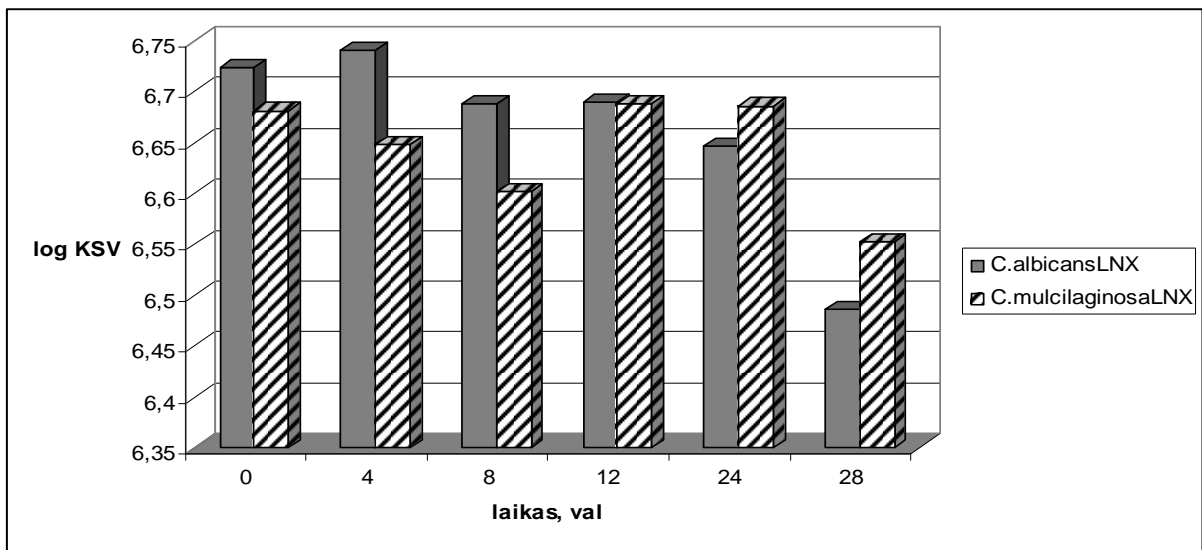
Yra žinoma, kad probiotikų vartojimas padeda atstatyti natūralią mikroflorą sergant bakterine vaginoze ar kandidamikoze (Elmer ir kt., 1996). Tiriamos moteris su nuolat besikartojančiu *Candida* sukeltu vaginitu, paaiškėjo, kad vartojant metus jogurtą, tris kartus sumažėjo makšties infekcijų skaičius (Shalev ir kt., 1996). Todėl labai svarbu įvertinti probiotinių kultūrų įtaką *Candida* rūšių augimui, kad būtų galima patvirtinti šiuos minėtus teiginius. Tyrimams naudoti probiotikai (LINEX, BIFOVAL, BIFOLAC, YOGURT, LACTOSEVEN ir ENTEROL) ir 4 *Candida* rūšys (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. mulcilaginos*). Gauti rezultatai rodo (1priedas), kad probiotiniai mikroorganizmai nemažina *Candida* rūšių augimo, tarp 24 – 28 val. tiek probiotikų, tiek *Candida* augimas sparčiai pradeda didėti. Tam įtakos galėjo turėti kitų mikroorganizmų augimo suintensyvėjimas. Vienintelio probiotiko LACTOSEVEN su *C. tropicalis* augimo kreivė pasižymi silpnesniu augimu.



11 pav. Probiotiko LACTOSEVEN įtaka *Candida* rūšių augimui



12 pav. Probiotiko BIFOVAL įtaka *Candida* rūšių augimui



13 pav. Probiotiko LINEX įtaka *Candida* rūšių augimui

Pakartotinas tyrimas buvo atliekamas su probiotikais (LACTOSEVEN, LINEX IR BIFOVAL), bei *Candida* 2 rūšimis (*C. albicans* ir *C. mulciliginoso*). Augimas buvo stebimas kas 4 val., 8 val., 12 val., 24 val. ir 28 val., pagal tai, kuriuo laiku, prieš tai atliktame tyrime augimas užfiksuotas intensyviausias.

Rezultatai rodo, kad LINEX ir BIFOVAL probiotikai turi įtakos *C. albicans* ir *C. mulciliginoso* rūšių augimui, tad galime teigti, jog šie preparatai turėtų slopinti *Candida* sukeliamas infekcijas. LACTOSEVEN probiotikas skatina *Candida* rūšių augimą. Viso tyrimo metu užfiksuotas laipsniškas abiejų kultūrų didėjimas.

### 3. 5. *Saccharomyces boulardii* rūšies identifikacija

Šiandien egzistuoja daugybė mokslinių publikacijų, kuriose nurodoma, kad žmonėms ir gyvūnams skirtuose probiotikuose esantis mikroorganizmų rūšių sąstatas ir kiekis dažnai neatitinka duomenų nurodytų informaciniuose lapuose. Įvairiuose šaltiniuose nurodoma, kad probiotikų rūšinis sąstatas gali nesutapti su nurodytu nuo 20-40% ir daugiau (Weese, 2002). Kanadoje patikrinus 44 žmonėms ir veterinariniam skirtus probiotikus nustatyta, kad neteisingai identifiкуotos bakterijų kultūros 9/21 (43%) žmonėms skirtuose probiotikuose ir 8/23 (35%) veterinariniam skirtuose probiotikuose. Klaidingai užrašytos rūšys 5/20 (25%) žmonių probiotikuose ir 3/17 (18%) veterinariniuose probiotikuose; *Streptococcus faecium* apibūdintas kaip *Enterococcus faecium*, pateikta neegzistuojanti rūšis *Lactospore sporogenes*, *Bacillus*

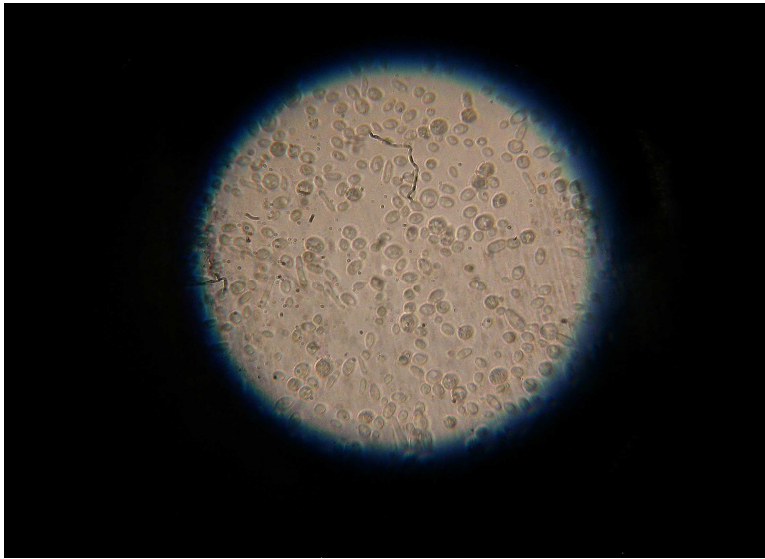
*coagulans* neteisingai identifikuojama kaip *Lactobacillus sporogenes* (Weese, 2003). Čekijoje ištyrus fermentuotus produktus (Activia, Holandia, Rajo, kefyra) visos *Bifidobacterium* bakterijos buvo gyvulinės kilmės. (Klingauf., 2004).

Daugelyje įvairių straipsnių susiduriame ne tik su *Saccharomyces boulardii* rūšies identifikacijos neatitikimais, bet ir su informacijos stoka lapelyje, nes nėra nurodoma koks turėtų būti gyvybingų ląstelių skaičius, taip pat kas tai per preparatas ir nuo ko jis vartojimas. Kaip teigia daugelis autorių, *Saccharomyces boulardii* įeinanti į probiotiko Enterol sudėtį, yra nepatogeninė mielė, plačiai naudojama liofilizuota forma daugelyje pasaulio šalių (Buts, 2008). Pirmą kartą išskirta iš tropinių vaisių odelės Indokinijoje, vietiniai žmonės tuos vaisius naudodavo viduriavimui gydyti. Plačiai naudojama 7 rūšių viduriavimui gydyti visoje Europoje, ypatingai gydant lėtinį ir pasikartojamą viduriavimą. Tačiau yra keletas pranešimų apie *S. boulardii* sukėlimas fungemijas ir septicemijas Tyrinėjama pagal biokodeksą Jungtinėse Amerikos valstijose ir pagal patentuotas padermes. (McCullough, 1998).

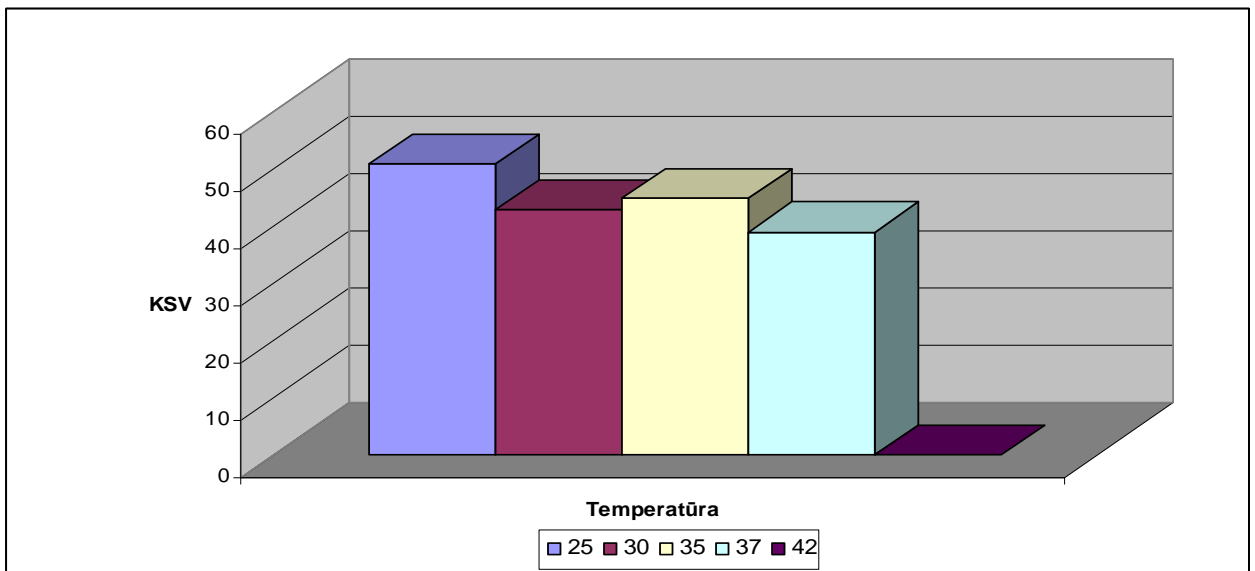
Šiuo metu atliktais molekuliniais tyrimais tiksliai nustatyta, kad *S. boulardii* yra kepimo rūšies mielė *S. cerevisiae*. Tiriant *S. boulardii* rūšies identifikaciją morfologiniais ir fiziologiniais aspektais, jų parametrai sutapo su *S. cerevisiae*. Rūšies identifikacija atlikta remiantis 26S rDNR geno D1/D2 domeno seka, kuri buvo identiška visose *S. boulardii* padermėse ir 100% atitiko *S. cerevisiae* CBS 1171<sup>T</sup> ir S288c padermių sekas. Visuose *S. boulardii* izoliatuose buvo randama tokia pati ITS1-5.8S rDNR-ITS2 seka, kuri labai sutapo su *S. cerevisiae* padermių S288c(99,9%) ir CBS 1171<sup>T</sup> (99,3%) sekomis. COX2 II geno mitochondrinio citochromo sekos analizė buvo identiška *S. boulardii* izoliatams ir palyginus su turimo nukleotido seka, atitiko S288c (99,5%) ir CBS 1171<sup>T</sup> (96,6%) atmainų sekas. Elektroforezė kariatipų *S. boulardii* sutapo su *S. cerevisiae*, jie sudarė nuo padermių atskirus klasterius (Kühle ir kt., 2003). Taip pat trys *S. boulardii* padermės buvo komerciškai gautos Italijoje ir Pranzūzijoje ir molekuliniais tyrimais nustatyta, kad *S. boulardii* padermės turėjo identišką struktūrą ir buvo panašios į *S. cerevisiae*. Mielių rūšies nustatymui naudojama 5.8S-ITS regiono karpų fragmentų ilgio polimorfizmas (RFLP), rezultatai parodė, kad *S. boulardii* izoliatai nesiskyrė nuo *S. cerevisiae* izoliatų (McCullough, 1998)

Fiziologiniais ir biocheminiais tyrimais buvo atlikta *S. boulardii* identifikacijos analizė. Įvertinus *Saccharomyces boulardii* morfologiją, kolonijos gautos apvalios formos, baltai kreminės spalvos, plokščio iškilumo, lygaus paviršiaus, blizgios. Mikroskopiškai - ovalios formos lašeliai (12 pav.).

Mielių fermentacija, šlapalo hidrolizė, nitritų, nitratų redukcija buvo vertinama, remiantis mielių identifikacijos raktais pagal Meyen ex Hansen (1937).



14 pav. *Saccharomyces boulardii* kolonijos



15 pav. *Saccharomyces boulardii* augimas skirtingose temperatūrose

Mielės buvo auginamos skirtingų laipsnių temperatūrose (25°C, 30 °C, 35 °C, 37 °C, 42 °C) 24 val. analizuojant jų augimą. *S. boulardii* geriausiai auga prie 25 °C, tačiau neblogai ir prie 30 °C, 35 °C, 37 °C, visiškai neauga prie 42 °C. Žinome, kad optimali temperatūra *S. cerevisiae* yra 28 °C.

2 lentelė. *S. boulardii* identifikacijos vertinimas

	Vertinimo kriterijai mielėms	Gauti rezultatai
Maltozė	+	+
Laktozė	–	–
D - gliukozė	+	+
D - galaktozė	+, -	–
Cellobiozė	–	+
Raffinozė	+, -	+
DL sacharozė	+, -	+
D(+) - ksilozė	–	–
L – rhamnozė	–	–
Natrio nitratas	–	–
L - arabinozė	–	–
Krakmolas	+, -	+
Šlapalas	–	–
Natrio citratas	–	+
Kalio nitritas	–	+
Vitaminų tirpalas	+, -	–

Tyrimų rezultatai parodė, kad *S. boulardii* fermentuoja celobiozę, taip pat redukuoja kalio nitritus, bei teigiamas rezultatas gautas su natrio citratu, pagal šiuos duomenis *S. boulardii* nepasižymi panašumu į *S. cerevisiae*. Kaip žinome kepimo mielės celobiozės nefermentuoja, o *S. boulardii* identifikacijos metu gautas teigiamas rezultatas. Remiantis mielių identifikacijos raktais pagal Meyen ex Hansen (1937) galima būtų preliminariai teigti, kad *S. boulardii* priskiriama *Brettanomyces* genčiai, tačiau reikalingi išsamūs tyrimai molekuliniam lygmenyje, kad būtų patvirtinta tiksli *S. boulardi* rūšies identifikacija. Pagal visus kitus rezultatus *S. boulardii* kaip ir atitiktų kepimo mielės rūšinį sąstatą.

## Išvados

- Probiotinių kultūrų gyvybingumo tyrimai parodė, kad gyvybingų ląstelių skaičius (KSV), nurodytas apraše, patvirtintas tik Linex ir Bifolac probiotikuose. Anaerobinėmis ir aerofilinėmis sąlygomis atlikti tyrimai beveik nesiskiria, nepriklausomai nuo probiotikų partijos, įsigyjimo vietos ir realizacijos laiko. Geriausias probiotinių kultūrų greitis nustatytas probiotiko Linex
- Enterol sudėtyje nurodyta tik *Saccharomyces boulardii* kultūros biomasė, todėl realus, kolonijas sudarančių vienetų skaičius (KSV) negali būti patvirtintas standartiniais metodais. Atliekant fiziologinius ir biocheminius tyrimus, nustatyta, kas *Saccharomyces boulardii* nėra ta pati *Saccharomyces cerevisiae* rūšis, kad būtų tiksliai nustatyta *Saccharomyces boulardii* rūšies identifikacija reikalingi išsamūs tyrimai molekuliniam lygmenyje
- Rezultatai parodė, kad iš 6 tirtų probiotinių preparatų atsparumu skrandžio rūgščiai labiausiai pasižymėjo tik Bifolac ir Enterol probiotikai
- Vertinant probiotikų atsparumą antibiotikams nustatyta, kad iš tirtų 5 probiotikų, daugiau nei pusė pasižymėjo atsparumu gentamicinui, o Linex ir Bifoal probiotiniai preparatai buvo jautrūs visiems tirtiems antibiotikams
- Vertinant probiotikų įtaką *Candida* rūšių augimui nustatyta, kad preparatai Linex ir Bifoal slopina *Candida* rūšių augimą. Visiškai *Candida* augimo neįtakojo Lactoseven, Bifolac, Yogurt ir Enterol probiotiniai preparatai.
- Probiotikų informaciniuose lapuose turėtų būti iki rūšies nurodyti mikroorganizmai ar jų mišinys, tikslus gyvybingų ląstelių skaičius ir laikas, per kurį šios ląstelės išlaikytų savo gyvybingumą nurodytą apraše



## PROBIOTIKŲ KOKYBĖS TYRIMAI

Probiotikai – tai gyvi, žmogaus organizmui giminingi ir naudingi mikroorganizmai, kuriuos vartojant adekvačiais kiekiais, pasireiškia teigiamas poveikis žmogaus sveikatai, pagerinamas virškinimas, sustiprinama imuninė sistema, atkuriamas mikroorganizmų pusiausvyra žarnyne. Populiarėjant probiotikų vartojimui medicinoje ir veterinarijoje, didėja ir jų prekybos apimtys, todėl šiandien probiotikų tyrimams visame pasaulyje teikiamas itin didelis dėmesys, jų gamybai, technologijai, skiriamos milžiniškos pinigų sumos, todėl labai svarbu, kad probiotikai atitiktų jiems keliamus reikalavimus.

Šiame darbe buvo tirti komercinių probiotikų (Linex, Bifolac, Bifoval, Yogurt, Lactoseven ir Enterol) kokybiniai ir kiekybiniai parametrai, nustatant bakterijų kultūrų atsparumą antibiotikams ir skrandžio rūgštims bei įvertinant probiotinių kultūrų įtaką *Candida* genties grybams. Tyrimo metu pagrindinės problemos buvo bakterijų gyvybingumo palaikymas, netiksli informacija aprašuose (rūšinio sąstato neatitikimai, klaidingai nurodomas bakterijų ląstelių skaičius arba jo visai nėra, neaiškios laikymo sąlygos). Tokie pažeidimai reikalauja griežtos kokybės kontrolės tiek gamyboje, tiek transportavimo ir pardavimo metu.

## Summary

### **PROBIOTICS QUALITY RESEARCHES**

Probiotics are alive, akin and useful for human organism microorganisms which, when used in adequate amounts, have a positive effect on human health. Furthermore, the digestion is improved, the immune system is strengthened, and the balance of microbes in the intestine is renewed when using probiotics. The consumption of probiotics in medicine and veterinary is becoming more and more popular so the size of its trade is also increasing. This is the reason why very big attention is given to researches of probiotics in our days. Huge sums of money are allocated to their production and technology so it is very important for probiotics to suit all requirements.

Qualitative and quantitative parameters of commercial probiotics (Linex, Bifolac, Bifoval, Yogurt, Lactoseven and Enterol), estimating the resistance of bacterial culture to antibiotics and gastric acids and evaluating the impact of probiotical cultures on *Candida* genus mushrooms, were examined. Major problems during the research were keeping bacteria alive and inaccurate information in literature, such as inadequacy of varietal, the number of bacteria cells was indicated wrongly or not indicated at all, vague conditions of keeping. Such violations demand strict quality control in production, transportation and sales.

## Literatūra:

1. Allen S., Okoko B., Martinez E., Gregorio G., Dans L. (2004). Probiotics for treating infectious diarrhoea. *Cochrane Database Syst Rev.* 2:CD003048.
2. Ardatskaia MD., Dubinin AV. (2001). Minushkin intestinal dysbacteriosis: current aspects of studying the problem, principles of diagnosis and treatment. *Ter Arkh.* 73(2): 67-72.
3. Aukštakalnierė A., Radžiūnas A. (2006) Disbakteriozė ir probiotikai. KMU Šeimos medicinos klinika, KMU Chirurgijos klinika. *Farmakoterapija.* 1:26 – 29.
4. Bang B.R., Chun E.P., et al. (2007) The role of the sensitized alveolar macrophage in T cell proliferation. *World Allergy Organization Journal.* s135.
5. Boyle R.J., Roy M., Browne R., and Mimi LK Tang. (2006). Probiotic use in clinical practice: what are the risks? *Am J Clin Nutr.* 83:1256–64.
6. Borriello S.P., Hammes W.P., Holzapfel W., Marteau P., Schrezenmeir J., Vaara M., and Valtonen V., (2003). Safety of probiotics that contain *Lactobacilli* or *Bifidobacteria*. *Clinical Infectious Diseases.* 36:775–780.
7. Castagliuolo I.M.F., Riegler L., Valenick L.J.T., and Pothoulakis C. (1999). *Saccharomyces boulardii* protease inhibits the effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in human colonic mucosa. *Infect. Immun.* 67:302-307.
8. Coeuret V., Gueguen M., and Vernoux J. P. (2004). Numbers and strains of lactobacilli in some probiotic products. *International Journal of Food Microbiology.* 2(25): 273.
9. Collins M. D. (1999). Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *Am. J Clin Nutr,* 69:052S-7S.
10. Corre C., Madec M.N., Boyaval P. (2007). Production of concentrated *Bifidobacterium bifidum*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology.* 53(2):189 – 194.
11. De Groote M.A., Frank D.N., Dowel E., et al. (2005). *Lactobacillus rhamnosus* GG bacteremia associated with probiotic use in a child with short gut syndrome. *Pediatr Infect Dis J.* 24:278 – 280.
12. Doron S., Gorbach SL. (2006). Probiotics: their role in the treatment and prevention of disease. *Expert Review of Anti-Infective Therapy.* 4(2):261–275.
13. Elmer GW., Christina M., McFarland LV. (1996). Biotherapeutic agents. A neglected modality for the treatment and prevention of selected intestinal and vaginal infections. *JAMA.* 275:870-6.

14. FAO/WHO Working Group. (2002). Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario, Canada. 138:1250S-1254S.
15. Fedorak R.N., Madsen K.L. (2004) Probiotics and prebiotics in gastrointestinal disorders // *Current. Opinion in Gastroenterology*. 20:146–155.
16. Gibson G.R., Roberfroid M.B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota – introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*. 125:1401–1412.
17. Gregor R., Jass J.M., Sebulsky T., John K. (2003). McCormick potential uses of probiotics in clinical practice. *Clinical Microbiology Reviews*. 16(4):658-672.
18. Guarner F., Schaafsma GJ. (1998). Probiotics. *Int J Food Microbiol*. 39:237–238.
19. Harish K., Harish K., and Varghese T., Varghese T. (2006). Probiotics in humans: evidence based review. *Calicut Medical Journal*. 4(4):3.
20. Hatakka K., Ahola A.J., Yli-Knuutila H., Richardson M., Poussa T., Meurman J.H., and Korpela R. (2007). Probiotics Reduce the Prevalence of Oral *Candida* in the Elderly - a Randomized Controlled Trial. *Journal of Dental Research*. 86(2):125-130.
21. Ishibashi N., Yaeshima T., and Hayasawa H. (1997). Bifidobacteria: their significance in human intestinal health. *Mal J Nutr*. 3:149-159.
22. Isolauri E., Arvola T., Sutas Y., Moilanen E., Salminen S. (2000) Probiotics in the management of atopic eczema. 30:1604-10.
23. Kalionmaki M.S., Salminen H., Arvilommi H., Kero P., Koskinen P., Isolauri E. (2001). Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo – controlled trial. *Lancet*. 357:1076 – 1079.
24. Khan SH., Ansari FA. (2007). Probiotics - the friendly bacteria with market potential in global market. *Pak J Pharm Sci*. 20(1):76-82.
25. Kidd T. (2008). Facts and functions of prebiotics, probiotics and symbiotics. Nutrition News from the Department of Human Nutrition. *K-State Research and Extension, Kansas State University*. 1-2.
26. Klaenhammer T.R. (1998) Functional activities of *Lactobacillus* probiotics: genetic mandate. *Int Dairy J*. 8:497-506.
27. Klessen B., Sykura B., Zunft H.J., Blaut M.(1997). Effect of inulin and lactose on fecal mikroflora, microbial activity, and bowel habit in elderly constipated persons. *Am J Clin Nutr*. 65:1397:1402.

28. Kühle A.V. A., and Jespersen L. (2003). The Taxonomic Position of *Saccharomyces boulardii* as Evaluated by Sequence Analysis of the D1/D2 Domain of 26S rDNA, the ITS1-5.8S rDNA-ITS2 Region and the Mitochondrial Cytochrome-*c* Oxidase II Gene. *Systematic and Applied Microbiology*. 26(4):564 – 571.
29. Kotowska M., Albrecht P., and Szajewska H. (2005). *Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic – associated diarrhoea in children: randomized double – blind placebo – controlled. *Aliment Pharmacol Ther*. 21:583 – 590.
30. Malda M.T., Juris P. (2006). Probiotics as functional food: microbiological and medical aspects. *Acta Universitatis Latviensis. Biology*. 710:117–129.
31. Martin F. (2007). Probiotics: Applications in Gastrointestinal Health & Disease. American College of Gastroenterology. *Inc. & Yakult Honsha Co.* 1 – 12.
32. Martin H.F., MD., MACG. (2003). Probiotics, irritable bowel syndrome, and inflammatory bowel disease. *Current Treatment Options in Gastroenterology*. 6:283–288.
33. Michael J., Mccullough., Clemons K.V., John H.M.,Stevens D.A. (1998) Species Identification and Virulence Attributes of *Saccharomyces boulardii* (nom. inval.). *Journal of Clinical Microbiology*. 2613–2617
34. Miller JMT. (1996). Probiotics – panacea or nostrum? *Nutrition Bulletin*. 21(3):199 – 203.
35. Miller JMT., H. (2003). The role of probiotics in the treatment and prevention of *Helicobacter pylori* infection. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 22(4):360 – 366.
36. Miller JMT.H., Shah S. (2002). Deficiencies in microbiological quality and labelling of probiotic supplements. *International journal of food microbiology*. ISSN 0168-1605. 72(1,2):175 – 176.
37. Miller JMT.H., Shah S., and Winkler JT. (1998). Public health issues arising from microbiological and labelling quality of foods and supplements containing probiotic microorganisms. *Public Health Nutrition*. 2(2):223–229.
38. Mitterdorfer G., Mayer HK., Kneifel W., Viernstein H. (2002). Clustering of *Saccharomyces boulardii* strains within the species *S. cerevisiae* using molecular typing techniques. *J Appl Microbio*. 193:521–530.
39. Murthy M. et al. (2000). Delineation of Beneficial Characteristics of Effective Probiotics, in *Journal of American Nutraceutical Association*. 3(2):38–43.
40. Pavilonis A., Čerkašina-Lasinskaitė A., Pavilonytė Ž. [2004]. Probiotikų klinikinio vartojimo pagrįstumas. Kauno medicinos universitetas. Mikrobiologijos katedra. 1 – 20.

41. Perdigon G., Alvarez S., Rachid M., Agüero G., and Gobbato N. (1995). Immune System Stimulation by Probiotics. *Journal of Dairy Science*. 78(7):1597-1606.
42. Rambaud JC., Buts JP., Corthier G., Flourie B. (2006) Gut Microflora. John Libbey Eurotex, Paris.
43. Raugalė A. (2006). Probiotikai pediatriinėje praktikoje. Vilniaus universiteto vaikų ligų klinika. 1(20): 85 – 92.
44. Rautio M., Somer H.J., Kaupa H. (1999). Liver abscess due to a *Lactobacillus rhamnosus* strain indistinguishable from *L. rhamnosus* strain GG. *Clin Infect Dis*. 28:1159–60.
45. Rutkauskaitė V., Abelytė R. (2006). Kombinuotų bakterijų preparatų nauda. Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Vaikų ligų klinika. *Pediatrics*. 2 (21) : 123 – 126.
46. Saarela M.G. Mogensen F.R., Mättö J., Sandholm T.M (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*. 84(3):197-215).
47. Salminen S., Isolauri E., Salminen E. (1996). Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and pseudo challenges. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70:347–358.
48. Sanders M.E. (1998). Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. *Int Dairy J*. 8:341-347.
49. Savage D.T. (2000). Probiotic bacteria in the gastrointestinal environment. Factors influencing their survival and colonization. *Biosci Microflora*. ISSN:1342-1441. 19(1):9 – 14.
50. Senok A.C., Ismaee A.Y., and Botta G. A. (2005). Probiotics: facts and myths. *CMI* 11 : 958–966.
51. Shalev E., Battino S., Weiner E., Colodner R., Keness Y. (1996). Ingestion of yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* compared with pasteurized yogurt as prophylaxis for recurrent candidal vaginitis and bacterial vaginosis. *Arch Fam Med*. 5:593-6.
52. Souza AL., Rajkumar C., Cooke J., Bulpitt CJ. (2002). Probiotic in prevention of antibiotic - associated diarrhoea:meta – analysis. *BMJ*. 324:1361 – 4.
53. Tamura T., Shin Y.S., Williams M.A., and Stokstad E.L.R. (2004). *Lactobacillus casei* response to pteroylpolyglutamates. 517-521.
54. Teixeira P., Castro H., Kirby R. (2008). Inducible thermotolerance in *Lactobacillus bulgaricus*. *The Society for Applied Microbiology*. 18(4):218 – 221.

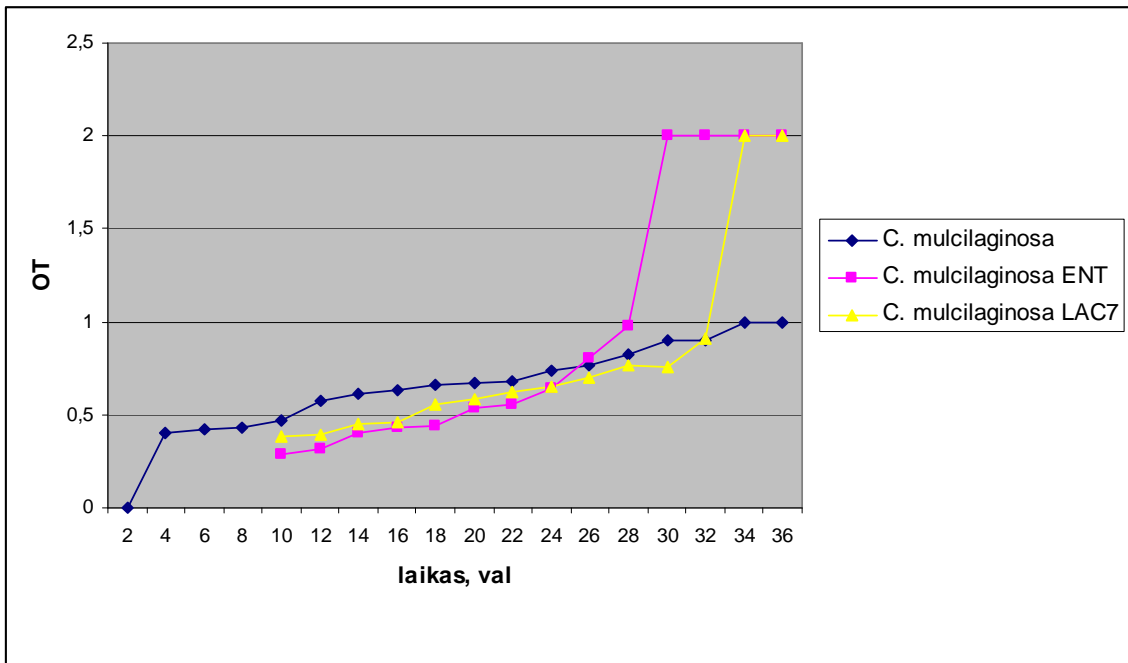
55. Temmerman R., Pota B., Huysa G., Swings J. (2003). Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Intern J Food Microbiol.* 81(1):1-10.
56. Tsimmerman I.A.S. (2005) Intestinal dysbiosis (dysbacteriosis) and/or “excessive bacterial growth syndrome”. *Klin med.* 83(4):14-22 .
57. Vankerckhoven V. (2004). Inventory and identification of lactic acid bacteria used as probiotics. 14th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Prague / Czech Republic. 1 – 4.
58. Vilcova E., Rada V., Trojanova I. (2004). Enumeration, isolation, and identification of bifidobacteria from diary products. *Acta agriculturae slovenica.* 84(1):31 – 36.
59. Vogel G. (2008). Deaths Prompt a Review of Experimental Probiotic Therapy. *Science.* 319:5863 – 557.
60. Waltz B. (2004). Intestinal immunity of rats with colon cancer is modulated by oligofructose – Enriched inulin combined *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis*. *Br J Nutr.* 92:931 – 938.
61. Weese JS. (2002). Microbiologic evaluation of commercial probiotics. *J Am Vet Med Assoc.* 220:794–797

## **PRIEDAI**

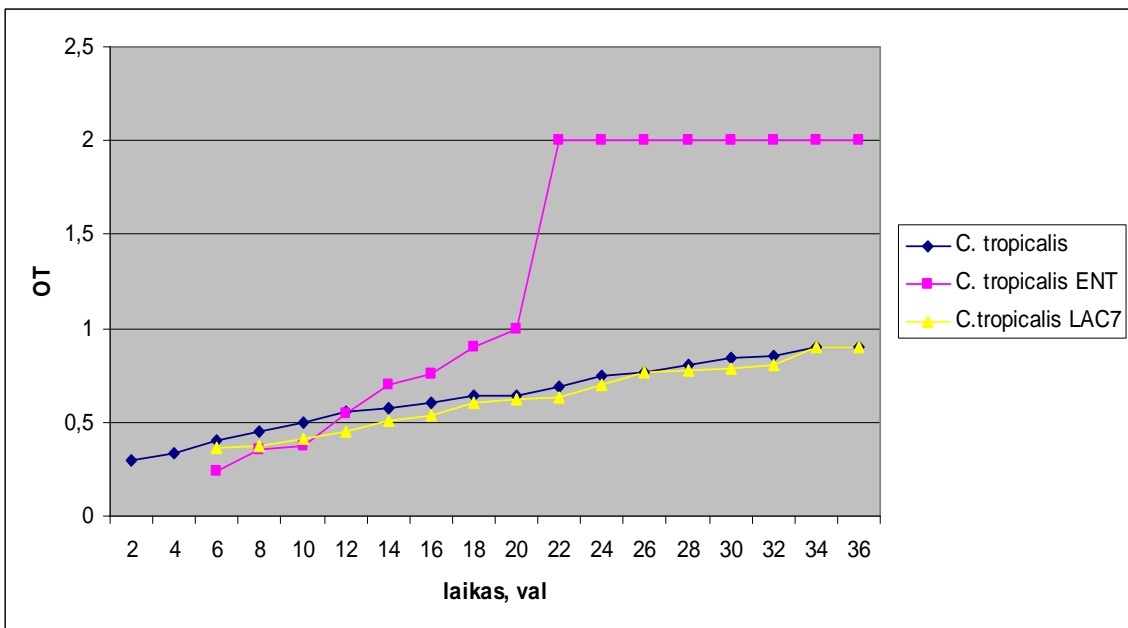






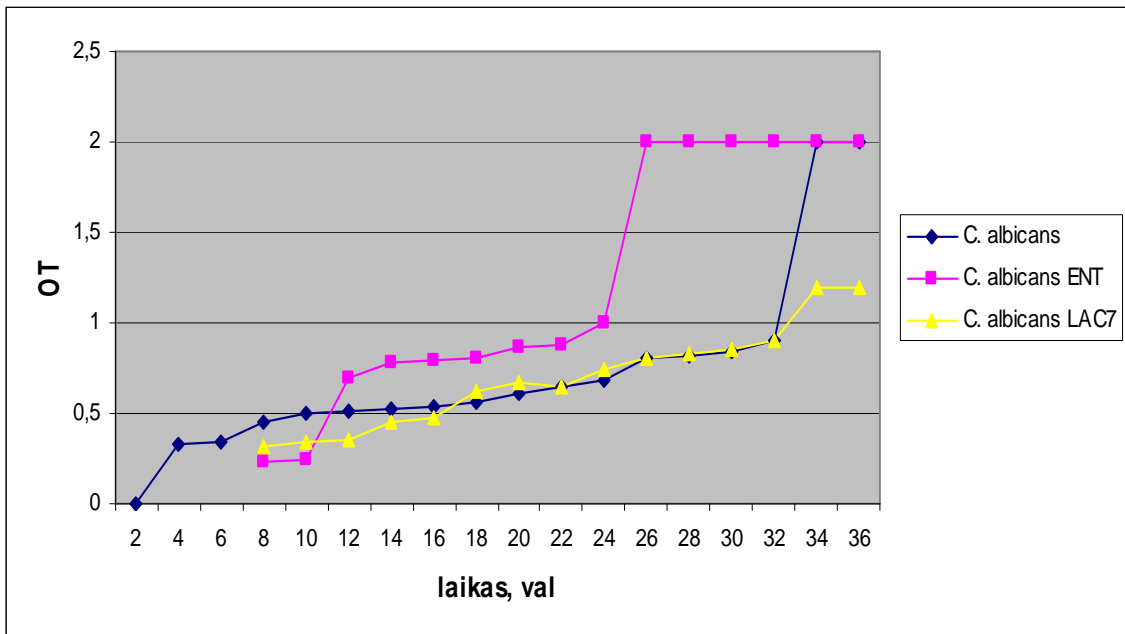


1 pav. Probiotikų Enterol ir Lactoseven įtaka *C. mulciliginosa* augimui

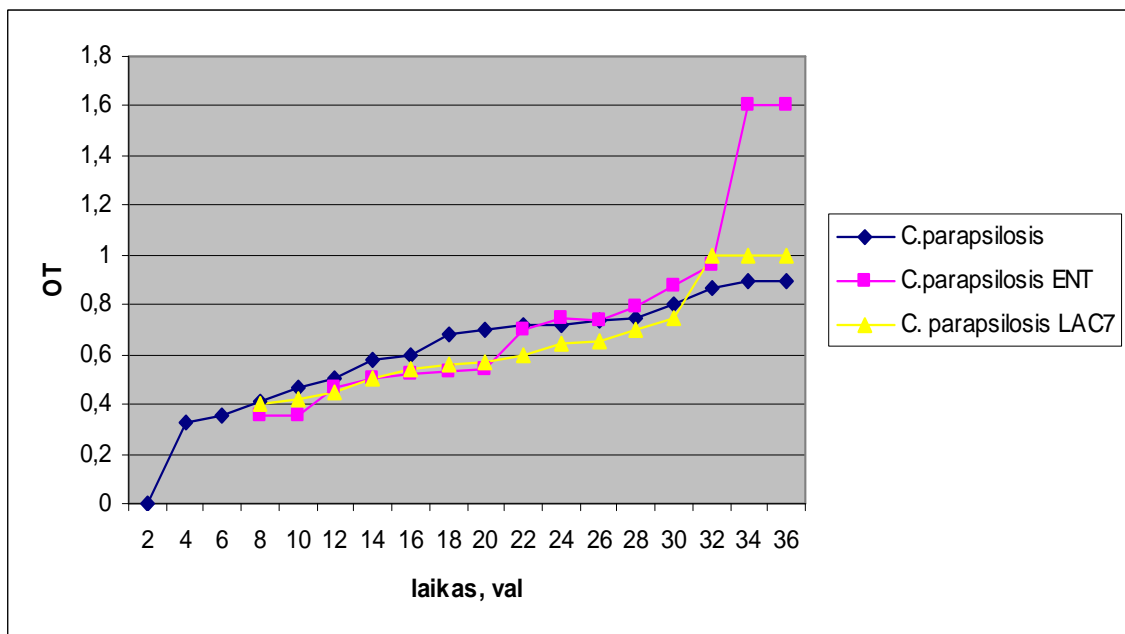


2 pav. Probiotikų Enterol ir Lactoseven įtaka *C. tropicalis* augimui



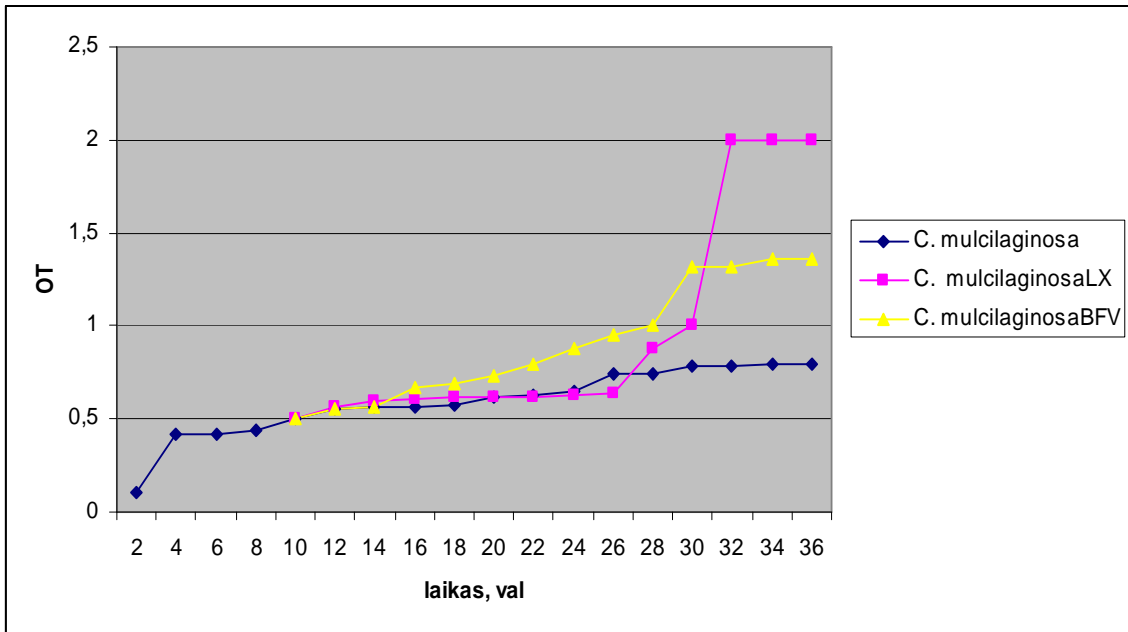


3 pav. Probiotikų Enterol ir Lactoseven įtaka *C.albicans* augimui

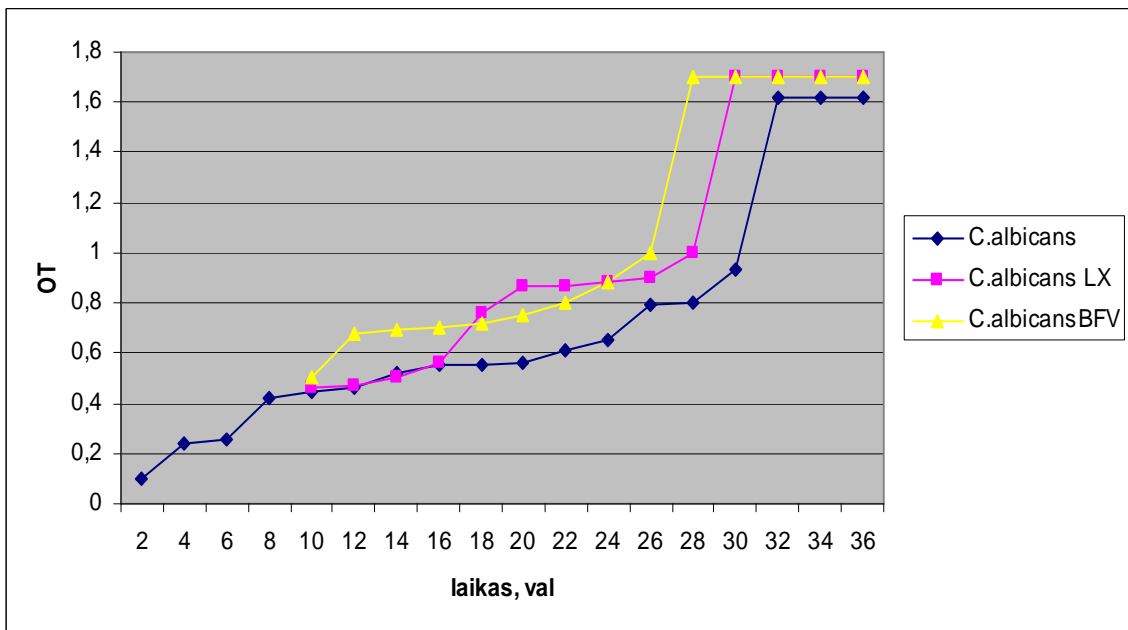


4 pav. Probiotikų Enterol ir Lactoseven įtaka *C. parapsilosis* augimui





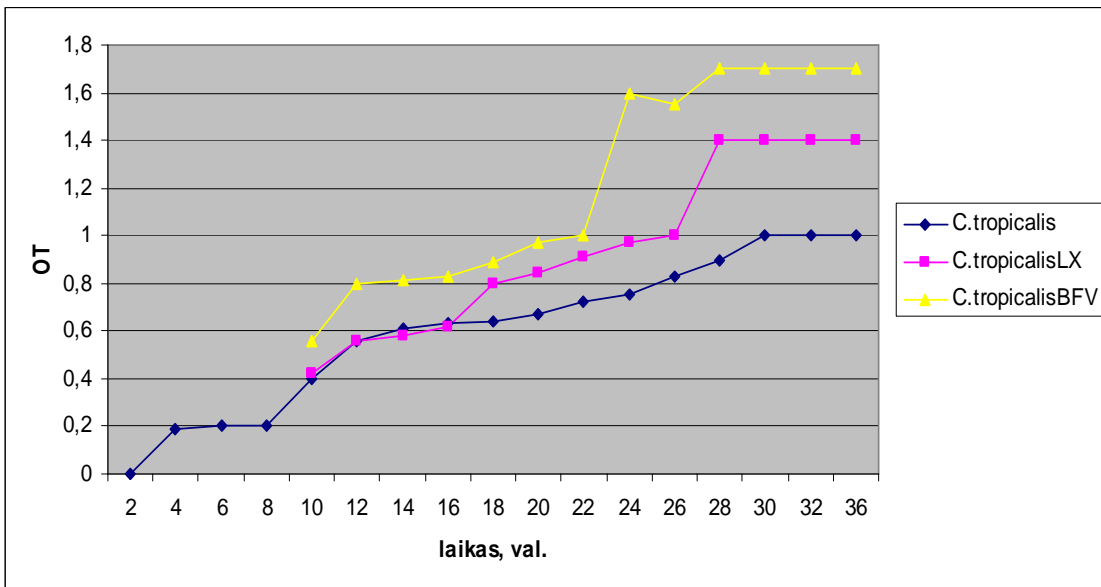
5 pav. Probiotikų Linex ir Bifoval įtaka *C. mulciliginososa* augimui



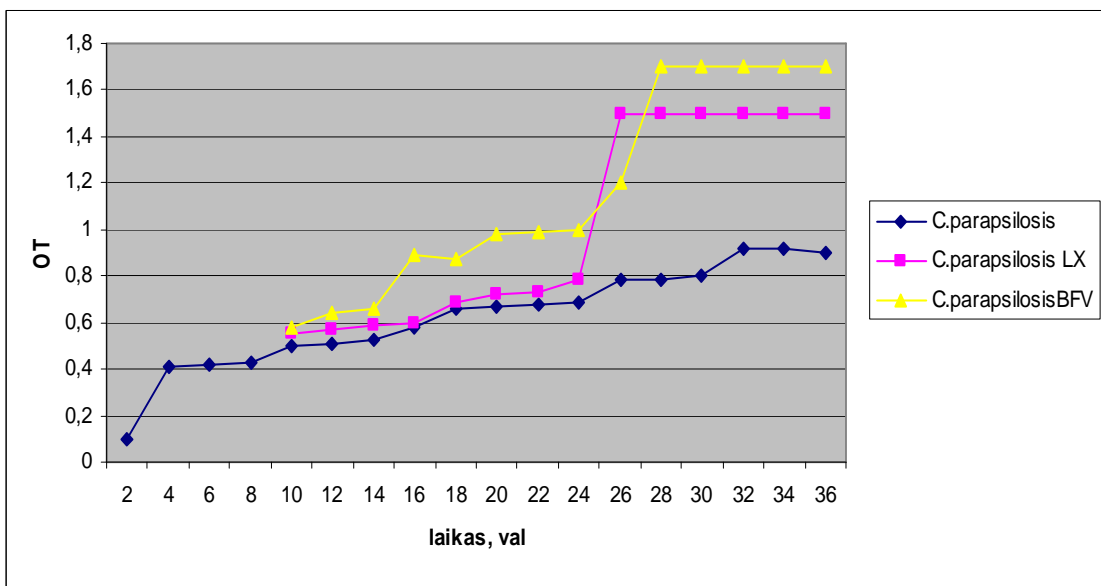
6 pav. Probiotikų Linex ir Bifoval įtaka *C. albicans* augimui





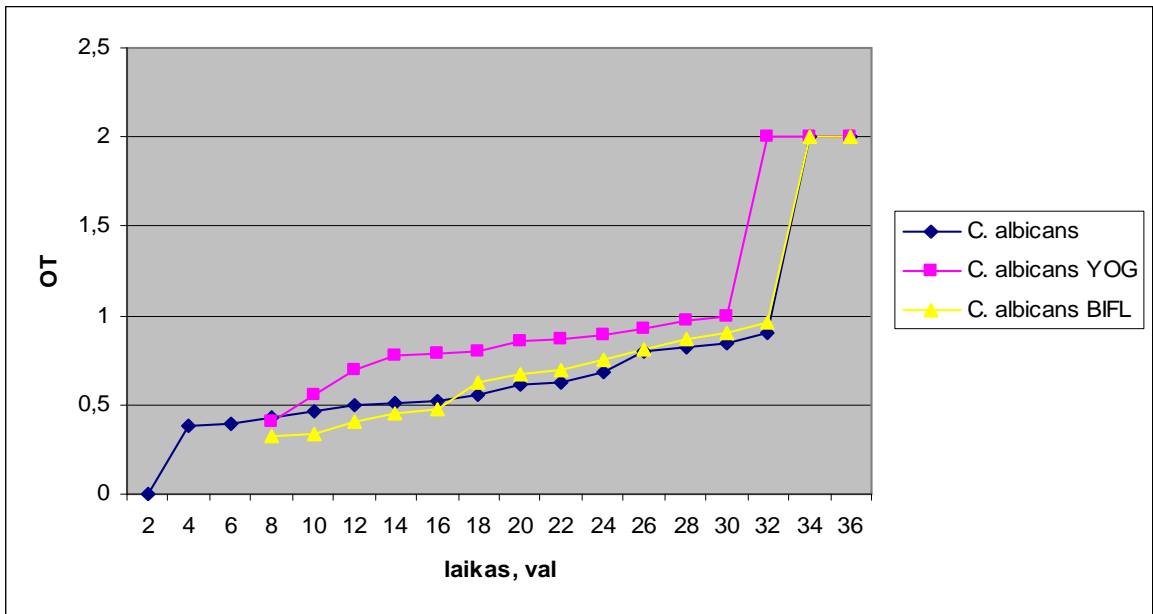


7 pav. Probiotikų Linex ir Bifoval įtaka *C. tropicalis* augimui

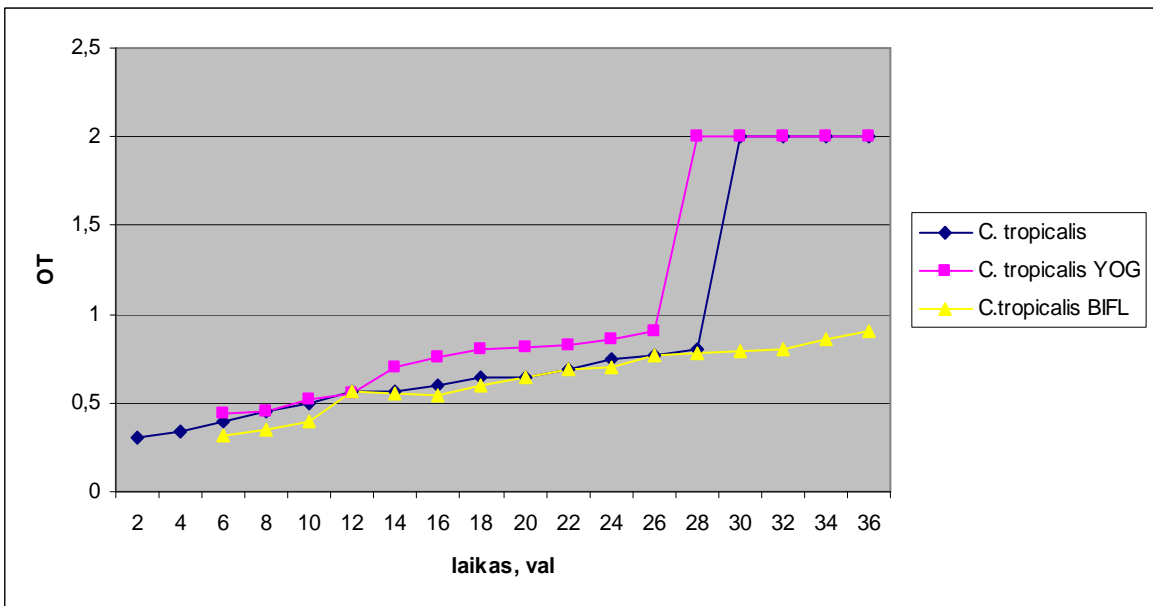


8 pav. Probiotikų Linex ir Bifoval įtaka *C.parapsilosis* augimui



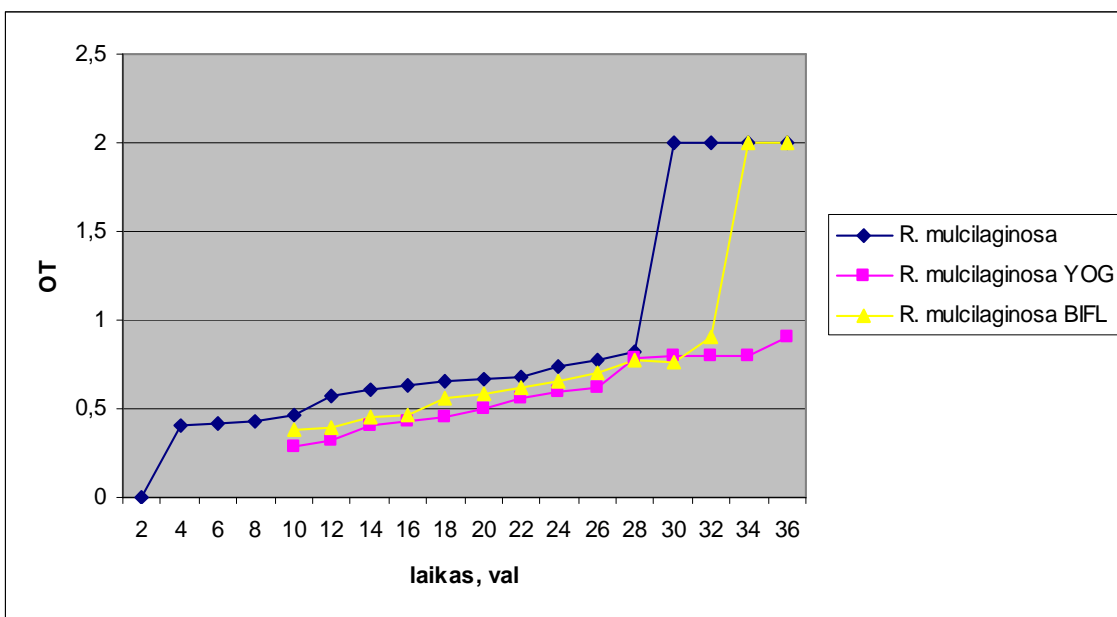


9 pav. Probiotikų Yogurt ir Bifolac įtaka *C. albicans* augimui

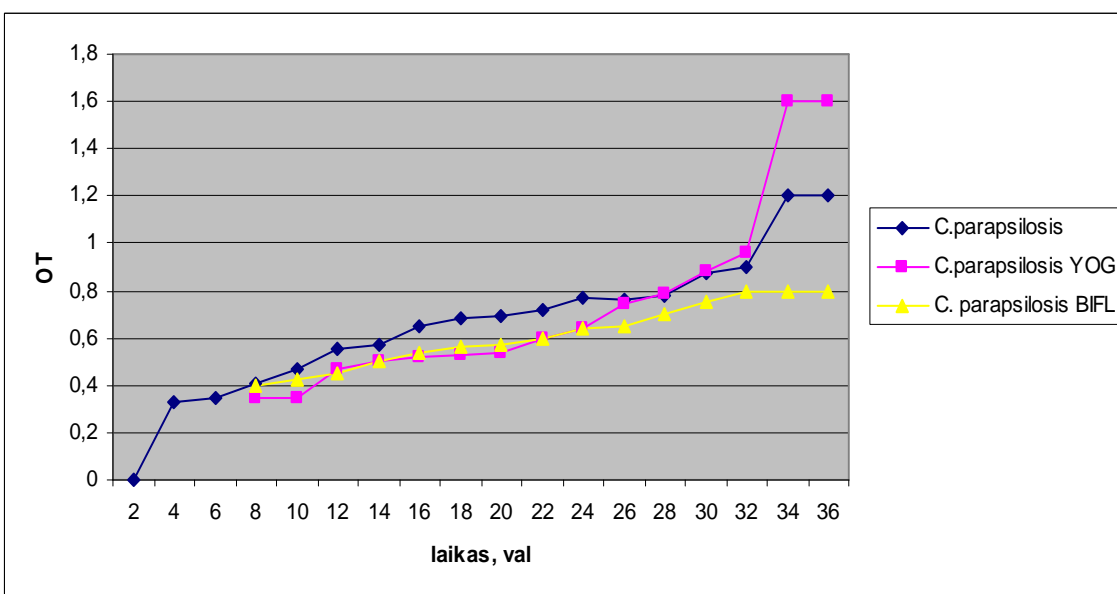


10 pav. Probiotikų Yogurt ir Bifolac įtaka *C. tropicalis* augimui





11 pav. Probiotikų Yogurt ir Bifolac įtaka *C. mucilaginosa* augimui



12 pav. Probiotikų Yogurt ir Bifolac įtaka *C. parapsilosis* rūšių augimui

