Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu

ALINA KIEŁPIŃSKA
(z d. PACESZ)

Ocena aktywności przeciw-*Clostridium perfringens* wybranych szczepów bakterii fermentacji mlekowej oraz możliwości ich wykorzystania do produkcji probiotycznych dodatków paszowych

Praca doktorska
wykonana w Katedrze Biotechnologii
i Mikrobiologii Żywności
pod kierunkiem
prof. UPP dr hab. Anny Sip

Poznań 2023

Streszczenie

Bakterie *Clostridium perfringens* stanowią poważne zagrożenie dla zwierząt hodowlanych. Do niedawna głównym narzędziem walki z nimi były antybiotyki. Nadmierne stosowanie antybiotyków w produkcji zwierzęcej doprowadziło jednak do pojawienia się szczepów wykazujących antybiotykoodporność. Z uwagi na narastanie tego zjawiska w 2006 roku wprowadzono zakaz stosowania antybiotyków w hodowli zwierząt w celach prewencyjnych oraz jako stymulatorów wzrostu. W związku z tym pojawiła się potrzeba opracowania alternatywnych metod ograniczania rozwoju patogennych *C. perfringens*. Wychodząc naprzeciw tej potrzebie w dysertacji podjęto się opracowania probiotycznych dodatków paszowych zdolnych do antagonistycznego działania na szczepy *C. perfringens* będące przyczyną ostrych infekcji zwierząt hodowanych w naszym kraju.

Aby opracować preparaty przydatne w praktyce, jako wskaźniki do testów aktywności wybrano izolaty *C. perfringens* pozyskane od zwierząt. Najpierw przeprowadzono ich genotypowanie. Na podstawie obecności genów kodujących toksyny α, β, ε, jota oraz β2 ustalono, że należały one do pięciu typów toksycznych - A, B, C, D i E, wśród których wyróżniono również dwa podtypy - A β2 pozytywny i E β2 pozytywny. Toksotyp C był czynnikiem etiologicznym martwiczego zapalenia jelit świń, D i E enterotoksemii bydła i świń, natomiast typy A β2 pozytywny, B oraz E β2 pozytywny wywoływały u drobiu enterotoksemię i martwicze zapalenie jelit. Następnie przystąpiono do izolacji szczepów LAB. Z 69 próbek pobranych od zdrowych prosiąt, cieląt i kurcząt rzeźnych łącznie pozyskano 912 izolatów, które przebadano w kierunku zdolności do antagonistycznego działania na poszczególne typy toksyczne *C. perfringens*. Poszukiwaną aktywność wykryto u 75,7% izolatów od cieląt, 50,4% izolatów od prosiąt oraz prawie 30% izolatów od kurcząt rzeźnych. Otrzymane izolaty cechowa duża wybiórczość działania na *C. perfringens*. Tylko 7% z nich działało antagonistycznie na wszystkie typy toksyczne *C. perfringens*. Żaden z wyizolowanych szczepów nie wykazywał jednak silnej aktywności w stosunku do wszystkich zidentyfikowanych w pracy typów toksycznych *C. perfringens*.

Kluczowym etapem opracowywania formuł probiotycznych był wybór szczepów LAB. W tym celu zidentyfikowano 41 szczepów najbardziej aktywnych przeciwko *C. perfringens* i określono ich potencjał probiotyczny. Aby zrozumieć mechanizmy leżące u podstaw aktywności przeciw-*C. perfringens*, wstępnie wskazano czynniki odpowiedziane za przedmiotowe działanie. Ostatecznie jako składowe preparatów probiotycznych wybrano trzy szczepy: *E. faecium* 10t, *L. paracasei* 11c i *L. plantarum* 12k. Szczep *E. faecium* 10k wykazywał aktywność w stosunku do *C. perfringens* typu A, A β2 pozytywnego, B, C i D, ale tylko na typ C działał silnie. Zakres aktywności *L. paracasei* 11c obejmował *C. perfringens* typu C, D, E i E β2 pozytywnego. Spośród wymienionych typów toksycznych, silnie działał on na dwa toksotypy - C i D. Z kolei szczep *L. plantarum* 12k wykazywał

słabą aktywność w stosunku do wszystkich typów toksycznych *C. perfingens*. Wszystkie wybrane szczepy cechowały się silnymi właściwościami adhezyjnymi względem mucyny świńskiej i dobrze przeżywały symulowany pasaż jelitowy. Nie powodowały hydrolizy soli żółci oraz były wrażliwe na działanie głównych grup antybiotyków stosowanych w zootechnice. W pracy zidentyfikowano ponadto ich najbardziej aktywne wobec *C. perfingens* metabolity zewnątrzkomórkowe. W przypadku *L. paracasei* 11c takim metabolitem była bakteriocyna klasy IIa o masie cząsteczkowej ok. 4,9 kDa, natomiast szczepu *L. plantarum* 12k dwa bioaktywne peptydy masach cząsteczkowych 2,2-2,3 kDa.

Następnie przystąpiono do produkcji preparatów probiotycznych oraz oceny ich stabilności przechowalniczej. Preparaty probiotyczne wytworzono metodą konwencjonalną oraz zmodyfikowaną. Metoda konwencjonalna obejmowała hodowlę wytypowanych szczepów w podłożu płynnym, separację ich biomasy metodą wirowania oraz jej utrwalanie metodą suszenia sublimacyjnego. W ramach tego etapu pracy ustalono warunki optymalne dla wzrostu badanych szczepów oraz zoptymalizowano skład typowej dla LAB pożywki hodowlanej. Zaproponowana w pracy modyfikacja produkcji preparatów probiotycznych polegała na zastąpieniu podłoża płynnego tańszym podłożem półstałym na bazie mąki pszennej, owsianej i kukurydzianej, rezygnacji z separacji biomasy oraz zastosowaniu suszenia rozpyłowego zamiast sublimacyjnego. Ustalono, że do przemysłowej produkcji preparatów probiotycznych najbardziej nadawała się pożywka z mąki kukurydzianej z glukozą, inuliną, ekstraktem drożdżowym oraz ekstraktem sojowym. W pożywce tej wszystkie szczepy rosły lepiej niż w płynnej pożywce MRS (pożywce wyjściowej). *L. paracasei* 11c i *L. plantarum* 12k namnażały się do poziomu ponad 10^{10}jtk/ml, a *E. faecium* 10t do poziomu ponad 10^{9} jtk/ml. Plon biomasy można jeszcze było jeszcze zwiększyć poprzez dodatek białek owadzich. Co istotne hodowle w podłożach półstałych pozwoliły na wytworzenie preparatów probiotycznych metodą bezodciekową. Zaproponowana w pracy modyfikacja była zatem również korzystna z ekologicznego punktu widzenia, ponieważ ograniczyła powstawanie odpadów biologicznych. Poza tym suszenie biomasy z całymi złożami pohodowlanymi pozwoliło na otrzymanie produktów o większej masie, które poprzez to były łatwiejsze do dozowania i mieszania z paszą. Komórki w preparatach otrzymanych w wyniku wysuszenia całych hodowli półstałych były jednak mniej stabilne w trakcie przechowywania niż w preparatach produkowanych w konwencjonalny sposób. Mimo to działały silniej na *C. perfringens*, gdyż były dodatkowo źródłem aktywnych wobec nich metabolitów.

Na bazie szczepów o zdefiniowanej w pracy aktywności można tworzyć preparaty przeznaczone do zwalczania konkretnych typów toksycznych *C. perfringens*. Można je też wykorzystać do konstruowania preparatów wieloszczepowych o szerokim zakresie aktywności przeciw-*C. perfringens*. Wyniki pracy mogą zatem przyczynić się do rozwoju nowych strategii promowania zdrowia zwierząt hodowlanych, a poprzez się również przyczynić się do poprawy jakości i bezpieczeństwa produktów pochodzenia zwierzęcego.

30.08.2023r.
Alina Kiełpińska