

ÜLEVAADE PROBIOOTIKUMIDE ANTAGONISTLIKUST AKTIIVSUSEST CAMPYLOBACTER JEJUNI TÜVEDELE IN VITRO

Kadrin Meremäe^{a*}, Priit Elias^b, Mati Roasto^a, Terje Elias^a

^aEesti Maaülikool, veterinaarmeditsiini ja loomakasvatuse instituut, toiduhügieeni osakond, Kreutzwaldi 58A, 51014 Tartu, Eesti

^bEesti Maaülikool, veterinaarmeditsiini ja loomakasvatuse instituut, toiduteaduse ja toiduainete tehnoloogia osakond, Kreutzwaldi 58, 51014 Tartu, Eesti
*tel +372 731 3431; fax +372 731 3432; e-mail kadrin.meremae@emu.ee

ABSTRACT. This review article summarises Kadrin Meremäe's PhD thesis part II: The co-effect of pro- and prebiotics to the *Campylobacter* spp. strains in vitro. The aim of this study was to investigate the antagonistic activity of selected lactobacilli and bifidobacteria combined with and without inulin and oligofructose to the *C. jejuni* strains of human origin in vitro. Interactions between probiotic bacteria and *C. jejuni* strains were determined using co-culture experiments. Lactic and acetic acid produced by probiotics in growth media were analyzed by HPLC. Our findings showed that the antagonistic activity of probiotic bacteria against campylobacters depended on the probiotic strain and on the presence of prebiotic ingredient in growth media. *L. acidophilus* ATCC 4356 combined with 1% inulin or 1% oligofructose and *B. bifidum* Bb12 as well as *B. longum* B46 with 1% oligofructose totally inhibited the growth of all the tested *C. jejuni* strains below detection limit (< 1 CFU/ml). The antagonistic activity of selected probiotic bacteria against *C. jejuni* was mostly related to the decrease of pH via the production of lactic and acetic acids in growth media.

Keywords: probiotics, prebiotics, antagonistic activity, *C. jejuni*.

Sissejuhatus

Campylobacter jejuni klassikalise toidupatogeenina on üks sagedasemaid akuutse gastroenteriidi tekitajaid inimestel (Hänninen, Rautelin, 2000; Blaser, Skirrow, 2000; EFSA, 2006). Teadaolevalt esineb igal aastal Euroopa Liidus keskmiselt 180,000 termofiilsete kampülobakterite põhjustatud haigusjuhtumit (EFSA, 2009). *C. jejuni* esile kutsutud kampülobakterenteriiti haigestumise peamine põhjus on ebapiisavalt kuumtöödeldud või pärast kuumtöötlust kampülobakteritega saastunud broileriliha tarbimine (Wingstrand *et al.*, 2006). Üldjuhul on kampülobakterenteriit iselimeeruv haigus, kuid esineda võib ka reinfektsioone ja tüsistusi. Terve inimese tasakaalus soolestiku mikrofloora inhibeerib sinna sattunud patogeensete bakterite elutegevust, kuid muuted seedetrakti bakterikooslustes võivad inimese vastuvõtlikkust infektsioonidele suurendada (Patterson, Burkholder, 2003). Seepärast on soovitatud gastroenteriitide profülaktikas ja järelravis kasutada probiootilisi baktereid, mis suurendavad inimese vastupanuvõimet infektsioonidele ja pärsivad soolepatogeenide kasvu,

aidates säilitada või taastada organismi normaalse soolestiku mikrofloora (Collins, Gibson, 1999; Sanders, 2000). Kõige enam on probiootikumidena tuntud *Lactobacillus*'e ja *Bifidobacterium*'i liigid, mis on algselt isoleeritud terve inimese soolestiku mikrofloorast ning omavad elusate mittepatoogeensete bakterikultuuridena peremeesorganismi tervist tugevdavat toimet (Rowland, 1999).

Probiootikumide üks funktsionaalne omadus on nende antimikroobne toime patogeensetele bakteritele. Mitmed uuringud kinnitavad probiootiliste bakterite antagonistlikku mõju mitmesuguste patogeeni, näiteks *Staphylococcus* spp., *Salmonella* spp., *Listeria* spp. ja *Campylobacter* spp. ning *Escherichia coli* suhtes (Yusof *et al.*, 2000; Annuk *et al.*, 2003; Fernández *et al.*, 2003; Hütt *et al.*, 2006). Probiootikumide antagonistlikud omadused ebasoovitavate bakterite elutegevuse inhibeerimiseks on seotud nende võimega produtsseerida kasvukeskkonda erinevaid antimikroobseid ühendeid, näiteks orgaanilisi happeid, vesinikperoksiidi, bakteriotsiine, jt (Fooks, Gibson, 2003; Meremäe *et al.*, 2010). Kasutatavad probiootikumid peavad olema inimpäritolu, kuna antagonistlike omaduste poolest tuntud bakterite liigid avaldavad toimet vaid kohanenud liigimases kasvukeskkonnas (Chaveerach *et al.*, 2004; Draksler *et al.*, 2004; Kizerwetter-Świda, Binek, 2005). Lisaks eeltoodule sõltub probiootikumide antagonistlik aktiivsus veel mitmetest teguritest: valitud liigist ja tüvest, fermentatsioonitüübist, kasvukeskkonna tingimustest, probiootikumi olemasolust, jne (Hütt *et al.*, 2006; Meremäe *et al.*, 2010).

Üks võimalus probiootikumide elutegevuse soodustamiseks, säilivusvõime tagamiseks ja antimikroobsete ainete intensiivsemaks produtsseerimiseks kasvukeskkonda on kasutada probiootikume koos prebiootikumidega, kusjuures nende koostoimel on võimalik inhibeerida toidupatogeenide elutegevust suuremal määral (Bosscher *et al.*, 2006; Juhkam *et al.*, 2007). Prebiootikumid on probiootiliste bakterite fermenteeritavad toitained, mis jõuavad peremeesorganismi jämesoolde seedimatu kujul (Roberfroid, 2000). Prebiootilisi omadusi on leitud näiteks frukto-, glüko-, ksülo-, isomalto- ja galakto-oligosahhariididel. Frukto-oligosahhariididest on tuntumad inuliin ja oligofruktoos, mis stimuleerivad probiootikumide elutegevust erinevates kasvukeskkondades, sh inimese soolestiku mikroflooras (Conway 2001; Corcoran *et al.*, 2004). Probiootikumide antagonistlikku aktiivsust koostoides prebiootikumidega on uuritud vähestes teadaolevates teadustööstes (Fooks,

Gibson, 2002; Fooks, Gibson, 2003; Klewicki, Klewicki, 2004; Meremäe *et al.*, 2010).

Käesolevas artiklis antakse ülevaade doktoriväitekirja (Meremäe, 2010) II osast, mis hõlmab valitud probiootiliste bakteritüvede antagonistliku mõju uuringuid *C. jejuni* tüvedele, nii prebiootikumideta kui ka kombinatsioonis 1% oligofruktoosi või 1% inuliiniga *in vitro* (Meremäe *et al.*, 2010).

Materjal ja meetodika

Probiootikumid. Uuringuks valiti järgmised probiootikumid: *L. acidophilus* ATCC 4356, *L. fermentum* ATCC 14931, *B. bifidum* Bb12, *B. longum* B46, mis pärinesid Tartu Ülikooli kollektsioonist. Probiootiliste bakterikultuuride saamiseks tehti külvid MRS (de Man, Rogosa, Sharp) agarsöötmele, mida inkubeeriti 24 tundi temperatuuril 37°C. Probiootikume inkubeeriti anaeroobsetes tingimustes, välja arvatud *L. acidophilus* ATCC 4356, mida inkubeeriti mikroaeroobses keskkonnas. Seejärel viidi 1 µl (aasatäis) baktermassi MRS puljongisse, mida inkubeeriti temperatuuril 37°C 24 tundi, et saada bakterite arvukus keskmiselt 10⁸ bakterit/ml (Meremäe *et al.*, 2010).

Prebiootikumid. Planeeritud katseseeriadele kohaselt kasutati prebiootikumidena 1% oligofruktoosi (RAFTILOSE®P95) või 1% inuliini (RAFTILINE®HP).

C. jejuni tüved. *C. jejuni* isolaatidest valiti uuringuks järgmised humaantüved: *C. jejuni* C135, *C. jejuni* C1055 ja *C. jejuni* ATCC 33291. Katseseeriates kasutatavad tüved külvasi selektiivagarile (mCCDA), mida inkubeeriti mikroaeroobsetes tingimustes 48 tundi temperatuuril 42°C. Seejärel viidi 1 µl (aasatäis) baktermassi Mueller Hinton (MH) puljongisse, mida inkubeeriti 42°C juures 24 tundi, et saada bakterite arv keskmiselt 10⁸ bakterit/ml (Meremäe *et al.*, 2010).

Segatud bakterikultuuride katsed. Valitud probiootiliste bakterite ja *C. jejuni* tüvede vaheliste interaktsioonide uuringuteks kasutati segatud bakterikultuuride katseid (Chaveerach *et al.*, 2004; Meremäe *et al.*, 2010). Selleks viidi koos 100 µl eelnevalt väljakasvatatud probiootilist bakterikultuuri ja *C. jejuni* bakterikultuuri MH puljongisse (keskmiselt 10⁶ bakterit/ml), mida in-

kubeeriti mikroaeroobses keskkonnas 48 tundi temperatuuril 37°C. Planeeritud katseseeriade kohaselt lisati MH puljongisse ka kas 1% oligofruktoosi või 1% inuliini. Paralleelselt ja samades tingimustes tehti kontrollproovid, mis sisaldasid vaid ühte probiootilist bakterikultuuri või *C. jejuni* tüve. Probiootiliste bakterite ja *C. jejuni* arvu selektiivseks loendamiseks nii kontrollproovides kui ka segatud bakterikultuuridega MH puljongites tehti probiootikumide külvid MRS agarile, mida inkubeeriti temperatuuril 37°C, ning *C. jejuni* külvid mCCDA agarile, mida inkubeeriti temperatuuril 42°C. MH puljongitest mõõdeti pH-d ning tehti väljakülvid katse alguses, 24. ja 48. katsetunnil. Probiootikume inkubeeriti anaeroobsetes tingimustes, välja arvatud *L. acidophilus* ATCC 4356, mida sarnaselt *C. jejuni* tüvedega inkubeeriti mikroaeroobses keskkonnas. Kasvukeskkonda probiootikumide produtseeritud piim- ja äädikhappe sisalduste määramine toimus kõrgefektiivse vedelik-kromatograafia (HPLC) abil 24. ja 48. katsetunnil (Akalin *et al.*, 2004; Meremäe *et al.*, 2010). Saadud andmete analüüsil kasutati Student's *t*-testi.

Tulemused

Valitud probiootikumide antagonistliku mõju uuringud *C. jejuni* tüvedele *in vitro* hõlmasid katseseeriaid nii 1% oligofruktoosiga, 1% inuliiniga kui ka ilma prebiootikumideta (tabelid 1, 2, 3, 4). Tugev antagonistlik toime kampülobakteritele ilmnis saadud tulemuste järgi (Meremäe *et al.*, 2010) eelkõige *L. acidophilus*'e ATCC 4356 koostoimes 1% oligofruktoosi ja 1% inuliiniga (tabel 1). Võrreldes kontrollproovidega, kus kampülobakterite arvukus suurenes pärast 48-tunnist inkubatsiooni keskmiselt 1 log ühiku võrra, väljendus *L. acidophilus*'e ATCC 4356 tugev antagonism *C. jejuni* tüvede suhtes selliselt, et nende algarv kohe pärast külvi, mis oli 5.87–6.13 log pmü/ml, vähenes 48-tunnise inkubatsiooni ajal alla määramispiiri (< 1 pmü/ml). Tulemused näitasid, et probiootikumide antagonistlikku aktiivsust *C. jejuni* tüvede suhtes MH puljongisöötmes ilma prebiootikumita ei ilmnunud (*P* > 0.05), samas kui köikides uuritud proovides *L. acidophilus*'e ATCC 4356 arv suurenes keskmiselt 1 log ühiku võrra.

Tabel 1. *L. acidophilus* ATCC 4356 antagonistlik aktiivsus *C. jejuni* tüvede suhtes

Table 1. Antagonistic activity of *L. acidophilus* ATCC 4356 against *C. jejuni* strains (Meremäe, 2010; Meremäe *et al.*, 2010)

Puljong/Broth	Aeg (tundides)/ Time (h)	ATCC 4356 arvukus (log pmü/ml)/ Log CFU/ml of ATCC 4356	<i>C. jejuni</i> tüvede arvukus (log pmü/ml)/ Log CFU/ml of <i>C. jejuni</i> strains		
			ATCC 33291	C135	C1055
MH + 1% oligofruktoos/ oligofructose	0	6.03	5.87	6.07	6.03
	24	6.78	1.53	1.20	2.87
	48	7.31	UD	UD	UD
MH + 1% inuliin/ <i>inulin</i>	0	6.01	6.04	6.13	6.00
	24	6.69	4.87	3.14	3.33
	48	7.23	UD	UD	UD
MH	0	6.03	6.02	6.05	5.99
	24	6.53	6.73	6.17	6.63
	48	6.87	6.90	6.89	7.20

UD – alla määramispiiri (< 1 pmü/ml)

UD – under detection limit (< 1 CFU/ml)

Erinevalt teistest probiootikumidest (tabel 1, 3, 4), *L. fermentum*'il ATCC 14931 ei olnud ($P > 0.05$) meie *in vitro* eksperimendis (Meremäe *et al.*, 2010) testitud *C. jejuni* tüvede suhtes piisaval määral antagonistlikku aktiivsust (tabel 2). Võrreldes kontrollproovidega esines kasvukeskkonnas *L. fermentum*'i ATCC 14931 ja kampülobakterite koosinkubeerimisel mõningane *C. jejuni* arvu vähenemine vaid 1% oligofruktoosi olemasolul, mil kampülobakterite arv vähenes 1-2 log ühi-

ku võrra jäädes vahemikku 4.00–5.00 log pmü/ml. Ülejäänud proovides, välja arvatud *C. jejuni* ATCC 33291 puhul, toimus kampülobakterite arvu mõningane suurenemine 48 tunni jooksul. Nii kontrollproovides kui ka koosinkubeerimisel kampülobakteritega oli *L. fermentum*'i ATCC 14931 arv pärast 48-tunnist inkubatsiooni MH puljongis 6.35 log pmü/ml, 1% inuliini olemasolul 6.51 log pmü/ml ja 1% oligofruktoosi olemasolul 6.88 log pmü/ml.

Tabel 2. *L. fermentum* ATCC 14931 antagonistlik aktiivsus *C. jejuni* tüvede suhtes

Table 2. Antagonistic activity of *L. fermentum* ATCC 14931 against *C. jejuni* strains (Meremäe, 2010; Meremäe *et al.*, 2010)

Puljong/Broth	Aeg (tundides)/ Time (h)	ATCC 14931 arvukus		<i>C. jejuni</i> tüvede arvukus		
		(log pmü/ml)/ Log CFU/ml		(log pmü/ml)/ Log CFU/ml of <i>C. jejuni</i> strains		
		of ATCC 14931		ATCC 33291	C135	C1055
MH + 1% oligofruktoos/ oligofructose	0	6.01	6.09	6.10	6.07	
	24	6.38	5.22	4.53	4.70	
	48	6.88	5.00	3.87	4.00	
MH + 1% inuliin/ <i>inulin</i>	0	6.10	6.02	6.13	6.02	
	24	6.40	5.56	6.03	6.23	
	48	6.51	5.07	6.23	6.53	
MH	0	6.09	6.10	6.08	6.01	
	24	6.20	7.10	6.63	6.40	
	48	6.35	7.13	7.57	6.67	

UD – alla määramispiiri (< 1 pmü/ml)

UD – under detection limit (< 1 CFU/ml)

Bifidobakterite antagonistliku mõju uuringute tulemustes olulisi erinevusi bifidobakterite vahel ei täheldatud ($P > 0.05$), mis viitab tüvespetsiifilisuse puudumisele. Tabelites 3 ja 4 selgub, et meie katseseeriates testitud bifidobakterite, *B. bifidum* Bb12 ja *B. longum* B46 tugevad antagonistlikud omadused väljendusid *C. jejuni* tüvede suhtes üksnes 1% oligofruktoosi olemasolul (Meremäe *et al.*, 2010). 1% oligofruktoosi lisand kasvu

keskkonnas, võrreldes kontrollproovidega, mõjutas oluliselt ($P < 0.001$) *C. jejuni* arvu, mis jäi pärast 48-tunnist inkubatsiooni alla määramispiiri (< 1 pmü/ml). Ülejäänud proovides suurenes kampülobakterite arv 48 tunni jooksul 0.17–0.63 log ühiku võrra. *B. bifidum* Bb12 ja *B. longum* B46 arv suurenes samuti kõikides katseseeriates, jäädes pärast 48-tunnist kasvu 6.40–7.29 log pmü/ml piirsesse.

Tabel 3. *B. bifidum* Bb12 antagonistlik aktiivsus *C. jejuni* tüvede suhtes

Table 3. Antagonistic activity of *B. bifidum* Bb12 against *C. jejuni* strains (Meremäe, 2010; Meremäe *et al.*, 2010)

Puljong/Broth	Aeg (tundides)/ Time (h)	Bb12 arvukus		<i>C. jejuni</i> tüvede arvukus (log pmü/ml)/		
		(log pmü/ml)/ Log CFU/ml		Log CFU/ml of <i>C. jejuni</i> strains		
		of Bb12		ATCC 33291	C135	C1055
MH + 1% oligofruktoos/ oligofructose	0	6.03	6.03	6.03	5.90	
	24	6.78	1.08	1.20	0.97	
	48	7.29	UD	UD	UD	
MH + 1% inuliin/ <i>inulin</i>	0	6.10	6.12	6.01	6.12	
	24	6.40	6.17	6.30	6.48	
	48	6.73	6.43	6.28	6.52	
MH	0	6.08	6.00	6.10	5.90	
	24	6.23	6.17	6.20	6.13	
	48	6.40	6.63	6.40	6.27	

UD – alla määramispiiri (< 1 pmü/ml)

UD – under detection limit (< 1 CFU/ml)

Tabel 4. *B. longum* B46 antagonistlik aktiivsus *C. jejuni* tüvede suhtes**Table 4.** Antagonistic activity of *B. longum* B46 against *C. jejuni* strains (Meremäe, 2010; Meremäe et al., 2010)

Puljong/Broth	Aeg (tundides)/ Time (h)	B46 arvukus (log pmü/ml)/ Log CFU/ml of B46	<i>C. jejuni</i> tüvede arvukus (log pmü/ml)/ Log CFU/ml of <i>C. jejuni</i> strains		
			Log CFU/ml of <i>C. jejuni</i> strains		
			ATCC 33291	C135	C1055
MH + 1% oligofruktoos/oligofruktose	0	6.09	5.83	5.90	6.03
	24	6.77	1.63	0.37	0.53
	48	7.33	UD	UD	UD
MH + 1% inuliin/ <i>inulin</i>	0	6.10	6.11	6.03	6.13
	24	6.28	6.34	5.93	6.43
	48	6.58	6.13	5.30	6.17
MH	0	6.02	6.05	6.02	6.01
	24	6.23	6.53	6.20	6.23
	48	6.52	6.77	6.83	6.30

UD – alla määramispiiri (< 1 pmü/ml)

UD – under detection limit (< 1 CFU/ml)

Meie uuringud (Meremäe *et al.*, 2010) näitasid, et laktobatsillide ja bifidobakterite antagonistlikud omadused sõltusid metaboliitide produktsioonist, mistõttu oli suure tähtsusega peamiste metaboliitide määramine *in vitro* (tabel 5). Antagonistlike metaboliitide produktsioon sõltus probiootikumide arvust ja sobiva prebiootikumi olemasolust, mis omakorda mõjutas kasvukeskkonna pH näitajaid. Probiootiliste bakterite antagonistlik

aktiivsus *C. jejuni* suhtes ilmnes vaid siis, kui sobiva prebiootikumi olemasolul kasvukeskkonna pH väärtus vähenes alla 5.0, olles pärast 48-tunnist inkubatsiooni vahemikus 4.28–4.69. Sellisel juhul jäid probiootikumide produtseeritud piim- ja äädikhapete kontsentratsioonid vastavalt vahemikku 58.3–88.7 mmol/l ja 31.8–42.4 mmol/l (tabel 5).

Tabel 5. Probiootikumide produtseeritud piim- ja äädikhapete kontsentratsioonid ning pH väärtused MH puljongites**Table 5.** Concentrations of lactic and acetic acid by probiotic bacteria and the pH values in MH broths (Meremäe, 2010; Meremäe et al., 2010)

Probiootikumid/ Probiotic bacteria	Puljongid/Broths	Piimhape/Lactic acid (mmol/l)		Äädikhape/ Acetic acid (mmol/l)		pH	
		24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
		<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	MH + 1% oligofruktoos/ <i>oligofruktose</i>	81.6	88.6	31.8	42.4
	MH + 1% inuliin/ <i>inulin</i>	71.6	81.5	37.2	41.6	4.61	4.69
	MH	45.5	54.9	30.9	36.3	5.40	5.50
<i>L. fermentum</i> ATCC 14931	MH + 1% oligofruktoos/ <i>oligofruktose</i>	36.4	52.1	28.0	33.0	5.09	5.03
	MH + 1% inuliin/ <i>inulin</i>	31.5	38.6	26.0	26.7	5.82	5.41
	MH	30.5	37.9	23.9	26.7	6.10	6.10
<i>B. longum</i> Bb12	MH + 1% oligofruktoos/ <i>oligofruktose</i>	58.3	73.6	33.6	36.3	4.63	4.57
	MH + 1% inuliin/ <i>inulin</i>	37.0	38.8	26.7	28.7	5.63	5.68
	MH	38.6	41.9	20.9	28.0	5.75	5.81
<i>B. bifidum</i> B46	MH + 1% oligofruktoos/ <i>oligofruktose</i>	74.7	88.7	33.4	34.4	4.58	4.52
	MH + 1% inuliin/ <i>inulin</i>	48.5	50.7	30.4	34.4	5.72	5.64
	MH	42.7	55.8	31.9	36.3	5.70	5.71

Arutelu

Probiootikumide antagonistlik toime patogeenidele on üks nende olulisi funktsionaalseid omadusi, mis võimaldab pärssida ebasoovitavate bakterite elutegevust. Kuna probiootikumide antagonistlikud omadused sõltuvad mitmetest teguritest, on oluline läbi viia valitud probiootikumide antagonistliku mõju uuringud *C. jejuni* tüvedele, et hinnata nende antimikroobsust valitud patogeenide suhtes.

Meie uuringus (Meremäe, 2010; Meremäe *et al.*, 2010) keskenduti *L. acidophilus* ATCC 4356, *L. fer-*

mentum ATCC 14931, *B. bifidum* Bb12 ja *B. longum* B46 antagonistlike omaduste väljaselgitamisele inimpäritolu kontrolltüve *C. jejuni* ATCC 33291 ja Eesti patsientidel kampülobakterenteriidi diagnoosimisel isoleeritud *C. jejuni* tüvedele C135 ja C1055. Varasemates samalaadsetes uuringutes on käsitletud näiteks *B. infantis*'e antagonistlikku aktiivsust *E. coli* 0157 ja *S. typhimurium* S-285 suhtes (Yusof *et al.*, 2000) ning terve inimese seedetrakti mikrofloorast isoleeritud kolme *Lactobacillus*'e liigi, kodeerituna B21060, B21070 ja B21190, uuringuid *E. coli* ja *S. enteritidis*'e suhtes (Drago *et al.*, 1997). Saadud uurimistulemused (Mere-

mäe *et al.*, 2010) näitasid, et testitud laktobatsillide ja bifidobakterite antimikroobne aktiivsus *in vitro* sõltus eelkõige probiootikumi liigist ja lisatavast prebiootikumist, mitte aga *C. jejuni* tüvest. Järelikult probiootikumide toime oli samalaadne ($P > 0.05$) kõikidele testitud *C. jejuni* tüvedele. Seejuures *C. jejuni* oma elutegevusega probiootikumide elutegevust ja arvukust ei pärssinud (Drago *et al.*, 1997; Meremäe *et al.*, 2010) ning sarnaselt teiste patogeenidega ei ole ka *C. jejuni*, vastupidiselt probiootikumidele, võimeline kasutama probiootikume oma elutegevuseks (Rowe, Madden, 2000).

Probiootikumide antimikroobne mõju kampülobakteritele sõltus aga omakorda sobiva prebiootikumi olemasolust kasvukeskkonnas. Meie *in vitro* segatud bakterikultuuride katsetest (Meremäe *et al.*, 2010) selgus, et *L. acidophilus* ATCC 4356 kombinatsioonis 1% inuliini või 1% oligofruktoosiga ning *B. bifidum* Bb12 ja *B. longum* B46 kombinatsioonis 1% oligofruktoosiga inhibeerisid täielikult kõikide testitud *C. jejuni* tüvede elutegevuse. Samalaadselt leidsid Fooks ja Gibson (2002), et *B. bifidum* Bb12 kombinatsioonis oligofruktoosiga pärssis samuti täielikult *C. jejuni* kasvu. Vastupidiselt eeltoodule, ei omanud bifidobakterid kombinatsioonis inuliiniga ja *L. fermentum* ATCC 14931 koos inuliini või oligofruktoosiga meie uuringus antagonistlikku aktiivsust testitud kampülobakteritele. Seejuures ka Hütt *et al.* (2006), Yusof *et al.* (2000) ja Gibson, Wang (1994) on leidnud, et patogeensete bakterite elutegevuse inhibeerimine sõltub probiootilise bakteri liigist ja tüvest. Kooskõlas meie tulemustega leidsid Asahara *et al.* (2001), et *L. fermentum* ATCC 14931-l ei olnud antagonistlikku aktiivsust ka *E. coli* suhtes. Sarnaselt meie uuringuga leidsid ka Vernazza *et al.* (2006), et *B. longum* B46 ja *B. lactis* Bb12 ei kasutanud inuliini oma elutegevuseks sel määral kui oligofruktoosi.

Järelikult prebiootikumidest oligofruktoos ja inuliin stimuleerivad valikuliselt probiootikumide elutegevust. Meie uuringud näitasid, et sobiva prebiootikumi olemasolu kasvukeskkonnas suurendab olulisel määral probiootikumide arvukust, kuid prebiootikumide mõju probiootikumidele sõltub kasutatavast prebiootikumist (Juhkam *et al.*, 2007; Meremäe *et al.*, 2010). Prebiootikumide efektiivsus probiootikumide elutegevuse stimuleerimisel ja säilivusvõime tõstmisel sõltub kasutatavast prebiootikumi kogusest (Juhkam *et al.*, 2007). Piisav mõju probiootikumidele on tagatud 1% prebiootikumi olemasolul. Sobivate pro- ja prebiootikumide kombinatsioonide olemasolul suureneb kasvukeskkonnas nii probiootikumide arv kui ka orgaaniliste hapete produktsioon (Burkholder, Patterson, 2003; Meremäe *et al.*, 2010).

Meie uuringus selgus, et probiootikumide produtseeritud orgaaniliste hapete kontsentratsioon MH puljongis sõltus lisatavast prebiootikumist (Meremäe *et al.*, 2010). Seetõttu antud *in vitro* eksperimendis oli probiootikumide toodetud orgaaniliste hapete sisaldus mõnevõrra ($P < 0.05$) kõrgem nendes MH puljongites, mis sisaldasid 1% oligofruktoosi. Sarnaselt meie uuringuga on ka Burkholder, Patterson (2003) ja Fooks, Gibson (2002) leidnud, et sobivate pro- ja prebiootikumi kombinatsioonide olemasolul on laktobatsillide ja bifidobakterite

toodetud piim- ja äädikhapete kontsentratsioonid kõrgemad kui ilma prebiootikumi lisandita. Samas, meie teine uuring (Juhkam *et al.*, 2007) näitas, et oligofruktoosil oli oluliselt suurem mõju probiootikumide arvu suurenemisele, säilivusvõime paranemisele ja orgaaniliste hapete produktsioonile kui inuliinil. See tuleb nähtavasti sellest, et inuliin on polüsahhariid, mis koosneb pikema ahelaga oligomeeridest kui oligofruktoos. Seega saavad probiootikumid oligofruktoosi oligosahhariidina oma elutegevuseks kergemini lõhustada ja kasutada kui inuliini (Niness, 1999; Van der Meulen *et al.*, 2004).

Probiootikumide antagonistlik aktiivsus on seotud peamiselt antagonistlike metaboliitidega, näiteks piim- ja äädikhapetega, vesinikperoksiidiga, bakteriotsiinidega, jt (Fernández *et al.*, 2003). Annuk *et al.* (2003) leidsid, et bakteriotsiinidel on Gram-positiivsete bakterite suhtes spetsiifiline pidurdusaktiivsus, samas Gram-negatiivsed patogeendid, näiteks kampülobakterid, on tundlikud rohkem orgaaniliste hapete suhtes. Meie uuring (Meremäe *et al.*, 2010) näitas, et *C. jejuni* arvukuse vähenemine uuritud proovides sõltus nii kasvukeskkonda probiootikumide produtseeritud orgaaniliste hapete kontsentratsioonidest kui kasvukeskkonna pH-st. *C. jejuni* arvikus MH puljongites oli väiksem kui 1 pmü/ml siis, kui probiootikumide produtseeritud piimhappe kontsentratsioon ületas 58.3 mmol/l ja äädikhapesisaldus oli suurem kui 31.8 mmol/l. Sellisel juhul jäi kasvukeskkonna pH väärtus alla 5.0, olles pärast 48-tunnist inkubatsiooni vahemikus 4.28–4.69. Coconnier *et al.* (1997) leidsid, et laktobatsillide antimikroobne aktiivsus sõltus piimhappe produktsioonist. Fooks, Gibson (2003) ja Draksler *et al.* (2004) leidsid, et probiootikumide antagonistlikud omadused sõltusid orgaaniliste hapete produktsioonist, mille tulemusena toimus kasvukeskkonna pH vähenemine. Fooks, Gibson (2002) leidsid, et enteropatogeendid ei suuda ellu jääda pH-väärtusel alla 5. Samas Chaveerach *et al.* (2002) leidsid, et orgaanilised happed omavad tugevat bakteritsiidset toimet eeskätt pH 4.5 juures. Seega, testitud laktobatsillide ja bifidobakterite antagonistlikud omadused meie uuringus väljendusid nende võimes toota piisaval hulgal metaboliite, mille tulemusena vähenes olulisel määral kasvukeskkonna pH. Orgaaniliste hapete tugevat koostoimelist bakteritsiidset mõju patogeensetele bakteritele on täheldatud ka teistes uuringutes (Yusof *et al.*, 2000; Chaveerach *et al.*, 2002; Fooks, Gibson, 2002; Annuk *et al.*, 2003).

Järeldused

Probiootikumide antagonistlik aktiivsus avaldub *C. jejuni* tüvede arvukuse pärssimises ainult sobiva pro- ja prebiootikumi koostoimel. *L. acidophilus* ATCC 4356 koostoimes 1% inuliini või 1% oligofruktoosiga ning *B. bifidum* Bb12 ja *B. longum* B46 koostoimes 1% oligofruktoosiga omavad antagonistlikku aktiivsust *C. jejuni* suhtes *in vitro*. Pro- ja prebiootikumide antagonistlik aktiivsus on seletatav intensiivsema orgaanilis-

te hapete produktsiooniga ning sellest tuleneva pH lan-
gusega kasvukeskkonnas. Tänuavaldused

Käesolev töö on valminud EMÜ veterinaarmeditsiini
ja loomakasvatuse instituudi toiduhügieeni osakonnas.
Uurimistööd finantseerisid Eesti Maaülikooli baasfi-
nantseerimise projekt 'Bioloogilised ja keemilised ohud
toidu tootmise ahelas ja nende minimeerimise võimalu-
sed' (Projekt 8-2/T5081VLVL05) ja EMÜ doktorikool.

Kirjandus

- Akalin, A.S., Akbut, N and Fenderya, S. 2004. Viability and activity of bifidobacteria in yoghurt containing fructooligosaccharide during refrigerated storage. – International Journal of Food Science and Technology, 39, p. 613–621.
- Anuk, H., Kullisaar, T., Mikelsaar, M., Shchepetova, J., Songisepp, E., Zilmer M. 2003. Characterization of intestinal lactobacilli as putative probiotic candidates. – Journal of Applied Microbiology, 94, p. 403–412.
- Asahara, T., Nomoto, K., Watanuki, M., Yokokura, T. 2001. Antimicrobial activity of intraurethrally administered probiotic *Lactobacillus casei* in a murine model of *Escherichia coli* urinary tract infection. – Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 45(6), p. 1751–1760.
- Barbés, C., Boris, S., Fernández, M.F. 2003. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. Journal of Applied Microbiology, 94, p. 449–455.
- Bernet-Camard, M.-F., Coconnier, Hudault, S., M.-H., Liévin, V., Servin, A. 1997. Antibacterial effect of the adhering human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 41(5), p. 1046–1052.
- Boscher, D., Franck, A. and van Loo, J. 2006. Inulin and oligofructose as prebiotics in the prevention of intestinal infections and diseases. – Nutrition Research Reviews, 19, p. 216–226.
- Chaveerach, P., Keuzenkamp, van Knapen, F., D.A., Lipman, L.J.A., Urlings, H.A.P. 2002. *In vitro* study on the effect of organic acids on *Campylobacter jejuni/coli* populations in mixtures of water and feed. Poultry Science, 81, p. 621–628.
- Chaveerach, P., Lipman, L.J.A., Knapen, F. 2004. Antagonistic activities of several bacteria on *in vitro* growth of 10 strains of *Campylobacter jejuni/coli*. – International Journal of Food Microbiology, 90, p. 43–50.
- Collins, M.D., Gibson, G.R. 1999. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. American Journal of Clinical Nutrition, 69, p. 1052–1057.
- Conway, P.L. 2001. Probiotics and human health: The state-of-the-art and future perspectives. Scandinavian Journal of Nutrition, 45, p. 13–21.
- Corcoran, B.M., Fitzgerald, G.F., Ross, R.P., Stanton, C. 2004. Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. Journal of Applied Microbiology, 96, p. 1024–1039.
- Drakslar, D., Gonzáles, S., Oliver, G. 2004. Preliminary assays for the development of a probiotic for goats. Reproduction Nutrition Development, 44, p. 397–405.
- Drago, L., Gismondo M.R., Gozzini, L., Haën, C., Lombardi, A. 1997. Inhibition of *in vitro* growth of enteropathogens by new *Lactobacillus* isolates of human intestinal origin. FEMS Microbiology Letters, 153, p. 455–463.
- EFSA. 2006. The Community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2005. Information on specific zoonoses. *Campylobacter*. – The European Food Safety Authority (EFSA) Journal, 94, p. 83–104.
- EFSA. 2009. The Community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2007. Information on specific zoonoses. *Campylobacter*. – The European Food Safety Authority (EFSA) Journal 2009, p. 95–116.
- Elias, P., Juhkam, K., Roasto, M., Tamme, T. 2007. Viability of *Lactobacillus acidophilus* in yoghurt containing inulin or oligofructose during refrigerated storage. Milchwissenschaft/Milk Science International, 62(1), p. 52–54.
- Fooks, L.J., Gibson, G.R. 2002. *In vitro* investigations of the effect of probiotics and prebiotics on selected human intestinal pathogens. FEMS Microbiology Ecology, 39, p. 67–75.
- Fooks, L.J., Gibson, G.R. 2003. Mixed culture fermentation studies on the effects of synbiotics on the human intestinal pathogens *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli*. Anaerobe, 9, p. 231–242.
- Gibson, G.R., Wang, X. 1994. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. – Journal of Applied Bacteriology, 77(4), p. 412–420.
- Hütt, P., Kullisaar, T., Lõivukene, K., Mikelsaar, M., Shchepetova, J. 2006. Antagonistic activity of probiotic lactobacilli and bifidobacteria against entero- and uropathogens. – Journal of Applied Microbiology, 100, p. 1324–1332.
- Kizerwetter-Świda, M., Binek, M. 2005. Selection of potentially probiotic *Lactobacillus* strains towards their inhibitory activity against poultry enteropathogenic bacteria. Polish Journal of Microbiology, 54(4), p. 287–294.
- Klewicki R., Klewicka E. 2004. Antagonistic activity of lactic acid bacteria as probiotics against selected bacteria of the *Enterobacteriaceae* family in the presence of polyols and their galactosyl derivatives. Biotechnology Letters, 26, p. 317–320.
- Meremäe, K. 2010. *Campylobacter* spp. in Estonian broiler chicken production chain and the co-effect of pro- and prebiotics to the *Campylobacter* spp. strains *in vitro*. A Thesis. Tartu, 93.
- Meremäe, K., Elias, P., Tamme, T., Kramarenko, T., Lillenberg, M., Karus, A., Hänninen, M.-L., Roasto, M. 2010. The occurrence of *Campylobacter* spp. in Estonian broiler chicken production in 2002–2007. Food Control, 21, p. 272–275.
- Niness, K.R. 1999. Inulin and oligofructose: what are they? Journal of Nutrition, 129, p. 1402–1406.
- Patterson, J.A., Burkholder, K.M. 2003. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. Poultry Science, 82, p. 627–631.
- Rautelin, H., Hänninen, M.-L. 2000. *Campylobacters*: the most common bacterial enteropathogens in the Nordic countries. Annals of Medicine, 32, p. 440–445.
- Roberfroid, M.B. 2000. Prebiotics and probiotics: are they functional foods? American Journal of Clinical Nutrition, 71, p. 1682–1687.
- Rowe, M.T., Madden, R.H. 2000. *Campylobacter*. In: Robinson, R.K., Batt, C.A., Patel, P.D. (Eds.), Encyclopedia of food microbiology. Academic Press, p. 335–352.
- Rowland, I. 1999. Probiotics and benefits to human health – the evidence in favour. Environmental Microbiology, 1(5), p. 375–382.
- Sanders, M.E., 2000. Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health. Journal of Nutrition, 130, p. 384–390.

- Skirrow, M.B., Blaser, M.J. 2000. Clinical aspects of *Campylobacter* infection. In: Nachamkin, I., Blaser, M.J. (Eds.), *Campylobacter*. American Society for Microbiology Press, Washington, DC, p. 69–88.
- Wingstrand, A., Neimann, J., Engberg, J., Nielsen, E.M., Gerner-Smidt, P., Wegener, H.C., Molbak, K. 2006. Fresh chicken as main risk factor for campylobacteriosis, Denmark. *Emerging Infectious Diseases*, 12(2), p. 280–284.
- Van der Meulen, R., Avonts, L. and De Vuyst, L. 2004. Short fractions of oligofructose are preferentially metabolized by *Bifidobacterium animalis* DN-173 010. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, p. 1923–1930.
- Vernazza, C.L., Gibson, G.R., Rastall, R.A. 2006. Carbohydrate preference, acid tolerance and bile tolerance in five strains of *Bifidobacterium*. – *Journal of Applied Microbiology*, 100, p. 846–853.
- Yusof, R.M., Haque, F., Ismail, M. and Hassan, Z., 2000. Isolation of *Bifidobacterium infantis* and its antagonistic activity against ETEC 0157 and *Salmonella typhimurium* S-285 in weaning foods. – *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 9, p. 130–135.

The antagonistic activity of probiotics against *Campylobacter jejuni* in vitro

Kadrin Meremäe*, Priit Elias, Mati Roasto, Terje Elias
Estonian University of Life Sciences,
kadrin.meremae@emu.ee

Summary

Campylobacter jejuni is one of the most frequent bacterial cause of acute gastroenteritis in humans. In terms of human health, probiotic bacteria can be used to control pathogenic bacteria in growth media. Furthermore, the probiotic bacteria

combined with suitable prebiotic ingredient have a synergistic co-effect, creating a competitive advantage in front of pathogenic bacteria. This review article summarises Kadrin Meremäe's PhD thesis part II: The co-effect of pro- and prebiotics to the *Campylobacter* spp. strains *in vitro*. The aim of this study was to investigate the antagonistic activity of selected lactobacilli and bifidobacteria combined with and without inulin and oligofructose to the *C. jejuni* strains of human origin *in vitro*. The effect of *L. acidophilus* ATCC 4356, *L. fermentum* ATCC 14931, *B. bifidum* Bb12 or *B. longum* B46 in combination with and without prebiotic ingredient on the growth of *C. jejuni* *in vitro* is shown in Tables 1–4. Our results indicated that *L. acidophilus* ATCC 4356 combined with 1% inulin or 1% oligofructose and *B. bifidum* Bb12 as well as *B. longum* B46 with 1% oligofructose totally inhibited the growth of all the tested *C. jejuni* strains below detection limit (< 1 CFU/ml). Consequently, in order to reduce and inhibit *C. jejuni*, the effective combinations of pro- and prebiotic were developed *in vitro*. There are no statistical differences ($P > 0.05$) in the effect of the selected probiotic bacteria on the colony forming units of *C. jejuni* strains that originated from human feces. Consequently, the antagonistic activity of probiotic bacteria against all the tested campylobacters depended on the probiotic strain and on the presence of prebiotic ingredient but was not dependent on the *C. jejuni* strains. The concentrations of lactic and acetic acid produced by *L. acidophilus* ATCC 4356, *L. fermentum* ATCC 14931, *B. bifidum* Bb12, and *B. longum* B46 and dynamics of pH in the media were analysed in MH broths with and without 1% inulin or 1% oligofructose (Table 5). Our findings showed that the antagonistic activity of selected probiotic bacteria against *C. jejuni* was mostly related to the decrease of pH via the production of lactic and acetic acids in growth media. The higher concentrations of organic acids at pH 4.28 to 4.69 probably lead to the strengthening of the antagonistic effect of selected probiotics in combination with 1% prebiotic against *C. jejuni*.