

Metody oceny skuteczności działania substancji pre-, pro- i synbiotycznych na stan mikroflory przewodu pokarmowego organizmów zwierzęcych*)

IZABELA KOZŁOWSKA, AGATA DANKOWIAKOWSKA, MAREK BEDNARCZYK

Katedra Biotechnologii Zwierząt Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt
Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich, ul. Mazowiecka 28, 85-084 Bydgoszcz

Kozłowska I., Dankowiakowska A., Bednarczyk M.

Methods of evaluating the influence of pre-, pro- and symbiotic substances on the gastrointestinal microflora in animals

Summary

The gastrointestinal tract of animals harbors a large, complex and dynamic microbiome important to the growth and health of livestock animals. This microbiome can be directly modulated, for example by antibiotic treatment or by various bioactive substances. Following the ban on the in-feed use of antibiotic growth promoters in the EU, an increased effort has been put into discovering an alternative in animal production. An indispensable tool for the evaluation of bioactive substances are complex studies combining *in vitro* and *in vivo* methods. They consist of precision tests that make it possible to evaluate not only the characteristics of specific strains of bacteria, but also the safety of their application. This paper presents the most important methods for the evaluation and selection of *in vitro* and *in vivo* bioactive substances that make it possible to stimulate the gastrointestinal microbiome of animals.

Keywords: *in vitro*, *in vivo*, *in ovo*, bioactive substances

Bezpieczeństwo żywności jest jednym z głównych celów, jaki stawia przed sobą Unia Europejska. Wpływ na jakość artykułów żywnościowych ma wiele biologicznych, chemicznych lub fizycznych czynników, które wymagają stałego, konsekwentnego monitoringu i oceny w kontekście zdrowia człowieka. W odniesieniu do produkcji zwierzęcej gromadzone są dane wskazujące na ścisły związek zdrowia człowieka ze zdrowiem zwierząt. Tak więc koncepcja „jednego zdrowia” stanowi pomost pomiędzy troską o zdrowie zwierząt a ochroną zdrowia publicznego.

Zoonozy, choroby odzwierzęce, w tym pojawiające się nowe jednostki chorobowe, w połączeniu z coraz większą modyfikacją środowiska naturalnego oraz powszechna globalizacja i urbanizacja mogą stanowić istotne źródło zagrożenia zdrowia publicznego. Zwierzęta stają się często wektorami przenoszącymi choroby i źródłem chorób powodowanych przez żywność nieodpowiedniej jakości. W ciągu ostatnich dziesięciu lat około 75% nowo pojawiających się chorób ludzi było pochodzenia zwierzęcego. Obecnie sklasyfikowano ponad 200 zoonoz, aczkolwiek szacuje się,

że jest ich znacznie więcej w zależności od przyjętych kryteriów oceny (32).

Postępująca intensyfikacja produkcji zwierzęcej wiąże się z zagrożeniami. W wielu krajach, zarówno rozwiniętych, jak i rozwijających się, jak wskazują raporty European Food Safety Authority (EFSA), produkcja zwierzęca oraz jej produkty mogą stanowić potencjalne źródło zakażeń ludzi wielu zoonozami, z których obecnie najczęstsze to kamylobakterioza i salmonelloza, np. mięso drobiowe stanowi od 20% do 30% przypadków kamylobakteriozy u ludzi (EFSA, 2010), natomiast udokumentowane przypadki salmonellozy w UE wyniosły w 2005 r. średnio 38,2 zachorowań na 100 000 mieszkańców (EFSA, 2006). Wycofanie w krajach UE z dniem 1 stycznia 2006 r. antybiotykowych stymulatorów wzrostu (ASW) jako dodatków paszowych stanowi wyzwanie dla hodowców oraz producentów pasz. Skłania do poszukiwania nowych rozwiązań żywieniowych oraz stosowania takich dodatków, które będą bezpieczne dla zwierząt oraz w produkcji żywności.

Rolę taką mogą spełniać probiotyki, prebiotyki i ich kombinacja, czyli synbiotyki. Probiotyki to kultury mikroorganizmów składające się z jednego lub więcej

*) Praca finansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na podstawie decyzji numer DEC-2011/01/B/NZ9/00642.

gatunków, które po wprowadzeniu do przewodu pokarmowego zwierząt lub ludzi kolonizują jelito grube, wpływając korzystnie na znajdującą się tam mikroflorę, przyczyniając się do zachowania zdrowia organizmu gospodarza (39). Efektywność działań probiotyków wspomagają prebiotyki – substancje, najczęściej o charakterze węglowodanów, niezdolne do trawienia przez enzymy endogenne górnego odcinka przewodu pokarmowego zwierząt jednożołądkowych, transportowane w niezmięnionej postaci do jelita grubego, gdzie są wykorzystywane przez bytującą tam, korzystną dla zdrowia mikroflorę przewodu pokarmowego (34).

W ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat przeprowadzono wiele doświadczeń nad optymalnym doborem wspomnianych dodatków, ich oddziaływaniem na cechy produkcyjne zwierząt oraz nad mechanizmami ich oddziaływania (7, 9, 11, 17, 18, 27). W efekcie uzyskano wiele często wykluczających się wyników, które są efektem m.in. odmiennej procedury doświadczalnej, a przede wszystkim różnorodności stosowanych substancji bioaktywnych, uniemożliwiających porównanie wyników prac różnych autorów (12, 26). Wydaje się, że kluczowym zagadnieniem w skutecznej stymulacji mikrobiomu zwierząt, a więc tego złożonego i dynamicznego układu mikroflory bytującego w przewodzie pokarmowym, jest odpowiednia selekcja substancji bioaktywnych oraz określenie ich mechanizmów działania. Warunkiem prawidłowej selekcji jest wybór odpowiednich kryteriów i metod jej realizacji.

Według Charterisa (5), kryteria selekcyjne dla probiotyków można podzielić pod względem technologicznym (łatwy i tani w uzyskaniu oraz obróbce, łatwy w przechowywaniu) i naukowym. Do ostatnich należą takie elementy, jak: odporność na czynniki biorące udział w trawieniu prowadzonym w górnych odcinkach przewodu pokarmowego, zdolność redukcji poziomu cholesterolu we krwi, zdolność do obniżania ciśnienia krwi i redukcji biegunek, zdolność adhezji do nabłonka okrężnicy, stymulacja układu immunologicznego, zmniejszenie ryzyka wystąpienia nowotworów okrężnicy, zdolność do produkcji substancji szkodliwych dla bakterii patogennych itp. (10, 26). Ponadto ważne są także: bezpieczeństwo biologiczne probiotyku, metoda jego produkcji, przetwarzania, aplikacji oraz optymalne miejsce administracji w organizmie (15).

Natomiast cechy potencjalnie idealnego probiotyku są następujące: odporny na kwasowość, hydrolizę oraz absorpcję w przewodzie pokarmowym ssaków; ulega fermentacji prowadzonej przez mikroflorę jelit; wpływa pozytywnie na wzrost i aktywność prozdrowotnych mikroorganizmów jelita grubego, przyczyniając się do poprawy zdrowia gospodarza (13, 34).

Odpowiednie dobranie synbiotycznych par bakterii probiotycznych spełniających ww. założenia oraz dobranych do nich, uzupełniających prebiotyków wspo-

magających ich wzrost daje możliwość stworzenia substancji optymalnej (4). Uzyskanie takiej substancji możliwe jest pod warunkiem wypracowania odpowiednich metod oceny oraz przeprowadzenia testów porównawczych. Aby zrozumieć rolę, jaką odgrywają poszczególne suplementy, konieczne jest wykonanie badań zarówno w warunkach *in vitro*, jak i takich, które wymagałyby użycia żywych organizmów (30). Celem niniejszej pracy jest analiza najważniejszych metod oceny oraz selekcji *in vitro* i *in vivo* probiotyków wpływających na stymulację mikroflory przewodu pokarmowego organizmów zwierzęcych.

Ocena *in vitro* substancji bioaktywnych

Dokonując selekcji substancji bioaktywnych w testach *in vitro*, wykonuje się szereg badań, które skupiają się głównie na zmianach liczebności bakterii probiotycznych, ich identyfikacji i przeżywalności, zdolności adhezyjnych, wpływie określonych czynników probiotycznych na aktywność tych bakterii, a także na zmianach w poziomie metabolitów bakterii probiotycznych wzbogaconych prebiotykami. W tym celu zostało opracowanych wiele metod badających powyższe właściwości. Do najważniejszych należą klasyczne i molekularne technologie identyfikacji mikroorganizmów oraz modele symulujące układ pokarmowy (lub jego określoną część) zwierząt monogastrycznych, jak: fermentatory, chemostaty, a nawet hodowle tkankowe.

Izolując bakterie z próbek kału lub innych źródeł, największym problemem staje się ich identyfikacja (34). O powodzeniu oznaczenia gatunku bakterii probiotycznej w optymalnym medium hodowlanym decydują takie czynniki, jak: selektywność pożywki, identyfikacja kolonii przy użyciu mikroskopu, świeżość składników medium oraz sam skład medium (35). Klasyczne oznaczanie gatunków w testach *in vitro*, jak i *in vivo* może odbywać się na wiele sposobów. Są to m.in.: wygląd kolonii, morfologia oceniana mikroskopowo, obecność specyficznych enzymów (4), wzory fermentacji cukrów (16), a także testy API (19). Powszechnie stosowane techniki z użyciem podłoży selekcyjnych nie dają pełnej pewności co do zidentyfikowanych gatunków bakterii. Klasyczna kulturowa charakterystyka bakterii jest co prawda szybka, niedroga, pozwalająca przeprowadzić dużą liczbę powtórzeń, jednak jest metodą subiektywną, ograniczoną do bakterii zdolnych do wytworzenia kolonii, a metaboliczna plastyczność organizmów może prowadzić do błędów w odczycie (34). Także ocena liczebności bakterii probiotycznych za pomocą dostępnych mediów hodowlanych nie jest pozbawiona błędów. Najczęściej pomiary *in vitro* i *in vivo* liczebności oraz działalności probiotyków skupiają się głównie na gatunkach *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* (2, 31). Dla pełnej oceny konieczne jest jednak poszerzenie tego pola o inne gatunki, które również mogą mieć wpływ na efektywność działania bakterii probiotycznych (40).

Molekularne sposoby identyfikacji są bardziej wiarygodne i mogą obejmować pełną różnorodność mikroflory (34), np. w oparciu o częściową analizę sekwencji genu kinazy pirogronianowej (43) oraz z wykorzystaniem technik PCR, takich jak: 16S rRNA, ITS i recA (7, 30), a także TGGE (temperature gradient gel electrophoresis) oraz DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis). Jedną z najlepszych i najbardziej rozpowszechnionych (6, 23, 28, 33, 36) metod jest fluorescent in situ hybridization (FISH). Metoda FISH pozwala na uzyskanie informacji o pojedynczych komórkach w próbkach kału, dzięki zastosowaniu wrażliwych na fluorescencję sond, które hybrydują bezpośrednio do komórek osadzonych na szkiełku podstawowym (30, 41, 42). Szacuje się, iż FISH daje możliwość wskazania około dziesięciokrotnie wyższej liczby bakterii w próbach kału niż tradycyjne techniki hodowlane (30), jednak jednoczesne zastosowanie co najmniej dwóch sond pozwala prawidłowo zidentyfikować mikroorganizmy, gdyż sygnał nadawany przez obie sondy potwierdza obecność poszukiwanych sekwencji charakterystycznych dla danego gatunku. Ponadto do wad trzeba zaliczyć czasochłonność procedury oraz dostępność sond, które są ograniczone dla znanych bakterii (34).

Techniki TGGE oraz DGGE pozwalają na szybką i dokładną ocenę mikroflory jelit zmieniającą się w czasie, w oparciu o powielone fragmenty 16S rRNA bakterii (3). Elektroforetyczny rozdział powielonych w reakcji PCR fragmentów DNA następuje na skutek różnic w chemicznej bądź też termicznej stabilności genów (46). TGGE i DGGE umożliwiają wykrycie nowych szczepów przewodu pokarmowego (30), zarówno tych tworzących, jak i nie tworzących kolonie. Metody TGGE i DGGE pozwalają na analizę bardziej jakościową niż ilościową (34).

Modele symulujące układ pokarmowy

Pełne odtworzenie swego mikroklimate jelita grubego w warunkach laboratoryjnych na dzień dzisiejszy nie jest, niestety, możliwe, jednakże opracowanych zostało wiele metod naśladujących naturalne warunki występowania drobnoustrojów przewodu pokarmowego. Jednym z pierwszych takich systemów jest hodowla mikroorganizmów probiotycznych na mediach hodowlanych. Czynniki, które muszą zostać spełnione przy zakładaniu hodowli *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* to: dostępność składników odżywczych i substancji wzrostowych, niski potencjał oksydacyjno-redukcyjny, stałe pH (35). W przypadku oceny synbiotyków pożywki zawierają dodatki prebiotyków, najczęściej w postaci fruktooligosacharydów lub innych węglowodanów (47). Rozkład tych substancji ocenia się poprzez wzrost bakterii probiotycznych i zmiany pH medium (4).

W ocenie właściwości probiotycznych substancji niezwykle cennym symulatorem okazały się fermentatory i prowadzone w nich fermentacje tych związków z wykorzystaniem bakterii kałowych. Dzięki takim systemom można ocenić zawartość krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych i innych produktów końcowych rozkładu prebiotyków przez bakterie jelitowe. Produkcja kwasów w procesie fermentacji cukrów znacznie różni się pomiędzy gatunkami. Statyczna hodowla na podłożu płynnym jest obecnie najprostszym na rynku rodzajem fermentatora. Ten model symulujący fermentację w jelicie grubym został wykorzystany w wielu badaniach (28, 29, 36). Typowy mechanizm składa się z zespołów szklanych naczyń (z płaszczem wodnym lub bez), głównej jednostki kontrolującej, mieszaczy, kontrolerów temperatury oraz pH.

Fermentatory umożliwiają badanie substancji nawet w niewielkich stężeniach (29), są szybkie, mogą być prowadzone równocześnie w kilku zestawach, przez co dają możliwość szybkiej oceny porównawczej (13, 36), są jednak systemami zamkniętymi z ograniczoną ilością substratu, co ogranicza ich zastosowanie do krótkoterminowych eksperymentów (13). Nie uwzględniają również takich niebagatelnych czynników, jak ruchy perystaltyczne oraz procesy zachodzące w komórkach układu pokarmowego.

Bardziej złożonym mechanizmem służącymi do pomiaru zdolności synbiotycznych pre- i probiotyków są chemostaty i prowadzone w nich ciągłe systemy hodowli. Systemy te wykorzystują nawet kilkanaście połączonych ze sobą naczyń (24), z których każde reprezentuje inną część przewodu pokarmowego, a cały system jest sterowany komputerowo. Jednoetapowy model został użyty przez Gibsona i Wanga (14) i był nazywany chemostatem dyfuzyjnym. Składał się z dwóch połączonych ze sobą komór oddzielonych specyficzną membraną, umożliwiającą wymianę substancji (wzrostowych, metabolitów) pomiędzy nimi, membrana ta nie była jednak przepuszczalna dla samych komórek.

Bardziej złożone modele wieloetapowe uwzględniają o wiele więcej warunków fizykochemicznych, na jakie natrafia przesuwająca się treść w układzie pokarmowym. Dlatego też zostały nazwane „gut models”, gdyż w sposób bardziej precyzyjny odzwierciedlają różne warunki panujące w jelitach żywego organizmu (tab. 1).

Bakterie probiotyczne mają zdolność blokowania kolonizacji bakterii patogennych i adhezji do nabłonka jelit. Najbardziej efektywną, powtarzalną oraz czułą metodą *in vitro* pomiaru zdolności adhezyjnych bakterii niekorzystnych dla zdrowia jest znakowanie radioaktywne. Również znakowanie fluorescencyjne jest metodą szybką i powtarzalną, lecz jego czułość dla słabo przylegających bakterii jest zbyt niska (44). Hodowle tkankowe najbardziej przypominające rzeczywiste warunki jelita grubego, służące do oceny przyczepności bakterii to Caco-2 oraz HT-29-MTX (37). Model jednowarstwowej hodowli Caco-2 z do-

Tab. 1. Charakterystyka wybranych modeli symulujących układ pokarmowy

Model	Charakterystyka	Autor
Trzyetapowy ciągły system hodowli	<ul style="list-style-type: none"> - 3 połączone, ustawione w szeregu naczynia: proksymalna część jelita grubego (kwaśne warunki, bogaty w substancje odżywcze – węglowodany, szybki pasaż), okrężnica poprzeczna oraz część dystalna (obojętne warunki, ubogi w węglowodany, wolny pasaż); - nieprzerwane dostarczanie medium; - skład treści odtworzony przez próbki pochodzące z ludzkich zwłok 	21
SHIME (Simulated Human Intestinal Microbial Ecosystem reactor)	<ul style="list-style-type: none"> - 5 głównych naczyń: dwa pierwsze symulują jelito cienkie; trzy następne – jelito grube; - uruchamiany na 2 tygodnie przed eksperymentem; - pierwsze trzy komory są zaopatrywane w treść w sposób półciągły; dwie ostatnie w sposób ciągły; - część proksymalna bogata w bakterie sacharolityczne (<i>Bacteroides</i>; <i>Eubacterium</i>); część dystalna wzbogacona w bakterie rozkładające mucynę 	25
Enteromix colon Simulator	<ul style="list-style-type: none"> - 4 główne naczynia (od części proksymalnej do dystalnej); - przepływ gazów i cieczy regulowany przez magnetyczne zawory przy użyciu komputera; - transport treści zachodzi w sposób półciągły 	22
Trzyetapowy model okrężnicy <i>in vitro</i>	<ul style="list-style-type: none"> - 3 szklane bioreaktory z płaskim dnem; - naczynia symulują proksymalną, poprzeczną oraz dystalną część jelita; - zawiera kałową mikroflorę niemowląt unieruchomioną na polisacharydowych żelowych kulkach; - mogą wystąpić problemy ze stabilnością wolnokomórkowych hodowli zawieszinowych 	6
TIM (TNO Intestinal Model)	<ul style="list-style-type: none"> - dwie części: pierwsza – (8 połączonych szklanych naczyń) symuluje żołądek i jelito cienkie; - druga – (4 połączone szklane naczynia) symuluje jelito grube; - umożliwia wprowadzenie ruchów perystaltycznych dzięki elastycznej ścianie i zastosowaniu ciśnienia wodnego – ściskanie kontroluje komputer; - bardzo dokładny system – stała absorpcja wody i metabolitów przez dializowane membrany 	24

datkiem mucyny najbardziej precyzyjnie oddaje charakter nabłonka *in vivo* (20). Wykorzystując proste modele naśladujące powierzchnie zębowe, udało się wykazać zdolności adhezyjne mikroorganizmów z produktów mlecznych, przyczyniających się do redukcji próchnicy zębów (8). Niestety, prowadzenie takich modeli jest bardzo drogie, czasochłonne i nie bierze pod uwagę wszystkich czynników występujących naturalnie.

Modele *in vitro* symulacji przewodów pokarmowych stanowią nieograniczoną prawami etyki możliwość sprawdzenia zarówno nowych, jak i już dostępnych w użyciu substancji prebiotycznych oraz ich powiązania z probiotyczną mikroflorą jelit. Obecnie istniejące modele nie zastępują jednak w stu procentach organizmu żywego, dlatego kontynuuje się badania w kierunku usprawnienia istniejących modeli lub stworzenia nowych.

Ocena *in vivo* substancji bioaktywnych

Według kryteriów WHO (38), chcąc dokonać rejestracji danej substancji probiotycznej należy wykonać szereg badań, spośród nich ważną rolę odgrywają testy *in vivo* wykonane na modelu zwierzęcym. W ocenie *in vivo* uwzględnia się takie parametry, jak: kondycja, objawy, dobrostan, zmniejszone ryzyko zachorowania, dłuższy czas remisji, szybsze wyzdrowienie po chorobie. W procedurze klinicznej wyróżnia się trzy etapy: faza 1 – ocena bezpieczeństwa probiotyku, faza 2 – ocena skuteczności danego szczepu i ewentualnych działań niepożądanych, badanie z randomizacją i podwójną ślepą próbą, kontrolowane placebo, faza 3 – ocena skuteczności probiotyku w porównaniu ze standardowym leczeniem.

Skuteczność działania substancji bioaktywnych *in vivo* analizuje się na podstawie parametrów fizjologicznych i immunologicznych organizmu. Ocenie podlegają wskaźniki biochemiczne krwi, stężenie hormonów oraz immunoglobulin w osoczu krwi, a także aktywność enzymów trzustkowych. Ponadto, w zależności od gatunku zwierzęcia, sposobu podania substancji oraz dawki, pod uwagę należy wziąć przeżywalność, masę ciała, dzienne przyrosty oraz wskaźniki: wykorzystania paszy (FCR) oraz europejski wskaźnik wydajności (EWW). Do analiz pobierane są również próbki kału w celu oceny profilu bakteryjnego. Ocenie podlegają również narządy wewnętrzne (śledziona, grasica), ich stosunek do masy ciała zwierzęcia. Szczególnie istotna jest ocena morfologii nabłonka jelitowego, w tym: wysokości kosmków jelitowych, powierzchni i głębokości krypt jelitowych, grubości warstwy podsłuzowej, liczby komórek kubkowych oraz poziomu skolonizowania i adhezji bakterii probiotycznych. Adhezję mikroorganizmów probiotycznych można badać *in vivo*, wykonując biopsję nabłonka po stymulacji dawcy suplementami, metoda ta jest jednak czasochłonna, ograniczona do liczby osobników oraz mało precyzyjna ze względu na dużą utratę bakterii podczas opróżniania jelita w celu wykonania kolonoskopii (37).

Kosztowne oraz ograniczone prawami etyki badania *in vivo* poprzedzają zazwyczaj eksperymenty nie wykorzystujące modeli zwierzęcych. Mogą one być tworzone w celu eliminacji substancji bioaktywnych, które wcale lub w bardzo niskim stopniu stymulują wybrane funkcje organizmu żywego, oraz w celu selekcji substancji o najbardziej pożądanym działaniu. Grupa preparatów, które pomyślnie przeszły selekcję

in vitro, może być dalej oceniana i brakowana na zwierzętach (4, 17). Wykazano między innymi, iż prawidłowo dobrane substancje pro- i prebiotyczne w warunkach testów na mediach hodowlanych potwierdzają swoje synbiotyczne właściwości *in vivo* (4).

Efektywną i stosunkową nową metodą dostarczenia substancji bioaktywnych *in vivo* jest ich iniekcja do komory powietrznej inkubowanego jaja (45). Wykorzystanie modelu zarodka kury pozwala prowadzić selekcję substancji bioaktywnych w oparciu o ocenę mikroflory jelitowej oraz wybranych parametrów metabolicznych lub/ oraz ocenę systemu immunologicznego (1, 2, 31). Zaletami stosowania metody *in ovo* są: obniżenie kosztów robocizny, precyzja zabiegu, eliminacja niekorzystnie wpływających na wylęgowość czynników, stymulacja rozwoju embrionalnego, należy jednak wziąć pod uwagę dawkę, rodzaj substancji oraz miejsce podania szczepionki, a także wiek zarodka (31).

Podsumowanie

Niezbędnym narzędziem do walidacji substancji bioaktywnych są kompleksowe badania łączące metody *in vitro* oraz *in vivo*. Stanowią one grupę precyzyjnych testów, które nie ograniczają się tylko do oceny właściwości danego szczepu bakterii, ale przede wszystkim umożliwiają ocenę bezpieczeństwa jego stosowania. Często zdarza się tak, iż dopiero w testach *in vivo* wychodzą na jaw negatywne skutki nie w pełni przebadanych *in vitro* substancji bioaktywnych. Konieczne jest zatem poszerzenie tych doświadczeń o modele zwierzęce lub udoskonalenie istniejących metod *in vitro*, aby precyzyjnie oddawały złożoność naturalnych procesów mających miejsce w żywym organizmie. Dopiero właściwie przebadane zarówno pod kątem *in vitro*, jak i *in vivo* szczepy bakterii probiotycznych oraz prebiotyczne substraty ich metabolizmu mogą skutkować znacznym wzmożeniem odpowiedzi immunologicznej i antynowotworowej, redukcją chorób przewodu pokarmowego, spadkiem stężenia cholesterolu we krwi, lepszym wykorzystaniem paszy oraz lepszymi przyrostami. Konieczna jest więc dalsza selekcja substancji bioaktywnych w oparciu o kompleksowe badania *in vitro* i *in vivo*, gdyż tylko one w pełni obrazują rzeczywistą skuteczność działania tych preparatów.

Piśmiennictwo

1. Bednarczyk M., Brzezińska J., Sławińska A., Siwek M., Ubranowski M., Kasperczyk K.: Technologia *in ovo* – narzędziem w nowoczesnej profilaktyce drobiu. *Biotechnol.* 2010, 1, 109-118.
2. Bednarczyk M., Urbanowski M., Gulewicz P., Kasperczyk K., Maiorano G., Szwaczkowski T.: Field and *in vitro* study on prebiotic effect of raffinose family oligosaccharides. *Biull. Vet. Institut. Pulawy* 2011, 55, 465-469.
3. Bello F. D., Walter J., Hertel C., Hammes W. P.: *In vitro* study of Prebiotic Properties of Levan-type Exopolysaccharides from Lactobacilli and Non-digestible Carbohydrates Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *System. Appl. Microbiol.* 2001, 24, 232-237.
4. Bielecka M., Biedrzycka E., Majkowska A.: Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their *in vivo* effectiveness. *Food Research Int.* 2002, 35, 125-131.
5. Charteris W., Kelly P. M., Morelli L., Collins J. K.: Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. *Int. J. Dairy Tech.* 1998, 51, 123-136.
6. Cinquin C., Le Blay G., Fliss I., Lacroix C.: New three-stage *in vitro* model for infant colonic fermentation with immobilized fecal microbiota. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2006, 57, 324-336.
7. Collado M. C., Meriluoto J., Salminen S.: *In vitro* analysis of probiotic strain combinations to inhibit pathogen adhesion to human intestinal mucus. *Food Research Int.* 2007, 40, 629-636.
8. Comelli E. M., Guggenheim B., Stingle F., Neeser J. R.: Selection of dairy bacterial strains as probiotics for oral health. *Eur. J. Oral. Sci.* 2002, 110, 218-224.
9. Drouault-Holowacz S., Foligne B., Dennin V., Goudercourt D., Terpend K., Burckel A., Pot B.: Anti-inflammatory potential of the probiotic dietary supplement Lactibiane Tolérance: *In vitro* and *in vivo* considerations. *Clin. Nutr.* 2006, 25, 994-1003.
10. Dunne C., O'Mahony L., Murphy L., Thornton G., Morrissey D., O'Halloran S., Feeney M., Flynn S., Fitzgerald G., Daly C., Kiely B., O'Sullivan G. C., Shanahan F., Collins J. K.: *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. *Am. J. Clin. Nutr.* 2001, 73, 386-392.
11. Ewaschuk J. B., Walker J. W., Diaz H., Madsen K. L.: Bioproduction of conjugated linoleic acid by probiotic bacteria occurs *in vitro* and *in vivo* in mice. *J. Nutr.* 2006, 136, 1483-1487.
12. Frece J., Kos B., Beganović J., Vuković S., Šuškić J.: *In vivo* testing of functional properties of three selected probiotic strains. *World J. Microbiol. & Biotech.* 2005, 21, 1401-1408.
13. Gibson G. R., Fuller R.: Aspects of *in vitro* and *in vivo* research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. *J. Nutr.* 2000, 130, 391-395.
14. Gibson G. R., Wang X.: Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 1994, 77, 412-420.
15. Gomez-Gil B., Roque A., Turnbull J. F.: The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquacult.* 2000, 191, 259-270.
16. He F., Ouwehand A. C., Isolauri E., Hashimoto H., Benno Y., Salminen S.: Comparison of mucosal adhesion and species identification of bifidobacteria isolated from healthy and allergic infants. *FEMS Immunol. Medical Microbiol.* 2001, 30, 43-47.
17. Jacobsen N. C., Rosenfeldt Nielsen V., Hayford A. E., Møller P. L., Michaelson K. F., Pærregaard A., Sandström B., Tvede M., Jakobsen M.: Screening of probiotic activities of forty-seven strains of Lactobacillus spp. by *in vitro* techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Appl. and Environmental Microbiol.* 1999, 65, 4949-4956.
18. Koenen M. E., Hulst R. van der., Leering M., Jeurissen S. H. M., Boersma W. J. A.: Development and validation of a new *in vitro* assay for selection of probiotic bacteria that express immune-stimulating properties in chickens *in vivo*. *FEMS Immunol. Medical Microbiol.* 2004, 40, 119-127.
19. Kos B., Šuškić J., Beganović J., Gjurčić K., Frece J., Iannaccone C., Cangarella F.: Characterization of the three selected probiotic strains for the application in food industry. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2008, 24, 699-707.
20. Laparra J. M., Sanz Y.: Comparison of *in vitro* models to study bacterial adhesion to the intestinal epithelium. *Letters in Applied Microbiol.* 2009, 49, 695-701.
21. Macfarlane G. T., Macfarlane S., Gibson G. R.: Validation of a Three-Stage Compound Continuous Culture System for Investigating the Effect of Retention Time on the Ecology and Metabolism of Bacteria in the Human Colon. *Microb. Ecol.* 1998, 35, 180-187.
22. Mäkituokko H. A., Saarinen M. T., Ouwehand A. C., Rautonen N. E.: Effects of lactose on colon microbial community structure and function in a four-stage semi-continuous culture system. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2006, 70, 2056-2063.
23. Mandalari G., Faulks R. M., Bisignano C., Waldron K. W., Narbad A., Wickham M. S. J.: *In vitro* evaluation of the prebiotic properties of almond skins (*Amygdalus communis* L.). *FEMS Microbiol. Lett.* 2010, 304, 116-122.
24. Minekus M., Smeets-Peters M., Bernalier A., Marol-Bonnin S., Havenaar R., Marteau P., Alric M., Fonty G., Huis in't Veld J. H. J.: A computer-controlled system to simulate conditions of the large intestine with peristaltic mixing, water absorption and absorption of fermentation products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1999, 53, 108-114.
25. Molly K., Woestyne M. V., Verstraete W.: Development of a 5-step multi-chamber reactor as a simulation of the human intestinal microbial ecosystem. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1993, 39, 254-258.

26. *Morelli L.*: In vitro selection of probiotic Lactobacilli: A critical appraisal. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 2000, 1, 59-67.
27. *Nilsson U., Öste R., Jägerstad M., Birkhed D.*: Cereal fructans: in vitro and in vivo studies on availability in rats and humans. *J. Nutr.* 1988, 118, 1325-1330.
28. *Ogué-Bon E., Khoo C., McCartney A. L., Gibson G. R., Rastall R. A.*: In vitro effects of synbiotic fermentation on the canine faecal microbiota. *FEMS Microbiol Ecol.* 2010, 73, 587-600.
29. *Olano-Martin E., Mountzouris K. C., Gibson G. R., Rastall R. A.*: In vitro fermentability of dextran, oligodextran and maltodextrin by human gut bacteria. *British J. Nutr.* 2000, 83, 247-255.
30. *O'Sullivan D. J.*: Methods for analysis of the intestinal microflora. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 2000, 1, 39-50.
31. *Pilarski R., Bednarczyk M., Lisowski M., Rutkowski A., Bernacki Z., Gulewicz K.*: Prebiotic activity of α -galactosides injected during embryogenesis on selected chicken traits. *Folia biol.* 2005, 53, 13-20.
32. *Poljak Z.*: Zoonotic diseases from pigs. *Proc. London Swine Confer.* 2009, 95-103.
33. *Pompei A., Cordisco L., Raimondi S., Amaretti A., Pagnoni U. M., Matteuzzi D., Rossi M.*: In vitro comparison of the prebiotic effects of two inulin-type fructans. *Anaerobe.* 2008, 14, 280-286.
34. *Roberfroid M.*: Prebiotics: the concept revisited. *J. Nutr.* 2007, 137, 830-837.
35. *Roy D.*: Media for the isolation and enumeration of bifidobacteria in dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 2001, 69, 167-182.
36. *Rycroft C. E., Jones M. R., Gibson G. R., Rastall R. A.*: A comparative in vitro evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. *J. Appl. Microbiol.* 2001, 91, 878-887.
37. *Saarela M., Mogensen G., Fondén R., Mättö J., Mattila-Sandholm T.*: Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J. Biotech.* 2000, 84, 197-215.
38. *Schmidt M., Olejnik-Schmidt A.*: Metody selekcji mikroorganizmów o właściwościach probiotycznych. *Technika-Technologia* 2010, 64, 40-44.
39. *Shortt C.*: The probiotic century: historical and current perspectives. *Trends in Food Sci. & Technol.* 1999, 10, 411-417.
40. *Strompfová V., Lauková A., Ouwehand A. C.*: Selection of enterococci for potential canine probiotic additives. *Vet. Microbiol.* 2004, 100, 107-114.
41. *Tuohy K. M., Finlay R. K., Wynne A. G., Gibson G. R.*: A human volunteer study on the prebiotic effects of HP-inulin - faecal bacteria enumerated using fluorescent in situ hybridisation (FISH). *Anaerobe.* 2001, 7, 113-118.
42. *Tzortzis G., Goulas A. K., Gee J. M., Gibson G. R.*: A novel galactooligosaccharide mixture increases the bifidobacterial population numbers in a continuous in vitro fermentation system and in the proximal colonic contents of pigs in vivo. *J. Nutr.* 2005, 135, 1726-1731.
43. *Vaugien L., Prevots F., Roques C.*: Bifidobacteria identification based on 16S rRNA and pyruvate kinase partial gene sequence analysis. *Anaerobe.* 2002, 8, 341-344.
44. *Vesterlund S., Palta J., Karp M., Ouwehand A. C.*: Measurement of bacterial adhesion-in vitro evaluation of different methods. *J. Microbiol. Meth.* 2005, 60, 225-233.
45. *Villaluenga C. M., Wardeńska M., Pilarski R., Bednarczyk M., Gulewicz K.*: Utilization of chicken embryo model for assessment of biological activity of different oligosaccharides. *Folia biol.* 2004, 52, 135-142.
46. *Walter J., Tannock G. W., Tilsala-Timisjarvi A., Rodtong S., Loach D. M., Munro K., Alatosava T.*: Detection and identification of gastrointestinal Lactobacillus species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000, 66, 297-303.
47. *Zhang F., Hang X., Fan X., Li G., Yang H.*: Selection and optimization procedure of synbiotic for cholesterol removal. *Anaerobe.* 2007, 13, 185-192.

Adres autora: mgr inż. Izabela Kozłowska, ul. Mazowiecka 28, 85-084 Bydgoszcz; e-mail: izabela.kozlowska@utp.edu.pl